

A.18. MOLEKYLÄR MEDELVIKT OCH MOLEKYLÄR VIKTFÖRDELNING AV POLYMERER

1. METOD

Denna kromatografiska metod (genomträngning i gelé) är en kopia på OECD TG 118 (1996). Grundläggande principer och annan teknisk information finns under hänvisning (1).

1.1 INLEDNING

Eftersom polymerernas egenskaper är så varierande är det omöjligt att beskriva en enda metod som ger exakta förhållanden för separation och bedömning som täcker alla eventualiteter och särskilda företeelser vid separation av polymerer. Särskilt komplexa polymera system är ofta inte mottagliga för kromatografisk analys av genomträngning i gelé (GPC). När GPC inte är praktiskt genomförbart kan den molekylära vikten fastställas med andra metoder (se bilaga). I sådana fall skall fullständig information om och motivering för den använda metoden anges.

Den beskrivna metoden grundas på DIN-standard 55672 (1). Detaljerad information om hur experimentet skall utföras och hur datan skall bedömas finns i denna DIN-standard. Om experimentförhållandena måste ändras, skall dessa förändringar motiveras. Andra standarder får tillämpas om full hänvisning därtill görs. I den beskrivna metoden används polystyrenprover med känd polydispersion för kalibrering, som kan behöva anpassas till vissa polymerer, t ex vattenlösliga och anpassade polymerer med långa molekylkedjor.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Den numerära medelmolekylvikten M_n och den viktjämsigt molekylära medelvikten M_w fastställs med följande ekvationer:

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

där

H_i är nivån på detektorsignalen från baslinjen för den kvarhållna volymen V_i ,
 M_i är polymerfraktionens molekylvikt vid den kvarhållna volymen V_i och
 n är antalet datapunkter.

Bredden på den molekylära viktfordelningen, som är ett mått på systemdispersionen, fås med förhållandet M_w/M_n .

1.3 RERERENSÄMNEN

Eftersom GPC är en relativ metod måste kalibrering göras. Normalt används tätt fördelad, linjärt konstruerad standardpolystyren med känd medelmolekylvikt M_n och M_w och en känd molekylviktfördelning för detta ändamål. Kalibreringskurvan kan bara användas för fastställande av molekylvikten för det okända provet om separationsförhållandena för provet och standardämnen valts på exakt samma sätt.

Det fastställda förhållandet mellan molekylvikten och urlakningsvolymen gäller enbart under det aktuella experimentets specifika förhållanden. Dessa förhållanden omfattar framför allt temperatur, lösning eller lösningsblandning, kromatografiska förhållanden och separationskolonn eller kolonnssystem.

Den molekylvikt som fastställs för provet på detta sätt utgörs av relativa värden och beskrivs som polystyrenets molekylära ekvivalensvikt. Detta innebär att molekylvikterna, beroende på struktur och kemisk skillnad mellan provet och standardämnet, kan avvika från de absoluta värdena i större eller mindre utsträckning. Om andra standardämnen används, t ex polyetylen glykol, polyetylenoxid, polymetylmetakrylat, polyakrylsyra skall skälet därtill anges.

1.4 PRINCIPEN FÖR PROVNINGSMETODEN

Både provets molekylviktfördelning och medelmolekylvikter (M_n , M_w) kan fastställas med hjälp av GPC. GPC är en särskild typ av vätskekromatografi där provet separeras beroende på de enskilda komponenternas hydrodynamiska volymer (2).

Separationen utförs när provet passerar genom en kolonn fylld med poröst material, vanligtvis en organisk gelé. Små molekyler kan passera igenom porerna medan stora molekyler kvarhålls. De stora molekylernas passage blir därför kortare och dessa tas bort först. Medelstora molekyler passerar genom en del av porerna och/eller elueras senare. De minsta molekylerna, med en hydrodynamisk medelradie mindre än porerna i gelén, kan passera genom samtliga porer. Dessa elueras då sist.

I idealsituationen styrs separeringen helt och hållet av molekylstorleken, men i praktiken är det svårt att förhindra att åtminstone en viss absorbtionseffekt inverkar störande. Ojämn packning i kolonnen och döda volymer kan förvärra situationen (2).

Detektionen utförs med t ex reflexionsindex eller UV-absorbktion och ger en enkel fördelningskurva. För att kunna tillskriva kurvan den faktiska molekylvikten måste kolonnen kalibreras, genom att polymerer med känd molekylvikt och helst i stort sett liknande struktur, t ex olika standardpolysterener, tillåts passera genom kolonnen. Normalt fås en typisk Gaus-kurva, i bland utdragen i en mindre svans på sidan för den låga molekylvikten, om de vertikala axlarna anger mängden, i förhållande till vikten, för de olika molekylvikter som elueras, och den horisontella axeln står för den logaritmiska molekylvikten.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Repererbarheten (relativ standardavvikelse: RSD) för elutionsvolymen skall vara bättre än 0,3 %. Nödvändig repererbarhet för analysen måste säkerställas genom korrigering enligt intern standard om ett kromatogram bedöms vara tidsberoende och inte omfattas av ovannämnda kriterie (1). Spridningen beror på standardämnets molekylvikt. Följande värden är typiska för standardpolystyren:

$M_p < 2000$	$M_w/M_n < 1,20$
$2000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1,05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1,20$

(M_p är standardämnets molekylvikt vid toppvärdet.)

1.6 BESKRIVNING AV PROVNINGSMETODEN

1.6.1 Beredning av lösningar med standardpolystyren

Standardpolystyrenen löses noggrant genom blandning i vald eluent. Hänsyn måste tas till tillverkarens rekommendationer vid beredning av lösningarna.

Koncentrationen av de standardämnen som väljs beror på olika faktorer, t ex injektionsvolym, lösningsviskositet och den analytiska detektorns känslighet. Maximal injektionsvolym måste anpassas till kolonnens längd för undvikande av överbelastning. Typiska injektionsvolymer för analytiska separationer med GPC och en kolonn på 30 cm x 7,8 mm ligger mellan 40 och 100 μ l. Större volymer kan användas men bör inte överstiga 250 μ l. Det optimala förhållandet mellan injektionsvolym och koncentration måste fastställas innan kolonnen kalibreras.

1.6.2 Beredning av provlösningen

I princip gäller samma krav för beredning av provlösning. Provet löses upp i lämpligt lösningsmedel, t ex tetrahydrofuran (THF), genom omsorgsfull skakning. Det får under inga omständigheter lösas upp i ultraljudsbad. Vid behov kan provlösningen renas genom ett membranfilter, med en finhet på mellan 0,2 och 2 μm .

Förekomst av oupplösta partiklar måste registreras i slutrapporten, eftersom dessa kan bero på högviktsmolekyler. Lämplig metod skall användas för fastställande av viktandelen oupplösta partiklar. Lösningen bör användas inom 24 timmar.

1.6.3 Apparater

- lösningsbehållare
- avluftningsapparat (när så krävs)
- pump
- pulsdämpare (när så krävs)
- injektionssystem
- kromatografikolonner
- detektor
- flödesmätare (när så krävs)
- apparat för registrering/bearbetning av data
- avfallskärl

Det måste säkerställas att GPC-systemet är inert avseende använda lösningsmedel, t ex genom användning av stålkapilär för THF-lösningen.

1.6.4 Injektions- och lösningstillförselsystem

En definierad volym av lösningsprovet fylls i kolonnen, antingen automatiskt eller manuellt, i en tydligt definierad zon. Alltför snabb utdragning eller intryckning av kolven i sprutan, om fyllningen sköts manuellt, kan förorsaka förändringar i den observerade molekylviktfördelningen. Systemet för tillförsel av lösning skall så långt möjligt vara pulsfritt, helst med inbyggd pulsdämpning. Flödes hastigheten skall vara ca 1 ml/min.

1.6.5 Kolonn

Polymeren kännetecknas, beroende på provet, antingen genom användning av enkel kolonn eller flera kolonner kopplade i serie. Ett antal porösa kolonnmaterial med definierade egenskaper, t ex porstorlek, exklusionsgränser osv, finns kommersiellt tillgängliga. Val av separationsgelé och kolonnlängd beror både på provets egenskaper (hydrodynamisk volym, molekylviktfördelning) och specifika förhållandena för separationen, som t ex lösning, temperatur och flödes hastighet (1) (2) (3).

1.6.6 Teoretiska plattor

Den kolonn eller kolonnkombination som används för separationen måste karakteriseras av antalet teoretiska nivåer. Detta inkluderar, när THF används som elutionslösning, fyllning av en lösning av etylbensen eller annan lämplig icke-polär lösning i en kolonn med känd längd. Antalet teoretiska nivåer fås med följande ekvation:

$$N = 5.54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{eller} \quad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

där

N är antalet teoretiska nivåer,

V_e är elutionsvolymen vid toppvärdet,

W är toppvärdets baslinjebredd och

$W_{1/2}$ är toppbredden vid halva höjden

1.6.7 Separationseffektivitet

Förutom antalet teoretiska nivåer, som styr bandbredden, spelar också separationseffektiviteten, som bestäms av lutningen på kalibreringskurvan, en viss roll. Separationseffektiviteten för en kolonn fås med följande förhållande:

$$\frac{V_{e,Mx} - V_{e,(10Mx)}}{\text{kolonnens tvärsnittarea}} \geq 6.0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

där

$V_{e,Mx}$ är elutionsvolymen för polystyren med molekylvikten M_x och

$V_{e,(10Mx)}$ är elutionsvolymen för polystyren med en tio gånger större molekylvikt.

Systemets upplösning definieras normalt som:

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

där

V_{e1} och V_{e2} är elutionsvolymerna för de två standardpolystyrenerna vid maximalt toppvärde,

W_1 och W_2 är baslinjebredderna vid toppvärde och

M_1 och M_2 är molekylvikten vid maximalt toppvärde (bör skilja sig åt med en faktor på 10).

R-värdet för kolonnsystemet bör vara större än 1,7 (4).

1.6.8 Lösningsmedel

Samtliga lösningsmedel måste ha hög renhet (för THF används en renhet på 99,5 %). Lösningsmedelsbehållaren, om nödvändigt i en inert gasatmosfär) skall vara tillräckligt stor för kalibrering av kolonnen och flera provanalyser. Lösningsmedlet skall avgasas innan det via pumpen transporteras till kolonnen.

1.6.9 Temperaturövervakning

Temperaturen i de kritiska, interna komponenterna (injektionsslinga, kolonn, detektor och rörsystem) skall vara jämn och anpassad till valt lösningsmedel.

1.6.10 Detektor

Syftet med detektorn är att kvantitativt registrera koncentrationen i det prov som elueras från kolonnen. För att undvika onödig breddning av toppvärden skall detektorcellens kuvettvolym hållas så liten som möjligt. Den bör inte vara större än 10 μl , utom för lättflyktiga och tunna detektorer. Differentialrefraktometri används vanligtvis för detektion. Om provets eller elutionslösningens särskilda egenskaper så kräver kan emellertid andra detektortyper användas, t ex UV/VIS, IR, viskositetsdetektorer osv.

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 DATA

Detaljerade utvärderingskriterier och krav avseende insamling och bearbetning av data skall uppfylla kraven i DIN-standard (1).

Två sinsemellan oberoende experiment skall utföras för varje prov. Experimenten skall analyseras individuellt.

M_n , M_w , M_w/M_n och M_p skall anges för varje mätning. Det är nödvändigt att uttryckligen ange att uppmätta värden är relativa värden, ekvivalenta mot molekylvikten för det standardämne som använts.

Efter fastställande av retentionsvolymerna eller retentionstiderna (eventuellt korrigerade med en intern standard), plottas $\log M_p$ -värdena (M_p är maximalt toppvärde för kalibreringsämnet) mot en av nämnda mängder. Minst två kalibreringspunkter krävs per tiotal molekylvikter och minst fem mätpunkter för den totala kurvan, som skall täcka provets uppskattade molekylvikt. Kalibreringskurvas ändpunkt för den låga molekylvikten definieras av n-hexylbenzen eller annan lämplig icke-polär lösning. Medelantal och medelvikt för molekylvikterna fastställs allmänt med elektronisk databearbetning, baserad på formlerna i avsnitt 1.2. Om manuell digitalisering används kan råd hämtas från ASTM D 3536-91 (3).

Fördelningskurvan skall presenteras i tabellform eller som ett diagram (differentialfrekvens eller summa procentandel mot $\log M$). I den grafiska presentationen skall varje tiotal molekylvikter normalt ha en bredd på 4 cm, och maximalt toppvärde skall ligga på ungefär 8 cm höjd. Vid integralfördelningskurvor skall skillnaderna mellan 0 och 100 % vara ungefär 10 cm.

2.2 PROVNINGSRAPPORT

Provningsrapporten skall innehålla följande information:

2.2.1 Undersökt ämne:

- tillgänglig information om det undersökta ämnet (identitet, tillsatser, föroreningar);
- beskrivning av hanteringen av provet, anmärkningar, problem.

2.2.2 Instrument

- eluentbehållare, inertgas, avgasning av eluenten, eluentens sammansättning, föroreningar;
- pump, pulsdämpare, injektionssystem;
- separationskolonner (tillverkare, all information om kolonnernas karakteristika, som porstorlek, typ av separationsmaterial, osv., antal, längd och inbördes ordning på använda kolonner);
- antal teoretiska nivåer i kolonnen eller kolonnkombinationen, separationseffektivitet (systemupplösning);
- information om topparnas symmetri;
- kolonntemperatur, typ av temperaturövervakning;
- detektor (mätprincip, typ, kuvettvolym);
- flödesmätare om sådan används (tillverkare, mätprincip);
- system för registrering och bearbetning av data (hårdvara och mjukvara).

2.2.3 Systemkalibrering:

- detaljerad beskrivning av den metod som används för konstruktion av kalibreringskurvan;
- information om kvalitetskriterier för den aktuella metoden (t ex koordinationskoefficient, kvadraternas summeringsfel, osv);
- information om all extrapolering, alla antaganden och approximeringar gjorda under experimentproceduren samt om bedömning och bearbetning av data ;
- alla mätningar som gjorts för konstruktion av kalibreringskurvan skall dokumenteras i en tabell som inkluderar följande information för varje kalibreringspunkt:

- provets namn
- provets tillverkare
- karakteristikvärden för standardämnena M_p , M_n , M_w , M_w/M_n , enligt tillverkaren eller från efterföljande mätningar, tillsammans med detaljerade uppgifter om bestämningsmetoden
- insprutningsvolym och insprutningskoncentration
- M_p värde för kalibrering
- elueringsvolym eller korrigerad retentionstid mätt vid maximalt toppvärde
- M_p beräknat vid maximalt toppvärde
- procentfel för beräknat M_p och kalibreringsvärde

2.2.4 **Bedömning:**

- bedömning på tidsbasis: metoder som används för att säkerställa önskad reproducerbarhet (korrektionsmetod, intern standard osv.);
- information om huruvida bedömningen gjorts på basis av elutionsvolymen eller retentionstiden;
- information om gränserna för bedömningen, om ett toppvärde inte analyserats fullständigt;
- beskrivning av utjämningsmetoder, om sådana används;
- beredning av och förbehandlingsprocedurer för provet;
- närvaro av oupplösta partiklar, om sådana förekommit;
- injektionsvolym (μl) och injektionskoncentration (mg/ml);
- anmärkningar om effekter som lett till avvikelser från den ideala GPC-profilen;
- detaljerad beskrivning av alla ändringar i provningsförfarandet;
- detaljerade uppgifter om felområden;
- all övrig information och anmärkningar relevanta för tolkningen av resultatet.

3. **REFERENSER**

- (1) DIN 55672 (1995) Gelégenomträngningskromatografi (GPC) med tetrahydrofuran (THF) som elutionsmedel, del 1.
- (2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons. (ung. Modern vätskeuteslutningskromatografi för uteslutning)
- (3) ASTM D 3536-91, (1991). Standardmetod för analys av medelmolekylvikter och molekylviktfördelning med vätskeuteslutningskromatografi (gelégenomträngningskromatografi - GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) ASTM D 5296-92, (1992). Standardmetod för analys av medelmolekylvikter och molekylviktfördelning i of polystyren med storleksseparationskromatografi av. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

BILAGA
EXEMPEL PÅ ANDRA METODER FÖR FASTSTÄLLANDE AV
MEDELANTALET MOLEKYLVIKT (M_n) FÖR POLYMERER

Gelelrenomträngningskromatografi (GPC) är den metod som är att föredra för fastställande av M_n , framför allt när en uppsättning standardämnen finns tillgängliga, vilkas struktur är jämförbar med polymerens struktur. När det föreligger praktiska svårigheter med användning av GPC eller det redan finns en förväntan att ämnet inte kommer att uppfylla ett vanligt M_n -kriterie (och detta kräver bekräftelse) finns emellertid alternativa metoder, som t ex:

1. Utnyttjande av kolligativa egenskaper

1.1 **Ebullioscopi/krvoscopi**: inkluderar mätning av kokpunktshöjning (ebullioscopi) eller fryspunktssänkning (cryoscopi) för ett lösningsmedel när polymeren tillsätts. Metoden grundas på det faktum att den upplösta polymerens effekt på vätskans kok- och/eller fryspunkt beror på polymerens molekylvikt (1) (2).

Tillämpningsbarhet, $M_n < 20\ 000$

1.2 **Sänkning av ångtryck**: inkluderar mätning av ångtrycket för en vald referensvätska före och efter tillsats av kända mängder polymerer (1) (2).

Tillämpningsbarhet, $M_n < 20\ 000$ (teoretiskt, i praktiken emellertid ett begränsat värde)

1.3 **Membranosometri**: grundas på osmosprincipen, dvs den naturliga tendensen för molekylerna i en lösning att passera genom ett halvgenomträngligt membran från en lösning till en koncentrerad lösning för att uppnå balans. I detta prov har den uppblandade lösningen nollkoncentration, medan den koncentrerade lösningen innehåller polymeren. Lösningens passage genom membranet förorsakar ett differensstryck som är avhängigt koncentrationen och polymerens molekylvikt (1) (3) (4).

Tillämpningsbarhet, M_n mellan 20 000 - 200 000.

1.4 **Ångfasosometri**: inkluderar jämförelse av förångningshastigheten för en ren aerosollösning till minst tre aerosoler innehållande polymeren vid olika koncentrationer (1) (5) (6).

Tillämpningsbarhet, $M_n < 20\ 000$.

2. Ändgruppanalys

För att kunna använda denna metod krävs kunskap om både polymerens övergripande struktur och om den typ av kedja som avslutar ändgrupperna (som måste vara urskiljningsbar från huvudstrukturen med t ex NMR eller titrering/derivatisering) Fastställandet av molekylkoncentrationen i polymerens ändgrupper kan ge ett värde för molekylvikten (7) (8) (9).

Tillämpningsbarhet, M_n upp till 50 000 (med minskande tillförlitlighet)

REFERENSER

- (1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science (ung. Textbok om polymerforskning), tredje utg., John Wiley, New York.
- (2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods (ung. Absoluta metoder för bestämning av kolligativa egenskaper), kapitel 4, In: Polymer Molecular Weights (ung. Polymerers molekylvikt), 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 (ung. Standardmetod för bestämning av numerisk medelmolekylvikt med membranosometri i polymerer). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) Coll, H. (1989). Membrane Osmometry (Membranosometri). In: Determination of Molecular Weight (Bestämning av molekylvikt), 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 (ung. Rekommenderad standardmetod för bestämning av molekylvikt med hjälp av ångtryck), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry (Ångtrycksosometri). In: Determination of Molecular Weight (Bestämning av molekylvikt), A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.
- (7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation (Polymerkaraktisering), Carl Hanser Verlag, Munich.
- (8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations (ung. Bestämning av ändgrupper), kapitel 3 In: Polymer Molecular Weights (Polymerers molekylvikt), Del 1, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.
- (9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry (ung. Ren och tillämpad kemi), 62, 2139-2146.

A.19. INNEHÅLL AV LÅGMOLEKYLVIKTSPOLYMERER

1. METOD

Denna kromatografiska metod (genomträngning i gelé) är en kopia på OECD TG 119 (1996). Grundläggande principer och annan teknisk information finns i hänvisningarna.

1.1 INLEDNING

Eftersom polymerernas egenskaper är så varierande är det omöjligt att beskriva en enda metod som ger exakta förhållanden för separation och bedömning som täcker alla eventualiteter och särskilda företeelser vid separation av polymerer. Särskilt komplexa polymera system är ofta inte mottagliga för kromatografisk analys av genomträngning i gelé (GPC). När GPC inte är praktiskt genomförbart kan den molekylära vikten fastställas med andra metoder (se bilaga). I sådana fall skall fullständig information om och motivering för den använda metoden anges.

Den beskrivna metoden grundas på DIN-standard 55672 (1). Detaljerad information om hur experimentet skall utföras och hur datan skall bedömas finns i denna DIN-standard. Om experimentförhållandena måste ändras, skall dessa förändringar motiveras. Andra standarder får tillämpas om full hänvisning därtill görs. I den beskrivna metoden används polystyrenprover med känd polydispersion för kalibrering, som kan behöva anpassas till vissa polymerer, t ex vattenlösliga och anpassade polymerer med långa molekylkedjor.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Låg molekylvikt definieras som en molekylvikt under 1000 dalton.

Den numerära medelmolekylvikten M_n och den viktjämsigt molekylära medelvikten M_w fastställs med följande ekvationer:

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

där

H_i är nivå på detektorsignalen från baslinjen för den kvarhållna volymen V_i ,
 M_i är polymerfraktionens molekylvikt vid den kvarhållna volymen V_i och
 n är antalet datapunkter.

Bredden på den molekylära viktfordelningen, som är ett mått på systemdispersionen, fås med förhållandet M_w/M_n .

1.3 REFERENSÄMNE

Eftersom GPC är en relativ metod måste kalibrering göras. Normalt används tätt fördelad, linjärt konstruerad standardpolystyren med känd medelmolekylvikt M_n och M_w och en känd molekylviktfordelning för detta ändamål. Kalibreringskurvan kan bara användas för fastställande av molekylvikten för det okända provet om separationsförhållandena för provet och standardämnen valts på exakt samma sätt.

Det fastställda förhållandet mellan molekylvikten och urlakningsvolymen gäller enbart under det aktuella experimentets specifika förhållanden. Dessa förhållanden omfattar framför allt temperatur, lösning eller lösningsblandning, kromatografiska förhållanden och separationskolonn eller kolonnssystem.

Den molekylvikt som fastställs för provet på detta sätt utgörs av relativa värden och beskrivs som polystyrenets molekylära ekvivalensvikt. Detta innebär att molekylvikterna, beroende på struktur och kemisk skillnad mellan provet och standardämnet, kan avvika från de absoluta värdena i större eller mindre utsträckning. Om andra standardämnen används, t ex polyetylglykol, polyetylenoxid, polymetylmetakrylat, polyakrylsyra skall skälet därtill anges.

1.4 PRINCIPEN FÖR PROVNINGSMETODEN

Både provets molekylviktfördelning och medelmolekylvikter (M_n , M_w) kan fastställas med hjälp av GPC. GPC är en särskild typ av vätskekromatografi där provet separeras beroende på de enskilda komponenternas hydrodynamiska volymer (2).

Separationen utförs när provet passerar genom en kolonn fylld med poröst material, vanligtvis en organisk gelé. Små molekyler kan passera igenom porerna medan stora molekyler kvarhålls. De stora molekylernas passage blir därför kortare och dessa tas bort först. Medelstora molekyler passerar genom en del av porerna och/eller elueras senare. De minsta molekylerna, med en hydrodynamisk medelradie mindre än porerna i gelén, kan passera genom samtliga porer. Dessa elueras då sist.

I idealsituationen styrs separeringen helt och hållet av molekylstorleken, men i praktiken är det svårt att förhindra att åtminstone en viss absorbtionseffekt inverkar störande. Ojämn packning i kolonnen och döda volymer kan förvärra situationen (2).

Detektionen utförs med t ex reflexionsindex eller UV-absorbtion och ger en enkel fördelningskurva. För att kunna tillskriva kurvan den faktiska molekylvikten måste kolonnen kalibreras, genom att polymerer med känd molekylvikt och helst i stort sett liknande struktur, t ex olika standardpolysterener, tillåts passera genom kolonnen. Normalt fås en typisk Gaus-kurva, i bland utdragen i en mindre svans på sidan för den låga molekylvikten, om de vertikala axlarna anger mängden, i förhållande till vikten, för de olika molekylvikter som elueras, och den horisontella axeln står för den logaritmiska molekylvikten.

Innehållet med låg molekylvikt härleds från denna kurva. Beräkningen kan bara bli korrekt om innehållet av lågmolekylviktarter är jämnt fördelat i polymermassan.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Repetierbarheten (relativ standardavvikelse: RSD) för elutionsvolymen skall vara bättre än 0,3 %. Nödvändig repetierbarhet för analysen måste säkerställas genom korrigering enligt intern standard om ett kromatogram bedöms vara tidsberoende och inte omfattas av ovannämnda kriterie (1). Spridningen beror på standardämnets molekylvikt. Följande värden är typiska för standardpolystyren:

$M_p < 2000$	$M_w/M_n < 1.20$
$2000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1.05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1.20$

(M_p är standardämnets molekylvikt vid toppvärdet.)

1.6 BESKRIVNING AV PROVNINGSMETODEN

1.6.1 Beredning av lösningar med standardpolystyren

Standardpolystyrenen löses noggrant genom blandning i vald eluent. Hänsyn måste tas till tillverkarens rekommendationer vid beredning av lösningarna.

Koncentrationen av de standardämnen som väljs beror på olika faktorer, t ex injektionsvolym, lösningsviskositet och den analytiska detektorns känslighet. Maximal injektionsvolym måste anpassas till kolonnens längd för undvikande av överbelastning.

Typiska injektionsvolymen för analytiska separationer med GPC och en kolonn på 30 cm x 7,8 mm ligger mellan 40 och 100 µl. Större volymer kan användas men bör inte överstiga 250 µl. Det optimala förhållandet mellan injektionsvolym och koncentration måste fastställas innan kolonnen kalibreras.

1.6.2 Beredning av provlösningen

I princip gäller samma krav för beredning av provlösning. Provet löses upp i lämpligt lösningsmedel, t ex tetrahydrofuran (THF), genom omsorgsfull skakning. Det får under inga omständigheter lösas upp i ultraljudsbad. Vid behov kan provlösningen renas genom ett membranfilter, med en finhet på mellan 0,2 och 2 µm.

Förekomst av ouplösta partiklar måste registreras i slutrapporten, eftersom dessa kan bero på högviktsmolekyler. Lämplig metod skall användas för fastställande av viktandelen ouplösta partiklar. Lösningen bör användas inom 24 timmar.

1.6.3 Korrigering för innehåll av föroreningar och tillsatser

Korrigering av artinnehållet av $M < 1000$ för bidraget från närvarande icke-polymera specifika komponenter (t ex föroreningar och/eller tillsatser) krävs normalt, med mindre det uppmätta innehållet redan är mindre än 1 %. Detta fås genom direkt analys av polymerlösningen eller GPC-eluatet.

När eluatet efter passage genom kolonnen skall spädas för ytterligare analys, skall den vara koncentrerad. Det kan vara nödvändigt att evaporera eluatet till torrhet och lösa upp den igen. Eluatkoncentrationen skall göras under förhållanden som garanterar att inga förändringar uppstår i eluatet. Hanteringen av eluatet efter GPC-steget är beroende av den analysmetod som används för mängdbestämningen.

1.6.4 Apparater

GPC-apparater består av följande komponenter:

- lösningsbehållare
- avluftningsapparat (när så krävs)
- pump
- pulsdämpare (när så krävs)
- injektionssystem
- kromatografikolonner
- detektor
- flödesmätare (när så krävs)
- apparat för registrering/bearbetning av data
- avfallskärl

Det måste säkerställas att GPC-systemet är inert avseende använda lösningsmedel, t ex genom användning av stålkapilär för THF-lösningen.

1.6.5 Injektions- och lösningstillförselsystem

En definierad volym av lösningsprovet fylls i kolonnen, antingen automatiskt eller manuellt, i en tydligt definierad zon. Alltför snabb utdragning eller intryckning av kolven i sprutan, om fyllningen sköts manuellt, kan förorsaka förändringar i den observerade molekylviktfordelningen. Systemet för tillförsel av lösning skall så långt möjligt vara pulsfritt, helst med inbyggd pulsdämpning. Flödes hastigheten skall vara ca 1 ml/min.

1.6.6 Kolonn

Polymeren kännetecknas, beroende på provet, antingen genom användning av enkel kolonn eller flera kolonner kopplade i serie. Ett antal porösa kolonnmaterial med definierade egenskaper, t ex porstorlek, exklusionsgränser osv, finns kommersiellt tillgängliga. Val av separationsgelé och kolonnlängd beror både på provets egenskaper (hydrodynamisk volym, molekylviktfördelning) och specifika förhållandena för separationen, som t ex lösning, temperatur och flödes hastighet (1) (2) (3).

1.6.7 Teoretiska nivåer

Den kolonn eller kolonnkombination som används för separationen måste karakteriseras av antalet teoretiska nivåer. Detta inkluderar, när THF används som elutionslösning, fyllning av en lösning av etylbensen eller annan lämplig icke-polär lösning i en kolonn med känd längd. Antalet teoretiska nivåer fås med följande ekvation:

$$N = 5.54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{eller} \quad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

där

N är antalet teoretiska nivåer,

V_e är elutionsvolymen vid toppvärdet,

W är toppvärdets baslinjebredd och

$W_{1/2}$ är toppbredden vid halva höjden

1.6.8 Separationseffektivitet

Förutom antalet teoretiska nivåer, som styr bandbredden, spelar också separationseffektiviteten, som bestäms av lutningen på kalibreringskurvan, en viss roll. Separationseffektiviteten för en kolonn fås med följande förhållande:

$$\frac{V_{e,Mx} - V_{e,(10Mx)}}{\text{kolonnens tvärsnittarea}} \geq 6.0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

där

$V_{e,Mx}$ är elutionsvolymen för polystyren med molekylvikten M_x , och

$V_{e,(10Mx)}$ är elutionsvolymen för polystyren med en tio gånger större molekylvikt.

Systemets upplösning definieras normalt som:

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

där

V_{e1} och V_{e2} är elutionsvolymerna för de två standardpolystyrenerna vid maximalt toppvärde,

W_1 och W_2 är baslinjebredden vid toppvärde och

M_1 och M_2 är molekylvikten vid maximalt toppvärde (bör skilja sig åt med en faktor på 10).

R-värdet för kolonnsystemet bör vara större än 1,7 (4).

1.6.9 Lösningsmedel

Samtliga lösningsmedel måste ha hög renhet (för THF används en renhet på 99,5 %). Lösningsmedelsbehållaren, om nödvändigt i en inert gasatmosfär) skall vara tillräckligt stor för kalibrering av kolonnen och flera provanalyser. Lösningsmedlet skall avgasas innan det via pumpen transporteras till kolonnen.

1.6.10 Temperaturövervakning

Temperaturen i de kritiska, interna komponenterna (injektionslinga, kolonn, detektor och rörsystem) skall vara jämn och anpassad till valt lösningsmedel.

1.6.11 Detektor

Syftet med detektorn är att kvantitativt registrera koncentrationen i det prov som elueras från kolonnen. För att undvika onödig breddning av toppvärden skall detektorcellens kuvettvolym hållas så liten som möjligt. Den bör inte vara större än 10 µl, utom för lättflyktiga och tunna detektorer. Differentialrefraktometri används vanligtvis för detektion. Om provets eller elutionslösningens särskilda egenskaper så kräver kan emellertid andra detektortyper användas, t ex UV/VIS, IR, viskositetsdetektorer osv.

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 DATA

Detaljerade utvärderingskriterier och krav avseende insamling och bearbetning av data skall uppfylla kraven i DIN-standarden (1).

Två sinsemellan oberoende experiment skall utföras för varje prov. Experimenten skall analyseras individuellt. Det är alltid viktigt att också ta fram data från blankprover, behandlade på samma sätt som det verkliga provet.

Det är nödvändigt att uttryckligen ange att uppmätta värden är relativa värden, ekvivalenta mot molekylvikten för det standardämne som använts.

Efter fastställande av retentionsvolymerna eller retentionstiderna (eventuellt korrigerade med en intern standard), plottas $\log M_p$ -värdena (M_p är maximalt toppvärde för kalibreringsämnet) mot en av nämnda mängder. Minst två kalibreringspunkter krävs per tiotal molekylvikter och minst fem mätpunkter för den totala kurvan, som skall täcka provets uppskattade molekylvikt. Kalibreringskurvas ändpunkt för den låga molekylvikten definieras av n-hexylbenzen eller annan lämplig icke-polär lösning. Den del av kurvan som svarar mot molekylvikter under 1000 bestäms och korrigeras för föroreningar och tillsatser efter behov. Elutionskurvorna bedöms i allmänhet med hjälp av elektronisk databehandling. Om manuell digitalisering används kan råd hämtas från ASTM D 3536-91 (3).

Om någon olöslig polymer blir kvar i kolonnen är dess molekylvikt troligen högre än den upplösta fraktionen och om hänsyn inte tas därtill kommer den att ge en för hög bedömning av innehållet lågmolekylvikter. Riktlinjer för korrigering av innehållet av lågmolekylvikten för olöslig polymer ges i bilagan.

Fördelningskurvan skall presenteras i tabellform eller som ett diagram (differentialfrekvens eller summa procentandel mot $\log M$). I den grafiska presentationen skall varje tiotal molekylvikter normalt ha en bredd på 4 cm, och maximalt toppvärde skall ligga på ungefär 8 cm höjd. Vid integralfördelningskurvor skall skillnaderna mellan 0 och 100 % vara ungefär 10 cm.

2.2 PROVNINGSRAPPORT

Provningsrapporten skall innehålla följande information:

2.2.1 Undersökt ämne:

- tillgänglig information om det undersökta ämnet (identitet, tillsatser, föroreningar);
- beskrivning av hanteringen av provet, anmärkningar, problem.

2.2.2 Instrument:

- eluentbehållare, inertgas, avgasning av eluenten, eluentens sammansättning, föroreningar;
- pump, pulsdämpare, injektionssystem;
- separationskolonner (tillverkare, all information om kolonnernas karakteristika, som porstorlek, typ av separationsmaterial, osv., antal, längd och inbördes ordning på använda kolonner);
- antal teoretiska nivåer i kolonnen eller kolonnkombinationen, separationseffektivitet (systemupplösning);
- information om topparnas symmetri;
- kolonntemperatur, typ av temperaturövervakning;
- detektor (mätprincip, typ, kuvettvolym);
- flödesmätare om sådan används (tillverkare, mätprincip);
- system för registrering och bearbetning av data (hårdvara och mjukvara).

2.2.3 Systemkalibrering:

- detaljerad beskrivning av den metod som används för konstruktion av kalibreringskurvan;
- information om kvalitetskriterier för den aktuella metoden (t ex koordinationskoefficient, kvadraternas summeringsfel, osv);
- information om all extrapolering, alla antaganden och approximeringar gjorda under experimentproceduren samt om bedömning och bearbetning av data;
- alla mätningar som gjorts för konstruktion av kalibreringskurvan skall dokumenteras i en tabell som inkluderar följande information för varje kalibreringspunkt:
 - provets namn
 - provets tillverkare
 - karakteristikvärden för standardämnena M_p , M_n , M_w , M_w/M_n , enligt tillverkaren eller från efterföljande mätningar, tillsammans med detaljerade uppgifter om fastställandemetoden
 - injektionsvolym och insprutningskoncentration
 - M_p värde för kalibrering
 - elueringsvolym eller korrigerad retentionstid mätt vid maximalt toppvärde
 - M_p beräknat vid maximalt toppvärde
 - procentfel för beräknat M_p och kalibreringsvärde.

2.2.4 Information om innehåll av lågmolekylvikt i polymer

- beskrivning av de metoder som används för analys och hur experimentet utfördes;
- information om andelen innehåll lågmolekylviktarter (w/w) för hela provet;
- information om föroreningar, tillsatser och andra icke-polymera arter, som viktandel i förhållande till hela provet.

2.2.5 **Bedömning:**

- bedömning på tidsbasis: metoder som används för att säkerställa önskad reproducerbarhet (korrektionsmetod, intern standard osv.);
- information om huruvida bedömningen gjorts på basis av elutionsvolymen eller retentionstiden;
- information om gränserna för bedömningen, om ett toppvärde inte analyserats fullständigt;
- beskrivning av utjämningsmetoder, om sådana används;
- beredning av och förbehandlingsprocedurer för provet;
- närvaro av ouplösta partiklar, om sådana förekommit;
- injektionsvolym (μl) och injektionskoncentration (mg/ml);
- anmärkningar om effekter som lett till avvikelser från den ideala GPC-profilen;
- detaljerad beskrivning av alla ändringar i provningsförfarandet;
- detaljerade uppgifter om felområden;
- all övrig information och anmärkningar relevanta för tolkningen av resultatet.

3. **REFERENSER**

- (1) DIN 55672 (1995) Gelégenomträngningskromaografi (GPC) med tetrahydrofuran (THF) som elutionsmedel, del 1.
- (2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons. (ung. Modern vätskeuteslutningskromatografi för uteslutning)
- (3) ASTM D 3536-91, (1991). Standardmetod för analys av medelmolekylvikter och molekylviktfördelning med vätskeuteslutningskromatografi (gelégenomträngningskromatografi - GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) ASTM D 5296-92, (1992). Standardmetod för analys av medelmolekylvikter och molekylviktfördelning i of polystyren med storleksseparationskromatografi av. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

BILAGA
RIKTLINJER FÖR KORRIGERING AV LÅGMOLEKYLÄRT INNEHÅLL
BEROENDE PÅ NÄRVARO AV OLÖSLIG POLYMER

När olösliga polymerer förekommer i ett prov, leder detta till massaförlust under GPC-analysen. Den olösliga polymeren kvarhålls definitivt i kolonnen eller provfiltret, medan den lösbara delen av provet passerar genom kolonnen. När polymerens refraktiva indexökning (dn/dc) kan uppskattas eller mätas, kan provets massaförlust i kolonnen uppskattas. I detta fall görs en korrigering med hjälp av en extern kalibrering med standardmaterial med känd koncentration och dn/dc för kalibrering av refraktometerns reaktion. I nedanstående exempel används en standardpolymer (metylmetakrylat) (pMMA).

Vid den externa kalibreringen för analys av akrylpolymerer analyseras en standard-pMMA med känd koncentration i tetrahydrofuran med GPC, och resulterande data används för att få fram refraktometerkonstanten med följande ekvation:

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

där:

K står för refraktometerkonstanten i $\mu\text{vs/ml}$,

R för reaktionen på standard-pMMA i μvs ,

C för koncentrationen av standard-pMMA i mg/ml ,

V för insprutningsvolymen i ml och

dn/dc är ökningen av refraktionsindexet för pMMA i tetrahydrofuran (i ml/mg).

Följande data är normala för en standard-pMMA:

$$R = 2937891$$

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

$$V = 0,1 \text{ ml}$$

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

Resultatet K-värde, $3,05 \times 10^{11}$, används därefter för att beräkna den teoretiska detektorreaktionen, om 100% av den insprutade polymeren hade eluerat genom detektorn.

A.20. POLYMERERS BETEENDE I VATTEN VID LÖSNING/EXTRAKTION

1. METOD

Den beskrivna metoden är en kopia av en reviderad version av OECD TG 120 (1997). Ytterligare teknisk information finns i hänvisning 1.

1.1 INLEDNING

För vissa polymerer, som t ex emulsionspolymerer, kan visst inledande förberedande arbete krävas innan nedanstående metod kan användas. Metoden är inte tillämplig på flytande polymerer och på polymerer som under provningsförhållandena reagerar med vatten.

När metoden inte är praktisk eller möjlig kan beteendet vid lösning/extraktion undersökas med andra metoder. I så fall skall fullständiga detaljer och motivering för den använda metoden anges.

1.2 REFERENSÄMNEN

Inga

1.3 UNDERSÖKNINGSMETODENS PRINCIP

Polymerernas beteende vid lösning/extraktion i vatten fastställs med flaskmetoden (se A.6 lösningsbarhet i vatten, flaskmetod) med nedan beskrivna ändringar.

1.4 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.5 BESKRIVNING AV UNDERSÖKNINGSMETODEN

1.5.1 Utrustning

Följande utrustning krävs för denna metod:

- krossanordning, t ex kvarn för produktion av partiklar med känd storlek
- apparater för skakning med möjlighet till temperaturövervakning
- membranfiltersystem
- lämplig analysutrustning
- standardsil

1.5.2 Beredning av prover

Ett representativt prov skall först reduceras till en partikelstorlek på mellan 0,125 och 0,25 mm med lämplig sil. Kylning kan krävas för provets stabilitet eller för malningsprocessen. Material med gummiliknande natur kan krossas vid temperaturen på flytande kvävgas (1).

Om den önskade partikelstorleksfraktionen inte kan skapas skall åtgärd vidtas för att i största utsträckning minska partikelstorleken och resultatet därav registreras. Det skall i rapporten anges på vilket sätt det krossade provet förvarats fram till undersökningen.

1.5.3 Förfarande

Tre prover på 10 g av det undersökta ämnet skall vägas i vart och ett av tre kärl försedda med glaspropp, och därefter skall 1000 ml vatten tillsättas till varje kärl. Om hantering av 10 g polymer visar sig vara opraktiskt, skall den närmast högre mängd som kan hanteras användas och vattenvolymen justeras i enlighet därmed.

Kärlden skall tillslutas noggrant och därefter upphettas till 20 °C. En skak- eller omrörningsanordning som kan arbeta vid konstant temperatur skall användas. Efter en period på 24 timmar skall innehållet i varje kärl centrifugeras eller filtreras och polymerkoncentrationen i den klara vätskefasen fastställas med lämplig analysmetod. Om ingen lämplig analysmetod för vätskefasen finns kan den totala lösbarheten/extraktionsbarheten uppskattas utifrån filterrestens eller centrifugrestens torra vikt.

Det är vanligtvis nödvändigt att kvantitativt differentiera å ena sidan föroreningarna och tillsatserna och å andra sidan de med låg molekylvikt. Det är också viktigt att vid gravimetriskt fastställande göra ett blankprov utan undersökt ämne, för att kunna ta hänsyn till resterna från experimentet.

Polymerernas beteende vid lösning/extraktion i vatten vid 37 °C och pH 2 samt pH 9 kan fastställas på samma sätt såsom beskrivet för utförandet av experimentet vid 20 °C. pH-värdena kan erhållas genom tillsats av antingen lämplig buffert eller syra eller bas, som t ex saltsyra, ättiksyra, analytiskt natrium eller kaliumhydroxid eller NH₃.

En eller två undersökningar skall göras, beroende på vilken analysmetod som används. När tillräckligt specifika metoder finns för direktanalys av vätskefasen avseende polymerkomponenten, är det tillräckligt med en sådan undersökning som beskrivits här ovan. När sådana metoder inte finns tillgängliga och fastställande av polymerens beteende vid lösning/extraktion begränsas till indirekt analys, genom fastställande enbart genom det totala innehållet organiskt kol (TOC) i vätskeextraktet, skall ytterligare en undersökning göras. Denna kompletterande undersökning skall också göras på tre prover, med tio gånger mindre polymer och samma mängd vatten som använts vid den första undersökningen.

1.5.4 Analys

1.5.4.1 Undersökningar utförda med en provstorlek

Det kan finnas metoder tillgängliga för direktanalys av polymerkomponenter i vätskefasen. Alternativt kan eventuellt också indirekt analys av upplösta/extraerade polymerkomponenter, genom fastställande av det totala innehållet upplösningsbara delar och korrigering för ej polymerspecifika komponenter, göras.

Analys av vätskefasen avseende totala polymeriska arter är möjlig:

antingen genom tillräckligt känslig metod, t ex:

- TOC med hjälp av persulfat- eller dikromatupplösning för att producera CO₂, följt av uppskattning med IR-analys eller kemisk analys,
- Atomabsorptionspektrometri (AAS) eller dess induktivt kopplade plasmautsläpp (ICP) motsvarande den för kisel- eller metallinnehållande polymerer,
- UV-absorbtion eller spektrofluorimetri för acrylpolymerer,
- LC-MS för lågmolekylviktsprover,

eller genom vakuumevaporation till torrhet av vätskeextraktet och spektroskopisk analys (IR, UV, osv) eller AAS/ICP-analys av resten.

Om analys av vätskefasen som sådan inte är praktiskt genomförbar, skall vätskeextraktet extraeras med ett vattenupplösligt organiskt lösningsmedel, t ex klorerat kolväte. Lösningsmedlet evaporeras därefter och resten analyseras enligt ovan avseende angivet polymerinnehåll. Komponenter i denna rest som identifieras som föroreningar eller tillsatser skall subtraheras för bestämning av polymerens egen upplösning/extraktion.

När förhållandevis stora mängder sådant material finns närvarande, kan det vara nödvändigt att analysera resterna med t ex HPLC- eller GC-analys för att differentiera föroreningarna från monomera och monomerderiverade ämnen, så att det faktiska innehållet av det senare kan fastställas.

I vissa fall kan vanlig evaporation av det organiska lösningsmedlet till torrhet och vägning av den torra resten vara tillräckligt.

1.5.4.2 Provning med två olika provstorlekar

Alla vätskeextrakt analyseras avseende total mängd organiskt kol.

Gravimetrisk bestämning skall göras på den ouplösta/ej extraerade delen av provet. Om polymerresten, efter centrifugering eller filtrering av innehållet i varje kärl, sitter kvar på kärllväggen, skall kärlet sköljas med filtratet tills kärlet är rent från alla synliga rester. Därefter skall filtratet återigen centrifugeras eller filtreras. Kvarvarande rester på filtret eller i centrifugröret torkas vid 40 °C under vakuum och vägs. Torkningen skall fortsätta tills konstant vikt nås.

2. DATA

2.1 PROVNING MED EN ENDA PROVSTORLEK

De enskilda resultaten för var och en av de tre flaskorna samt medelvärdena skall anges och uttryckas i enheter för massa/volym lösning (normalt mg/l) eller massa/massa av polymerprovet (normalt mg/g). Dessutom skall provets viktförlust anges, beräknad som lösningens vikt dividerad med det ursprungliga provets vikt. Den relativa standardavvikelsen skall beräknas. Enskilda värden skall ges för hela ämnet (polymer plus väsentliga tillsatser osv) och för polymeren ensam (dvs efter subtraktion av bidraget från sådana tillsatser).

2.2 PROVNING MED TVÅ OLIKA PROVSTORLEKAR

De enskilda värdena för total mängd organiskt kol i vätskeextrakten för de två tripplexperimenten och medelvärdet för varje experiment skall anges, uttryckt som massa per volym lösning (normalt mgC/l), samt som massa per vikt för det ursprungliga provet (normalt mgC/g).

Om ingen skillnad föreligger mellan resultaten för stort respektive litet förhållande mellan prov och vatten, kan detta innebära att alla extraerbara komponenter faktiskt extraherats. I sådana fall krävs normalt ingen direkt analys.

Resternas individuella vikter skall anges och uttryckas i procent av provernas initialvikt. Medelvärden skall beräknas för varje experiment. Skillnaderna mellan 100 och funnen procentandel representerar andelen lösningsbart och extraerbart material i ursprungsprovet.

3. RAPPORT

3.1 PROVNINGSRAPPORT

Provningsrapporten skall innehålla följande information:

3.1.1 Undersökt ämne:

- tillgänglig information om ämnet, identitet, tillsatser, föroreningar, innehåll av varianter med låg molekylvikt.

3.1.2 Experimentella förhållanden:

- beskrivning av tillämpat förfarande och experimentella förhållanden;
- beskrivning av analys- och detektionsmetoder.

3.1.3

Resultat:

- resultatet avseende lösningsbarhet/extraktionsbarhet i mg/l, individuella värden och medelvärden för extraktionsprovet för de olika lösningarna, uppdelat i polymerinnehåll och föroreningar, tillsatser osv
- resultatet av upplösningen/extraktionen av polymeren i mg/g
- värden för det totala innehållet organiskt kol i vätskeextrakten, lösningens vikt och beräknade andel, om denna mäts
- pH-värde för varje prov
- information om blankvärden
- vid behov hänvisningar till det undersökta ämnets kemiska instabilitet, både under provnings- och analysprocessen
- all information som är viktig för tolkningen av resultaten .

4.

REFERENSER

- (1) DIN 53733 (1976) Provtagning från plastprodukter för provningsändamål.

DEL B: METODER FÖR BESTÄMNING AV TOXICITET OCH ANDRA HÄLSOEFFEKTER

ALLMÄN INLEDNING: DEL B

A. FÖRKLARANDE ANMÄRKNING

I denna inledning används följande numrering:

- B.15 Genmutation - *Saccharomyces cerevisiae*
- B.16 Mitotisk rekombination - *Saccharomyces cerevisiae*
- B.17 Genmutationstest in vitro på däggdjursceller
- B.18 DNA-skada och DNA-reparation - felaktig DNA-syntes - däggdjursceller in vitro
- B.19 Test avseende systerkromatidbyten in vitro
- B.20 Könbundet recessivt letalt test på *Drosophila melanogaster*
- B.21 Celltransformationstest in vitro på däggdjursceller
- B.22 Dominant letalt test på gnagare
- B.23. spermatogonial test av KROMOSOMAVVIKELSEr hos däggdjur
- B.24 Fläcktest på mus
- B.25 Test avseende ärftlig translokation på mus
- B.26 Test avseende subkronisk oral toxicitet: 90 dagars upprepat oraltest på gnagare
- B.27 Test avseende subkronisk oral toxicitet: 90 dagars upprepat oraltest på icke-gnagare
- B.28 Test avseende subkronisk dermal toxicitet: 90 dagars upprepat dermaltest på gnagare
- B.29 Test avseende subkronisk inhalationstoxicitet: 90 dagars upprepat inandningstest på gnagare
- B.30 Test avseende kronisk toxicitet
- B.31 Teratogenicitetstest - på gnagare och icke-gnagare
- B.32 Test avseende cancerogenicitet
- B.33 Kombinerat test avseende kronisk toxicitet och cancerogenicitet
- B.34 Reproduktionstoxicitetstest på en generation
- B.35 Reproduktionstoxicitetstest på två generationer
- B.36 Toxikokinetik

B. GENERELLA DEFINITIONER AV TERMER SOM ANVÄNDS I TESTMETODERNA I DENNA BILAGA

- i) Akut toxicitet omfattar de skadliga effekter som uppträder inom en given tid (vanligen 14 dagar), efter tillförsel av en enda dos av ett ämne.
- ii) Påtaglig toxicitet är en generell term för tydliga tecken på toxicitet efter det att en testsubstans tillförts. Dessa tecken torde räcka för en ungefärlig bedömning och vara sådana att en ökning av den tillförda dosen kan förväntas resultera i att allvarliga förgiftningssymtom uppträder och troligen medför dödsfall.
- iii) Dos är den mängd testsubstans som tillförs. Dos uttrycks i vikt (gram eller mg) eller som vikten av en testsubstans per viktenhet försöksdjur (t.ex. mg per kg kroppsvikt), eller som konstanta livsmedelskoncentrationer (delar per miljon eller mg per kg livsmedel).
- iv) Särskiljande dos är den högsta av fyra fastställda dosnivåer som kan tillföras utan att ha substansrelaterad dödlig verkan (inbegripet avlivning av humana skäl).
- v) Dosering är en generell term som omfattar dos, frekvens och varaktigheten av dosens verkan.
- vi) LD50 (median letal dos) är en statistisk fastställd enstaka dos av ett ämne som kan förväntas leda till döden för 50 % av de djur som tillförts dosen. Ett LD50-värde uttrycks som vikt testsubstans per viktenhet försöksdjur (mg/kg).
- vii) LC50 (median letal koncentration) är en statistisk fastställd koncentration av ett ämne som kan förväntas leda till döden, under exponering eller inom en bestämd tid efter exponering, för 50 % av de djur som har exponerats under en bestämd tid. LC50-värdet uttrycks som vikt testsubstans per standardvolym luft (mg/l).
- viii) NOAEL är förkortningen för no observed adverse effect levels och är den högsta dos eller exponeringsnivå då inga negativa behandlingsrelaterade resultat observeras.

- ix) Toxicitet vid upprepad dosering/subkronisk toxicitet omfattar de skadliga effekter som uppträder hos försöksdjur till följd av upprepad daglig dosering med, eller exponering för, en kemikalie under en kort tid av deras förväntade livslängd.
- x) Maximalt tolererad dos (MTD) är den högsta dosnivå som framkallar tecken på toxicitet utan att i någon högre grad påverka överlevnaden i det försök i vilket den används.
- xi) Hudirritation är framkallandet av inflammatoriska förändringar i huden efter applicering av testsubstansen.
- xii) Ögonirritation är framkallandet av förändringar i ögonen efter det att en testsubstans applicerats på ögats främre yta.
- xiii) Hudsensibilisering (allergisk kontaktdermatit) är en immunologiskt utlöst kutan reaktion på ett ämne.
- xiv) Frätning är framkallandet av irreversibla vävnadsskador i huden efter applicering av en testsubstans under tidsrymder på mellan 3 minuter och 4 timmar.
- xv) Toxikokinetik är studiet av absorption, distribution, metabolism och utsöndring av testsubstanser.
- xvi) Absorption är den eller de processer genom vilka ett tillfört ämne tränger in kroppen.
- xvii) Utsöndring är den eller de processer genom vilka ett tillfört ämne eller dess metaboliter avlägsnas från kroppen.
- xviii) Distribution är den eller de processer genom vilka det upptagna ämnet eller dess metaboliter fördelar sig i kroppen.
- xix) Metabolism är den eller de processer genom vilka de tillförda ämnena förändras strukturellt i kroppen genom enzymatiska eller icke enzymatiska reaktioner.

B.I Akut toxicitet - toxicitet vid upprepad dosering/subkronisk toxicitet

En testsubstans akuta toxicitet samt organspecifika eller systemiska toxicitet kan bedömas genom en rad toxicitetstester (metoderna B.1-B.5) genom vilka efter en tillförd dos en preliminär indikation på toxiciteten kan fås.

Beroende på hur giftigt ett ämne är kan ett "limit-test"-förfarande övervägas i fråga om ett komplett LD50-test, även om inget "limit-test" anges för inhalationstester eftersom det inte varit möjligt att definiera ett enhetligt gränsvärde för exponering genom inandning.

Metoder som innebär användningen av så få djur som möjligt och som minskar deras lidande i största möjliga utsträckning bör övervägas, t.ex. metoder med fast dosnivå (metod B.1a) och metoden för bestämning av akut toxicitetsklass (metod B.1c). Vid tester på nivå 1 kan undersökning av en andra djurart komplettera slutsatserna från den första undersökningen. I sådana fall får en standardtestmetod användas eller så kan metoden anpassas efter ett mindre antal djur.

Testet av toxiciteten efter upprepad dosering (metoderna B.7, B.8 och B.9) omfattar utvärdering av de toxikologiska effekterna av upprepad exponering. Härvidlag betonas behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt. Dessa tester torde bidra till att identifiera målorgan för toxiciteten, toxicitet och icke-toxiska doser. Ytterligare fördjupade undersökningar av dessa aspekter kan komma att krävas vid långvariga studier (metoderna B.26-B.30 och B.33).

B.II Mutagenicitet - genotoxicitet

Mutagenicitet innebär induktion av permanenta förändringar i mängden av eller strukturen hos det genetiska materialet i en cell eller organism. Dessa förändringar, `mutationer`, kan omfatta en enskild gen eller gensegment, ett genblock eller hela kromosomer. Effekterna på hela kromosomer kan vara strukturella eller numeriska.

Ett ämnes mutageniska verkan undersöks genom in vitro-försök av gen (punkt) mutationer i bakterier (metod B.13/14) och/eller av strukturella kromosomskador i däggdjursceller (metod B.10).

Även in vivo-förfaranden är godtagbara, t.ex. mikrokärntest (metod B.12) eller metafasanalys i ryggmärg (metod B.11). I avsaknad av starka motargument föredras dock in vitro-metoder.

I fråga om högre produktionsvolymen kan vidare tester krävas för att undersöka mutagenicitet ytterligare eller för att testa cancerogenicitet och/eller för att utföra eller följa upp en riskutvärdering, och dessa tester kan användas för flera olika syften: För att bekräfta erhållna resultat i grundomgången; för att initiera eller utvidga in vivo-studier.

För dessa syften omfattar metoderna B.15-B.25, både in vivo och in vitro, eukaryotiska system och en utvidgad rad biologiska sluteffekter. Testerna ger information om punktmutationer och andra sluteffekter i organismer som är mer komplexa än den bakterie som används i fråga om grundomgångens uppgifter.

Om ett program för vidare mutagenicitetstester övervägs bör detta som allmän princip utformas så att det ger ytterligare relevant information om ämnets mutageniska eller cancerogena potential.

De konkreta tester som kan vara lämpliga i ett särskilt fall beror på flera faktorer, inbegripet ämnets kemiska och fysikaliska egenskaper, resultaten av de inledande bakteriella och cytogenetiska försöken, ämnets metaboliska profil, resultaten av övriga toxicitetstester och ämnets kända användningsområden. Med tanke på de varierande faktorer som bör beaktas är det därför inte lämpligt med en strikt plan för urval av tester.

Vissa allmänna principer för testmetoder föreskrivs i direktiv 93/67/EEG men tydliga teststrategier förekommer också i det tekniska vägledningsdokumentet för riskutvärdering, trots att detta är flexibelt och kan anpassas på lämpligt sätt till särskilda omständigheter.

Metoder för ytterligare undersökning anges gruppvis nedan, indelade efter sin principiella genetiska sluteffekt:

Test av gen (punkt) mutationer

- a) Framåt- eller återmutationstester med användning av eukaryotiska mikroorganismer (*Saccharomyces cerevisiae*) (metod B.15).
- b) In vitro-tester av framåtmutation i däggdjursceller (metod B.17).
- c) Könsbundet recessivt letalt test på *Drosophila melanogaster* (metod B.20).
- d) In vivo-test för undersökning av somatisk cellmutation: Fläcktest på mus (metod B.24).

Test av kromosomskador

- a) Cytogenetiska in vivo-försök på däggdjur. Metafasanalys i ryggmärg in vivo kan övervägas om den inte omfattades av den inledande bedömningen (metod B.11). Därutöver kan könscellers cytogenetik undersökas in vivo (metod B.23).
- b) Cytogenetiska in vitro-försök på däggdjur, om detta inte omfattades av den inledande bedömningen (metod B.10).
- c) Dominant letalt test på gnagare (metod B.22).
- d) Test avseende ärftlig translokation på mus (metod B.25).

Genotoxiska effekter - effekter på DNA

Genotoxicitet, identifierad som potentiellt skadliga effekter på det genetiska materialet som inte nödvändigtvis hänger samman med mutagenicitet, får anges som orsakad skada på DNA utan direkta bevis för mutation. Följande metoder som utnyttjar eukaryotiska mikroorganismer eller däggdjursceller kan vara lämpliga för sådana tester:

- a) Mitotisk rekombination med *Saccharomyces cerevisiae* (metod B.16).
- b) DNA-skador och DNA-reparation - felaktig DNA-syntes - däggdjursceller (in vitro) (metod B.18).
- c) Undersökning av systerkromatidbyten med däggdjursceller (in vitro) (metod B.19).

Alternativa metoder för undersökning av cancerogen potential

Det finns tester för att mäta ett ämnets potential att inducera morfologiska och beteendemässiga förändringar i cellkulturer som tros vara förbundna med maligna transformationer in vivo (metod B.21). Ett rad olika celltyper och kriterier för transformation kan användas.

Riskbedömning av ärftliga verkningar hos däggdjur

Det finns metoder för att mäta sådana ärftliga verkningar hos intakta däggdjur som framkallats av gen(punkt)mutationer, t.ex. det särskilda locustestet med mus för att mäta

könszellförändringar i första generationen (finns inte med i denna bilaga), eller av kromosomförändringar, t.ex. testet för ärftlig translokation med mus (metod B.25). Sådana metoder kan användas vid bedömning av ett ämnes eventuella genetiska risk för människor. Med tanke på dessa testers komplexitet och det mycket stora antal djur som krävs, särskilt för det specifika locustestet, krävs det starka motiv innan dessa tester utförs.

B.III Cancerogenicitet

Kemikalier kan beskrivas som genotoxiska eller icke genotoxiska cancerogener beroende på den förmodade verkningsmekanismen.

Pre-screeninginformation om ett ämnes genotoxikologiska cancerogena potential kan erhållas genom mutagenicitets- eller genotoxicitetstest. Ytterligare information kan erhållas genom upprepad dosering och tester av subkronisk eller kronisk toxicitet. Toxicitetstestet genom upprepad dosering, metod B.7 och långvariga tester med upprepad dosering omfattar utvärdering av sådana histopatologiska förändringar som observeras vid toxicitetstester med upprepad dosering, t.ex. hyperplasi i vissa vävnader som kan vara relevanta. Dessa tester och toxikokinetiska uppgifter kan bidra till att identifiera kemikalier med cancerogen verkan, vilket kan komma att kräva ytterligare fördjupade studier av denna aspekt, genom ett cancerogenicitetstest (metod B.32) eller ofta genom ett kombinerat test avseende kronisk toxicitet och cancerogenicitet (metod B.33).

B.IV Reproduktionstoxicitet

Reproduktionstoxicitet kan spåras på olika sätt, t.ex. försämrad reproduktionsfunktion eller -kapacitet hos hannar och honor, identifierade som "effekter på fertiliteten", eller som orsak till icke ärftliga skadliga effekter på avkomman, identifierade som "utvecklingstoxicitet", vilket även omfattar teratogenicitet och effekter under distadiet.

Som ett led i tester av utvecklingstoxicitet inriktas testmetoden (B.31) i fråga om teratogenicitetsstudier främst på oral tillförsel. Alternativt kan andra intagsvägar användas beroende på testsubstansens fysikaliska egenskaper eller de tänkbara vägar på vilka människor exponeras för ämnet. I sådana fall bör testmetoden på lämpligt sätt anpassas till att beakta lämpliga komponenter i testmetoder om 28 dagar.

Om ett reproduktionstest (fertilitetstest) på tre generationer krävs kan den metod som beskrivs för reproduktionstest på två generationer (metod B.35) utvidgas till att omfatta den tredje generationen.

B.V Neurotoxicitet

Neurotoxicitet kan spåras på olika sätt, t.ex. genom funktionsförändringar eller strukturella och biokemiska förändringar i det centrala eller perifera nervsystemet. En preliminär indikation av neurotoxicitet kan erhållas genom akut toxicitetstest. Toxicitetstestet med upprepad dosering, metod B.7, omfattar en utvärdering av neurotoxikologiska effekter, och behovet av noggranna kliniska observationer av djuret betonas i syfte att erhålla så mycket information som möjligt. Metoden torde bidra till att identifiera kemikalier med potentiell neurotoxisk verkan, vilket kan komma att kräva ytterligare fördjupade tester av den aspekten. Därutöver är det viktigt att beakta ämnets potential att orsaka specifika neurotoxiska effekter som inte kan spåras genom andra toxicitetsstudier. T.ex. har det observerats att vissa organiska fosforföreningar har orsakat fördröjd neurotoxicitet och kan bedömas med hjälp av metoderna B.37 och B.38 genom exponering för en enstaka dos eller upprepad dosering.

B.VI Immunotoxikologi

Immunotoxicitet kan spåras på olika sätt, t.ex. genom immunsuppression eller ökad mottaglighet i immunsystemet, som resulterat i antingen överkänslighet eller autoimmun reaktion.

Toxicitetstestet med upprepad dosering, metod B.7, omfattar utvärdering av immunotoxiska effekter. Metoden torde bidra till att identifiera kemikalier med immunotoxisk potential som kan kräva ytterligare fördjupade studier av denna aspekt.

B.VII Toxikokinetik

Toxikokinetiska undersökningar kan vara till hjälp vid tolkning och utvärdering av uppgifter om

toxicitet. Undersökningarna är avsedda att belysa särskilda aspekter av kemikaliens toxicitet vid tester och resultaten kan komma att bidra till utformningen av ytterligare toxicitetsundersökningar. Avsikten är inte att alla parametrar behöver bestämmas i samtliga fall. Hela sekvensen av toxikokinetiska tester (absorption, utsöndring, distribution och metabolism) kommer att krävas endast i sällsynta fall. I fråga om vissa produkter kan en förändrad sekvens vara tillräddlig, eller så räcker ett test med en enstaka dos (metod B.36).

Uppgifter om testsubstansens kemiska struktur och fysikaliskt-kemiska egenskaper kan dessutom ge en indikation om absorptionsförmågan vid en bestämd tillförselväg, liksom upplysa om ämnets beteende i fråga om metabolism och distributionen i vävnaderna. Uppgifter om toxikokinetiska parametrar kan dessutom finnas tillgängliga från tidigare undersökningar om toxicitet och toxikokinetik.

C. BESKRIVNING AV TESTSUBSTANSEN

Testsubstansens sammansättning, inbegripet de viktigaste orenheterna, och dess relevanta fysikaliskt-kemiska egenskaper, inbegripet ämnets stabilitet, skall vara kända innan en toxicitetsundersökning inleds.

Testsubstansens fysikaliskt-kemiska egenskaper ger viktig vägledning vid val av tillförselväg, utformning av varje enskild undersökning samt hantering och lagring av testsubstansen.

En analysmetod för kvalitativ och kvantitativ bestämning av testsubstansen (om möjligt inbegripet viktiga orenheter) i doseringsmediet och i biologiska material bör utvecklas innan en undersökning inleds.

Alla uppgifter om identifiering av testsubstansen, dess fysikaliskt-kemiska egenskaper, renhet och beteende bör omfattas av testrapporten.

D. DJURVÅRD

En strikt kontroll av miljöförhållandena samt tillämpliga djurvårdsmetoder är grundläggande i fråga om toxicitetstester.

i) Förvaltningsförhållanden

Miljön i försöksdjurens rum eller burar skall vara avpassade efter djurarten. Lämpliga betingelser för råttor, möss och marsvin är en rumstemperatur på 22 ± 3 °C med en relativ luftfuktighet på 30-70 %. För kaniner och marsvin bör temperaturen hållas vid 20 ± 3 °C med en relativ luftfuktighet på 30-70 %.

Vissa testmetoder är särskilt känsliga för temperatureffekter och i dessa fall ingår detaljuppgifter om lämpliga betingelser i metodbeskrivningen. I alla undersökningar av toxiska effekter skall temperaturen och luftfuktigheten kontrolleras, registreras och anges i den slutliga testrapporten.

Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus, 12 timmar mörker.

Detaljuppgifter om belysningsrytmen skall registreras och anges i den slutliga testrapporten.

Om inte annat anges för metoden får djuren inhysas individuellt eller i små grupper av samma kön; i fråga om grupper bör högst fem djur inhysas i varje bur.

I rapporter om djurförsök är det viktigt att ange vilken typ av bur som används och antalet djur i varje bur, både under exponering för det kemiska ämnet och under en påföljande observationstid.

ii) Utfodring

Fodret skall uppfylla alla näringsmässiga krav som kan ställas för den djurart som används i försöket. Om testsubstansen tillförs djuren via fodret kan näringsvärdet sjunka till följd av en samverkan mellan ämnet och någon beståndsdel i fodret. Möjligheten av en sådan reaktion skall övervägas vid tolkningen av testresultaten. Konventionellt laboratoriefoder får användas tillsammans med obegränsade mängder vatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning med testsubstansen när denna tillförs enligt denna metod.

I fodret får inte finnas störande koncentrationer av föroreningar som man vet påverkar toxiciteten.

E. DJURSKYDD

Vid utarbetande av testmetoder har djurskyddet beaktats. Nedan följer några exempel, men förteckningen är inte uttömmande. Den exakta ordalydelsen eller de exakta villkoren bör läsas i

anvisningarna för respektive metod:

- Vid bestämning av toxicitet genom oralt upptag bör två alternativa metoder användas, förfarandet med fast dos och metoden för bestämning av akut toxicitetsklass. Förfarandet med fast dos har inte döden som specifik sluteffekt och förbrukar färre djur. Metoden för bestämning av akut toxicitetsklass förbrukar i genomsnitt 70 % färre djur än oraltest B.1 för akut toxicitet. Båda dessa alternativa metoder innebär mindre smärta och lidande än de klassiska metoderna.
- Antalet förbrukade djur reduceras till ett vetenskapligt godtagbart minimum: Endast fem djur av samma kön testas per dosnivå i fråga om metoderna B.1 och B.3; endast 10 djur (och endast 5 i den negativa kontrollgruppen) används för bestämning av hudsensibilisering genom maximeringstest på marsvin (metod B.6). Även antalet djur som krävs för den positiva kontrollen vid test av mutagenicitet in vivo minskas (metoderna B.11 och B.12).
- Djurens smärta och lidande under testerna minimeras. Djur som visar allvarliga och ihållande tecken på stress och smärta kan behöva avlivas på ett skonsamt sätt. Dosering av testsubstanser på ett sätt som är känt för att orsaka svår smärta och lidande på grund av frätning eller irriterande egenskaper behöver inte utföras (metoderna B.1, B.2 och B.3).
- Tester med irrelevant höga doser undviks genom införande av "Limit-test"er, inte bara i fråga om tester av akut toxicitet (metoderna B.1, B.2 och B.3) utan också i fråga om in vivo-tester av mutagenicitet (metoderna B.11 och B.12).
- En strategi i fråga om tester av irriterande ämnen gör det numera möjligt att inte utföra test eller att reducera testerna till studiet av ett enstaka djur, om tillräckliga vetenskapliga bevis kan erhållas.

Sådana vetenskapliga bevis kan baseras på testsubstansens fysikaliskt-kemiska egenskaper, resultaten av redan utförda tester eller resultaten av in vitro-tester som utvärderats grundligt. Om exempelvis en undersökning av akut toxicitet via huden utförs med "Limit-test" dosen för ämnet (metod B.3) och ingen hudirritation observeras kan ytterligare tester av hudirritation (metod B.4) vara överflödiga. Material som visat tydlig frätning eller allvarlig hudirritation en undersökning av hudirritation (metod B.4) bör inte testas vidare i fråga om ögonirritation (metod B.5).

F. ALTERNATIVA TESTER

För Europeiska unionen är det ett vetenskapligt mål att utveckla och validera alternativa metoder som kan ge samma informationsnivå som nuvarande djurförsök, men som använder färre djur, orsakar mindre lidande eller undviker användning av djur fullständigt.

När sådana metoder blir tillgängliga skall de om möjligt beaktas för riskbedömning och efterföljande klassificering och märkning av eventuella risker.

G. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

När tester utvärderas och tolkas skall begränsningarna för i vilken utsträckning resultaten av djurförsök och in vitro-undersökningar går att tillämpa på människor beaktas och därför får bevis för negativa effekter på människor i förekommande fall användas som bekräftelse av testresultaten.

Dessa resultat kan användas för klassificering och märkning av nya och befintliga kemikalier i fråga om hälsoeffekter för människor, på grundval av deras inneboende egenskaper, och då de identifierats och kvantifierats med hjälp av dessa metoder. Motsvarande kriterier i bilaga VI för klassificering och märkning avser också sluteffekterna för de testprotokoll som omfattas av dessa testmetoder.

Resultaten kan också användas för undersökningar av riskutvärdering, för nya och befintliga kemikalier; lämpliga teststrategier för dessa ändamål anges i motsvarande vägledningsdokument.

H. LITTERATURHÄNVISNINGAR

De flesta av dessa metoder har utvecklats inom ramen för OECD:s program för riktlinjer för tester och bör utföras i enlighet med principerna för god laboratoriepraxis, i syfte att så långt möjligt säkerställa ömsesidigt godtagande av uppgifter.

Ytterligare information finns i de hänvisningar som görs i OECD:s riktlinjer och relevant litteratur som publicerats på annat håll

B. 1 c

AKUT TOXICITET (ORAL) — METOD FÖR BESTÄMNING AV AKUT TOXICITETSKLASS

1. METOD

1.1 Inledning

Metoden för bestämning av akut toxicitetsklass ger information både vad gäller riskbedömning och riskklassificering.

Metoden använder tre fasta doser med lämpliga intervall för att göra det möjligt att försöksrangordna en produkt på grundval av undersökningsresultaten. Dessutom är det enligt det förfarande som beskrivs i denna testmetod möjligt att välja ytterligare tre fasta doser vilka antingen kan användas som alternativ vid givna tidpunkter för beslut eller som valmöjlighet vid ytterligare tester. Användning av (någon av) tilläggsdoserna kan övervägas om en närmare bestämning är önskvärd eller nödvändig.

Metoden bygger på bestämda utgångsdoser och är inte avsedd att tillåta beräkning av ett exakt LD₅₀ men gör det möjligt att bestämma en exponeringsskala där döden förväntas inträffa, eftersom död hos en del av försöksdjuren fortfarande är den huvudsakliga sluteffekten vid detta test. Testresultaten bör möjliggöra klassificering i enlighet med kriterierna i bilaga VI. Beroende på tillvägagångssättets sekventiella karaktär kan testet utföras under en längre period än det förfarande som beskrivs i B.1. Den stora fördelen med metoden är att den kräver ett lägre antal djur än både testet av akut toxicitet (oralt) (B.1) och den alternativa metoden med fast dos (B.1a).

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 Definitioner

Se även Allmän inledning, del B.

1.3 Princip för testmetoden

Testsubstansen ges oralt i en av de bestämda doserna till en grupp försöksdjur. Ämnet testas enligt ett stegvist förfarande, varvid tre djur av samma kön används i varje steg. Det är inte nödvändigt att utföra en inledande pilotstudie. Avsaknad eller närvaro av substansrelaterad död hos djuren vid ett steg kommer att bestämma nästa steg, dvs.

— inga ytterligare tester krävs,

— nästa steg kommer att utföras med samma dos men med djur av det motsatta könet,

— nästa steg kommer att utföras med närmaste högre eller lägre dos.

1.4 Beskrivning av testmetod

1.4.1 Förberedelser

Friska unga vuxna djur väljs ut slumpvis, märks för att möjliggöra individuell identifiering och hålls i sina burar minst fem dagar innan försöket påbörjas för att möjliggöra anpassning till laboratorieförhållandena. Djuren får hållas i burar i grupper av samma kön och dos, men antalet djur per bur får inte påverka möjligheterna till tydliga observationer av varje individ.

Testsubstansen ges som engångsdos till djuren genom sondmatning med magsond eller lämplig intubationskanyl.

Vid behov löses eller suspenderas testsubstansen i lämplig vehikel. Det rekommenderas att i första hand om möjligt använda vattenlösning eller vattensuspension, därefter oljelösning eller oljeemulsion (t.ex. majsolja) och därefter möjligen lösning i andra vehiklar. I fråga om icke vattenbaserade vehiklar bör vehikelns toxiska egenskaper vara kända; i annat fall bör dessa bestämmas före försöket.

Djuren bör fasta före doseringen (t.ex. över natten i fråga om råttor och 3–4 timmar i fråga om möss); däremot får de dricka vatten.

- 1.4.2 *Försöksförhållanden*
- 1.4.2.1 *Försöksdjur*
- Om det inte finns skäl däremot används i första hand råttor. Honorna skall inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.
- Då undersökningen påbörjas bör viktvariationen mellan de använda djuren vara minimal och inte överstiga $\pm 20\%$ av vardera könets genomsnittsvikt.
- 1.4.2.2 *Antal och kön*
- Tre djur av samma kön används för varje steg. Vilket som helst av könen kan användas under inledningssteget.
- 1.4.2.3 *Dosnivåer*
- Den dosnivå som skall användas som utgångsdos väljs från en av de tre fasta dosnivåerna, dvs. 25, 200 eller 2 000 mg/kg kroppsvikt. Utgångsdosnivån bör vara den som troligen orsakar död hos åtminstone några av de doserade djuren. Beroende på vilken utgångsdos som används kan ett av de flödesscheman som beskrivs i bilaga 1 användas.
- Vid val av kön och utgångsdos bör all tillgänglig information användas, inbegripet information om strukturaktivitetssamband. Om det enligt informationen är osannolikt att döden inträffar vid den högsta dosnivån (2 000 mg/kg kroppsvikt) bör ett "Limit-test" utföras. Om det inte finns någon information om det ämne som skall testas rekommenderas av djurskyddsskäl att utgångsdosen 200 mg/kg kroppsvikt används.
- Ibland kan det vara önskvärt att uppnå mer detaljerad information än vad som skulle vara möjligt efter att ha utfört försöket med de tre fasta dosnivåerna 25, 200 och 2 000 mg/kg kroppsvikt. I sådana fall får ytterligare tester med de fasta tilläggsdoser 5, 50 eller 500 mg/kg kroppsvikt övervägas.
- Doser som man vet orsakar uppenbar smärta och lidande på grund av frätande eller allvarligt irriterande verkan behöver inte ges.
- Tidsintervallet mellan behandlingsgrupperna bestäms med utgångspunkt från den tidpunkt då tecken på toxicitet uppträder, deras varaktighet och hur allvarliga de är. Behandling av djur av det motsatta könet eller vid nästa dosnivå bör inte ske förrän man förväntat sig om att de tidigare doserade djuren överlever.
- 1.4.2.4 *"Limit-test"*
- Ett "limit-test" på dosnivån 2 000 mg/kg kroppsvikt får utföras med tre djur av vardera könet. Om substansrelaterad död framkallas kan ytterligare test med 200 mg/kg (eller 500 mg/kg) kroppsvikt behöva utföras.
- 1.4.2.5 *Observationsperiod*
- Djuren bör normalt observeras under 14 dagar, med undantag för om djuren behöver tas ur försöket och avlivas av djurskyddsskäl eller om de hittas döda. Observationsperiodens längd bör dock inte fastställas strikt. Den bör bestämmas på grundval av toxiska reaktioner, när dessa börjar visa sig och återhämningsperiodens längd och kan därför förlängas vid behov. De tidpunkter vid vilka tecken på toxicitet uppträder och försvinner är viktiga, särskilt om det finns en tendens till fördröjda toxiska symtom. Alla observationer skall registreras systematiskt med individuella uppgifter för varje djur.
- 1.4.3 *Förfarande*
- Efter fasteperioden bör djuren vägas innan de tillförs testsubstansen. Efter det att testsubstansen tillförts utfodras inte djuren på ytterligare 3–4 timmar. Om en dos tillförs i fraktioner under en viss period kan det vara nödvändigt att utfodra djuren och ge dem vatten, beroende på periodens längd.
- Den största vätskevolym som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på försöksdjurens storlek. I fråga om gnagare bör volymen normalt inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt; i fråga om vattenlösningar kan dock 2 ml/100 g kroppsvikt övervägas. Variationer i testvolymen bör minimeras genom att koncentrationen justeras för att säkerställa konstant volym vid alla dosnivåer. Om en enskild dos inte är möjlig får en dos som tillförs i fraktioner ges under en period på högst 24 timmar.
- Detaljer i testförfarandet beskrivs i bilaga 1.

1.4.3.1 Allmänna observationer

Noggranna kliniska observationer bör göras minst två gånger under doseringsdagen eller oftare om detta är befogat på grund av djurets reaktion på behandlingen, och därefter minst en gång per dag. Djur som hittas döende och djur som visar tecken på allvarlig smärta och ihållande lidande bör avlivas på ett skonsamt sätt. Djur som avlivas av humanitära skäl skall betraktas på samma sätt som djur som avlider till följd av försöket.

Om djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda skall tidpunkten då döden inträffade registreras så exakt som möjligt. Om djuren fortsätter att visa tecken på toxicitet krävs ytterligare observationer. Observationerna skall omfatta hud- och pålsförändringar, ögon och selmhinnor och även respirations- och cirkulationsystem, autonoma och centrala nervsystemet samt motorisk aktivitet och beteendemönster. Särskild uppmärksamhet skall ägnas åt observation av skälvnningar, kramper, salivering, diarré, slöhet, sömn och medvetlöshet.

Samtliga observationer skall registreras systematiskt med individuella noteringar för varje djur.

1.4.3.2 Kroppsvikt

Alla djur bör vägas strax innan testsubstansen tillförs och därefter minst en gång i veckan. Viktförändringar bör beräknas och noteras. Mot slutet av försöket vägs djuren innan de avlivas skonsamt.

1.4.3.3 Obduktion

Alla försöksdjur, inbegripet de som dör under försöket eller avlägsnas från försöket, skall obduceras. Alla patologiska förändringar skall noteras för varje djur. Mikroskopisk undersökning av organ som visar tecken på patologiska förändringar hos djur som överlevt 24 timmar eller mer får också övervägas eftersom undersökningen kan ge värdefull information.

2. DATA

Individuella uppgifter för varje djur bör finnas tillgängliga. Därutöver bör alla uppgifter sammanfattas i en tabell som för varje försöksgrupp visar antalet använda djur, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som påträffats döda under försöket eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten för döden för varje individ, en beskrivning av och tidsförloppet för toxiska effekter och reversibilitet samt obduktionsresultat.

En allmän vägledning för tolkning av resultaten inför klassificeringen ges i bilaga 2.

3. RAPPORTERING

Försöksrapport

Försöksrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

Försöksdjur:

- Art/stam.
- Djurens mikrobiologiska status, om denna är känd.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Ursprung, försöksförhållanden, foder etc.
- Djurens individuella vikt vid början av försöket, därefter vikten med en veckas mellanrum och vid försökets slut.

Försöksförhållanden:

- Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.
- Utförliga uppgifter om tillförsel av testsubstansen, inbegripet dosvolymen och tidpunkt för dosering.
- Utförliga uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet typ och källa, vattenkälla).
- Motivering för val av utgångsdos.

Resultat:

- Tabeller över reaktionsdata per kön och dosnivå för varje djur (dvs. djur som visar tecken på toxicitet inbegripet dödsfall samt effekternas art, allvar och varaktighet).
- Tidsförlopp från det att tecken på toxicitet uppträder och om dessa var reversibla för varje individ.
- Obduktionsresultat och eventuella histopatologiska resultat för varje individ, om de finns tillgängliga.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

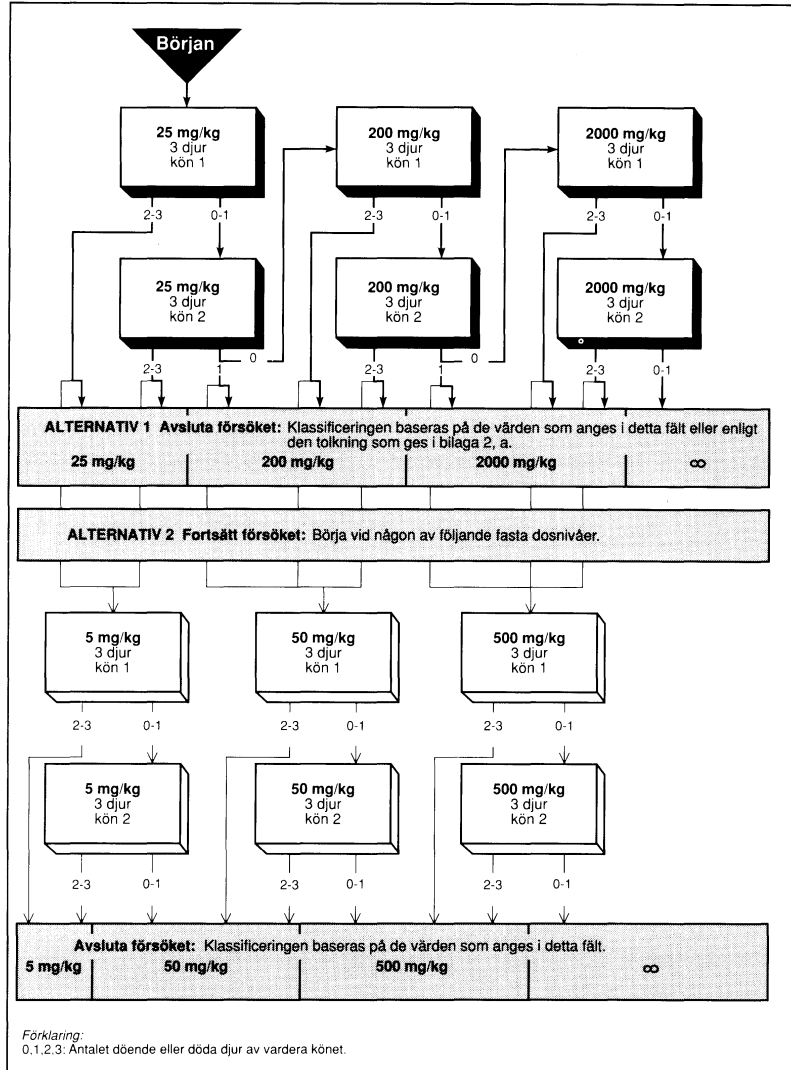
Denna metod motsvarar OECD TG 423.

BILAGA 1

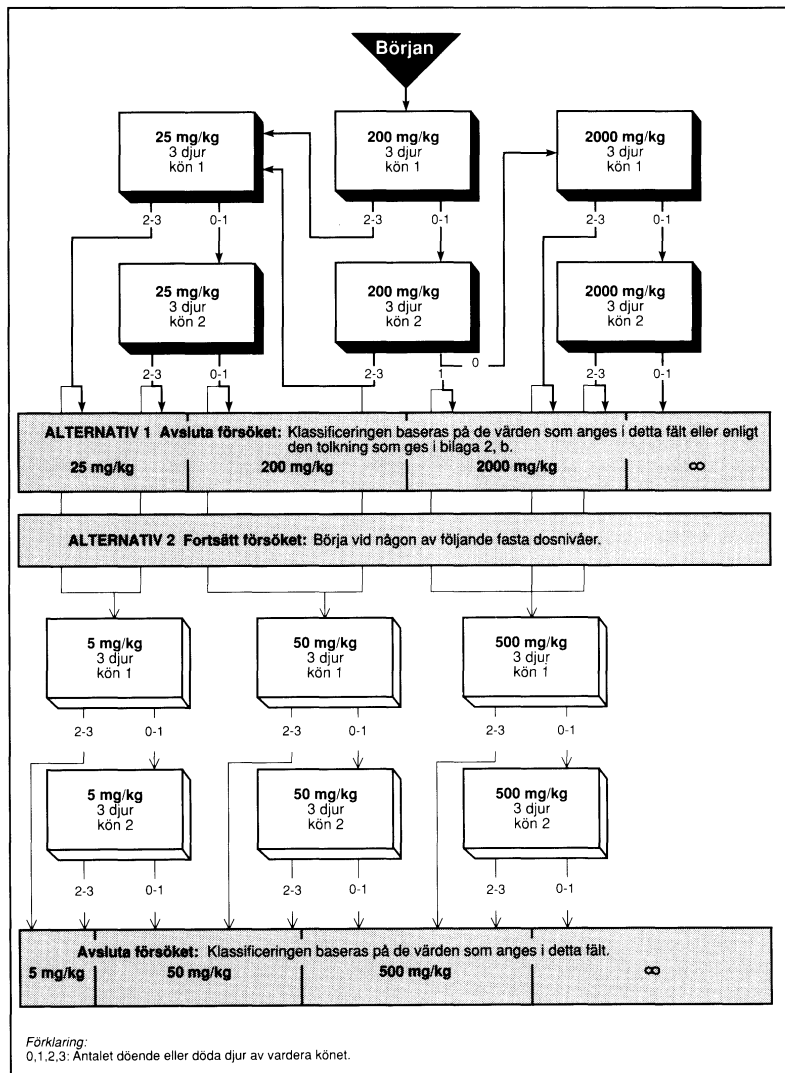
FÖRSÖKSFÖRFARANDE

1. I enlighet med punkt 1.4.2.3 bör utgångsdosen vara den dos som sannolikt orsakar döden för åtminstone några av de doserade djuren. Information som kan användas för val av utgångsdos omfattar följande:
 - Uppgifter om fysikaliskt-kemiska egenskaper.
 - Strukturaktivitetssamband.
 - Samtliga uppgifter från andra toxicitetstester.
 - Förmodad användning av testsubstansen.
2. För varje utgångsdos visar de respektive testscheman som omfattas av denna bilaga vilket förfarande som skall följas. Beroende på antalet skonsamt avlivade eller döda djur skall försöksförfarandet följa de angivna pilarna.
3. Om endast ett djur av det motsatta könet dör vid en utgångsdos på 25 eller 200 mg/kg kroppsvikt bör detta normalt inte leda till vidare försök. Om emellertid inga tecken på toxicitet uppträder hos de övriga fem djuren bör man vid obduktionen beakta möjligheten att mortaliteten inte varit substansrelaterad. I sådana fall bör försöket fortsättas med dosering på närmast högre nivå.
4. Om ett djur per kön dör vid en dos på 2 000 mg/kg kroppsvikt förväntas LD₅₀-värdet överstiga 2 000 mg/kg kroppsvikt. Eftersom detta är ett gränsresultat bör dock reaktionen hos de återstående två djuren per kön observeras omsorgsfullt, och förekomsten av distinkta, tydliga tecken på toxicitet hos dessa djur kan mycket väl leda till en klassificering motsvarande ett LD₅₀-värde på 2 000 mg/kg kroppsvikt eller lägre, eller motivera ytterligare tester vid samma dosnivå.
5. Förfarandet möjliggör försök med ytterligare tre fasta doser (alternativ 2). Detta alternativ kan antingen användas för att välja en alternativ dos vid en given tidpunkt för beslut eller för ytterligare försök efter att ha avslutat det aktuella försöket (alternativ 1). Försöksförfarandet enligt alternativ 1 anges med pilar i fetstil medan försöksförfarandet enligt alternativ 2 anges med tunna pilar.

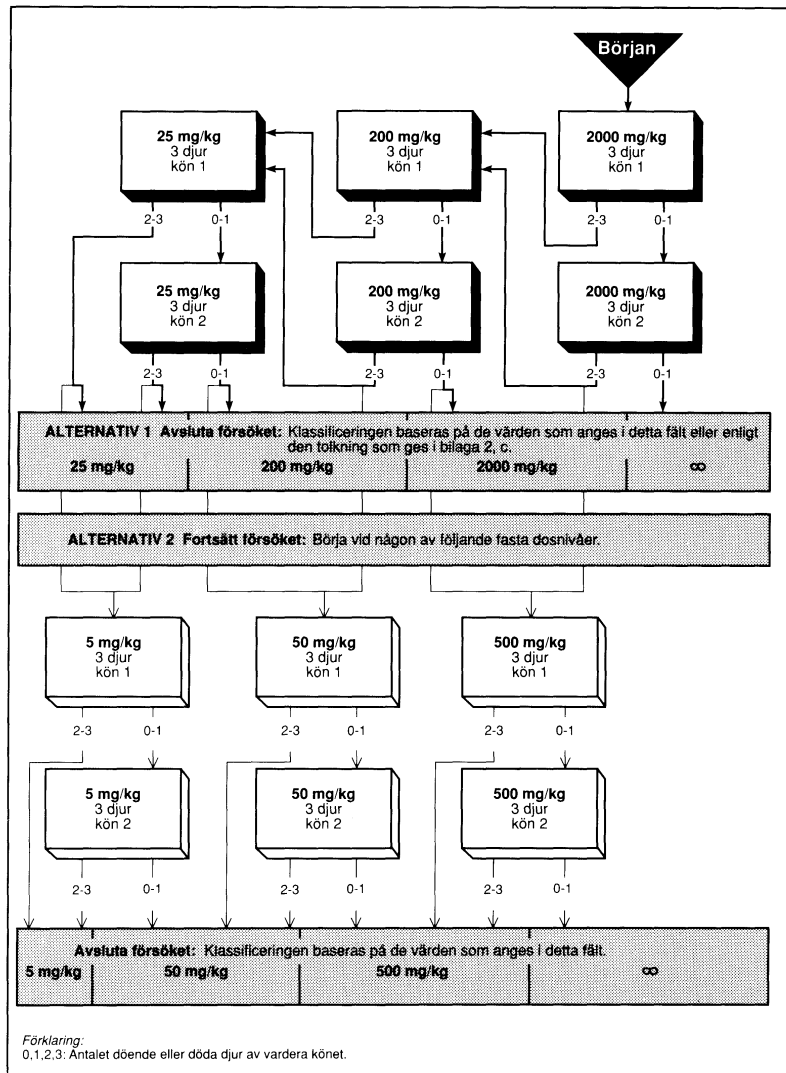
a) Försöksförfarande med en utgångsdos på 25 mg/kg kroppsvikt



b) Försöksförfarande med en utgångsdos på 200 mg/kg kroppsvikt



c) Försöksförfarande med en utgångsdos på 2 000 mg/kg kroppsvikt



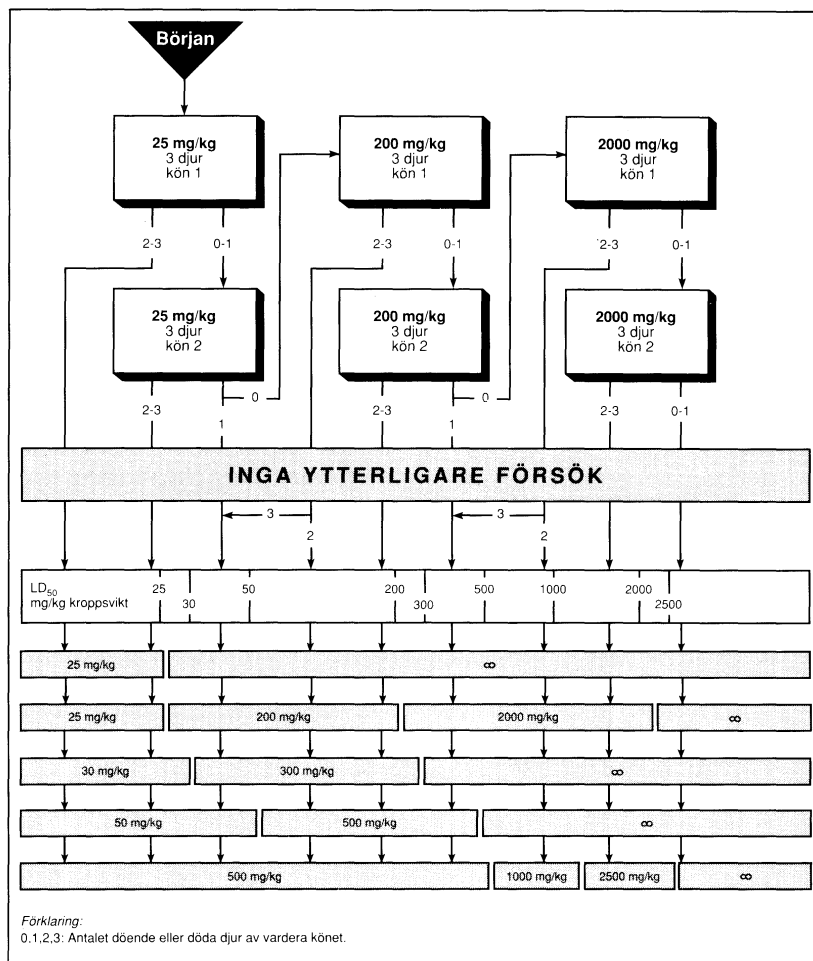
BILAGA 2

TOLKNING AV RESULTAT BASERADE PÅ FÖRSÖK ENLIGT ALTERNATIV 1

De grå fälten under fältet "Avsluta försöket" i de scheman som återges i denna bilaga representerar de värden som används vid klassificering. Efter försöksförfarandet enligt alternativ 1 följs relevant pil nedåt till det berörda grå fältet.

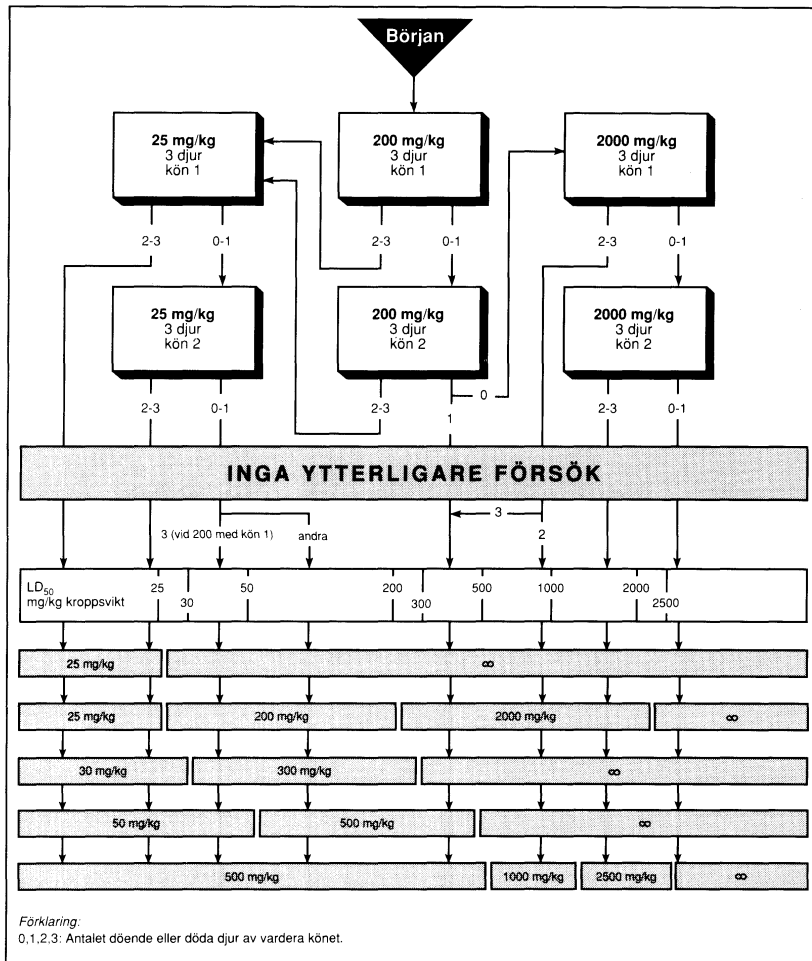
a) Tolkning av resultat baserade på försök enligt alternativ 1

Utgångsdos: 25 mg/kg kroppsvikt



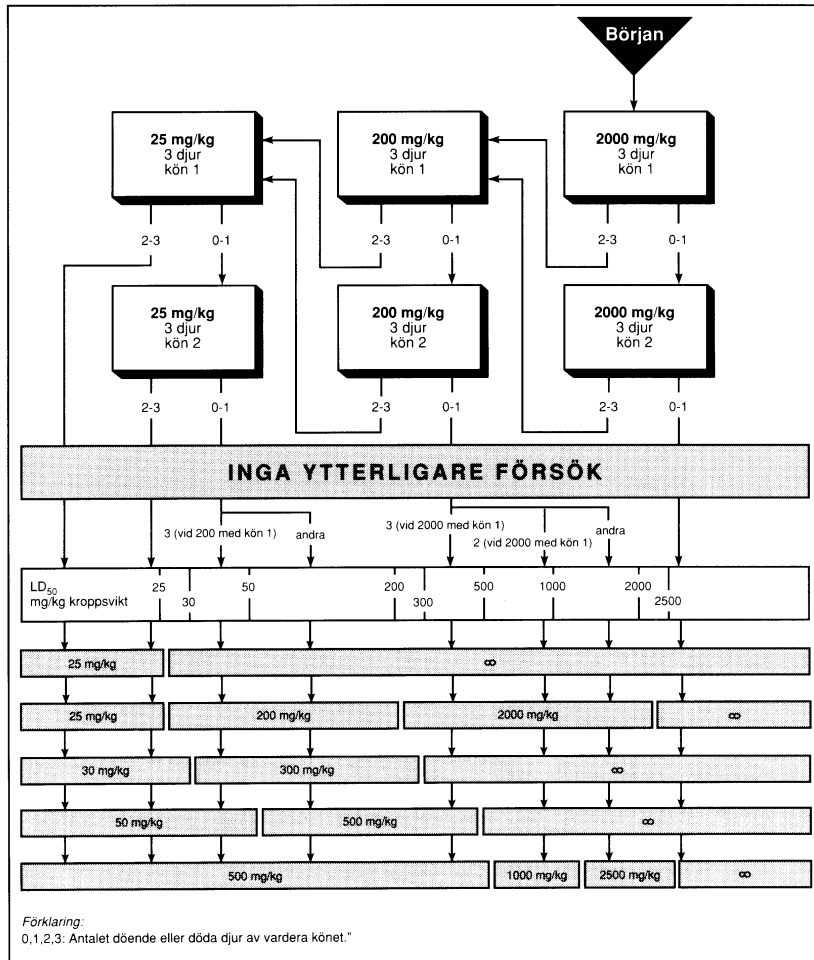
b) Tolkning av resultat baserade på försök enligt alternativ 1

Utgångsdos: 200 mg/kg kroppsvikt



c) Tolkning av resultat baserade på försök enligt alternativ 1

Utgångsdos: 2 000 mg/kg kroppsvikt



B. 6 HUDSENSIBILISERING

1. METOD

1.1 Inledning

Kommentarer:

Testers noggrannhet och förmåga att spåra sådana ämnen som kan orsaka hudallergi hos människan anses betydelsefulla i ett klassificeringssystem för toxicitet som avser folkhälsan.

Det finns ingen enstaka testmetod som på ett lämpligt sätt kan identifiera samtliga de ämnen som kan vara sensibiliserande och som är relevant för alla ämnen.

Faktorer som ett ämnes fysikaliska egenskaper, inbegripet dess förmåga att penetrera huden, skall beaktas vid valet av test.

Två typer av test på marsvin har utvecklats: Ett test av adjuvanstyp i vilket man åstadkommer ett allergiskt tillstånd genom att upplösa eller suspendera (blanda) testsubstansen i Freund's Complete Adjuvant (FCA), och test av icke-adjuvanstyp.

Adjuvanstester är sannolikt mer precisa vad gäller att förutsäga ämnets eventuella kapacitet att orsaka hudsensibilisering hos människan än metoder där inte Freund's Complete Adjuvant används och de är därför att föredra.

Maximeringstest på marsvin (GPMT) används ofta som adjuvanstest. Trots att flera andra metoder kan användas för att upptäcka ett ämnes potentiella förmåga att orsaka hudsensibilisering anses maximeringsförsöket på marsvin vara den bästa metoden.

Icke-adjuvanstester (av vilka Buehler-testet föredras) med många kemiska klasser anses mindre känsliga.

I vissa fall anses det finnas goda skäl att välja Buehler-testet, som innebär lokal applicering i stället för den intradermala injektion som används i GPMT. Då Buehler-testet används skall detta vara vetenskapligt välmotiverat.

Här beskrivs GPMT och Buehler-testet. Andra metoder får användas, förutsatt att de är väldokumenterade och vetenskapligt motiverade.

Om en erkänd kontrollundersökning ger positiva resultat, kan testämnet betecknas som potentiellt sensibiliserande, och det behöver inte vara nödvändigt att genomföra ytterligare test på marsvin. Om en sådan kontrollundersökning dock ger negativt resultat skall ett test på marsvin genomföras enligt det förfarande som beskrivs i denna testmetod.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 Definitioner

Hudsensibilisering (allergisk kontaktdermatit): En immunologiskt utlöst kutan reaktion på ett ämne. Hos människan kan reaktionerna kännetecknas av klåda, hudrodnad, ödem, blemmor och blåsor eller en kombination av dessa. Andra arter kan reagera annorlunda så att endast hudrodnad och ödem observeras.

Induktionsexponering: En försöksexponering av ett försöksobjekt för en testsubstans i syfte att inducera hypersensibilitet.

Induktionsperiod: En period på minst en vecka som följer efter induktionsexponering då hypersensibilitet kan utvecklas.

Provokationsexponering: En försöksexponering av ett tidigare behandlat objekt för att testa ämnet efter en induktionsperiod i syfte att bestämma om objektet reagerar med hypersensibilitet.

1.3 Referensämnen

Den tillämpade försöksmetodens noggrannhet och tillförlitlighet bör utvärderas var sjätte månad genom användning av ämnen som är kända för att ha milda till moderata hudsensibiliserings-egenskaper.

I ett korrekt utfört test bör en reaktion på minst 30 % i adjuvanstest och minst 15 % i icke-adjuvanstest förväntas för milda/moderata sensibiliserande ämnen.

Följande ämnen är att föredra:

CAS-nummer	EINECS-nummer	EINECS-namn	Vanliga namn
101-86-0	202-983-3	α -hexylcinnamaldehyd	α -hexylcinnamaldehyd
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (merkaptobenzo-tiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzokain	norkain

Då det är motiverat på grund av vissa omständigheter får andra kontrollämnen som uppfyller ovan angivna kriterier användas.

1.4 Princip för testmetoden

Försöksdjuren exponeras inledningsvis för testsubstansen genom intradermala injektioner och/eller epidermal applicering (induktionsexponering). Efter en paus på 10–14 dagar (induktionsperiod) under vilken en immunreaktion kan utvecklas exponeras djuren för en provokationsdos. Omfattningen och graden av hudens reaktion på provokationsexponeringen hos försöksdjuren jämförs med den som uppträder hos kontrollgruppens djur som under induktionsexponeringen får skenbehandling och därefter utsätts för provokationsexponering.

1.5 Beskrivning av testmetoderna

Om det anses nödvändigt att avlägsna testsubstansen görs det med vatten eller en lämplig lösning utan att befintlig reaktion eller hudens tillstånd ändras.

1.5.1 Maximeringstest på marsvin (GPMT)

1.5.1.1 Förberedelser

Friska unga vuxna albinomarsvin aklimatiseras till laboratoriemiljö under minst fem dagar före försöket. Före försöket väljs djuren ut slumpvis och fördelas i behandlingsgrupper. Pälsen avlägsnas genom klippning, rakning eller eventuellt kemiskt, beroende på vilken testmetod som används. Försiktighet skall iaktas för att inte skada huden. Djuren vägs innan försöket påbörjas och då det avslutas.

1.5.1.2 Försöksförhållanden

1.5.1.2.1 Försöksdjur

Vanliga stammar av albinomarsvin används.

1.5.1.2.2 Antal och kön

Hannar och/eller honor kan användas. Om honor används skall de inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Minst 10 djur används i behandlingsgruppen och minst fem djur i kontrollgruppen. Om färre än 20 testdjur och 10 kontrolldjur har använts och det inte är möjligt att konstatera att testsubstansen är hudsensibiliserande, rekommenderas starkt tester med ytterligare djur upp till totalt 20 testdjur och 10 kontrolldjur.

1.5.1.2.3 Dosnivåer

Den testsubstanskoncentration som används vid varje induktionsexponering skall tolereras väl av hela organismen och vara den högsta nivå som orsakar mild till måttlig hudirritation. Den koncentration som används vid provokationsexponering skall vara den högsta icke-irriterande dosen. Om nödvändigt, kan de lämpliga koncentrationerna fastställas med hjälp av en pilotundersökning med två eller tre djur. För detta ändamål bör användningen av FCA-behandlade djur beaktas.

1.5.1.3 Förfarande

1.5.1.3.1 Induktion

Dag 0 — behandlingsgrupp

Tre par intradermala injektioner på 0,1 ml ges i skuldertrakten, där pälsen avlägsnats, så att varje par injektioner görs på var sida om mittlinjen.

Injektion 1a 1:1 blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

Injektion 2: Testsubstansen i lämplig vehikel i vald koncentration.

Injektion 3: Testsubstansen i vald koncentration i en 1:1 blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

I injektion 3 löses de vattenlösliga ämnena i vattenfasen innan de blandas med FCA. Fettlösliga eller olösliga ämnen suspenderas (blandas) i FCA innan de blandas med vattenfasen. Testsubstansens slutliga koncentration skall vara densamma som den i injektion 2.

Injektion 1 och 2 ges med ett kort intervall och närmast huvudet medan injektion 3 ges i testområdet nedersta del.

Dag 0 — kontrollgrupp

Tre par intradermala injektioner på 0,1 ml ges i samma område som på djuren i behandlingsgruppen.

Injektion 1a 1:1 blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

Injektion 2: Outspädd vehikel.

Injektion 3: En 50 % blandning av vehikeln i en 1:1 blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

Dag 5–7 — behandlings- och kontrollgrupp

Om ämnet inte är hudirriterande behandlas testområdet, efter klippning eller rakning, ungefär 24 timmar före lokal applicering med 0,5 ml 10 % natriumlaurylsulfat i vaselin i syfte att orsaka lokal irritation.

Dag 6–8 — behandlingsgrupp

Pälsen avlägsnas på nytt från testområdet. Testsubstansen i lämplig vehikel fördelas på ett filterpapper (2 × 4 cm), appliceras på testområdet och hålls i kontakt med huden genom täckande förband under 48 timmar. Valet av vehikel skall vara välmotiverat. Fasta ämnen pulveriseras och införlivas i en lämplig vehikel. Vätskor kan om det är lämpligt appliceras outspädda.

Dag 6–8 — kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas på nytt från testområdet. Vehikeln appliceras på liknande sätt på testområdet och hålls i kontakt med huden genom täckande förband under 48 timmar.

1.5.1.3.2 Provokation

Dag 20–22 — behandlings- och kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas från behandlings- och kontroldjurens flanker. En kompress eller kammare innehållande testsubstansen appliceras på djuens ena flank och, om relevant, en kompress eller kammare innehållande enbart vehikel på den andra flanken. Kompresserna hålls i kontakt med huden genom täckande förband under 24 timmar.

1.5.1.3.3 Observation och gradering: Behandlings- och kontrollgrupp

- Cirka 21 timmar efter det att kompressen avlägsnats rengörs det provocerade området och klipps eller rakas och vid behov avlägsnas pälsen med hårborttagningsmedel.
- Cirka tre timmar senare (ungefär 48 timmar från det att provokationsexponeringen påbörjats) observeras hudreaktionen och noteras i enlighet med graderingen i bilagan.
- Cirka 24 timmar efter föregående observation görs en andra observation (72 timmar) och resultaten noteras.

Blindläsning av test- och kontrolldjur rekommenderas.

Om det är nödvändigt för att klargöra resultaten från den första provokationen bör en andra provokation (dvs. en omprovokation) övervägas en vecka efter den första, i tillämpliga fall med en ny kontrollgrupp. En omprovokation får också göras på den ursprungliga kontrollgruppen.

Alla hudreaktioner och ovanliga resultat, inbegripet systematiska reaktioner, som orsakas av induktions- och provokationsförfarandena bör observeras och noteras i enlighet med graderingskalan enligt Magnusson/Kligman (se bilagan). Övriga förfaranden t.ex. histopatologisk undersökning eller mätning av hudvecks tjocklek, bör utföras för att klargöra tveksamma reaktioner.

1.5.2 Buebler-test

1.5.2.1 Förberedelser

Friska unga vuxna albinomarsvins aklimatiseras till laboratoriemiljön under minst fem dagar före försöket. Före försöket väljs djuren ut slumpvis och fördelas i behandlingsgrupper. Pälsen avlägsnas genom klippning, rakning eller eventuell kemiskt, beroende på den testmetod som används. Försiktighet skall iaktas för att inte skada huden. Djuren vägs innan försöket påbörjas och då det avslutas.

1.5.2.2 Försöksförhållanden

1.5.2.2.1 Försöksdjur

Vanliga laboratoriestammar av albinomarsvin används.

1.5.2.2.2 Antal och kön

Hannar och/eller honor kan användas. Om honor används skall de inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Minst 20 djur används i behandlingsgruppen och minst 10 djur i kontrollgruppen.

1.5.2.2.3 Dosisnivåer

Testsubstansens koncentration anpassas till den högsta nivå som djuren har tolererat väl i varje induktionsstadium och skall vara den högsta nivå som orsakar mild till uthärdlig hudirritation. Den koncentration som används vid provokationsexponering skall vara den högsta icke-irriterade dosen. Om nödvändigt, kan de lämpliga koncentrationerna fastställas med hjälp av en pilotundersökning med två eller tre djur.

I fråga om vattenlösliga testmaterial är det lämpligt att använda vatten eller en icke-irriterande lösning av anjon-yttaktiva ämnen som vehikel. I fråga om övriga testmaterial är 80 % etanol/vatten att föredra för induktion och aceton för provokation.

1.5.2.3 Förfarande

1.5.2.3.1 Induktion

Dag 0 — behandlingsgrupp

Pälsen avlägsnas från ena flanken (klipps). Testkompresssystemet dränks in med testsubstansen i lämplig vehikel (valet av vehikel skall vara välmotiverat; om lämpligt får testsubstansen i vätskeform appliceras utspädda). Testkompresssystemet appliceras på testområdet och hålls i kontakt med huden med ocklusivkompress eller -kammare och lämpligt förband under sex timmar.

Testkompresssystemet skall vara ocklusivt. En bomullskompress är lämplig och kan vara fyrkantig eller rund och cirka 4–6 cm². Fasthållning medelst lämpligt förband är lämpligt för att säkerställa ocklusion. Om omslag används kan ytterligare exponering krävas.

Dag 0 — kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas från ena flanken (klipps). Endast vehikeln appliceras på liknande sätt som för behandlingsgruppen. Testkompresssystemet hålls i kontakt med huden genom ocklusivkompress eller -kammare och lämpligt förband under sex timmar. Om det kan visas att en simulerad kontrollgrupp inte krävs kan en oxponerad kontrollgrupp användas.

Dag 6–8 och 13–15 — behandlings- och kontrollgrupp

Samma applicering som dag 0 utförs på samma testområde (vid behov efter avlägsnande av päls) på samma flank dag 6–8 och åter dag 13–15.

1.5.2.3.2 Provokation

Dag 27–29 — behandlings- och kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas från den obehandlade flanken på behandlings- och kontrolldjuren (klippning). En ocklusivkompress eller -kammare innehållande lämplig mängd testsubstans appliceras vid maximal icke-irriterande koncentration, på den bakre obehandlade flanken på behandlings- och kontrolldjuren.

I relevanta fall appliceras också en ocklusivkompress eller -kammare på den främre obehandlade flanken på både behandlings- och kontrolldjur. Kompresserna eller kamrarna hålls i kontakt med huden genom lämpligt förband under sex timmar.

1.5.2.3.3 Observation och gradering

- Cirka 21 timmar efter det att kompressen tagits bort avlägsnas pälsen från provokationsområdet.
- Cirka tre timmar senare (ungefär 30 timmar efter det att provokationskompressen applicerades) observeras hudreaktionerna och noteras i enlighet med graderingen i bilagan.
- Cirka 24 timmar efter 30 timmars-observationen (ungefär 54 timmar efter det att provokationskompressen applicerades) observeras hudreaktionerna på nytt och noteras.

Blindläsning av test och kontrolldjur rekommenderas.

Om det är nödvändigt för att klargöra resultaten från den första provokationen bör en andra provokation (dvs. en förnyad provokation) övervägas en vecka efter den första, i tillämpliga fall med en ny kontrollgrupp. En förnyad provokation får också göras på den ursprungliga kontrollgruppen.

Alla hudreaktioner och ovanliga resultat, inbegripet systemiska reaktioner, som följer av induktions- och provokationsförfarandena bör observeras och noteras i enlighet med graderingsskalan enligt Magnusson/Kligman (se bilagan). Övriga förfaranden, t.ex. histopatologisk undersökning eller mätning av hudvecks tjocklek, får utföras för att klargöra tveksamma reaktioner.

2. DATA (GPMT OCH BUEHLER-TEST)

Uppgifterna bör sammanfattas i tabellform som i fråga om varje djur visar hudreaktioner vid varje observation.

3. **RAPPORTERING (GPMT OCH BUEHLER-TEST)**

Om ett screeningsförsök utförs före marsvinsförsöket skall en beskrivning av eller hänvisning till försöket (t.ex. Local Lymph Node Essay (LLNA), Mouse Ear Swelling Test (MEST), inbegripet uppgifter om förfarandet, lämnas tillsammans med de resultat som erhållits genom försöket och referensämnena.

Försöksrapport (GPMT och Buehler-test)

Försöksrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

Försöksdjur:

- Art/stam för använda marsvin.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Hätkomst, miljöbetingelser, foder etc.
- Djurens individuella vikt vid försökets inledning.

Försöksförhållanden:

- Metod för förberedelse av kompressområde.
- Uppgift om använt kompressmaterial och kompressmetod.
- Resultat av förundersökning med slutsatser om de induktions- och provokationskoncentrationer som skall användas i försöket.
- Uppgift om förberedelse av testsubstans, applicering och borttagning.
- Motivering för val av vehikel.
- Vehikel- och testsubstanskoncentrationer som används vid induktions- och provokationsexponering och den totala mängd ämne som appliceras vid induktion och provokation.

Resultat:

- En sammanfattning av resultaten av den senaste kontrollen av känslighet och tillförlitlighet (se 1.3), inbegripet uppgift om ämne, koncentration och använd vehikel.
- Resultatet för varje djur inklusive graderingsystem.
- Redogörelse för arten och graden av observerade effekter.
- Eventuella histopatologiska resultat.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

Denna metod motsvarar OECD TG 406.

Bilaga

TABELL:

Graderingsskala enligt Magnusson/Kligman för utvärdering av reaktioner på provokationskom-
presstest

- 0 = ingen synbar förändring
- 1 = lätt eller måttlig hudrodnad
- 2 = måttlig till stark hudrodnad
- 3 = intensiv hudrodnad och svullnad*

B.7 28 DAGARS STUDIE AV TOXICITET MED UPPREPAD ORAL DOSERING

1. METOD

1.1 Inledning

Se Allmän inledning, del B.

1.2 Definitioner

Se Allmän inledning, del B.

1.3 Princip för testmetoden

Testsubstansen tillförs dagligen oralt i gradvist ökande doser till flera grupper försöksdjur, en dosnivå per grupp, under 28 dagar. Under doseringsperioden observeras djuren noggrant varje dag efter tecken på toxicitet. Djur som dör eller avlivas under försöket obduceras och vid försökets slut avlivas de överlevande djuren och obduceras.

Denna metod lägger större vikt vid de neurologiska effekterna som särskild sluteffekt samt behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att erhålla mesta möjliga information. Metoden skall identifiera kemikalier med eventuell neurotoxisk verkan vilket kan motivera mer ingående undersökningar av den aspekten. Därutöver kan metoden ge indikationer på immunologiska och reproduktionstoxiska effekter.

1.4 Beskrivning av testmetoden

1.4.1 Förberedelser

Friska unga vuxna djur väljs slumpvis ut till kontroll- och dosgrupperna. Burarna bör ordnas så att eventuella effekter på grund av deras placering minimeras. Djuren identifieras individuellt och hålls i sina burar minst fem dagar innan försöket påbörjas för att de skall aklimatisera sig till laboriemiljön.

Testsubstansen tillförs via sondmatning, foder eller vatten. Den metod som väljs för oral tillförsel beror på syftet med studien och ämnets fysikaliskt-kemiska egenskaper.

Testsubstansen löses vid behov i lämplig vehikel. Om möjligt bör i första hand vattenlösning eller vattensuspension övervägas, följt av oljelösning eller oljeemulsion (t.ex. majsolja) samt därefter andra vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten skall vehikelns toxiska egenskaper vara kända. Testsubstansens stabilitet i vehikeln bör fastställas.

1.4.2 Försöksförhållanden

1.4.2.1 Försöksdjur

Helst skall råttor användas även om andra gnagare kan användas. Vanligen använda laboriestammar av unga friska vuxna djur bör användas. Honorna skall inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. Doseringen bör inledas snarast möjligt efter avvänjningen och under alla förhållanden innan djuren är nio veckor gamla.

Då undersökningen påbörjas bör variationen i vikt mellan de använda djuren vara minimal och inte överstiga $\pm 20\%$ av vardera könets genomsnittsvikt.

Om upprepade oralstudie utförs som inledning till en långtidsstudie skall helst djur från samma stam och med samma ursprung användas i båda försöken.

1.4.2.2 Antal och kön

Minst 10 djur (fem honor och fem hannar) bör användas för varje dosnivå. Om avlivningar är inplanerade under försökets gång bör antalet djur ökas med det antal som avlivas innan försöket slutförts.

Därutöver bör en satellitgrupp på 10 djur (fem av vardera kön) behandlas med den höga dosnivån under 28 dagar och observeras angående reversibla eller kvarstående effekter eller fördröjt uppträdande av toxiska effekter under 14 dagar efter det att försöket avslutats. En satellitgrupp på 10 kontroldjur (fem av vardera kön) skall också användas.

1.4.2.3 Dosnivåer

I allmänhet bör minst tre dosgrupper och en kontrollgrupp användas. Med undantag för behandling med testsubstansen bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna. Om en vehikel används vid tillförsel av testsubstansen bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största dos som används.

Om det, efter utvärdering av andra uppgifter, inte förväntas några effekter vid en dos på 1 000 mg/kg kroppsvikt får ett "limit-test" utföras. Om det inte finns tillgång till relevant underlag får en pilotstudie genomföras till hjälp för att bestämma doser som skall användas.

Dosnivåerna bör väljas med hänsyn till eventuellt befintliga toxicitets- och toxikokinetiska uppgifter som finns tillgängliga för testsubstansen eller närbesläktade ämnen. Den högsta dosnivån bör väljas i syfte att inducera toxiska effekter utan att orsaka dödsfall eller allvarligt lidande. Därefter bör dosnivåerna väljas i fallande skala för att påvisa en dosrelaterad reaktion samt vid den lägsta dosnivån inga påvisbara skadliga effekter (NOAEL - no-observed-adverse effects). Två- till fyrdubbla dosintervall är ofta optimala för att fastställa de fallande dosnivåerna; tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användning av mycket breda intervall (t.ex. över faktor 10) mellan dosnivåerna.

För substanser som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att försäkra sig om att de kvantiteter av testsubstansen som används inte stör det normala näringsupptaget eller den normala vattenbalansen. När testsubstansen tillförs via fodret kan man använda antingen en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet skall anges. För ett ämne som tillförs genom sondmatning skall dosen ges vid samma tid varje dag och vid behov justeras för att hålla en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt.

Om försök med upprepad oral dosering används som förstudie till en långtidsstudie skall samma foder användas i båda försöken.

1.4.2.4 "Limit-test"

Om ett försök med en dosnivå om minst 1000 mg per kg kroppsvikt och dag eller, vid tillförsel i föda eller dricksvatten, en motsvarande andel i födan eller dricksvattnet (baserad på fastställd kroppsvikt) och med användning av det tillvägagångssätt som beskrivits för denna studie, inte ger några observerbara toxiska effekter och om toxicitet inte förväntas på grundval av uppgifter från strukturellt närbesläktade ämnen, kan en fullständig undersökning med tre dosnivåer anses överflödig. Ett "limit-test" används utom när exponering på människor visar att en högre dosnivå behövs.

1.4.2.5 Observationsperiod

Observationsperioden bör vara 28 dagar. Djur i en satellitgrupp avsedd för fortsatta observationer bör hållas i minst ytterligare 14 dagar utan behandling för att fördröjda eller kvarstående effekter eller återhämtning från toxiska effekter skall kunna upptäckas.

1.4.3 Förfarande

Djuren doseras med testsubstansen dagligen sju dagar per vecka under en period på 28 dagar.

Dosering fem dagar per vecka måste motiveras. Om testsubstansen tillförs genom sondmatning skall ämnet ges till djuren i en enda dos via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på försöksdjurets storlek.

Volymen bör inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt utom i fråga om vattenlösningar då 2 ml/100 g kroppsvikt får användas. Med undantag för irriterande eller frätande ämnen som normalt visar kraftigare effekt med högre koncentration bör variationer i testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym på alla dosnivåer.

1.4.3.1 Generella observationer

Generella kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt(er) varje dag och med hänsyn till de maximalt förväntade effekterna efter dosering. Djurens hälsostatus bör noteras. Minst två gånger per dag kontrolleras om djur är döende eller döda.

Döende djur och djur som lider allvarligt bör avlägsnas, avlivas skonsamt och obduceras.

Noggranna kliniska observationer görs en gång av samtliga djur före den första exponeringen (för att möjliggöra jämförelser på samma objekt) och därefter minst en gång i veckan. Dessa observationer bör göras utanför buren på en "standardarena" och helst vid samma tidpunkt varje gång. Observationerna bör noteras noggrant, helst genom att poängsystem som definieras utförligt av testlaboratoriet. Minimala variationer i försöksbetingelserna bör eftersträvas, och

observationerna skall helst utföras av någon som inte känner till behandlingen. De tecken som noteras bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, hårrem, ögon och slemhinnor, uppträdande av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (tårflöde, upprest hårrem, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotyp beteende (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisart beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) bör också noteras.

Under den fjärde exponeringsveckan bör den sensoriska reaktionen på stimuli av olika slag utföras (t.ex. hörsel-, syn- och djupsensoriska stimuli) liksom bedömning av greppstyrka och motorisk aktivitet. Ytterligare uppgifter om de förfaranden som kan följas finns publicerad (se Allmän inledning, del B).

De funktionsobservationer som utförs under den fjärde exponeringsveckan kan utelämnas om en förstudie genomförs som inledning till ett efterföljande subkroniskt 90-dagarstest. I sådana fall bör funktionsobservationerna inkluderas i den efterföljande undersökning. Å andra sidan kan tillgång på uppgifter om funktionsobservationer från en förstudie med upprepad dosering öka möjligheterna att välja dosnivåer till en efterföljande subkronisk undersökning.

I undantagsfall får funktionsobservationerna också utelämnas för grupper som annars skulle visa tecken på toxicitet i en sådan utsträckning att det väsentligt skulle påverka utförandet av funktionsförsöket.

1.4.3.2 Kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion

Alla djuren bör vägas minst en gång i veckan. Mätning av foder- och vattenkonsumtion bör göras minst en gång per vecka. Om testsubstansen tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas minst en gång i veckan.

1.4.3.3 Hematologi

Följande hematologiska undersökningar bör göras då testperioden avslutas: hematokrit, hemoglobinkoncentration, räkning av röda blodkroppar, total- och differentialräkning av vita blodkroppar, blodplättsräkning samt ett mått på koagulerings- och koaguleringsförmåga. Blodprov bör tas från ett angivet ställe just före eller som ett led i avlivningsförfarandet och förvaras under lämpliga förhållanden.

1.4.3.4 Klinisk kemi

Kliniskt kemiska bestämningar för att undersöka större toxiska effekter i vävnader, särskilt effekter på lever och njurar, bör utföras på de blodprov som tas från samtliga djur strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet (med undantag för de djur som hittas döende eller avlivas under försökets gång). Djuren bör fasta natten före blodprovstagningen (1). Undersökningar av serum eller plasma skall omfatta natrium, kalium, glukos, totalkolesterol, urinämne, kreatinin, totalprotein och albumin, minst två enzymer som indikerar effekter på leverceller (t.ex. alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, alkaliskt fosfat, gamma-glutamyl-transpeptidas och sorbitol-dehydrogenas). Mätningar av ytterligare enzymer (från lever eller av annat ursprung) och gallsyror kan under vissa förhållanden ge användbar information.

(1) I fråga om vissa mätningar av serum och plasma, särskilt i fråga om glukos, är fasta under natten att föredra. Huvudskälet är att den ökade variation som skulle följa av icke-fastande skulle tendera att dölja mer subtila effekter och försvåra tolkningen. Å andra sidan kan fasta under natten påverka djurens generella metabolism och särskilt i utfordringsundersökningar störa den dagliga exponeringen för testsubstansen. Om djuren får fasta under natten bör de kliniskt kemiska analyserna göras efter det att funktionsobservationer utförts under försökets fjärde vecka.

Följande urinanalysbestämningar kan utföras frivilligt under sista veckan av försöket med samling av urin på fasta tider: utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, protein, glukos och blod eller blodceller.

Dessutom bör tester för att undersöka serummarkörer av allmänna vävnadsskador övervägas.

Andra bestämningar som bör utföras, om testsubstansens kända egenskaper kan eller misstänks

påverka närbesläktade metaboliska profiler, omfattar kalcium, fosfat, fastevärden av triglycerider, specifika hormoner, methemoglobin och kolinesteras. Dessa behöver identifieras för ämnen inom vissa grupper eller från fall till fall.

Generellt krävs flexibla tillvägagångssätt beroende på djurart och på den observerade eller förväntade effekten av ett givet ämne.

Om historiska basdata är otillräckliga bör hänsyn tas till hematologiska och kliniskt kemiska variabler innan doseringen påbörjas.

1.4.3.5 Obduktion

Samtliga djur i undersökningen bör underkastas en fullständig obduktion som omfattar yttre granskning av kroppen, alla kroppsöppningar liksom kranium, bröst- och bukhåla samt deras innehåll. Lever, njurar, binjuror, testiklar, bitestiklar, bräss, mjälte, hjärna och hjärta från samtliga djur skall putsas från angränsande vävnad och deras våtvikt vägas så snart möjligt efter dissekering för att undvika uttorkning.

Följande vävnader och organ bör bevaras i det mest lämpade mediet för histopatologiska undersökningar: alla stora skador, hjärnan (representativa regioner inbegripet storhjärna, lillhjärna och hjärnbrygga), ryggrad, magsäck, tunntarm och tjocktarm (inklusive Peyer's patches), lever, njurar, binjuror, mjälte, hjärta, bräss, sköldkörtel, luftstrupe och lungor (konserverade genom inflation med fixermedel och därefter immersion), könskörtlar, accessoriska könsorgan (t.ex. livmoder, prostata), urinblåsa, lymfkörtlar (helst en lymfkörtel som omfattar tillförselvägen och en annan långt från tillförselvägen för att täcka systematiska effekter), perifer nerv (ischias- eller tibialnerven), helst nära muskeln, och ett snitt av ryggmärgen (alternativt färskt bencmargsaspirat). Kliniska eller andra fynd indikerar att ytterligare vävnader behöver undersökas. Dessutom bör de organ bevaras som på grund av testsubstansens kända egenskaper förmodas vara målorgan.

1.4.3.6 Histopatologisk undersökning

En fullständig histopatologisk undersökning bör utföras på bevarade organ och vävnader från samtliga djur i kontroll- och högdosgrupperna. Undersökningarna bör utsträckas till djur i alla andra dosgrupper om behandlingsrelaterade förändringar observeras i de högre dosgrupperna. Alla stora skador skall undersökas.

Om en satellitgrupp används bör histopatologisk undersökning utföras på de vävnader och organ som visat effekter i dosgrupperna.

2. DATA

Individuella data bör tillhandahållas. Därutöver bör alla data sammanfattas i en tabell som anger antalet djur i varje testgrupp vid försökets början, antalet djur som hittats döda under försöket eller som avlivats av humanitära skäl samt tidpunkten för avlivning, antalet djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inbegripet tidpunkten då de först visar sig, duration och hur allvarliga de toxiska effekterna är, antalet djur som visar skador, typ av skada och procentandelen djur för varje typ av skada.

Om möjligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt godtagbar statistisk metod. De statistiska metoderna bör väljas vid utformningen av undersökningen.

3. RAPPORTERING

Försöksrapport

Försöksrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

Försöksdjur:

- Art/stam som använts.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Ursprung, försöksförhållanden, foder etc.
- Djurens individuella vikt vid försökets början, därefter varje vecka samt vid försökets avslutning.

Försöksförhållanden:

- Motivering av val av vehikel, om annan än vatten.

- Grund för dosval.
- Utförliga uppgifter om testsubstansens sammansättning och förberedelse av foder, uppnådd koncentration, preparatets stabilitet och homogenitet.
- Utförliga uppgifter om tillförseln av testsubstansen.
- Omräkning från testsubstanskoncentration i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos (mg/kg kroppsvikt och dag) i förekommande fall.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat:

- Kroppsvikt och förändringar av kroppsvikt.
- Foderkonsumtion och i tillämpliga fall vattenkonsumtion.
- Uppgifter om toxiska reaktioner per kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.
- Arten, grad och duration av kliniska observationer (reversibilitet skall anges).
- Bedömning av sensorisk aktivitet, greppstyrka och motorisk aktivitet.
- Blodundersökningar med relevanta basvärden.
- Kliniskt kemiska tester med relevanta basvärden.
- Kroppsvikt vid avlivning och organvikt.
- Obduktionsfynd.
- En detaljerad beskrivning alla histopatologiska fynd.
- Absorptionsdata om de finns tillgängliga.
- Statistisk bearbetning av resultaten i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. HÄNVISNINGAR

Denna metod motsvarar OECD TG 407.

B. 10. MUTAGENICITET – TEST *IN VITRO* AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR

1. METOD

Denna metod är en kopia av metoden OECD TG 473, Test *In Vitro* av kromosomavvikelser hos däggdjur (1997).

1.1 INLEDNING

Avsikten med testen av kromosomavvikelser *in vitro* är att identifiera ämnen som orsakar strukturella kromosomavvikelser hos odlade däggdjursceller (1)(2)(3). Strukturella avvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. Majoriteten av de kemiska mutagenerna inducerar avvikelser av kromatidtyp, men även avvikelser av kromosomtyp förekommer. En ökning av polyploidin kan indikera att ett kemiskt ämne har potential att inducera numeriska avvikelser. Denna metod är dock inte utformad för att mäta numeriska avvikelser och används inte rutinmässigt för det ändamålet. Kromosommutationer och liknande händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar och det finns påtagliga bevis för att kromosommutationer och liknande händelser som ger upphov till förändringar i onkogener och tumörsuppressorgener i somatiska celler är inblandade i cancerinduktion hos människa och hos försöksdjur.

Test av kromosomavvikelser *in vitro* kan göras med kulturer av etablerade cellinjer, cellstammar eller primära cellkulturer. De celler som används väljs ut på grundval av tillväxtförmåga vid odling, karyotypens stabilitet, antalet kromosomer, kromosomernas mångfald och den spontana frekvensen av kromosomavvikelser.

Tester som utförs *in vitro* kräver i allmänhet att en exogen källa för metabolisk aktivering används. Detta metaboliska system för aktivering kan inte helt och hållet efterlikna de förhållanden som råder i däggdjuret *in vivo*. Man bör se till att undvika sådana förhållanden som skulle leda till positiva resultat som inte återspeglar den verkliga mutageniciteten och kan ha sin orsak i pH-förändringar, osmolalitet eller hög cytotoxicitet (4)(5).

Denna test används för att söka efter möjliga mutagener och karcinogener hos däggdjur. Många ämnen som är positiva i detta test är karcinogena hos däggdjur, men det finns ingen perfekt korrelation mellan detta test och karcinogenicitet. Korrelationen är beroende på den kemiska klassen och det finns allt starkare bevis för att det finns karcinogener som inte detekteras med detta test, eftersom det ser ut som om de verkar genom andra mekanismer än direkta DNA-skador.

Se även Allmän inledning, Del B.

1.2 DEFINITIONER

Avvikelse av kromatidtyp: en strukturell kromosomskada, uttryckt i form av brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

Avvikelse av kromosomtyp: en strukturell kromosomskada, uttryckt som brott, eller brott och återförening, hos båda kromatiderna på samma ställe.

Endoreduplikation: en process där kärnan efter en S-fas under DNA-replikationen inte övergår i mitos utan inleder ännu en S-fas. Resultatet är kromosomer med 4, 8, 16, . . . kromatider.

Lucka: en akromatisk skada som är mindre än bredden hos en kromatid, och med ett minimum av misspassning hos kromatiderna.

Mitotiskt index: den andel celler som är i metafase delat med det totala antalet celler som kan observeras i en cellpopulation; en indikation på graden av tillväxt hos den populationen.

Numerisk avvikelse: en förändring av antalet kromosomer jämfört med det normala antalet karakteristika hos de celler som används.

Polyploidi: en multipel av det haploida antalet kromosomer (n) som skiljer sig från det diploida antalet (d.v.s. $3n$, $4n$ och så vidare).

Strukturell avvikelse: en förändring i kromosomstrukturen som kan detekteras genom en mikroskopisk undersökning av celldelningens metafase stadium, och som uppträder i form av deletioner och fragment, interna eller externa utbyten.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Cellodlingar exponeras för testsubstanten både med och utan metabolisk aktivering. Vid förutbestämda intervall, efter att cellodlingen har exponerats för testsubstanten, utförs behandling med ett ämne som stoppar celldelningen i metafase (t.ex. Colcemid® eller colchicin). Därefter skördas cellerna och färgas in, varpå närvaro av kromosomavvikelser i metafascellerna analyseras mikroskopiskt.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 Förberedelser

1.4.1.1 *Celler*

Ett antal olika cellinjer, stammar eller primära cellkulturer, inklusive humanceller, kan användas (t.ex. fibroblaster från kinesisk hamster, perifera blodlymfocyter från människor eller andra däggdjur).

1.4.1.2 *Typ av medium och kultur*

Lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, CO₂-koncentration, temperatur och luftfuktighet) bör väljas för odlingarna. Etablerade cellinjer och stammar bör rutinmässigt kontrolleras med avseende på stabilitet hos det modala kromosomantalet och frånvaro av kontaminerad mykoplasma. Om kontaminering har skett bör de inte användas. Cellernas normala cellcykeltid och de odlingsförhållanden som används bör vara kända.

1.4.1.3 *Förberedelse av kulturer*

Etablerade cellinjer och stammar: celler dras upp från stamkulturer, inokuleras i ett odlingsmedium som har en sådan densitet att kulturerna inte kommer att växa samman innan det är dags att skörda, och inkuberas vid 37°C.

Lymfocyter: helblod, behandlat med en antikoagulant (t.ex. heparin) eller separerade lymfocyter som erhållits från friska individer, tillsätts till odlingsmediet, vilket innehåller en mitogen substans (t.ex. fytohemaglutinin), varpå inkubering sker vid 37°C.

1.4.1.4 *Metabolisk aktivering*

Celler bör exponeras för testsubstansen både i närvaro och frånvaro av ett lämpligt metaboliskt system för aktivering. Det mest använda systemet är en kofaktorstött post-mitokondriell fraktion (S9) beredd ur lever från gnagare vilka behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (6)(7)(8)(9) eller en blandning av fenobarbiton och β -naftoflavon (10)(11)(12).

Den postmitokondriella fraktionen används vanligen vid koncentrationer i området 1 till 10 % v/v i det slutliga testmediet. Tillståndet hos ett system för metabolisk aktivering kan bero på den klass av kemikalier som testas. I vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en koncentration av den post-mitokondriella fraktionen.

Ett antal vidareutvecklingar, inklusive skapandet av genetiskt modifierade cellinjer som uttrycker specifika aktiverande enzymer, kan erbjuda en potential för endogen aktivering. Valet av de cellinjer som skall användas bör vara vetenskapligt underbyggt (t.ex. genom relevansen av cytokrom P450 isoenzym för metabolismen hos testsubstansen).

1.4.1.5 *Beredning av testsubstansen*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpligt lösningsmedel eller vehikel och spädas ut om detta är lämpligt före det att cellerna behandlas. Flytande testsubstanser kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut innan behandlingen startas. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata påvisar att lagring är acceptabelt.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen och bör vara förenlig med överlevnaden för cellerna samt S9-aktiviteten. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används bör det finnas data som visar att de är kompatibla. Det rekommenderas att vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar i första hand bör övervägas närhelst det är möjligt. När substanser som är instabila i vatten testas, bör de organiska lösningsmedel som används vara fria från vatten. Vatten kan avlägsnas genom tillsats av en molekylsikt.

1.4.2.2 *Exponeringskoncentrationer*

Bland de kriterier som skall övervägas när den högsta koncentrationen skall fastställas är cytotoxicitet, löslighet i testsystemet och förändringar i pH eller osmolalitet.

Cytotoxicitet bör fastställas, såväl med som utan metabolisk aktivering i huvudexperiment, med hjälp av en lämplig indikation på cellernas integritet och tillväxt, såsom graden av sammanväxning, viabilitetsräkning av cellerna, eller ett mitotiskt index. Det kan vara lämpligt att fastställa cytotoxicitet och löslighet i ett förberedande experiment.

Minst tre analyserbara koncentrationer bör användas. Där cytotoxicitet uppträder bör dessa koncentrationer täcka in ett område som sträcker sig från maximal toxicitet ner till liten eller ingen toxicitet. Detta innebär normalt att koncentrationerna bör separeras av minst en faktor mellan 2 och $\sqrt{10}$. Vid tiden för skörd av cellerna bör den högsta koncentrationen visa en signifikant reduktion i graden av konfluens, cellräkning eller mitotiskt index (alla större än 50 %). Det mitotiska indexet är endast ett indirekt mått på cytotoxiska/cytostatiska effekter och är beroende av tiden efter behandlingen. Det mitotiska indexet är dock acceptabelt för suspensionskulturer där andra toxicitetsmätningar kan vara besvärliga och opraktiska. Information om kinetiken för cellcykler, såsom medelgenerationstid (AGT), kan användas som extra information. AGT är dock ett övergripande medelvärde som inte alltid avslöjar existensen av försenade subpopulationer, och även små ökningar av medelgenerationstiden kan associeras med en mycket påtaglig senareläggning av tiden för optimalt utbyte av avvikelser.

För substanser som är relativt icke-cytotoxiska bör den maximala testkoncentrationen vara 5 $\mu\text{l/ml}$, 5 mg/ml eller 0,01 M, beroende på vilket av dessa värden som är det lägsta.

För relativt olösliga substanser, som inte är toxiska vid koncentrationer som är lägre än koncentrationen där olöslighet inträder, bör den högsta använda dosen vara en koncentration som ligger över löslighetsgränsen i det avslutande odlingsmediet mot slutet av behandlingsperioden. I vissa fall (t.ex. när toxicitet endast uppträder vid koncentrationer som är högre än den lägsta olösliga koncentrationen) är det lämpligt att testa vid mer än en koncentration med synlig fällning. Det kan vara lämpligt att fastställa lösligheten vid början och slutet av behandlingen, eftersom lösligheten kan ändras under det att exponeringen i testsystemet pågår, beroende på närvaro av celler, S9, serum, etc. Olöslighet kan detekteras med blotta ögat. Fällningen torde inte störa bestämningen.

1.4.2.3 *Negativa och positiva kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningssmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje experiment. När metabolisk aktivering används, bör den positiva kontrollkemikalien vara av en sådan typ att aktivering krävs för att ge ett mutagen svar.

Positiva kontroller bör utnyttja en känd klastogen vid exponeringsnivåer som förväntas ge en reproducerbar och detekterbar ökning jämfört med bakgrunden och som demonstrerar känsligheten hos testsystemet.

Positiva kontrollkoncentrationer bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos kodade utstryksglas för läsaren. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanter.

Betingelser för metabolisk aktivering	Substans	CAS-nr.	EINECS-nr.
Frånvaro av exogen metabolit Aktivering	Metylmetsulfonat	66-27-3	200-625-0
	Etylmetsulfonat	62-50-0	200-536-7
	Etylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitroquinolin-N-oxid	56-57-5	200-281-1
Närvaro av exogen metabolit Aktivering	Bens[<i>a</i>]pyren	50-32-8	200-028-5
	Cyklofosamid	50-18-0	200-015-4
	Cyklofosamidmonohydrat	6055-19-2	

Andra lämpliga positiva kontrollsubstanter kan användas. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier bör övervägas när sådana finns tillgängliga.

Negativa kontroller, bestående av lösningsmedel eller enbart en behållare i behandlingsmediet, och hanterade på samma sätt som behandlingsodlingarna, bör inkluderas var gång som odlingen skördas. Dessutom bör obehandlade kontroller också användas om det inte finns historiska kontrollerdata som påvisar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

1.4.3 **Förfarande**

1.4.3.1 *Behandling med en testsubstans*

Prolifererande celler behandlas med testsubstanten i såväl närvaro som frånvaro av ett system för metabolisk aktivering. Behandling av lymfocyter bör inledas när ca 48 timmar gått efter den mitogena stimuleringen.

1.4.3.2

Två kulturer bör normalt användas för varje koncentration, och rekommenderas varmt för negativa kontrollkulturer eller kontrollkulturer för lösningsmedel. Där minimala variationer mellan två kulturer kan påvisas (13)(14) ur historiska data, kan det vara acceptabelt att en enda kultur används för varje koncentration.

Gasformiga eller flyktiga substanser bör testas med hjälp av lämpliga metoder, t.ex. test i slutna odlingskärl (15)(16).

1.4.3.3 *Tid för skörd av odlingen*

I det första experimentet bör cellerna exponeras för testsubstansen, både med och utan metabolisk aktivering, under 3–6 timmar och prov bör tas ut vid en tid som motsvarar ca 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter det att behandlingen har påbörjats (12). Om detta protokoll ger negativa resultat både med och utan aktivering, bör ytterligare ett experiment utan aktivering utföras, med kontinuerlig behandling fram till att provtagning sker vid en tidpunkt som motsvarar ca 1,5 gånger den normala cellcykelns längd. Vissa kemikalier kan vara enklare att detektera vid behandlings-/provtagningstider som är längre än 1,5 cykellängder. Negativa resultat med metabolisk aktivering måste bekräftas från fall till fall. I de fall där det inte anses nödvändigt att bekräfta negativa resultat bör detta motiveras.

1.4.3.4 *Kromosomberedning*

Cellkulturer behandlas vanligtvis med Colcemid® eller colchicin under en till tre timmar innan skördning sker. Varje cellkultur skördas och behandlas separat för preparationen av kromosomer. Kromosomberedning innefattar hypoton behandling av cellerna, fixering och infärgning.

1.4.3.5 *Analys*

Alla utstryksglas, inklusive de med positiva och negativa kontroller, bör kodas upp oberoende av varandra innan den mikroskopiska analysen utförs. Eftersom fixeringen ofta ger upphov till brott på en del av de celler som är i metafase, med åtföljande förlust av kromosomer, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromerantal som är ekvivalent med det modala antalet ± 2 för alla celltyper. Åtminstone 200 väl spridda metafaser bör förekomma per koncentration och kontroll, med lika fördelning mellan dubbelproven, om det är tillämpligt. Detta antal kan reduceras när ett stort antal avvikelser observeras.

Även om syftet med testet är att detektera strukturella kromosomavvikelser, är det viktigt att notera polyploidi och endoreduplikation när dessa händelser observeras.

2. **DATA**

2.1 **BEHANDLING AV RESULTATEN**

Den experimentiella enheten utgörs av cellen, och därför bör den procentandel av cellerna som uppvisar strukturella kromosomavvikelser utvärderas. Olika typer av strukturella kromosomavvikelser bör listas med antal och frekvenser för experimentella kulturer samt kontrollkulturer. Luckor i DNA-strängen noteras separat och rapporteras men inkluderas inte generellt i den totala frekvensen för avvikelser.

Samtidiga mätningar av cytotoxicitet för alla behandlade och negativa kontrollkulturer i huvudexperimenten avseende avvikelser bör även samlas in.

Individuella data för kulturen bör tas fram. Dessutom bör alla data sammanställas i form av en tabell.

Det finns inga krav på verifiering av ett tydligt positivt svar. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser. Behovet av att fastställa negativa resultat har diskuterats under 1.4.3.3. Vid uppföljningsexperiment bör man överväga att ändra parametrarna i undersökningen för att utvidga de bedömda försöksbetingelserna. De försöksparametrar som kan modifieras innefattar koncentrationsstegen och betingelserna för den metaboliska aktiveringen.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning eller en reproducerbar ökning av antalet celler med kromosomavvikelse. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärderingen av testresultaten (3)(13). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt.

En ökning av antalet polyploida celler kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inhibera mitotiska processer och att inducera numeriska kromosomavvikelse. En ökning av antalet celler med endoreduplicerade kromosomer kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inhibera cellcykelns förlopp (17)(18).

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier bedöms såsom icke-mutagen i detta system.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, så kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många experiment som utförs.

Positiva resultat från testet av kromosomavvikelse *in vitro* indikerar att testsubstansen inducerar strukturella kromosomavvikelse hos odlade somatiska däggdjursceller. Negativa resultat indikerar att testsubstansen inte inducerar kromosomavvikelse hos odlade somatiska däggdjursceller under de betingelser som rådde under testet.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel

— motivering av valet av vehikel

— testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Celler:

- cellernas typ och ursprung
- den använda celltypens karyotypegenskaper och lämplighet
- frånvaro av mykoplasma, om detta är tillämpligt
- information om cellcykelns längd
- bloddonatorernas kön, helblod eller separerade lymfocyter, använd mitogen substans
- antal passager, om detta är tillämpligt
- metoder för underhåll av cellkulturen, om detta är tillämpligt
- det normala antalet kromosomer.

Försöksbetingelser :

- identitet hos det ämne som stoppar celldelningen i metafasen, dess koncentration och cellexponeringens varaktighet
- grund för val av koncentrationer och antalet kulturer som ingår, t.ex. data för cytotoxicitet och begränsningar i löslighet, om detta finns tillgängligt
- mediets sammansättning, CO₂-koncentration, om detta är tillämpligt
- testsubstansens koncentration
- den tillsatta vehikelns och testsubstansens volym
- inkubationstemperatur
- inkubationstid
- behandlingens varaktighet
- celldensitet vid inokulering, om detta är tillämpligt
- typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, inklusive acceptabilitetskriterier
- positiva och negativa kontroller
- metoder för preparation av utstryksglas
- kriterier för bedömning av avvikelser
- antal metafaser som analyserats
- metoder för toxicitetsmätningarna
- kriterier för när studierna skall anses vara positiva, negativa eller osäkra.

Resultat :

- tecken på toxicitet, t.ex. grad av sammanväxning, cellcykeldata, cellräkningar, mitotiskt index
- tecken på utfällning
- data om behandlingsmediets pH och osmolalitet, om detta har uppmätts
- definition av avvikelser, inklusive luckor i DNA-strängen
- antalet celler med kromosomavvikelse och typ av sådana avvikelser, anangivna separat för varje behandlad kultur samt kontrollkultur
- förändringar i ploiditet, om detta observerats
- dos/respons-förhållande, där det är möjligt
- statistiska analyser, om sådana finns
- samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata
- historiska negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata, med variationer, medelvärden och standardavvikelse.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. REFERENSER

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. MUTAGENICITET – TEST *IN VIVO* AV KROMOSOMAVVIKELSER

I BENMÄRG HOS DÄGGDJUR

1. METOD

Denna metod är en kopia av OECD TG 475, Test av kromosomavvikelser i benmärg hos däggdjur (Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997)).

1.1 INLEDNING

Testet *in vivo* avseende kromosomavvikelser hos däggdjur används för att detektera strukturella kromosomavvikelser inducerade av testsubstansen i benmärgsceller hos djur, vanligen hos gnagare (1)(2)(3)(4). Strukturella kromosomavvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. En ökning av polyploidin kan indikera att en kemikalie har potential att inducera numeriska avvikelser. För huvuddelen av de kemiska mutagenerna utgörs de inducerade avvikelserna av kromatidtypen, men även avvikelser av kromosomtyp kan förekomma. Kromosommutationer och liknande händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människa och det finns omfattande bevis för att kromosommutationer och liknande händelser som ger upphov till förändringar i onkogener samt att tumörsuppressorgener är inblandade i cancer hos människa och i experimentella system.

Gnagare används rutinmässigt i detta test. Benmärg är målvävnaden i detta test, eftersom det är en mycket kärlik vävnad som innehåller en cellpopulation med en snabb cellcykel, och där cellerna enkelt kan isoleras och bearbetas. Andra arter och målvävnader används inte med denna metod.

Detta test av kromosomavvikelser är särskilt relevant för att fastställa mutagena risker, eftersom det medger överväganden av faktorer *in vivo* för metabolism, farmakokinetik och processer för DNA-reparationer, även om dessa faktorer kan variera mellan olika arter och vävnader. Ett test *in vivo* är även användbart för fortsatta undersökningar av en mutagen effekt, med detektion genom tester *in vitro*.

Om det finns bevis för att testsubstansen, eller en reaktiv metabolit, inte kommer att nå målvävnaden, är det inte lämpligt att använda detta test.

Se även Allmän inledning, Del B.

1.2 DEFINITIONER

Avvikelse av kromatidtyp: en strukturell kromosomskada, uttryckt i form av brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

Avvikelse av kromosomtyp: en strukturell kromosomskada, uttryckt som brott, eller brott och återförening, hos båda kromatiderna vid samma ställe.

Endoreduplikation: en process där kärnan efter en S-fas under DNA-replikationen inte övergår i mitos utan inleder ännu en S-fas. Resultatet är kromosomer med 4, 8, 16, . . . kromatider.

Lucka: en akromatisk skada som är mindre än bredden hos en kromatid, och med ett minimum av misspassning hos kromatiderna.

Numerisk avvikelse: en förändring av antalet kromosomer jämfört med det normala antalet karakteristika hos de celler som används.

Polypliodi: en multipel av det haploida antalet kromosomer (n) som skiljer sig från det diploida antalet (d.v.s. $3n$, $4n$, o.s.v.).

Strukturell avvikelse: en förändring i kromosomstrukturen som kan detekteras genom en mikroskopisk undersökning av celledelningens metafascadium, och som observeras i form av deletioner och fragment, interna eller externa utbyten.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Djur exponeras för testsubstanten genom en lämplig metod för exponering och de avlivas på lämpliga tider efter behandlingen. Innan de avlivas behandlas djuren med ett ämne som gör att celler stannar upp i metafase (t.ex. colchicin eller Colcemid®). Kromosombredningar görs sedan från benmärgscellerna och färgas in, varpå celler i metafase analyseras med avseende på kromosomavvikelser.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 Förberedelser

1.4.1.1 Val av djurarter

Vanligen används råttor, möss och kinesiska hamstrar, även om vilket lämpligt däggdjur som helst kan utnyttjas. Man bör välja de stammar av unga, friska vuxna djur som vanligen används på laboratorier. När undersökningen skall påbörjas, är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten som möjligt och den bör inte överstiga $\pm 20\%$ av medelvikten för varje kön.

1.4.1.2 Förhållanden vid förvaring och utfodring

De generella förhållanden som anges i den Allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60 %.

1.4.1.3 Förberedelse av djuren

Friska, unga vuxna djur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren skall ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar.

1.4.1.4 *Beredning av doser*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till djuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas, om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabel.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. Därhelst det är möjligt rekommenderas att man i första hand överväger att använda vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) bör ingå för varje kön i varje test. Förutom behandling med testsubstansen, bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på ett identiskt sätt i förhållande till djuren i de grupper där behandling skett.

Positiva kontroller bör ge strukturella avvikelser *in vivo* vid exponeringsnivåer som förväntas ge en detekterbar ökning i förhållande till bakgrunden. Positiva kontrolldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men att identiteten hos kodade utstryksglas inte omedelbart avslöjas för läsaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen och att provtagning endast sker vid ett enstaka tillfälle. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier kan dessutom övervägas när dessa finns tillgängliga. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Substans	CAS-nr.	EINECS-nr.
Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
Etylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	
Trietylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativa kontroller, behandlade enbart med lösningsmedel eller vehikel, och i övrigt behandlade på samma som som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle, om inte acceptabel variabilitet och frekvens hos celler med kromosomavvikelse hos djuren kan erhållas från historiska kontrolldata. Om enstaka provtagning används för negativa kontroller, är den lämpligaste tiden det första provtagningstillfället. Dessutom bör obehandlade kontroller även användas om inte det finns historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 Försöksdjurens antal och kön

Varje behandlad grupp samt kontrollgruppen måste bestå av minst 5 analyserbara djur av varje kön. Det räcker med att testa enbart det ena könet, om det vid tiden för undersökningens genomförande finns data tillgängliga från undersökningar av samma art och där man har använt sig av samma exponeringssätt, så att det går att visa att det inte finns några substantiella skillnader i toxicitet mellan könen. I de fall där exponering för kemikalier hos människa kan vara könsspecifik, vilket t.ex. kan vara fallet för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön.

1.5.2 Behandlingsschema

Testsubstanser administreras med fördel som en enstaka behandling. Testsubstanser kan även administreras i form av en delad dos, d.v.s. två behandlingar under samma dag med högst några timmars intervall, för att underlätta administrering av en stor volym. Andra doseringsscheman bör vara vetenskapligt motiverade.

Prover bör tas vid två separata tillfällen efter behandling under en dag. Det första provtagningstillfället för gnagare ligger på 1,5 gånger den normala cellcykelns längd (den senare är normalt 12–18 timmar) efter behandling. Eftersom den tid som går åt för upptag och metabolism av testsubstansen, likväl som dess effekt på cellcykelns kinetik, kan påverka den optimala tiden för detektion av kromosomavvikelse, så rekommenderas att provtagningen senareläggs till 24 timmar efter det första provtagningstillfället. Om doseringsscheman på mer än en dag används, bör man använda en provtagningstid på 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter den slutliga behandlingen.

Innan djuren avlivas bör de injiceras intraperitonealt med en lämplig dos av ett ämne som stoppar celldelningen i metafase (t.ex. Colcemid® eller colchicin). Prover på försöksdjur bör därefter tas vid lämpliga intervall. För möss är detta intervall ca 3–5 timmar; för kinesiska hamstrar ligger intervallet på ca 4–5 timmar. Celler skördas från benmärgen och analyseras med avseende på kromosomavvikelse.

1.5.3 **Dosnivåer**

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare skall användas i huvudundersökningen (5). Vid toxicitet används tre dosnivåer för det första provtagningsstillfället. Dessa dosnivåer bör täcka in ett område som sträcker sig från maximal till liten eller ingen toxicitet. Vid senare provtagningsstillfällen räcker det med att endast den högsta dosen används. Den högsta dosen definieras som den dos som producerar tecken på toxicitet och så att högre dosnivåer baserade på samma doseringsschema skulle förväntas leda till att försöksdjuret dör. Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag från kriterier som är dosbestämmande och bör utvärderas från fall till fall. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i benmärgen (t.ex. mer än 50 % reduktion av mitotiskt index).

1.5.4 **”Limit-test”**

En fullständig undersökning med tre dosnivåer kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå på minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte ger upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. För undersökningar med en längre varaktighet ligger gränsdosen på 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag vid behandlingar upp till 14 dagar, och 1 000 mg/kg/ kroppsvikt/dag för behandlingar som varar längre än 14 dagar. Förväntad exponering av människor kan utgöra en indikation på behovet av att använda en högre dosnivå i ett ”limit-test”.

1.5.5 **Administrering av doser**

Testsubstansen administreras normalt genom sondmatning med hjälp av en magsond, en lämplig intuberingsskanyl eller genom en intraperitoneal injektion. Andra vägar för exponering kan vara acceptabla där de kan motiveras. Den maximala vätskevolymen som kan administreras med hjälp av sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överstiga 2 ml/100 g kroppsvikt. Användning av volymer som är högre än dessa måste motiveras. Förutom för irriterande eller korrosiva substanser, som normalt kommer att visa på stegrade effekter med högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom en justering av koncentrationen för att säkerställa att volymen är konstant vid alla dosnivåer.

1.5.6 **Kromosomberedning**

Omedelbart efter avlivningen tas benmärgen ut, tillsätts hypoton lösning och fixeras. Cellerna sprids sedan ut på utstryksglas och färgas in.

1.5.7 **Analys**

Det mitotiska indexet bör fastställas som ett mått på cytotoxicitet hos minst 1 000 celler per djur för alla behandlade försöksdjur (inklusive positiva kontroller) och obehandlade försöksdjur för negativ kontroll.

Minst 100 celler bör analyseras för varje försöksdjur. Detta antal kan reduceras när ett stort antal avvikelser observeras. Alla utstryksglas, inklusive de för positiva och negativa kontroller, bör kodas oberoende av varandra innan de analyseras i mikroskop. Eftersom beredningen av utstryksglas ofta resulterar i brott på en del av de celler som är i metafase med förlust av kromosomer som följd, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromererantal som är lika med antalet $2n \pm 2$.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella data för försöksdjuren bör presenteras i tabellform. Den experimentiella enheten utgörs av djuret. För varje försöksdjur bör antalet celler som påträffas, antalet avvikelser per cell och procentandelen celler med strukturella kromosomavvikelser utvärderas. Antalet och frekvensen av olika typer av strukturella kromosomavvikelser bör listas för behandlade grupper och kontrollgrupper. Luckor i DNA-strängen noteras separat och rapporteras men inkluderas inte generellt i den totala frekvensen av avvikelser. Om det inte finns några bevis för en skillnad i resultaten mellan könen, kan data från båda könen kombineras för statistisk analys.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning i det relativa antalet celler med kromosomavvikelser eller en tydlig ökning av antalet celler som uppvisar avvikelser i en grupp som fått en enstaka dos vid ett enstaka provtagningsstillfälle. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan vara till hjälp vid utvärdering av testresultatet (6). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser.

En ökning av polyploidin kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inducera numeriska kromosomavvikelser. En ökning av endoreduplikationen kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inhibera cellcykelns förlopp (7)(8).

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, så kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många experiment som utförs.

Positiva resultat från testet av kromosomavvikelser *in vivo*, indikerar att en substans inducerar kromosomavvikelser i benmärgen hos de arter som testades. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under dessa försöksbetingelser, inte inducerar kromosomavvikelser i benmärgen hos de arter som testades.

Sannolikheten för att testsubstansen eller dess metaboliter når ut till det stora kretsloppet eller specifikt till målvävnaden (t.ex. systemisk toxicitet) bör diskuteras.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information :

Lösningsmedel/vehikel

- motivering av valet av vehikel
- testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Försöksdjur:

- art/stam som används
- försöksdjurens antal, ålder och kön
- källa, förhållanden vid förvaring, diet, etc.
- individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

Försöksbetingelser:

- positiva och negativa kontroller (vehikel/lösningsmedel)
- data från en undersökning av lämpligt intervall, om en sådan har utförts
- grund för valet av dosnivå
- uppgifter om beredningen av testsubstansen
- uppgifter om administreringen av testsubstansen
- grund för administreringens tillförselväg
- metoder för att verifiera att testsubstansen nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden, om detta är tillämbart
- omvandling från koncentration av testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg kroppsvikt/dag), om detta är tillämbart
- uppgifter om fodrets och vattnets kvalitet
- detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman
- metoder för mätningar av toxicitet
- identiteten hos substanser som stoppar cellcykeln i metafase, deras koncentration och behandlingens varaktighet
- metoder för preparation av utstryksglas
- kriterier för hur avvikelser påvisas
- antalet celler som analyserats per försöksdjur
- kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga.

Resultat :

- tecken på toxicitet
- mitotiskt index
- typ av och antal avvikelser, angivna separat för varje försöksdjur
- det totala antalet avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser
- antalet celler med avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser
- förändringar i ploiditet, om några sådana har observerats
- dos/respons-förhållande, där så är möjligt
- statistiska analyser, om några sådana förekommer
- samtidiga negativa kontrolldata
- historiska negativa kontrolldata med områden, medelvärden och standardavvikelser
- samtidiga positiva kontrolldata

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. REFERENSER

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. MUTAGENICITET – TEST AV MIKROKÄRNOR *IN VIVO* I ERYTROCYTER HOS

DÄGGDJUR

1. METOD

Denna metod är en kopia av testet OECD TG 474, Test av mikrokärnor i erythrocyter hos däggdjur (Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997)).

1.1 INLEDNING

Testet av mikrokärnor *in vivo* hos däggdjur används för detektion av sådana skador på kromosomer eller på den mitotiska apparaten hos erythroblaster som induceras av testsubstansen, genom analys av erythrocyter från provtagning på benmärg och/eller perifert blod från djurceller, vanligtvis gnagare.

Avsikten med testet av mikrokärnor är att identifiera substanser som orsakar cytogen skada, vilket resulterar i bildning av mikrokärnor som innehåller isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

När en erythroblast från benmärg utvecklas till en polykromatisk erythrocyt stöts huvudkärnan ut. Varje mikrokärna som har bildats kan bli kvar i den annars kärnfria cytoplasman. Visualisering av mikrokärnor underlättas i dessa celler eftersom de saknar en huvudkärna. En ökning av frekvensen av polykromatiska erythrocyter med mikrokärnor hos behandlade försöksdjur utgör en indikation på inducerade kromosomskador.

Benmärg från gnagare används rutinmässigt i detta test eftersom polykromatiska erythrocyter produceras i sådan vävnad. Mätningen av omogna (polykromatiska) erythrocyter med mikrokärnor i perifert blod är lika acceptabelt hos alla arter där oförmågan hos mjälten att avlägsna erythrocyter med mikrokärnor har kunnat påvisats, eller som har uppvisat en adekvat sensitivitet för att detektera ämnen som orsakar strukturella eller numeriska kromosomavvikelser. Mikrokärnor kan särskiljas genom ett antal olika kriterier. Dessa innefattar identifiering av närvaron eller frånvaron av en kinetochor eller av centromer-DNA i mikrokärnor. Frekvensen av omogna (polykromatiska) erythrocyter med mikrokärnor utgör den huvudsakliga slutpunkten. Antalet mogna (normokromatiska) erythrocyter i perifert blod som innehåller mikrokärnor bland ett givet antal mogna erythrocyter kan även användas som slutpunkt på undersökningen, när försöksdjur behandlas kontinuerligt under 4 veckor eller längre.

Detta test av mikrokärnor *in vivo* på däggdjur är särskilt relevant för att fastställa mutagena risker, eftersom det möjliggör överväganden av faktorer för *in vivo* metabolism, farmakokinetik och processer för DNA-reparationer, även om sådana faktorer kan variera mellan olika arter, vävnader och genetiska slutpunkter. Ett test *in vivo* är även användbart för fortsatta undersökningar av en mutagen effekt, med detektion i ett *in vitro*-system.

Om det finns bevis för att testsubstansen eller en reaktiv metabolit inte kommer att nå målvävnaden, är det inte lämpligt att använda detta test.

Se även Allmän inledning, Del B.

1.2 DEFINITIONER

Centromer (Kinetochor): Delar av en kromosom till vilka spindelfibrer är fästa under celledelning, vilket ger upphov till en ordnad rörelse av dotterkromosomerna mot dottercellernas poler.

Mikrokärnor: Små extra kärnor som är separata från cellernas huvudkärna, och som produceras under mitosens telofas (meios) från isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

Normokromatisk erythrocyt: Mogna erythrocyter som saknar ribosomer och som kan särskiljas från omogna, polykromatiska erythrocyter genom infärgning som är selektiv för ribosomer.

Polykromatisk erythrocyt: Omogen erythrocyt, i ett intermediärt utvecklingsstadium, vilken fortfarande innehåller ribosomer och därför kan särskiljas från mogna, normokromatiska erythrocyter genom infärgning som är selektiv för ribosomer.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjur bör exponeras för testsubstanten på ett lämpligt sätt. Om benmärg används, bör försöksdjuren avlivas vid lämpliga tider efter behandling, varvid benmärg extraheras, preparationer görs och färgas in (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7). När perifert blod används, samlas blodet upp vid lämpliga tidpunkter efter behandling och utstrykspreparationer görs, vilka sedan färgas in (4)(8)(9)(10). Vid undersökningar med perifert blod, bör det gå så kort tid som möjligt mellan den sista exponeringen och skörden av cellerna. Preparationerna analyseras med avseende på närvaron av mikrokärnor.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 Förberedelser

1.4.1.1 *Val av djurarter*

Råttor, möss och kinesiska hamstrar används vanligen, även om vilket lämpligt däggdjur som helst kan användas. Vid användning av perifert blod rekommenderas möss. Det är emellertid även möjligt att använda andra däggdjursarter, förutsatt att det är en art där mjälten inte avlägsnar erythrocyter med mikrokärnor eller en art som har uppvisat en adekvat känslighet när det gäller att detektera ämnen som kan orsaka strukturella eller numeriska kromosomavvikelse. Vanligt använda laboratoriestammar av unga, friska försöksdjur bör komma ifråga. Vid undersökningens början bör viktskillnaden mellan försöksdjuren vara minimal och inte överskrida $\pm 20\%$ av medelvikten för varje kön.

1.4.1.2 *Förhållanden vid förvaring och utfodring*

De generella förhållanden som anges i den allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60 %.

1.4.1.3 *Förberedelse av djuren*

Friska, unga vuxna djur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren skall ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar.

1.4.1.4 *Beredning av doser*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till djuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabel.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. Det rekommenderas att, därhelst det är möjligt, man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) bör ingå för varje kön i varje test. Förutom behandling med testsubstansen, bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på ett identiskt sätt i förhållande till djuren i de grupper där behandling skett.

Positiva kontroller bör ge mikrokärnor *in vivo* vid de exponeringsnivåer som förväntas ge en detekterbar ökning i förhållande till bakgrunden. Positiva kontroldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga, men att identiteten hos kodade utstryksglas inte omedelbart avslöjas för läsaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen och att provtagning endast sker vid ett enstaka tillfälle. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier kan dessutom övervägas när dessa finns tillgängliga. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Substans	CAS-nr.	EINECS-nr.
Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-etyl-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	
Trietylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativa kontroller, behandlade enbart med lösningsmedel eller vehiklar, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle, om inte acceptabel variabilitet och frekvens hos celler med kromosomavvikelse hos djuren kan erhållas ur historiska kontrolldata. Om enstaka provtagningar används för negativa kontroller, är den lämpligaste tiden det första provtagningstillfället. Dessutom bör obehandlade kontroller även användas om inte det finns historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln.

Om perifert blod används, kan även ett prov taget innan behandlingen påbörjas vara acceptabelt som en samtidig negativ kontroll, men endast för de korta perifera undersökningarna av blod (t.ex. 1 – 3 behandling (ar)) när resulterande data ligger inom det förväntade området för den historiska kontrollen.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 Försöksdjurens antal och kön

Varje behandlad grupp samt kontrollgruppen måste bestå av minst 5 analyserbara djur av varje kön. Det räcker med att testa enbart det ena könet, om det vid tiden för undersökningens genomförande finns data tillgängliga från undersökningar av samma art och där man har använt sig av samma exponeringssätt, så att det går att visa att det inte finns några substantiella skillnader i toxicitet mellan könen. I de fall där exponering för kemikalier hos människa kan vara könsspecifik, vilket t.ex. kan vara fallet för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön.

1.5.2 Behandlingsschema

Inget standardiserat behandlingsschema (t.ex. 1, 2 eller flera behandlingar med 24 timmars intervall) kan rekommenderas. Proverna från utökade doseringsscheman är acceptabla så länge som en positiv effekt har demonstrerats för denna typ av undersökning eller, för en negativ undersökning, så länge som toxicitet har påvisats eller gränsvärdesdosen har använts, och doseringen fortsatte tills det var dags för provtagning. Testsubstanser kan även administreras i form av en delad dos, d.v.s. två behandlingar under en och samma dag med högst några timmars intervall, för att på så sätt underlätta administrering av stora volymer med material.

Testet kan utföras på två sätt:

- (a) Försöksdjur behandlas en gång med testsubstansen. Prover på benmärg tas ut minst två gånger, med början tidigast 24 timmar och senast 48 timmar efter behandling, och med lämpliga intervall mellan proven. Om prover tas tidigare än 24 timmar efter behandling bör detta motiveras. Prover på perifert blod tas ut minst två gånger, med början tidigast 36 timmar efter behandling, och i lämpliga intervall efter det första provet, men inte senare än efter 72 timmar. När ett positivt svar identifieras vid ett provtagningstillfälle, så är ytterligare provtagning inte nödvändig.
- (b) Om 2 eller flera dagliga behandlingar utförs (t.ex. två eller flera behandlingar med 24 timmars intervall), bör prover tas ut en gång mellan 18 och 24 timmar efter den slutliga behandlingen av benmärgen och en gång mellan 36 och 48 timmar efter den slutliga behandlingen av det perifera blodet (12).

Prover kan dessutom tas vid andra tidpunkter när detta är lämpligt.

1.5.3 **Dosnivåer**

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare skall användas i huvudundersökningen (13). Vid toxicitet används tre dosnivåer för det första provtagningsstillfället. Dessa dosnivåer bör täcka in ett område som sträcker sig från maximal till liten eller ingen toxicitet. Vid senare provtagningsstillfällen räcker det med att endast den högsta dosen används. Den högsta dosen definieras som den dos som producerar tecken på toxicitet och så att högre dosnivåer baserade på samma doseringsschema skulle förväntas leda till att försöksdjuret dör. Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag från kriterier som är dosbestämmande och bör utvärderas från fall till fall. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i benmärgen (t.ex. en reduktion av andelen omogna erythrocyter jämfört med det totala antalet erythrocyter i benmärgen eller i perifert blod).

1.5.4 **”Limit-test”**

En fullständig undersökning med tre dosnivåer kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå på minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte ger upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. För undersökningar med en längre varaktighet ligger gränsdosen på 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag vid behandlingar upp till 14 dagar, och på 1 000 mg/kg/ kroppsvikt/dag för behandlingar som varar längre än 14 dagar. Förväntad exponering av människor kan utgöra en indikation på behovet av att använda en högre dosnivå i ett ”limit-test”.

1.5.5 **Administrering av doser**

Testsubstansen administreras normalt genom sondmatning med hjälp av en magsond, en lämplig intuberingsskanyl eller genom en intraperitoneal injektion. Andra tillförselvägar för exponering kan vara acceptabla där de kan motiveras. Den maximala vätskevolymen som kan administreras med hjälp av sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överstiga 2 ml/100 g kroppsvikt. Användning av volymer som är högre än dessa måste motiveras. Förutom för irriterande eller korrosiva substanser, som normalt kommer att visa på stegrade effekter med högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom en justering av koncentrationen för att säkerställa att volymen är konstant vid alla dosnivåer.

1.5.6 **Beredning av benmärg / blod**

Benmärgsceller erhålls vanligen från lårbenet eller skenbenet omedelbart efter att djuret avlivats. Normalt avlägsnas cellerna från lårbenet eller skenbenet, prepareras och färgas in med hjälp av etablerade metoder. Perifert blod erhålls från svansvenen eller någon annan lämplig blodåder. Blodceller färgas omedelbart in supravitalt (8)(9)(10) eller så görs utstrykspreparationer vilka sedan färgas in. Användningen av ett DNA-specifikt färgämne [t.ex. akridinorange (14) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)] kan eliminera några av de artefakter som är associerade med användning av ett färgämne som inte är DNA-specifikt. Denna fördel utsluter inte användningen av konventionella färgämnen (t.ex. Giemsa). Ytterligare system [t.ex. cellulosakolonner för att avlägsna celler med kärnor (16)] kan även användas, förutsatt att dessa system har visat sig fungera på ett adekvat sätt vid preparation av mikrokärnor i laboratoriet.

1.5.7 **Analys**

Andelen omogna erythrocyter bland det totala antalet erythrocyter (omogna + mogna) bestäms för varje djur genom att totalt räkna minst 200 erythrocyter för benmärg och 1 000 erythrocyter för perifert blod (17). Alla utstryksglas, inklusive de från positiva och negativa kontroller, bör ges en oberoende kodning innan analys i mikroskop utförs. Minst 2 000 omogna erythrocyter per djur undersöks med avseende på förekomst av omogna erythrocyter med mikrokärnor. Ytterligare information kan erhållas genom att söka efter mogna erythrocyter med mikrokärnor. Vid analys av utstryksglas bör antalet omogna erythrocyter jämfört med det totala antalet erythrocyter inte vara mindre än 20 % av kontrollvärdet. När djur behandlas kontinuerligt under 4 veckor eller mer kan även minst 2 000 mogna erythrocyter per djur undersökas med avseende på förekomst av mikrokärnor. System för automatiserad analys (bildanalys och flödescytometri av cellsuspensioner) är acceptabla alternativ till manuell utvärdering om lämplig verifiering och validering sker.

2. **DATA**

2.1 **BEHANDLING AV RESULTATEN**

Individuella data från försöksdjur bör presenteras i tabellform. Den experimentella enheten utgörs av försöksdjuret. Antalet omogna erythrocyter som påträffas, antalet omogna erythrocyter med mikrokärnor, och antalet omogna bland det totala antalet erythrocyter bör listas separat för varje djur som analyseras. När försöksdjur behandlas kontinuerligt under 4 veckor eller mer, bör data över mogna erythrocyter också presenteras, om dessa har samlats in. Andelen omogna erythrocyter bland det totala antalet erythrocyter och, om det anses tillämpligt, procentandelen av erythrocyter med mikrokärnor, bör anges för varje försöksdjur. Om det inte finns några bevis för en skillnad i resultaten mellan könen, kan data från båda könen kombineras för statistisk analys.

2.2 **UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN**

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning av antalet celler med mikrokärnor eller en tydlig ökning av antalet celler med mikrokärnor hos en grupp som fått en enstaka dos vid ett enstaka provtagningstillfälle. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärdering av testresultatet (18)(19). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt. Tvetydiga resultat bör klargöras genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger experimentet upprepas.

Positiva resultat i testet av mikrokärnor tyder på att substansen inducerar mikrokärnor som är ett resultat av en kromosomal skada eller skada på den mitotiska apparaten i erytroblasterna hos den art som testas. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under dessa försöksbetingelser, inte ger upphov till mikrokärnor i de omogna erythrocyterna hos den art som testas.

Sannolikheten för att testsubstansen eller någon av dess metaboliter skall nå ut i det stora kretsloppet eller specifikt till målvävnaden (t.ex. systemisk toxicitet) bör diskuteras.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel

- motivering för valet av vehikel
- testsubstansens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Försöksdjur:

- art/stam som används
- försöksdjurens antal, ålder och kön
- källa, förhållanden vid förvaring, diet, etc.
- individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

Försöksbetingelser:

- positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel)
- data från en undersökning av spännvidden, om en sådan har utförts
- grund för valet av dosnivå
- uppgifter om beredningen av testsubstansen
- uppgifter om administreringen av testsubstansen
- grund för det sätt administreringen sker på
- metoder för att verifiera att testsubstansen nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden, om detta är tillämbart
- omvandling av koncentrationen för testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg kroppsvikt/dag), om detta är tillämbart
- fodrets och vattnets kvalitet
- detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman
- metoder för preparation av utstryksglas
- metoder för mätningar av toxicitet
- kriterier för bestämning av omogna erythrocyter med mikrokärnor
- antalet analyserade celler per djur
- kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga.

Resultat :

- tecken på toxicitet
- andelen omogna erythrocyter av det totala antalet erythrocyter
- antalet omogna erythrocyter med mikrokärnor, angett separat för varje djur
- medelvärde ± standardavvikelse för omogna erythrocyter med mikrokärnor per grupp
- dos/respons-förhållande, närhelst detta är möjligt
- statistiska analyser och metoder som används
- samtidiga och historiska negativa kontrolldata
- samtidiga positiva kontrolldata

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. REFERENSER

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. MUTAGENICITET : TEST AV ÅTERMUTATION HOS BAKTERIER

1. METOD

Denna metod är en kopia av OECD TG 471, Omvänt bakteriellt mutationstest (Bacterial Reverse Mutation Test (1997)).

1.1 INLEDNING

I detta test av återmutation hos bakterier används aminosyraberoende stammar av *Salmonella typhimurium* och *Escherichia coli* för att detektera punktmutationer, vilka innefattar substitution, addition eller deletion av ett eller några DNA-baspar (1)(2)(3). Testet bygger på principen att man detekterar mutationer som gör att redan existerande mutationer i teststammarna går tillbaka varvid den funktionella förmågan hos bakterierna att syntetisera en essentiell aminosyra återställs. De återmuterade bakterierna detekteras på grundval av sin förmåga att växa i frånvaro av den aminosyra som krävs hos den ursprungliga teststammen.

Punktmutationer är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människor och mycket tyder på att punktmutationer i onkogener och suppressorgener för tumörer i somatiska celler är inblandade i bildning av tumörer hos människor och försöksdjur. Testet av återmutation hos bakterier är snabbt, billigt och relativt enkelt att utföra. Många av testarterna har ett flertal egenskaper som gör dem mera känsliga för detektion av mutationer inklusive responsiva DNA-sekvenser vid reversionssäten, ökad cellpermeabilitet för stora molekyler och eliminering av reparationsystem för DNA eller förstärkning av felbenägna reparationsprocesser för DNA. Specificiteten hos teststammarna kan erbjuda en del nyttig information om de typer av mutationer som induceras av genotoxiska ämnen. En mycket stor databas med resultat för ett stort antal olika strukturer finns tillgänglig för tester av återmutation hos bakterier och väletablerade metoder har utvecklats för testning av kemikalier med olika fysisk-kemiska egenskaper, inklusive flyktiga ämnen.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Ett test av återmutation hos antingen *Salmonella typhimurium* eller *Escherichia coli* detekterar mutation i en aminosyraberoende stam (histidin respektive tryptofan) vilket ger en stam som är oberoende av en extern tillförsel av aminosyror.

Mutagener som ger basparsubstitutioner är ämnen som orsakar en basförändring i DNA. I ett test av återmutation kan denna förändring uppträda vid sätet för den ursprungliga mutationen eller på ett andra säte i det bakteriella genomet.

Mutagener som ger förskjutningar (frameshift) är ämnen som orsakar addition eller deletion av ett eller flera baspar i DNA, vilket då ger en ändrad avläsningsordning i RNA.

1.3 INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Testet av återmutation hos bakterier utnyttjar prokaryota celler, vilka skiljer sig från däggdjursceller med avseende på sådana faktorer som upptag, metabolism, kromosomstruktur och processer för DNA-reparation. Tester som utförs *in vitro* kräver i allmänhet att det finns en yttre källa för metabolisk aktivering. Hos system för metabolisk aktivering *in vitro* kan inte förhållandena för däggdjur *in vivo* efterliknas helt och hållet. Testet ger därför ingen direkt information om den mutagena och den karcinogena potensen hos en substans i däggdjur.

Testet av återmutation hos bakterier används vanligen som en inledande undersökning av genotoxisk aktivitet och, i synnerhet, av aktivitet som inducerar punktmutationer. En omfattande databas har demonstrerat att många kemikalier som ger positiva resultat i detta test även uppvisar mutagen aktivitet i andra tester. Det finns exempel på mutagena ämnen som inte kan detekteras med hjälp av detta test. Skälen till dessa tillkortakommanden kan tillskrivas den specifika naturen hos den detekterade slutpunkten, skillnader i metabolisk aktivering, eller skillnader i biotillgänglighet. Å andra sidan kan faktorer som höjer känsligheten hos testet leda till en överskattning av den mutagena aktiviteten.

Testet av återmutation hos bakterier kan visa sig olämpligt för utvärdering av vissa klasser av kemikalier såsom starkt baktericida ämnen (t.ex. vissa antibiotika) och de som anses (eller är kända för att) interferera specifikt med systemet för cellreplikation hos däggdjur (t.ex. vissa inhibitorer av topoisomeras och vissa nukleosidanaloger). I sådana fall kan mutationstester på däggdjur vara mera lämpliga.

Även om många ämnen som ger positiva resultat i detta test är karcinogena för däggdjur, är korrelationen inte absolut. Den är beroende på kemisk klass och det finns karcinogener som inte kan detekteras med hjälp av detta test, eftersom de verkar genom andra, icke-genotoxiska mekanismer eller mekanismer som saknas i bakterieceller.

1.4 TESTMETODENS PRINCIP

Suspensioner med bakterieceller exponeras för testsubstansen i närvaro och i frånvaro av ett exogent system för metabolisk aktivering. I plattinkorporeringsmetoden blandas dessa suspensioner med en toppskiktsgär varpå plattor omedelbart görs på minimalmedium. I preinkubationsmetoden inkuberas behandlingsblandningen och sedan blandas denna med en toppskiktsgär innan plattor görs på minimalmedium. I båda metoderna räknas återmuterade kolonier efter två eller tre dagars inkubering och jämförs med antalet spontant återmuterade kolonier på kontrollplattor med lösningsmedel.

Ett flertal procedurer för att utföra testet av återmutation hos bakterier har beskrivits. Bland de som vanligtvis används ingår plattinkorporeringsmetoden (1)(2)(3)(4), preinkubationsmetoden (2)(3)(5)(6)(7)(8), fluktueringsmetoden (9)(10) och suspensionsmetoden (11). Modifikationer för testning av gaser eller ångor har tidigare beskrivits (12).

De procedurer som beskrivs i metoden hänför sig primärt till plattinkorporerings- och preinkubationsmetoder. Inga av dem är acceptabla för att genomföra experiment både med och utan metabolisk aktivering. Vissa substanser kan detekteras mer effektivt med hjälp av preinkubationsmetoden. Dessa substanser tillhör kemiska klasser som innefattar korta kedjor med alifatiska nitrosaminer, tvåvärda metaller, aldehyder, azofärger och diazoföreningar, pyrolizidinalkaloider, allylföreningar och nitroföreningar (3). Det är även känt att vissa klasser av mutagener inte alltid detekteras med hjälp av standardprocedurer såsom plattinkorporeringsmetoden eller preinkubationsmetoden. Dessa bör uppfattas som "speciella fall" och det rekommenderas varmt att alternativa procedurer används för detektionen av dem. De följande "speciella fallen" bör identifieras (tillsammans med exempel på procedurer som kan användas för detektionen av dem): azofärger och diazoföreningar (3)(5)(6)(13), gaser och flyktiga kemikalier (12)(14)(15)(16) samt glykosider (17)(18). En avvikelse från standardproceduren måste vara vetenskapligt motiverad.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 Förberedelser

1.5.1.1 Bakterier

Nya kulturer med bakterier bör få växa till sig fram till den sena exponentiella eller tidiga stationära tillväxtfasen (ungefär 10^9 celler per ml). Kulturer som befinner sig i sen stationär fas bör inte användas. Det är viktigt att de kulturer som används i experimentet har en hög titer med livsdugliga bakterier. Titern kan fås fram antingen ur tillväxtkurvor från historiska kontrolldata, eller ur varje försök genom att bestämma antalet livsdugliga celler med hjälp av ett utstrykningsexperiment.

Den rekommenderade inkubationstemperaturen är 37°C.

Minst fem bakteriestammar bör användas. Dessa bör inkludera fyra stammar av *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 eller TA97a eller TA97; TA98; och TA100) som har visat sig vara tillförlitliga och ge en reproducerbar respons i olika laboratorier. Dessa fyra stammar av *S. typhimurium* har GC-baspar vid det primära återmutationsstället och det är känt att de inte kan detektera vissa oxiderande mutagener, tvärbindande ämnen och hydraziner. Sådana substanser kan detekteras med hjälp av *E. coli* WP2-stammar eller *S. typhimurium* TA102 (19) som har ett AT-baspar vid det primära återmutationsstället. Den rekommenderade kombinationen av stammar är därför:

- *S. typhimurium* TA1535,
- *S. typhimurium* TA1537 eller TA97 eller TA97a,
- *S. typhimurium* TA98,
- *S. typhimurium* TA100, och
- *E. coli* WP2 uvrA, eller *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), eller *S. typhimurium* TA102.

För att kunna detektera tvärbindande mutagener kan det vara lämpligt att inkludera TA102 eller att också använda en DNA-reparationsduglig stam av *E. coli* [t.ex. *E. coli* WP2 eller *E. coli* WP2 (pKM101)]

Etablerade procedurer för beredning av baskulturer, markörverifiering och lagring bör användas. Behovet av aminosyror för tillväxten bör påvisas för varje frusen preparation av baskulturer (histidin för stammar av *S. typhimurium* och tryptofan för stammar av *E. coli*). Andra fenotypiska karakteristika bör kontrolleras på liknande sätt, nämligen närvaron eller frånvaron av R-faktorplasmider där detta är lämpligt [d.v.s. ampicillin-resistens i stammarna TA98, TA100 och TA97a eller TA97, WP2 uvrA och WP2 uvrA (pKM101) och ampicillin + tetracyklinresistens i stammen TA102]; närvaron av karakteristiska mutationer (d.v.s. rfa-mutation i *S. typhimurium* genom känslighet för kristallviolett och uvrA-mutation i *E. coli* eller uvrB-mutation i *S. typhimurium* genom känslighet för ultraviolettt ljus) (2)(3). Stammarna bör även ge spontant återmuterande platträckningar av kolonier inom de frekvensområden som kan förväntas från laboratoriets historiska kontrolldata och helst inom det område som rapporteras i litteraturen.

1.5.1.2 Medium

Använd en lämplig minimalagar (t.ex. innehållande Vogel-Bonner minimalmedium E och glukos) och ett agartoppskikt som innehåller histidin och biotin eller tryptofan, så att några stycken celldelningar skall kunna ske (1)(2)(9).

1.5.1.3 Metabolisk aktivering

Bakterier bör exponeras för testsubstanten både i närvaro och frånvaro av ett lämpligt system för metabolisk aktivering. Det vanligaste systemet som används är en post-mitokondriell fraktion där en kofaktor tillsatts (S9) vilken beretts ur lever från gnagare vilka behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (1)(2) eller en kombination av fenobarbiton och β -naftoflavon (18)(20)(21). Den post-mitokondriella fraktionen används vanligen vid koncentrationer i området från 5 till 30 % v/v i S9-blandningen. Valet av och betingelserna hos ett system för metabolisk aktivering kan bero på den klass av kemikalier som testas. I vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en koncentration av den postmitokondriella fraktionen. För azofärger och diazoämnen, kan användning av ett reduktivt system för metabolisk aktivering vara lämpligare (6)(13).

1.5.1.4 Beredning av testsubstanten

Fasta testsubstanter bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om detta är lämpligt, före det att bakterierna behandlas. Flytande testsubstanter kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut före behandling. Nygjorda beredningar bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

Lösningsmedel/vehiklar bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstanten och bör vara förenliga med bakteriernas överlevnad samt S9-aktivitet (22). Om man använder andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. Därhelst det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

1.5.2 Försöksbetingelser

1.5.2.1 Teststammar (se 1.5.1.1)

1.5.2.2 Exponeringskoncentration

Cytotoxiciteten och lösligheten i den slutliga behandlingsblandningen är några av de kriterier som man måste ta hänsyn till vid bestämningen av den högsta mängd av testsubstansen som skall användas.

Det kan vara bra att bestämma toxicitet och löslighet i ett förberedande experiment. Cytotoxicitet kan detekteras genom en minskning av antalet återmuterande kolonier, en uttunning eller minskning av bakgrundstillväxten, eller graden av överlevnad hos de behandlade kulturerna. Cytotoxiciteten hos en substans kan ändras i närvaro av system för metabolisk aktivering. Olöslighet bör fastställas som en utfällning i den slutliga blandningen, under de verkliga försöksbetingelserna och skall vara synlig för blotta ögat.

Den maximala rekommenderade testkoncentrationen för lösliga icke-cytotoxiska substanser är 5 mg/platta eller 5 µl/platta. För icke-cytotoxiska substanser som inte är lösliga vid 5 mg/platta eller 5 µl/platta, bör en eller flera av de koncentrationer som testas vara olösliga i den slutliga behandlingsblandningen. Testsubstanser som är cytotoxiska redan under 5 mg/platta eller 5 µl/platta bör testas upp till en cytotoxisk koncentration. Fällningen torde inte störa bestämningen.

Minst fem olika analyserbara koncentrationer av testsubstansen bör användas, med ungefär halva log-intervall (d.v.s. $\sqrt{10}$) mellan testpunkterna för ett inledande experiment. Mindre intervall kan vara lämpliga när ett koncentrationssvar håller på att undersökas. Testning över en koncentration på 5 mg/platta eller 5 µl/platta kan övervägas vid utvärdering av substanser som innehåller avsevärda mängder av potentiellt mutagena föroreningar.

1.5.2.3 Negativa och positiva kontroller

Samtidiga stamspecifika positiva och negativa kontroller (lösningsmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje försök. Positiva kontrollkoncentrationer som visar på det effektiva utfallet för varje försök bör väljas.

För försök där ett system för metabolisk aktivering används, bör den positiva kontrollreferenssubstansen väljas på basis av de typer av bakteriestammar som används.

De följande substanserna utgör exempel på lämpliga positiva kontroller för försök med metabolisk aktivering:

CA-nummer	EINECS-nummer	Namn
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetylantracen
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetylbensantracen
50-32-8	200-028-5	bens[a]pyren
613-13-8	210-330-9	2-aminoantracen
50-18-0	200-015-4	cyklofosfoamid
6055-19-2		cyklofosfoamidmonohydrat

Följande substans är en lämplig positiv kontroll för den reductiva metaboliska aktiveringsmetoden:

573-58-0	209-358-4	kongorött
----------	-----------	-----------

2-aminoantracen bör inte användas som den enda indikatorn på effektiviteten hos S9-blandningen. Om 2-aminoantracen används, bör varje sats av S9 även karakteriseras med en mutagen som kräver metabolisk aktivering med hjälp av mikrosomala enzymer, t.ex. bens[*a*]pyren, dimetylbensantracen.

Följande substanser utgör exempel på sorts specifika positiva kontroller för försök som utförs utan exogena system för metabolisk aktivering:

CAS-nummer	EINECS-nummer	Namn	Sort
26628-22-8	247-852-1	natriumazid	TA 1535 och TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluoren	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoakridin	TA 1537, TA 97 och TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 och TA 97a
80-15-9	201-254-7	kumenhydroperoxid	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomycin C	WP2 uvrA och TA102
70-25-7	200-730-1	N-etyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin	WP2, WP2uvrA och WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitroquinolin-1-oxid	WP2, WP2uvrA och WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furylfuramid (AF2)	plasmidinhållande sorter

Andra lämpliga positiva kontrollreferenssubstanser kan användas. Användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier bör övervägas när sådana finns att tillgå.

Negativa kontroller, bestående av enbart lösningsmedel eller vehikel, utan testsubstans, och i övrigt hanterade på samma sätt som för de behandlade grupperna, bör inkluderas. Obehandlade kontroller bör dessutom även användas, om det inte finns historiska kontrolldata som visar att inga farliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

1.5.3 **Förfarande**

Vid plattinkorporeringsmetoden (1)(2)(3)(4), utan metabolisk aktivering, blandas vanligen 0,05 ml eller 0,1 ml av testlösningarna, 0,1 ml av färsk bakteriekultur (innehållande ungefär 10^8 livsdugliga celler) och 0,5 ml av steril buffert med 2,0 ml av toppskiktsagar. För ett försök med metabolisk aktivering blandas vanligen 0,5 ml av en metabolisk aktiveringsblandning, vilken innehåller en adekvat mängd postmitokondriell fraktion (i området från 5 till 30 % v/v i den metaboliska aktiveringsblandningen), med toppskiktsagar (2,0 ml), tillsammans med bakterierna och testsubstansen/testlösningen. Innehållet i varje rör blandas och hälls över ytan på en minimalagarplatta. Toppskiktsagarn tillåts att stelna innan inkubering sker.

För förinkubationsmetoden (2)(3)(5)(6), förinkuberas testsubstansen/testlösningen med teststammen (innehållande ungefär 10^8 livsdugliga celler) och steril buffert eller med system för metabolisk aktivering (0,5 ml), vanligen under 20 min. eller längre vid 30–37°C, innan den blandas med toppskiktsagarn och hälls uppå ytan på en minimalagarplatta. Vanligen blandas 0,05 eller 0,1 ml av testsubstansen/testlösningen, 0,1 ml bakterier och 0,5 ml av S9-blandningen eller steril buffert blandat med 2,0 ml av toppskiktsagar. Rören bör luftas under förinkubationen med hjälp av en skakmaskin.

För att möjliggöra en rimlig uppskattning av variationen bör tre plattor användas vid varje dosnivå. Användning av två plattor är acceptabelt när detta är vetenskapligt motiverat. Förlust av en enstaka platta innebär inte nödvändigtvis att ett försök blir ogiltigt.

Gasformiga eller flyktiga substanser bör testas med lämpliga metoder, såsom i slutna kärl (12)(14)(15)(16).

1.5.4 **Inkubering**

Alla plattor i en given assay bör inkuberas vid 37°C under 48–72 timmar. Efter inkubationsperioden räknas antalet återmuterande kolonier per plattor.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data bör presenteras som antalet återmuterande kolonier per platta. Antalet återmuterande kolonier på såväl negativa (lösningsmedelskontroll och obehandlad kontroll, om en sådan används) och positiva kontrollplattor bör även anges. Individuella platträkningar, medelantalet för de återmuterande kolonierna per platta och standardavvikelsen bör uppges för såväl testsubstansen som för positiva och negativa (obehandlade och/eller (lösningsmedels-) kontroller.

Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt svar. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser. Negativa resultat måste bekräftas från fall till fall. I de fall där det inte anses nödvändigt att bekräfta negativa resultat bör detta motiveras. Vid uppföljningsexperiment bör man överväga att ändra parametrarna i undersökningen för att utvidga de bedömda försöksbetingelserna. De försöksparametrar som skulle kunna modifieras innefattar koncentrationsindelningen, metoden för behandling (plattinkorporering eller förinkubation i vätska), och betingelser för metabolisk aktivering.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning över hela det testade området och/eller en reproducerbar ökning, vid en eller flera koncentrationer, av antalet återmuterande kolonier per platta för minst en stam, med eller utan ett system för metabolisk aktivering (23). Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärdering av testresultatet (24). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om svaret är positivt.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan uppsättningen av data i sällsynta fall göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger experimentet upprepas.

Positiva resultat från testet av återmutation hos bakterier indikerar att substansen inducerar punktmutationer genom bassubstitutioner eller förskjutningar i genomet hos antingen *Salmonella typhimurium* och/eller *Escherichia coli*. Negativa resultat indikerar att testsubstansen inte är mutagen hos den testade sorten under dessa försöksbetingelser.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Följande information måste ingå i testrapporten:

Lösningsmedel/vehikel:

- motivering för valet av lösningsmedel/vehikel
- testsubstansens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.

Stammar:

- stammar som används
- antalet celler per kultur
- karakteristika för stammen

Försöksbetingelser:

- mängd av testsubstansen per platta (mg/platta eller µl/platta) med grund för val av dos och antal plattor per koncentration
- använda medier
- typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, inklusive acceptabilitetskriterier
- behandlingsprocedurer.

Resultat :

- tecken på toxicitet
- tecken på utfällning
- individuella platträkningar
- medelantalet återmuterande kolonier per platta och standardavvikelse
- dos/respons-förhållande, där detta är möjligt
- statistiska analyser, om några sådana finns
- samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser
- historiska negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

REFERENSER

1. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
2. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
3. Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res.*, 312, 217-233.
4. Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 168, 69-240.
5. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, 91-96.
6. Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. 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. Resultat 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 eller 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. MUTAGENICITET – TEST AV GENMUTATIONER HOS DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO*

1. METOD

Denna metod är en kopia av OECD TG 476, Test av genmutationer hos däggdjursceller *in vitro* (*In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997)).

1.1 INLEDNING

Genmutationstestet *in vitro* för däggdjursceller kan användas för att detektera genmutationer som inducerats med hjälp av kemiska substanser. Lämpliga cellinjer innefattar L5178Y muslymfomceller, CHO-, CHO-AS52- och V79-linjerna från kinesiska hamsterceller och TK6 lymfoblastoidceller från människa (1). I dessa cellinjer mäter de vanligast använda genetiska slutpunkterna mutation av tymidinkinas (TK) och hypoxanthinganin fosforibosyltransferas (HPRT), och en transgen av xanthin-guanin fosforibosyltransferas (XPRT). Mutationstesterna TK, HPRT och XPRT detekterar olika spektra av genetiska händelser. Den autosomala lokaliseringen av TK och XPRT kan göra det möjligt att detektera genetiska händelser (t.ex. stora deletioner) som inte detekteras vid HPRT-lokuset på X-kromosom (2)(3)(4)(5)(6).

I genmutationstestet *in vitro* för däggdjursceller kan kulturer med etablerade cellinjer eller celltyper användas. De celler som används väljs ut på basis av tillväxtförmåga vid odling och stabilitet med avseende på spontan mutationsfrekvens.

Tester som utförs *in vitro* kräver i allmänhet att en exogen källa för metabolisk aktivering används. Detta system för metabolisk aktivering kan inte fullt ut efterlikna förhållandena *in vivo* hos däggdjur. Försiktighet bör iakttagas så att man undviker förhållanden som skulle kunna leda till resultat som inte avspeglar den verkliga mutageniciteten. Positiva resultat som inte avspeglar den verkliga mutageniciteten kan uppkomma från förändringar i pH, osmolalitet eller hög cytotoxicitet (7).

Detta test används för att undersöka möjliga mutagener och karcinogener i däggdjur. Många ämnen som är positiva i detta test är karcinogena i däggdjur. Det föreligger dock ingen perfekt korrelation mellan detta test och karcinogenicitet. Korrelationen är beroende på den kemiska klassen och det finns allt fler bevis för att det finns karcinogener som inte detekteras med hjälp av detta test, eftersom de verkar uppträda genom andra, icke-genotoxiska mekanismer eller mekanismer som är frånvarande i bakterieceller (6).

Se även Allmän inledning, Del B.

1.2 DEFINITIONER

Framåtmutation: en genmutation från den parentala typen till den mutanta formen, vilket ger upphov till en förändring eller en förlust av den enzymatiska aktiviteten i funktionen hos det protein som bildas.

Mutagener som ger basparsubstitutioner: substanser som orsakar substitution av ett eller flera baspar i DNA.

Förskjutnings (frameshift)-mutagener: substanser som orsakar addition eller deletion av ett eller flera baspar i DNA-molekylen.

Fenotypisk expressionstid: en period under vilken celler som nyligen muterat töms på oförändrade genprodukter.

Mutantfrekvens: antalet mutanta celler som observerats, delat med antalet livskraftiga celler.

Relativ total tillväxt: ökningen av antalet celler över tiden jämfört med en kontrollpopulation av celler, beräknat som produkten av suspensionstillväxten i förhållande till den negativa kontrollen, gånger kloningseffektiviteten i förhållande till den negativa kontrollen.

Relativ suspensionstillväxt: ökning av cellantalet delat med expressionsperioden i relation till den negativa kontrollen.

Viabilitet: kloningens effektivitet hos de behandlade cellerna vid tiden för utstryk på platta, under selektiva betingelser efter expressionsperioden.

Överlevnad: kloningens effektivitet hos de behandlade cellerna när utstryk på platta sker vid behandlingsperiodens slut. Överlevnaden uttrycks vanligen i förhållande till överlevnaden hos kontrollens cellpopulation.

1.3

TESTMETODENS PRINCIP

Celler som lider brist på tymidinkinas (TK), beroende på mutationen $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$, är resistent mot de cytotoxiska effekterna av pyrimidinanalogen trifluortymidin (TFT). Celler med väl fungerande tymidinkinas är känsliga för TFT, eftersom TFT ger upphov till inhibering av cellmetabolismen och stoppar fortsatt celledning. Mutanta celler kan således utvecklas i närvaro av TFT, medan däremot normala celler, som innehåller tymidinkinas, inte klarar detta. Celler som lider brist på HPRT eller XPRT kan på liknande sätt väljas ut genom resistens mot 6-tioguanin (TG) eller 8-azaguanin (AG). Egenskaperna hos testsubstansen bör noggrant gås igenom om en basanalog eller ett ämne som är relaterat till det selektiva ämnet testas i något av testerna för genmutationer i däggdjursceller. Exempelvis bör varje misstänkt selektiv toxicitet hos testsubstansen mot mutanta och icke-mutanta celler undersökas. Det sätt som det selekterande systemet/ämnet fungerar på, måste således bekräftas när man testar kemikalier som är strukturellt relaterade med det selektiva ämnet (8).

Celler i suspension eller kulturer i form av ett enkelskikt exponeras för testsubstansen, både med och utan metabolisk aktivering, under en lämplig tidsperiod och subkultiveras för att bestämma cytotoxiciteten och för att tillåta fenotypisk expression innan mutantvalet sker (9)(10)(11)(12)(13). Cytotoxiciteten bestäms i vanliga fall genom att mäta den relativa kloningseffektiviteten (överlevnad) eller den relativa totala tillväxten för kulturerna efter behandlingsperioden. De behandlade kulturerna bibehålls i ett tillväxtmedium under en tillräckligt lång tid, karakteristisk för varje selekterat lokus och celltyp, för att tillåta i det närmaste optimal fenotypisk expression av inducerade mutationer. Mutationsfrekvensen bestäms genom att inockulera ett känt antal celler i ett medium som innehåller det selektiva ämnet för detektion av mutanta celler, och i ett medium utan selektivt ämne för bestämning av kloningseffektiviteten (viabiliteten). Efter en lämplig inkubationstid räknas cellerna. Mutationsfrekvensen erhålls från antalet mutanta kolonier i selektivt medium och antalet kolonier i icke-selektivt medium.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Celler*

Det finns ett antal olika celltyper som kan användas i detta test, inklusive subkloner från L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 eller TK6-celler. De celltyper som används i detta test bör ha en demonstrerad känslighet mot kemiska mutagener, en hög kloningseffektivitet och en stabil spontan mutationsfrekvens. Cellerna bör kontrolleras med avseende på kontaminering från mykoplasma och bör inte användas om kontaminering skett.

Testet bör utformas på ett sådant sätt att det har en förutbestämd känslighet och styrka. Antalet celler, kulturer och koncentrationer av testsubstansen som används bör reflektera dessa definierade parametrar (14). Det minsta antalet livskraftiga celler som överlever behandlingen och används vid varje stadium av testet bör baseras på den spontana mutationsfrekvensen. En generell regel är att använda ett cellantal som är minst tio gånger det inverterade värdet av den spontana mutationsfrekvensen. Det rekommenderas dock att minst 10^6 celler används. Adekvata historiska data för det cellsystem som används bör vara tillgängliga för att kontrollera att testet ger reproducerbara resultat.

1.4.1.2 *Betingelser för media och kulturer*

Lämpliga kulturmedia och inkubationsbetingelser (odlingskärl, temperatur, CO₂-koncentration och luftfuktighet) bör användas. Mediet bör väljas ut i enlighet med de selektiva system och celltyper som används i testet. Det är särskilt viktigt att betingelserna för kulturerna väljs på ett sådant sätt att man säkrar en optimal celltillväxt cellerna under expressionsperioden och en förmåga till bildning av kolonier för både mutanta och icke-mutanta celler.

1.4.1.3 *Förberedelse av kulturer*

Celler dras upp från stamkulturer, inockuleras i ett odlingsmedium och inkuberas vid 37°C. Innan de används i detta test kan kulturerna behöva tvättas rena från redan existerande mutanta celler.

1.4.1.4 *Metabolisk aktivering*

Celler bör exponeras för testsubstansen både i närvaro och frånvaro av ett lämpligt system för metabolisk aktivering. Det system som vanligen används är en postmitokondriell fraktion som tillsatts en kofaktor (S9), beredd ur levern från gnagare vilka behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (15)(16)(17)(18) eller en kombination av fenobarbiton och β -naftoflavon (19)(20).

Den postmitokondriella fraktionen används vanligen vid koncentrationer i området 1–10 % v/v i det slutliga testmediet. Valet av och betingelserna för ett system för metabolisk aktivering kan vara beroende av klassen av kemikalier som testas. I vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en koncentration av den postmitokondriella fraktionen.

Ett antal vidareutvecklingar, inklusive konstruktion av genetiskt modifierade cellinjer som uttrycker specifika aktiverande enzymer, kan ge en potential för endogen aktivering. Valet av de cellinjer som används bör vara vetenskapligt motiverat (t.ex. genom relevansen av cytokrom P450 isoenzym för metabolismen av testsubstansen).

1.4.1.5 *Beredning av testsubstansen*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut före det att cellerna behandlas, om detta är lämpligt. Flytande testsubstanser kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut innan behandlingen startas. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata tyder på att lagring kan accepteras.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen och bör vara förenlig med överlevnaden för cellerna samt S9-aktiviteten. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används bör det finnas data som visar att de är kompatibla. Det rekommenderas att vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar i första hand bör övervägas närhelst det är möjligt. När substanser som är instabila i vatten testas, bör de organiska lösningsmedel som används vara fria från vatten. Vatten kan avlägsnas genom att tillsats av en molekylsikt.

1.4.2.2 *Exponeringskoncentrationer*

Bland de kriterier som skall övervägas när den högsta koncentrationen skall fastställas är cytotoxicitet, löslighet i testsystemet och förändringar i pH eller osmolalitet.

Cytotoxicitet bör fastställas såväl med som utan metabolisk aktivering i huvudexperimentet med hjälp av lämplig indikation på cellernas integritet och tillväxt, såsom relativ kloningseffektivitet (överlevnad) eller relativ total tillväxt. Det kan vara lämpligt att fastställa cytotoxicitet och löslighet i ett förberedande experiment.

Minst fyra analyserbara koncentrationer bör användas. Där cytotoxicitet uppträder bör dessa koncentrationer täcka in ett område som sträcker sig från maximal toxicitet ner till liten eller ingen toxicitet. Detta innebär normalt att koncentrationsnivåerna bör separeras av minst en faktor mellan 2 och $\sqrt{10}$. Om den maximala koncentrationen är baserad på cytotoxicitet bör detta då resultera i ungefär 10–20 % (men inte mindre än 10 %) relativ överlevnad (relativ kloningseffektivitet) eller relativ total tillväxt. För relativt icke-cytotoxiska substanser, bör den maximala testkoncentration vara 5 mg/ml, 5 μ l/ml eller 0,01 M, beroende på vilket som är det lägsta.

Relativt olösliga substanser bör testas upp till eller över sin löslighetsgräns under odlingsbetingelserna för kulturen. Bevis för olöslighet bör bestämmas i det slutliga behandlingsmediet för vilket cellerna exponeras. Det kan vara lämpligt att fastställa lösligheten vid behandlingens början och slutpunkt, eftersom lösligheten kan förändras under exponeringsförloppet i testsystemet beroende på närvaron av celler, S9, serum, etc. Olöslighet kan detekteras med hjälp av blotta ögat. Fällningen torde inte störa bestämningen.

1.4.2.3 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje experiment. När metabolisk aktivering används, bör den positiva kontrollkemikalien vara av sådant slag att den kräver aktivering för att ge ett mutagent svar.

I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanter.

Betingelser för metabolisk aktivering	Lokus	Substans	CAS-nr.	EINECS-nr.
Frånvaro av exogen metabolisk aktivering	HPRT	Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Etylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (små och stora kolonier)	Metylmetsulfonat	66-27-3	200-625-0
		XPRT	Etylmetansulfonat	62-50-0
			Etylnitrosourea	759-73-9
	Närvaro av exogen metabolisk aktivering	HPRT	3-Metylkolantren	56-49-5
N-Nitrosodimetylamin			62-75-9	200-549-8
7,12-Dimetylbensantracen			57-97-6	200-359-5
TK (små och stora kolonier)		Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
		Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	
		Bens[a]pyren	50-32-8	200-028-5
		3-Metylkolantren	56-49-5	200-276-5
XPRT		N-Nitrosodimetylamin (för höga nivåer av S-9)	62-75-9	200-549-8
		Bens[a]pyren	50-32-8	200-028-5

Andra lämpliga referenssubstanter för positiv kontroll kan användas, t.ex. om ett laboratorium har en historisk databas med 5-brom-2'-deoxiuridin [CAS-nr. 59-14-3, EINECS-nr. 200-415-9] skulle även denna referenssubstans kunna användas. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier bör övervägas när sådana finns att tillgå.

Negativa kontroller, bestående av enbart ett lösningsmedel eller en vehikel i behandlingsmediet och behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna bör inkluderas. Dessutom bör även obehandlade kontroller användas, om det inte finns historiska kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

1.4.3 **Förfarande**

1.4.3.1 *Behandling med testsubstansen*

Prolifererande celler bör exponeras för testsubstansen både med och utan metabolisk aktivering. Exponering bör ske under en lämplig tidsperiod (normalt är tre till sex timmar effektivt). Exponeringstiden kan utsträckas över en eller flera cellcykler.

Antingen en eller två behandlade kulturer kan användas vid varje koncentration som testas. När enstaka kulturer används, bör antalet koncentrationer ökas så att ett adekvat antal kulturer säkerställs för analys (t.ex. minst 8 analyserbara koncentrationer). Två negativa (lösningsmedels-) kontrollkulturer bör användas.

Gasformiga eller flyktiga substanser bör testas med hjälp av lämpliga metoder, såsom slutna odlingskärl (21)(22).

1.4.3.2 *Mätning av överlevnad, viabilitet och mutantfrekvens*

Mot slutet av exponeringsperioden tvättas cellerna och odlas för att bestämma överlevnad och för att medge att den mutanta fenotypen uttrycks. Mätning av cytotoxicitet, genom en bestämning av den relativa kloningseffektiviteten (överlevnad) eller relativa totala tillväxten för kulturerna, initieras normalt efter behandlingsperioden.

Varje lokus har definierade krav på minimitid, så att närmast optimal fenotypisk expression av nyligen inducerade mutanter medges (HPRT och XPRT kräver minst 6–8 dagar och TK minst 2 dagar). Celler odlas ofta i ett medium med och utan selektiva ämnen för att såväl antalet mutanter som kloningens effektivitet skall kunna bestämmas. Mätningen av viabiliteten (används för att beräkna mutantfrekvensen) initieras vid slutet av expressionstiden genom utstryk på platta i ett icke-selektivt medium.

Om testsubstansen är positiv i testet L5178Y TK^{+/−}, bör storleksmätning av kolonierna utföras på åtminstone en av testkulturerna (den högsta positiva koncentrationen) och på de negativa och positiva kontrollerna. Om testsubstansen är negativ i testet L5178Y TK^{+/−}, bör storleksmätning av kolonierna utföras på de negativa och positiva kontrollerna. I undersökningar där TK6TK^{+/−} används, kan storleksmätning av kolonierna utföras även där.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data bör inkludera en bestämning av cytotoxicitet och viabilitet, räkning av kolonier och mutantfrekvenser för de behandlade kulturerna och kontrollkulturerna. Om testet L5178Y TK^{+/+} ger ett positivt svar, påvisas kolonier utifrån kriterier för små och stora kolonier för åtminstone en koncentration av testsubstansen (högsta positiva koncentrationen) och för de negativa och positiva kontrollerna. Den molekylära och cytogenetiska naturen hos både stora och små mutanta kolonier har undersökts mycket ingående (23)(24). I testet TK^{+/+} påvisas kolonier utifrån kriterier för normal tillväxt (stora) och långsam tillväxt (små) av kolonier (25). Mutanta celler som har utsatts för den mest omfattande genetiska skadan uppvisar förlängda dubblingstider och bildar därför små kolonier. Denna skada sträcker sig typiskt i en skala från förlust av hela genen till karyotypiskt synliga kromosomavvikelser. Induktion av mutanter som ger små kolonier har associerats med kemikalier som inducerar omfattande kromosomavvikelser (26). Mutanta celler som är mindre allvarligt påverkade växer med hastigheter liknande de som parentala celler uppvisar och bildar stora kolonier.

Överlevnad (relativa kloningseffektiviteter) eller relativ total tillväxt bör anges. Mutantfrekvensen bör uttryckas som antalet mutanta celler per antalet celler som överlever.

Individuella data för kulturerna bör anges. Alla data bör dessutom sammanfattas i tabellform.

Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt svar. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser. Negativa resultat måste bekräftas från fall till fall. I de fall där det inte anses nödvändigt att bekräfta ett negativt resultat bör detta motiveras. Vid tvetydiga eller negativa resultat bör man vid uppföljningsexperiment överväga att ändra parametrarna i undersökningen för att utvidga de bedömda försöksbetingelserna. Försöksparametrar som kan behöva modifieras inkluderar koncentrationsstegen och villkoren för metabolisk aktivering.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATET

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning eller en reproducerbar ökning i mutationsfrekvensen. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan vara till hjälp vid utvärdering testresultatet. Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Positiva resultat från testet av genmutationer *in vitro* hos däggdjursceller indikerar att testsubstansen inducerar genmutationer i de odlade däggdjursceller som används. Ett positivt koncentrationssvar som är reproducerbart är mycket meningsfullt. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar genmutationer i de odlade däggdjursceller som används.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Följande information måste ingå i testrapporten:

Lösningsmedel/vehikel

- motivering för valet av vehikel/lösningsmedel
- testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Celler:

- cellernas typ och källa
- antalet cellkulturer
- antalet cellpassager, om detta är tillämpligt
- metoder för bibehållande av cellkulturen, om detta är tillämpligt
- frånvaro av mykoplasma.

Försöksbetingelser:

- grund för val av koncentrationer och antalet kulturer inklusive t.ex. data för cytotoxicitet och löslighetsbegränsningar, om dessa finns att tillgå
- mediernas sammansättning, CO₂-koncentration
- testsubstansens koncentration
- den tillsatta vehikelns och testsubstansens volym
- inkubationstemperatur
- inkubationstid
- behandlingens varaktighet
- celldensitet under behandlingen
- typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, inklusive acceptabilitetskriterier
- positiva och negativa kontroller
- expressionsperiodens varaktighet (inklusive antalet celler som inokulerats, samt subkulturer och scheman för näringstillförsel, om detta är tillämpligt)
- selektiva ämnen
- kriterier för när tester skall anses som positiva, negativa eller tvetydiga
- metoder som används för att räkna antalet livskraftiga och muterade celler
- definition av kolonier vars storlek och typ skall beaktas (inklusive kriterier för ”små” och ”stora” kolonier, där detta är tillämpligt).

Resultat :

- tecken på toxicitet
- tecken på utfällning
- data för pH och osmolalitet under det att exponering för testsubstansen sker, om sådana data har uppmätts
- koloniernas storlek (i de fall de räknats) för åtminstone negativa och positiva kontroller
- laboratoriets möjligheter att detektera mutanter som ger små kolonier med L5178Y TK^{+/−}-systemet, där detta är tillämpligt
- dos/respons-förhållande, där detta är möjligt
- statistiska analyser, om sådana finns
- samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata
- historiska negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden och standardavvikelse
- mutationsfrekvens

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

REFERENSER

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 McCooley, 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 (TFT^r) Mutants of L5178Y/TK^{+/+} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151, 161-174.
25. Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. *Mutation Res.*, 229, 89-102.
26. Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK^{+/+}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis*, 5, 609-614.

B.23. SPERMATOGONIAL TEST AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR

1. METOD

Denna metod är en kopia av testet OECD TG 483, Spermatogonial test av kromosomavvikelser hos däggdjur (Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997)).

1.1 INLEDNING

Ändamålet med testet av spermatogoniala avvikelser *in vivo* hos däggdjur, är att identifiera de substanser som orsakar strukturella kromosomavvikelser i spermatogoniala celler hos däggdjur (1)(2)(3)(4)(5). Strukturella avvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. Majoriteten av de kemiska mutagenerna inducerar avvikelser av kromatidtyp, men även avvikelser av kromosomtyp förekommer. Denna metod är inte utformad för att mäta numeriska avvikelser och används inte rutinmässigt för detta ändamål. Kromosommutationer och relaterade händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människor.

Detta test mäter kromosomhändelser i spermatogoniala könsceller och förväntas därför utgöra en förutsägelse på induktion av ärftliga mutationer i könsceller.

Gnagare används rutinmässigt i detta test. Detta cytogenetiska test *in vivo* detekterar kromosomavvikelser i spermatogoniala mitoser. Andra målceller omfattas inte av denna metod.

För att detektera avvikelser av kromatidtyp i spermatogoniala celler, bör den första mitotiska celldelningen efter behandlingen undersökas innan dessa skador förloras i de påföljande celldelningarna. Ytterligare information från behandlade spermatogoniala stamceller kan erhållas genom meiotisk kromosomanalys av avvikelser av kromosomtyp vid diakinesmetafas I, när de behandlade cellerna förvandlas till spermacyter.

Detta *in vivo*-test är utformat för att undersöka om mutagener för somatiska celler även är aktiva i könsceller. Det spermatogoniala testet är dessutom relevant för att fastställa risken för mutagenicitet, eftersom det medger att faktorer för *in vivo* metabolism, farmakokinetik och reparationsprocesser för DNA beaktas.

Ett antal generationer av spermatogonier finns närvarande i testikeln med ett spektrum av känslighet för kemisk behandling. De avvikelser som detekteras representerar alltså ett samlat svar på behandlade spermatogoniala cellpopulationer, där de mera talrika differentierade spermatogoniala cellerna överväger. Olika generationer av spermatogonier kan där komma i kontakt med det stora kretsloppet. Om detta sker eller ej avgörs av deras position inne i testikeln, beroende på den fysiska och fysiologiska Sertoli-cellbarriären och på blod/testikelbarriären.

Om det finns bevis för att testsubstansen, eller en reaktiv metabolit, inte kommer att nå fram till målvävnaden, är det inte lämpligt att använda detta test.

Se även Allmän inledning, Del B.

1.2 DEFINITIONER

Avvikelse av kromatidtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

Avvikelse av kromosomtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott, eller brott och återförening, på båda kromatiderna på samma ställe.

Lucka: en akromatisk skada som är mindre än bredden på en kromatid, och med ett minimum av misspassning hos kromatider.

Numerisk avvikelse: en förändring av antalet kromosomer från det normala antalet som är karakteristiskt för det försöksdjur som används.

Polyploidi: en multipel av det haploida kromosomantalet (n) som skiljer sig från det diploida antalet (d.v.s. $3n$, $4n$, o.s.v.).

Strukturell avvikelse: en förändring av kromosomstrukturen som är detekterbar med hjälp av en mikroskopisk undersökning av metafasstadiet vid celldelning, observerad i form av deletioner, interna eller externa utbyten.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjur exponeras för testsubstansen genom ett lämpligt exponeringssätt och avlivas sedan vid en lämplig tid efter behandling. Innan avlivningen sker, behandlas försöksdjuren med en substans som gör att celldelningen stannar upp i metafase (t.ex. colchicin eller Colcemid®). Kromosombereidningar görs sedan från könsceller och färgas in, varpå de celler som är i metafase analyseras med avseende på kromosomavvikelser.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 Förberedelser

1.4.1.1 Val av djurarter

Handjur av kinesiska hamstrar och möss används i stor utsträckning. Det är även möjligt att använda hanar från andra lämpliga däggdjursarter. Man bör välja de stammar av unga, friska vuxna djur som vanligen används på laboratorier. När undersökningen skall påbörjas är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten som möjligt och den bör inte överstiga $\pm 20\%$ av medelvikten.

1.4.1.2 Förhållanden vid förvaring och utfodring

De generella förhållanden som anges i den Allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60 %.

1.4.1.3 Förberedelse av djuren

Friska, unga vuxna djur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren skall ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar innan undersökningen börjar.

1.4.1.4 *Beredning av doser*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till djuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas, om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabel.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger att använda vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa (lösningsmedel/vehikel) kontroller bör inkluderas i varje test. Utom vid behandling med testsubstansen, bör försöksdjuren i kontrollgrupperna hanteras på ett sätt som är identiskt med sättet för försöksdjuren i de grupper som behandlas.

Positiva kontroller bör ge strukturella kromosomavvikelser *in vivo* i spermatogoniala celler när administrering sker vid exponeringsnivåer som förväntas ge en detekterbar ökning i förhållande till bakgrunden.

Positiva kontroldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos kodade utstryksglas för läsaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen och att provtagningen endast sker vid ett tillfälle. Dessutom kan användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier övervägas när sådana finns att tillgå. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsustanser.

Substans	CAS-nr.	EINECS-nr.
Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	
Cyklohexylamin	108-91-8	203-629-0
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Monomer akrylamid	79-06-1	201-173-7
Trietylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativa kontroller, behandlade med enbart ett lösningsmedel eller en vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle, om inte acceptabel variabilitet och frekvens för celler med kromosomavvikelse mellan försöksdjuren kan påvisas från historiska kontrolldata. Dessutom bör obehandlade kontroller även användas, om inte det finns historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 Antal försöksdjur

Varje behandlad grupp och kontrollgrupp måste inkludera minst 5 analyserbara hanar.

1.5.2 Behandlingsschema

Testsubstanser bör lämpligen administreras en eller två gånger (d.v.s. som en enskild behandling eller som två behandlingar). Testsubstanser kan även administreras i form av en delad dos, d.v.s. två behandlingar under samma dag med högst några timmars intervall, för att underlätta administrering av stora volymer. Andra doseringsscheman bör vara vetenskapligt motiverade.

I den högsta dosgruppen används två provtagningstider efter behandlingen. Eftersom cellcykelns kinetik kan påverkas av testsubstansen, används en tidig och en sen provtagningstid vid ungefär 24 och 48 timmar efter behandlingen. För andra doser än den högsta dosen bör en provtagningstid vid 24 timmar eller 1,5 cellcyklers längd efter behandlingen användas, om inte andra provtagningstider är kända för att vara lämpligare för detektion av effekter (6).

Dessutom kan andra provtagningstider användas. När det t.ex. gäller fall där kemikalier kan inducera kromosom-”lagging”, eller när de kan ge upphov till S-oberoende effekter, kan tidigare provtagningstider visa sig vara lämpligare (1).

Man måste i varje enskilt fall fastställa om det är lämpligt att använda ett upprepat behandlingsschema. Efter ett upprepat behandlingsschema bör försöksdjuren avlivas 24 timmar (1,5 gånger cellcykelns längd) efter den sista behandlingen. Ytterligare provtagningstider kan användas där så är lämpligt.

Innan avlivningen sker, injiceras försöksdjuren intraperitonealt med en lämplig dos av en substans som stoppar celledelningen i metafase (t.ex. Colcemid® eller colchicin). Provtagning på försöksdjur sker därefter med lämpliga intervall. För möss ligger detta intervall på ungefär 3 – 5 timmar och för kinesiska hamstrar ligger intervallet på ungefär 4 – 5 timmar.

1.5.3 Dosnivåer

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar och behandlingsschema som senare skall användas i huvudundersökningen (13). Vid toxicitet används tre dosnivåer för det första provtagningstillfället. Dessa dosnivåer bör täcka in ett intervall som sträcker sig från maximal till liten eller ingen toxicitet. Vid senare provtagningstillfällen räcker det med att endast den högsta dosen används. Den högsta dosen definieras som den dos som producerar tecken på toxicitet och så att högre dosnivåer baserade på samma doseringsschema skulle förväntas leda till att försöksdjuret dör.

Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag från kriterier som är dosbestämmande och bör utvärderas ifrån fall till fall. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i de spermatogoniala cellerna (t.ex. en reduktion i kvoten av spermatogoniala mitoser hos de första och andra meiotiska metafaser; denna reduktion bör inte överskrida 50 %).

1.5.4 "Limit-test"

En fullständig undersökning med tre dosnivåer kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå vid minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enskild behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte ger upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. En förväntad exponering av människor kan visa på behovet av att en högre dosnivå används i "limit-testen".

1.5.5 Administrering av doser

Testsubstansen administreras normalt genom sondmatning med hjälp av en magsond, en lämplig intuberingsskanyl eller genom en intraperitoneal injektion. Andra tillförselvägar för exponering kan vara acceptabla där de kan motiveras. Den maximala vätskevolymen som kan administreras med hjälp av sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överstiga 2 ml/100 g kroppsvikt. Användning av volymer som är större än dessa måste motiveras. Förutom för irriterande eller korrosiva substanser, som normalt kommer att visa på stegrade effekter med högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom att en justering av koncentrationen sker för att säkerställa att volymen är konstant vid alla dosnivåer.

1.5.6 Kromosomberedning

Omedelbart efter avlivning, tas cellsuspensioner ut från en eller båda testicklarna, exponeras för en hypoton lösning och fixeras. Cellerna stryks sedan ut på utstryksglas och färgas in.

1.5.7 Analys

För varje försöksdjur bör minst 100 väl spridda metafaser analyseras (d.v.s. ett minimum på 500 metafaser per grupp). Detta antal skulle kunna reduceras när ett stort antal avvikelser observeras. Alla utstryksglas, inklusive de från positiva och negativa kontroller, bör få en oberoende kodning innan den mikroskopiska analysen utförs. Eftersom fixeringsprocedurerna ofta resulterar i brott på en del av de celler som är i metafase, med förlust av kromosomer som följd, bör de celler som påvisas innehålla ett antal centromerer som motsvarar antalet $2n \pm 2$.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella data från försöksdjur bör presenteras i tabellform. Den experimentella enheten utgörs av försöksdjuret. För varje individuellt försöksdjur bör antalet celler med strukturella kromosomavvikelser och antalet kromosomavvikelser per cell utvärderas. Olika typer av strukturella kromosomavvikelser bör listas med antal och frekvenser för behandlade grupper och kontrollgrupper. Luckor i DNA-strängen registreras separat och rapporteras men inkluderas i allmänhet inte i den totala avvikelsefrekvensen.

Om såväl mitos som meios observeras, bör förhållandet mellan spermatogoniala mitoser och de första och andra meiotiska metafaser fastställas som ett mått på cytotoxicitet för alla behandlade och negativa kontrollförsöksdjur vid ett totalt prov på 100 celler som delar sig per djur för att etablera en möjlig cytotoxisk effekt. Om endast mitos kan observeras, bör mitosindexet bestämmas i minst 1 000 celler för varje försöksdjur.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning av det relativa antalet celler med kromosomavvikelser eller en tydlig ökning av antalet celler hos en grupp som fått en enstaka dos vid ett enstaka provtagningsfall. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärdering av testresultatet (8). Tvetydiga resultat bör klargöras genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, så kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Positiva resultat från *in vivo*-testet för spermatogonala kromosomavvikelser indikerar att testsubstansen inducerar strukturella kromosomavvikelser i könscellerna hos den art som testas. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar kromosomavvikelser i könscellerna på den art som testas.

Sannolikheten för att testsubstansen eller dess metaboliter når målvävnaden bör diskuteras.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel

- motivering av valet av vehikel
- testsubstansens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Försöksdjur:

- art/stam som används
- försöksdjurens antal och ålder
- ursprung, förhållanden vid förvaring, diet, etc.
- individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

Försöksbetingelser:

- data från en omfångsundersökning, om en sådan genomförts
- grund för valet av dosnivå
- grund för administrationsvägen
- uppgifter om beredningen av testsubstansen
- uppgifter om administreringen av testsubstansen
- grund för avlivningstiderna
- omvandling från koncentration av testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg kroppsvikt/dag), om detta är tillämpligt
- uppgifter om fodrets och vattnets kvalitet
- detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman
- metoder för mätningar av toxicitet
- identiteten hos substanser som stoppar cellcykeln i metafase, deras koncentration och behandlingens varaktighet
- metoder för preparation av utstryksglas
- kriterier för hur avvikelser påvisas
- antalet celler som analyserats per försöksdjur
- kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga

Resultat:

- tecken på toxicitet
- mitotiskt index
- förhållandet mellan spermatogoniala mitoceller och de första och andra meiotiska metafaser
- typ av och antal avvikelser, angivna separat för varje försöksdjur
- det totala antalet avvikelser per grupp
- antalet celler med avvikelser per grupp
- dos/respons-förhållande, där så är möjligt
- statistiska analyser, om några sådana förekommer
- samtidiga negativa kontrolldata
- historiska negativa kontrolldata med omfång, medelvärden och standardavvikelser
- samtidiga positiva kontrolldata
- förändringar i ploiditet, om sådana har observerats

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

REFERENSER

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. TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET

90-DAGARS UPPREPAT ORALTEST PÅ GNAGARE

1. METOD

Denna testmetod för subkronisk oral toxicitet motsvarar OECD TG 408 (1998).

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av en kemikalies toxiska egenskaper kan bestämningen av subkronisk oral toxicitet med användning av upprepade doser genomföras efter det att man har fått preliminär toxicitetsinformation från test avseende akut toxicitet eller från test med upprepade dosering (28 dagar). Från 90-dagarsstestet fås information om eventuella hälsoskador som kan uppstå till följd av upprepade exponering under en lång tidsperiod som täcker mognaden efter avvänjning och uppväxten ända in i vuxenstadiet. Genom testet fås information om de mest betydande toxiska verkningarna, indikation om vilka organ som påverkas och huruvida det finns en risk för ackumulering. Likaså kan man få en uppskattning om en exponeringsnivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras. Denna information kan användas för att välja dosnivåer för test avseende kronisk toxicitet och för att fastställa säkerhetskriterier gällande exponering på människor.

Metoden innebär starkare betoning av neurologiska slutpunkter (endpoints) och ger indikationer om immunologiska och reproduktionstoxiska verkningar. Likaså betonas behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt. Testets syfte är att möjliggöra identifiering av kemikalier som har potential att framkalla sådana neurotoxiska, immunologiska eller reproduktionstoxiska verkningar som kan motivera närmare undersökningar.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Dos: den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikt (g, mg), som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (t.ex. mg/kg) eller som en konstant utfodringskoncentration (ppm).

Dosering: ett allmänt begrepp som inbegriper dos, dess frekvens och varaktighet.

NOAEL: en förkortning av "No-observed-adverse-effect level" (nivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras). Avser den högsta dosnivån vid vilken inga skadliga behandlingsrelaterade verkningar kan observeras.

1.3 PRINCIP FÖR TEST METODEN

Testämnet tillförs oralt dagligen under 90 dagar i stegvis ökande doser till flera grupper försöksdjur, en dosnivå per grupp. Under denna period observeras djuren noggrant för att se upp de uppvisar några tecken som tyder på att testämnet är toxiskt. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras och vid testets slut avlivas de överlevande djuren och obduceras.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelse av djuren**

För testet används friska djur som har acklimatiserats till laboratoriemiljön under minst fem dagar och som inte har använts för tidigare test. Försöksdjuren bör karakteriseras enligt art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupper. Burarna placeras på sådant sätt att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Varje djur tilldelas ett unikt identifieringsnummer.

1.4.2 **Förberedelse av doserna**

Testämnet tillförs via sondmatning, foder eller dricksvatten. Den metod som väljs för oral tillförsel beror på testets syfte och testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper.

Vid behov kan testämnet lösas upp eller suspenderas i en lämplig vehikel. Om möjligt man bör i första hand överväga vattenlösning eller vattensuspension, sedan oljelösning eller oljeemulsion (t.ex. majsolja) och därefter eventuella övriga vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxiska egenskaperna vara kända. Testämnets stabilitet vid tillförselförhållandena bör fastställas.

1.4.3 **Testförhållanden**

1.4.3.1 *Försöksdjur*

Rekommenderat försöksdjur är råtta, även om testet kan utföras med andra gnagare (t.ex. mus). Djuren bör vara unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Doseringen bör inledas snarast möjligt efter avvänjningen och under alla förhållanden innan djuren är nio veckor gamla. Vid testets början bör variationen i vikt mellan de använda djuren vara minimal och får inte överstiga $\pm 20\%$ av vardera könets medelvikt. Om testet utförs som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste djur från samma stam och ursprung användas för båda testen.

1.4.3.2 *Antal och kön*

Minst 20 djur (tio honor och tio hanar) bör användas för varje dosnivå. Om avlivningar är inplanerade under testets gång bör antalet djur ökas med det antal djur som avlivas innan testet har slutförts. Beroende på tidigare kunskaper om kemikalien eller en nära besläktad kemikalie bör man överväga att ta med ytterligare en satellitgrupp på tio djur (fem per kön) för kontrollgruppen och toppdosgruppen. Efter behandlingsperioden observeras satellitgruppen med avseende på reversibla eller kvarstående toxiska verkningar. Längden för denna period fastställs med beaktande av de observerade verkningarna.

1.4.3.3 *Dosnivåer*

Minst tre dosgrupper och en parallell kontrollgrupp bör användas, utom om gränstest utförs (se 1.4.3.4). Dosisnivåerna kan basera sig på resultaten från test med upprepad dos eller från preliminära test för dosbestämning, och de bör fastställas med beaktande av alla toxikokinetiska data som finns tillgängliga för testämnet eller närbesläktade ämnen. Den högsta dosnivån väljs så att den framkallar toxiska verkningar utan att orsaka dödsfall eller svårt lidande, förutsatt att det inte finns begränsningar som beror på testämnets fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar. Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att en dosrelaterad respons kan påvisas, och samtidigt så att inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) kan observeras vid den lägsta dosnivån. Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna. Tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användning av mycket breda intervall mellan dosnivåerna (t.ex. en faktor som är större än cirka 6–10).

Kontrollgruppen är en obehandlad grupp, eller en vehikelkontrollgrupp om vehikel används för tillförsel av testämnet. Förutom att djuren i kontrollgruppen inte behandlas med testämnet bör de hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna. Om en vehikel används bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används. Om testämnet tillförs via fodret och man märker att foderintaget minskar, kan det vara till fördel med en parallellt utfodrad kontrollgrupp för att kunna avgöra huruvida minskningen beror på att testämnet påverkar fodrets smak eller på att det förekommer toxikologiska förändringar i testmodellen.

Följande egenskaper hos vehikeln och övriga eventuella tillsatser bör beaktas: verkningarna på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testämnet; verkningarna på testämnets kemiska egenskaper i den utsträckning dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på försöksdjurens foder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd.

1.4.3.4 *Gränstest (Limit-test)*

Om ett test med en dosnivå om minst 1000 mg per kg kroppsvikt och dag genomförs på det sätt som beskrivs här och inga toxiska verkningar kan observeras, och om toxicitet inte förväntas på grundval av uppgifter om strukturellt närbesläktade ämnen, kan ett fullständigt test med tre dosnivåer anses vara överflödigt. Gränstest tillämpas utom när exponering på människor indikerar att en högre dosnivå behövs.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Tillförsel av doser**

Djuren ges dagliga doser av testämnet under 90 dagar. Varje annat doseringsschema, t.ex. dosering fem dagar per vecka, måste motiveras. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör hela dosen tillföras på en gång via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen får inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt utom i fråga om vattenlösningar för vilka 2 ml per 100 g kroppsvikt får användas. Med undantag för irriterande eller frätande ämnen som normalt ger kraftigare verkan med högre koncentration bör variationer i testvolym minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym på alla dosnivåer.

För ämnen som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att försäkra sig om att testämnet ges i kvantiteter som inte stör det normala näringsupptaget eller den normala vattenbalansen. När testämnet tillförs via fodret kan man använda en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet måste anges. När ett ämne tillförs genom sondmatning bör dosen ges vid samma tid varje dag och vid behov justeras dosen så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Om ett 90-dagarstest används som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste samma foder användas i båda testen.

1.5.2 **Observationer**

Observationsperioden bör vara minst 90 dagar. Djur i en satellitgrupp avsedd för fortsatta observationer hålls obehandlade under en lämplig period så att man kan upptäcka kvarstående verkningar eller återhämtning från toxiska verkningar.

Generella kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tid(er) varje dag och med beaktande av perioden för när maximala verkningar förväntas efter dosering. Djurens hälsostatus bör registreras. Minst två gånger per dag, i regel i början och slutet av varje dag, undersöks alla djur i syfte att hitta döende eller döda djur.

Noggranna kliniska observationer görs minst en gång av alla djur före den första exponeringen (för att möjliggöra jämförelser på samma objekt) och därefter minst en gång i veckan. Dessa observationer bör göras utanför buren, helst på en "standardarena" och vid samma tid på dagen varje gång. Observationerna bör noteras noggrant, helst genom att poängsystem som testlaboratoriet har definierat exakt. Man bör eftersträva minimala variationer i observationsbetingelserna. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon och slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (tårflöde, upprest päls, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypt beteende (t.ex. överdrivet putsande, eller att djuren springer runt i cirklar) eller bisartt beteende (t.ex. självstypning, baklängesgång) bör också noteras (1).

Innan testämnet tillförs och efter avslutat test undersöks djuren oftalmologiskt med ett oftalmoskop eller motsvarande utrustning. Denna undersökning bör helst omfatta alla djur men åtminstone djuren i högdos- och kontrollgrupperna. Om ögonförändringar upptäcks bör alla djur undersökas.

Mot slutet av exponeringsperioden, och under alla förhållanden inte tidigare än vecka 11, görs en bedömning av den sensoriska reaktionen på stimuli (1) (t.ex. hörsel-, syn- och djupsensoriska stimuli) (2), (3), (4), samt bedömning av greppstyrka (5) och motorisk aktivitet (6). Närmare uppgifter om de förfaranden som kan följas finns i respektive hänvisning. Alternativt kan även andra förfaranden än de som nämns i hänvisningarna användas.

Mot slutet av testet kan funktionsobservationerna utelämnas om det finns uppgifter om motsvarande observationer tillgängliga från övriga test och man inte har kunnat konstatera några funktionsstörningar vid de dagliga kliniska observationerna.

I undantagsfall kan funktionsobservationerna också utelämnas för grupper vars djur i övrigt uppvisar tecken på toxicitet i en sådan utsträckning att det väsentligt skulle påverka funktionstestet.

1.5.2.1 *Kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion*

Alla djur bör vägas minst en gång i veckan. Foder- och vattenkonsumtion bör mätas minst en gång varje vecka. Om testämnet tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas minst en gång i veckan. Mätning av vattenkonsumtionen kan också övervägas för foder- eller sondmatningstest under vilka vattendrickandet kan förändras.

1.5.2.2 *Hematologi och klinisk biokemi*

Blodprov bör tas från ett angivet ställe och förvaras under lämpliga förhållanden. I slutet av testperioden tas blodprov strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet.

Följande hematologiska undersökningar bör göras då testperioden avslutas och varje gång eventuella blodprover tas under testperiodens gång: hematokrit, hemoglobinkoncentration, räkning av röda blodkroppar, total- och differentialräkning av vita blodkroppar, blodplättsräkning samt mätning av koaguleringsstid och koaguleringsförmåga.

Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka större toxiska effekter i vävnader, särskilt verkningar på lever och njurar, bör utföras på de blodprov som tas från alla djur strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet (med undantag för de djur som hittas döende eller avlivas under testets gång). På samma sätt som för hematologiska undersökningar kan blodprover för kliniska biokemiska undersökningar tas under testets gång. Det rekommenderas att djuren fastar natten före blodprovstagningen¹. Undersökningarna av plasma eller serum bör omfatta natrium, kalium, glukos, totalkolesterol, urinämne, urinämneskväve, kreatinin, totalprotein och albumin, minst två enzymer som indikerar verkningar på leverceller (t.ex. alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, alkaliskt fosfatas, gamma-glutamyltranspeptidas och sorbitoldehydrogenas). Mätningar av ytterligare enzymer (från lever eller av annat ursprung) och gallsyror kan under vissa förhållanden ge användbar information.

Eventuellt kan dessutom följande urinanalyser utföras under sista veckan av testet med uppsamling av urin på fasta tider: utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, protein, glukos och blod eller blodceller.

Dessutom bör undersökning av serummarkörer av allmänna vävnadsskador övervägas. Ytterligare bestämningar som bör utföras, i det fall att testämnets kända egenskaper kan eller misstänks påverka närbesläktade metaboliska profiler, omfattar kalcium, fosfor, fastevärden av triglycerider, specifika hormoner, metahemoglobin och kolinesteras. Dessa bestämningar behövs för kemikalier inom vissa klasser eller från fall till fall.

Överlag krävs en viss flexibilitet i fråga om tillvägagångssätt, beroende på djurart och på de observerade eller förväntade verkningarna av ett givet ämne.

Om historiska basdata är otillräckliga bör man överväga bestämning av hematologiska och kliniska biokemiska variabler innan doseringen påbörjas. I allmänhet rekommenderas inte att dessa uppgifter genereras före behandlingen (7).

¹ För vissa mätningar som görs på serum och plasma, särskilt i fråga om glukos, är fasta över natten att föredra. Den viktigaste orsaken till detta är att resultaten annars oundvikligen uppvisar större variationer, vilket tenderar att maskera svaga verkningar och göra det svårare att tolka resultaten. Å andra sidan kan fasta över natten leda till störningar i djurens allmänna metabolism och särskilt i fråga om exponeringstest störa den dagliga exponeringen för testämnet. Om fasta över natten tillämpas bör de kliniska biokemiska bestämningarna göras efter funktionsobservationerna.

1.5.2.3 *Obduktion*

Alla försöksdjur bör genomgå en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull yttre granskning av kroppen, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Lever, njurar, binjuror, testiklar, bitestiklar, livmoder, äggstockar, bräss, mjälte, hjärna och hjärta från alla djur (med undantag för de djur som hittas döende eller avlivas under testets gång) putsas från angränsande vävnad och deras våtvikt bestäms så snart möjligt efter dissekering för att undvika uttorkning.

Följande vävnader och organ bör bevaras i det mest lämpade mediet med hänsyn till typen av vävnad och planerade efterföljande histopatologiska undersökningar: alla organ och vävnader med stora skador, hjärnan (representativa regioner inbegripet storhjärna, lillhjärna och hjärnbrygga), ryggrad (på tre nivåer: cervikal, thorakal (mellersta) och lumbal), hypofys, sköldkörtel, bisköldkörtel, bräss, matstrupe, salivkörtlar, magsäck, tunntarm och tjocktarm (inklusive Peyers plack), lever, bukspottkörtel, njurar, binjuror, mjälte, hjärta, luftstrupe och lungor (konserverade genom inflation med fixermedel och därefter immersion), aorta, könskörtlar, livmoder, accessoriska könsorgan, honornas bröstkörtlar, prostata, urinblåsa, gallblåsa (mus), lymfkörtlar (helst en lymfkörtel som omfattar tillförselvägen och en annan långt från tillförselvägen för att täcka systematiska effekter), perifer nerv (ischias- eller tibialnerven), helst nära muskeln, ett snitt av ryggmärgen (alternativt färskt benmärgsaspirat), hud och ögon (om förändringar har observerats under oftalmologiska undersökningar). Kliniska eller övriga fynd kan indikera att ytterligare vävnader behöver undersökas. Dessutom bör man bevara alla organ som på grund av testämnets kända egenskaper förmodas vara målorgan.

1.5.2.4 *Histopatologi*

En fullständig histopatologisk undersökning bör utföras på bevarade organ och vävnader från alla djur i kontroll- och högdosgrupperna. Om behandlingsrelaterade förändringar observeras i högdosgruppen bör undersökningarna utsträckas till djuren i alla övriga dosgrupper.

Alla stora skador bör undersökas.

Om en satellitgrupp används bör histopatologisk undersökning utföras på de vävnader och organ på vilka verkningar har konstaterats i dosgrupperna.

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Uppgifter bör rapporteras individuellt. Därutöver bör alla uppgifter sammanställas i en tabell över antalet djur i varje testgrupp vid testets början, antalet djur som hittats döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl samt tidpunkten för avlivning, antalet djur som uppvisat tecken som tyder på att testämnet är toxiskt, en beskrivning av observerade tecken på toxicitet, inbegripet tidpunkten då sådana första gången upptäcktes, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antalet djur som har skador, typ av skada och procentandelen djur för varje typ av skada.

Om möjligt bör numeriska resultat utvärderas genom en tillämplig och allmänt godtagbar statistisk metod. De statistiska metoderna och data för vilka analys planeras bör väljas när testet utformas.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten skall innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 **Testämne:**

- Aggregationstillstånd, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper
- Identifieringsdata
- Vehikel (i förekommande fall). Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

2.2.2 **Försöksdjur:**

- Art och stam som använts
- Djurens antal, ålder och kön
- Ursprung, förvaringsförhållanden, foder osv
- Djurens individuella vikter vid testets början.

2.2.3 **Testförhållanden:**

- Motivering för val av dosnivåer
- Utförliga uppgifter om testämnets formulering och beredning av fodret, uppnådd koncentration, preparatets stabilitet och homogenitet
- Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts
- Faktiska doser (mg per kg kroppsvikt och dag) och omräkningsfaktor från testämneskoncentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos, om tillämpligt
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

2.2.4 **Resultat:**

- Kroppsvikt och förändringar av kroppsvikt
- Foderkonsumtion och i tillämpliga fall vattenkonsumtion
- Uppgifter om toxiska reaktioner per kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet
- Art, grad och varaktighet för kliniska observationer (oavsett om de är reversibla eller inte)
- Resultat av oftalmologisk undersökning
- Bedömning av sensorisk aktivitet, greppstyrka och motorisk aktivitet (i mån av tillgänglighet)
- Blodundersökningar med relevanta basvärden
- Kliniska biokemiska undersökningar med relevanta basvärden
- Kroppsvikt vid avlivning, organvikt och förhållandena mellan organ- och kroppsvikt
- Obduktionsfynd
- En detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd
- Absorptionsdata om de finns tillgängliga
- Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

3. **HÄNVISNINGAR**

- (1) IPCS (1986), "Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals", *Environmental Health Criteria*, dokument nr 60.
- (2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980), "Utility of the Neurologic Examination in Rats", *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, s. 999–1003.
- (3) Gad, S.C. (1982), "A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology", *J.Toxicol. Environ. Health*, 2, s. 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, s. 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. Toxicol.*, 1, s. 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, s. 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.*, 22, s. 198–201.

B.27. TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET

90-DAGARS UPPREPAT ORALTEST PÅ ICKE-GNAGARE

1. METOD

Denna testmetod för subkronisk oral toxicitet motsvarar OECD TG 409 (1998).

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av en kemikalies toxiska egenskaper kan bestämningen av subkronisk oral toxicitet med användning av upprepade doser genomföras efter det att man har fått preliminär toxicitetsinformation från test avseende akut toxicitet eller från test med upprepad dosering (28 dagar). Genom 90-dagarsstestet fås information om eventuella hälsoskador som kan uppstå till följd av upprepad exponering under en period av snabb tillväxt och in i ungt vuxenstadium. Genom testet fås information om de mest betydande toxiska verkningarna, indikation om vilka organ som påverkas och huruvida det finns en risk för ackumulering. Likaså kan man få en uppskattning om en exponeringsnivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras. Denna information kan användas för att välja dosnivåer för test avseende kronisk toxicitet och för att fastställa säkerhetskriterier gällande exponering på människor.

Testmetoden kan användas för identifiering av skadliga verkningar hos icke-gnagare som utsätts för exponering av en kemikalie och den bör endast användas i följande fall:

- Verkningar som har observerats i övriga test indikerar att det finns ett behov av förtydligande eller karakterisering med hjälp av en art som inte är gnagare.
- Tokikokinetiska test indikerar att en specifik art av icke-gnagare är det mest relevanta alternativet för valet av försöksdjur.
- Andra särskilda orsaker motiverar att en art som inte är gnagare används.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Dos: den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikt (g, mg), som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (t.ex. mg/kg) eller som en konstant utfodringskoncentration (ppm).

Dosering: ett allmänt begrepp som inbegriper dos, dess frekvens och varaktighet.

NOAEL: en förkortning av "no-observed-adverse-effect level" (nivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras). Avser den högsta dosnivån vid vilken inga skadliga behandlingsrelaterade verkningar kan observeras.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet tillförs oralt dagligen under 90 dagar i stegvis ökande doser till flera grupper försöksdjur, en dosnivå per grupp. Under denna period observeras djuren noggrant för att se upp de uppvisar några tecken som tyder på att testämnet är toxiskt. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras och vid testets slut avlivas de överlevande djuren och obduceras.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 Val av djurart

En ofta använd icke-gnagare är hund. Hunden bör vara av definierad ras, ofta används beagle. Även andra arter, t.ex. svin eller minigrisar, kan användas. Primater rekommenderas inte och användning av dem måste motiveras. Djuren bör vara unga och friska. När det gäller hund bör doseringen helst inledas vid 4–6 månaders ålder och aldrig senare än vid 9 månaders ålder. Om testet utförs som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste djur av samma art och ras användas för båda testen.

1.4.2 Förberedelse av djuren

För testet används unga och friska djur som har acklimatiserats till laboratoriemiljön och som inte har använts för tidigare test. Acklimatiseringsperiodens längd beror på djurarterna och deras ursprung. För hund eller för ändamålet uppfödda svin från en resident koloni rekommenderas minst fem dagar och för djur av externt ursprung rekommenderas minst två veckor. Försöksdjuren bör karakteriseras enligt art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupper. Burarna placeras på sådant sätt att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Varje djur tilldelas ett unikt identifieringsnummer.

1.4.3 Beredning av doserna

Testämnet kan tillföras via foder eller dricksvatten, genom sondmatning eller i kapslar. Den metod som väljs för oral tillförsel beror på testets syfte och testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper.

Vid behov kan testämnet lösas upp eller suspenderas i en lämplig vehikel. Om möjligt bör man i första hand överväga vattenlösning eller vattensuspension, sedan oljelösning eller oljeemulsion (t.ex. majsolja) och därefter eventuellt andra vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxiska egenskaperna vara kända. Testämnets stabilitet vid tillförselförhållandena bör fastställas.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 Djurens antal och kön

Minst åtta djur (fyra honor och fyra hanar) bör användas för varje dosnivå. Om avlivningar är inplanerade under testets gång bör antalet djur ökas med det antal djur som avlivas under testets gång. Antalet djur vid testets slut måste vara tillräckligt med tanke på en meningsfull utvärdering av de toxiska verkningarna. Beroende på tidigare kunskaper om ämnet eller en nära besläktad kemikalie bör man överväga att ta med ytterligare en satellitgrupp på åtta djur (fyra per kön) för kontrollgruppen och toppdosgruppen. Efter behandlingsperioden observeras satellitgruppen med avseende på reversibla eller kvarstående toxiska verkningar. Längden för denna period fastställs med beaktande av de observerade verkningarna.

1.5.2 **Dosering**

Minst tre dosgrupper och en parallell kontrollgrupp bör användas, utom om gränstest utförs (se 1.5.3). Dosnivåerna kan basera sig på resultaten från test med upprepad dos eller från preliminära test för dosbestämning och de fastställs med beaktande av alla toxikokinetiska data som finns tillgängliga för testämnet eller närbesläktade ämnen. Den högsta dosnivån väljs så att den framkallar toxiska verkningar utan att orsaka dödsfall eller svårt lidande, förutsatt att det inte finns begränsningar som beror på testämnets fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar. Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att en dosrelaterad reaktion kan påvisas, medan inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) bör uppstå vid den lägsta dosnivån. Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna. Tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användning av mycket breda intervall mellan dosnivåerna (t.ex. över en faktor på cirka 6–10).

Kontrollgruppen är en obehandlad grupp, eller en vehikelkontrollgrupp om vehikel används för tillförsel av testämnet. Förutom att djuren i kontrollgruppen inte behandlas med testämnet bör de hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna. Om en vehikel används bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används. Om testämnet tillförs via fodret och man märker att foderintaget minskar, kan det vara till fördel med en parallellt utfodrad kontrollgrupp för att kunna avgöra huruvida minskningen beror på att testämnet påverkar fodrets smak eller på att det förekommer toxikologiska förändringar i testmodellen.

Följande egenskaper hos vehikeln och övriga eventuella tillsatser bör beaktas: verkningarna på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testämnet; verkningarna på testämnets kemiska egenskaper i den utsträckning dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på försöksdjurens foder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd.

1.5.3 **Gränstest (Limit-test)**

Om ett test med en dosnivå om minst 1000 mg per kg kroppsvikt och dag genomförs på det sätt som beskrivs här och inga toxiska verkningar kan observeras, och om toxicitet inte förväntas på grundval av uppgifter om strukturellt närbesläktade ämnen, kan ett fullständigt test med tre dosnivåer anses vara överflödigt. Gränstest tillämpas utom när exponering på människor indikerar att en högre dosnivå behövs.

1.5.4 **Tillförsel av doser**

Djuren ges dagliga doser av testämnet under 90 dagar. Varje annat doseringsschema, t.ex. dosering fem dagar per vecka, måste motiveras. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör hela dosen tillföras på en gång via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på försöksdjurets storlek. I regel bör volymen hållas så låg som möjligt. Med undantag för irriterande eller frätande ämnen som normalt ger kraftigare verkan med högre koncentration bör variationer i testvolym minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym på alla dosnivåer.

För ämnen som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att försäkra sig om att testämnet ges i kvantiteter som inte stör det normala näringsupptaget eller den normala vattenbalansen. När testämnet tillförs via fodret kan man använda en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet måste anges. För ett ämne som tillförs genom sondmatning eller kapslar bör dosen ges vid samma tid varje dag och vid behov justeras så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Om ett 90-dagarstest används som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste samma foder användas i båda testen.

1.5.5 **Observationer**

Observationsperioden bör vara minst 90 dagar. Djur i en satellitgrupp avsedd för fortsatta observationer hålls obehandlade under en lämplig period så att man kan upptäcka kvarstående verkningar eller återhämtning från toxiska verkningar.

Generella kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tid(er) varje dag och med beaktande av perioden för när maximala verkningar förväntas efter dosering. Djurens hälsostatus bör registreras. Minst två gånger per dag, i regel i början och slutet av varje dag, undersöks alla djur i syfte att hitta döende eller döda djur.

Noggranna kliniska observationer görs minst en gång av alla djur före den första exponeringen (för att möjliggöra jämförelser på samma objekt) och därefter minst en gång i veckan. Dessa observationer bör göras, när det är genomförbart, utanför buren, helst på en "standardarena" och vid samma tidpunkt varje gång. Man bör eftersträva minimala variationer i observationsbetingelserna. Alla tecken på toxicitet bör registreras i detalj, inklusive tidpunkt för första upptäckt, svårighetsgrad och varaktighet. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon och slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (tårflöde, upprest päls, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotyp beteende (t.ex. överdrivet putsande, eller att djuren springer runt i cirklar) eller eventuellt bisart beteende (t.ex. självtympling, baklängesgång) bör också noteras.

Innan testämnet tillförs och efter avslutat test undersöks djuren oftalmologiskt med ett oftalmoskop eller motsvarande utrustning. Denna undersökning bör helst omfatta alla djur men åtminstone djuren i högdos- och kontrollgrupperna. Om behandlingsrelaterade ögonförändringar upptäcks bör alla djur undersökas.

1.5.5.1 *Kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion*

Alla djur bör vägas minst en gång i veckan. Foder- och vattenkonsumtion bör mätas minst en gång varje vecka. Om testämnet tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas minst en gång i veckan. Mätning av vattenkonsumtionen kan också övervägas för test med tillförsel via foder eller sond under vilka vattendrickandet kan förändras.

1.5.5.2 *Hematologi och klinisk biokemi*

Blodprov bör tas från ett angivet ställe och förvaras under lämpliga förhållanden. I slutet av testperioden tas blodprov strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet.

Blodprov, omfattande hematokrit, hemoglobinkoncentration, räkning av röda blodkroppar, total- och differentialräkning av vita blodkroppar, blodplättsräkning samt mätning av koagulerings- och protrombintid eller tromboplastintid tas vid testets början och därefter varje månad eller när halva testperioden gått, och när testet avslutas.

Kliniska biokemiska bestämningar för undersökning av betydande toxiska verkningar i vävnader, särskilt verkningar på njurar och lever, görs på blodprov som tagits från alla djur när testets inleds, varje månad eller när halva testperioden har gått, och när testet avslutas. Undersökning kan även övervägas i fråga om elektrolytbalans, kolhydratmetabolism samt lever- och njurfunktion. De specifika undersökningar som väljs beror på observationerna av hur testämnet agerar. Innan blodprov tas bör djuren fasta under en för arten lämplig period. Till de bestämningar som föreslås hör mätningar av kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, faste-glukos, alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, ornitindekarboxylas, gammaglutamyltranspeptidas, urinämneskväve, albumin, blodkreatinin, totalbilirubin och totalserumprotein.

Urinalyser bör göras minst när testet inleds, när halva testperioden gått och när testet avslutas, med uppsamling av urin på fasta tider. Urinalyserna omfattar utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, protein, glukos och blod eller blodceller. Ytterligare parametrar kan vid behov användas för att utvidga undersökningen av observerade verkningar.

Dessutom bör undersökning av markörer för allmänna vävnadsskador övervägas. För en tillräcklig toxikologisk bedömning kan även behövas analys av lipider, hormoner, syra-basbalans, metahemoglobin och kolinesterasinhinhibition. Ytterligare klinisk biokemi kan vid behov användas för att utvidga undersökningen av observerade verkningar. Dessa bestämningar behövs för kemikalier inom vissa klasser eller från fall till fall.

Överlag krävs en viss flexibilitet i fråga om tillvägagångssätt, beroende på djurart och på de observerade eller förväntade verkningarna av ett givet ämne.

1.5.5.3 *Obduktion*

Alla försöksdjur bör genomgå en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull yttre granskning av kroppen, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Lever med gallblåsa, njurar, binjurar, testiklar, bitestiklar, äggstockar, livmoder, sköldkörtel (med bisköldkörtlar), bräss, mjälte, hjärna och hjärta från alla djur (med undantag för de djur som hittas döende eller avlivas under testets gång) putsas från angränsande vävnad och deras våtvikt bestäms så snart möjligt efter dissekering för att undvika uttorkning.

Följande vävnader och organ bör bevaras i det mest lämpade mediet med hänsyn till typen av vävnad och planerade efterföljande histopatologiska undersökningar: alla organ och vävnader med stora skador, hjärnan (representativa regioner inbegripet storhjärna, lillhjärna och hjärnbrygga), ryggrad (på tre nivåer: cervikal, thorakal (mellersta) och lumbal), hypofys, ögon, sköldkörtel, bisköldkörtel, bräss, matstrupe, salivkörtlar, magsäck, tunntarm och tjocktarm (inklusive Peyers plack), lever, gallblåsa, bukspottkörtel, njurar, binjurar, mjälte, hjärta, luftstrupe och lungor, aorta, könskörtlar, livmoder, accessoriska könsorgan, honornas bröstkörtlar, prostata, urinblåsa, lymfkörtlar (helst en lymfkörtel som omfattar tillförselvägen och en annan långt från tillförselvägen för att täcka systematiska effekter), perifer nerv (ischias- eller tibialnerven), helst nära muskeln, ett snitt av ryggmärgen (alternativt färskt benmärgsaspirat) och hud. Kliniska eller övriga fynd kan indikera att ytterligare vävnader behöver undersökas. Dessutom bör man bevara alla organ som på grund av testämnets kända egenskaper förmodas vara målorgan.

1.5.5.4 *Histopatologi*

En fullständig histopatologisk undersökning bör utföras på bevarade organ och vävnader från åtminstone alla djur i kontroll- och högdosgruppen. Undersökningarna bör utsträckas till djur i alla andra dosgrupper om behandlingsrelaterade förändringar observeras i högdosgruppen.

Alla stora skador bör undersökas.

Om en satellitgrupp används bör histopatologisk undersökning utföras på de vävnader och organ på vilka verkningar har konstaterats i dosgrupperna.

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Uppgifter bör rapporteras individuellt. Därutöver bör alla uppgifter sammanställas i en tabell över antalet djur i varje testgrupp vid testets början, antalet djur som hittats döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl samt tidpunkten för avlivning, antalet djur som uppvisat tecken som tyder på att testämnet är toxiskt, en beskrivning av observerade tecken på toxicitet, inbegripet tidpunkten då sådana första gången upptäcktes, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antalet djur som har skador, typ av skada och procentandelen djur för varje typ av skada.

Om möjligt bör numeriska resultat utvärderas genom en tillämplig och allmänt godtagbar statistisk metod. De statistiska metoderna och data för vilka analys planeras bör väljas när testet utformas.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten skall innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 **Testämne:**

- Aggregationstillstånd, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Identifieringsdata.
- Vehikel (i förekommande fall). Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

2.2.2 **Försöksdjur:**

- Art och stam som använts.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Ursprung, förvaringsförhållanden, foder osv.
- Djurens individuella vikter vid testets början.

2.2.3 **Testförhållanden:**

- Motivering för val av dosnivåer.
- Utförliga uppgifter om testämnets formulering och beredning av fodret, uppnådd koncentration, preparatets stabilitet och homogenitet.
- Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts.
- Faktiska doser (mg per kg kroppsvikt och dag) och omräkningsfaktor från testämneskonzentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos, om tillämpligt.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat:

- Kroppsvikt och förändringar av kroppsvikt.
- Foderkonsumtion och i tillämpliga fall vattenkonsumtion.
- Uppgifter om toxiska reaktioner per kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.
- Art, grad och varaktighet för kliniska observationer (oavsett om de är reversibla eller inte).
- Oftalmologisk undersökning.
- Blodundersökningar med relevanta basvärden.
- Kliniska biokemiska undersökningar med relevanta basvärden.
- Kroppsvikt vid avlivning, organvikt och förhållandena mellan organ- och kroppsvikt.
- Obduktionsfynd.
- En detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.
- Absorptionsdata om de finns tillgängliga.
- Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

B.37 FÖRDRÖJD NEUROTOXICITET ORSAKAD AV ORGANISKA FOSFORFÖRENINGAR TILL FÖLJD AV AKUT EXPONERING

1. METOD

1.1 Inledning

Vid bedömning och utvärdering av ämnens toxiska effekter är det viktigt att beakta potentialen hos substanser i vissa ämnesgrupper att framkalla specifika typer av neurotoxicitet som kanske inte upptäcks vid andra toxicitetsundersökningar. Det har observerats att vissa organiska fosforföreningar framkallar fördröjd neurotoxicitet och dessa skall beaktas för eventuell utvärdering.

Screening-tester in vitro får tillämpas för att identifiera de ämnen som kan framkalla fördröjd polyneuropati; negativa resultat från in vitro-undersökningar bevisar dock inte att testsubstansen inte skulle vara neurotoxisk.

Se Allmän inledning, del B.

1.2 Definitioner

Organiska fosforföreningar omfattar icke joniserande organiska fosforestrar, tioestrar eller anhydrider av organofosfor-, organofosforo- eller organofosforamidssyror eller av besläktade fosfonthio-, fosforthio- eller fosforthoamidssyror eller andra ämnen som kan framkalla sådan fördröjd neurotoxicitet som ibland observeras i denna ämnesgrupp.

Fördröjd neurotoxicitet är ett syndrom som förknippas med förlängd fördröjd debut för ataxi, distala axonopatier i ryggmärgen och perifera nerver samt hämmande och åldrande av neurotoxiskt esteras (NTE) i nervvävnad.

1.3 Referensämnen

Ett referensämne skall testas i en positiv kontrollgrupp för att påvisa att den testade artens respons inte ändras väsentligt under försöksförhållandena i laboratoriet.

Ett exempel på en mycket använd neurotoxisk substans är tri-o-tolylfosfat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-namn: fosforsyra, tris(2-metyl-fenyl)ester), även kallad tris-o-kresylfosfat.

1.4 Princip för testmetoden

Testsubstansen tillförs oralt i en enda dos till tamhöns som i tillämpliga fall skyddats från akuta kolinerga effekter. Djuren observeras under 21 dagar i fråga om beteendestörningar, ataxi och förlamning. Biokemiska mätningar, särskilt inhibition av neurotoxiskt esteras (NTE) utförs på höns som väljs slumpvis ur varje grupp, normalt 24-48 timmar efter doseringen. 21 dagar efter exponeringen avlivs resterande höns och en histopatologisk undersökning av valda nervvävnader genomförs.

1.5 Beskrivning av testmetoden

1.5.1 Förberedelse

Friska unga vuxna höns som inte får medicin och som inte har virussjukdomar eller gångdefekter skall väljas slumpmässigt till behandlings- respektive kontrollgrupper och aklimatiseras till laboratorieförhållandena under minst fem dagar före undersökningens skalljan.

Burar eller inhängnader som är stora nog att ge hönsen fri rörlighet och som underlättar observation av hönsens gång skall användas.

Dosering av testsubstansen skall normalt ske oralt genom sondmatning, gelatinkapslar eller motsvarande metod. Vätska kan ges utspädd eller löst i en lämplig vehikel som majsolja; fasta ämnen skall om möjligt lösas eftersom stora doser fasta ämnen i gelatinkapslar kanske inte kan absorberas effektivt. I fråga om icke-flytande vehiklar skall vehikelns toxiska egenskaper vara kända; i annat fall skall de bestämmas före försöket.

1.5.2 Försöksförhållanden

1.5.2.1 Försöksdjur

Unga vuxna värphöns (Gallus gallus domesticus) i åldern 8-12 månader rekommenderas. Standardstora arter och stammar skall användas och hönsen skall normalt ha fötts upp under sådana förhållanden att de kunnat röra sig fritt.

1.5.2.2 Antal och kön

Utöver behandlingsgruppen skall både en vehikelkontrollgrupp och en positiv kontrollgrupp användas. Vehikelkontrollgruppen skall behandlas på samma sätt som behandlingsgruppen med undantag för att tillförsel av testsubstansen utesluts. Tillräckligt många höns skall användas i varje grupp för att minst sex fåglar skall kunna avlivas för biokemisk bestämning (tre stycken vid vardera av två tidpunkter) och sex överleva observationsperioden på 21 dagar för patologisk undersökning. Den positiva kontrollgruppen kan hållas parallellt eller vara en aktuell historisk kontrollgrupp. Den skall omfatta minst sex höns som behandlats med ett välkänt neurotoxiskt ämne som ger fördröjd polyneuropati, tre för biokemisk och tre för patologisk undersökning. Regelbunden uppdatering av historiska data rekommenderas. Nya positiva kontrolldata skall tas fram om någon viktig komponent (t.ex. stam, foder, förvaringsutrymmen) har ändrats av det berörda laboratoriet efter det att det tidigare försöket genomfördes.

1.5.2.3 Dosnivåer

En preliminär undersökning med ett lämpligt antal höns och dosnivågrupper skall utföras för att fastställa vilken nivå som skall användas i huvudundersökningen. En viss dödlighet i den preliminära undersökningen är nödvändig för att fastställa en tillräcklig dos för huvudundersökningen. För att förhindra dödsfall beroende på akuta kolinerga effekter får atropin eller något annat skyddsämne, om vilket det är känt att det inte påverkar fördröjda neurotoxiska responser, användas. En variation av testmetoder får användas för att beräkna den maximala icke-dödliga dosen av testsubstans (se metod B.1a). Historiska data om hönsen eller annan toxikologisk information kan också vara till hjälp vid valet av dos.

Testsubstansens dosnivå i huvudundersökningen skall vara den högsta möjliga med beaktande av resultaten från den preliminära undersökningen för dosval och den övre dosgränsen på 2 000 mg/kg kroppsvikt. Eventuella dödsfall skall inte vara fler än att tillräckligt många djur överlever för biokemi (sex stycken) och histologi (sex stycken) efter 21 dagar. Atropin eller andra skyddsämnen, om vilka det är känt att de inte påverkar fördröjda neurotoxiska responser, skall användas för att förhindra dödsfall till följd av akuta kolinerga effekter.

1.5.2.4 "Limit-test"

Om ett test vid en dosnivå på minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och dag, med användning av de förfaranden som beskrivs för denna metod, inte framkallar några observerbara toxiska effekter och om toxicitet inte är att förvänta på grundval av data från strukturellt besläktade ämnen, kan en undersökning med användning av en högre dos anses överflödig. "Limit-test" är tillämpligt, med undantag för om exponering på människor påvisar ett behov av att använda en högre dosnivå.

1.5.2.5 Observationsperiod

Observationsperioden skall vara 21 dagar.

1.5.3 Förfarande

Efter tillförsel av ett skyddsämne för att förhindra dödsfall till följd av akuta kolinerga effekter tillförs testsubstansen som engångsdos.

1.5.3.1 Allmänna observationer

Observationerna skall påskalljas direkt efter exponeringen. Samtliga höns skall

observeras noggrant flera gånger under de första två dagarna och därefter minst en gång dagligen under en period på 21 dagar eller fram till planerad avlivning. Alla tecken på toxicitet skall noteras, inbegripet tid för beteendestörningarnas debut, deras typ, allvar och duration. Ataxi skall mätas enligt en ordningsskala på minst fyra nivåer, och förlamning skall noteras. Minst två gånger per vecka skall de höns som valts ut för patologiska undersökningar tas ut från burarna och underkastas en period av påtvingad motorisk aktivitet, t.ex. klättring på stege, för att underlätta observation av minimala toxiska effekter. Döende djur och djur som lider av svår smärta skall tas bort när detta upptäcks, avlivas skonsamt och obduceras.

1.5.3.2 Kroppsvikt

Samtliga höns skall vägas just före tillförseln av testsubstansen och därefter minst en gång i veckan.

1.5.3.3 Biokemi

Sex höns väljs slumpvis från var och en av behandlings- respektive vehikelkontrollgrupperna och tre höns från den positiva kontrollgruppen (om denna grupp hålls parallellt.) Hönsen skall avlivas några dagar efter dosering, och hjärnan och lumbala delar av ryggmärgen prepareras och testas i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Därutöver kan det också vara lämpligt att preparera och testa ischiasnervvävnad i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Normalt skall tre fåglar från kontrollgruppen och varje behandlingsgrupp avlivas efter 24 timmar och tre efter 48 timmar, medan de tre hönsen från de positiva kontrollgrupperna skall avlivas efter 24 timmar. Om eventuella kliniska tecken på förgiftning (detta kan ofta bedömas genom observation vid debuten på kolinerga svar) indikerar att det toxiska ämnet kan tas upp mycket långsamt är det bättre att ta vävnadsprov från tre fåglar vid vardera av två tidpunkter mellan 24 och så sent som 72 timmar efter dosering. Om det bedöms lämpligt kan även analyser av acetylkolinesteras (AChE) utföras på dessa prover. Spontan reaktivering av AChE kan dock uppträda in vivo och därmed leda till en underskattning av ämnets potential som AChE-hämmare.

1.5.3.4 Obduktion

Obduktion av samtliga djur (avlivade enligt planen och döende djur som avlivats) skall omfatta observation av hjärnans och ryggmärgens utseende.

1.5.3.5 Histopatologisk undersökning

Nervvävnad från djur som överlevt observationsperioden och som inte används för biokemiska undersökningar skall underkastas mikroskopisk undersökning.

Vävnaderna skall fixeras in situ med användning av perfusionsteknik. Snitten skall omfatta lillhjärnan (longitudiellt, medialt), förlängda märgen, ryggmärgen och perifera nerver. Rygggradssnitten skall tas från halsområdet, mitten av brösthålan och det lumbosakrala området. Snitt från tibialnervens distala region och dess förgreningar till musculus gastrocnemius och ischiasnerven skall tas. Snitten skall färgas med lämplig myelin- och axonspecifik färg.

2. DATA

Negativa resultat i fråga om de sluteffekter som valts för denna metod (biokemi, histopatologi och beteendeobservationer) skulle normalt inte kräva ytterligare tester av fördröjd neurotoxicitet. Tvetydiga eller oklara resultat i fråga om dessa sluteffekter kan komma att kräva ytterligare utvärdering.

Individuella data skall anges. Därutöver skall alla data sammanfattas i tabellform som för varje testgrupp visar antalet djur vid försökets skalljan, antalet djur som uppvisar skador, beteendeffekter eller biokemiska effekter, typen och allvaret av dessa skador eller effekter och procentandelen djur som uppvisar respektive typ och grad av skada eller effekt.

Resultaten av denna undersökningen skall utvärderas i fråga om fördelning, allvar och korrelation mellan beteendeeffekter, biokemiska och histopatologiska effekter och eventuellt andra observerade effekter i behandlings- och kontrollgrupperna. Numeriska resultat skall utvärderas genom lämpliga och allmänt erkända statistiska metoder. De statistiska metoder som används skall väljas vid utformandet av undersökningen.

3. RAPPORTERING

Försöksrapport

Försöksrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

Försöksdjur:

- Använd stam.
- Antal djur och deras ålder.
- Källa, förvaringsförhållanden etc.
- Djurens individuella vikt vid försökets skalljan.

Försöksförhållanden:

- Uppgifter om testsubstansen, stabilitet och homogenitet i tillämpliga fall.
- Motivering av val av vehikel.
- Uppgifter om tillförseln av testsubstansen.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.
- Grund för val av dos.
- Specifikation av tillförda doser, inbegripet uppgifter om vehikel, volym och det tillförda materialets fysiska form.
- Benämning på och uppgifter om tillförsel av eventuellt skyddsämne.

Resultat:

- Uppgifter om kroppsvikt.
- Uppgifter om toxisk respons per grupp, inbegripet dödsfall.
- De kliniska observationernas art, allvar och duration (reversibilitet skall anges).
- En detaljerad redogörelse för biokemiska metoder och resultat.
- Obduktionsresultat.
- En detaljerad redogörelse för alla histopatologiska resultat.
- Statistisk bearbetning av resultat i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. REFERENSER

Denna metod motsvarar OECD TG 418.

B.38 FÖRDRÖJD NEUROTOXICITET ORSAKAD AV ORGANISKA FOSFORFÖRENINGAR

28 DAGARS UPPREPAD DOSUNDERSÖKNING

1. METOD

1.1 Inledning

Vid bedömning och utvärdering av ämnens toxiska effekter är det viktigt att beakta potentialen hos substanser inom vissa ämnesgrupper att framkalla vissa typer av neurotoxicitet som kanske inte upptäcks vid andra toxicitetsundersökningar. Det har observerats att vissa organiska fosforföreningar framkallar fördröjd neurotoxicitet och dessa skall beaktas för eventuell utvärdering.

Screening-tester in vitro får tillämpas för att identifiera de ämnen som kan framkalla fördröjd polyneuropati; negativa resultat från in vitro-undersökningar bevisar dock inte att testsubstansen inte skulle vara neurotoxisk.

Denna 28 dagars undersökning av fördröjd neurotoxicitet ger information om de tänkbara hälsorisker som troligen uppstår till följd av upprepad exponering under en begränsad tidsperiod. Den ger information om dosrespons och kan ge en beräkning av en NOAEL-nivå som kan vara användbar för att fastställa säkerhetsföreskrifter om exponering.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 Definitioner

Organiska fosforföreningar omfattar icke joniserande organiska fosforestrar, tioestrar eller anhydrider av organofosfor-, organofosforo- eller organofosforamidsyror eller av besläktade fosfonthio-, fosforthio- eller fosforthioamidsyror eller andra ämnen som kan framkalla sådan fördröjd neurotoxicitet som ibland observeras i denna ämnesgrupp.

Fördröjd neurotoxicitet är ett syndrom som förknippas med förlängd fördröjd debut för ataxi, distala axonopatier i ryggmärgen och perifera nerver samt hämmande och åldrande av neurotoxiskt esteras (NTE) i nervvävnad.

1.3 Princip för testmetoden

Testsubstansen tillförs dagligen oralt till tamhöns under 28 dagar. Djuren observeras minst en gång dagligen i fråga om beteendestörningar, ataxi och förlamning till dess det gått 14 dagar efter den sista dosen. Biokemiska mätningar, särskilt inhibition av neurotoxiskt esteras (NTE) utförs på höns som väljs slumpvis ur varje grupp, normalt 24-48 timmar efter doseringen. Två veckor efter den sista dosen avlivas resterande höns och en histopatologisk undersökning av valda neuralvävnader genomförs.

1.4 Beskrivning av testmetoden

1.4.1 Förberedelser

Friska unga vuxna höns som inte får medicin och som inte har virussjukdomar eller gångdefekter skall väljas slumpmässigt till behandlings- respektive kontrollgrupper och aklimatiseras till laboratorieförhållandena under minst fem dagar före undersökningens skalljan.

Burar eller inhägnader som är stora nog att ge hönsen fri rörlighet och som underlättar observation av hönsens gång skall användas.

Oral dosering skall ske dagligen sju dagar i veckan, helst genom sondmatning eller tillförsel av gelatinkapslar. Vätska kan ges utspädd eller löst i en lämplig vehikel som majsolja; fasta ämnen skall om möjligt lösas eftersom stora doser fasta ämnen i gelatinkapslar kanske inte kan absorberas effektivt. I fråga om icke-flytande vehiklar skall vehikelns toxiska egenskaper vara kända; i annat fall skall de bestämmas före försöket.

1.4.2 Försöksförhållanden

1.4.2.1 Försöksdjur

Unga vuxna värphöns (*Gallus gallus domesticus*) i åldern 8-12 månader rekommenderas. Standardstora arter och stammar skall användas och hönsen skall normalt ha fötts upp under sådana förhållanden att de kunnat röra sig fritt.

1.4.2.2 Antal och kön

Vanligen bör minst tre behandlingsgrupper och en vehikelkontrollgrupp användas. Vehikelkontrollgruppen skall behandlas på samma sätt som behandlingsgruppen med undantag för att tillförsel av testsubstansen utesluts.

Tillräckligt många höns skall användas i varje grupp för att minst sex fåglar skall kunna avlivas för biokemisk bestämning (tre stycken vid vardera två tidpunkter) och sex överleva en 14 dagar lång observationsperiod efter behandlingen för patologisk undersökning.

1.4.2.3 Dosnivåer

Dosnivåerna skall väljas med beaktande av resultaten från ett akut test av fördröjd neurotoxicitet eller andra befintliga toxicitets- eller kinetiska data som finns tillgängliga i fråga om testsubstansen. Den högsta dosnivån skall väljas i syfte att inducera toxiska effekter, helst fördröjd toxicitet, men inte dödsfall eller svårt lidande. Därefter skall dosnivåer fastställas i en fallande skala i syfte att påvisa eventuella dos-responssamband och NOAEL vid den lägsta dosnivån.

1.4.2.4 "Limit-test"

Om ett test vid en dosnivå på minst 1000 mg/kg kroppsvikt och dag, med användning av de förfaranden som beskrivs för denna undersökning, inte framkallar några observerbara toxiska effekter och om toxicitet inte är att förvänta på grundval av data om strukturellt besläktade ämnen kan en undersökning med en högre dos anses överflödig. "Limit-test" är tillämpligt, med undantag för om exponering på människor indikerar att det finns behov av att använda en högre dosnivå.

1.4.2.5 Observationsperiod

Samtliga djur skall observeras minst en gång dagligen under exponeringsperioden och därefter under 14 dagar, med undantag för planerad dissektion.

1.4.3 Förfarande

Djuren doseras med testsubstansen sju dagar i veckan under en period på 28 dagar.

1.4.3.1 Allmänna observationer

Observationerna skall påskalljas direkt efter exponeringen. Samtliga höns skall observeras minst en gång dagligen under de 28 behandlingsdagarna och under minst 14 dagar efter dosering eller fram till planerad avlivning. Alla tecken på toxicitet skall noteras, inbegripet tid för beteendestörningarnas debut, deras typ, allvar och duration. Observationerna skall omfatta, men inte begränsas till, beteendeavvikelser. Ataxi skall mätas enligt en ordningsskala på minst fyra nivåer, och förlamning skall noteras. Minst två gånger per vecka skall hönsen tas ut från burarna och underkastas en period av påtvingad motorisk aktivitet, t.ex. klättring på stege, för att underlätta observation av minimala toxiska effekter. Döende djur och djur som lider av svår smärta skall tas bort när detta upptäcks, avlivas skonsamt och obduceras.

1.4.3.2 Kroppsvikt

Samtliga höns skall vägas just före tillförseln av testsubstansen och därefter minst en gång i veckan.

1.4.3.3 Biokemi

Sex höns väljs slumpvis från var och en av behandlings- respektive vehikelkontrollgrupperna och avlivas några dagar efter doseringen, och hjärnan och lumbala delar av ryggmärgen prepareras och testas i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Därutöver kan det också vara lämpligt att preparera och testa ischiasnervvävnad i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Normalt skall tre fåglar från kontrollgruppen och var och en av behandlingsgrupperna avlivas efter 24 timmar och tre 48 timmar efter den sista doseringen. Om data från den akuta undersökningen eller andra undersökningar (t.ex. toxikokinetik) indikerar att andra tidpunkter för avlivning är att föredra efter slutdosering så skall dessa tidpunkter tillämpas och grunden för detta dokumenteras. Om det bedöms lämpligt kan även analyser av acetylkolinesteras (AChE) utföras på dessa prover. Spontan reaktivering av AChE kan dock uppträda in vivo och därmed leda till en underskattning av ämnets potential som AChE-hämmare.

1.4.3.4 Obduktion

Obduktion av samtliga djur (avlivade enligt planen och döende djur som avlivats) skall omfatta observation av hjärnans och ryggmärgens utseende.

1.4.3.5 Histopatologisk undersökning

Nervvävnad från djur som överlevt observationsperioden och som inte används för biokemiska undersökningar skall underkastas mikroskopisk undersökning. Vävnaderna skall fixeras in situ med användning av perfusionsteknik. Snitten skall omfatta lillhjärnan (longitudiellt, medalt), förlängda märgen, ryggmärgen och perifera nerver. Ryggradssnitten skall tas från halsområdet, mitten av brösthålan och det lumbosakrala området. Snitt från tibialnervens distala region och dess förgreningar till musculus gastrocnemius och ischiasnerven skall tas. Snitten skall färgas med lämplig myelin- och axonspecifik färg. Inledningsvis skall mikroskopundersökning utföras på de bevarade vävnaderna av samtliga djur i kontroll- respektive högdosgruppen. Om det finns bevis på effekter i högdosgruppen skall mikroskopundersökning även utföras på hönsen från mellan- och lågdosgrupperna.

2. DATA

Negativa resultat i fråga om de sluteffekter som valts för denna metod (biokemi, histopatologi och beteendeobservationer) skulle normalt inte kräva ytterligare tester av fördröjd neurotoxicitet. Tvetydiga eller oklara resultat i fråga om dessa sluteffekter kan komma att kräva ytterligare utvärdering.

Individuella data skall anges. Därutöver skall alla data sammanfattas i tabellform som för varje testgrupp visar antalet djur vid försökets skalljan, antalet djur som uppvisar skador, beteendeffekter eller biokemiska effekter, typen och allvaret av dessa skador eller effekter och procentandelen djur som uppvisar respektive typ och grad av allvar av skada eller effekt. Resultaten av denna undersökning skall utvärderas i fråga om fördelning, allvar och korrelation mellan beteendeffekter, biokemiska och histopatologiska effekter och eventuellt andra observerade effekter i behandlings- och kontrollgrupperna.

Numeriska resultat skall utvärderas genom lämpliga och allmänt erkända statistiska metoder. De statistiska metoder som används skall väljas vid utformandet av undersökningen.

3. RAPPORTERING

Försöksrapport

Försöksrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

Försöksdjur:

- Använd stam.
- Antal djur och deras ålder.
- Källa, förvaringsförhållanden etc.
- Djurens individuella vikt vid försökets skalljan.

Försöksförhållanden:

- Uppgifter om testsubstansen, stabilitet och homogenitet i tillämpliga fall.
- Motivering för val av vehikel.
- Uppgifter om tillförseln av testsubstansen.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.
- Grund för val av dos.
- Specifikation av tillförda doser, inbegripet uppgifter om vehikel, volym och det tillförda materialets fysiska form.
- Grund för att välja andra tidpunkter för biokemisk bestämning om de inte motsvarar 24 respektive 48 timmar.

Resultat:

- Uppgifter om kroppsvikt.
- Uppgifter om toxisk respons per grupp, inbegripet dödsfall.
- Nivå för no-observed adverse effect.
- De kliniska observationernas art, allvar och duration (reversibilitet skall anges).
- En detaljerad redogörelse för biokemiska metoder och resultat.

- Obduktionsresultat.
- En detaljerad redogörelse för alla histopatologiska resultat.
- Statistisk bearbetning av resultat i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. REFERENSER

Denna metod motsvarar OECD TG 419

B.39. TEST AV REPARATIONSSYNTES (UDS)

HOS LEVERCELLER FRÅN DÄGGDJUR *IN VIVO*

1. METOD

Denna metod är en kopia av testet OECD TG 486, Test av reparationssyntes (UDS) hos leverceller från däggdjur *in vivo* (Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997)).

1.1 INLEDNING

Ändamålet med testet av reparationssyntes (UDS) hos leverceller från däggdjur *in vivo* är att identifiera testsubstanser som inducerar DNA-reparation i leverceller från behandlade försöksdjur (se 1,2,3,4).

Detta *in vivo*-test erbjuder en metod för undersökning av genotoxiska effekter av kemikalier i levern. Slutpunktmätning är indikativt för DNA-skador och påföljande reparation i leverceller. Levern är vanligen det huvudsakliga sätet för metabolismen av absorberade ämnen. Det är således ett lämpligt säte för att mäta DNA-skador *in vivo*.

Om det finns bevis för att testsubstansen inte kommer att nå målvävnaden är det inte lämpligt att använda detta test.

Reparationssyntesens slutpunkt mäts genom att bestämma upptaget av märkta nukleosider i celler som inte undergår reguljär DNA syntes (S-fas). Den teknik som är den mest använda är bestämning av upptag av tritiummärkt tymidin ($^3\text{H-TdR}$) med hjälp av autoradiografi. Råttlever används med fördel för UDS-tester *in vivo*. Andra vävnader än lever kan användas, men omfattas inte av denna metod.

Detektionen av ett UDS-svar är beroende av antalet DNA-baser som "klippas bort" och byts ut vid platsen för skadan. UDS-testet är därför särskilt värdefullt för att detektera substansinducerad "longpatch"-reparation (20–30 baser). "Shortpatch"-reparation (1–3 baser) detekteras däremot med mycket lägre känslighet. Vidare kan mutagena händelser inträffa på grund av utebliven reparation, felreparation eller felreplikation av DNA-skador. Omfattningen av UDS-svaret ger ingen indikation på noggrannheten i reparationsprocessen. Dessutom är det möjligt att ett mutagen reagerar med DNA men att DNA-skadan inte repareras via en reparationsprocess där DNA-baser "klippas bort" och byts ut. Bristen på specifik information rörande mutagen aktivitet, erhållen genom UDS-testet, kompenseras för genom dess potentiella känslighet, eftersom den mäts i hela genomet.

Se även Allmän inledning, Del B.

1.2 DEFINITIONER

Celler som repareras: ett nettoantal korn i kärnan (net nuclear grain, NNG) som är större än ett förvalt värde, vilket skall verifieras av det laboratorium som utför testet.

Nettoantal korn i kärnan (NNG): kvantitativ mätning av UDS-aktivitet hos celler i autoradiografiska UDS-tester, beräknade genom att subtrahera medelantalet av de cytoplasmiska kornen i kärnekivalenta cytoplasmiska områden (CG) från antalet korn i kärnan (nuclear grains, NG): $\text{NNG} = \text{NG} - \text{CG}$. NNG-räkningar beräknas för individuella celler och slås sedan samman för celler i en kultur, i parallella kulturer, etc.

Reparationssyntes (UDS): DNA-reparationssyntes efter "bortklippning" och avlägsnande av en DNA-sträng som innehåller ett avsnitt med skador som inducerats av kemiska substanser eller fysiska ämnen.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

UDS-testet med leverceller från däggdjur *in vivo* indikerar DNA-reparationssyntes efter ”bortklippning” och avlägsnande av en sträng med DNA innehållande ett avsnitt med skador, vilka inducerats av kemiska substanser eller fysiska ämnen. Testet baseras i vanliga fall på en inkorporering av ^3H -TdR i DNA hos leverceller, vilka har en låg frekvens av celler som befinner sig i cellcykelns S-fas. Upptaget av ^3H -TdR bestäms vanligen genom autoradiografi, eftersom denna teknik inte är så mottaglig för interferens från celler i S-fas som, t.ex. vätskescintillationsräkning.

1.4 BESKRIVNING AV METODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Val av djurarter*

Vanligen används råttor men det går även bra att använda ett annat lämpligt däggdjur. Man bör välja de stammar av unga, friska vuxna försöksdjur som vanligen används på laboratorier. När undersökningen skall påbörjas, är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten som möjligt och den bör inte överstiga $\pm 20\%$ av medelvikten för varje kön.

1.4.1.2 *Förhållanden vid förvaring och utfodring*

De generella förhållanden som anges i den Allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60 %.

1.4.1.3 *Förberedelse av djuren*

Friska, unga och vuxna försöksdjur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren skall ha en unik identifiering och hållas i sina burar under minst fem dagar innan undersökningen börjar, för att göra det möjligt för dem att aklimatiseras till förhållandena i laboratoriet.

1.4.1.4 *Beredning av testsubstansen*

Testsubstanser i fast form bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till försöksdjuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller så späds de ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabelt.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) bör ingå i varje oberoende utförd del av experimentet. Förutom vid behandling med testsubstansen, bör försöksdjuren i kontrollgrupperna hanteras på ett identiskt sätt i förhållande till djuren i de grupper där behandling skett.

Positiva kontroller bör utgöras av substanser som är kända för att ge UDS när de administreras vid exponeringsnivåer som kan förväntas att ge en detekterbar ökning jämfört med bakgrunden. Positiva kontroller som kräver metabolisk aktivering bör användas vid doser som framkallar ett måttligt svar (4). Doserna kan väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men att de inte omedelbart avslöjar identiteten hos kodade utstryksglas för läsaren. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Tider för provtagning	Substans	CAS-nr.	EINECS-nr.
Tidiga provtagningstider (2–4 tim.)	N-Nitrosodimetylamin	62-75-9	200-249-8
Sena provtagningstider (12–16 tim)	N-2-Fluorenylacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Andra lämpliga positiva kontrollsubstanser kan användas. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Försöksdjurens antal och kön**

Ett lämpligt antal försöksdjur bör användas, för att man skall kunna ta hänsyn till den naturliga biologiska variationen hos testresultaten. Antalet försöksdjur bör utgöras av minst 3 analyserbara försöksdjur per grupp. Där det finns en signifikant historisk databas som har ackumulerats, krävs det endast 1 eller 2 försöksdjur för de samtidiga negativa och positiva kontrollgrupperna.

Om det vid tiden för undersökningen visar sig att det finns data som är tillgängliga från undersökningar på samma stam och där samma tillförselväg för exponering har använts, samt att dessa visar att det inte finns några betydande skillnader i toxicitet mellan könen, kan testning på endast ett kön, helst på hanar, vara tillräckligt. I de fall där exponering av människa för kemikalier kan ge könsspecifika resultat, som t.ex. för vissa läkemedel ämnen, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön.

1.5.2 **Behandlingsschema**

Testsubstanser administreras i allmänhet i form av en enstaka behandling.

1.5.3 **Dosnivåer**

Normalt används minst två olika dosnivåer. Den högsta dosen definieras som den dos vilken producerar tecken på toxicitet på ett sådant sätt att högre dosnivåer, baserade på en likadan doseringsregim, skulle förväntas leda till letalitet. I allmänhet bör den lägre dosen vara 50 % till 25 % av den högre dosen.

Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag med avseende på de dosbestämmande kriterierna och bör utvärderas från fall till fall. Om en undersökning för att bestämma intervallet utförs på grund av att det inte finns några lämpliga data tillgängliga, bör denna utföras i samma laboratorium, och där man använder samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som i huvudundersökningen.

Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken producerar en indikation på toxicitet i levern (t.ex. pyknotiska kärnor).

1.5.4 "Limit-test"

En fullständig undersökning kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå vid minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte ger upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. En förväntad exponering av människor kan visa på behovet av att en högre dosnivå används i "limit-testen".

1.5.5 Administrering av doser

Testsubstansen administreras vanligen via sondmatning genom att använda en magsond eller en lämplig intubationskanyl. Andra tillförselvägar för exponering kan vara acceptabla, där de kan motiveras. Den intraperitoneala vägen rekommenderas dock inte, eftersom den skulle kunna exponera levern direkt för testsubstansen snarare än via det cirkulatoriska systemet. Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror av försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överskrida 2 ml/100 g kroppsvikt. Användningen av större volymer måste motiveras. Förutom när det gäller irriterande eller korrosiva substanser, vilka normalt kommer att avslöja förvärrade effekter vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom en justering av koncentrationen, så att en konstant volym kan säkerställas vid alla dosnivåer.

1.5.6 Beredning av leverceller

I normala fall bereds leverceller från behandlade försöksdjur 12–16 timmar efter dosering. Ytterligare en tidig provtagningstidpunkt (normalt 2–4 timmar efter behandlingen) är normalt nödvändig om inte det finns ett tydligt positivt svar efter 12–16 timmar. Alternativa provtagningstidpunkter kan användas när det är motiverat utifrån toxikokinetiska data.

Kortvariga kulturer med leverceller från däggdjur startas genom att skölja levern *in situ* med kollagenas och att låta nyligen dissocierade leverceller fästa sig på en lämplig yta. Leverceller från negativa kontrollförsöksdjur bör ha en viabilitet (5) på minst 50 %.

1.5.7 Bestämning av UDS

Nyligen isolerade leverceller från däggdjur inkuberas normalt med ett medium som innehåller ^3H -TdR under en tid som är tillräckligt lång, t.ex. 3–8 timmar. När inkubationsperioden går mot sitt slut, bör mediet avlägsnas från cellerna, vilka sedan kan inkuberas i ett medium som innehåller ett överskott på omärkt tymidin för att försvaga oinkorporerad radioaktivitet ("cold chase"). Cellerna tvättas sedan, fixeras och torkas. Vid längre inkubationstider, kan "cold chase" visa sig vara onödigt. Utstryksglas doppas sedan i en autoradiografisk emulsion, exponeras i mörker (t.ex. nedkylda under 7–14 dagar), framkallas och färgas in, varpå exponerade silverkorn sedan räknas. Två till tre utstryksglas bereds från varje försöksdjur.

1.5.8 **Analys**

Preparationerna av utstryksglas bör innehålla tillräckligt många celler med normal morfologi för att medge en meningsfull bestämning av UDS. Preparationer undersöks mikroskopiskt efter tecken på uppenbar cytotoxicitet (t.ex. pyknos, reducerade nivåer av radioaktiv märkning).

Utstryksglas bör kodas innan kornen räknas. Normalt påvisas 100 celler från varje försöksdjur från minst två utstryksglas. Om mindre än 100 celler/försöksdjur påvisas bör detta motiveras. Vid kornräkningar påvisas inte kärnor i S-fas, men proportionen av celler i S-fas kan registreras.

Mängden av $^3\text{H-TdR}$ som inkorporerats i kärnan och cytoplasman hos morfologiskt normala celler, som bevisats av upplagringen av silverkorn, bör bestämmas med hjälp av lämpliga metoder.

Kornräkningar bestäms i kärnorna (nuclear grains, NG) och kärnekivalenta områden i cytoplasman (cytoplasmic grains, CG). CG-räkningar mäts genom att antingen ta det område av cytoplasman som har den mest omfattande märkningen, eller genom att ta ett medeltal av två eller tre slumpmässiga cytoplasmräkningar nära kärnan. Andra räknemetoder (t.ex. helcellräkning) kan användas om de kan motiveras (6).

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella utstryksglas och försöksdjursdata bör tas fram. Dessutom bör alla data sammanfattas i tabellform. Räkningar av nettoantalet korn i kärnan (NNG) bör tas fram för varje cell, för varje försöksdjur och för varje dos och tid genom att subtrahera CG-räkningar från NG-räkningar. Om "celler under reparation" räknas in, bör kriterierna för definition av "celler under reparation" vara motiverade och baserade på historiska eller samtidiga negativa kontrolldata. Numeriska resultat kan utvärderas utifrån statistiska metoder. Om statistiska tester används, bör de selekteras och motiveras innan undersökningen utförs.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Exempel på kriterier för positiva/negativa svar innefattar:

positiva	(i)	NNG-värden över ett förvalt tröskelvärde som är motiverat på basis av historiska laboratoriedata
eller	(ii)	NNG-värden som är signifikant större än den samtidiga kontrollen
negativa	(i)	NNG-värden inom/under det historiska kontrolltröskelvärdet
eller	(ii)	NNG-värden som inte är signifikant större än den samtidiga kontrollen

Den biologiska relevansen hos registrerade data bör uppmärksammas: d.v.s. parametrar såsom variationer mellan olika försöksdjur, dos/respons-förhållanden och cytotoxicitet bör också beaktas. Statistiska metoder kan användas såsom en hjälp vid utvärderingen av testresultaten. Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan uppsättningen av data i sällsynta fall göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Ett positivt resultat från UDS-testet på leverceller från däggdjur *in vivo* indikerar att testsubstansen inducerar DNA-skador i leverceller från däggdjur *in vivo*, vilka kan repareras av reparationssyntes *in vitro*. Ett negativt resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar skador på DNA som är detekterbara med hjälp av detta test.

Sannolikheten för att testsubstansen eller dess metaboliter skall nå ut i det stora kretsloppet eller specifikt till målvävnaden (t.ex. systemisk toxicitet) bör diskuteras.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel

- motivering för valet av vehikel
- testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Försöksdjur:

- art/stam som används
- försöksdjurens antal, ålder och kön
- ursprung, förhållanden vid förvaring, diet, etc.
- individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

Försöksbetingelser:

- positiva och negativa kontroller (vehikel/lösningsmedel)
- data från en undersökning av spännvidden, om en sådan har utförts
- grund för valet av dosnivå
- uppgifter om beredningen av testsubstansen
- uppgifter om administreringen av testsubstansen
- grund för det sätt administreringen sker på
- metoder för att verifiera att testsubstansen nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden, om detta är tillämbart
- omvandling från koncentration av testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg kroppsvikt/dag), om detta är tillämbart
- uppgifter om beträffande fodrets och vattnets kvalitet
- detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman

- metoder för mätning av toxicitet
- metod för beredning och odling av leverceller
- den autoradiografiska teknik som använts
- antalet utstryksglas som preparerats och antalet celler som påvisats
- kriterier för utvärdering
- kriterier för att bedöma om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga

Resultat:

- individuella utstryksglas, försöksdjurs- och gruppmedelvärden för antalet korn i kärnan, cytoplasmiska korn, och nettoantalet korn i kärnan (NNG)
- dos/respons-förhållande, om detta är tillgängligt
- statistisk utvärdering, om en sådan utförts
- tecken på toxicitet
- samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata
- historiska negativa och positiva kontrolldata (lösningsmedel/vehikel) med intervall, medelvärden och standardavvikelser
- antalet "celler under reparation", om detta har fastställts
- antalet celler i S-fas, om detta har bestämts
- cellernas viabilitet

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. REFERENSER

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. HUDKORROSIVITET

1. METOD

1.1 INLEDNING

Europeiska centret för validering av alternativa provningsmetoder (ECVAM, Gemensamma forskningscentret, Europeiska kommissionen) har bedömt två *in vitro*-test för hudkorrosivitet – bestämning av transkutant elektriskt motstånd i råtthud (TER) och ett test där en modell av human hud används – som vetenskapligt validerade (1)(2)(3). Vid ECVAM-valideringsstudien påvisades att båda testerna gav tillförlitliga resultat när det gällde att skilja mellan kända korrosiva och icke-korrosiva ämnen. Med försöksprotokollet baserat på modell av human hud kunde man dessutom framgångsrikt skilja mellan olika grader av korrosivitet (kända starkt korrosiva ämnen, R35 och andra korrosiva ämnen, R34) (2). Föreliggande dokument innehåller beskrivningar och förfaranden för båda testerna. Valet av test för ett visst ändamål beror på användarens specifika krav och preferenser.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Hudkorrosivitet: förmågan hos ett testämne som har applicerats på huden att framkalla irreversibla vävnadsskador.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga referensämnen har specificerats. Se dock punkterna 1.5.3.4 och 1.7.2.3.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN – BESTÄMNING AV TER I RÅTTHUD

Testämnet appliceras och får verka upp till 24 timmar på ytan av hudbitar från humant avlivade unga råttor. Korrosiva ämnen identifieras genom sin förmåga att framkalla skador på hudens hornlager och störningar i den normala barriärfunktionen, vilket kan fastställas som en sänkning av hudens transkutana elektriska motstånd (TER) under ett tröskelvärde (5 k Ω) (4)(5). Irriterande och icke-irriterande material framkallar ingen sänkning av TER under tröskelvärdet. För surfaktanter och neutrala organiska ämnen kan testförfarandet kompletteras med ett färgämnesbindningssteg (för definition, se hänvisning (6)) i syfte att minska antalet falska positiva resultat som ofta fås med dessa kemikalietyper (2) (7).

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN – BESTÄMNING AV TER I RÅTTHUD

1.5.1 Djur

För beredningen av hudbitar behövs unga råttor (20–23 dagar, Wistar eller motsvarande stam). Råttornas rygg- och flankhår avlägsnas omsorgsfullt med en liten pälsklippsmaskin. Djuren tvättas genom omsorgsfull avtorkning och det hårlösa området dränks med antibiotikalösning (som kan innehålla t.ex. streptomycin, penicillin, kloramfenikol eller amfotericin i tillräcklig koncentration för att hindra bakterietillväxt). Djuren tvättas på nytt med antibiotika tre eller fyra dagar efter den första tvätten och måste därefter användas inom 3 dagar (djur som används för beredning av hudbitar får inte vara äldre än 31 dagar).

1.5.2 Beredning av hudbitar

Djuren avlivas på humant sätt. Rygg huden från varje djur tas tillvara och allt överskottsfett avlägsnas omsorgsfullt. Huden placeras över ändan av ett rör av PTFE (polytetrafluoroetylen) med epidermisytan mot röret. En O-ring av gummi trycks över rörets ända för att hålla hudbiten på plats och överskottshud trimmas bort. Rörets och O-ringens mått framgår av figur 1. Därefter förseglas O-ringen omsorgsfullt till PTFE-röret med paraffin. Rörets stöds av en fjäderklämma innanför en receptorkammare som innehåller magnesiumsulfatlösning (154 mM) (figur 2).

1.5.3 Testförfarande

1.5.3.1 Applicering av testämne

Testämnena i vätskeform (150 µl) appliceras på epidermisytan inuti röret (figur 2). Vid testning av ämnen i fast form appliceras en tillräcklig mängd för att säkerställa att hela epidermisytan täcks. Därefter tillförs avjoniserat vatten (150 µl) på det fasta ämnet och röret omskakas varsamt. Testämnet bör ha maximal kontakt med huden. För vissa fasta ämnen kan detta uppnås genom uppvärmning till 30°C så att testämnet smälter. Alternativt kan ämnet finfördelas till granulat eller pulver.

Varje testämne appliceras på tre hudbitar. Testämnet får verka 24 timmar (se även 1.5.3.4) och avlägsnas därefter genom sköljning med kranvattenstråle (upp till 30°C). Sköljningen bör pågå till dess att inget ämne längre fås bort. Testämne som har fastnat i röret kan sköljas bort med varmt vatten (cirka 30°C).

1.5.3.2 TER-mätningar

För TER-mätningen används en LCR-mätare för lågspänning och växelström (t.ex. AIM 401, AIM 6401 eller motsvarande). För att sänka hudens ytspänning före motståndsmätningen tillförs etanol (70 %) i tillräcklig mängd för att täcka epidermisytan. Etanolen får verka i några sekunder och hålls sedan ur röret. Därefter behandlas vävnaden med 3 ml magnesiumsulfatlösning (154 mM). För motståndsmätningen (kΩ/hudbit) placeras mätutrustningens elektroder på hudbitens motstående båda ytor (figur 2). Elektrodernas mått och elektrod längden under krokodilklämman framgår av figur 1. Den inre (tjocka) elektrod klämman hålls uppe på PTFE-röret under motståndsmätningen för att säkerställa att elektrod längden inne i magnesiumsulfatlösningen hålls konstant. Den yttre (tunna) elektroden placeras innanför receptorkammaren så att elektroden ligger mot kammarens botten. Avståndet mellan fjäderklämman och PTFE-rörets botten skall hållas konstant (figur 1) eftersom avståndet påverkar det erhållna motståndsvärdet.

Observera att om det uppmätta motståndsvärdet överstiger ett så högt värde som 20 kΩ kan detta bero på att hudbitens epidermisyta är täckt av testämne. För att få bort ämnet kan man t.ex. sluta till PTFE-röret med tummen (som bör skyddas med handske) och skaka om röret i cirka 10 sekunder, hålla ut magnesiumsulfatlösningen och upprepa mätningen med ny magnesiumsulfatlösning.

De resulterande medelvärdena är godtagbara om samtliga positiva och negativa kontrollvärden faller inom det godkända området för metoden. I tabellen nedan anges förslag till kontrollämnen samt motsvarande godkända motståndsintervall för den beskrivna metoden och utrustningen.

Kontroll	Ämne	Motståndsintervall (kΩ)
Positiv	10 M saltsyra (36 %)	0,5–1,0
Negativ	Destillerat vatten	10–25

1.5.3.3 Modifierat förfarande för surfaktanter och neutrala organiska ämnen

Om testämnet är en surfaktant eller neutralt organiskt ämne och TER-värdet är lägre eller lika med 5 kΩ kan falska positiva resultat sållas ut genom bestämning av färgämnespenetrationen i vävnaderna (2).

1.5.3.3.1 Applicering och avlägsnande av färgämne (*Sulforhodamine B*)

Efter den första behandlingen med testämne appliceras 150 µl 10-procentig (vikt i volym) lösning av färgämnet i destillerat vatten på epidermisytan av alla hudbitar. Lösningen får verka i 2 timmar. Därefter avlägsnas överskott (obundet färgämne) genom tvättning av hudbitarna med kranvattenstråle under cirka 10 sekunder. Hudbitarna tas försiktigt bort från PTFE-rören och varje hudbit placeras i en burk (t.ex. en 20 ml scintillationsburk i glas) som innehåller avjoniserat vatten (8 ml). Burkarna omskakas varsamt under 5 minuter för att avlägsna ytterligare överskott (obundet färgämne). Därefter upprepas sköljningen. Hudbitarna tas bort, placeras i burkar som innehåller 5 ml 30-procentig (vikt i volym) natriumdodekylsulfat (SDS) i destillerat vatten och inkuberas över natten vid 60°C. Efter inkubationen avlägsnas hudbitarna och slängs. Den kvarvarande lösningen centrifugeras under 8 minuter vid 21°C (relativ centrifugalkraft ~175). Ett 1 ml prov av supernatanten späds ut i volymförhållandet 1:5 (t.ex. 1 ml + 4 ml) med 30-procentig (vikt i volym) SDS i destillerat vatten. Lösningens optiska densitet (OD) mätes vid cirka 565 nm.

1.5.3.3.2 Beräkning av färgämneshalten

Färgämneshalten per hudbit beräknas utifrån OD-värdena (färgämnets molära extinktionskoefficient vid 565nm = $8,7 \times 10^4$; molekylvikt = 580). Färgämneshalten bestäms för varje hudbit och därefter beräknas en medelhalt för alla hudbitarna. Resultaten är godtagbara om samtidiga kontrollvärden faller inom de godkända intervallen för metoden. I tabellen nedan ges förslag på godtagbara intervall för kontrollämnenas färgämneshalt för den beskrivna metoden och utrustningen.

Kontroll	Ämne	Intervall för färgämneshalten (µg/bit)
Positiv	10 M saltsyra (36 %)	40–100
Negativ	Destillerat vatten	15–35

1.5.3.4 Tilläggsinformation

Det är också möjligt att låta testämnena verka på hudbitarna under kortare tid (t.ex. 2 timmar) i syfte att identifiera ämnen som är starkt korrosiva. Det visade sig dock vid valideringsstudien att TER-bestämning efter 2 timmars kemikaliepåverkan gav överdrivna resultat avseende flera kemikaliers korrosivitetspotential (2), trots att en korrekt identifiering av korrosiva och icke-korrosiva kemikalier kunde göras efter 24 timmars verkningstid.

Testutrustningens egenskaper och mått samt det använda testförfarandet kan påverka de uppmätta TER-värdena. Korrosivitetströskeln på 5 kΩ härleddes från data som erhållits med den specifika utrustning och det specifika förfarande som beskrivs för denna metod. Om försöket utförs under betydligt annorlunda förhållanden kan avvikande tröskel- och kontrollvärden erhållas. Det rekommenderas därför att metoden och motståndets tröskelvärde kalibreras genom testning av en serie referensstandarder som valts ut bland de kemikalier som använts i valideringsstudien (3).

1.6 PRINCIP FÖR TESTMETODEN – BESTÄMNING MED MODELL AV HUMAN HUD

Testämnet appliceras och får verka upp till 4 timmar på ytan av en tredimensionell modell av human hud som består av rekonstruerad epidermis med funktionellt hornlager. Korrosiva ämnen identifieras genom sin förmåga att efter fastställda exponeringsperioder framkalla en sänkning av cellernas viabilitet (vilket kan fastställas t.ex. med MTT-reduktionsbestämning) under definierade tröskelvärden. Principen för bestämningen följer hypotesen om att kemikalier är korrosiva om de kan penetrera hornlagret (genom diffusion eller erosion) och är tillräckligt cytotoxiska för att orsaka celldöd i underliggande cellskikt.

1.7 BESKRIVNING AV TESTMETODEN – BESTÄMNING MED MODELL AV HUMAN HUD

1.7.1 Modeller av human hud

Modeller av human hud kan härröra från olika källor men måste uppfylla vissa kriterier. Modellen måste ha ett funktionellt hornlager med ett underliggande lager levande celler och hornlagrets barriärfunktion måste vara tillräcklig. Tillräcklig barriärfunktion kan påvisas genom demonstration av hudmodellens beständighet vad gäller cytotoxicitet. Detta görs genom att applicera ämnen som veterligen är cytotoxiska för celler men som normalt inte passerar hornlagret. Man måste kunna påvisa att hudmodellen ger reproducerbara resultat under definierade försöksförhållanden.

Hudmodellens levande celler måste ha tillräcklig viabilitet för att det skall uppstå en skillnad mellan resultatet för positivt och negativt kontrollämne. Cellernas viabilitet (t.ex. uppmätt genom MTT-reduktion, dvs. ett OD-värde) efter exponering för det negativa kontrollämnets måste falla inom godtagbara gränser för den berörda modellen. Likaså måste cellernas viabilitetsvärden för det positiva kontrollämnets (i förhållande till värdena för det negativa kontrollämnets) falla inom fastställda gränser. Det viktigaste kriteriet är att den förutsägbarhetsmodell som används måste ha påvisats uppfylla internationella valideringsstandarder.

1.7.2 Testförfarande

1.7.2.1 Applicering av testämne

Ämnen i vätskeform måste appliceras i tillräcklig mängd för att täcka hudens yta (minst 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Ämnen i fast form måste appliceras i tillräcklig mängd för att täcka huden och därefter måste ämnet fuktas för att säkerställa god kontakt med huden. I vissa fall måste ämnen i fast form pulveriseras före appliceringen. Appliceringsmetoden måste bevisligen vara lämplig för ett stort antal olika kemikalietyper (se t.ex. hänvisning 2). I slutet av exponeringsperioden skall testämnet omsorgsfullt tvättas bort från hudytan med saltlösning.

1.7.2.2 Mätning av cellernas viabilitet

Cellernas viabilitet kan mätas med valfri validerad metod. Den oftast använda bestämningsmetoden är MTT-reduktion, som har visat sig ge exakta och reproducerbara resultat i olika laboratorier (2). Hudbitarna får ligga 3 timmar i en MTT-lösning (0,3 mg/ml) vid 20–28°C. Den utfällda blå formazanprodukten extraheras med lösningsmedel och formazanhalten mäts genom OD-bestämning vid en våglängd mellan 545 och 595 nm.

1.7.2.3 Tilläggsinformation

Den hudmodell som används och det exakta protokollet för exponeringstid, tvättningsförfaranden och dylika faktorer har stor inverkan på resultaten avseende cellernas viabilitet. Det rekommenderas att metoden och förutsägbarhetsmodellen kalibreras genom testning av en serie referensstandarder som väljs ut bland de kemikalier som användes i ECVAM-valideringsstudien (3). Ett avgörande kriterium är att metoden bevisligen är reproducerbar inom och mellan laboratorier för ett stort antal olika kemikalier, i enlighet med internationella standarder. Metoden bör minst uppfylla de fastställda kriterierna för vetenskaplig validitet (2) och resultaten från en sådan valideringsstudie måste publiceras i en kollegialt granskad vetenskaplig tidskrift.

2. DATA

2.1 HANTERING AV RESULTATEN

2.1.1 TER i rått hud

Motståndsvärden ($k\Omega$) för testämnet, positiva och negativa kontrollämnena samt eventuella standardreferenskemikalier skall rapporteras i tabellform, inbegripet data för replikat och upprepade försök, medelvärden och den resulterande klassificeringen.

2.1.2 Bestämning med modell av human hud

OD-värden och beräknade värden för cellernas procentuella viabilitet för testämnet, positiva och negativa kontrollämnena samt eventuella standardreferenskemikalier skall rapporteras i tabellform, inbegripet data för replikat och upprepade försök, medelvärden och den resulterande klassificeringen.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

2.2.1 TER i rått hud

Om TER-medelvärdet som fås för testämnet är högre än $5 k\Omega$ är testämnet icke-korrosivt. Om TER-värdet är lägre eller lika med $5 k\Omega$ (och det inte gäller en surfaktant eller neutralt organiskt ämne) är testämnet korrosivt.

För surfaktanter eller neutrala organiska ämnen som ger TER-värden lägre eller lika med $5 k\Omega$ kan testförfarandet kompletteras med färgämnespenetrering. Om medelvärdet för hudbitarnas färgämneshalt är större eller lika med motsvarande värde i den positiva kontroll som samtidigt utförs med 36 % HCl är testämnet sant positivt och därmed även korrosivt. Om medelvärdet för hudbitarnas färgämneshalt är lägre än motsvarande värde i den positiva kontrollen är testämnet falskt positivt och därmed icke-korrosivt.

2.2.2 Bestämning med modell av human hud

Ett negativt OD-kontrollvärde betyder 100 % viabilitet för cellerna och därför kan de OD-värden som fås för vart och ett prov användas för att beräkna en procentuell viabilitet i förhållande till den negativa kontrollen. Innan metoden kan valideras måste det viabilitetsgränsvärde som skiljer korrosiva testämnen från icke-korrosiva (eller som skiljer mellan olika grader av korrosivitet) definieras på ett klart sätt i förutsägbarhetsmodellen, och vid påföljande valideringsstudie måste påvisas att gränsvärdet är lämpligt (se t.ex. hänvisning 2).

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla minst följande information:

Testämne

– Identifierande data, fysikalisk natur och i tillämpliga fall fysikalkemiska egenskaper. Motsvarande information bör lämnas för eventuella referensämnen.

Försöksförhållanden

– Detaljerade uppgifter om det testförfarande som har använts.
– Beskrivning av och motivering för eventuella modifieringar.

Resultat

- Tabelluppställning med testämnets motståndsvärden (TER-bestämning) eller cellernas procentuella viabilitet (bestämning med modell av human hud), positiva och negativa kontroller och eventuella standardreferenskemikalier, inbegripet data för replikat eller upprepade försök och medelvärden.
- Beskrivning av eventuella andra observerade verkningar.

Diskussion om resultaten

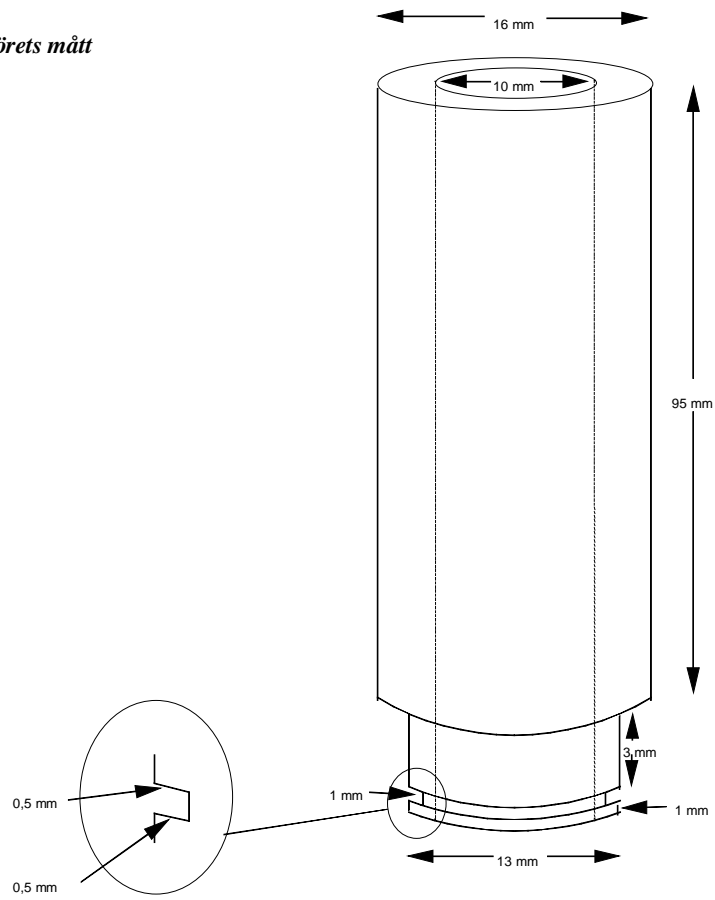
Slutsatser

4. HÄNVISNINGAR

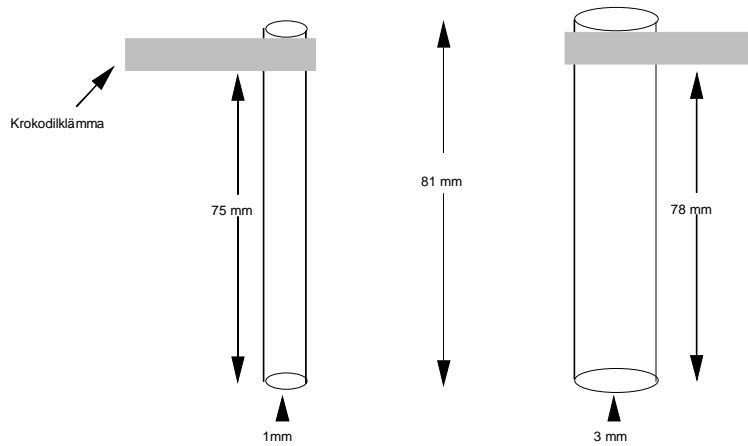
1. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* **26**, 275–280.
2. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. och Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA* **23**, 219–255.

Figur 1

PTFE-rörets mått

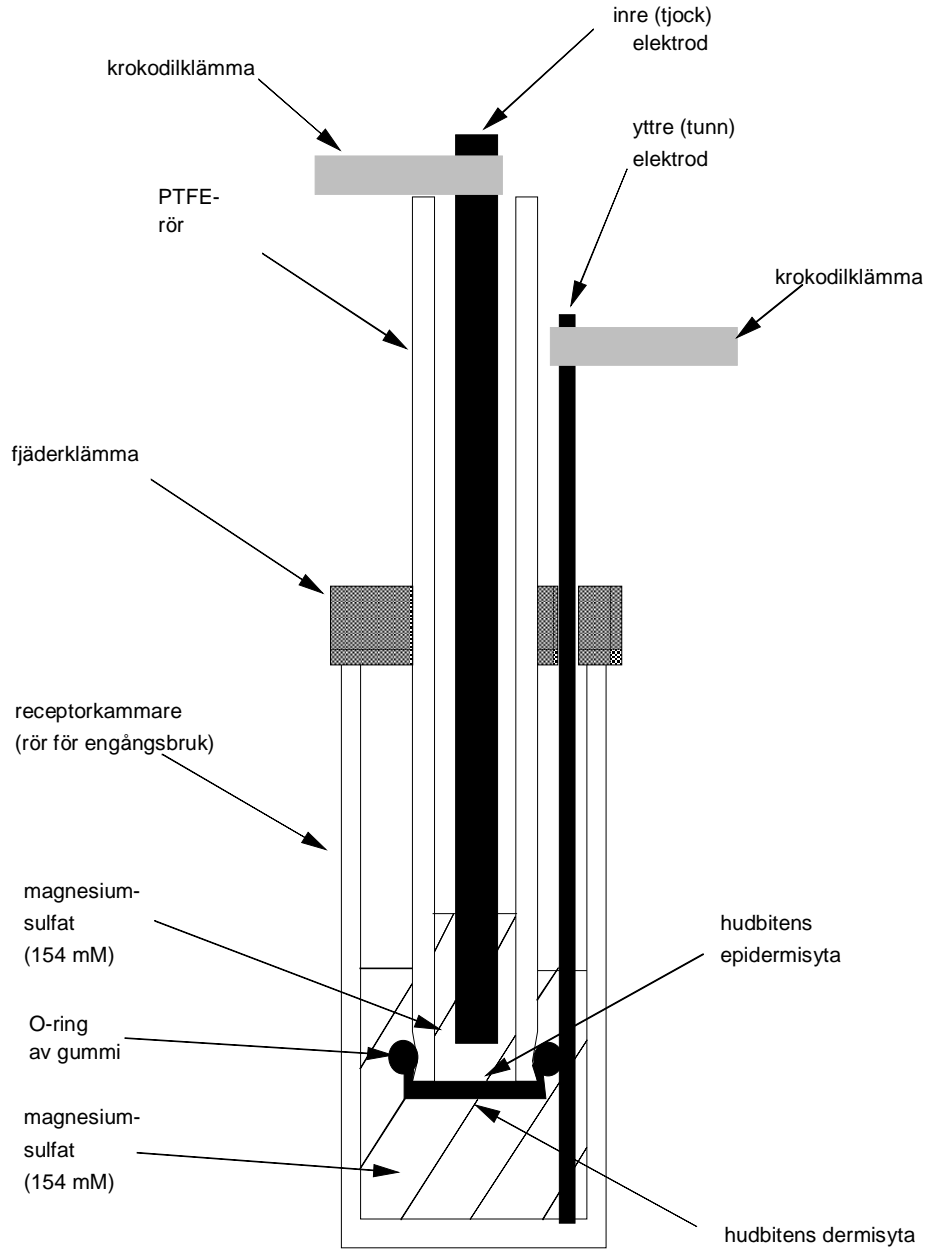


Elektrodens mått



Figur 2

Utrustning för bestämning av TER i råttthud



B. 41. FOTOTOXICITET – 3T3 NRU-FOTOTOXICITETSTEST *IN VITRO*

1. METOD

1.1 INLEDNING

Fototoxicitet definieras såsom toxisk respons som framkallas när huden först exponeras för vissa kemikalier och därefter för ljus, eller som framkallas på liknande sätt genom hudbestrålning efter administrering av en kemikalie till organismen.

Den information som erhållits från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* kan användas för att identifiera den fototoxiska potentialen hos ett testämne, dvs. huruvida testämnet kan ge upphov till skador eller inte i kombination med exponering för UV-strålning och synligt ljus.

Den toxikologiska slutpunkten för *in vitro*-testet består av fastställandet av *fototoxicitet* som framkallas genom kombinerad verkan av en kemikalie och ljus, och därför kan testet användas för att identifiera både föreningar som är fototoxiska *in vivo* efter systemisk applicering och fördelning på huden, och föreningar som har fotoirriterande egenskaper efter applicering på hudens yta.

3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* utvecklades och validerades inom ramen för ett gemensamt EU/COLIPA-projekt 1992–1997 (1)(2)(3) i syfte att få fram ett adekvat *in vitro*-alternativ till de olika *in vivo*-tester som var i bruk. Ett OECD-arbetsmöte lämnade 1996 rekommendationer om en sekventiell *in vitro*-testmetod för bedömning av fototoxicitet (4).

Resultaten från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* jämfördes med akuta fototoxicitets- och fotoirritationsverknings *in vivo* hos djur och människor, och testet har visat sig ge utmärkt förutsägbarhet vad gäller dessa verknings. Avsikten med testet är inte att förutsäga andra skadliga verknings som kan uppstå genom kombinerad verkan av en kemikalie och ljus, t.ex. *fotogenotoxicitet*, *fotoallergi* och *fotokarcinogenitet*, även om många kemikalier med sådana specifika egenskaper reagerar positivt vid 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro*. Testet är inte heller avsett att användas för bedömning av *fototoxisk potential*.

En sekventiell metod för testning av kemikaliers fototoxicitet presenteras i bilaga 1.

1.2 DEFINITIONER

Strålning: Intensiteten hos ultraviolett (UV) eller synligt ljus som når en yta, uttryckt i W/m² eller mW/cm².

Ljusdos: Den mängd (= intensitet × tid) ultraviolett (UV) eller synlig strålning som når en yta, uttryckt i Joule (= W × s) per ytenhet, t.ex. J/m² eller J/cm².

UV-ljusets våglängdsområden: CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) rekommenderar följande uppdelning: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) och UVC (100–280 nm). Även andra uppdelningar förekommer – gränsen mellan UVB och UVA sätts ofta vid 320 nm och UVA kan uppdelas i UV-A1 och UV-A2 med en gräns vid cirka 340 nm.

Cellviabilitet: En parameter för att mäta en cellpopulations totala aktivitet (t.ex. upptag av det vitala färgämnet neutralrött i cellernas lysosomer). Denna aktivitet korrelerar, beroende på den slutpunkt som uppmäts och den testutformning som används, med det totala antalet celler och deras vitalitet.

Relativ cellviabilitet: Cellviabiliteten uttryckt i förhållande till negativa kontroller (med lösningsmedel) som har tagits fortlöpande under hela testförloppet (+UV eller -UV), utan behandling med testkemikalie.

Företsägbarhetsmodell: En algoritm som används för att omvandla resultaten från ett toxicitetstest till förutsägelse av toxisk potential. I föreliggande testriktlinjer kan PIF och MPE användas för att omvandla resultaten från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* till en förutsägelse av fototoxisk potential.

PIF (fotoirritationsfaktor): En faktor som fås genom att jämföra två cytotoxiska koncentrationer (EC_{50}) av testkemikalien som ger samma effekt i frånvaro (-UV) respektive närvaro (+UV) av icke-cytotoxisk bestrålning med UVA/synligt ljus.

MPE (Mean Photo Effect): Ett nytt mått som har härletts från matematisk analys av den fullständiga formen hos två koncentrations-responskurvor som erhållits i frånvaro (-UV) respektive närvaro (+UV) av icke-cytotoxisk bestrålning med UVA/synligt ljus.

Fototoxicitet: Akut toxisk respons som framkallas när huden först exponeras för vissa kemikalier och därefter för ljus, eller som framkallas på liknande sätt genom hudbestrålning efter administrering av en kemikalie till organismen.

Fotoirritation: Ett underbegrepp av termen "fototoxicitet". Begreppet används endast för att beskriva sådana fototoxiska reaktioner som uppstår i huden efter kemikalieexponering (på huden eller oralt) och som alltid leder till icke-specifika cellskador (reaktioner av typen solbrännskador).

Fotoallergi: En förvärvad immunologisk reaktivitet som inte uppkommer vid en första behandling med kemikalie och ljus, och som behöver en induktionsperiod på en eller två veckor innan hudens reaktionsbenägenhet kan påvisas.

Fotogenotoxicitet: Genotoxisk respons som observeras med en genetisk slutpunkt. Denna framkallas efter att cellerna har exponerats för en icke-genotoxisk dos av UV/synligt ljus och en icke-genotoxisk kemikalie.

Fotokarcinogenitet: Karcinogenitet som induceras genom upprepad behandling med ljus och kemikalie. Termen "foto-co-karcinogenes" står för att en kemikalie förstärker UV-inducerad tumorigenes.

1.3 REFERENSÄMNEN

För upprättandet av 3T3 NRU-fototoxicitetstest rekommenderas, utöver användning av den positiva kontrollkemikalien *klorpromazin* som vid varje bestämning bör testas parallellt, att referenskemikalierna väljs ut ur den uppsättning kemikalier som användes i de laboratorier som deltog i provningarna för det aktuella testet (1)(3)(13).

1.4 BAKGRUND

Många typer av kemikalier har rapporterats orsaka fototoxiska verkningar (5)(6)(7)(8). Dessa kemikaliers enda gemensamma egenskap är förmågan att absorbera ljusenergi inom solljusets våglängdsområde. Enligt fotokemins första lag (Grothaus-Drapers lag) är tillräcklig absorption av ljuskvanta förutsättningen för en fotoreaktion. Innan man planerar biologisk testning av en kemikalie enligt de aktuella testriktlinjerna bör man därför fastställa den berörda kemikalies absorptionsspektrum avseende UV/synligt ljus (t.ex. enligt OECD:s testriktlinjer 101). Om den molära extinktions- eller absorptionskoefficienten ligger under $10 \text{ liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ har kemikalien ingen fotoreaktiv potential och behöver inte testas med 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* eller annat biologiskt test av skadliga fotokemiska effekter (bilaga 1).

1.5 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Man har identifierat fyra mekanismer som kan resultera i fototoxisk respons genom att ljus absorberas av en (kemisk) kromofor (7). Alla fyra mekanismer leder till cellskador. Därför bygger 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* på en jämförelse av cytotoxiciteten hos en kemikalie när den testas exponerad respektive icke-exponerad för en icke-cytotoxisk dos av UVA/synligt ljus. Cytotoxiciteten uttrycks då som en koncentrationsberoende minskning av upptaget av det vitala färgämnet neutralrött (NR (9)) 24 timmar efter behandling med testkemikalien och påföljande bestrålning.

Balb/c 3T3-celler hålls i kultur under 24 timmar för monolayerbildning. Två 96-hålsplattor per testkemikalie förinkuberas i en timme med åtta olika koncentrationer av kemikalien. Därefter exponeras den ena av de två plattorna för en icke-cytotoxisk dos (5 J/cm² UVA) av UVA/synligt ljus (+UV-provning) medan den andra plattan hålls i mörker (-UV-provning). Sedan byter man ut båda plattornas behandlingsmedium mot kulturmedium (näringslösning) och efter ytterligare 24 timmars inkubering bestäms cellviabiliteten med neutralröttupptag (NRU) i 3 timmar. Den relativa cellviabiliteten, uttryckt som en procentandel jämfört med obehandlade negativa kontrollprov, beräknas för envar av de åtta testkoncentrationerna. Därefter uppskattas den fototoxiska potentialen genom jämförelse av den koncentrationsrespons som erhålls i närvaro (+UV) och i frånvaro (-UV) av strålning, i regel på nivån EC₅₀, dvs. den koncentration som minskar cellviabiliteten med 50 % jämfört med de obehandlade kontrollproverna.

1.6 KVALITETSKRITERIER

Cellernas UVA-känslighet, historiska data: Cellerna skall regelbundet kontrolleras avseende UVA-känslighet. Cellerna sås ut med samma täthet som i 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro*, bestrålas följande dag med UVA-doser på 1–9 J/cm² och en dag senare bestäms cellernas viabilitet med NRU-metoden. Cellerna uppfyller kvalitetskriterierna om deras viabilitet efter bestrålning med 5 J/cm² UVA är minst 80 % av viabiliteten hos obestrålade kontrollceller. Vid den högsta UVA-dosen på 9 J/cm² bör viabiliteten vara minst 50 % av viabiliteten hos obestrålade kontrollceller. Kontrollen bör upprepas cirka var tionde cellpassage.

Negativkontrollcellernas UVA-känslighet, aktuellt test: Testet uppfyller kvalitetskriterierna om +UVA-försökets negativkontrollceller (celler i EBSS – Earl's Balanced Salt Solution) med eller utan 1 % dimetylsulfoxid (DMSO) eller 1 % etanol (EtOH)) har en viabilitet som är minst 80 % av viabiliteten hos obestrålade celler i likadan lösning i det parallella mörkerexperimentet (-UVA).

Negativkontrollcellernas viabilitet: Den absoluta optiska densiteten (OD_{540 NRU}) uppmätt för negativkontrollcellernas NR-extrakt indikerar om de 1×10⁴ celler som har såtts ut per håll har vuxit med normal dubblingstid under de två dagar bestämningen pågår. Ett test uppfyller kriterierna för godkännande om medelvärdet för OD_{540 NRU} hos obehandlade kontrollceller är ≥ 0,2.

Positivkontrollämne: Varje 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* skall åtföljas av parallelltest av en känd fototoxisk kemikalie. Vid EU/COLIPA-valideringsstudien användes klorpromazin (CPZ) som positivkontrollämne och denna kemikalie kan därför rekommenderas. För CPZ som hade testats enligt standardprotokollet i 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* definierades följande kriterier för godkännande: *CPZ bestrålat (+UVA):* EC₅₀ = 0,1–2,0 µg/ml, *CPZ obestrålat (-UVA):* EC₅₀ = 7,0–90,0 µg/ml. Fotoirritationsfaktorn (PIF), dvs. brytpunkten för EC₅₀, bör vara minst 6.

I stället för CPZ kan även andra kända fototoxiska kemikalier, lämpliga för den kemiska klass eller de löslighetsegenskaper som gäller för testkemikalien, användas vid de parallella positivkontrollerna. I sådant fall skall historiska data användas som hjälp för att definiera de värdeområden för EC₅₀ och för PIF eller MPE som används som kriterier för godkännande.

1.7 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.7.1 Förberedelser

1.7.1.1 Celler

För valideringsstudien användes en etablerad musfibroblastcellinje – Balb/c 3T3, klon 31 – antingen från ATCC eller från ECACC, som därför kan rekommenderas. Andra celler eller cellinjer kan med framgång användas med samma testprotokoll, förutsatt att odlingsbetingelserna anpassas till cellernas specifika behov. Motsvarigheten måste demonstreras.

Cellerna skall regelbundet kontrolleras med avseende på mykoplasmaförorening och får endast användas när resultatet från en sådan kontroll är godtagbart.

Eftersom cellernas UVA-känslighet kan öka med antalet passager skall Balb/c 3T3-celler med lägsta möjliga passagenummer användas, helst under 100. Det är viktigt att Balb/c 3T3-cellernas UVA-känslighet kontrolleras enligt det kvalitetskontrollförfarande som beskrivs i dessa riktlinjer.

1.7.1.2 *Media och odlingsbetingelser*

Lämpliga näringslösningar och inkuberingsbetingelser bör användas för vanliga cellpassager och under testförfarandet. Balb/c 3T3-celler DMEM-kompletteras med 10 % serum från nyfödd kalv, 4 mM glutamin, penicillin och streptomycin samt inkubering i fuktig atmosfär vid 37°C och 7,5 % CO₂. Det är särskilt viktigt att man med cellodlingsbetingelserna kan säkerställa en cellcykeltid inom det normala historiska intervallet för de celler eller den cellinje som används.

1.7.1.3 *Beredning av kulturer*

Celler från djupfrysta stamkulturer sås ut i näringslösningen i lämplig täthet och subkultiveras minst en gång innan de används i 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro*.

För fototoxicitetstestet sås testcellerna ut i näringslösningen med sådan täthet att odlingarna inte växer samman före avslutat test, dvs. när cellviabiliteten bestäms 48 timmar efter utsädden. För Balb/c 3T3-celler som odlas på 96-hålsplattor rekommenderas tätheten 1×10^4 celler per hål.

För varje testkemikalie sås celler ut på samma sätt på två separata 96-hålsplattor som därefter parallellt används genom hela testförfarandet under identiska odlingsförhållanden, med undantag av den tidsperiod då den ena plattan bestrålas (+UVA/synligt ljus) och den andra hålls i mörker (-UVA/synligt ljus).

1.7.1.4 *Metabolisk aktivering*

Metaboliserande system är ett allmänt krav för alla *in vitro*-test som används för förutsägelse av genotoxisk och carcinogen potential, men när det gäller fototoxicitet känner man än så länge inte till någon kemikalie där metabolisk omvandling krävs för att kemikalien skall fungera fototoxiskt *in vivo* eller *in vitro*. Det är därför varken nödvändigt eller vetenskapligt motiverat att det aktuella testet genomförs med ett system som har metabolisk aktivering.

1.7.1.5 *Testkemikalie – beredning*

Testkemikalierna måste ha beretts omedelbart före användningen, om man inte med stöd av stabilitetsdata kan visa att kemikalierna är lagringsbeständiga. Om det är sannolikt att kemikalien har hög sönderfallshastighet under inverkan av ljus måste beredningen genomföras under rött ljus.

Testkemikalierna skall lösas upp i buffrade saltlösningar, t.ex. EBSS (Earl's Balanced Salt Solution) eller PBS (fosfatbuffrad saltlösning). Saltlösningarna får inte innehålla proteinkomponenter eller ljusabsorberande pH-indikatorfärger som kan störa bestrålningsresultatet.

Testkemikalier med begränsad vattenlöslighet skall lösas upp i lämpligt lösningsmedel i en koncentration som är 100 gånger högre än den önskade och därefter spädas ut i förhållandet 1:100 med den buffrade saltlösningen. Om lösningsmedel används måste detta förekomma i en konstant volymkoncentration på 1 % i alla odlingar, dvs. både i de negativa kontrollerna och i alla koncentrationer av testkemikalien.

Som lösningsmedel rekommenderas dimetylsulfoxid (DMSO) och etanol (EtOH). Andra lösningsmedel med låg cytotoxicitet (t.ex. aceton) kan vara lämpliga men måste utvärderas omsorgsfullt med avseende på specifika egenskaper, t.ex. reaktionsbenägenhet med testkemikalien, dämpning av den fototoxiska verkan eller benägenhet att fånga upp radikaler.

Vid behov kan man använda Vortex-blandning, ultraljudsbehandling eller uppvärmning till 37°C för att underlätta upplösningen.

1.7.1.6 UV-bestrålning – beredning

Ljuskälla: Lämplig ljuskälla i kombination med lämplig filtrering är den viktigaste faktorn vid testning av fototoxicitet. I regel förknippas UVA och de synliga våglängdsområdena med fotosensibilisering (7)(10), medan UVB har mindre relevans och är direkt mycket cytotoxisk – cytotoxiciteten ökar 1000-faldigt när våglängden minskar från 313 till 280 nm (11). Kriterierna för valet av lämplig ljuskälla bör inbegripa det grundläggande kravet om att ljuskällan emitterar våglängder som absorberas av testkemikalien och att ljusdosen (den dos som uppnås inom skälig tid) är tillräcklig för detektering av kända fotosensibilisatorer. Dessutom får de våglängder och doser som används inte vara otillbörligt skadliga för testsystemet, vilket inbegriper värmeemission (infraröda området).

Det optimala är att använda simulerat solljus från en solsimulator. I solsimulatorer används både xenonbåglampor och (dopade) kvicksilver-metallhalidbåglampor. Fördelen med de senare är att de emitterar mindre värme och är billigare, men ljusets likhet med solljus är inte perfekt. Alla solsimulatorer emitterar betydande mängder UVB och bör därför förses med lämpliga filter för att dämpa de mycket cytotoxiska UVB-våglängderna.

Det strålningsspektrum som används för 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* måste vara praktiskt taget fritt från UVB (UVA:UVB ~ 1:20). Man har offentliggjort ett exempel på den spektrala strålningsdistributionen från den filtrerade solsimulator som användes i valideringsstudien för 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* (3).

Dosimetri: Ljusets (strålningens) intensitet skall före varje fototoxicitetstest rutinmässigt kontrolleras med hjälp av en bredbands UV-mätare. UV-mätaren måste ha kalibrerats mot källan och dess prestanda bör kontrolleras. För detta ändamål rekommenderas användning av en referensmätare, dvs. en annan, identiskt kalibrerad UV-mätare av samma typ. Helst skall man även då och då använda en spektroradiometer för att mäta den spektrala strålningen från den filtrerade ljuskällan och för att kontrollera UV-mätarnas kalibrering. Användningen av sådana instrument är dock mycket krävande och förutsätter tillbörligt utbildad personal.

I valideringsstudien konstaterades att en dos på 5 J/cm² (UVA) inte var cytotoxisk för Balb/c 3T3-celler men ändå tillräckligt stark för att excitera även svagt fototoxiska kemikalier. För att uppnå 5 J/cm² inom en tidsperiod på 50 minuter måste strålningen ställas in på 1,666 mW/cm². Om en annan cellinje eller en annan ljuskälla används måste UVA-dosen eventuellt justeras i någon mån. Som kriterium skall då gälla att strålningen inte får vara skadlig för cellerna men tillräcklig för detektering av vanliga fototoxiska ämnen. Tiden för ljusexponeringen beräknas på följande sätt:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{bestrålningsdos}(\text{J}/\text{cm}^2) \times 1000}{\text{strålning}(\text{mW}/\text{cm}^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Ws})$$

1.7.2 Försöksförhållanden

Testkemikaliens maximikoncentration får inte överskrida 100 µg/ml, eftersom alla fototoxiska kemikalier detekterades vid lägre koncentrationer. Vid högre koncentrationer ökar återigen förekomsten av falska positiva utslag (13). Den högsta koncentrationen av testkemikalien bör ha ett tillfredsställande pH-värde (pH-område: 6,5–7,8).

Koncentrationsområdena för en kemikalie som skall testas i närvaro (+UVA) respektive i frånvaro (-UVA) av ljus skall först fastställas på lämpligt sätt i förberedande försök. Koncentrationsseriens område och intervall skall justeras på sådant sätt att försöksdata ger tillräckligt underlag för koncentrations-responskurvorna. Koncentrationsserierna skall vara geometriska (dvs. ha konstant utspädningsfaktor).

1.7.3 **Testförfarande**¹

1.7.3.1 *Dag 1*

Bered en cellsuspension på 1×10^5 celler/ml i näringslösning och dosera 100 µl ren näringslösning i de perifera hålen av en 96-håls TC-mikroplatta (= blindprov). Dosera 100 µl cellsuspension med 1×10^5 celler/ml i de återstående hålen (= 1×10^4 celler/hål). Det behövs två plattor per kemikalie: en för bestämning av cytotoxicitet (-UVA) och en för bestämning av fotocytotoxicitet (+UVA).

Inkubera cellerna i 24 timmar (7,5 % CO₂, 37°C) för att få bildning av halvkonfluent monolayer. Denna inkuberingsperiod är tillräcklig för cellernas återhämtning och vidhäftning samt exponentiell tillväxt.

1.7.3.2 *Dag 2*

Dekantera näringslösningen från cellerna efter inkuberingen och tvätta två gånger med 150 µl EBSS/PBS per hål. Tillsätt 100 µl EBSS/PBS som innehåller lämplig koncentration av testkemikalien eller rent lösningsmedel (negativ kontroll). Använd 8 olika koncentrationer av testkemikalien. Inkubera cellerna med testkemikalie i mörker i 60 minuter (7,5 % CO₂, 37°C).

Utför bestämningens +UVA-del genom att bestråla cellerna vid rumstemperatur i 50 minuter genom 96-hålsplattans lock med 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Ventilera med en fläkt för att förebygga kondensbildning under locket. Håll parallellplattorna (-UVA) vid rumstemperatur i en mörk låda i 50 minuter (= UVA-exponeringstiden).

Dekantera testlösningen och tvätta två gånger med 150 µl EBSS/PBS. Ersätt EBSS/PBS med näringslösning och inkubera (7,5 % CO₂, 37°C) över natten (18–22 timmar).

1.7.3.3 *Dag 3*

Utvärdering med mikroskop

Undersök cellerna i faskontrastmikroskop. Notera alla ändringar i cellernas morfologi till följd av cytologiska verkningar av testkemikalien. Denna undersökning rekommenderas som kontroll i syfte att utesluta experimentella fel men resultatet används inte för utvärdering av cytotoxicitet eller fotocytotoxicitet.

Test med upptagning av neutralrött

Tvätta cellerna med 150 µl föruppvärmd EBSS/PBS. Avlägsna tvättlösningen genom att klappa försiktigt. Tillsätt 100 µl NR-medium och inkubera vid 37°C, i fuktig atmosfär med 7,5 % CO₂ i 3 timmar.

Avlägsna NR-mediet efter inkuberingen och tvätta cellerna med 150 µl EBSS/PBS. Dekantera och absorbera EBSS/PBS helt och hållet. (*Alternativt*: centrifugera omvänd platta.)

Tillsätt exakt 150 µl NR-desorptionslösning (färsk lösning av etanol och ättiksyra).

Skaka plattan snabbt i en skakmaskin i 10 minuter för att extrahera NR ur cellerna och få ett homogent NR-extrakt.

Mät NR-extraktets optiska densitet vid 540 nm i en spektrofotometer och använd blindproven som referens. Spara data i lämpligt filformat (t.ex. ASCII) för efterföljande analys.

¹ Närmare detaljer finns i hänvisning (12).

2 DATA

2.1 KVALITET OCH KVANTITET HOS DATA

Erhållna data bör ge möjlighet till meningsfull analys av den koncentrationsberoende respons som konstaterats i närvaro och i frånvaro av bestrålning med UVA/synligt ljus. Om cytotoxicitet detekteras skall både koncentrationsområdet och intervallet för enskilda koncentrationer anpassas så att försöksdata kan sammanställas till en kurva. Eftersom en testkemikalie kan vara icke-cytotoxisk upp till den definierade gränskoncentrationen på 100 µg/ml i mörkerförsöket (-UVA) men mycket cytotoxisk när den bestrålas (+UVA), måste man eventuellt använda koncentrationsområden av olika storleksordningar för de två delarna av försöket i syfte att få adekvat kvalitet på data. Om kemikalien inte uppvisar cytotoxicitet i någondera försöksdelen (-UVA och +UVA) är det tillräckligt att testa med stort intervall mellan enskilda doser upp till den högsta koncentrationen.

Klart positiva resultat behöver inte verifieras genom upprepade försök. Dessutom behöver klart negativa resultat inte verifieras förutsatt att testkemikalien har testats vid tillräckligt höga koncentrationer. I sådana fall är det tillräckligt med ett huvudförsök som stöds av ett eller flera preliminära försök för bestämning av område.

Om man får testresultat som kommer nära förutsägarhetsmodellens gräns måste resultaten verifieras genom upprepat test.

Om upprepat test behövs kan det vara viktigt att variera försöksförhållandena för att få ett tydligt resultat. En nyckelvariabel är då beredningen av testkemikalielösningarna. Därför kan variationer i beredningen (hjälpämningsmedel, sönderdelning, ultraljudsbehandling) ha mycket stor relevans vid en upprepning. Alternativt kan man överväga variation av inkuberingstiden före bestrålningen. En kortare bestrålningstid kan ha betydelse när det gäller kemikalier som inte är stabila i vatten.

2.2 HANTERING AV RESULTATEN

När detta är möjligt fastställs den koncentration av testkemikalien som motsvarar en minskning på 50 % av cellernas NR-upptag (EC_{50}). Detta kan genomföras med hjälp av valfri icke-linjär regressionsprocedur (helst en Hill-funktion eller logistisk regressionsanalys) för koncentrations-responsdata, eller med hjälp av andra anpassningsprocedurer (14). Innan ett EC_{50} -värde används för ytterligare beräkningar skall anpassningens kvalitet kontrolleras på tillbörligt sätt. Alternativt kan man använda grafiska anpassningsmetoder för beräkning av EC_{50} . I sådant fall rekommenderas användning av sannolikhetspapper (x-skala: log, y-skala: probit) eftersom funktionen för koncentrationsrespons efter denna omvandling i många fall blir nästan linjär.

2.3 UTVÄRDERING AV RESULTATEN (FÖRUTSÄGBARHETSMODELLER)

2.3.1 Förutsägarhetsmodell version 1: Fotoirritationsfaktor (PIF)

Om man som resultat får fullständiga koncentrations-responskurvor både i närvaro (+UVA) och i frånvaro (-UVA) av ljus, kan en fotoirritationsfaktor (PIF) beräknas med hjälp av följande formel:

$$(a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

En PIF-faktor under 5 tyder på att kemikalien inte har fototoxisk potential, medan en PIF-faktor ≥ 5 tyder på fototoxisk potential.

Om en kemikalie endast är cytotoxisk när den testas med +UVA men inte är cytotoxisk när den testas med -UVA kan PIF inte beräknas, även om detta är ett resultat som tyder på fototoxisk potential. I ett sådant fall kan man beräkna ett "> PIF"-värde om (-UV)-cytotoxicitetstestet genomförs upp till den högsta testkoncentrationen (C_{max}) och detta värde används för beräkning av "> PIF":

$$(b) \quad > PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Om endast "> PIF" kan erhållas tyder varje värde större än 1 på fototoxisk potential.

Om varken EC₅₀ (-UV) eller EC₅₀ (+UV) kan beräknas på grund av att en kemikalie inte uppvisar någon cytotoxicitet upp till den högsta testkoncentrationen, tyder detta på avsaknad av fototoxisk potential. I sådana fall används ett formellt värde "PIF = *1" för att karakterisera resultatet:

$$(c) \quad PIF = *1 = \frac{C_{\max}(-UV)}{C_{\max}(+UV)}$$

Om endast "PIF = *1" kan erhållas tyder detta på avsaknad av fototoxisk potential.

I fall (b) och fall (c) skall resultaten från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* omsorgsfullt beaktas vid förutsägelse av den fototoxiska potentialen.

2.3.2 Förutsägbarhetsmodell version 2: MPE (Mean-Photo-Effect)

Alternativt kan en ny version av modellen för förutsägbarhet av den fototoxiska potentialen tillämpas. Denna nya version har tagits fram med hjälp av data från EU/COLIPA-valideringsstudien (15) och har testats under blindförhållanden i en efterföljande studie om *in vitro*-fototoxiciteten hos UV-filterkemikalier (13). Med stöd av denna modell kan man överkomma PIF-modellens begränsningar i fall där EC₅₀ inte kan erhållas. Modellen stöder sig på MPE, ett mått som grundar sig på jämförelse av de fullständiga koncentrations-responskurvorna. MPE-modellen tillämpas med hjälp av ett datorprogram som har utvecklats speciellt för ändamålet vid Humboldt-universitetet (Berlin, Tyskland) och som kan rekvireras kostnadsfritt.

2.4 TOLKNING AV RESULTATEN

Ett positivt resultat i 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* (PIF ≥ 5 eller MPE ≥ 0,1) indikerar att testämnet har fototoxisk potential. Om resultatet fås med koncentrationer under 10 µg/ml är det sannolikt att testkemikalien också fungerar som fototoxin under olika exponeringsförhållanden *in vivo*. Om positivt resultat endast fås med den högsta testkoncentrationen på 100 µg/ml kan det vara nödvändigt med ytterligare överväganden för bedömningen av risk eller fototoxisk potential. Sådana kan inbegripa data om penetrering, absorption och möjlig ackumulering av kemikalien i huden, eller testning av kemikalien i ett bekräftande alternativt test, t.ex. med modell av human hud *in vitro*.

Ett negativt resultat från 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* (PIF < 5 eller MPE < 0,1) indikerar att testämnet under gällande förhållanden inte är fototoxiskt för de odlade däggdjurscellerna. I fall där kemikalien kan testas upp till den högsta koncentrationen på 100 µg/ml indikerar ett negativt resultat att kemikalien saknar fototoxisk potential och att fototoxicitet *in vivo* kan anses osannolik. I fall där identisk koncentrations-toxicitetsrespons (EC₅₀+UV och EC₅₀-UV) fås vid lägre koncentrationer skall data tolkas på samma sätt. Om däremot ingen fototoxicitet kan påvisas (+UV och -UV) och om begränsad vattenlöslighet medför att man inte kan få koncentrationer på över 100 µg/ml, måste testämnets lämplighet för bestämningen ifrågasättas och bekräftande testning bör övervägas (t.ex. med modell av human hud *in vitro*, hudmodell *ex vivo* eller *in vivo*-test).

3 RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skall innehålla följande uppgifter:

Testkemikalie:

- identifieringsdata och CAS-nr (i mån av tillgänglighet)
- fysikalisk form och renhetsgrad
- fysikalisk-kemiska egenskaper av betydelse för studien
- stabilitet och fotostabilitet (i mån av tillgänglighet)

Lösningsmedel:

- motivering för valet av lösningsmedel
- testkemikalies löslighet i det valda lösningsmedlet
- procenthalten lösningsmedel i behandlingsmediet (EBSS eller PBS)

Celler:

- typ av celler och deras källa
- frånvaron av mykoplasma
- antalet cellpassager (i mån av tillgänglighet)
- cellernas UVA-känslighet, bestämd med den bestrålningsutrustning som använts för 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro*

Försöksförhållanden (a); *inkubering före och efter behandlingen:*

- näringslösningens (kulturmediets) typ och sammansättning
- inkuberingsförhållanden (CO₂-koncentration, temperatur, fuktighet)
- inkuberings varaktighet (förbehandling, efterbehandling)

Försöksförhållanden (b); *behandling med kemikalien:*

- motivering för valet av de koncentrationer av testkemikalien som använts i närvaro och i frånvaro av bestrålning med UV/synligt ljus
- om testkemikalien är begränsat löslig och om cytotoxicitet inte föreligger, motivering för den högsta koncentration som testats
- typ av och sammansättning hos behandlingsmediet (buffrad saltlösning)
- kemikaliebehandlings varaktighet

Försöksförhållanden (c); *bestrålning:*

- motivering för valet av den ljuskälla som använts
- ljuskällans spektrala strålningsegenskaper
- transmissions- och absorptionsegenskaper hos filter som använts
- radiometerns egenskaper och närmare uppgifter om kalibreringen
- avstånd mellan ljuskälla och testsystem
- UVA-bestrålning på detta avstånd, uttryckt i mW/cm²
- varaktigheten hos bestrålningen med UV/synligt ljus
- UVA-dos (bestrålning × tid), uttryckt i J/cm²
- temperatur som använts för cellodlingarna under bestrålningen och för cellodlingar som parallellt hållits i mörker

Försöksförhållanden (d); *NRU-test*

- sammansättning hos NR-mediet
- NR-inkuberings varaktighet
- inkuberingsförhållanden (CO₂-koncentration, temperatur, fuktighet)
- NR-extraktionsbetingelser (extraktionsmedel, varaktighet)
- våglängd som använts för spektrofotometrisk avläsning av optisk densitet för NR
- annan våglängd (referens), om sådan har använts
- spektrofotometerblindprovets innehåll, om blindprov har använts

Resultat

- cellviabilitet som erhållits vid varje koncentration av testkemikalien, uttryckt som genomsnittlig procentuell andel jämfört med kontrollernas viabilitet
- koncentrations-responskurvor (testkemikaliekoncentration i förhållande till relativ cellviabilitet), som erhållits i parallella försök med +UVA och -UVA
- dataanalys av koncentrations-responskurvorna: om möjligt beräkning av EC₅₀ (+UVA) och EC₅₀ (-UVA)
- jämförelse av de två koncentrations-responskurvorna som erhållits i närvaro och i frånvaro av bestrålning med UVA/synligt ljus, antingen genom beräkning av PIF eller genom beräkning av MPE
- klassificering av fototoxisk potential
- kriterier för godkännande av testet (a), *parallell negativkontroll:*
 - absolut viabilitet (optisk densitet hos NR-extrakt) hos bestrålade och obestrålade celler
 - historiska data för negativkontroll, medelvärde och standardavvikelse
- kriterier för godkännande av test (b), *parallell positivkontroll:*
 - EC₅₀(+UVA) och EC₅₀(-UVA) och PIF för positivkontrollkemikalie
 - historiska data för positivkontrollkemikalie: EC₅₀(+UVA) och EC₅₀(-UVA) och PIF, medelvärde och standardavvikelse

Diskussion av resultaten

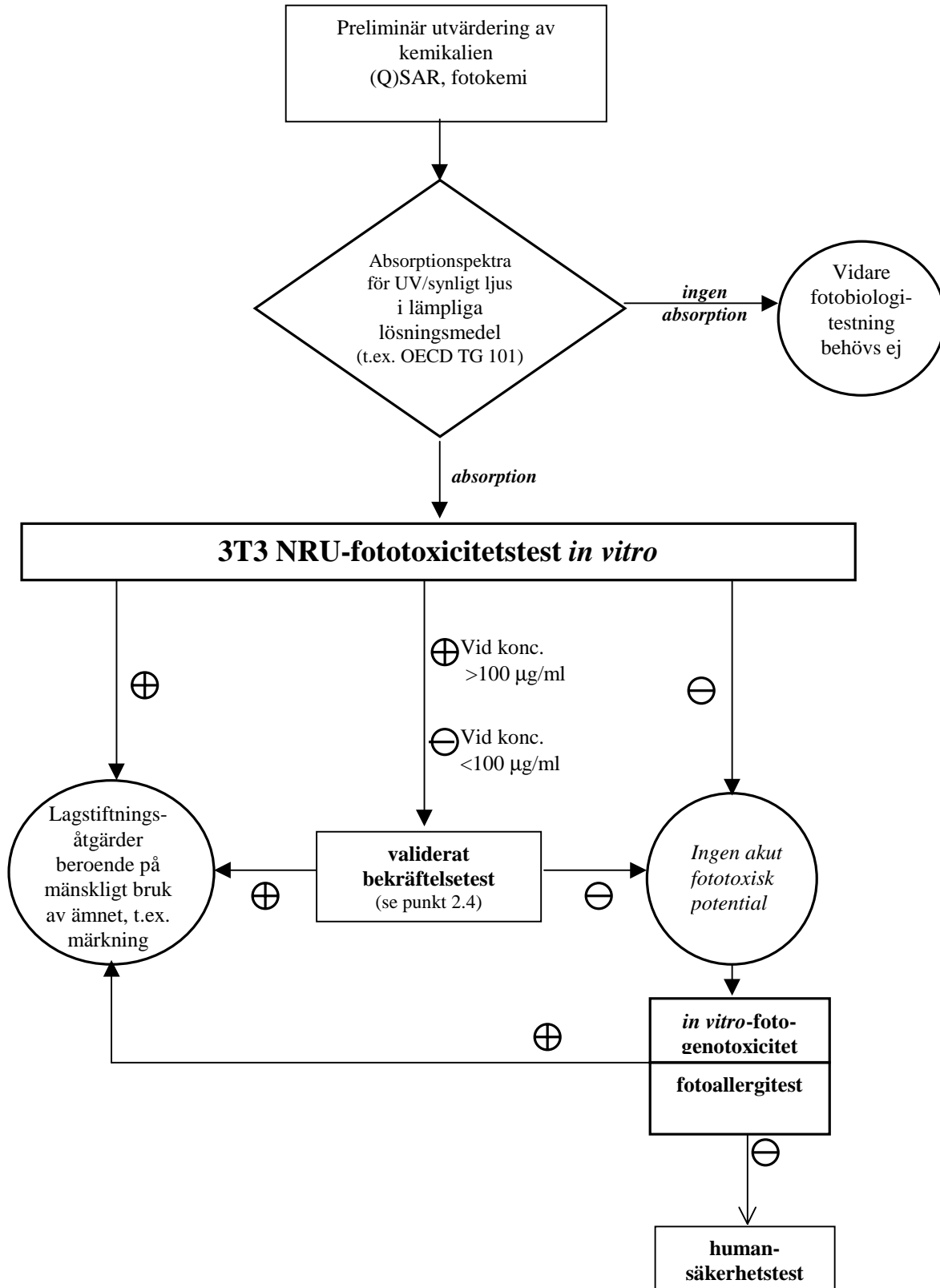
Slutsatser

HÄNVISNINGAR

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., Pothast, J., De Silva, O., Steiling, W. och 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**, s. 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**, s. 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., Pothast, J.M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. och 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**, s. 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**, s. 95–102.
6. Santamaria, L. och Prino, G. (1972): List of the photodynamic substances. I: "Research progress in organic, biological and medicinal chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co, Amsterdam, s. XI–XXXV.
7. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. och Sladowski, D. (1994): *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2. ATLA **22**, s. 314–348.
8. Spikes, J.D. (1989): Photosensitization. I: Smith, K.C. (Red.): "The science of photobiology". Plenum Press, New York; 2:a uppl. s. 79–110.
9. Borenfreund, E. och Puerner, J.A. (1985): Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* **24**, s. 119–124.
10. Lambert L.A, Warner W.G. och Kornhauser A. (1996): Animal models for phototoxicity testing. I: Marzulli, F.N. och Maibach, H.I. (Red.): "Dermatotoxicology". Taylor & Francis, Washington DC; 5:e uppl. s. 515–530.
11. Tyrrell R.M. och 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**, s. 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. och 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**, s. 679–708.
14. Holzhütter, H.G. och Quedenau, J. (1995): Mathematical modelling of cellular responses to external signals. *Journal of Biological Systems* **3**, s. 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**, s. 445–462.

BILAGA 1

Rollen hos 3T3 NRU-fototoxicitetstest i en sekventiell metod för testning av kemikaliers fototoxicitet



C.13 BIODIVERSITET: GENOMFLÖDESPROVNING MED FISK

1. METOD

Denna biokoncentrationsmetod är en kopia av OECD TG 305 (1996).

1.1 INLEDNING

Denna metod beskriver en procedur för karakterisering av potentialen för biokoncentration av ämnen i fisk vid genomflöde. Även om genomflödesprov är att föredra, kan halvstatistiska metoder tillåtas, förutsatt att giltighetskriterierna uppfylls.

Metoden ger tillräckliga upplysningar för genomförandet av provet, samtidigt som den ger lämplig frihet för experimentell utformning av förhållandena i vissa laboratorier och varierande karakteristik för de undersökta ämnena. Metoden gäller framför allt för stabila organiska kemikalier med värden på $\log P_{ow}$ mellan 1,5 och 6,0 (1) men kan även gälla för superlipofila ämnen (med $\log P_{ow}$ större än 6,0). Förbedömningen av biokoncentrationsfaktorn (BCF), ibland benämnd K_B , för sådana superlipofila ämnen kommer sannolikt att vara högre än den biokoncentrationsfaktor vid stabilt tillstånd (BCF_{ss}) som kan förväntas fås vid laboratorieexperiment. Uppskattningar av biokoncentrationsfaktorn för organiska kemikalier med värden för $\log P_{ow}$ upp till ungefär 9,0 kan fås med Bintein-ekvationen vid al (2). De parametrar som karakteriserar biokoncentrationspotentialen inkluderar upptagningskonstanten (k_1), utsöndringskonstanten (k_2) och BCF_{ss} .

Radioaktiv märkning av de ämnen som skall undersökas kan underlätta analysen av vatten- och fiskprover och kan användas för att fastställa huruvida degraderingsidentifiering och kvantifiering skall göras. Om den totala radioaktiva resten mäts (t ex genom förbränning eller vävnadsupplösning), grundas BCF på huvudblandningen, eventuella kvarvarande metaboliter och assimilerat kol. BCF-värden grundade på de totala radioaktiva resterna kan därför inte jämföras direkt med ett BCF från specifika kemiska analyser av enbart huvudblandningen.

Rengöringsprocedurer kan användas i undersökningar där radioaktiv märkning förekommer, för fastställande av BCF grundat på huvudblandningen, och de större metaboliterna kan vid behov karakteriseras. Det är också möjligt att kombinera en fiskmetabolismstudie med en biokoncentrationsstudie genom analys och identifiering av vävnadsrester.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Biokoncentrationen/bioackumuleringen är ökningen av koncentrationen av det undersökta ämnet i eller på en organism (specificerad vävnad därav) i förhållande till koncentrationen av det undersökta ämnet i omgivande medium.

Biokoncentrationsfaktorn (BCF eller K_A) vid varje tidpunkt under upptagningsfasen av ackumulationsprovet är det undersökta ämnets koncentration i/på fisken eller den specificerade vävnaden därav (C_f som $\mu\text{g/g}$ (ppm)), dividerat med det kemiska ämnets koncentration i omgivande medium (C_w som $\mu\text{g/ml}$ (ppm)).

Den stabila biokoncentrationsfaktorn (BCF_{ss} eller K_A) genomgår ingen väsentlig förändring under en längre tidsperiod, om koncentrationen av det undersökta ämnet i omgivande medium är konstant under denna tidsperiod.

Platån eller stabiliteten nås när mängden undersökt ämne i fisk (C_f) i den tidpunkt där kurvan blir parallell med tidsaxeln och tre på varandra följande C_f -analyser, på prover tagna med intervaller på minst två dagar, ligger inom $\pm 20\%$ på de tre proverna och det inte är några betydande skillnader mellan de tre provningsperioderna. När kombinerade prover analyseras krävs minst fyra på varandra följande analyser. När de undersökta ämnena tas upp långsamt bör provtagningsintervallerna vara sju dagar.

Biokoncentrationsfaktor som beräknas direkt från förhållandet mellan kinetiska konstanter (k_1/k_2) kallas kinetisk koncentrationsfaktor, BCF_K .

Fördelningskoefficienten oktanol/vatten (P_{ow}) är förhållandet då det kemiska ämnet lösbarhet i n-oktanol och vatten når balans (metod A.8), också uttryckt som K_{ow} . Logaritmen för P_{ow} används som en indikering på det kemiska ämnets potential för biokoncentration i vattenorganismer.

Exponerings- eller upptagningsfasen är den tid under vilken fisken exponeras för det undersökta ämnet.

Konstanten för upptagningsförhållandet (k_1) är det numeriska värde som definierar ökningshastigheten av koncentrationen av det undersökta ämnet i/på den undersökta fisken eller specificerad vävnad därav, när fisken exponeras för nämnda kemiska ämne (k_1 uttrycks som dag^{-1}).

Efterexponerings- eller utsöndringsfasen (förlustfasen) är den period, efter det att den undersökta fisken flyttats från ett medium innehållande det undersökta ämnet till ett medium fritt från detta ämne, under vilken utsöndringen (eller nettoförlusten) av det aktuella ämnet från den undersökta fisken eller specificerad vävnad därav studeras.

Utsöndringskonstanten (förlustkonstanten) (k_2) är det numeriska värdet för minskningshastigheten av koncentrationen av det undersökta ämnet i den undersökta fisken eller i specificerad vävnad därav, efter överföring av den undersökta fisken från ett medium innehållande det undersökta ämnet till ett medium fritt från detta ämne (k_2 uttrycks som dag^{-1}).

1.3 PROVNINGSMETODEN

Provet består av två faser: exponerings-(upptagnings-) och efterexponerings-(utsöndrings-)fasen. Under upptagningsfasen exponeras separata grupper av en fiskart för minst två koncentrationer av det undersökta ämnet. Fiskarna överförs därefter till ett medium fritt från det undersökta ämnet för utsöndringsfasen. Utsöndringsfas krävs alltid med mindre ämnesupptagningen under upptagningsfasen varit obetydlig, t ex om BCF är mindre än 10. Koncentrationen av det undersökta ämnet i/på fisken eller specificerad vävnad därav skall följas under de bägge provningsfaserna. Utöver de två provningskoncentrationerna skall en kontrollgrupp fiskar hållas under identiska förhållanden, förutom frånvaron av det undersökta ämnet, för att kunna jämföra eventuella negativa effekter i biokoncentrationsprovet mot en jämförbar kontrollgrupp och för att få bakgrundskoncentrationen av det undersökta ämnet.

Upptagningsfasen sträcker sig över 28 dagar, med mindre det kan visas att balans nås tidigare. Beräkning av upptagningsfasens längd fram till stabilitet kan göras med den ekvation som visas i bilaga 3. Utsöndringsperioden inleds därmed genom överföring av fisken till samma medium, men utan det undersökta ämnet, i ett annat rent kärl. När så är möjligt skall biokoncentrationsfaktorn beräknas helst både som koncentrationsförhållandet (BCF_{ss}) i fisken (C_f) och i vattnet (C_w) vid uppenbar stabilitet och som en kinetisk biokoncentrationsfaktor, BCF_K , som förhållandet mellan konstanterna för upptagningshastigheten (k_1) och utsöndringen (k_2), varvid första ordningens kinetik skall förutsättas. Om första ordningens kinetik uppenbarligen inte följs, skall mer komplexa modeller tillämpas (se bilaga 5).

Om stabilitet inte uppnås inom 28 dagar skall upptagningsfasen förlängas tills stabilitet nås eller till 60 dagar, beroende på vilket som inträffar först, varefter utsöndringsfasen påbörjas.

Konstanten för upptagningshastigheten, konstanten för utsöndringshastigheten (eller konstanterna om mer komplexa modeller används), biokoncentrationsfaktorn och när så är möjligt tillförlitlighetsgränserna för var och en av dessa parametrar beräknas med den modell som bäst beskriver den uppmätta koncentrationen av det undersökta ämnet i fisken och vattnet.

BCF uttrycks som en funktion av fiskens totala, våta vikt. I specialfall kan emellertid specificerade vävnader eller organ, som t ex muskler, lever osv, användas, om fisken är tillräckligt stor eller den kan delas upp i ätbara (filé) och icke ätbara (inälvor) delar. Eftersom det för många organiska ämnen föreligger ett klart samband mellan potentialen för biokoncentrationen och fettupptagningsförmågan, finns det också ett motsvarande förhållande för fettinnehållet i den undersökta fisken och den observerade biokoncentrationen av sådana ämnen. För att minska denna källa till variationer i provningsresultaten för ämnen med hög fettupptagningsförmåga, dvs med $\log P_{ow} > 3$, bör därför biokoncentrationen uttryckas i förhållande till fettinnehållet förutom i förhållande till hela kroppsvikten.

Fettinnehållet skall fastställas för samma biologiska materia som används för fastställande av koncentrationen av det undersökta ämnet om så är genomförbart.

1.4 INFORMATION OM DET UNDERSÖKTA ÄMNET

Innan biokoncentrationsprovet utförs skall följande information om det undersökta ämnet finnas tillgänglig:

- a) lösningsbarhet i vatten
- b) uppdelningskoefficienten P_{ow} för oktanol/vatten (också betecknad K_{ow} , fastställd med HPLC-metod i A.8)
- c) hydrolys
- d) ljusöverföring i vatten fastställd vid solbestralning eller simulerad solstrålning och under de strålningsförhållanden som gäller för undersökningen av biokoncentrationen (3)
- e) ytspänning, dvs för ämnen där $\log P_{ow}$ inte kan fastställas
- f) ångtryck
- g) biologisk nedbrytbarhet (när så är tillämpligt)

Annan information som krävs är giftigheten för de fiskarter som skall användas under provet, företrädesvis det asymptotiska LC_{50} , dvs tidsberoende. Det måste finnas lämplig analysmetod med känd noggrannhet, precision och känslighet för fastställande av mängden undersökt ämne i provlösningar och biologisk materia, tillsammans med uppgifter om beredning och förvaring av proverna. Den analytiska detektionsgränsen för det undersökta ämnet skall också vara känd för både vatten och fiskvävnad. När ^{14}C -märkta ämnen används skall procentandelen radioaktivitet kopplad till föroreningar vara känd.

1.5 PROVETS GILTIGHET

Följande omständighet skall vara uppfyllda för att provet skall vara giltigt:

- Temperaturvariationen skall vara mindre än $\pm 2^{\circ}C$.
- Koncentrationen av löst syre får inte falla under en mättnad på 60%.
- Koncentrationen av det undersökta ämnet i kärnen skall hållas inom $\pm 20\%$ av det medelvärde som mäts under upptagningsfasen.
- Dödligheten eller andra negativa effekter/sjukdomar i både kontroll- och behandlingsgrupp skall vara mindre än 10% vid slutet av försöket. Om försöket förlängs över flera veckor eller månader skall dödligheten eller andra negativa effekter i bägge fiskgrupperna vara mindre än 5% per månad och får inte överstiga 30% totalt.

1.6 REFERENSBLANDNINGAR

Användning av referensblandningar med känd biokoncentrationspotential kan vara lämpligt vid kontroll av experimentförfarandet när så krävs. Specifika ämnen kan emellertid ännu inte rekommenderas.

1.7 BESKRIVNING AV PROVNINGSMETODEN

1.7.1 Apparater

Material som kan lösas upp, absorberas eller läcka och som har negativ effekt på fisken skall nogsamt undvikas i alla delar av utrustningen. Vanliga rektangulära eller cylindriska tankar, tillverkade av kemiskt beständigt material och med lämplig kapacitet vad gäller fyllningshastigheten skall användas. Användning av mjuka plaströr bör minimeras. Helst bör rör av teflon ®, rostfritt stål och/eller glas användas. Erfarenheten visar att kiselglas kan krävas för ämnen med hög absorptionskoefficient, som t ex syntetiska pyretroider. I dessa fall skall utrustningen slängas efter användningen.

1.7.2 Vatten

Naturligt vatten används vanligtvis vid undersökningen och bör tas från en oförorenad källa med jämn kvalitet. Lösningvattnet måste hålla en kvalitet som möjliggör överlevnad för valda fiskarter under acklimatiserings- och provningsperioderna, utan att fiskarna uppvisar onormala förändringar eller beteende. I idealfallet skall det kunna visas att de arter som används kan överleva, växa och reproducera sig i vattenlösningen, t ex vid laboratorieodling eller en giftundersökning under livsrytten. Vattnet skall bestämmas avseende pH, hårdhet, partikelförekomst, total mängd organiskt kol och helst även ammonium, nitrit och alkalitet, samt för havslevande arter även salthalt. De parametrar som är viktiga för fiskens optimala välbefinnande är fullt ut kända, men i bilaga 1 anges rekommenderade maximala koncentrationer för ett antal parametrar för söt- och havsvattenprover.

Vattnet skall hålla jämn kvalitet under hela undersökningen. PH-värdet skall ligga mellan 6,0 och 8,5, men under pågående provning skall det ligga inom ± 0.5 enheter. För att säkerställa att vattnet inte påverkar undersökningens resultat på oönskat sätt, t ex genom förändring av det undersökta ämnet, eller negativt påverkar fiskbeståndets förutsättningar, skall prover tas med jämna mellanrum för analys. Tungmetaller, t ex Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, viktigare an- och katjoner, t ex Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄, bekämpningsmedel, t ex medel som helt består av organisk fosfor eller organiska kloriner, totala mängden organiskt kol och utfällda fasta partiklar skall göras t ex var tredje månad när vattenlösningen är känd för att hålla en relativt jämn kvalitet. Om vattenkvaliteten har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras mer sällan och intervallerna utökas, till t ex var sjätte månad.

Den naturliga partikelinnehållet samt den totala mängden organiskt kol (TOC) i vattenlösningen skall vara så låg som möjligt för undvikande av absorption av det undersökta ämnet i organisk materia, vilket skulle kunna minska dess biotillgänglighet (4). Det maximalt acceptabla värdet är 5 mg/l för partiklar (torr materia som inte passerar ett filter på 0,45 µm och 2 mg/l för helorganiskt kol (se bilaga 1). Vattnet skall vid behov filtreras före användning. Bidraget till innehållet av organiskt kol i vattnet (exkrementer) från fisk och foderrester skall vara så litet som möjligt. Koncentrationen av organiskt kol i provningskärl skall under undersökningen inte överstiga den koncentration av organiskt kol som härrör från det undersökta ämnet och om sådan används, från lösningssubstratet med mer än 10 mg/l ($\pm 20\%$).

1.7.3 Provlösningar

Det undersökta ämnet skall lösas upp vid lämplig koncentration för förvaring. Förrådslösningen skall helst beredas genom att det undersökta ämnet helt enkelt blandas eller rörs i vattenlösningen. Användningen av lösningsmedel eller dispersanter (lösningssubstrat) rekommenderas inte. Det kan emellertid i vissa fall vara nödvändigt för att få en lämpligt koncentrerad förrådslösning. Lösningssubstrat som kan användas är etanol, metanol, etylenglykolmonometyleter, etylenglykoldimetyleter, dimetylformamid och trietylenglykol. Dispersanter som kan användas är kremofoor RH40, Tween 80, metylcellulosa på 0,01% och HCO-40. Försiktighet skall iaktas vid användning av lätt biologiskt nedbrytbara ämnen, eftersom dess kan förorsaka problem med bakterietillväxt vid genomflödesprovning. Det undersökta ämnet kan vara radioaktivt märkt och skall hålla högsta renhet, företrädesvis >98%.

Vid genomflödesprovet krävs ett system som kontinuerligt släpper ut och löser upp förrådslösningen av det undersökta ämnet, t ex med mätpump, proportionalitetslösningssystem, för att leverera provningskoncentrationerna till provningskärlen. Helst skall minst fem volymsbyten per dag göras i provningskärlen. Genomflödessystemet är att föredra, men när detta inte är genomförbart, t ex om den undersökta organismen påverkas negativt därav, kan en halvstatisk teknik användas, förutsatt att giltighetskriterierna uppfylls. Förrådslösningens och lösningssubstratets flöden skall kontrolleras både 48 timmar före och minst en gång dagligen under pågående provning. Denna kontroll skall omfatta fastställande av flödeshastigheten genom varje provningskammare, samt skall den garantera att flödeshastigheten inte varierar med mer än 20% inom eller mellan kärlen.

1.7.4 Val av arter

Viktiga kriterier vid val av arter är att de skall finnas enkelt tillgängliga, kan skaffas i lämpliga storlekar och kan hållas på ett tillfredsställande sätt i laboratoriemiljö. Andra kriterier vid val av fiskart är betydelsen för rekreation, handel och ekologi samt jämförbar känslighet, tidigare framgångsrik användning osv.

Rekommenderade provarter anges i bilaga 2. Andra arter kan användas, men provningsförfarandet kan då behöva anpassas för att ge lämpliga provningsförhållanden. Underlaget för val av art och experimentmetod skall i detta fall rapporteras.

1.7.5 Hållande av fisk

Fiskbeståndet skall aklimatiseras under minst två veckor i vatten med provningstemperaturen och hela tiden matas med tillräcklig diet av samma typ som skall användas under provet.

Efter en anpassningsperiod på 48 timmar skall dödligheten registreras och följande kriterier tillämpas:

- större dödlighet än 10% av beståndet under sju dagar - fiskbeståndet skall inte användas
- dödlighet på mellan 5 och 10% av beståndet på sju dagar - beståndet skall aklimatiseras under ytterligare sju dagar
- dödlighet på mindre än 5% av beståndet under sju dagar - acceptera beståndet, om mer än 5% av beståndet dött under den andra sjudagsperioden skall hela beståndet avlägsnas.

Kontrollera att fisk som använts vid undersökningen inte har några synliga sjukdomar eller abnormaliteter. Bortskaffa eventuell sjuk fisk. Fisken skall inte behandlas mot sjukdomen under de två närmast på undersökningen följande veckorna.

1.8 FÖRFARANDE VID UNDERSÖKNINGEN

1.8.1 Preliminärt prov

Det kan vara lämpligt att göra ett preliminärt experiment för att optimera provningsförhållandena för den slutgiltiga provningen, t ex val av koncentration för det undersökta ämnet och längd på upptagnings- och utsöndringsfaserna.

1.8.2 Exponeringsförhållanden

1.8.2.1 Upptagningsfasens längd

Upptagningsfasens längd kan bedömas utifrån praktiska erfarenheter, t ex från tidigare undersökning eller en ackumulationsrelaterad kemikalie, eller från vissa empiriska förhållanden tillsammans med kunskap om antingen det undersökta ämnets vattenlöslighet eller partitionskoefficient i oktanol/vatten (se bilaga 3).

Upptagningsfasen skall vara 28 dagar, med mindre det kan visas att balans nås tidigare. Om stabilitet inte nås inom 28 dagar, skall upptagningsfasen förlängas med ytterligare mätningar, tills stabilitet nås eller 60 dagar, om detta inträffar först.

1.8.2.2 Utsöndringsfasens varaktighet

En period motsvarande halva upptagningsfasen är normalt tillräcklig för att få tillräcklig minskning, t ex 95%, av det undersökta ämnet i fiskkroppen (se bilaga 3 för förklaring av bedömningen). Om den tid som krävs för att få en 95-procentig minskning blir orimligt lång, dvs att den överskrider dubbla normala varaktigheten för upptagningsfasen, dvs mer än 56 dagar, kan en kortare period användas, dvs tills koncentrationen av det undersökta ämnet är mindre än 10% av koncentrationen vid stabilitet. För ämnen med ett mer komplext mönster för upptagning och utsöndring än det som representeras av en enstaka fiskmodell med första ordningens kinetik, krävs emellertid utsöndringsfas för fastställande av utsöndringshastigheten. Periodens längd bör emellertid styras utifrån längden på den period som koncentrationen av det undersökta ämnet i fisken ligger kvar över analytiskt mätbar gräns.

1.8.2.3 Antal fiskar

Välj antalet fiskar per undersökt koncentration på ett sådant sätt att minst fyra fiskar per prov finns tillgängliga för varje provtagning. Om större statistisk noggrannhet krävs, behövs fler fiskar per prov.

Om vuxna fiskar användas skall det i rapporten anges huruvida han- eller honfiskar eller bägge sorter använts vid experimentet. Om bägge könen används skall skillnader avseende fettinnehåll mellan könen visas vara utan betydelse innan exponeringen påbörjas. Det kan vara nödvändigt att hålla han- och honfiskar var för sig.

Vid denna typ av undersökningar skall fiskar med jämn vikt alltid väljas, på ett sådant sätt att den minsta fisken inte väger mindre än 2/3 av vad den största väger. Samtliga fiskar skall vara från samma årskull och från samma källa. Eftersom fiskens vikt och ålder ibland förefaller ha stor betydelse för BCF-värdena (1), skall dessa uppgifter registreras korrekt. Det rekommenderas att delar av fiskbeståndet vägs före undersökningen, för fastställande av medelvikten.

1.8.2.4 *Fisktäthet*

En hög fisktäthet används för att minimera minskningen av C_w p.g.a. tillförsel av fiskar vid undersökningens början samt för att undvika en ökning av koncentrationen upplöst syre. Det är viktigt att fisktätheten är anpassad för den art som används. En täthet på 0,1-1,0 g fisk (våt vikt) per liter vatten och dag rekommenderas normalt. Hög täthet kan användas om det visar sig att önskad koncentration av det undersökta ämnet kan upprätthållas inom $\pm 20\%$ och att koncentrationen av upplöst syre inte faller under 60% mättnad.

Vid val av lämpliga system skall hänsyn tas till fiskartens normala beteende. Bottenlevande fisk kan således kräva en större bottenyta i ett akvarium för en viss vattenvolym i förhållande till ytlevande fiskarter.

1.8.2.5 *Utfodring*

Under aklimatiserings- och provningsperioderna skall fisken utfodras med lämplig diet med känd fetthalt och totalt proteininnehåll, i sådan utsträckning att de hålls friska och behåller kroppsvikten. Fisken skall under aklimatiserings- och provningsperioderna utfodras med ungefär 1-2% av kroppsvikten per dag. Detta håller fetthalten relativt konstant i de flesta fiskarter under provet. Fodermängden skall räknas om, t ex en gång per vecka, för att upprätthålla jämn kroppsvikt och fetthalt. Vid denna beräkning kan fiskens vikt i respektive provningskammare bedömas utifrån vikten på den fisk som senast tagits som prov från respektive kammare. Väg inte den fisk som lämnas kvar i kammaren.

Kvarvarande foder och exkrementer skall sugas ut från provningskammaren kort efter utfodringen (30 minuter till 1 timma). Kärlen skall hållas så rena som möjligt under provningen, så att koncentrationen av organisk materia hålls så låg som möjligt, eftersom förekomst av organisk kol kan begränsa det undersökta ämnets biotillgänglighet (1).

Eftersom många foder tillverkas av fiskmjöl, skall fodret analyseras avseendes det undersökta ämnet. Det är också önskvärt att fodret analyseras avseende bekämpningsmedel och tungmetaller.

1.8.2.6 *Ljus och temperatur*

Ljusperioden är vanligtvis 12 till 16 timmar, och temperaturen ($\pm 2^\circ\text{C}$) skall vara anpassad för den undersökta arten (ser bilaga 2). Belysningens typ och egenskaper skall vara kända. Hänsyn skall tas till det undersökta ämnets eventuella fototransformation under strålningsförhållanden vid försöket. Lämplig belysning skall användas för undvikande av exponering av fisken för onaturliga ljusprodukter. Det kan i vissa fall vara lämpligt att använda ett filter för bortfiltrering av UV-strålning under 290 nm.

1.8.2.7 *Provningskoncentrationer*

Fisken exponeras under genomflödesförhållandena för minst två koncentrationer av det undersökta ämnet i vatten. Normalt väljs den högre (eller högsta) koncentrationen av det undersökta ämnet till ungefär 1% av dess akuta asymptotiska LC_{50} och så att den är minst tio gånger högre än den gräns som skall överskridas för detektion i vatten med den använda analysmetoden.

Den högsta provningskoncentrationen kan också fastställas genom division av den akuta LC₅₀ under 96 timmar med lämpligt akut/kroniskt förhållande (lämpliga förhållanden för vissa kemikalier kan vara från ungefär 3 upp till 100). Om möjligt bör andra koncentrationer väljas på ett sådant sätt att de avviker från ovannämnda med en faktor på 10. Om detta inte är möjligt p.g.a. kravet på 1% av LC₅₀ och det analytiska gränsvärdet, kan en lägre faktor än 10 tillämpas eller ¹⁴C-märkning av det undersökta ämnet beaktas. Ingen av använda koncentrationer får ligga över det undersökta ämnets lösningsbarhet.

När lösningsagent används skall dess koncentration inte vara större än 0,1 ml/l och vara lika stor i samtliga kärl. Dess bidrag tillsammans med det undersökta ämnet till det totala innehållet av organiskt kol i provningsvattnet skall vara känt. Denna typ av ämne bör emellertid undvikas i största möjliga utsträckning.

1.8.2.8 *Kontroller*

Kontroll av lösningsvattnet eller, om så är tillämpligt, kontroll av lösningsagenten, skall göras utöver provningsserierna, förutsatt att det kunnat fastställas att agenten inte har någon effekt på fisken. Om så inte är fallet skall bägge kontrollerna göras.

1.8.3 **Frekvens för mätning av vattenkvalitet**

Upplöst syre, TOC, pH och temperatur skall mätas i samtliga kärl under provningen. Den totala hårdheten och eventuellt salthalten skall mätas vid kontrollerna i ett kärl med högre (eller högst) koncentration. Det upplösta syret och eventuellt salthalten skall mätas minst tre gånger - i början, ungefär i mitten och mot slutet av upptagningsperioden - och en gång i veckan under utsöndringsperioden. TOC skall mätas vid början av provet (24 och 48 timmar innan upptagningsfasen initieras) före det att fisken tillsätts och minst en gång i veckan under både upptagnings- och utsöndringsfaserna. Temperaturen skall mätas dagligen, pH i början och slutet av varje period och hårdheten en gång under varje provning. Temperaturen skall helst avläsas kontinuerligt i åtminstone ett kärl.

1.8.4 **Provtagning och analys av fisk och vatten**

1.8.4.1 *Schema för provtagning på fisk och vatten*

Vatten från provningskärlen skall tas både före det att fisken tillsätts samt under upptagnings- och utsöndringsfaserna, för fastställande av koncentrationen av det undersökta ämnet. Prover skall tas av vattnet åtminstone samtidigt som av fisken samt före utfodring. Under upptagningsfasen fastställs koncentrationen av det undersökta ämnet för kontroll av överensstämmelse med giltighetskriterierna.

Prover skall tas på fisken minst fem gånger under upptagningsfasen och vid minst fyra tillfällen under utsöndringsfasen. Eftersom det i bland är svårt att göra en exakt uppskattning av BCF-värdet grundat på detta antal prover, framför allt när annan utsöndringskinetik än första ordningens kan påvisas, kan det vara tillrådligt att ta prover med tätare mellanrum under bägge perioderna (se bilaga 4). Extraproverna skall lagras och bara analyseras om resultaten från första omgångens analyser visar sig vara otillräckliga för beräkning av BCF med önskad noggrannhet.

I bilaga 4 ges ett exempel på ett oacceptabelt provtagningsschema. Andra scheman kan lätt räknas ut med andra antagna värden för P_{ow}, för beräkning av exponeringstiden för att få 95-procentig upptagning.

Provtagningen skall fortsätta under upptagningsfasen tills stabil nivå uppnås, dock minst 28 dagar. Om stabil nivå inte nås inom 28 dagar, skall provtagningen fortsätta tills stabil nivå nås, dock minst 60 dagar, om detta inträffar först. Innan utsöndringsfasen inleds skall fisken överföras till rena tankar.

1.8.4.2 *Provtagning och beredning av prover*

Vattenprover för analys tas genom en tät röranslutning i provningskammarens mittpunkt. Eftersom varken filtrering eller centrifugering alltid separerar den icke-biologiska fraktionen från det undersökta ämnet från den biotillgängliga delen (särskilt för superlipofila kemikalier, dvs kemikalier med log P_{ow}>5) (1) (5), skall proverna inte utsättas för sådan behandling.

Åtgärder bör istället vidtas för att hålla tankarna så rena som möjligt och innehållet fullorganiskt kol skall övervakas under både upptagnings- och utsöndringsfasen.

Ett lämpligt antal fiskar, i normalfallet minst fyra, skall tas från provningskammaren vid varje provtagning. Provtagningsfisken skall sköljas snabbt med vatten, torkas torr, dödas omedelbart på lämpligaste och humanaste sätt och därefter vägas.

Det är lämpligt att under den tid som provet pågår analysera fisken och vattnet omedelbart efter provtagning, för att förhindra försämring eller andra förluster samt för beräkning av ungefärlig upptagnings- och utsöndringshastighet. Mellanalyser förhindrar också förseningar vid fastställande av när en nivå har nåtts.

Om mellanalyser inte görs skall proverna lagras på lämpligt sätt. Innan undersökningen påbörjas skall information om lämplig förvaringsmetod för det aktuella ämnet, t ex djupfrysning, nedkylning vid 4°C, förvaringstid, extraktion osv, skaffas.

1.8.4.3 *Analysmetodens kvalitet*

Eftersom hela proceduren i huvudsak styrs av noggrannhet, precision och känslighet i den analysmetod som används för det undersökta ämnet, skall precision och reproduktionsbarhet för den kemiska analysen kontrolleras experimentellt, vilket även gäller för återhämtning av det undersökta ämnet från både vatten och fisk, vilket skall vara tillfredsställande med den aktuella metoden. Kontrollera också att det undersökta ämnet inte kan upptäckas i det lösningsvattnet som används.

Om så krävs skall C_w - och C_f -värden som fås från undersökningen korrigeras för återhämtnings- och bakgrundsvärden från kontrollerna. Fisk- och vattenprover skall alltigenom hanteras på ett sådant sätt att förorening och förlust minimeras, t ex på grund av absorption från provtagningsanordningarna.

1.8.4.4 *Analys av fiskprov*

Om radioaktivt märkt material används vid undersökningen är det möjligt att analysera den totala radioaktiva märkningen, dvs moderblandning och metaboliter, eller kan proverna rengöras så att moderblandningen kan analyseras separat. De viktigare metaboliterna kan karakteriseras vid stabil nivå, dock senast vid upptagningsfasens slut. Om BCF som total radioaktivt märkt rest är $\geq 1000\%$, kan det vara lämpligt och för vissa kemikaliekategorier, som t ex bekämpningsmedel, starkt rekommendabelt att identifiera och mängdbestämma de rester som uppgår till $\geq 10\%$ av den totala resten i fiskvävnaden vid stabil nivå. Om resterna representerar $\geq 10\%$ av den totala radioaktivt märkta resten i fiskvävnaden identifieras och kvantifieras, är det också rekommendabelt att identifiera och mängdbestämma resterna i provningsvattnet.

Koncentrationen av det undersökta ämnet skall normalt fastställas för varje vägd fiskindivid. Om detta inte är möjligt kan sammanslagning av proverna vid varje provtagningstillfälle göras, men detta begränsar det statistiska förfarandet för erhållna data. Om ett visst statistiskt förfarande och dess funktion är viktiga, skall ett tillräckligt antal fiskar för att tillfredsställa den önskade sammanslagningsproceduren och effekten införas i undersökningen (6) (7).

BCF skall uttryckas både som en funktion av total våt vikt och, för kraftigt lipofila ämnen, som en funktion av fettinnehållet. Fettinnehållet i fisken fastställs om möjligt vid varje provtagningstillfälle. Lämpliga metoder skall användas för fastställandet av fettinnehållet (punkterna 8 och 2 i bilaga 3). Extraktionstekniker med kloroform/metanol kan vara att rekommendera som standardmetod (9). De olika metoderna ger inte identiska värden (10), varför det är viktigt att ange vilken metod som använts. När så är möjligt fettanalysen görs på samma extrakt som det som tagits fram för analys av det undersökta ämnet, eftersom fett ofta måste tas bort från extraktet innan kromatografisk analys kan göras. Fettinnehållet i fisken (som mg fett per kg våt vikt) får vid slutet av experimentet inte skilja sig från innehållet vid experimentets början med mer än $\pm 25\%$. Andelen fasta partiklar i vävnaden skall också registreras för att möjliggöra omvandling av fettkoncentrationen från vått till torrt värde.

2. DATA

2.1 RESULTATBEARBETNING

Upptagningskurvan för det undersökta ämnet fås genom plottning av dess koncentration i /på fisk (eller specificerad vävnad därav) under upptagningsfasen i förhållande till tiden på en aritmetisk skala. Om kurvan når en platå, dvs blir ungefär asymptotisk med tidsaxeln, beräknas BCF_{ss} med följande formel:

$$\frac{C_f \text{ vid stabilitet (medel)}}{C_w \text{ vid stabilitet (medel)}}$$

När stabilitet inte nås, kan BCF_{ss} beräknas med tillräcklig noggrannhet för riskbedömning från en stabilitet vid 80% ($1,6/k_2$) eller 95% ($3,0/k_2$) balans.

Koncentrationsfaktorn (BCF_K) fastställs också som förhållandet k_1/k_2 , de två kinetiska konstanterna av första ordningen. Konstanten för utsöndringshastighet, k_2 fastställs normalt ur utsöndringskurvan, dvs en plottning av ökningen av det undersökta ämnets koncentration i fisken i tiden. Konstanten för upptagningshastigheten, k_1 , beräknas utifrån konstanten k_2 och värdet på C_f som fås från upptagningskurvan (se också bilaga 5). Den bästa metoden för erhållande av BCF_K och hastighetskonstanterna k_1 and k_2 är att göra en icke-linjär parameterbedömning i en dator (11). I annat fall kan grafiska metoder användas för beräkning av k_1 och k_2 . Om det är uppenbart att utsöndringskurvan inte är en kurva av första ordningen, skall mer komplexa modeller tillämpas (se referenser i bilaga 3) och råd inhämtas från biostatistiker.

2.2 TOLKNING AV RESULTAT

Resultaten skall tolkas med försiktighet när uppmätta koncentrationer av den undersökta lösningen påträffas på nivåer nära den analytiska metodens gränsvärdet för detektion.

Tydligt definierade upptagnings- och förlustkurvor är en indikation på att biokoncentrationsdatan är av god kvalitet. Skillnaden i upptagnings/utsöndringskonstanterna mellan de två provningskoncentrationerna skall vara mindre än 20%. Observera att väsentliga skillnader i upptagnings-/utsöndringshastigheterna mellan de två tillämpade provningskoncentrationerna skall registreras och om möjligt förklaras. Tillförlitlighetsgränsen för BCF kan för väl utformade studier sägas ligga runt $\pm 20\%$.

3. RAPPORTERING

Undersökningsrapporten måste innehålla följande information:

3.1 UNDERSÖKT ÄMNE:

- fysisk form och, när så är tillämpligt, fysiokemikaliska egenskaper;
- kemiska identifiering (inklusive eventuellt innehåll av organiskt kol);
- om ämnet är radioaktivt märkt skall den märkta atomens exakta position och andelen radioaktivitet kopplad till föreningar anges.

3.2 UNDERSÖKTA ARTER

- vetenskapligt namn, variant, källa, eventuell förbehandling, acklimatisering, ålder, storleksområde osv:

3.3 PROVNINGSFÖRHÅLLANDEN:

- tillämpat provningsförfarande, t ex genomflöde eller halvstatiskt;
- typ och karakteristik för använd belysning och ljusperiod;

- provets utformning, t ex antal och storlek på provningskammare, vattenväxlingshastighet, antal kopior, antal fiskar per kopia, antal provningskoncentrationer, upptagnings- och utsöndringsfasernas längd, provtagningsfrekvens för fisk och vatten;
- metod för beredning av förrädslösningar och förnyelsefrekvensen (lösningsagent, dess koncentration och bidrag till innehåll av organiskt kol i provningsvattnet måste anges när sådan används);
- nominella provningsförhållanden, medelvärden för uppmätta värden samt deras standardavvikelser i provningskärlen och metod som använts för beräkning av dessa värden;
- vattenkälla, beskrivning av eventuell förbehandling, resultat från eventuell undersökning av fiskens förmåga att överleva i vattnet, samt vattnets karakteristik: pH, hårdhet, temperatur, syrehalt, klorrestvärde om detta mäts, total mängd organiskt kol, utfällda fasta partiklar, salthalt i det undersökta mediet, om tillämpligt, och eventuella andra gjorda mätningar;
- vattenkvalitet i provningskärlen, pH, hårdhet, TOC, temperatur och syrehalt;
- detaljerad information om utfodringen, t ex fodertyp, källa, sammansättning (om möjligt åtminstone fett- och proteininnehåll, mängd och frekvens);
- information om behandlingen av fisk- och vattenprover, inklusive uppgifter om beredning, förvaring, extraktion och analytiska förfaranden, samt deras noggrannhet, för det undersökta ämnet och fettinnehållet (om detta mäts).

3.4

RESULTAT:

- resultat från eventuell preliminär studie;
- dödligheten för kontrollfisken och fisken i varje exponerat kärl, samt eventuellt observerat onormalt beteende;
- fettinnehållet i fisken (om detta fastställs vid provningen);
- kurvor, inklusive samtliga mätdata, över upptagningen och utsöndringen av den undersökta kemikalien i fisken, tiden till stabilitet;
- C_f och C_w (med standardavvikelse och område, om tillämpligt) för samtliga provtagningsstillfällen (C_f uttryckt som $\mu\text{g/g}$ våt vikt (ppm) i hela kroppen eller den specificerade vävnaden därav, t ex fett, och C_w som $\mu\text{g/ml}$ (ppm)), C_w -värden för kontrollserierna (bakgrundsvärden skall också rapporteras);
- biokoncentrationsfaktorn vid stabilitet (BCF_{ss}) och/eller den kinetiska koncentrationsfaktorn (BCF_K) och om tillämpligt den 95-procentiga tillförlitlighetsgränsen för upptagnings- och utsöndringshastighetskonstanterna (samtliga uttryckta i förhållande till hela kroppen och det totala fettinnehållet, om detta mäts, i djuret eller den specificerade vävnaden därav), tillförlitlighetsgränser och standardavvikelser (om tillgängliga) samt metoder för beräkning/dataanalys av samtliga koncentrationer av det undersökta ämnet;
- om strålningsmarkerade ämnen används och om så krävs, kan ackumulationen av eventuella upptäckta metaboliter visas;
- eventuella anmärkningar avseende undersökning, eventuell avvikelse från förfarandet och annan relevant information.

Undvik resultat som t ex "ej upptäckt vid detektionsgränsen" vid framtagningen av undersökningsmetoden och dess experimentella utformning, eftersom sådana resultat inte kan användas för beräkning av hastighetskonstanter.

4.

REFERENSER

- 1) **Connell D.W.** (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms (ung. Bestående kemikaliers bioackumulationsbetende i vattenorganismer). *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 (Fiskbiokoncentrationens icke-linjära beroende av partitionskoefficienten för n-oktanol/vatten). *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 (ung. Direkt ljustransformering av kemikalier i vatten. Riktlinjer för miljöskydd - provning och bedömning av kemikalier). Nr 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 (ung. Biokoncentration i fisk: Jämförelse av biokoncentrationsfaktorer från OECD:s och ASTM:s provningsmetoder, partikelformigt organsikt materials påverkan på kemikaliers biotillgänglighet). Water Quality Institute, Danmark.
- 5) **US EPA 822-R-94-002** (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors (ung. Tekniskt underlag för kvalitetsinitiativet för vattnet i Stora sjöarna, för fastställande av bioackumulationsfaktorer), juli 1994.
- 6) **US FDA**, (Myndigheten för livsmedel och droger) Revision. Handbok för analys av bekämpningsmedel, **1**, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, juli 1975.
- 7) **US EPA** (1974). Avsnitt 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples (ung. Analys av fettvävnad från människa eller djur vid analys av bekämpningsmedelsrester i prov från människa eller djur), 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' (ung. Fastställande av möjliga effekter från kemikalier och avfall på vattenmiljön: degradering, giftighet, bioackumulation), kap. 2.3, del 2. 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* (ung. Utvärdering av vissa fettmetoder för oskadliggörande av förorenande bioackumulation). **10**, sid 1431-1436.
- 11) **CEC**, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985 (ung. Biokoncentration av kemikalier i fisk: genomflödesmetoden - Ringprovningsprogrammet 1984-1985), slutrapport 1987, författare: P. Kristensen and N. Nyholm.
- 12) **ASTM E-1022-84** (Återantagen 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs (ung. Standardförfarande för biokoncentrationsundersökning med fisk och saltvattenblötdjur med två kanaler)

BILAGA 1**KEMISK KARAKTERISTIK FÖR ACCEPTABELT LÖSNINGSVATTEN**

	ÄMNE	KONCENTRATIONS- GRÄNSVÄRDE
1	Partiklar	5 mg/l
2	Total mängd organiskt kol	2 mg/l
3	Ojoniserad ammonium	1 µg/l
4	Klorrester	10 µg/l
5	Total mängd fosfororganiska bekämpningsmedel	50 ng/l
6	Total mängd klororganiska bekämpningsmedel plus flerklorerade bifenyl	50 ng/l
7	Total mängd organiskt klor	25 ng/l
8	Aluminium	1µg/l
9	Arsenik	1µg/l
10	Krom	1µg/l
11	Kobolt	1µg/l
12	Koppar	1µg/l
13	Järn	1µg/l
14	Bly	1µg/l
15	Nickel	1µg/l
16	Zink	1µg/l
17	Kadmium	100 ng/l
18	Kvicksilver	100 ng/l
19	Silver	100 ng/l

BILAGA 2

FISKARTER SOM REKOMMENDERAS FÖR UNDERSÖKNING

	Rekommenderade arter	Rekommenderat temperaturområde för undersökningen (°C)	Rekommenderad total längd på det undersökta djuret (cm)
1	Danio rerio ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrafisk	20 - 25	3.0 ± 0.5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow (art av kvidd)	20 - 25	5.0 ± 2.0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Vanlig karp	20 - 25	5.0 ± 3.0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Ricefish (risfiskart)	20 - 25	4.0 ± 1.0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 - 25	3.0 ± 1.0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Bluegill (art av solabborre)	20 - 25	5.0 ± 2.0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Regnbågslox	13 - 17	8.0 ± 4.0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Stenspigg	18 - 20	3.0 ± 1.0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231

Flera söt- och saltvattenarter har använts i olika länder t ex:

<i>Leiostomus xanthurus</i>	Spot
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Sheepshead minnow (art av tandkarp)
<i>Menidia beryllina</i>	Silverside
<i>Cymatogaster aggregata</i>	Shiner perch
<i>Parophrys vetulus</i>	English sole
<i>Leptocottus armatus</i>	Staghorn sculpin
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Stenspigg
<i>Dicentracus labrax</i>	Havsaborre
<i>Alburnus alburnus</i>	Benlöja

INSAMLING

Den sötvattenfisk som anges i ovanstående tabell är lätt att skaffa och/eller finns lätt tillgänglig under hela året, medan tillgängligheten för havs- och bräckvattenarterna delvis begränsas till respektive länder. De kan födas upp och odlas på fiskodlingar eller laboratorier under sjukdoms- och parasitkontrollerade förhållanden, så att det använda djuret är friskt och har känd stamtavla. Dessa fiskar finns tillgängliga i stora delar av världen.

BILAGA 3

FÖRBESTÄMNING AV LÄNGDEN PÅ UPPTAGNINGS- OCH UTSÖNDRINGSFASERNA

1. Förbestämning av upptagningsfasens längd

Innan provet påbörjas skall en uppskattning av k_2 göras, och hänsyn tas till hur stor del av tiden som krävs för att nå stabilitet kan inhämtas från empiriska förhållanden mellan k_2 och n-oktanol/vattenfördelningskoefficienten (P_{ow}) eller k_2 och vattenlösligheten (s).

En uppskattning av k_2 (dag^{-1}) kan erhållas med t ex följande empiriska förhållande (1):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10}(P_{ow}) + 1,47 (r^2=0,95) \quad [\text{ekvation 1}]$$

För andra förhållanden se hänvisning 2.

Om partitionskoefficienten (P_{ow}) inte är känd, kan en bedömning göras (3) utifrån kunskapen om ämnets vattenlöslighet (s) med följande formel:

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 (r^2 = 0,994) [\text{ekvation 2}]$$

där s står för lösligheten i mol/l : ($n=36$)

Dessa förhållanden gäller enbart för kemikalier med $\log P_{ow}$ -värden mellan 2 och 6,5 (4).

Tiden för att nå en viss del av den stabila nivån kan fås genom tillämpning av så kallad k_2 -bedömning, med den allmänna kinetiska ekvationen för upptagning och utsöndring (första ordningens kinetik):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

eller om C_w är konstant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{ekvation 3}]$$

När stabiliteten börjar närma sig ($t \rightarrow \infty$), kan ekvation 3 reduceras (5) (6) till:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{eller} \quad C_f / C_w = k_1 / k_2 = \text{BCF}$$

$k_1 / k_2 \cdot C_w$ närmar sig då koncentrationen i fisken vid stabilitet ($C_{f,s}$).

Ekvation 3 kan skrivas om på följande sätt:

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{eller} \quad \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{ekvation 4}]$$

Vid användning av ekvation 4 kan tiden för att nå viss stabilitet förutsägas när k_2 förutbestäms med ekvation 1 eller 2.

Som riktlinje kan sägas att den statistiskt optimala längden på upptagningsfasen, för produktion av statistiskt acceptabla data (BCF_K) är den period som krävs för att kurvan över koncentrationslogaritmen för det undersökta ämnet i fisken, plottad mot linjär tidsaxel, till medelpunkten är $1,6/k_2$ eller 80% av den stabila nivån, men inte mer än $3,0/k_2$ eller 95-procentig stabilitet (7).

Tiden för att nå 80-procentig stabilitet är (ekvation 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{eller} \quad t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{ekvation 5}]$$

95-procentig stabilitet fås på motsvarande sätt med ekvationen: $t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$ [ekvation 6]

Upptagningsfasens (upp) längd för ett undersökt ämne med $\log P_{ow} = 4$ blir då (med ekvationerna 1,5 och 6):

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0,414 \cdot (4) + 1,47 & k_2 &= 0,652 \text{ dag}^{-1} \\ \text{upp (80\%)} &= 1,6/0,652, \text{ t ex 2,45 dagar (59 timmar)} \\ \text{eller upp (95\%)} &= 3,0/0,652, \text{ t ex. 4,60 dagar (110 timmar)} \end{aligned}$$

För ett undersökt ämne med $s = 10^{-5}$ mol/l ($\log(s) = -5,0$), är upptagningsfasen (med ekvationerna 1,2,5 och 6):

$$\begin{aligned} \log_{10} (P_{ow}) &= -0,862 (-5,0) + 0,710 = 5,02 \\ \log_{10} K_2 &= -0,414 (5,02) + 1,47 \\ k_2 &= 0,246 \text{ dagar}^{-1} \\ \text{upp (80\%)} &= 1,6/0,246, \text{ t ex 6,5 dagar (156 timmar)} \\ \text{eller upp (95\%)} &= 3,0/0,246, \text{ t ex 12,2 dagar (293 timmar)} \end{aligned}$$

Alternativt kan följande uttryck användas:

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55,31 \text{ (timmar)}$$

Detta uttryck används för beräkning av tiden till det att faktiskt stabilitet nås (4).

2. Förutbestämning av utsöndringsfasens varaktighet

Förutbestämning av den tid som krävs för att minska mängden ämne i kroppen, till en viss del av den ursprungliga koncentrationen, kan också göras med den allmänna ekvationen för upptagning och utsöndring (första ordningens kinetik) (1) (8).

C_w antas vara noll för utsöndringsfasen. Ekvationen kan reduceras till:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{eller} \quad C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

där $C_{f,o}$ är koncentrationen vid början av utsöndringsperioden. 50-procentig utsöndring nås då vid tiden (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{eller} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

95-procentig utsöndring fås på motsvarande sätt med ekvationen:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Om en upptagning på 80% används för den första perioden ($1,6/k_2$) och en 95-procentig förlust i utsöndringsfasen ($3,0/k_2$), är utsöndringsfasen ungefär dubbelt så lång som utsöndringen i upptagningsfasen.

Det är emellertid viktigt att observera att dessa beräkningar är grundade på förutsättningen att upptagnings- och utsöndringsmönstren följer första ordningens kinetik. Om det är uppenbart att första ordningens kinetik inte följs, skall mer komplexa beräkningsmodeller användas (se hänvisning 1).

LITTERATUR (för bilaga 3)

- 1) **Spacie A.** and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. (ung. Alternativa modeller för beskrivning av biokoncentrationen av organiska ämnen i fisk; miljö; gift; kemikalie) **1**, sid 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 (ung. Biokoncentration i fisk: jämförelse av biokoncentrationsfaktorerna från OECD:s och ASTM:s provningsmetoder, partikelformiga ämnens påverkan på kemikaliernas biotillgänglighet). Danska vattenkvalitetsinstitutet.
- 3) **Chiou C.T.** and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol (ung. Fördelning av organiska blandningar i oktanol-vattensystem; miljö; forskning; teknik). **16** (1), sid 4-10.
- 4) **Hawker D.W.** and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish (ung. Lipofila blandningars partitionskoefficients påverkan på biokoncentrationskinetiken med fisk). Wat. Res. **22** (6), sid 701-707.
- 5) **Branson D.R.,** Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society (ung. Amerikanska fiskeförbundets transaktioner), **104** (4), sid 785-792.
- 6) **Ernst W.** (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals (ung. Ackumulering i vattenorganismer. In: Bedömning av provningar för att förutsäga kemikaliers beteende i miljön). Författad av Sheehman P., Korte F., Klein W. och Bourdeau P.H., del 4.4 sid 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
- 7) **Reilly P.M.,** Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. och Sauerhoff M.W. (1977): Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models (ung. Riktlinjer för optimal utformning av experiment för bedömning av parametrar i modeller för första ordningens kinetik) , Can. J. Chem. Eng. 55, sid 614-622.
- 8) **Könemann H.** and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere (ung. Toxicokinetik i fisk: Ackumulering och eliminering av sex klorbenzener i guppy), **9**, sid 3-19.

BILAGA 4

TEORETISKT EXEMPEL PÅ PROVTAGNINGSSCHEMA FÖR

BIOKONCENTRATIONSUNDERSÖKNINGAR FÖR ÄMNEN MED $\log P_{ow} = 4$.

Provtagning av fisk	Tidsschema för provtagning		Antal vattenprover	Antal fiskar per prov
	Längsta tänkbara provtagningsfrekvens (dagar)	Tilläggsprover		
Upptagningsfas	-1		2*	tillsätt 45-80 fiskar
	0		2	
Första	0.3	0.4	2 (2)	4 (4)
Andra	0.6	0.9	2 (2)	4 (4)
Tredje	1.2	1.7	2 (2)	4 (4)
Fjärde	2.4	3.3	2 (2)	4 (4)
Femte	4.7		2	6
Utsöndringsfas				Flytta över fisken till vatten fritt från den undersökta kemikalien
Sjätte	5.0	5.3		4 (4)
Sjunde	5.9	7.0		4 (4)
Åttonde	9.3	11.2		4 (4)
Nionde	14.0	17.5		6 (4)

* Ta prover på vattnet när minst 3 kärvolymmer har levererats.

Värden inom parentes står för antal prover (vatten, fisk) som skall tas om tilläggsprovtagning görs.

Anmärkning: Föregående uppskattning för k_2 för $\log P_{ow}$ på 4.0 är 0.652 dagar⁻¹. Experimentets totala varaktighet är fastställd till:

3 x upp = 3 x 4,6 dagar, dvs. 14 dagar. För uppskattning av "upp", se bilaga 3.

BILAGA 5

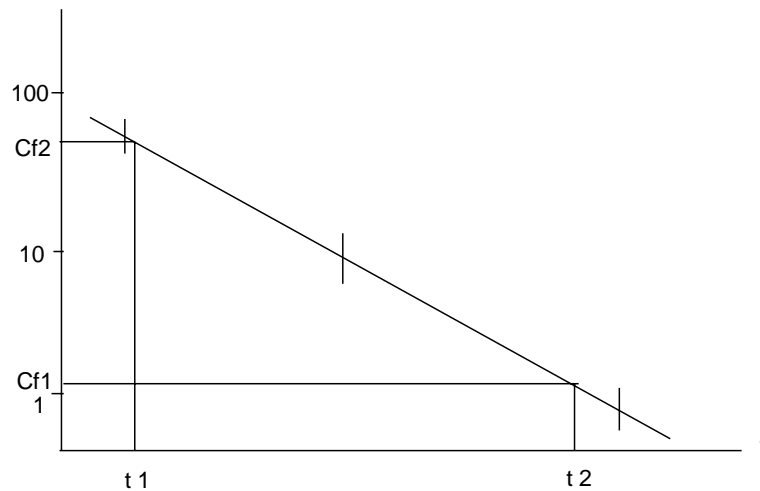
MODELLBESKRIVNING

De flesta biokoncentrationsdata har förutsatts bli skäligen väl beskrivna med en enkel tvådelad modell eller tvåparametersmodell, på det sätt som visas med den räta kurva som närmar sig punkterna för koncentrationen i fisk under utsöndringsfasen, när dessa linjer plottas på halvlogaritmiskt papper. Om dessa punkter inte kan beskrivas av en rät kurva skall mer komplexa modeller användas, se t ex Spacie och Hamelink, hänvisning 1 i bilaga 3.

GRAFISK METOD FÖR BESTÄMMNING AV KONSTANTEN k_2 FÖR UTSÖNDRINGSHASTIGHETEN

Plotta en koncentration av det undersökta ämne som återfinns i varje fiskprov mot provtagningstiden på halvlogaritmiskt papper. Linjens lutning är k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Observera att avvikelser från rät linje kan vara ett tecken på ett mer komplext utsöndringsmönster än första ordningens kinetik. En grafisk metod kan användas för att särskilja utsöndringstyper som avviker från första ordningens kinetik.

GRAFISK METOD FÖR FASTSTÄLLANDE AV KONSTANTEN k_1 FÖR UPPTAGNINGSHASTIGHETEN

När K_2 tagits fram kan konstanten k_1 beräknas med följande formel:

$$k_1 = \frac{c_f k_2}{c_w x (1 - e^{-k_2 t})} \text{ [ekvation 1]}$$

Värdet på C_f avläses i mittpunkten på den jämna upptagningskurva som fås av datan när den logaritmiska koncentrationen plottas i förhållande till tiden på en aritmetrisk skala.

METOD FÖR BERÄKNING AV KONSTANTERNA FÖR UPPTAGNINGS- OCH UTSÖNDRINGSHASTIGHETEN

De medel som föredras för erhållande av biokoncentrationsfaktorn och hastighetskonstanterna k_1 och k_2 är att använda en icke-linjär metod för parameteruppskattning på dator. Dessa program hittar värdena på k_1 och k_2 utifrån en uppsättning koncentrationsdata sekventiella i tiden och med följande ekvationer:

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[ekvation 2]}$$

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad \text{[ekvation 3]}$$

där t_c står för tiden vid slutet av upptagningsfasen.

Med denna metod kan vanliga avvikelsebedömningar göras för k_1 och k_2 .

Eftersom k_2 i de flesta fall kan uppskattas i utsöndringskurvan med förhållandevis hög precision och eftersom ett starkt samband finns mellan de två parametrarna k_1 och k_2 om de beräknas samtidigt, kan det vara tillrådligt att först beräkna k_2 från enbart utsöndringsdata och därefter beräkna k_1 från upptagningsdata med icke-linjär regression.

C.14. TILLVÄXTTEST PÅ UNGA EXEMPLAR AV FISK

1. METOD

Denna metod för tillväxttest avseende toxicitet motsvarar OECD TG 215 (2000).

1.1 INLEDNING

Testet är avsett för bestämning av vilka verkningar långvarig exponering för kemikalier har på tillväxten hos unga exemplar av fisk. Testet baserar sig på en metod för bestämning av verkningarna av kemikalier på tillväxten hos unga exemplar av regnbågslax (*Oncorhynchus mykiss*) under genomflödesförhållanden, en metod som har utvecklats och ringtestats (1)(2) inom Europeiska unionen. Även andra väldokumenterade arter kan användas. Man har t.ex. erfarenheter från tillväxttest med sebrafisk (*Danio rerio*)¹ (3)(4) och "ricefish medaka" *Oryzias latipes*) (5)(6)(7).

Se också den allmänna inledningen, del C.

1.2 DEFINITIONER

Lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): den lägsta testade koncentrationen av ett testämne vid vilken man kan observera signifikanta verkningar (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC måste framkalla skadliga verkningar som är lika stora eller större än de verkningar som kan observeras vid LOEC.

Koncentration vid vilken inga verkningar observeras (No Observed Effect Concentration, NOEC): testkoncentrationen omedelbart under LOEC.

EC_x: den koncentration av testämnet som orsakar en tillväxtvariation på x % hos testexemplaren jämfört med kontrollgruppen.

Fisktäthet: våtvikten fisk per vattenvolym.

Antalstäthet: antalet exemplar per vattenvolym.

Individuell specifik tillväxthastighet: tillväxthastigheten hos en individ, uppmätt med startvikten som utgångspunkt.

Kärlnedvärdet för specifik tillväxthastighet: medeltillväxthastigheten hos en kärlnpopulation vid en viss koncentration.

Pseudospecifik tillväxthastighet: den individuella tillväxthastigheten jämförd med kärlnpopulationens medelbegynnelsevikt.

¹ Meyer, A., Bierman, C.H. och Orti, G. (1993), "The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method", *Proc. R. Soc. Lond. B.* 252, s. 231–236.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Unga fiskexemplar i exponentiell tillväxtfas vägs och placeras i testkärl där de exponeras för en serie subletala koncentrationer av testämnet upplöst i vatten. Exponeringen skall helst ske under genomflödesförhållanden eller, om detta inte är möjligt, under lämpliga halvstatiska förhållanden (statisk förnyelse). Testperiodens längd är 28 dagar. Fiskarna utfodras dagligen. Foderportionen baserar sig på fiskarnas begynnelsevikter och kan räknas om efter 14 dagar. Vid slutet av testet vägs fiskarna på nytt. Verkningarna på tillväxthastigheterna analyseras med en regressionsmodell för att bestämma den koncentration som leder till en variation på x % av tillväxthastigheten, dvs. EC_x (t.ex. EC_{10} , EC_{20} eller EC_{30}). Alternativt kan testdata jämföras med kontrollgruppens värden för att bestämma den lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (LOEC) och den koncentration vid vilken inga verkningar observeras (NOEC).

1.4 INFORMATION OM TESTÄMNET

Det bör finnas tillgång till resultaten från ett test avseende akut toxicitet (se metod C.1), som helst skall ha utförts med samma art som används för detta test. Testämnets vattenlöslighet och ångtryck måste vara kända. Det bör finnas tillgång till en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av ämnet i testlösningen och denna metod bör ha känd och rapporterad noggrannhet och detektionsgräns.

Till information som bör anges hör bl.a. testämnets strukturformel, ämnets renhet, stabilitet i vatten och ljus, pK_a , P_{ow} och resultaten från test avseende biologisk lättnedbrytbarhet (se metod C.4).

1.5 TESTETS GILTIGHET

För att testet skall vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

- Mortaliteten i kontrollgruppen (kontrollgrupperna) får inte överskrida 10 % vid testets slut.
- Medelvikten hos fiskarna i kontrollgruppen (kontrollgrupperna) måste ha ökat tillräckligt för att ge möjlighet att detektera den minsta variation som anses vara signifikant. Resultaten från ett ringtest (2) har visat att medelvikten för exemplar av regnbågslax i kontrollgrupperna under de 28 testdagarna måste ha ökat med minst hälften (50 %) av begynnelsevikten. Om t.ex. begynnelsevikten är 1 g per fisk (= 100 %) bör slutvikten efter 28 dagar vara $\geq 1,5$ g per fisk (≥ 150 %).
- Koncentrationen upplöst syrgas måste under hela testet ha varit minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV).
- Under testet får vattentemperaturen inte vid någon tidpunkt variera med mer än $\pm 1^\circ\text{C}$ mellan olika testkärl och den får variera med högst 2°C från de temperaturgränser som specificerats för den art som används (se bilaga 1).

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 Utrustning

Normal laboratorieutrustning och särskilt

- a) syrgas- och pH-mätare,
- b) utrustning för bestämning av hårdhet och alkalinitet hos vatten,
- c) lämplig utrustning för temperaturreglering, helst med kontinuerlig övervakning,
- d) kärl som är tillverkade av kemiskt inert material och tillräckligt stora med tanke på den rekommenderade fisktätheten och antalstätheten (se avsnitt 1.8.5 och bilaga 1),
- e) lämplig precisionsvåg (t.ex. noggrannhet $\pm 0,5$ %).

1.6.2 Vatten

Som testvatten kan användas allt vatten i vilket den berörda arten uppvisar lämplig överlevnad och tillväxt under en längre period. Testvattnet bör ha konstant kvalitet under hela testperioden. Vattnets pH bör ligga inom intervallet 6,5 – 8,5 men får dock under ett givet test variera med högst $\pm 0,5$ pH-enheter. Hårdhet över 140 mg/l (räknat som CaCO_3) rekommenderas. För att säkerställa att spädvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom komplexbildning med testämnet), bör vattenprover regelbundet tas för analys. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner, t.ex. (Ca, Mg, Na, K, Cl och SO_4), bekämpningsmedel (t.ex. total mängd organiska fosforföreningar eller total mängd organiska klorföreningar), totalt organiskt kol och uppslammade partiklar bör göras t.ex. var tredje månad i fall där man vet att spädvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om vattenkvaliteten har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras med längre intervall (t.ex. var sjätte månad). I bilaga 2 anges ett antal kemiska egenskaper för godtagbart spädvatten.

1.6.3 Testlösningar

Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning.

Stamlösningen bör helst beredas genom enkel blandning eller omskakning av testämnet i spädvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning och ultraljud). Mättnadskolonner (löslighetskolonner) kan användas för att få stamlösning av lämplig koncentration.

I vissa fall kan lösnings- eller dispergeringsmedel (lösningsagenter) behövas för att få en stamlösning av lämplig koncentration. Lämpliga lösningsmedel är t.ex. aceton, etanol, metanol, dimetylsulfoxid, dimetylformamid och trietylglykol. Lämpliga dispergeringsmedel är t.ex. Cremophor RH40, Tween 80, metylcellulosa (0,01 %) och HCO-40. Om man använder agenter som är biologiskt lättnedbrytbara (t.ex. aceton) eller agenter med hög flyktighet bör man iakta särskild försiktighet eftersom sådana agenter kan orsaka problem med bakterieansamling vid genomflödestest. Om en lösningsagent används får den inte ha signifikant verkan på fisktillväxten eller framkalla synliga skadliga verkningar på de unga exemplaren (verkningar som framkommit vid test med rent lösningsmedel).

För genomflödestest behövs ett system som kontinuerligt portionerar och späder ut stamlösning av testämnet så att man får en tillförsel av en serie koncentrationer till testkärnen. Stamlösningens och spädvattnets flödes hastighet bör kontrolleras regelbundet, helst dagligen, och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. Resultaten från ett ringtest (2) har visat att en vattenavlägsning på 6 liter per gram fisk och dag är godtagbar vid test på regnbågslox (se avsnitt 1.8.2.2.).

För halvstatistiskt test (statisk förnyelse) beror mediets förnyelsefrekvens på testämnets stabilitet, men daglig förnyelse rekommenderas. Om resultaten från preliminära stabilitetstest (se avsnitt 1.4) visar att testämnet inte är stabilt (dvs. utanför området 80 – 120 % av nominell koncentration eller under 80 % av uppmätt starkkoncentration) under ett helt förnyelseintervall måste genomflödestest övervägas.

1.6.4 **Val av fiskart**

De flesta erfarenheterna från ringtest (1)(2) gäller regnbågslox (*Oncorhynchus mykiss*) och därför rekommenderas denna art för testet. Även andra väldokumenterade arter kan användas, men då måste testförfarandet eventuellt anpassas så att lämpliga testförhållanden erhålls. Det finns t.ex. erfarenheter från test med sebrafisk (*Danio rerio*) (3)(4) och "ricefish" (medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7). I ett sådant fall måste motiveringen för valet av art och testmetod rapporteras.

1.6.5 **Förvaring av fisk**

Testfiskarna skall tas från en population från en enda stam, helst från samma romläggning. Fiskarna bör, under minst två veckor före testets början, hållas i vatten med samma kvalitet och ljusförhållanden som det som används under testet. Fiskarna bör utfodras med en minimiportion på 2 % kroppsvikt per dag, helst 4 % kroppsvikt per dag, under hela förvaringsperioden och under testet.

Efter en inledande period på 48 timmar registreras mortaliteten och följande kriterier tillämpas:

- Om mortaliteten under sju dagar är högre än 10 % av populationen bör hela satsen förkastas.
- Om mortaliteten ligger mellan 5 och 10 % av populationen fortsätts acklimatiseringen under ytterligare sju dagar. Om mortaliteten under den andra sjudagarsperioden är högre än 5 % bör hela satsen förkastas.
- Om mortaliteten under sju dagar är lägre än 5 % av populationen kan satsen godtas.

Fiskarna bör inte ges behandling mot sjukdomar under de två veckorna före testet eller under testets gång.

1.7 TESTUTFORMNING

Begreppet "testutformning" hänför sig till valet av antalet testkoncentrationer och deras inbördes nivåskillnad, antalet kärl vid varje koncentration och antalet fiskar per kärl. Vid testutformningen bör följande beaktas:

- a) Undersökningens syfte.
- b) Den statistiska analysmetod som kommer att användas.
- c) Tillgången till försöksresurser och deras kostnader.

När det gäller undersökningens syfte bör man, om möjligt, specificera de statistiska krav som gäller för detekteringen av en given skillnad (t.ex. avseende tillväxthastighet) eller, alternativt, den noggrannhet med vilken EC_x (t.ex. $x = 10, 20$ eller 30 och helst inte under 10) måste bestämmas. Utan detta kan en hållbar definition av undersökningens storlek inte ges.

Det är viktigt att vara medveten om att en utformning som är optimal (bästa utnyttjande av resurser) för en viss metod för statistisk analys inte nödvändigtvis är optimal för en annan. Den utformning som rekommenderas för uppskattning av LOEC/NOEC är därför inte densamma som den utformning som rekommenderas för regressionsanalys.

I de flesta fall är regressionsanalys att rekommendera framför variansanalys. Motiveringen till detta diskuteras av Stephan och Rogers (8). Om ingen lämplig regressionsmodell finns att tillgå ($r^2 < 0,9$) bör NOEC/LOEC användas.

1.7.1 Utformning för regressionsanalys

Följande faktorer är viktiga vid utformningen av ett test som skall analyseras med regression:

- a) Den koncentration vid vilken verkningar observeras (t.ex. $EC_{10,20,30}$) och det koncentrationsområde som är av intresse med tanke på testämnets verkningar måste omfattas av de koncentrationer som används vid testet. Den noggrannhet med vilken man kan bestämma den koncentration vid vilken verkningar observeras är bäst när den berörda koncentrationen ligger i mitten av det testade koncentrationsområdet. Ett preliminärt orienterande försök kan vara till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer.
- b) För att göra det möjligt att uppnå en tillfredsställande statistisk modell bör testet inbegripa minst ett kontrollkärl och fem extra kärl vid olika koncentrationer. När en lösningsagent används och när det är lämpligt bör ett kontrollkärl som innehåller lösningsagenten vid den högsta testade koncentrationen köras utöver testserien (se avsnitten 1.8.3 och 1.8.4).
- c) En lämplig geometrisk eller logaritmisk serie (9) (se bilaga 3) kan användas. Fördelningen av testkoncentrationerna skall helst vara logaritmisk.
- d) Om man har tillgång till fler än sex kärl bör de extra kärnen användas för replikat eller fördelas över koncentrationsområdet i syfte att minska skillnaderna mellan de olika koncentrationsnivåerna. Dessa båda alternativ är likvärdiga.

1.7.2 **Utformning för bestämning av NOEC/LOEC med variansanalys (ANOVA)**

Det skall helst finnas replikatkärl vid varje koncentration och den statistiska analysen bör göras på kärlnivå (10). Utan replikatkärl kan man inte beakta variabiliteten mellan kärl utöver den som beror på individuella skillnader mellan fiskar. Erfarenheterna har dock visat (11) att variabiliteten mellan kärl i de undersökta fallen har varit mycket liten jämförd med variabiliteten inom kärlet (dvs. mellan olika fiskar). Det är därför ett relativt godtagbart alternativ att göra den statistiska analysen på nivån för individuella exemplar.

I regel används minst fem testkoncentrationer i en geometrisk serie med en faktor som helst inte bör överskrida 3,2.

När ett test utförs med replikatkärl bör antalet replikatkontrollkärl och därmed antalet fiskar i regel vara det dubbla jämfört med antalet vid testkoncentrationerna, och vid testkoncentrationerna bör antalet vara lika stort (12)(13)(14). Om däremot replikatkärl inte används bör antalet fiskar i kontrollgruppen vara lika stort som antalet vid varje testkoncentration.

Om man utgår från att ANOVA skall grunda sig på kärl i stället för individuella fiskar (det senare fallet skulle innebära antingen individuell märkning av fiskarna eller användning av pseudospecifika tillväxthastigheter (se avsnitt 2.1.2)), måste man ha ett tillräckligt antal replikatkärl för att möjliggöra bestämning av standardavvikelsen för koncentrationerna inom kärlet. Det betyder att frihetsgraderna för fel i variansanalysen bör vara minst 5 (10). Om endast kontrollgrupperna har replikat föreligger det fara för att felvariabiliteten ökar med ökande medelvärde för den berörda tillväxthastigheten. Eftersom tillväxthastigheten sannolikt minskar med ökande koncentration tenderar detta att leda till en överskattning av variabiliteten.

1.8 **FÖRFARANDE**

1.8.1 **Val och vägning av testfisk**

Det är viktigt att minimera fiskarnas viktvariationer vid testets början. I bilaga 1 anges lämpliga storleksområden för de olika arter som rekommenderas för detta test. De individuella vikterna för hela den fisksats som används för testet bör helst ligga inom $\pm 10\%$ av den aritmetiska medelvikten, och får under inga omständigheter överskrida 25 %. Det rekommenderas att ett delprov av fiskar vägs före testet i syfte att uppskatta medelvikten.

Stampopulationen bör hållas utan foder under 24 timmar före testet. Därefter väljs fiskarna ut slumpmässigt. Fiskarna ges allmän bedövning (t.ex. med en vattenlösning av 100 mg/l trikainmetansulfonat (MS 222) neutraliserad genom tillsats av två delar natriumbikarbonat per del MS 222) och deras våtvikt (avtorkad fisk) bestäms individuellt med den noggrannhet som anges i bilaga 1. Fiskar med vikter inom det planerade området väljs ut och fördelas sedan slumpmässigt mellan testkärlen. Den totala våtvikten för fiskarna i vart och ett testkärl bör registreras. Bedövningen och hanteringen av fiskarna (inbegripet avtorkning och vägning) kan orsaka stress och skador på de unga exemplaren, särskilt när det gäller små arter. Därför bör unga exemplar hanteras ytterst försiktigt så att stress och skador på testdjuren undviks.

Fiskarna vägs på nytt på testdag 28 (se avsnitt 1.8.6). Om det bedöms vara nödvändigt att räkna om foderportionen, kan fiskarna dock vägas på nytt på testdag 14 (se avsnitt 1.8.2.3). Det finns också andra metoder, t.ex. fotografiska metoder, för att bestämma om fiskarna har vuxit så mycket att portionerna behöver justeras.

1.8.2 **Exponeringsförhållanden**

1.8.2.1 *Varaktighet*

Testets varaktighet är ≥ 28 dagar.

1.8.2.2 *Fisktäthet och antalstäthet*

Det är viktigt att fisktätheten och antalstätheten är anpassade för de arter som testas (se bilaga 1). Om fisktätheten är för hög uppstår trängselstress som leder till minskade tillväxthastigheter och eventuellt också till sjukdomar. Om fisktätheten är för låg kan det uppstå ett territorialt beteende som också kan påverka tillväxten. Fisktätheten skall under alla omständigheter vara så låg att koncentrationen upplöst syrgas kan hållas på minst 60 % ASV utan luftning. Resultaten från ringtest (2) har visat att det för regnbågslax är lämpligt med en fisktäthet på 16 exemplar à 3 – 5 g i en 40-litersvolym. Rekommenderad vattenavlägsning under testet är 6 liter per fisk och dag.

1.8.2.3 *Utfodring*

Fiskarna skall ges lämpligt foder (bilaga 1) i tillräcklig mängd för att möjliggöra en godtagbar tillväxthastighet. Det är viktigt att se till att det inte uppstår mikrotillväxt och vattenturbiditet. För regnbågslax kan man utgå från att villkoren uppfylls om fiskarna ges en portion på 4 % av kroppsvikten per dag (2)(15)(16)(17). Den dagliga portionen kan delas upp i två lika delar och ges vid två utfodringstillfällen per dag med minst 5 timmars mellanrum. Portionen baserar sig på fiskarnas totala begynnelsevikt i vart och ett av testkärlen. Om fiskarna vägs på nytt på dag 14 kan portionen därefter räknas om. Fiskarna skall inte ges foder under de 24 timmar som föregår vägningen.

Okonsumerat foder och fekal material skall dagligen avlägsnas från testkärlen genom omsorgsfull rengöring av kärlets botten genom sugning.

1.8.2.4 *Ljus och temperatur*

Ljusperioden och vattentemperaturen bör vara anpassade för den art som testas (se bilaga 1).

1.8.3 **Testkoncentrationer**

I regel krävs fem koncentrationer av testämnet, oavsett vilken testutformning som används (se avsnitt 1.7.2). Tidigare kunskaper om testämnets toxicitet (t.ex. från test av akut toxicitet eller preliminära orienterande undersökningar) är till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer. Om färre än fem testkoncentrationer används måste detta motiveras. Den högsta testkoncentrationen får inte överskrida testämnets löslighetsgräns i vatten.

Om en lösningsagent används för att underlätta beredningen av testlösningar får agentens slutkoncentration i testkärlet inte överskrida 0,1 ml/l och samma slutkoncentration bör helst användas i alla testkärl (se avsnitt 1.6.3). Man bör dock sträva efter att undvika användning av lösningsagenter.

1.8.4 **Kontrollsatser**

Antalet spädvattenskontrollsatser beror på testutformningen (se avsnitten 1.7–1.7.2). Om en lösningsagent används bör testet även omfatta lika stort antal kontrollsatser för lösningsagenten som för spädvattnet.

1.8.5 **Frekvensen för analytiska bestämningar och mätningar**

Under testets gång bör testämnets koncentrationer bestämmas med regelbundna intervall (se nedan).

Vid genomflödestest bör flödeshastigheterna för spädlösning och testämnets stamlösning kontrolleras regelbundet, helst dagligen. Under testets förlopp får flödeshastigheterna inte variera med mer än 10 %. Om det förväntas att testämneskoncentrationerna kommer att hållas inom ± 20 % av de nominella värdena (dvs. inom området 80 – 120 %, se avsnitten 1.6.2 och 1.6.3) är det tillrådligt att analysera de högsta och lägsta testkoncentrationerna åtminstone vid testets början och därefter varje vecka. Vid test där det inte förväntas att testämneskoncentrationen kommer att hållas inom ± 20 % av de nominella värdena (med hänvisning till testämnets stabilitetsdata) är det nödvändigt att analysera alla testkoncentrationer, men enligt samma schema.

Vid halvstatiska test (förnyelsetest) där det förväntas att testämneskoncentrationen kommer att hållas inom ± 20 % av de nominella värdena är det tillrådligt att analysera de högsta och lägsta testkoncentrationerna åtminstone när de är nyberedda och strax före förnyelsen. Detta görs vid testets början och därefter varje vecka. Vid test där det inte förväntas att testämneskoncentrationen kommer att hållas inom dessa gränser måste alla testkoncentrationer analyseras enligt samma schema som används för stabilare ämnen.

Det rekommenderas att resultaten grundar sig på de uppmätta koncentrationerna. Om det däremot finns bevis för att testämnets koncentration i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen under hela testperioden, kan resultaten grunda sig på nominella eller uppmätta värden.

Proverna kan behöva filtreras (t.ex. med porstorlek 0,45 μm) eller centrifugeras. Centrifugering rekommenderas. Om testmaterialet inte adsorberas på filter kan dock även filtrering godtas.

Under testets gång mäts upplöst syrgas, pH och temperatur i alla testkärl. Totalhårdhet och salthalt (om relevant) mäts i kontrollsatserna och i ett kärl med den högsta koncentrationen. Upplöst syrgas och salthalt (om relevant) mäts minst tre gånger (vid testets början, mitt och slut). Vid halvstatiskt test rekommenderas att upplöst syrgas mäts oftare, helst före och efter varje vattenförnyelse eller minst en gång i veckan. Vid halvstatiskt test mäts pH i början och i slutet av varje vattenförnyelse och vid genomflödestest minst varje vecka. Hårdheten och alkaliniteten mäts en gång per test. Temperaturen bör mätas dagligen och helst övervakas kontinuerligt i minst ett testkärl.

1.1.6 Observationer

Vikt: Vid testets slut vägs alla fiskar (våtvikt, dvs. avtorkade exemplar) antingen i grupper per testkäril eller individuellt. Vägning per testkäril är att föredra eftersom individuell vägning förutsätter att fiskarna har märkts individuellt. Om man gör individuella vägningar för bestämning av individuell specifik tillväxthastighet bör den märkningsteknik som väljs stressa djuren minimalt (ett lämpligt alternativ till frysmärkning är t.ex. användning av färgad tunn fisklina).

Under testperioden bör fiskarna inspekteras dagligen och alla yttre abnormaliteter (t.ex. blödningar eller avfärgning) och onormalt beteende bör registreras. Varje fall av fiskdöd bör registreras, och döda fiskar bör avlägsnas så snart som möjligt. Döda fiskar skall inte ersättas eftersom fisktätheten och antalstätheten är tillräcklig för att tillväxten inte skall påverkas av ändringar i antalet fiskar per käril. Mängden foder som ges måste dock justeras.

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Det rekommenderas att en statistiker deltar i både utformning och analys av testet, eftersom metoden medger betydande variationer i fråga om testutformning, t.ex. antalet testkäril, antalet testkoncentrationer, antalet fiskar osv. Med hänvisning till de många alternativen för testutformning ges inga specifika anvisningar om statistiska procedurer.

Tillväxthastigheterna bör inte beräknas för testkäril där mortaliteten överskrider 10 %. Mortaliteten bör dock anges för alla testkoncentrationer.

Oavsett vilken metod som väljs för analys av data består det centrala konceptet av den specifika tillväxthastigheten mellan tidpunkten t_1 och tidpunkten t_2 . Denna kan definieras på flera olika sätt, beroende på om fiskarna är individuellt märkta eller inte och om det krävs ett kärilmedelvärde.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e w_2} - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e \overline{w_2} - \log_e \overline{w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

där

r_1	= individuell fiskspecifik tillväxthastighet
r_2	= specifik medeltillväxthastighet i kärlet
r_3	= pseudospecifik tillväxthastighet
w_1, w_2	= vikten hos en viss fisk vid tidpunkten t_1 respektive t_2
$\log_e w_1$	= logaritmen av vikten hos en individuell fisk vid testperiodens början
$\log_e w_2$	= logaritmen av vikten för en individuell fisk vid testperiodens slut
$\overline{\log_e w_1}$	= medelvärdet för logaritmerna av värdena w_1 för fiskarna i kärlet vid testperiodens början
$\overline{\log_e w_2}$	= medelvärdet för logaritmerna av värdena w_2 för fiskarna i kärlet vid testperiodens slut
t_1, t_2	= tidpunkten (dagar) vid testperiodens början och slut

r_1, r_2, r_3 kan beräknas för perioden dag 0 – 28 och i tillämpliga fall (t.ex. om mätning har gjorts dag 14) för perioderna dag 0 – 14 och dag 14 – 28.

2.1.1 **Analys av resultaten genom regression (koncentration-respons-modellering)**

Denna analysmetod innebär att en lämplig matematisk modell anpassas till förhållandet mellan den specifika tillväxthastigheten och koncentrationen. Genom modellen kan man uppskatta EC_x , dvs. önskat EC-värde. När denna metod används behöver r inte beräknas för individuella fiskar (r_1), utan analysen kan i stället basera sig på kärlets medelvärde för r (r_2). Den senare metoden är att föredra. Den är också lämpligare när man använder de minsta arterna.

Kärmedelvärdena för de specifika tillväxthastigheterna (r_2) plottas grafiskt mot koncentrationen, vilket ger möjlighet att granska förhållandet mellan koncentration och respons.

En lämplig modell bör väljas för att uttrycka förhållandet mellan r_2 och koncentrationen. Valet måste motiveras på tillbörligt sätt.

Om antalet fiskar som överlever inte är lika stort i varje kärl bör modellenanpassningen, antingen den är enkel eller icke-linjär, viktas för att kompensera för de olika stora grupperna.

Den metod som används för anpassning av modellen måste ge möjlighet att uppskatta t.ex. EC_{20} och få fram spridningen kring värdet (standardfel eller konfidensintervall). Kurvan för den anpassade modellen bör visualiseras i förhållande till data så att det framgår i hur hög grad modellen stämmer (8)(18)(19)(20).

2.1.2 **Analys av resultaten för uppskattning av LOEC**

Om testet har omfattat replikering av kärl vid alla koncentrationsnivåer kan uppskattningen av LOEC basera sig på en variansanalys (ANOVA) av kärmedelvärdet för specifik tillväxthastighet (se avsnitt 2.1) åtföljd av en lämplig metod (t.ex. Dunnetts eller Williams test (12)(13)(14)(21)) för jämförelse av medelvärdet r för varje koncentration med medelvärdet r för kontrollsatserna, i syfte att hitta den lägsta koncentration för vilken denna skillnad är signifikant vid en sannolikhetsnivå på 0,05. Om de antaganden som krävs för parametriska metoder inte uppfylls – onormal fördelning (t.ex. Shapiro-Wilks test) eller variansen är heterogen (Bartlett's test) – bör man överväga att homogenisera varianserna genom transformering av data före ANOVA. Alternativt kan viktad ANOVA övervägas.

Om testet inte har omfattat replikering av kärl vid varje koncentration är kärlbaserad ANOVA okänslig eller omöjlig. I en sådan situation är det en godtagbar kompromiss att basera ANOVA på den pseudospecifika tillväxthastigheten r_3 för individuella fiskar.

Medelvärdet r_3 för varje testkoncentration kan sedan jämföras med medelvärdet r_3 för kontrollsatserna. LOEC kan därefter fås fram på ovan beskrivet sätt. Det bör konstateras att denna metod inte beaktar eller ger skydd mot variabiliteten mellan kärl, utöver den variabilitet som beaktas genom variabiliteten mellan individuella fiskar. Erfarenheter har dock visat (8) att variabiliteten mellan kärl är mycket liten jämfört med variabiliteten inom ett kärl (dvs. mellan fiskar). Om individuella fiskar inte inkluderas i analysen bör metoden för identifiering av utanförhängande värden anges tillsammans med en motivering.

2.2 TOLKNING AV RESULTATEN

Resultaten bör tolkas med försiktighet när de uppmätta koncentrationerna av det toxiska ämnet i testlösningen ligger på nivåer nära analysmetodens detektionsgräns eller – vid halvstatiska test – när koncentrationen av testämnet minskar mellan nyss beredd lösning och lösningen före förnyelsen.

2.3 TESTRAPPORT

Testrapporten skall innehålla nedan angivna uppgifter.

2.3.1 **Testämne:**

- Aggregationstillstånd och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Kemiska identifieringsdata, inklusive renhet och i tillämpliga fall analysmetod för identifiering av testämnet.

2.3.2 **Testdjur:**

- Vetenskapligt namn.
- Tillgängliga uppgifter om stam, storlek, leverantör, eventuella förbehandlingar osv.

2.3.3 **Testförhållanden:**

- Testförfarande som har använts (t.ex. halvstatiskt test eller genomflödestest, fisktäthet, antalstäthet, osv.).
- Testutformning (t.ex. antalet testkärl, testkoncentrationer och replikat, antalet fiskar per kärl).
- Metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även lösningsageten och dess koncentration anges).
- Nominella testkoncentrationer, de uppmätta värdenas medelvärden och standardavvikelser i testkärlen och den metod med vilken dessa erhöles samt bevis för att mätningarna hänför sig till testämnet koncentrationer i lösningen.
- Spädvattnets egenskaper: pH, hårdhet, alkalinitet, temperatur, koncentrationen upplöst syrgas, restklornivåer (om de har uppmätts), totalt organiskt kol, partikelinnehåll, testmediets salthalt (om den har uppmätts) och resultatet av alla övriga mätningar.
- Vattenkvaliteten i testkärlen: pH, hårdhet, temperatur och halten upplöst syrgas.
- Detaljerade uppgifter om utfodringen (t.ex. typ av foder, källa, hur mycket fiskarna har fått och hur ofta).

2.3.4 **Resultat:**

- Bevis för att kontrollgrupperna uppfyller validitetskriterierna för överlevnad. Data om varje förekomst av fiskdöd.
- Statistiska analystekniker som har använts, statistik baserad på replikat eller fisk, behandlingen av data och motivering för de tekniker som har använts.
- Data i tabellform över individuella fiskvikter och medeltal dag 0, dag 14 (om uppmätt) och dag 28, kärlnedelvärde eller pseudospecifika tillväxthastigheter (enligt det som är lämpligt) för perioderna dag 0 – 28, eller eventuellt dag 0 – 14 och dag 14 – 28.
- Resultat av den statistiska analysen (regressionsanalys eller ANOVA), helst i tabellform och grafisk form samt LOEC ($p = 0,05$) och NOEC eller EC_x, om möjligt med standardfel (enligt det som är lämpligt).
- Förekomsten av eventuella ovanliga reaktioner hos fiskarna och eventuella synliga verkningar som har orsakats av testämnet.

HÄNVISNINGAR

- (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. och Grandy, N.J. (1990), "EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities", *WRc Report No EEC 2600-M*.
- (3) Crossland, N.O. (1985), "A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth", *Chemosphere* **14**, s. 1855–1870.
- (4) Nagel, R., Bresh, H., Caspers, N., Hansen, P.D., Market, M., Munk, R., Scholz, N. och Höfte, B.B. (1991), "Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study", *Ecotox. Environ. Safety* **21**, s. 157–164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975), "Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains", *Keigaku Publish*, Tokio, Japan.
- (6) Holcombe, G.W., Benoit, D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. och Johnson, R.D. (1995), "Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)", *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* **28**, s. 287–297.
- (7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. och 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. och 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 och D J Hansen (red.), *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, s. 328–338.
- (9) Environment Canada (1992), "Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon)", *Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28*, 81 s.
- (10) Cox, D.R. (1958), "Planning of experiments", *Wiley Edt.*
- (11) Pack, S. (1991), "Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology", *WRc Medmenham*, UK, 10–12 december 1991.
- (12) Dunnett, C.W. (1955), "A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control", *J. Amer. Statist. Assoc.*, **50**, s. 1096–1121.
- (13) Dunnett, C.W. (1964), "New tables for multiple comparisons with a control", *Biometrics*, **20**, s. 482–491.
- (14) Williams, D.A. (1971), "A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control", *Biometrics*, **27**, s. 103–117.
- (15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville, N.T. (1994), "A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level", *Aquaculture*, **120**, s. 123–133.

- (16) Quinton, J. C. och 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**, s. 33–41.
- (17) Post, G. (1987), "Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health", *T.F.H. Publications, Inc*, Neptune City, New Jersey, USA, 288 s.
- (18) Bruce, R.D. och Versteeg, D.J. (1992), "A statistical procedure for modelling continuous toxicity data", *Environ. Toxicol. Chem*, **11**, s. 1485–1494.
- (19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. och 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 s.
- (21) Williams, D.A. (1972), "The comparison of several dose levels with a zero dose control", *Biometrics* **28**, s. 510–531.

BILAGA 1

LÄMPLIGA TESTBETINGELSER OCH FISKARTER SOM REKOMMENDERAS FÖR TESTNING

Art	Rekommenderat temperatur-område (°C)	Ljusperiod (timmar)	Rekommenderat intervall för fiskarnas begynnelsevikt (g)	Mättnings-noggrannhet	Fisktäthet (g/l)	Antalstäthet (antal per liter)	Foder	Testets varaktighet (dagar)
Rekommenderad art								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> regnbågslax	12,5 – 16,0	12 – 16	1 – 5	närmaste 100 mg	1,2 – 2,0	4	Torrfooder som är särskilt ägnat för laxyngel	≥ 28
Andra väldokumenterade arter								
<i>Danio rerio</i> sebrafisk	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	närmaste 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 10	Levande föda (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> "ricefish" (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	närmaste 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 20	Levande föda (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥ 28

BILAGA 2

NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR GODTAGBART SPÄDVATTEN

ÄMNE	KONCENTRATIONER
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Restklor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska klorföreningar samt polyklorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt bundet klor	< 25 ng/l

BILAGA 3

LOGARITMISK SERIE AV KONCENTRATIONER LÄMPLIGA FÖR TOXICITETSTEST (9)

Kolumn (antalet koncentrationer mellan 100 och 10 eller mellan 10 och 1)*						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

* En serie av fem (eller flera) på varandra följande koncentrationer kan väljas ur en kolumn. Mittpunkterna mellan koncentrationerna i kolumn (x) finns i kolumn (2x + 1). De listade värdena kan representera koncentrationer uttryckta som procenthalt per volym eller vikt (mg/l eller µg/l). Värdena kan om nödvändigt multipliceras eller divideras med en eller flera tiopotenser. Kolumn 1 kan användas om det råder betydande osäkerhet om toxicitetsnivån.

C.15. FISK, KORTTIDSTEST AVSEENDE TOXICITET PÅ EMBRYO- OCH SÄCKYNGELSTADIerna

1. METOD

Denna metod för korttidstest avseende toxicitet motsvarar OECD TG 212 (1998).

1.1 INLEDNING

Vid detta korttidstest avseende toxicitet på fiskembryon och säckyngel exponeras levnadsstadierna från nyligen befruktade ägg till slutet av säckyngelstadiet. Inget foder ges vid detta test, och testet avslutas medan säckynglen fortfarande får sin näring från gulesäcken.

Testet är avsett för bestämning av de letala och, i begränsad utsträckning, subletala verkningarna av kemikalier på de specifika stadier och specifika arter som testas. Testet kan ge användbar information i flera avseenden: dels bildar det en brygga mellan test avseende letala verkningar och test avseende subletala verkningar, dels kan det användas som ett screeningtest inför ett komplett test av de tidiga levnadsstadierna eller för test avseende kronisk toxicitet. Dessutom kan det användas för test av arter för vilka uppfödningsteknikerna inte är tillräckligt utvecklade för att täcka perioden för övergång från endogen till exogen utfodring.

Man bör beakta att endast tester som täcker alla stadier av fiskens livscykel i regel kan ge en tillförlitlig uppskattning om en kemikalies kroniska toxicitet för fisk, och att minskad exponering av levnadsfaser kan medföra lägre känslighet och underskattning av den kroniska toxiciteten. Man kan därför anta att ett test på embryon och säckyngel är mindre känsligt än ett komplett test av de tidiga levnadsstadierna, särskilt när det gäller kemikalier som är starkt lipofila ($\log P_{ow} > 4$) och kemikalier med ett specifikt toxiskt verkningssätt. Man kan dock förvänta sig mindre skillnader i känslighet mellan de två testerna när det gäller kemikalier som har ett icke-specifikt, narkotiskt verkningssätt (1).

Fram till offentliggörandet av detta test har de flesta erfarenheterna från test på embryon och säckyngel erhållits med sötvattenfisken *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – sebrafisk). Närmare anvisningar om testförfarandet för denna art finns i bilaga 1. Det finns dock inga hinder för att använda andra arter för vilka det finns erfarenheter att tillgå (tabell 1).

1.2 DEFINITIONER

Lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): den lägsta testade koncentrationen av ett testämne vid vilken man kan observera signifikanta verkningar (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC måste framkalla skadliga verkningar som är lika stora eller större än de verkningar som kan observeras vid LOEC.

Koncentration vid vilken inga verkningar observeras (No Observed Effect Concentration, NOEC): testkoncentrationen omedelbart under LOEC.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Fiskens embryo- och säckyngelstadier exponeras för en serie koncentrationer av testämnet upplöst i vatten. Testprotokollet innehåller en möjlighet att välja mellan halvstatiskt test och genomflödestest. Det valda alternativet beror på testämnets egenskaper. Testet inleds med att befruktade ägg placeras i testkärl. Testet avslutas strax innan någon av gulesäckarna i något av testkärlen har absorberats helt eller innan ynglen i kontrollgrupperna börjar dö på grund av svält. De letala och subletala verkningarna bedöms och jämförs med kontrollgruppernas värden i syfte att bestämma den lägsta koncentrationen vid vilken verkningar observeras och den koncentration vid vilken inga verkningar observeras. Alternativt kan verkningarna analyseras med hjälp av en regressionsmodell i syfte att uppskatta den koncentration som framkallar en given procentuell verkan (t.ex. LC/EC_x, där x är en definierad procentuell verkan).

1.4 INFORMATION OM TESTÄMNET

Man bör ha tillgång till resultaten från ett test avseende akut toxicitet (se metod C. 1), som helst skall ha utförts med samma art som används för detta test. Sådana resultat kan vara till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer för testet på tidiga levnadsstadier. Testämnets vattenlöslighet (inbegripet lösligheten i testvattnet) och ångtryck måste vara kända. Man bör ha tillgång till en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av ämnet i testlösningen. Metoden bör ha känd och rapporterad noggrannhet och detektionsgräns.

För definition av testförhållandena bör man ange bl.a. testämnets strukturformel, ämnets renhet, stabilitet i ljus, stabilitet i testförhållandena, pK_a, P_{ow} och resultaten från test avseende biologisk lättnedbrytbarhet (se metod C. 4).

1.5 TESTETS GILTIGHET

För att testet skall vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

- Den totala överlevnaden hos de befruktade äggen i kontrollgrupperna, och i tillämpliga fall i kärnen med rent lösningsmedel, måste vara högre eller lika med de gränsvärden som definieras i bilagorna 2 och 3.
- Koncentrationen löst syrgas måste under hela testet ligga mellan 60 och 100 % av luftmättnadsvärdet (ASV).
- Under testet får vattentemperaturen inte variera med mer än $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ mellan olika testkärl eller mellan påföljande dagar. Vattentemperaturen bör hållas inom de temperaturgränser som specificerats för den art som används (se bilagorna 2 och 3).

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 Testkärl

Kärl av glas eller annat kemiskt inert material kan användas. Kärlen måste vara tillräckligt stora med tanke på lämplig fisktäthet (se avsnitt 1.7.1.2). Det rekommenderas att kärnen placeras slumpvis i testutrymmet. En randomiserad blockutformning med en behandling per block är att föredra framför en fullständigt randomiserad utformning, i de fall där det i laboratoriet förekommer sådana systematiska effekter som kan kontrolleras med hjälp av blockuppdelning. Eventuell blockuppdelning måste beaktas i de efterföljande dataanalyserna. Testkärlen bör avskärmas från oönskade störningar.

1.6.2 Val av fiskart

I tabell 1 A anges rekommenderade fiskarter. Det hindrar inte att andra arter används (se exemplen i tabell 1 B), men då måste testförfarandet eventuellt justeras så att lämpliga testförhållanden kan säkerställas. I ett sådant fall måste testrapporten innehålla en motivering för valet av art och testmetod.

1.6.3 Förvaring av fiskyngel

Närmare uppgifter om lämplig förvaring av fiskyngelstammen finns i OECD TG 210¹ och i hänvisningarna (2), (3), (4), (5), (6).

1.6.4 Hantering av embryon och yngel

Embryon och yngel kan exponeras i mindre kärl, placerade i huvudkärlet, med sidor eller ändar av nät som möjliggör ett flöde av testlösning genom kärlet. För att få ett icke-turbulent flöde genom dessa små kärl kan de hållas hängande från en arm som sänker och höjer kärlet (de får dock inte höjas över ytan). Ett sifonspolat system kan också användas. Befruktade ägg av laxfiskar kan hållas på ställningar eller galler med så stora öppningar att ynglen kan falla igenom efter kläckningen. Om halvstatiskt testförfarande med fullständig daglig förnyelse används rekommenderas pasteur-pipetter för avlägsnandet av embryon och yngel (se avsnitt 1.6.6)

Om äggbehållare, galler eller nät har använts för att hålla äggen inom huvudkärlet tas dessa tillbehör bort efter att ynglen har kläckts, med undantag av nät som behövs för att hålla fiskarna på plats. Om yngel måste flyttas får de inte utsättas för luft, och nät får inte användas för att släppa ut fisk från äggbehållare (dessa säkerhetsåtgärder är eventuellt inte nödvändiga om arten inte är så känslig, t.ex. när man använder karp). Överföringstidpunkten varierar beroende på art och det är inte alltid nödvändigt med en överföring. Vid halvstatiskt test kan man använda bågare eller grunda behållare, vid behov försedda med ett nät som finns en bit ovanför bågarens botten. Om bågarnas volym är tillräcklig med tanke på fisktätheten (se 1.7.1.2) är det eventuellt inte nödvändigt att överföra embryon eller yngel.

1.6.5 Vatten

Som testvatten kan användas allt vatten som uppfyller de kemiska kraven för godtagbart spädvatten enligt bilaga 4 och i vilket testarternas kontrollgrupper har minst den överlevnadsgrad som anges i bilagorna 2 och 3. Testvattnet bör ha konstant kvalitet under hela testperioden. Vattnets pH-värde får variera med högst $\pm 0,5$ pH-enheter. För att säkerställa att spädvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom komplexbildning med testämnet) eller har skadliga verkningar på yngelstammens prestanda, tas vattenprover regelbundet för analys. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner, t.ex. (Ca, Mg, Na, K, Cl och SO₄), bekämpningsmedel (t.ex. total mängd organiska fosforföreningar eller total mängd organiska klorföreningar), totalt organiskt kol och uppslammade partiklar bör göras t.ex. var tredje månad i fall där man vet att spädvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om vattenkvaliteten har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras med längre intervall (t.ex. var sjätte månad).

¹ OECD, Paris, 1992, *Test Guideline 210*, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test".

1.6.6 Testlösningar

Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning.

Stamlösningen bör helst beredas genom enkel blandning eller omskakning av testämnet i spädvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning och ultraljud). Mättnadskolonner (löslighetskolonner) kan användas för att få stamlösning av lämplig koncentration. Man bör så långt som möjligt undvika att använda lösnings- eller dispergeringsmedel (lösningsagenter). Sådana medel kan dock i vissa fall behövas för att få en stamlösning av lämplig koncentration. Lämpliga lösningsmedel är t.ex. aceton, etanol, metanol, dimetylformamid och trietylenglykol. Lämpliga dispergeringsmedel är t.ex. Cremophor RH40, Tween 80, metylcellulosa (0,01 %) och HCO-40. Om man använder agenter som är biologiskt lättnedbrytbara (t.ex. aceton) eller agenter med hög flyktighet bör man iaktta särskild försiktighet eftersom sådana agenter kan orsaka problem med bakterieansamling vid genomflödestest. Om en lösningsagent används får den inte ha signifikant verkan på överlevnaden eller framkalla synliga skadliga verkningar på tidiga levnadsstadier (verkningar som framkommit vid test med rent lösningsmedel). Användningen av sådana ämnen bör undvikas med alla medel.

Vid halvstatiskt test kan man välja mellan två olika förnyelseförfaranden. Det ena innebär att nya testlösningar bereds i rena kärl och överlevande ägg och yngel överförs försiktigt till de nya kärlen i en liten volym gammal lösning, samtidigt som man undviker exponering för luft. Det andra förfarandet innebär att organismerna hålls kvar i kärlen medan en andel (minst tre fjärdedelar) av testvattnet byts ut. Hur ofta mediet måste förnyas beror på testämnets stabilitet, men daglig förnyelse rekommenderas. Om resultaten från preliminära stabilitetstest (se avsnitt 1.4) visar att testämnet inte är stabilt (dvs. utanför området 80–120 % av nominell koncentration eller under 80 % av uppmätt startkoncentration) under ett helt förnyelseintervall, måste genomflödestest övervägas. Under alla omständigheter bör man undvika att stressa ynglen när man förnyar vattnet.

För genomflödestest behövs ett system som kontinuerligt portionerar och späder ut stamlösning av testämnet, så att man får en tillförsel av en serie koncentrationer till testkärnen. Stamlösningens och spädvattnets flödes hastighet bör kontrolleras regelbundet, helst dagligen, och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. En flödes hastighet som motsvarar minst fem testkärnsvolym per 24 timmar har konstaterats vara lämplig (2).

1.7 FÖRFARANDE

I litteraturen finns information om kapaciteten hos toxicitetstest på fiskembryon och säckyngel. Ett antal exempel på litteratur finns i hänvisningarna (7), (8), (9).

1.7.1 Exponeringsförhållanden

1.7.1.1 Varaktighet

Testet bör helst inledas inom 30 minuter efter befruktning av äggen. Embryona läggs i testlösningen före eller så snart som möjligt efter att blastocysten påbörjar klyvning, och under alla omständigheter innan gastrulastadiet inleds. Om äggen kommer från en kommersiell leverantör kan det hända att det inte är möjligt att starta testet strax efter befruktningen. Testets känslighet kan allvarligt påverkas av en försenad teststart. Testet måste inledas inom 8 timmar efter befruktningen. Eftersom ynglen inte utfodras under exponeringsperioden, bör testet avslutas strax innan någon av gulesäckarna i något av testkärnen har absorberats helt eller innan ynglen i kontrollgrupperna börjar dö på grund av svält. Testperiodens längd beror på den art som används. Vissa rekommendationer gällande testperiodens längd finns i bilagorna 2 och 3.

1.7.1.2 *Fisktäthet*

Antalet befruktade ägg vid testperiodens början bör vara tillräckligt med tanke på statistiska krav. Äggen fördelas slumpmässigt mellan behandlingsgrupperna. För varje koncentration används minst 30 befruktade ägg, jämnt fördelade (eller så jämnt det möjligt – med vissa arter är det svårt att få likadana satser) mellan minst tre likadana testkärl. Fisktätheten (biomassa per volym testlösning) får inte vara högre än att man kan hålla koncentrationen löst syrgas på minst 60 % ASV utan luftning. För genomflödestest rekommenderas en fisktäthet som inte överskrider 0,5 g/l per 24 timmar och som under inga omständigheter överskrider 5 g/l lösning (2).

1.7.1.3 *Ljus och temperatur*

Ljusperioden och vattentemperaturen bör anpassas till den art som testas (bilagorna 2 och 3). Temperaturövervakningen kan gärna ordnas med hjälp av ett extra testkärl.

1.7.2 **Testkoncentrationer**

I regel krävs fem koncentrationer av testämnet. Koncentrationerna bör ligga i en serie med en konstant faktor som inte överskrider 3,2. När man väljer testkoncentrationsområde är det viktigt att beakta kurvan som visar sambandet mellan LC_{50} och exponeringsperioden vid test avseende akut toxicitet. I vissa fall kan det vara motiverat med mindre än fem koncentrationer, t.ex. vid gränstest, och ett snävare koncentrationsintervall. Om mindre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Ämneskoncentrationer som är högre än LC_{50} under 96 timmar eller 100 mg/l, beroende på vilken som är lägre, behöver inte testas. Ämnen får inte testas ovanför sin löslighetsgräns i testvattnet.

Om en lösningsagent används för att underlätta beredningen av testlösningar (se avsnitt 1.6.6) får agentens slutkoncentration i testkärlet inte överskrida 0,1 ml/l och samma slutkoncentration bör användas i alla testkärl.

1.7.3 **Kontrollsatser**

En kontrollsats med spädvatten (med tillämpliga replikat) och, om det är relevant, en kontrollsats med lösningsagenten (med tillämpliga replikat) bör köras utöver testserierna.

1.7.4 **Frekvensen för analytiska bestämningar och mätningar**

Under testets gång bör testämnets koncentrationer bestämmas med regelbundna intervall.

Vid halvstatistiskt test, där testämnets koncentration bör hållas inom $\pm 20\%$ av den nominella koncentrationen (dvs. inom området 80 – 120 %, se avsnitten 1.4 och 1.6.6), rekommenderas att de högsta och lägsta testkoncentrationerna åtminstone analyseras strax efter beredningen och strax före förnyandet vid minst tre tillfällen som är jämnt fördelade över testperioden (analyserna görs på ett prov av samma lösning – när den är nyberedd och när den förnyas).

Om det är förväntat att testämnets koncentration inte kommer att hållas inom $\pm 20\%$ av den nominella koncentrationen (på grundval av stabilitetsdata om ämnet) måste alla testkoncentrationer analyseras, när de är nyberedda och när de förnyas, men enligt samma schema (dvs. vid minst tre tillfällen som är jämt fördelade över hela testperioden). Bestämning av testämnets koncentration före förnyandet behöver bara göras på ett replikatkärl per testämneskoncentration. Intervallet mellan bestämningarna får inte vara längre än sju dagar. Det rekommenderas att resultaten grundar sig på de uppmätta koncentrationerna. Om det däremot finns bevis för att testämnets koncentration i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom $\pm 20\%$ av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen under hela testperioden, kan resultaten grunda sig på nominella eller uppmätta startvärden.

Vid genomflödestest kan man lämpligen använda samma provtagningschema som för halvstatiskt test (även om mätningen av "gammal" lösning då inte är tillämplig). Om testperioden sträcker sig över mer än sju dagar kan det vara tillrådligt att utöka antalet provtagningsstillfällen under den första veckan (t.ex. tre mätningomgångar) för att kontrollera att testkoncentrationerna hålls stabila.

Proverna kan behöva centrifugeras eller filtreras (t.ex. med porstorlek 0,45 µm). Eftersom det inte alltid är möjligt att separera den icke-biotillgängliga fraktionen av testämnet från den biotillgängliga fraktionen genom centrifugering eller filtrering bör emellertid dessa behandlingar undvikas.

Under testets förlopp mäts upplöst syrgas, pH och temperatur i alla testkärl. Totalhårdhet och salthalt (om relevant) mäts i kontrollsatserna och i ett kärl med den högsta koncentrationen. Upplöst syrgas och salthalt (om relevant) mäts minst tre gånger (vid testets början, mitt och slut). Vid halvstatiskt test rekommenderas att upplöst syrgas mäts oftare, helst före och efter varje vattenförnyelse eller minst en gång i veckan. Vid halvstatiskt test mäts pH i början och i slutet av varje vattenförnyelse och vid genomflödestest minst varje vecka. Hårdheten mäts en gång per test. Temperaturen bör mätas dagligen och helst övervakas kontinuerligt i minst ett testkärl.

1.7.5 **Observationer**

1.7.5.1 *Stadiet för embryonal utveckling*

Det embryonala stadium (dvs. gastrulastadium) som råder när exponeringen för testämnet inleds bör bekräftas så exakt som möjligt. Detta kan göras på ett representativt prov av ägg som har förvarats på lämpligt sätt. Även litteratur kan konsulteras i fråga om beskrivning och illustration av de embryonala stadierna (2), (5), (10) och (11).

1.7.5.2 *Kläckning och överlevnad*

Observationer av kläckning och överlevnad bör göras minst en gång per dag. Alla antal bör registreras. Det kan vara önskvärt med tätare observationer i början av testperioden (t.ex. med 30 minuters intervall under de tre första timmarna) eftersom överlevnadstiderna i vissa fall kan ha större relevans än blotta antalet dödsfall (t.ex. när det förekommer akuta toxiska verkningar). Döda embryon och yngel bör avlägsnas så snart de observeras, eftersom förruttelse kan ske snabbt. Yttersta försiktighet bör iaktas när döda individer avlägsnas så att man inte slår till eller orsakar fysiska skador på närliggande ägg eller yngel eftersom de är extremt sköra och känsliga. Kriterierna för död varierar beroende på levnadsstadium:

- **Ägg:** särskilt i tidiga stadier en tydligt förlust av genomskinlighet och färgförändringar orsakade av koagulering eller utfällning av protein, vilket leder till ett vitt ogenomskinligt utseende.
- **Embryon:** avsaknad av kroppsrörelse, avsaknad av hjärtslag eller ogenomskinlig missfärgning hos arter vars embryon normalt är genomskinliga.
- **Yngel:** orörlighet, avsaknad av andningsrörelse, avsaknad av hjärtslag, vit ogenomskinlig färgning av centrala nervsystemet eller avsaknad av reaktion på mekanisk stimulering.

1.7.5.3 *Onormalt utseende*

Gulesäckens absorptionsstadium och antalet yngel som har onormal kroppsform eller pigmentering bör registreras med intervall vars längd bestäms enligt testperiodens längd och karaktären hos de abnormaliteter det gäller. Man bör beakta att onormala embryon och yngel även förekommer av naturliga skäl, och kan för vissa arter uppgå till flera procent i kontrollgruppen (kontrollgrupperna). Onormala djur bör inte avlägsnas från testkärlet förrän de har dött.

1.7.5.4 *Onormalt beteende*

Abnormaliteter, t.ex. hyperventilation, okoordinerat simmande och atypisk passivitet bör registreras med intervall vars längd bestäms enligt testperiodens längd. Sådana verkningar kan vara svåra att kvantifiera men kan, när de observeras, vara till hjälp vid tolkningen av dödlighetsdata, dvs. ge upplysningar om ämnets toxiska verkningssätt.

1.7.5.5 *Längd*

Vid testets slut rekommenderas mätning av individuella längder. Om det förekommer röta på stjärtfenan eller frätning av fenorna bör standardlängder användas. I ett väl utfört test bör variationskoefficienten med avseende på längden hos replikaten i kontrollgrupperna i regel vara $\leq 20\%$.

1.7.5.6 *Vikt*

Vid testets slut kan individuella vikter bestämmas. Härvid är torrsvikt (24 timmar vid 60°C) att föredra framför våtsvikt (avtorkning). I ett väl utfört test bör variationskoefficienten med avseende på vikt för replikaten i kontrollgrupperna i regel vara $\leq 20\%$.

Från dessa observationer fås följande data, till alla delar eller delvis, för statistisk analys:

- Kumulativ mortalitet.
- Antalet friska yngel vid försökets slut.
- Tidpunkten för kläckningens början och slut (dvs. kläckning till 90 % i varje replikat).
- Antalet yngel som kläcks per dag.
- Längd (och vikt) för överlevande djur vid testets slut.
- Antalet yngel som är missbildade eller har onormalt utseende.
- Antalet yngel som beter sig onormalt.

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Det rekommenderas att en statistiker deltar i både utformning och analys av testet, eftersom metoden medger betydande variationer i fråga om testutformning, t.ex. antalet testkärl, antalet testkoncentrationer, ursprungligt antal befruktade ägg och vilka parametrar som mäts. Med hänvisning till de många alternativen för testutformning ges inga specifika anvisningar om statistiska procedurer.

Om man avser att uppskatta LOEC- eller NOEC-värden är det nödvändigt att analysera variationerna inom varje replikatgrupp med hjälp av variansanalys (ANOVA) eller kontingenstabellprocedurer. För multipla jämförelser mellan resultaten vid enskilda koncentrationer och resultaten för kontrollgrupperna kan Dunnetts metod rekommenderas (12), (13). Det finns också exempel på andra användbara metoder (14), (15). Storleken på den verkan som kan detekteras med hjälp av ANOVA eller andra procedurer (dvs. testets kapacitet) beräknas och rapporteras. Anmärkningsvis kan konstateras att analys med ANOVA inte lämpar sig för alla observationer som uppräknas i avsnitt 1.7.5.6. Kumulativ mortalitet och antalet friska yngel i slutet av testet kan t.ex. analyseras med probitmetoder.

Om man avser att uppskatta värden på LC eller EC_x bör en eller flera kurvor, t.ex. logistisk kurva, anpassas till relevanta data med hjälp av en statistisk metod, t.ex. minsta kvadrat-metoden eller icke-linjär minsta kvadrat-metod. Kurvan (kurvorna) parametreras så att relevanta värden på LC eller EC_x och motsvarande standardfel kan uppskattas direkt. Därigenom underlättas beräkningen av konfidensintervallet kring LC eller EC_x betydligt. Tvåsidig konfidens på 95 % bör tillämpas, utom när det finns goda skäl för att föredra avvikande konfidensnivåer. Anpassningsproceduren bör helst ge tillgång till ett medel för bedömning av signifikansen eller bristen på signifikans. Grafiska metoder för kurvanpassning kan användas. Regressionsanalys är lämplig för alla observationer som uppräknas i avsnitt 1.7.5.6.

2.2 TOLKNING AV RESULTATEN

Resultaten bör tolkas med försiktighet när de uppmätta koncentrationerna av det toxiska ämnet i testlösningen ligger på nivåer nära analysmetodens detektionsgräns. Likaså bör man vara försiktig vid tolkning av resultaten när det gäller koncentrationer ovanför ämnets vattenlöslighetsgräns.

2.3 TESTRAPPORT

Testrapporten skall innehålla nedan angivna uppgifter.

2.3.1 Testämne:

- Aggregationstillstånd och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Kemiska identifieringsdata, inklusive renhet och i tillämpliga fall analysmetod för kvantifiering av testämnet.

2.3.2 Testdjur:

- Vetenskapligt namn, stam, antalet föräldrafiskar (dvs. hur många honor som behövdes för produktion av det antal ägg som användes i testet), ursprung, metoden för insamling av befruktade ägg och efterföljande behandling av äggen.

2.3.3

Testförhållanden:

- Testförfarande som har använts (t.ex. halvstatistiskt test eller genomflödestest), tiden mellan befruktningen och testets början, fisktäthet osv.).
- Ljusperiod(er).
- Testets utformning (t.ex. antalet testkärn och replikat, antalet embryon per replikat).
- Metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även lösningsagenten och dess koncentration anges).
- Nominella testkoncentrationer, uppmätta värden, deras medelvärden och standardavvikelser i testkärnen och den metod med vilken dessa erhöles. Om testämnet är vattenlösligt vid koncentrationer under de testade, måste man bevisa att mätningarna hänför sig till testämnet koncentrationer i lösningen.
- Spädvattnets egenskaper: pH, hårdhet, koncentrationen upplöst syrgas, restklornivåer (om de har uppmätts), totalt organiskt kol, partikelinnehåll, testmediets salthalt (om den har uppmätts) och resultatet av alla övriga mätningar.
- Vattenkvaliteten i testkärnen: pH, hårdhet, temperatur och halten upplöst syrgas.

2.3.4

Resultat:

- Resultaten från eventuella preliminära test gällande testämnet stabilitet.
- Bevis för att kontrollgrupperna uppfyller normerna för total överlevnad för testdjur (bilagorna 2 och 3).
- Data om mortalitet och överlevnad på embryo- och yngelstadiet och total mortalitet och överlevnad.
- Antalet dagar fram till kläckning och antalet kläckta ägg.
- Data om längd (och vikt).
- Förekomst och beskrivning av morfologiska abnormaliteter (i förekommande fall).
- Förekomst och beskrivning av verkningar på beteendet (i förekommande fall).
- Statistisk analys och behandling av data.
- För test som analyseras med hjälp av ANOVA bör man rapportera den lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (LOEC) vid $p = 0,05$ och den koncentration vid vilken inga verkningar observeras (NOEC) för varje respons som har varit föremål för bedömning, tillsammans med en beskrivning av de statistiska procedurer som har använts och angivelse av hur stark verkan som kunde detekteras.
- För test som har analyserats med hjälp av regressionstekniker bör man ange LC eller EC_x , konfidensintervall och en kurva med den anpassade modell som har använts för beräkningen.
- Motiveringar för varje avvikelser från denna testmetod.

HÄNVISNINGAR

- (1) Kristensen P. (1990), *Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods*, Slutlig rapport till Europeiska gemenskapernas kommission, 60 s, juni 1990.
- (2) ASTM (1988), "Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes", *American Society for Testing and Materials*, E 1241-88, 26 s.
- (3) Brauhn J.L. och Schoettger R.A. (1975), "Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills", s. 54, *Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011*, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W.A. och Jones B.R. (1977), "Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures", s. 128, *Ecological Research Series EPA-600/3-77-061*, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H.W. (1977), "The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review", *J. Biol.* **10**, s. 121-173.
- (6) Legault R. (1958), "A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan)", *Copeia*, **4**, s. 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. och Viktor T. (1987), "Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants", *Environmental Toxicology and Chemistry*, **6**, s. 61-71.
- (8) Birge J.W., Black J.A. och Westerman A.G. (1985), "Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents", *Environmental Toxicology and Chemistry* **4**, s. 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. och Mol F. (1986), "Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*)", *J. Aquatic Toxicology*, **2**, s. 129-145.
- (10) Kirchen R.V. och W. R. West (1969), "Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4", *Carolina Biological Supply Company*.
- (11) Kirchen R.V. och W. R. West (1976), "The Japanese Medaka. Its care and Development", *Carolina Biological Supply Company*, North Carolina. 36 s.
- (12) Dunnett C.W. (1955), "A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J", *Amer. Statist. Assoc.*, **50**, s. 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964), "New Tables for Multiple Comparisons with a Control", *Biometrics*, **20**, s. 482-491.
- (14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. och 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. och Hermes J. (1990), "Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity", *Aquatic Toxicology*, **16**, s. 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, s. 81.

- (17) Dave G. och Xiu R. (1991), "Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*", *Arch. of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, s. 126–134.
- (18) Meyer A., Bierman C.H. och 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, s. 231–236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. och Roubaud P. (1995), "Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo", *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, s. 19–28.
- (20) US EPA, (1991), "Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*", *EPA report EPA/600/3-91/064*, dec. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991), "Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*)", *EPA report EPA/600/3-91/063*, dec. 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. och Marcus M.D. (1991), "Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study", *Environ. Tox. Chem.* 10, s. 1189–1203.
- (23) Calow P. (1993), *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwells, Oxford. Vol. 1, kap. 10, "Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish".
- (24) Balon E.K. (1985), "Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives", *Junk Publ.*, Dordrecht, 280 s.
- (25) Blaxter J.H.S. (1988), "Pattern and variety in development", *W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology*, vol. XIA, Academic press, s. 1–58.

TABELL 1 A: FISKARTER SOM REKOMMENDERAS FÖR TESTNING

SÖTVATTEN
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regnbågslax (9), (16)
<i>Danio rerio</i> Sebrafisk (7), (17), (18)
<i>Cyprinus caprio</i> Karp (8), (19)
<i>Oryzias latipes</i> Japanese ricefish/Medaka (20), (21)
<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow (8), (22)

**TABELL 1 B: EXEMPEL PÅ ÖVRIGA VÄLDOKUMENTERADE ARTER
SOM OCKSÅ HAR ANVÄNTS**

SÖTVATTEN	SALTVATTEN
<i>Carassius auratus</i> Guldfisk (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside (23), (24), (25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Solaborre ("Bluegill") (8)	<i>Clupea harengus</i> Sill (24), (25)
	<i>Gadus morhua</i> Torsk (24), (25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow (23), (24), (25)

BILAGA 1

ANVISNINGAR FÖR TOXICITETSTEST PÅ EMBRYON

OCH SÄCKYNGEL AV SEBRAFISK (*Brachydanio rerio*)

INLEDNING

Sebrafisken härstammar från indiska Coromandel-kusten där den lever i snabbströmmande vatten. Den är en vanlig akvariefisk som tillhör karpfamiljen. Information om vård och odling finns i allmänt tillgängliga referensböcker om tropiska fiskar. En översikt över sebrafiskens biologi och användning för fiskforskning har sammanställts av Laale (1).

Fisken blir sällan längre än 45 mm. Den har en cylinderformad kropp med 7 – 9 mörkblå silverskiftande strimmor. Strimmorna löper in i stjärt- och analfenorna. Ryggen är olivgrön. Hanarna är slankare än honorna. Honorna är mer silverskiftande och har en svällande buk, särskilt före romläggningen.

Vuxna exemplar klarar av stora variationer i temperatur, pH och vattenhårdhet. För att få friska exemplar som producerar ägg av god kvalitet bör man dock se till att betingelserna är optimala.

Vid romläggningen följer hanen efter honan och trycker sig mot henne, och äggen befruktas efterhand som de kommer ut. Äggen, som är genomskinliga och icke-vidhäftande, faller till botten där de i vissa fall kan bli uppätta av föräldrarna. Romläggningen påverkas av ljus. Om morgonljuset är tillräckligt lägger fisken i regel sin rom under de första timmarna efter soluppgången.

En hona kan producera satser om hundratals ägg med en veckas intervall.

BETINGELSER FÖR FÖRÄLDRAGENERATIONEN, REPRODUKTION OCH TIDIGA LEVNADSSTADIER

Ett antal friska exemplar väljs ut och hålls i lämpligt vatten (se t.ex. bilaga 4) under minst två veckor före planerad romläggning. Fiskgruppen bör ha producerat minst en sats avkomma innan den producerar de ägg som används för testet. Fisktätheten under denna period får inte överskrida 1 gram fisk per liter. Om vattnet byts regelbundet eller om det finns ett reningssystem kan högre täthet tillåtas. Temperaturen i förvaringskärnen bör hållas på $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Fisken bör få varierande foder, såväl vanligt torrfoder som levande foder, t.ex. nyckläckta artemia, mygglarver, daphnia och vita maskar (enkyträer).

Nedan beskrivs två förfaranden som i praktiken har gett tillräcklig mängd friska och befruktade ägg för testningsändamål.

- i. Åtta hanar och 16 honor placeras i en behållare som innehåller 50 liter spädvatten. Behållaren bör vara avskärmd från direkt ljus och lämnas så ostörd som möjligt i minst 48 timmar. På eftermiddagen till den dag som föregår testets början placeras en romläggingsbricka på akvariets botten. Romläggingsbrickan består av en ram (plexiglas eller annat lämpligt material) som är 5 – 7 cm hög med ett grovt nät (2–5 mm) fäst upptill och ett fint nät (10 – 30 μm) nedtill. Ett antal "romläggningstråd" av otvinnat nylonrep fästes vid det grova nätet. Efter att fiskarna har hållits i mörker i 12 timmar utsätts de för ett svagt ljus som stimulerar till romläggning. Två till fyra timmar efter romläggningen tas romläggingsbrickan bort och äggen samlas in. Romläggingsbrickan hindrar fiskarna från att äta upp äggen och underlättar samtidigt insamling av äggen. Fiskgruppen bör ha lagt rom minst en gång innan den lägger den rom som används för testet.

- ii. 5–10 hanar och honor förvaras separat i minst två veckor före den planerade romläggningen. Efter 5 – 10 dagar har honorna uppsvälld buk och deras genitalpapiller är synliga. Hanfiskarna har inga papiller. Romläggningen utförs i romläggningsbehållare med nätförsedd botten (se ovan). Behållaren fylls med spädvatten så att vattendjupet ovanför nätet är 5 – 10 cm. En hona och två hanar placeras i behållaren två dagar före den planerade romläggningen. Vattentemperaturen ökas stegvis till ett värde som är en grad högre än acklimatiseringstemperaturen. Ljuset släcks och behållarna lämnas så ostörda som möjligt. På morgonen tänds ett svagt ljus för att stimulera romläggningen. Efter 2 – 4 timmar tas fiskarna bort och äggen samlas in. Om det behövs större äggmängder än en hona kan producera kan man använda tillräckligt antal parallella romläggningsbehållare. De enskilda honornas reproduktionskapacitet registreras före testet (satsens storlek och kvalitet) för att ge möjlighet att välja ut honorna med de bästa reproduktionsegenskaperna för romläggningen.

Äggen överförs till testkärlen med hjälp av glasrör (innerdiameter minst 4 mm) som är försedda med en mjuk sugboll. Vid överföring av äggen bör den medföljande vattenmängden vara så liten som möjligt. Äggen är tyngre än vatten och sjunker ut ur röret. Det är viktigt att se till att ägg (och yngel) inte kommer i kontakt med luft. Ett eller flera prover av satsen eller satserna undersöks i mikroskop för att kontrollera att det inte förekommer irreguläriteter i de första utvecklingsstadierna. Det är inte tillåtet att desinfektera äggen.

Mortaliteten för äggen är högst under de första 24 timmarna efter befruktningen. Under denna period är det vanligt med en mortalitet på 5 – 40 %. Äggen kan degenerera till följd misslyckad befruktning eller utvecklingsstörningar. Äggens kvalitet verkar bero på fiskhonan, eftersom vissa honor genomgående producerar ägg av god kvalitet medan andra aldrig gör det. Även utvecklingshastigheten och kläckningshastigheten varierar mellan olika satser. Framgångsrikt befruktade ägg och säkyngel överlever till stor del, i regel över 90 %. Vid 25°C kläcks äggen 3 – 5 dagar efter befruktningen och gulesäcken har absorberats cirka 13 dagar efter befruktningen.

Den embryonala utvecklingen har definierats väl av Hisaoka och Battle (2). Äggen och nykläckta yngel är genomskinliga och därför kan man följa med fiskens utveckling och observera eventuella missbildningar. Cirka fyra timmar efter romläggningen kan man se skillnaden mellan obefruktade ägg och befruktade ägg (3). För denna undersökning placeras ägg och yngel i små testkärn och granskas under mikroskop.

De testbetingelser som bör användas för de tidiga levnadsstadierna uppräknas i bilaga 2. Optimala värden för pH och spädvattnets hårdhet är 7,8 respektive 250 mg CaCO₃/l.

BERÄKNINGAR OCH STATISTIK

En tvåstegsmetod rekommenderas. Först görs en statistisk analys av data gällande mortalitet, onormal utveckling och kläckningstid. Därefter görs en statistisk utvärdering av kroppslängden hos de exemplar som behandlats i koncentrationer vid vilka inga skadliga verkningar på någon av de nämnda parametrarna har detekterats. Denna metod rekommenderas eftersom ett toxiskt ämne selektivt kan döda mindre fisk, förlänga kläckningstiden och framkalla grova missbildningar, vilket leder till missvisande längdmättningsresultat. Dessutom mäts ungefär samma antal fiskar per behandling, vilket säkerställer de statistiska resultatens giltighet.

BESTÄMNING AV LC₅₀ OCH EC₅₀

Procentandelen överlevande ägg och yngel beräknas och korrigeras för mortaliteten i kontrollgrupperna, enligt Abbotts formel (4):

$$P=100-\left(\frac{C-P'}{C}\cdot x100\right)$$

där

P = korrigerad procentandel överlevande,
P' = procentandel överlevande som observerats i testkoncentrationen,
C = procentandelen överlevande i kontrollgruppen.

I mån av möjlighet bestäms LC₅₀ vid testets slut med en lämplig metod.

Anvisningar för hur man kan få in morfologiska abnormaliteter i EC₅₀-statistiken har publicerats av Stephan (5).

UPPSKATTNING AV LOEC OCH NOEC

Ett av syftena med testet på ägg och säckyngel är att jämföra koncentrationer över noll med kontrollgruppens koncentrationer, dvs. att bestämma värdet på LOEC. Därför bör förfaranden med multipeljämförelse användas (6), (7), (8), (9), (10).

HÄNVISNINGAR

- (1) Laale H.W. (1977), "The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review", *J. Fish Biol.* **10**, s. 121–173.
- (2) Hisaoka K.K. och Battle H.I. (1958), "The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan)", *J. Morph.*, **102**, s. 311.
- (3) Nagel R. (1986), "Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan)", *Journal of Applied Ichthyology*, **2**, s. 173–181.
- (4) Finney D.J. (1971), *Probit Analysis*, 3:e uppl., Cambridge University Press, Storbritannien, s. 1–333.
- (5) Stephan C.E. (1982), "Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds", *American Society for Testing and Materials*, s. 69–81.
- (6) Dunnett C.W. (1955), "A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control", *J. Amer. Statist. Assoc.*, **50**, s. 1096–1121.
- (7) Dunnett C.W. (1964), "New Tables for Multiple Comparisons with a Control", *Biometrics*, **20**, s. 482–491.
- (8) Williams D.A. (1971), "A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control", *Biometrics*, **27**, s. 103–117.
- (9) Williams D.A. (1972), "The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control", *Biometrics* **28**, s. 519–531.
- (10) Sokal R.R. och Rohlf F.J. (1981), *Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

BILAGA 2

TESTBETINGELSER, TESTPERIOD OCH ÖVERLEVNADESKRITERIER FÖR REKOMMENDERADE ARTER

ARTER	TEMP. (°C)	SALT-HALT (0/00)	LJUS- PERIOD (timmar)	STADIERNAS LÄNGD (dagar)		TYPISK TESTPERIOD	ÖVERLEVNAD I KONTROLLGRUPPER, (MINIMUM, %)	
				Embryo	Säckyngel		Kläcknings- framgång	Efter kläckning
SÖTVATTEN								
<i>Brachydanio rerio</i> Sebrafisk	25 ± 1	–	12–16	3–5	8–10	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrulastadium) till fem dagar efter kläckning (8–10 dagar)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regnbågslox	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	–	0 ^(a)	30–35	25–30	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrulastadium) till 20 dagar efter kläckning (50–55 dagar)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Karp	21–25	–	12–16	5	> 4	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrulastadium) till 4 dagar efter kläckning (8–9 dagar)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Japanese ricefish/Medaka	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	–	12–16	8–11	4–8	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrulastadium) till 5 dagar efter kläckning (13–16 dagar)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow	25 ± 2	–	16	4–5	5	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrulastadium) till 4 dagar efter kläckning (8–9 dagar)	60	70

⁽¹⁾För embryon ⁽²⁾För yngel

^(a)Mörker för embryon och yngel tills att det gått en vecka efter kläckning, utom när de inspekteras. Därefter dämpad belysning till testets slut.

BILAGA 3

TESTSBETINGELSER, TESTPERIOD OCH ÖVERLEVNADSKRITERIER FÖR ANDRA VÄLDOKUMENTERADE ARTER

ARTER	TEMP (°C)	SALT-HALT (0/00)	LJUSPERIOD (timmar)	STADIERNAS LÄNGD (dagar)		TYPISK PERIOD FÖR TEST PÅ EMBRYO OCH SÄCKYNGEL	ÖVERLEVNAD I KONTROLLGRUPPER, (MINIMUM, %)	
				EMBRYO	TEST PÅ SÄCK-YNGEL		Kläcknings- framgång	Efter kläckning
SÖTVATTEN								
<i>Carassius auratus</i> Guldfisk	24 ± 1	–	–	3–4	> 4	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrulastadium) till 4 dagar efter kläckning (7 dagar)	–	80
<i>Leopomis macrochirus</i> ”Blugill sunfish”	21 ± 1	–	16	3	> 4	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrulastadium) till 4 dagar efter kläckning (7 dagar)	–	75
SALTVATTEN								
<i>Menidia peninsulae</i> ”Tidewater silverside”	22–25	15–22	12	1,5	10	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrulastadium) till 5 dagar efter kläckning (6–7 dagar)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Sill	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrulastadium) till 3 dagar efter kläckning (23–27 dagar)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Torsk	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrulastadium) till 3 dagar efter kläckning (18 dagar)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> ”Sheepshead minnow”	25 ± 1	15–30	12	–	–	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrulastadium) till 4 eller 7 dagar efter kläckning (28 dagar)	> 75	80

BILAGA 4

NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR GODTAGBART SPÄDVATTEN

ÄMNE	KONCENTRATIONER
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Restklor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska klorföreningar samt polyklorerade bifenyl	< 50 ng/l
Total mängd organiskt bundet klor	< 25 ng/l

C.16. HONUNGSBIN – TEST AVSEENDE AKUT TOXICITET (ORALT)

1. METOD

Denna testmetod för akut toxicitet motsvarar OECD TG 213 (1998).

1.1 INLEDNING

Detta test är en laboriemetod för bedömning av växtskyddsprodukters och andra kemikaliers akuta toxicitet (oralt) på vuxna arbetsbin.

Vid bedömning och utvärdering av olika ämnens toxiska egenskaper kan det vara nödvändigt att bestämma den akuta toxiciteten (oralt) på honungsbin, t.ex. när det är sannolikt att bin kommer att exponeras för en viss kemikalie. Testet för akut toxicitet (oralt) används för att bestämma bekämpningsmedels och kemikaliers toxicitet för bin. Resultatet av detta test används för att avgöra om det behövs ytterligare utvärderingar. Metoden kan särskilt användas i stegvisa program för bedömning av de risker som bekämpningsmedel kan medföra för bin. Dessa program bygger på en sekventiell arbetsgång från laborietoxicitetstest till semifält- och fältförsök (1). Bekämpningsmedel kan testas som verksamma ämnen eller som formulerade produkter.

En giftekvivalent bör användas för att fastställa binas känslighet och testförfarandets noggrannhet.

1.2 DEFINITIONER

Akut toxicitet (oralt): de skadliga verkningar som uppträder inom en period på högst 96 timmar efter oral tillförsel av en engångsdos av testämnet.

Dos: den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikten (μg) testämne per försöksdjur ($\mu\text{g}/\text{bi}$). Den faktiska dosen per enskilt bi kan inte beräknas eftersom bina matas kollektivt, men det går att uppskatta en genomsnittsdos (total konsumtion av testämnet dividerat med antalet testbin i en bur).

LD₅₀ (median letal dos) oralt: en statistiskt fastställd engångsdos av ett ämne som kan förväntas leda till döden för 50 % av de djur som fått dosen på oral väg. LD₅₀-värdet uttrycks som μg testämne per bi. När det gäller bekämpningsmedel kan testämnet vara ett verksamt ämne eller en formulerad produkt som innehåller ett eller flera verksamma ämnen.

Mortalitet: ett djur registreras som dött när det är helt orörligt.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Vuxna arbetsbin honungsbi (*Apis mellifera*) exponeras för en serie doser av testämnet som dispergerats i sackaroslösning. Därefter utfodras bina med samma foder, men utan tillsats av testämne. Mortaliteten registreras dagligen under minst 48 timmar och jämförs med kontrollgruppens värden. Om mortaliteten ökar under perioden 24–48 timmar efter tillförseln, medan kontrollgruppens mortalitet hålls på en godtagbar nivå, dvs. $\leq 10\%$, bör testet förlängas till högst 96 timmar. Resultaten analyseras för beräkning av LD₅₀ vid 24 och 48 timmar och, om testet har förlängts, även vid 72 och 96 timmar.

1.4 TESTETS GILTIGHET

För att testet skall vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

- Genomsnittsmortaliteten för det totala antalet kontroldjur får inte överskrida 10 % vid testets slut.
- De värden som erhålls för LD₅₀ för giftekvivalenterna skall ligga inom det specificerade området.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Insamling av bin**

För testet används unga vuxna arbetsbin av samma ras, ålder, näringstillstånd osv. Bina tas från adekvat utfodrade, friska, så långt som möjligt sjukdomsfria samhällen med renrasiga drottningar med känd historia och fysiologisk status. Bina bör samlas in på testdagens morgon eller kvällen före testet och hållas i testförhållandena fram till följande dag. Bin som insamlats från yngelfria ramar rekommenderas. Insamling tidigt på våren eller sent på hösten bör undvikas eftersom bina då har genomgått fysiologiska förändringar. Om ett test måste genomföras tidigt på våren eller sent på hösten kan bina kläckas i en inkubator och födas upp med "bibrod" (pollen som insamlats från vaxkakan) och sackaroslösning under en vecka. Bin som har behandlats med kemiska ämnen såsom antibiotika, varroabekämpningsmedel osv. får inte användas för toxicitetstest förrän det har gått fyra veckor från att den sista behandlingen avslutades.

1.5.2 **Förvarings- och utfodringsförhållanden**

Burarna bör vara enkla att rengöra och välventilerade. Burarna kan vara tillverkade i t.ex. rostfritt stål, nät eller plast. Även träburar för engångsbruk kan användas. Grupper om tio bin per bur rekommenderas. Burarnas storlek bör anpassas efter antalet bin och vara tillräckligt rymliga.

Bina hålls i mörker i ett testrum med en temperatur på $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Den relativa fuktigheten, i regel kring 50–70 %, registreras under hela testförloppet. Hanteringen, såsom behandling och observationer, kan däremot genomföras i (dags)ljus. Som foder ges sackaroslösning i vatten med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % vikt per volym). Efter tillförelse av testdoserna ges bina fri tillgång till foder. Utfodringsystemet bör vara utformat på sådant sätt att foderkonsumtionen per bur kan registreras (se avsnitt 1.6.3.1). För utfodringen kan ett ca 50 mm långt och 10 mm brett glasrör användas, vars öppna ända smalnar av till en diameter på cirka 2 mm.

1.5.3 **Förberedelse av bina**

De insamlade bina fördelas slumpvis i testburarna som placeras ut slumpvis i testrummet.

Bina kan hållas utan foder i upp till 2 timmar före testets början. Det rekommenderas att bina inte ges foder före behandlingen för att alla bin skall ha jämförbart tarminnehåll vid testets början. Döende bin avlägsnas och ersätts med friska bin före testets början.

1.5.4 **Förberedelse av doserna**

Om testämnet är vattenlösligt kan det dispergeras direkt i en 50 % sackaroslösning. För tekniska produkter och ämnen med låg vattenlöslighet kan ett organiskt lösningsmedel, emulgeringsämnen eller dispergeringsämnen med låg toxicitet användas som vehikel (t.ex. aceton, dimetylformamid eller dimetylsulfoxid). Vehikelkoncentrationen beror på testämnets löslighet och bör vara densamma för alla testkoncentrationer. I regel är en vehikelkoncentration på 1 % lämplig och denna koncentration bör inte överskridas.

Det behövs också lämpliga kontrolllösningar, dvs. om lösningsmedel eller dispergeringsmedel används för att lösa upp testämnet måste två separata kontrollgrupper användas: en som får vattenlösning och en som får sackaroslösning med lösningsmedlet eller vehikeln i samma koncentration som används för doseringslösningarna.

1.6 FÖRFARANDE

1.6.1 Test- och kontrollgrupper

Antalet doser och replikat som testas bör väljas så att de uppfyller de statistiska kraven för bestämning av LD₅₀ med 95 % konfidensintervall. I regel används fem doser i en geometrisk serie med en faktor på högst 2,2. Doserna bör täcka området för LD₅₀. Utspädningsfaktorn och antalet doskoncentrationer fastställs med beaktande av toxicitetskurvas lutning (dos i förhållande till mortalitet) och den statistiska metod som används för analys av resultaten. Ett preliminärt test kan användas som stöd för valet av lämpliga doskoncentrationer.

Varje testkoncentration bör ges till minst tre likadana testgrupper med tio bin per grupp. Utöver själva testserierna bör minst tre kontrollgrupper med tio bin per grupp också behandlas. Kontrollgrupper bör också användas för eventuella lösningsmedel eller vehiklar som används (se avsnitt 1.5.4).

1.6.2 Oalent

Testserien bör även omfatta en giftekvivalent. Minst tre doser bör väljas på sådant sätt att de täcker det förväntade LD₅₀-värdet. Minst tre likadana burar med tio bin per bur bör användas för varje testdos. Som giftekvivalent rekommenderas dimetoat, vars LD₅₀-värde (oralt, 24 timmar) enligt rapporterade uppgifter ligger inom området 0,10–0,35 µg verksamt ämne per bi (2). Även andra giftekvivalenter kan godtas förutsatt att man har tillgång till tillräckliga data om förväntad dosrespons (t.ex. paration).

1.6.3 Exponering

1.6.3.1 Tillförsel av doser

Varje testgrupp med bin ges 100–200 µl 50 % sackaroslösning i vatten som innehåller vald koncentrationen av testämnet. För ämnen som har låg löslighet, låg toxicitet eller låg koncentration i formuleringen krävs en större volym, eftersom större proportioner måste användas i sackaroslösningen. Mängden behandlat foder som konsumeras per grupp följs upp. När utfodringsbehållaren är tom (i regel inom 3–4 timmar) tas den ut ur buren och ersätts med en behållare som innehåller ren sackaroslösning. Bina får därefter fri tillgång till sackaroslösning. För vissa ämnen kan högre koncentrationer i testdosen leda till att bina avvisar den och endast konsumerar lite eller inget alls. Efter en period på högst 6 timmar bör okonsumerat behandlat foder ersättas med ren sackaroslösning. Mängden konsumerat behandlat foder uppskattas (t.ex. genom mätning av återstodens volym eller vikt).

1.6.3.2 Testperiodens längd

Testet fortsätts i regel i 48 timmar efter det att testlösningen har ersatts med ren sackaroslösning. Om mortaliteten fortsätter att stiga med mer än 10 % efter de första 24 timmarna bör testperioden förlängas (till högst 96 timmar), förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

1.6.4 Observationer

Mortaliteten registreras när det har gått 4 timmar från testets början och därefter vid 24 timmar och 48 timmar efter tillförsel av dosen. Om det behövs en förlängd testperiod görs efterföljande bedömningar med 24 timmars intervall (upp till högst 96 timmar), förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

En uppskattning görs av mängden behandlat foder som konsumeras per grupp. Genom att jämföra hur stor mängd behandlat och obehandlat foder som har konsumerats inom de angivna 6 timmarna kan man få upplysningar om i vilken grad bina accepterar det behandlade fodret.

Alla avvikelser i beteende som observeras under testperioden bör registreras.

1.6.5 Gränstest (Limit-test)

I vissa fall (t.ex. om ett testämne förväntas ha låg toxicitet) kan gränstest utföras med 100 µg verksamt ämne per bi, i syfte att demonstrera att LD₅₀ är högre än detta värde. Förfarandet bör vara detsamma, dvs. tre likadana testgrupper per testdos, relevanta kontrollgrupper, uppskattning av mängden konsumerat behandlat foder och användning av giftekvivalent. Om det förekommer mortalitet bör ett fullständigt test genomföras. Alla eventuella observerade subletala verkningar bör registreras (se avsnitt 1.6.4).

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 DATA

Alla uppgifter bör sammanställas i en tabell. Av tabellen skall framgå, för varje testgrupp samt för varje kontrollgrupp och varje giftekvivalentgrupp, antalet bin som använts, mortaliteten vid varje observationstidpunkt och antalet bin med ett beteende som tyder på skadliga verkningar. Mortalitetsdata bör analyseras med lämpliga statistiska metoder (t.ex. probit-analys, rörligt medelvärde eller binominal sannolikhet) (3), (4). Dos-responskurvor upprättas för varje rekommenderad observationstidpunkt. Kurvornas lutning och median letal dos (LD₅₀) beräknas med 95 % konfidensintervall. Korrigeringar för kontrollgruppens mortalitet kan göras med hjälp av Abbott-korrigeringsmetod (4), (5). Om det behandlade fodret inte har konsumerats helt bör man göra en uppskattning av hur stor dos av testämnet som har konsumerats per grupp. LD₅₀-värdet uttrycks som µg testämne per bi.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten skall innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 Testämne

- Aggregationstillstånd och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. stabilitet i vatten, ångtryck).
- Kemiska identifieringsdata, inklusive strukturformel, renhet (för bekämpningsmedel t.ex. identiteten och halten av verksamt ämne eller verksamma ämnen).

2.2.2 Försöksdjur

- Vetenskapligt namn, ras, ungefärlig ålder (i veckor), insamlingsmetod, insamlingsdatum.
- Information om de samhällen som används för insamling av testbin, inklusive hälsa, eventuella vuxensjukdomar, eventuella förbehandlingar osv.

2.2.3 Testförhållanden

- Temperatur och relativ fuktighet i testrummet.
- Förvaringsförhållanden, inklusive burarnas typ, storlek och material.
- Metoder för beredning av stam- och testlösningar (i förekommande fall anges även lösningsmedlet och dess koncentrationer).
- Testets utformning, t.ex. antal testkoncentrationer och deras värden, antalet kontrollgrupper, samt för varje testkoncentration och kontrollgrupp även antalet replikatburar och antalet bin per bur.
- Testdatum.

2.2.4

Resultat

- Resultaten från preliminära test (i förekommande fall).
- Rådata: mortaliteten för varje testad dos vid varje observationstidpunkt.
- Dos-responskurvorna vid testets slut.
- LD₅₀-värden med 95 % konfidensintervall, vid varje rekommenderad observationstidpunkt, för testämnet och för giftekivalenten.
- Statistiska metoder som har använts för att bestämma LD₅₀
- Mortaliteten i kontrollgrupperna.
- Övriga biologiska verkningar som har observerats eller uppmätts, t.ex. om bina har betett sig onormalt (inklusive om de avvisat testdosen), konsumtionen av foder i behandlade och obehandlade grupper.
- Varje avvikelse från de här beskrivna testförfarandena samt all annan relevant information.

3.

HÄNVISNINGAR

- (1) EPPO/Council of Europe (1993), "Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees", EPPO bulletin, vol. 23, nr 1, s. 151–165, mars 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, s. 119–125.
- (3) Litchfield, J.T. och Wilcoxon, F. (1949), "A simplified method of evaluating dose-effect experiments", Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, s. 99–113.
- (4) Finney, D.J. (1971), Probit Analysis, 3:e uppl., Cambridge, London och New-York.
- (5) Abbott, W.S. (1925), "A method for computing the effectiveness of an insecticide", Jour. Econ. Entomol., 18, s. 265–267.

C.17. HONUNGSBIN – TEST AVSEENDE AKUT TOXICITET (KONTAKT)

1. METOD

Denna testmetod för akut toxicitet motsvarar OECD TG 214 (1998).

1.1 INLEDNING

Detta test är en laboratoriemetod för bedömning av växtskyddsprodukters och andra kemikaliers akuta toxicitet (kontakt) på vuxna arbetsbin.

Vid bedömning och utvärdering av de toxiska egenskaperna hos ämnen kan det vara nödvändigt att bestämma den akuta toxiciteten (kontakt) på honungsbin, t.ex. när det är sannolikt att bin kommer att exponeras för en viss kemikalie. Testet för akut toxicitet (kontakt) används för att bestämma bekämpningsmedels och kemikaliers toxicitet för bin. Resultatet av detta test används för att avgöra om det behövs ytterligare utvärderingar. Metoden kan särskilt användas i stegvisa program för bedömning av de risker som bekämpningsmedel kan medföra för bin. Dessa program bygger på en sekventiell arbetsgång från laboratorietoxicitetstest till semifält- och fältförsök (1). Bekämpningsmedel kan testas som verksamma ämnen eller som formulerade produkter.

En giftekvivalent bör användas för att fastställa binas känslighet och testförfarandets noggrannhet.

1.2 DEFINITIONER

Akut toxicitet (kontakt): de skadliga verkningar som uppträder inom en period på högst 96 timmar efter lokal applicering av en engångsdos av testämnet.

Dos: den mängd testämne som appliceras. Dosen uttrycks som vikten (μg) testämne per försöksdjur ($\mu\text{g}/\text{bi}$).

LD₅₀ (median letal dos) kontakt: en statistiskt fastställd engångsdos av ett ämne som kan förväntas leda till döden för 50 % av de djur på vilka dosen har applicerats. LD₅₀-värdet uttrycks som μg testämne per bi. När det gäller bekämpningsmedel kan testämnet vara ett verksamt ämne eller en formulerad produkt som innehåller ett eller flera verksamma ämnen.

Mortalitet: ett djur registreras som dött när det är helt orörligt.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Vuxna arbetsbin (honungsbin – *Apis mellifera*) exponeras för en serie doser av testämnet upplöst i lämplig vehikel. Exponeringen sker genom direkt applicering på bröstkorgen (droppar). Testperiodens längd är 48 timmar. Om mortaliteten ökar under perioden 24–48 timmar efter tillförseln, medan kontrollgruppens mortalitet hålls på en godtagbar nivå, dvs. $\leq 10\%$, bör testet förlängas till högst 96 timmar. Mortaliteten registreras dagligen och jämförs med kontrollgruppens värden. Resultaten analyseras för beräkning av LD₅₀ vid 24 och 48 timmar, och om testet förlängs, vid 72 och 96 timmar.

1.4 TESTETS GILTIGHET

För att testet skall vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

- Genomsnittsmortaliteten för det totala antalet kontroldjur får inte överskrida 10 % vid testets slut.
- De värden som erhålls för LD₅₀ för giftekvivalenten skall ligga inom det specificerade området.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Insamling av bin**

För testet används unga vuxna arbetsbin med samma ålder, näringstillstånd, ras osv. Bina tas från adekvat utfodrade, friska, så långt som möjligt sjukdomsfria samhällen med renrasiga drottningar med känd historia och fysiologisk status. Bina bör samlas in på testdagens morgon eller kvällen före testet och hållas i testförhållandena fram till följande dag. Bin som insamlats från yngelfria ramar rekommenderas. Insamling tidigt på våren eller sent på hösten bör undvikas eftersom bina då har genomgått fysiologiska förändringar. Om test måste genomföras tidigt på våren eller sent på hösten kan bina kläckas i en inkubator och födas upp med "bibrod" (pollen som insamlats från vaxkakan) och sackaroslösning under en vecka. Bin som har behandlats med kemiska ämnen såsom antibiotika, varroabekämpningsmedel osv. får inte användas för toxicitetstest förrän det har gått fyra veckor från det att den sista behandlingen avslutades.

1.5.2 **Förvarings- och utfodringsförhållanden**

Burarna bör vara enkla att rengöra och välventilerade. Burarna kan vara tillverkade av t.ex. rostfritt stål, nät eller plast. Även träburar för engångsbruk kan användas. Burarnas storlek bör anpassas efter antalet bin och vara tillräckligt rymliga. Grupper om tio bin per bur rekommenderas.

Bina hålls i mörker i ett testrum med en temperatur på $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Den relativa fuktigheten, i regel kring 50–70 %, bör registreras under hela testförloppet. Hanteringen, såsom behandling och observationer, kan däremot genomföras i (dags)ljus. Sackaroslösning i vatten med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % vikt per volym) används som foder och tillhandahålls fritt för bina med hjälp av en utfodringsanordning. För utfodringen kan ett ca 50 mm långt och 10 mm brett glasrör användas, vars öppna ända smalnar av till en diameter på cirka 2 mm.

1.5.3 **Förberedelse av bina**

De insamlade bina kan bedövas med koldioxid eller kväve före appliceringen av testämnet. Mängden bedövningsmedel och exponeringstiden för medlet bör minimeras. Döende bin avlägsnas och ersätts med friska bin före testets början.

1.5.4 **Förberedelse av doserna**

Testämnet appliceras upplöst i en vehikel, t.ex. ett organiskt lösningsmedel eller vattenlösning med ett vätmiddel. Som organiskt lösningsmedel rekommenderas acetone men även andra organiska lösningsmedel med låg toxicitet kan användas (t.ex. dimetylformamid, dimetylsulfoxid). I fråga om formulerade produkter som är dispergerade i vatten och mycket polära organiska ämnen som inte är lösliga i organiska vehikellösningsmedel kan lösningarna vara enklare att applicera om de bereds i en svag lösning av ett vanligt vätmiddel (t.ex. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton eller Tween).

Lämpliga kontrolllösningar bör beredas. I fall där ett lösningsmedel eller ett dispergeringsmedel används för att lösa upp testämnet bör två separata kontrollgrupper användas, en som behandlas med vatten och en som behandlas med lösningsmedlet eller dispergeringsmedlet.

1.6 FÖRFARANDE

1.6.1 Test- och kontrollgrupper

Antalet doser och replikat som testas bör väljas så att de uppfyller de statistiska kraven för bestämning av LD₅₀ med ett konfidensintervall på 95 %. För testet används i regel fem doser i en geometrisk serie vars faktor inte överskrider 2,2. Doserna bör täcka området för LD₅₀. Antalet doser fastställs med beaktande av toxicitetskurvans lutning (dos i förhållande till mortalitet) och den statistiska metod som används för analys av resultaten. Ett preliminärt test kan användas som stöd för valet av lämpliga doser.

Varje testkoncentration bör ges till minst tre likadana testgrupper med tio bin per grupp.

Utöver själva testserierna bör minst tre kontrollgrupper med tio bin per grupp också behandlas. Om ett organiskt lösningsmedel eller ett vätningsmedel används måste tre extra kontrollgrupper med tio bin per grupp användas för lösningsmedlet eller vätningsmedlet.

1.6.2 Giftkivalent

En giftkivalent måste tas med i testserien. Minst tre doser bör väljas på sådant sätt att de täcker det förväntade LD₅₀-värdet. Minst tre likadana burar med tio bin per bur bör användas för varje testdos. Som giftkivalent rekommenderas dimetoat, vars LD₅₀-värde (kontakt) enligt rapporterade uppgifter ligger inom området 0,10–0,30 µg verksamt ämne per bi (2). Även andra giftkivalenter kan godtas förutsatt att man har tillgång till tillräckliga data om förväntad dosrespons (t.ex. paration).

1.6.3 Exponering

1.6.3.1 Tillförsel av doser

De bedövade bina behandlas individuellt genom lokal applicering. Bina väljs slumpmässigt ut för de olika testdoserna och kontrollgrupperna. En volym på 1 µl lösning innehållande testämnet i lämplig koncentration appliceras med mikroapplicator på flanksidan på bröstkorgen av varje bi. Om det är motiverat kan andra volymer användas. Efter appliceringen fördelas bina i testburarna där de bör ha tillgång till sackaroslösning.

1.6.3.2 Testperiodens längd

Rekommenderad testperiod är 48 timmar. Om mortaliteten ökar med mer än 10 % när det har gått 24–48 timmar från appliceringen bör testperioden förlängas (till högst 96 timmar), förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

1.6.4 Observationer

Mortaliteten registreras vid 4 timmar efter doseringen och därefter vid 24 och 48 timmar. Om det behövs en längre testperiod görs efterföljande bedömningar med 24 timmars intervall (upp till högst 96 timmar.) förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

Allt avvikande uppförande som observeras under testperioden bör registreras.

1.6.5 Gränstest

I vissa fall (t.ex. om ett testämne förväntas ha låg toxicitet) kan gränstest utföras med 100 µg verksamt ämne per bi, i syfte att demonstrera att LD₅₀ är högre än detta värde. Förfarandet bör vara detsamma, inklusive tre likadana testgrupper för testdosen, relevanta kontrollgrupper och användning av giftkivalent. Om det förekommer mortalitet bör ett fullständigt test genomföras. Alla eventuella observerade subletala verkningar bör registreras (se avsnitt 1.6.4).

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 DATA

Alla uppgifter bör sammanställas i en tabell. Av tabellen skall framgå, för varje testgrupp samt för varje kontrollgrupp och varje giftekvivalentgrupp, antalet bin som använts, mortaliteten vid varje observationstidpunkt och antalet bin med ett beteende som tyder på skadliga verkningar. Mortalitetsdata bör analyseras med lämpliga statistiska metoder (t.ex. probit-analys, rörligt medelvärde eller binominal sannolikhet) (3), (4). Dos-responskurvor uppritas för varje rekommenderad observationstidpunkt (24, 48 och i förekommande fall 72 och 96 timmar) och kurvornas lutning och median letal dos (LD_{50}) beräknas med 95 % konfidensintervall. Korrigeringar för kontrollgruppens mortalitet kan göras med hjälp av Abbott-korrigeringsmetoden (4), (5). LD_{50} -värdet uttrycks som μ g testämne per bi.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten skall innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 Testämne

- Aggregationstillstånd och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. stabilitet i vatten, ångtryck).
- Kemiska identifieringsdata, inklusive strukturformel, renhet (för bekämpningsmedel t.ex. identiteten och halten av verksamt ämne eller verksamma ämnen).

2.2.2 Försöksdjur

- Vetenskapligt namn, ras, ungefärlig ålder (i veckor), insamlingsmetod, insamlingsdatum.
- Information om de samhällen som används för insamling av testbin, inklusive hälsa, eventuella vuxensjukdomar, eventuella förbehandlingar osv.

2.2.3 Testförhållanden

- Temperatur och relativ fuktighet i testrummet.
- Förvaringsförhållanden, inklusive burarnas typ, storlek och material.
- Metod för tillförsel av testämnet, t.ex. använt vehikellösningsmedel, tillförd volym testlösning och använd bedövning.
- Testets utformning, t.ex. antal doser och deras storlek, antalet kontrollgrupper, för varje testdos och kontrollgrupp även antalet likadana burar och antalet bin per bur.
- Testdatum.

2.2.4 Resultat

- Resultaten från preliminära test (i förekommande fall).
- Rådata: mortaliteten för varje koncentration som testats vid varje observationstidpunkt.
- Dos-responskurvorna vid testets slut.
- LD_{50} -värden med 95 % konfidensintervall, vid varje rekommenderad observationstidpunkt, för testämnet och för giftekvivalenten.
- Statistiska metoder som använts för att bestämma LD_{50} .
- Mortaliteten i kontrollgrupperna.
- Övriga biologiska verkningar som observerats eller uppmätts och all onormal respons från bina.
- Varje avvikelse från de testmetodförfaranden som beskrivs här samt all annan relevant information.

3.

HÄNVISNINGAR

- (1) EPPO/Council of Europe (1993), "Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees", *EPPO bulletin*, vol. 23, nr 1, s. 151–165, mars 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, s. 119–125.
- (3) Litchfield, J.T. och Wilcoxon, F. (1949), "A simplified method of evaluating dose-effect experiments", *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, s. 99–113.
- (4) Finney, D.J. (1971), *Probit Analysis*, 3:e uppl., Cambridge, London och New-York.
- (5) Abbott, W.S. (1925), "A method for computing the effectiveness of an insecticide", *Jour. Econ. Entomol.* 18, s. 265–267.

C.18. BESTÄMNING AV ADSORPTION OCH DESORPTION I JORD VID JÄMVIKT I UPPSLAMMAT JORDPROV

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG 106 – Determination of Soil Adsorption/Desorption, using a Batch Equilibrium Method (2000).

1.1 INLEDNING

Metoden bygger bland annat på ett ringprov och en workshop för val av jordar för adsorptionstest (1)(2)(3)(4) samt existerande riktlinjer på nationell nivå (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

Adsorptions- och desorptionstest används för att erhålla grundläggande uppgifter om kemiska ämnens rörlighet och deras fördelning i biosfärens jord, vatten och luft (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). Uppgifterna kan utnyttjas för att förutspå eller uppskatta t.ex. ett visst kemiskt ämnes tillgänglighet vid organismernas nedbrytnings-, omvandlings- och upptagningsprocesser (24), ämnets urlakning genom jordprofilen (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28), ämnets flyktighet från jorden (21)(29)(30) eller ämnets avrinning från land och ytor in i naturliga vatten (18)(31)(32). Adsorptionsdata kan användas för jämförelser och för att skapa modeller (19)(33)(34)(35).

Ett kemiskt ämnes fördelning mellan jord- och vattenfas är en komplex process som beror på flera olika faktorer: ämnets kemiska natur (12)(36)(37)(38)(39)(40), jordfasens egenskaper (4)(12)(13)(14)(41)(42)(43)(44)(45) (46)(47)(48)(49) och klimatbetingade faktorer såsom regn, temperatur, sol och vind. Den mångfald fenomen och mekanismer som deltar i ämnets adsorption i jord kan därför inte beskrivas fullständigt med hjälp av den aktuella testmetoden, som utgör en förenklad laboratoriemodell. Även om detta test inte kan täcka alla tänkbara miljösituationer ger det ändå tillräckliga uppgifter om den betydelse för miljön som adsorptionen av det aktuella ämnet har.

Se även den allmänna inledningen.

1.2 TILLÄMPNINGSSOMRÅDE

Syftet med metoden är att kunna uppskatta ett ämnes adsorptions- och desorptionsbeteende i jordar. Målet är att få ett sorptionsvärde som kan användas för att uppskatta fördelningen när miljöbetingelserna varierar. För detta ändamål bestäms ämnets adsorptionskoefficient i jämvikt i olika jordar som funktion av jordens egenskaper (t.ex. halten av organiskt kol och lera samt jordens textur och pH). Olika jordtyper måste användas för att testet i så hög grad som möjligt skall täcka växelverkan mellan ett ämne och naturligt förekommande jordarter.

Inom ramen för denna metod avser man med begreppet adsorption den process när ett ämne binds till en jordyta, utan att i detta sammanhang skilja mellan olika adsorptionsprocesser (fysikalisk eller kemisk adsorption) eller processer såsom ytkatalyserad nedbrytning, bulkadsorption eller kemisk reaktion. Adsorption, som sker på kolloidala partiklar (diameter < 0,2 µm) som har bildats av jordarterna, räknas inte.

De viktigaste jordparametrarna med tanke på adsorptionen anses vara följande: halten av organiskt kol (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48), lerhalten och jordens textur (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48) samt joniserbara föreningars pH (3)(4)(42). Andra jordparametrar som kan ha inverkar på adsorption/desorption för ett särskilt ämne är den effektiva katjonbyteskapaciteten (ECEC), halten av amorft järn och aluminiumoxider, särskilt i fråga om vulkaniska och tropiska jordar (4), samt den specifika ytan (49).

Syftet med testet är att utvärdera ett ämnes adsorption i olika jordtyper för vilka halten av organiskt kol, lerhalten och jordens textur och pH varierar. Testet omfattar tre skeden:

Skede 1: Förberedande undersökningar för att bestämma följande:

- jord-lösningsförhållandet,
- tiden för att nå adsorptionsjämvikt och mängden av adsorberat testämne vid jämvikt,
- testämnets adsorption på testkärlens yta och testämnets stabilitet under testningstiden.

Skede 2: Screeningtest: undersökning av adsorptionen i fem olika jordtyper genom adsorptionskinetik vid en vald koncentration och bestämning av fördelningskoefficienterna K_d och K_{oc} .

Skede 3: Bestämning av Freundlich-adsorptionsisotermer för att fastställa hur koncentrationen inverkar på adsorptionens omfattning i jordar.

Undersökning av desorption genom desorptionskinetik och Freundlich-desorptionsisotermer (bilaga 1).

1.3

MÄTSTORHETER – DEFINITIONER OCH MÅTTENHETER

Beteckning	Definition	Måttenhet
A_{t_i}	procentuell adsorption vid tidpunkten t_i	%
A_{eq}	procentuell adsorption vid adsorptionsjämvikt	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massan av testämne som adsorberats i jorden vid tidpunkten t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massan av testämne som adsorberats i jorden under tidsintervallet Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	massan av testämne som adsorberats i jorden vid adsorptionsjämvikt	μg
m_0	massan av testämne i provröret vid adsorptionstestets början	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	massan av testämne uppmätt i ett delprov (v_a^A) vid tidpunkten t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massan av testämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt	μg
m_{soil}	mängd av jordfas, uttryckt som jordens torrmasa	g
C_{st}	masskoncentrationen i ämnets stamlösning	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	ursprunglig masskoncentration i provlösningen som är i kontakt med jord	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	ämnets masskoncentration i vattenfasen vid tidpunkten t_i då analysen utförs	$\mu\text{g cm}^{-3}$

$C_s^{ads}(eq)$	halten av ämne som adsorberats i jord vid adsorptionsjämvikt	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	ämnets masskoncentration i vattenfasen vid adsorptionsjämvikt	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_0	ursprunglig volym av vattenfas i kontakt med jord under adsorptionstestet	cm^3
v_a^A	volymen för det delprov som används för att mäta testämnet	cm^3
K_d	adsorptionens fördelningskoefficient	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{oc}	normaliserad adsorptionskoefficient	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{om}	normaliserad fördelningskoefficient	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlich-adsorptionskoefficient	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	Freundlich-exponent	
D_{t_i}	procentuell desorption vid tidpunkten t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	procentuell desorption under intervallet Δt_i	%
K_{des}	skenbar desorptionskoefficient	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{des}	Freundlich-desorptionskoefficient	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massan av testämne som desorberats från jord vid tidpunkten t_i	μg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	massan av testämne som desorberats från jord under tidsintervallet Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	analytiskt bestämd ämnesmassa i vattenfasen vid desorptionsjämvikt	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	totala massan av testämne som desorberats vid desorptionsjämvikt	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massan av ämne som förblir adsorberat i jorden efter tidsintervallet Δt_i	μg
m_{aq}^A	massan av ämne som blivit över från adsorptionsjämvikten på grund av ofullständig volymersättning	μg
$C_s^{des}(eq)$	halten av testämne som förblir adsorberat i jorden vid desorptionsjämvikt	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{des}(eq)$	testämnets masskoncentration i vattenfasen vid desorptionsjämvikt	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_T	totala volymen vattenfas i kontakt med jord under desorptionskinetiktest enligt seriemetoden	cm^3
V_R	volymen supernatant som har avlägsnats ur röret efter uppnådd adsorptionsjämvikt och som har ersatts med samma volym av 0,01 M CaCl_2 -lösning	cm^3
v_a^D	volymen delprov som tagits för analytiskt syfte under ett desorptionskinetiktest enligt seriemetoden	cm^3
V_r^i	volymen lösning som tagits ur röret (i) för mätning av testämnet under desorptionskinetiktest (parallellmetod)	cm^3

V_r^F	volymen lösning som vid jämvikt tagits ur röret för mätning av testämnet	cm^3
MB	massbalans	%
m_E	totala massan av testämne som extraherats ur jorden och provkärlets väggar i två steg	μg
V_{rec}	volymen supernatant som insamlats efter uppnådd adsorptionsjämvikt	cm^3
P_{ow}	fördelningskoefficient för oktanol-vatten	
pKa	dissociationskoefficient	
S_w	vattenlöslighet	g l^{-1}

1.4 PRINCIPEN FÖR TESTMETODEN

Kända volymer av testämnslösning, omärkta eller radioaktivt märkta och med kända koncentrationer i 0,01 M CaCl_2 , blandas med jordprover av känd torrsvikt som har bringats till jämvikt i 0,01 M CaCl_2 . Blandningen rörs om tillräckligt länge. Jordsuspensionerna separeras därefter genom centrifugering, och om så önskas kan filtratet och vattenfasen analyseras. Mängden av testämne som adsorberats i jordprovet bestäms som skillnaden mellan den ursprungliga mängden av testämne i lösningen och mängden av kvarvarande testämne i slutet av testet (indirekt metod).

Alternativt kan mängden av adsorberat testämne bestämmas direkt genom jordanalys (direkt metod). Denna procedur, som inbegriper stegvis jordextraktion med lämpligt lösningsmedel, rekommenderas i fall där skillnaden i lösningens halt av testämne inte kan bestämmas med tillräcklig noggrannhet. Detta kan förekomma om testämnet adsorberas på provkärlets yta, om testämnet är instabilt inom den tidsskala testet sträcker sig över, om adsorptionen är så svag att halten bara ändras lite eller om adsorptionen är så stark att den resulterande halten är för låg för att kunna bestämmas med tillräcklig noggrannhet. Om radioaktivt märkt ämne används kan man undvika jordextraktion genom att analysera jordfasen med förbränning och vätskescintillationsräknare (LSC). LSC är dock en icke-specifik teknik som inte kan skilja mellan ursprungliga ämnen och omvandlingsprodukter och som därför bara kan användas om testämnet är stabilt under hela testet.

1.5 UPPGIFTER OM TESTÄMNET

De kemiska reagenser som används skall ha hög analytisk renhetsgrad. Rekommenderade testämnen är omärkta ämnen med känd sammansättning och en renhetsgrad på helst minst 95% eller radioaktivt märkta ämnen med känd sammansättning och radioaktiv renhet. Om spårämnen med kort halveringstid används skall sönnerfallskorrigerings tillämpas.

Innan adsorptions- och desorptionstestet utförs skall följande uppgifter finnas om testämnet:

- vattenlöslighet (A.6.)
- ångtryck (A.4.) eller Henrys lag-koefficient
- abiotisk nedbrytning: hydrolys som funktion av pH (C.7.)
- fördelningskoefficient (A.8.)
- ”lätt” biologisk nedbrytbarhet (C.4.) eller aerobisk och anaerobisk omvandling i jord
- pKa för joniserbara ämnen
- direkt fotolys i vatten (t.ex. UV-Vis-absorptionsspektrum i vatten och kvantutbyte) och fotonedbrytning i jord.

1.6 TESTETS TILLÄMPBARHET

Testet kan tillämpas på kemiska ämnen som kan analyseras med tillräcklig noggrannhet. En viktig parameter som kan påverka tillförlitligheten hos resultaten, särskilt när den indirekta metoden används, är testämnets stabilitet inom testets tidsskala. Ämnets stabilitet måste därför kontrolleras med en förhandsundersökning, och om den visar att det förekommer omvandling inom testets tidsskala är det tillrådligt att huvudundersökningen utförs med analys av både jord- och vattenfasen.

Det kan vara svårt att genomföra testet med ämnen som har låg vattenlöslighet ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$) eller med ämnen som har hög elektrisk laddning, eftersom koncentrationen i vattenfasen då inte kan analyseras med tillräcklig noggrannhet. För sådana ämnen krävs vissa extra åtgärder. Närmare anvisningar finns i berörda avsnitt.

Vid testning av flyktiga ämnen är det viktigt att se till att det inte uppstår hanteringsförluster.

1.7 METODBESKRIVNING

1.7.1 Apparatur och kemiska reagenser

Normal laboratorieutrustning, särskilt följande:

- a) Provrör eller andra kärl för testet. Det är viktigt att rören eller kärnen
— passar direkt in i centrifugen så att hanterings- och överföringsfel kan undvikas,
— är gjorda av ett inert material så att adsorption av testämnet på rörets eller kärlets yta minimeras.
- b) Skakapparat: rotationsskak eller motsvarande, i ett utförande där jorden hålls i suspension under omröringen.
- c) Centrifug: helst i höghastighetsutförande, t.ex. med centrifugalkraft $> 3\,000 \text{ g}$, temperaturkontrollerad och med kapacitet att från vattenlösning separera partiklar med diameter större än $0,2 \mu\text{m}$. Under omröring och centrifugering skall behållarna vara täckta med lock så att flyktighets- och vattenförluster kan undvikas. För att minimera adsorption på locken skall dessa vara deaktiverade, t.ex. teflonbelagda skruvkorkar.
- d) Gärna även: filtreringsapparat som har sterila engångsfilter med porositeten $0,2 \mu\text{m}$. Särskild vikt skall fästas vid valet av filtermaterial så att förluster av testämne på filtret kan undvikas. För svårslösliga testämnen avråds användning av organiska filtermaterial.
- e) Analysinstrument lämpliga för mätning av testämnets koncentration.
- f) Laborarieugn som kan hålla en temperatur mellan 103 och $110 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.7.2 Karakterisering av jordar. Urval av jordar för test

Jordarna karakteriseras med hjälp av tre parametrar som anses vara i hög grad avgörande för adsorptionskapaciteten: organiskt kol, lerhalt och jordens textur samt pH. Såsom tidigare nämnts (se avsnittet "Tillämpningsområde") kan även andra fysikalisk-kemiska egenskaper hos jorden påverka adsorption och desorption av ett visst ämne, och de skall i så fall beaktas.

Valet av metoder för jordkaraktiseringen är av stor vikt och kan ha betydande inverkan på resultaten. Det rekommenderas därför att jordens pH mäts i en lösning av 0,01 M CaCl₂ (dvs. den lösning som används vid adsorptions- och desorptionstestet) enligt gällande ISO-metod (ISO-10390-1). Det rekommenderas också att övriga jordegenskaper av betydelse bestäms enligt standardmetoder (ISO Handbook of soil analysis) så att sorptionsdata kan analyseras på basis av globalt standardiserade jordparametrar. Arbetena (50–52) innehåller viss vägledning om existerande standardmetoder för jordanalys och jordkaraktisering. Det är tillrådligt att använda referensjordar för kalibrering av jordtestmetoderna.

Tabell 1 innehåller anvisningar för valet av jordar för adsorptions- och desorptionstest. De sju utvalda jordarna spänner över jordtyper som finns i tempererade geografiska zoner. För joniserbara testämnen skall de utvalda jordarna sträcka sig över ett stort pH-område så att ämnets adsorption kan bestämmas i joniserad och ojoniserad form. Anvisningar för hur många olika jordar som skall användas i de olika teststegen finns i avsnitt 1.9 ("Mätförfarande").

Om andra jordtyper väljs skall de karakteriseras med användning av samma parametrar och skall ha liknande variationer i fråga om de egenskaper som beskrivs i tabell 1, även om de inte behöver motsvara kriterierna fullständigt exakt.

Tabell 1: Anvisningar för val av jordprover för adsorption och desorption

Jordtyp	pH-område (i 0,01 M CaCl ₂)	Halt av organiskt kol (%)	Lerhalt (%)	Jordtextur*
1	4,5–5,5	1,0–2,0	65–80	clay
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	clay loam
3	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	silt loam
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	loam
5	< 4,0–6,0 [§]	< 0,5–1,5 [‡]	< 10–15 [§]	loamy sand
6	> 7,0	< 0,5–1,0 [‡]	40–65	clay loam/clay
7	< 4,5	> 10	< 10	sand/ loamy sand

* Enligt FAO och det amerikanska systemet (85).

§ Variablerna skall helst ha värden inom de angivna intervallen. Om det är svårt att hitta lämpligt jordmaterial kan värden under det angivna minimivärdet godtas.

‡ Jordar med mindre än 0,3% organiskt kol kan störa korrelationen mellan halten av organiskt material och adsorption. Det är därför tillrådligt att använda jordar med en minimihalt av 0,3% organiskt kol.

1.7.3 Provtagning och förvaring av jordprover

1.7.3.1 Provtagning

Det finns inga särskilda rekommendationer om specifika metoder eller verktyg för provtagning. Provtagningsmetoden beror på undersökningens syfte (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Följande aspekter skall beaktas:

- Platsen skall beskrivas i detalj, bl.a. genom läge, vegetationstäckning, behandlingar med bekämpnings- och gödningsmedel, biologiska tillsatser eller oavsiktlig förorening. Beskrivningen av provtagningsplatsen skall följa rekommendationerna i ISO-standarden för tagning av jordprover (ISO 10381-6).

- b) Provtagningsplatsen skall anges med UTM-koordinater (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) eller geografiska koordinater. På så sätt kan man längre fram ta nya prover av viss jord. Det kan också underlätta bestämningen av jorden enligt de olika ländernas klassificeringssystem. Vidare skall endast A-horisont tas, ned till ett maximidjup på 20 cm. För jord 7 gäller särskilt att om det finns O_h -horisont närvarande i jorden skall denna horisont tas med i provet.

Jordproverna skall transporteras i behållare, och temperaturbetingelserna skall vara sådana att jordprovernas ursprungliga egenskaper inte förändras i någon signifikant grad.

1.7.3.2 *Förvaring*

Jordproverna skall helst användas färska. Om detta inte är möjligt skall jorden förvaras lufttorkad i omgivningstemperatur. Det finns inga rekommenderade gränser för förvaringstiden, men om ett jordprov är äldre än tre år måste det analyseras på nytt avseende halten av organiskt kol, pH och CEC.

1.7.3.3 *Hantering och beredning av jordprover för test*

Jordproverna lufttorkas vid omgivningstemperatur (helst 20–25 °C). Finfördelningen skall göras så varsamt som möjligt för att minimera ändringarna i jordens ursprungliga textur. Jordarna sållas till en partikelstorlek ≤ 2 mm med beaktande av rekommendationerna i ISO-standarden om tagning av jordprover (ISO 10381-6). Omsorgsfull homogenisering rekommenderas eftersom resultatens reproducerbarhet då förbättras. Fukthalten i varje jordprov bestäms i tre delprover genom torkning vid 105 °C tills ingen signifikant viktändring längre kan registreras (cirka 12 timmar). Vid alla beräkningar som omfattar jordmassa avses ugnstorkad massa, dvs. jordens vikt korrigerad med en fukthaltsfaktor.

1.7.4 **Beredning av testämnet före kontakten med jord**

Testämnet upplöses i en lösning av 0,01 M CaCl_2 i destillerat eller avjoniserat vatten. CaCl_2 -lösningen används som vattenlösningsfas för att förbättra centrifugeringen och minimera katjonbytet. Stamlösningens koncentration skall helst vara tre tiopotenser högre än analysmetodens detektionsgräns. Genom denna tröskel säkerställs tillräcklig mätnoggrannhet med den använda metoden. Dessutom skall stamlösningens koncentration vara lägre än testämnets vattenlöslighet.

Stamlösningen skall helst beredas strax före kontakten med jordproverna och förvaras i stängd behållare vid 4 °C. Förvaringstiden beror på testämnets stabilitet och dess koncentration i lösningen.

Hjälplösningsmedel för upplösning av testämnet skall bara användas om ämnet är svårslösligt ($S_w < 10^{-4}$ g l⁻¹). Hjälplösningsmedlet skall a) vara blandbart med vatten, t.ex. metanol eller acetonitril, skall b) ha en koncentration som inte överskrider 1% av stamlösningens totalvolym och en koncentration som är under 1 % i den testämneslösning som kommer i kontakt med jorden (helst under 0,1%) och får c) inte vara ett ytaktivt ämne eller genomgå solvolytiska reaktioner med testämnet. Användningen av ett hjälplösningsmedel måste vara föreskriven och skall motiveras i rapporten.

Ett annat alternativ för att tillföra ett svårlösligt testämne i testsystemet är att använda tillsats (spiking). Det innebär att testämnet upplöses i ett organiskt lösningsmedel, och ett delprov av denna lösning tillsätts systemet bestående av jord och 0,01 M CaCl₂-lösning i destillerat eller avjoniserat vatten. Halten av organiskt lösningsmedel i vattenfasen skall hållas så låg som möjligt, normalt skall den inte överskrida 0,1%. Tillsats från en organisk lösning kan innebära att reproducerbarheten går förlorad i fråga om volymen, dvs. ett nytt fel kan komma in eftersom testämnets och hjälplösningsmedlets koncentration inte är samma i alla test.

1.8 FÖRUTSÄTTNINGAR FÖR UTFÖRANDE AV ADSORPTIONS- OCH DESORPTIONSTEST

1.8.1 Analysmetod

Följande nyckelparametrar kan påverka sorptionsmätningarnas noggrannhet: noggrannheten hos den metod som används för att analysera lösningen och de adsorberade faserna, testämnets stabilitet och renhet, uppnåendet av sorptionsjämvikt, storleksordningen på lösningens koncentrationsändring, förhållandet mellan jord och lösning samt ändringar i jordens struktur under jämviktsprocessen (35)(59-62). Noggrannheten tas upp i några av exemplen i bilaga 2.

Analysmetodens tillförlitlighet måste kontrolleras inom testets sannolika koncentrationsområde. Det står laboratoriet fritt att utveckla en lämplig metod med lämpliga värden i fråga om noggrannhet, reproducerbarhet, detektionsgränser och utbyte. Anvisningar för hur ett sådant test kan utföras ges nedan.

En lämplig volym av 0,01 M CaCl₂ (t.ex. 100 cm³) rörs om under 4 timmar med en viktsmängd (t.ex. 20 g) jord som har hög adsorptionsförmåga, dvs. hög halt av organiskt kol och lera. Dessa vikter och volymer kan variera beroende på analysbehoven, men ett jord-lösningförhållande på 1:5 är en lämplig utgångspunkt. Blandningen centrifugeras och vattenfasen kan filtreras. En bestämd volym av testämnets stamlösning tillsätts till vattenfasen så att den nominella koncentrationen kommer inom testets sannolika koncentrationsområde. Volymen skall vara högst 10% av vattenfasens slutliga volym, så att karaktären hos den jämviktade jordlösningen ändras så lite som möjligt. Lösningen analyseras.

Ett blindprov bestående av systemet jord + CaCl₂-lösning (utan testämne) måste ingå, för kontroll av falska indikationer i analysmetoden och matriseffekter orsakade av jorden.

Bland de analysmetoder som kan användas för sorptionsmätningar ingår gas-vätskekromatografi (GLC), högtrycksvätskekromatografi (HPLC), spektrometri (t.ex. GC-masspektrometri och HPLC-masspektrometri) och vätskescintillationsräknare (för radioaktivt märkta ämnen). Oavsett vilken metod som används gäller kriteriet att metoden anses lämplig om utbytet är mellan 90 och 110% av det nominella värdet. För att möjliggöra detektion och utvärdering efter det att ämnet fördelats måste analysmetodens detektionsgränser vara minst två tiopotenser under den nominella koncentrationen.

Egenskaper och detektionsgränser hos den analysmetod som används vid adsorptionstest spelar en viktig roll när det gäller att definiera testbetingelserna och testets totala provningsprestanda. Den föreliggande metoden följer ett allmänt testförlopp och innehåller rekommendationer och anvisningar för alternativa tillvägagångssätt i fall där analysmetoden och laboratoriets betingelser kan medföra begränsningar.

Val av optimalt förhållande mellan jord och lösning

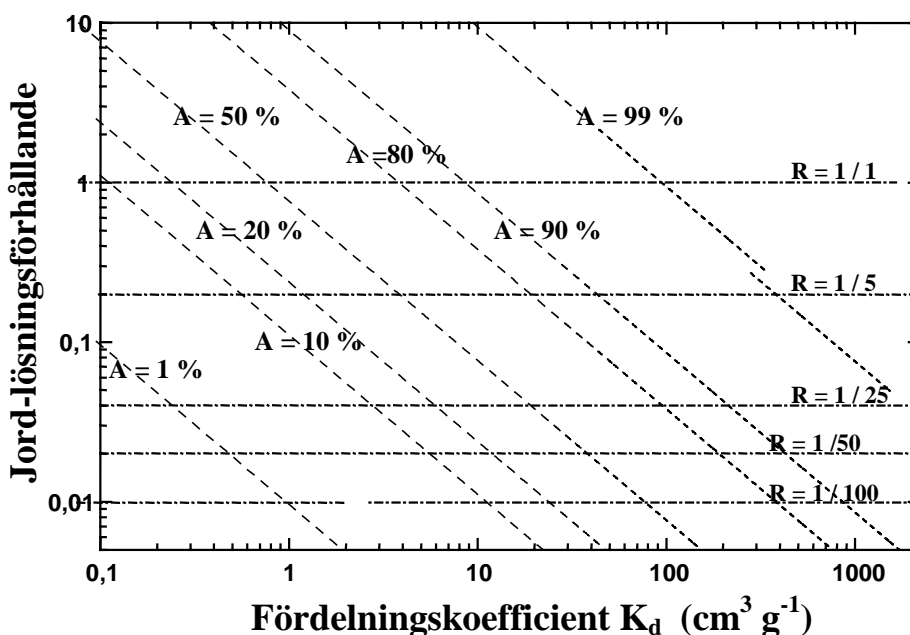
Valet av lämpligt jord-lösningsförhållande för sorptionsundersökningar är beroende av fördelningskoefficienten K_d och den önskade relativa adsorptionsgraden. Ämnets koncentrationsändring i lösningen avgör mätningens statistiska noggrannhet – grundat på adsorptionsekvationens form och analysmetodens gränser – vid detektion av ämnets koncentration i lösningen. För vanligt bruk är det därför praktiskt att bestämma sig för en uppsättning konstanta standardförhållanden för vilka adsorptionen är över 20%, och helst över 50% (62), samtidigt som man skall se till att testämnets koncentration i vattenfasen hålls så pass hög så att den kan mätas med tillräcklig noggrannhet. Detta är särskilt viktigt när adsorptionsprocenterna är höga.

Ett lämpligt tillvägångssätt för att välja lämpliga jord-lösningsförhållanden grundar sig på estimering av K_d -värdet, antingen genom förberedande undersökningar eller genom vedertagna estimeringsmetoder (bilaga 3). Valet av lämpligt förhållande kan sedan göras med hjälp av ett diagram där jord-lösningsförhållandet har avsatts mot K_d för konstanta adsorptionsprocenter (figur 1). Härvid antas att adsorptionsekvationen är linjär¹. Det sökta sambandet erhålls genom att bilda om ekvation 4 för K_d så att den får formen enligt ekvation 1:

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

eller logaritmisk form med antagande av att $R = m_{\text{soil}}/V_0$ och $A_{\text{eq}}\%/100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$:

$$\log R = - \log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}}\%/100)}{(1-A_{\text{eq}}\%/100)} \right] \quad (2)$$



Figur 1. Sambandet mellan jord-lösningsförhållande och K_d vid olika procenthalter av adsorberat testämne.

¹ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

I figur 1 visas jord-lösningsförhållandet som funktion av K_d för olika adsorptionsnivåer. Exempel: För jord-lösningsförhållandet 1:5 och $K_d = 20$ blir adsorptionen cirka 80%. För att få en adsorption på 50% med samma K_d måste förhållandet 1:25 användas. Detta sätt att välja jord-lösningsförhållande ger möjlighet att anpassa till olika testningsbehov.

Däremot är det svårare att hantera områden där ämnet adsorberas väldigt mycket eller väldigt litet. Vid låg adsorption rekommenderas jord-lösningsförhållandet 1:1, men för vissa mycket organiska jordtyper kan ännu lägre förhållanden behövas för att erhålla slurry. Analysmetoden måste ägnas stor uppmärksamhet när det gäller mätning av små ändringar i lösningens koncentration, annars blir adsorptionsmätningen inexact. Å andra sidan kan man vid mycket höga värden på fördelningskoefficienten K_d gå upp till ett jord-lösningsförhållande på 1:100 för att lämna en signifikant mängd av ämnet i lösningen. Då är det viktigt med god omröring och att systemet får tillräcklig tid på sig för att uppnå jämvikt. Ett alternativt sätt är att uppskatta K_d -värdet med hjälp av estimeringsmetoder som t.ex. grundar sig på P_{ow} -värden (bilaga 3). Detta kan vara särskilt användbart för lågadsorberande och polära ämnen med $P_{ow} < 20$ och för lipofila och starkt sorptiva ämnen med $P_{ow} > 10^4$.

1.9 MÄTFÖRFARANDE

1.9.1 Testbetingelser

Alla test skall göras i omgivningstemperatur och om möjligt vid en konstant temperatur mellan 20 och 25 °C.

Centrifugeringsbetingelserna skall vara sådana att partiklar större än 0,2 µm kan avlägsnas från lösningen. Detta värde anger den minsta partikelstorleken för fasta partiklar och bildar gränsen mellan fasta och kolloidala partiklar. Anvisningar om lämpliga centrifugeringsbetingelser finns i bilaga 4.

Om det inte går att säkerställa att partiklar större än 0,2 µm avlägsnas vid centrifugeringen, kan en kombination av centrifugering och filtrering med 0,2 µm filter användas. Filtermaterialet skall vara inert så att det inte uppstår förluster av testämnet på filtret. Under alla omständigheter måste det dokumenteras att det inte uppstår förluster av testämnet under filtreringen.

1.9.2 Skede 1 – Förberedande undersökning

Syftet med den förberedande undersökningen beskrivs i avsnittet "Tillämpningsområde". Anvisningar för hur en sådan förberedande undersökning kan läggas upp ges nedan.

1.9.2.1 Val av optimala jord-lösningsförhållanden

Två jordtyper och tre jord-lösningsförhållanden används (för sex tester). En av jordtyperna har hög halt av organiskt kol och låg lerhalt, och den andra typen har låg halt av organiskt kol och hög lerhalt. Följande förhållanden föreslås:

- 50 g jord och 50 cm³ vattenlösning av testämnet (förhållande 1:1),
- 10 g jord och 50 cm³ vattenlösning av testämnet (förhållande 1:5),
- 2 g jord och 50 cm³ vattenlösning av testämnet (förhållande 1:25).

Den minsta mängd jord som behövs för testet beror på laboratoriets utrustning och analysmetodernas prestanda. För tillförlitliga testresultat rekommenderas dock minst 1 g, helst 2 g.

Ett kontrollprov med enbart testämnet i 0,01 M CaCl₂-lösning (ingen jord) testas enligt exakt samma procedur som används för testsystemet, för att kontrollera testämnets stabilitet i CaCl₂-lösningen och dess eventuella adsorption på testkärlens ytor.

Ett blindprov per jord, med samma mängd jord och en totalvolym på 50 cm^3 0,01 M CaCl_2 -lösning (utan testämne) testas på samma sätt. Detta blindtest fungerar som bakgrundskontroll under analysen så att man kan detektera störande ämnen eller förorenade jordar.

Alla test, även kontroll- och blindtest, skall utföras minst två gånger. Det totala antalet prover som skall beredas för undersökningen bestäms utifrån den metod som används.

Metoderna för den förberedande undersökningen och huvudundersökningen är i regel desamma. I förekommande fall nämns skillnader som är av betydelse.

De lufttorkade jordproverna bringas till jämvikt genom omröring med en minimivolym på 45 cm^3 0,01 M CaCl_2 över natten (12 timmar) dagen före testet. Därefter tillsätts en bestämd volym av testämnets stamlösning för att justera den slutliga volymen till 50 cm^3 . Den tillsatta mängden av stamlösning skall a) vara högst 10% av vattenfasens slutliga volym på 50 cm^3 för att minimera ändringen av karaktären hos den jämviktade jordlösningen och b) helst ge en ursprunglig koncentration av testämnet som är i kontakt med jorden (C_0) som är minst två tiopotenser högre än analysmetodens detektionsgräns. Med denna tröskel säkerställs möjligheten att utföra tillräckligt noggranna mätningar även när stark adsorption inträffar ($> 90\%$) och möjligheten att längre fram bestämma adsorptionsisotermerna. Helst skall också, om det är möjligt, ämnets ursprungliga koncentration (C_0) inte överskrida hälften av dess löslighetsgräns.

Nedan ges ett exempel på beräkning av stamlösningens koncentration (C_{st}). För beräkningen gäller antagandet att detektionsgränsen är $0,01 \mu\text{g cm}^{-3}$ och adsorptionen 90%. Sålunda skall den ursprungliga koncentrationen av testämne i kontakt med jorden helst vara $1 \mu\text{g cm}^{-3}$ (två tiopotenser högre än detektionsgränsen). Under antagandet att den maximala rekommenderade volymen stamlösning tillsätts, dvs. 5 cm^3 till 45 cm^3 0,01 M CaCl_2 -jämviktslösning (= 10% stamlösning till 50 cm^3 total volym av vattenfas), bör stamlösningens koncentration vara $10 \mu\text{g cm}^{-3}$, dvs. tre tiopotenser högre än analysmetodens detektionsgräns.

Vattenfasens pH skall mätas före och efter kontakt med jorden eftersom pH-värdet spelar en viktig roll för hela adsorptionsprocessen, särskilt när det gäller joniserbara ämnen.

Lösningen rörs om så länge att adsorptionsjämvikt uppnås. Tiden för att nå jämvikt varierar kraftigt beroende på ämnet och jorden. I regel räcker 24 timmar (77). Vid den förberedande undersökningen kan sekventiella prover tas under en omröringstid på 48 timmar, t.ex. vid 4, 8, 24 och 48 timmar, men analysstidpunkterna kan också anpassas till arbetsschemat på laboratoriet.

Det finns två alternativ för analys av testämnet i vattenlösningen: a) parallellmetoden och b) seriemetoden. Det måste betonas att parallellmetoden, även om den tar längre tid att utföra, innebär enklare matematisk behandling av resultaten (bilaga 5). Valet av metod måste avgöras utifrån laboratoriets tillgängliga utrustning och resurser.

a) Parallellmetoden: Prover med samma jord-lösningsförhållande bereds. Antalet prover bestäms av antalet tidsintervall som används för undersökning av adsorptionskinetiken. Efter centrifugering och i förekommande fall filtrering tas det första rörets vattenfas till vara så fullständigt som möjligt och mäts efter t.ex. 4 timmar, det andra rörets vattenfas mäts efter 8 timmar, det tredje rörets efter 24 timmar osv.

b) Seriemetoden: Endast två likadana prover bereds för varje jord-lösningsförhållande. Faserna separeras genom centrifugering med bestämda tidsintervall. Ett litet delprov av vattenfasen analyseras omedelbart med avseende på testämnet, och därefter fortsätts testet med den ursprungliga blandningen. Om filtrering utförs efter centrifugeringen bör laboratoriet ha lämplig utrustning för filtrering av små delprover av vattenlösning. Det rekommenderas att den totala volymen delprover som tas inte överskrider 1% av lösningens totalvolym, så att det inte uppstår signifikanta ändringar i jord-lösningsförhållandet och minskningar i den mängd av löst ämne som är tillgänglig för adsorption under testet.

Den procentuella adsorptionen A_{t_1} beräknas för varje tidpunkt (t_1) på grundval av den nominella ursprungskoncentrationen och den uppmätta koncentrationen vid tidpunkten för provtagningen (t_1), med korrigering för blindprovets värde. En kurva där A_{t_1} avsätts mot tiden (figur 1 i bilaga 5) ritas upp för uppskattning av jämviktsplatån². Likaså beräknas K_d -värdet vid jämvikt. Utifrån detta K_d -värde väljs lämpliga jord-lösningsförhållanden i figur 1 så att den procentuella adsorptionen hamnar över 20%, och helst över 50% (61). De tillämpliga ekvationerna och principerna för uppritningen av kurvan ges i avsnittet "Data och rapportering" och i bilaga 5.

1.9.2.2 *Bestämning av adsorptionens jämviktstid och mängden av testämne som adsorberats vid jämvikt*

Kurvor där A_{t_1} eller C_{aq}^{ads} har avsatts mot tiden används, såsom tidigare nämnts, för att uppskatta när adsorptionsjämvikt inträtt och vilken mängd av testämne som adsorberats vid jämvikt. I figur 1 och 2 i bilaga 5 finns exempel på sådana kurvor. Jämviktstiden är den tid som systemet behöver för att nå en platå.

Om en viss jord inte ger upphov till någon platå utan en oavbruten ökning, kan detta bero på komplicerande faktorer såsom biologisk nedbrytning eller långsam diffusion. Biologisk nedbrytning kan konstateras genom att man upprepar testet med ett steriliserat prov av jorden. Om man fortfarande inte uppnår någon platå är det skäl att forska efter andra tänkbara faktorer. Det kan göras med lämpliga ändringar av testbetingelserna (temperatur, omröringstider, jord-lösningsförhållande etc.). Testledaren får avgöra om det är värt att fortsätta testet även om jämvikt inte kan uppnås.

1.9.2.3 *Adsorption på testkärlets yta och testämnets stabilitet*

Vissa indikationer rörande testämnets adsorption på testkärlets yta och rörande testämnets stabilitet kan fås fram genom analys av kontrollproverna. Om en minskning som är större än analysmetodens standardfel konstateras kan detta bero på abiotiskt sönderfall och/eller adsorption på testkärlets yta. För att avgöra vilket fenomen som är aktuellt tvättas testkärlets grundligt med en känd volym av lämpligt lösningsmedel, varefter tvättlösningen analyseras med avseende på testämnet. Om analysen visar att ingen adsorption på testkärlets yta har skett, beror minskningen på att testämnet är abiotiskt instabilt. Om adsorption kan konstateras, är det nödvändigt att byta till testkärl av annat material. Dessa resultat gällande adsorption på testkärlets yta kan dock inte direkt extrapoleras till testet med jord och lösning, eftersom adsorptionen i det senare fallet påverkas av att jord är närvarande.

Ytterligare uppgifter om testämnets stabilitet kan fås fram genom att man gör upp en massbalans som funktion av tiden. Det görs genom att vattenfasen, extrakt av jord samt testkärlets väggar analyseras med avseende på testämnet. Skillnaden mellan massan av tillsatt ämne och summan av testämnemassorna i vattenfasen, i jordextrakten och på testkärlets väggar är lika med den massa som brutits ned eller förflyktigats eller som inte har extraherats. En förutsättning för att massbalansen skall kunna bestämmas är att adsorptionsjämvikt uppnås inom den tid som går åt för testet.

² Jämviktsplatån kan också uppskattas genom att i ett diagram avsätta testämnets koncentration i vattenfasen (C_{aq}^{ads}) mot tiden (se figur 2 i bilaga 5).

Massbalansen bestäms för båda jordarna och för ett jord-lösningsförhållande för respektive jord som vid jämvikt ger en adsorption på över 20%, och helst över 50%. När proceduren för att få fram lämpliga jord-lösningsförhållanden har avslutats med analysen av det sista provet av vattenfas efter 48 timmar, separeras faserna genom centrifugering och, om så önskas, filtrering. Så mycket vattenfas som möjligt tas tillvara, och ett lämpligt extraktionslösningsmedel (med extraktionskoefficient på minst 95%) tillsätts jorden för att testämnet skall extraheras. Minst två extraktioner i följd rekommenderas. Mängden av testämne i extrakten från jord och testkäril bestäms, och massbalansen beräknas (se ekvation 10 i "Data och rapportering"). Om massbalansen är under 90% anses testämnet vara instabilt inom testets tidskala. Undersökningarna kan emellertid fortsättas om man tar testämnets instabilitet med i beräkningen, och i sådana fall är det tillrådligt att vid huvudundersökningen analysera båda faserna .

1.9.2.4 Skede 2 – Adsorptionskinetik vid en given koncentration av testämnet

Fem jordar väljs enligt tabell 1. Det är till fördel om dessa fem jordar inbegriper en del eller alla av de jordar som använts för den förberedande undersökningen. Då behöver skede 2 inte upprepas för den förberedande undersökningens jordar.

Jämviktstiden, jord-lösningsförhållandet, jordprovets vikt, volymen av vattenfasen i kontakt med jord samt testämnets koncentration i lösningen väljs på grundval av resultaten från den förberedande undersökningen. Analys skall helst utföras efter en kontakttid på 2, 4, 6, 8 (eventuellt även 10) och 24 timmar. Omröringstiden kan vid behov förlängas till högst 48 timmar om ämnet kräver längre jämviktstid. Vid behov kan analysstidpunkterna anpassas.

Varje test (en jord och en lösning) görs minst två gånger för att man skall få en indikation på resultatens varians. För varje test görs också ett blindtest. Det görs på jord och 0,01 M CaCl₂-lösning utan testämne och med samma vikt och volym som vid det riktiga testet. Som kontroll görs samma testproceduren på ett kontrollprov med enbart testämnet i 0,01 M CaCl₂-lösning (utan jord) som ett sätt att skydda sig mot oförutsedda faktorer.

Den procentuella adsorptionen beräknas för varje tidpunkt A_{t_1} eller tidsintervall $A_{\Delta t_1}$ (efter behov) och avsätts mot tiden i ett diagram. Likaså beräknas fördelningskoefficienten K_d vid jämvikt samt den normaliserade adsorptionskoefficienten K_{oc} (för opolära organiska ämnen).

Resultat av adsorptionskinetiktest

Det linjära K_d -värdet duger i allmänhet till att med tillräcklig noggrannhet beskriva sorptionsbeteendet i jord (35)(78), och det representerar ett uttryck för ämnens inherenta rörlighet i jord. Som exempel kan nämnas att allmänt förekommande kemiska ämnen med $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ i regel anses vara kvalitativt rörliga. Ett system för rörlighetsklassificering enligt K_{oc} -värden har konstruerats av MacCall *et al.* (16). Det finns också system för urlagningsklassificering som bygger på ett samband mellan K_{oc} och DT-50³ (32)(79).

Enligt felanalyser (61) kan K_d -värden under $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ inte uppskattas med tillräcklig noggrannhet på grundval av en koncentrationsminskning i vattenfasen, inte ens när det (ur noggrannhetssynpunkt) gynnsammaste jord-lösningsförhållandet används, dvs. 1:1. I detta fall rekommenderas analys av både jord- och lösningsfasen.

³ DT-50: nedbrytningstiden för 50 % av testämnet.

Med hänvisning till ovannämnda anmärkningar är det tillrådligt att undersökningen av ämnets adsorptionsbeteende i jord och dess potentiella rörlighet fortsätts genom bestämning av Freundlich-adsorptionsisotermer för sådana system där en tillräckligt noggrann bestämning av K_d är möjlig enligt schemat för den föreliggande testmetoden. En noggrann bestämning är möjlig om det värde som fås fram genom att multiplicera K_d med jord-lösningsförhållandet är $> 0,3$ när mätningarna grundar sig på en koncentrationsminskning i vattenfasen (indirekt metod), eller $> 0,1$ när båda faserna analyseras (direkt metod) (61).

1.9.2.5 Skede 3 – Adsorptionsisotermer, desorptionskinetik och desorptionsisotermer

1.9.2.5.1 Adsorptionsisotermer

Fem testämneskoncentrationer används, helst så att de sträcker sig över två tiopotenser. Vid valet av koncentrationer skall vattenlösligheten och de resulterande jämviktskoncentrationerna i vattenlösning tas med i beräkningen. Jordarnas respektive jord-lösningsförhållanden skall hållas konstanta genom hela undersökningen. Adsorptionstestet utförs enligt beskrivningen ovan, med enda skillnaden att vattenfasen bara analyseras en gång, efter den tid som enligt skede 2 går åt för att uppnå jämvikt. Jämviktskoncentrationerna i lösningen bestäms, och den adsorberade mängden beräknas på grundval av minskningen av testämne i lösningen, eller med hjälp av den direkta metoden. Den adsorberade massan per enhet jordmassa avsätts mot testämnets jämviktskoncentration i ett diagram (se "Data och rapportering").

Resultat av adsorptionsisotermtest

Av alla hittills framlagda matematiska adsorptionsmodeller är Freundlich-isotermerna en av de mest använda när det gäller att beskriva adsorptionsprocesser. För närmare uppgifter om hur man tolkar adsorptionsmodeller och om deras betydelse hänvisas till arbetena (41)(45)(80)(81)(82).

OBS: Det bör nämnas att jämförelse av K_F -värden (Freundlich-adsorptionskoefficienter) för olika ämnen bara är möjlig om K_F -värdena är uttryckta i samma måttenhet (83).

1.9.2.5.2 Desorptionskinetik

Syftet med detta test är att undersöka om ett ämne adsorberas reversibelt eller irreversibelt i en jord. Denna upplysning är betydelsefull eftersom desorptionsprocessen också spelar en viktig roll för hur ett ämne beter sig i fältjord. Dessutom är desorptionsdata värdefulla som indata när man vill skapa datormodeller för simulering av urlakning och avrinning av lösta ämnen. Om även desorptionen skall undersökas är det tillrådligt att den nedan beskrivna undersökningen utförs på varje system för vilket man kunnat göra en noggrann bestämning av K_d i det föregående adsorptionskinetiktestet.

Desorptionskinetiken kan, på samma sätt som adsorptionskinetiken, undersökas på två alternativa sätt: a) parallellmetoden och b) seriemetoden. Vilken metod som används får avgöras utifrån laboratoriets utrustning och resurser.

a) Parallellmetoden: För varje jord som har valts för desorptionsundersökning bereds ett antal prover med samma jord-lösningsförhållande. Antalet prover är samma som antalet tidpunkter vid vilka man önskar undersöka adsorptionskinetiken. Helst skall man använda samma tidsintervall som vid adsorptionskinetiktestet, även om totaltiden kan förlängas efter behov så att desorptionsjämvikt uppnås. För varje test (en jord och en lösning) körs ett blindprov. Detta består av jorden och 0,1 M CaCl₂-lösning, utan testämne, med samma vikt respektive volym som vid det riktiga testet. Som kontroll utförs samma testprocedur på enbart testämnet i 0,01 M CaCl₂-lösning (utan jord). Alla blandningar av jord med lösning rörs om tills adsorptionsjämvikt uppnås (enligt resultaten från skede 2). Därefter separeras faserna med centrifugering, och så mycket som möjligt av vattenfasen avlägsnas. Volymen avlägsnad lösning ersätts med en lika stor volym av 0,01 M CaCl₂ utan testämne, och den nya blandningen rörs om igen. Vattenfasen från det första röret tas till vara så fullständigt som möjligt och mäts efter t.ex. 2 timmar, vattenfasen från det andra röret efter 4 timmar, från det tredje efter 6 timmar osv., tills desorptionsjämvikt uppnås.

b) Seriemetoden: Efter adsorptionskinetiktestet centrifugeras blandningen, och så mycket som möjligt av vattenfasen avlägsnas. Den borttagna lösningens volym ersätts med lika stor volym av 0,01 M CaCl₂ utan testämne. Den nya blandningen rörs om tills desorptionsjämvikt uppnås. Under denna omröringstid centrifugeras blandningen med bestämda tidsintervall så att faserna separeras. Ett litet delprov av vattenfasen analyseras omedelbart med avseende på testämnet, och därefter fortsätts testet med den ursprungliga blandningen. Volymen för varje enskilt delprov skall vara mindre än 1 % av totalvolymen. Samma mängd av färsk 0,01 M CaCl₂-lösning tillsätts blandningen för att bibehålla förhållandet mellan jord och lösning, och omröringen fortsätts under nästa tidsintervall.

Den procentuella desorptionen beräknas för varje tidpunkt (D_{t_i}) eller tidsintervall ($D_{\Delta t_i}$) (beroende på vad som krävs för testet) och avsätts mot tiden i ett diagram. Likaså beräknas desorptionskoefficienten K_{des} vid jämvikt. De aktuella ekvationerna finns i avsnittet "Data och rapportering" och i bilaga 5.

Resultat från desorptionskinetiktest

Adsorptionsprocessens reversibilitet kan uppskattas med hjälp av ett diagram där den procentuella desorptionen D_{t_i} och adsorptionen A_{t_i} har avsatts mot tiden (i samma diagram). Om desorptionsjämvikt uppnås inom två gånger tiden för adsorptionsjämvikt, och den totala desorptionen är mer än 75% av den adsorberade mängden, anses adsorptionen vara reversibel.

1.9.2.5.3 Desorptionsisotermer

Freundlich-desorptionsisotermerna bestäms på de jordar som används i adsorptionsisotermtestet. Desorptionstestet utförs enligt beskrivningen i avsnittet "Desorptionskinetik", med undantag av att vattenfasen bara analyseras en gång, vid desorptionsjämvikt. Mängden av desorberat testämne beräknas. Halten av kvarvarande adsorberat testämne i jorden vid desorptionsjämvikt avsätts i ett diagram mot testämnets jämviktskoncentration i lösningen (se "Data och rapportering" samt bilaga 5).

2. DATA OCH RAPPORTERING

Data från analysen skall presenteras i tabellform (se bilaga 6). De enskilda mätningarna och beräknade medeltal skall anges. Adsorptionsisotermerna skall presenteras i diagramform. Beräkningarna skall göras på nedan beskrivet sätt.

Vid beräkningarna antas att vikten av 1 cm³ vattenlösning är 1 g. Därför kan jord-lösningsförhållandet uttryckas med samma värde oberoende av om vikt/vikt eller vikt/volym valts som måttenhet.

Adsorptionen (A_{t_i}) uttrycks i procent och definieras såsom förhållandet mellan den mängd av ämne som under testbetingelserna har adsorberats i jorden och den mängd som fanns närvarande vid testets början. Om testämnet är stabilt och inte i någon signifikant grad adsorberas på kärlets väggar beräknas A_{t_i} vid varje tidpunkt t_i enligt följande ekvation:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (3)$$

där:

A_{t_i} = den procentuella adsorptionen vid tidpunkten t_i (%),

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = massan av testämne som adsorberats i jorden vid tidpunkten t_i (μg),

m_0 = massan av testämne i provröret, vid testets början (μg).

Närmare anvisningar för hur den procentuella adsorptionen A_{t_i} beräknas för parallell- respektive seriemetoden finns i bilaga 5.

Fördelningskoefficienten K_d är förhållandet mellan ämnets halt i jordfasen och ämnets masskoncentration i vattenlösningen när adsorptionsjämvikt har inträtt, under testbetingelserna.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (4)$$

där:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = halten av adsorberat ämne i jord vid adsorptionsjämvikt ($\mu\text{g g}^{-1}$),

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = ämnets masskoncentration i vattenfasen vid adsorptionsjämvikt ($\mu\text{g cm}^{-3}$). Koncentrationen bestäms på analytisk väg med beaktande av värdet från blindprovet.

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massan av ämne som adsorberats i jord vid adsorptionsjämvikt (μg),

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = ämnets massa i lösningen vid adsorptionsjämvikt (μg),

m_{soil} = mängd av jordfas, uttryckt som torr jordmassa (g),

V_0 = ursprunglig volym av vattenfas i kontakt med jord (cm^3).

Sambandet mellan A_{eq} och K_d ges av:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (5)$$

där:

A_{eq} = procentuell adsorption vid adsorptionsjämvikt, %.

Den normaliserade adsorptionskoefficienten för organiskt kol K_{oc} bestämmer sambandet mellan fördelningskoefficienten K_d och halten av organiskt kol i jordprovet:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (6)$$

där:

$\%OC$ = procentuell andel organiskt kol i jordprovet (g g^{-1}).

Koefficienten K_{oc} representerar ett värde som beskriver hur huvudsakligen opolära organiska ämnen fördelas mellan å ena sidan jordens eller sedimentets organiska kol och å andra sidan vattnet. Sådana ämnens adsorption är beroende av den sorberande fasta fasens organiska innehåll (7), och därför beror K_{oc} -värdet på de humösa fraktionernas specifika egenskaper, eftersom sorptionskapaciteten hos dessa fraktioner kan variera kraftigt beroende på deras olika ursprung, genes osv.

2.1.1 Adsorptionsisotermer

Ekvationen för Freundlich-adsorptionsisotermer ger sambandet mellan mängden av adsorberat testämne och testämnets koncentration i lösningen vid jämvikt (ekvation 8).

Data behandlas på samma sätt som i punkten "Adsorption" ovan, och halten av adsorberat testämne i jorden efter adsorptionstestet ($C_s^{ads}(eq)$), på andra ställen betecknat som x/m beräknas för varje provrör, under antagandet att jämvikt har inträtt och att $C_s^{ads}(eq)$ representerar jämviktsvärdet:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

Freundlich-adsorptionsekvationen (8) ser ut så här:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

eller i linjär form:

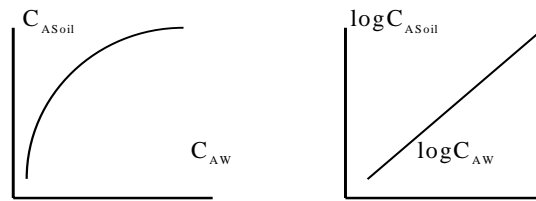
$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

där:

K_F^{ads} = Freundlich-adsorptionskoefficienten, som anges i dimensionen $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ bara om exponenten $1/n = 1$. I alla andra fall införs $1/n$ i dimensionen för K_F^{ads} ($\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$).

n = regressionskoefficienten. $1/n$ ligger i regel mellan 0,7 och 1,0 som indikation på att sorptionsdata ofta är något olinjära.

Ekvationerna (8) och (9) ritas upp i diagram, och värdena på K_F^{ads} och $1/n$ beräknas med regressionsanalys med hjälp av ekvation 9. Likaså beräknas den logaritmiska ekvationens korrelationskoefficient r^2 . Exempel på kurvor av detta slag finns i figur 2.



Figur 2. Freundlich-adsorptionskurva (normal respektive linjariserad)

2.1.2

Massbalans

Massbalansen (MB) anges i procent och definieras som förhållandet mellan den mängd av ämnet som analytiskt kan tas till vara efter adsorptionstestet och den nominella mängden av ämnet vid testets början.

Behandlingen av resultaten blir annorlunda om lösningsmedlet är fullständigt blandbart med vatten. Då kan man behandla resultaten på samma sätt som i punkten "Desorption" för att bestämma den mängd av ämnet som tagits till vara genom extraktion av lösningsmedel. Om lösningsmedlet är mindre blandbart med vatten krävs en bestämning av den tillvaratagna mängden.

Massbalansen MB för adsorptionen beräknas enligt följande ekvation, under antagandet att termen (m_E) motsvarar summan av de testämnesmassor som extraherats ur jorden och från testkärlets yta med hjälp av ett organiskt lösningsmedel:

$$MB = \frac{(V_{\text{rec}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

där:

MB = massbalans (%),

m_E = total massa av testämne som extraherats ur jorden och från testkärlets väggar i två steg (μg),

C_0 = ursprunglig masskoncentration i testlösningen som är i kontakt med jord ($\mu\text{g cm}^{-3}$),

V_{rec} = volymen supernatant som tagits till vara efter adsorptionsjämvikt (cm^3).

Desorptionen (D) uttrycks i procent och definieras som förhållandet mellan den desorberade mängden av testämnet och den tidigare adsorberade mängden av ämnet, under testbetingelserna:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

där:

D_{t_i} = procentuell desorption vid tidpunkten t_i (%),

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massan av testämne som desorberats ur jorden vid tidpunkten t_i (μg),

$m_s^{ads}(eq)$ = massan av testämne som adsorberats i jorden vid adsorptionsjämvikt (μg).

Närmare anvisningar för sättet att beräkna den procentuella desorptionen D_{t_i} för parallell- och seriemetoden finns i bilaga 5.

Den skenbara desorptionskoefficienten (K_{des}) är, under de aktuella testbetingelserna, förhållandet mellan massan av ämne som finns kvar i jordfasen och massan av desorberat ämne i vattenlösningen, när desorptionsjämvikt har inträtt:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

där:

K_{des} = desorptionskoefficient ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = totala massan av testämne som desorberats ur jord vid desorptionsjämvikt (μg),

V_T = totala volymen av vattenfas i kontakt med jord under desorptionskinetiktestet (cm^3).

Anvisningar för beräkning av $m_{aq}^{des}(eq)$ finns i bilaga 5 under rubriken "Desorption".

Anmärkning

Om adsorptionstestet som föregår desorptionstestet utförts med parallellmetoden, kan volymen V_T i ekvation (12) sättas lika med V_0 .

Desorptionsisotermer

Ekvationen för Freundlich-desorptionsisotermer beskriver sambandet mellan mängden av testämne som förblir adsorberat i jorden och koncentrationen av testämne i lösningen vid desorptionsjämvikt (ekvation 16).

Halten av ämne som förblir adsorberat i jorden vid desorptionsjämvikt beräknas för varje provrör enligt följande:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}$ (eq) definieras som:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq}) \cdot \frac{V_0}{V_{\text{F}}} - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad (\mu\text{g}) \quad (14)$$

där:

$C_{\text{S}}^{\text{des}}$ (eq) = halten av testämne som förblir adsorberat i jorden vid desorptionsjämvikt ($\mu\text{g g}^{-1}$),

$m_{\text{m}}^{\text{des}}$ (eq) = massan av ämne som bestämts analytiskt i vattenfasen vid desorptionsjämvikt (μg),

m_{aq}^{A} = massan av testämne som blivit över (efter att adsorptionsjämvikt inträtt) på grund av ofullständig volymersättning (μg),

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}$ (eq) = massan av ämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt (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} = volymen av lösning som tagits ur röret för uppmätning av testämnet vid desorptionsjämvikt (cm^3)

V_{R} = volymen av supernatant som avlägsnats ur röret efter att adsorptionsjämvikt inträtt och som ersatts med samma volym av 0,01 M CaCl₂-lösning (cm^3).

Freundlich-desorptionsekvationen (16) ser ut så här:

$$C_{\text{S}}^{\text{des}}(\text{eq}) = K_{\text{F}}^{\text{des}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

eller i linjär form:

$$\log C_{\text{S}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_{\text{F}}^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

där:

$K_{\text{F}}^{\text{des}}$ = Freundlich-desorptionskoefficienten,

n = regressionskoefficienten,

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = ämnets masskoncentration i vattenfasen vid desorptionsjämvikt ($\mu\text{g cm}^{-3}$).

Ekvationerna (16) och (17) kan ritas upp i diagram, och värdet på $K_{\text{F}}^{\text{des}}$ och $1/n$ beräknas med regressionsanalys med hjälp av ekvation 17.

Anmärkning:

Om Freundlichs adsorptions- eller desorptionsexponent $1/n$ är lika med 1, blir Freundlichs adsorptions- eller desorptionskoefficient ($K_{\text{F}}^{\text{ads}}$ respektive $K_{\text{F}}^{\text{des}}$) lika med adsorptionens respektive desorptionens

jämviktskoefficient (K_d och K_{des}), och kurvorna över C_s som funktion av C_{aq} blir linjära. Om exponenten är skild från 1, blir kurvorna över C_s som funktion av C_{aq} olinjära, och adsorptions- och desorptionskoefficienterna kommer att variera längs isotermer.

2.2.2

RAPPORT

Testrapporten skall innehålla följande uppgifter:

- Fullständiga uppgifter om jordproverna, inbegripet följande:
 - områdets geografiska läge (latitud och longitud),
 - provtagningsdatum,
 - bruksändamål (t.ex. jordbruk, skog osv.),
 - provtagningsdjup,
 - halt av sand, *silt* och *clay*,
 - pH-värden (i 0,01 M CaCl_2),
 - halt av organiskt kol,
 - halt av organiskt material,
 - kvävehalt,
 - kol-kväveförhållande,
 - katjonbyteskapacitet (mmol/kg),
 - alla uppgifter av betydelse som rör provtagning och förvaring av jordproverna,
 - i förekommande fall, alla uppgifter av betydelse för tolkning av testämnets adsorption och desorption,
 - uppgift om vilka metoder som använts för bestämning av enskilda parametrar.
- Relevanta uppgifter om testämnet
- Testtemperaturen
- Centrifugeringsbetingelser
- Analysprocedurer som använts för analys av testämnet
- I förekommande fall motivering för användning av hjälplösningsmedel för beredning av testämnets stamlösning
- I förekommande fall förklaringar av korrigeringar som gjorts i beräkningarna
- Data enligt blanketten (bilaga 6) och diagram
- Alla uppgifter och observationer som kan vara till hjälp för att tolka testresultaten.

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. Fränzele 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.

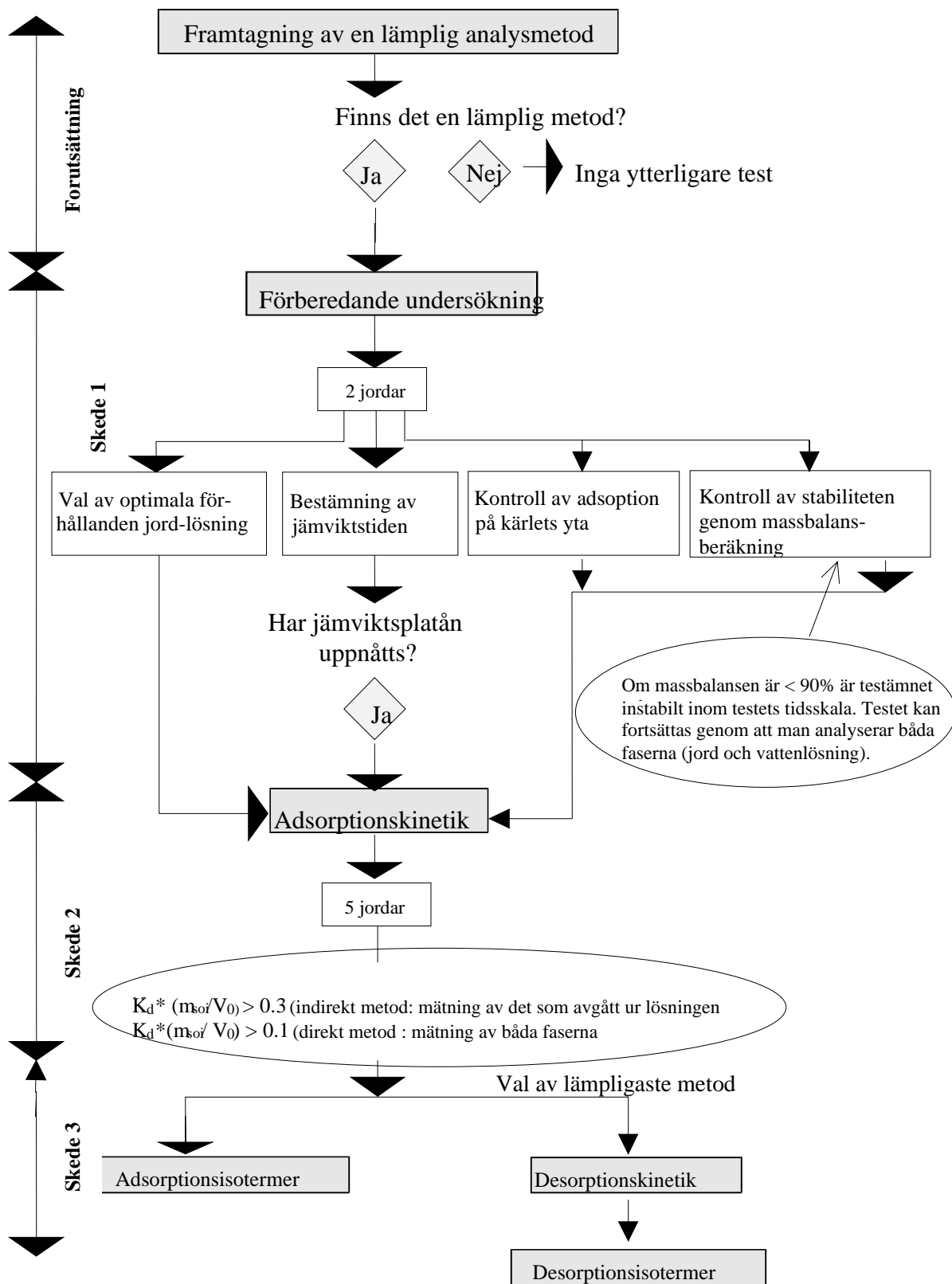
21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
22. Furninge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), "Persistence of herbicides in 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).

BILAGA 1

Testschema



BILAGA 2
ADSORPTIONSRESULTATENS NOGGRANNHET SOM FUNKTION AV
ANALYSMETODENS NOGGRANNHET OCH KONCENTRATIONSÄNDRINGEN

Av tabellen nedan (84) framgår klart att när skillnaden mellan massan vid testets början ($m_0 = 110 \mu\text{g}$) och testämnets massa i lösningen vid jämvikt ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = 100 \mu\text{g}$) är mycket liten, så leder ett fel på 5% vid mätning av jämviktskoncentrationen till ett fel på 50% i beräkningen av massan av ämne som adsorberats i jorden ($m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$) och ett fel på 52,4% i beräkningen av K_d .

Mängd jord $m_{\text{soil}} = 10 \text{ g}$
 Lösningens volym $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	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)	($\mu\text{g g}^{-1}$)			
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	För A = 9 %							
	100	1,000	verkligt värde	10	1,00	verkligt värde	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%
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	För A = 55 %							
	50,0	0,500	verkligt värde	60,0	6,00	verkligt värde	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%
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	För A = 99 %							
	1,100	0,011	verkligt värde	108,9	10,89	verkligt värde	990	
	1,111	0,01111	1%	108,889	10,8889	0,01%	980	1,0%
	1,155	0,01155	5%	108,845	10,8845	0,05%	942	4,8%
	1,21	0,0121	10%	108,790	10,8790	0,10%	899	9,2%

$$* m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}}, \quad K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

där:

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = testämnets massa i jordfasen vid jämvikt, μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = testämnets massa i vattenfasen vid jämvikt, μg ;

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = testämnets halt i jordfasen vid jämvikt, $\mu\text{g g}^{-1}$;

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = testämnets masskoncentration i vattenfasen vid jämvikt, $\mu\text{g cm}^{-3}$;

R = analysfel vid bestämning av $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

R^{\ddagger} = beräkningsfel på grund av analysfelet R.

BILAGA 3

ESTIMERINGSMETODER FÖR K_d

1. Genom estimeringsmetoder kan K_d uppskattas på grundval av samband med t.ex. P_{ow} -värden (12)(39)(63-68), vattenlöslighetsdata (12)(19)(21)(39)(68-73) eller polaritetsdata som fått fram från HPLC-RP (omvänd fas) (74-76). K_{oc} och K_{om} beräknas med hjälp av ekvationerna i tabell 1 och 2, och sedan räknas K_d fram indirekt ur följande ekvationer:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1.724} \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1})$$

2. Principen för dessa samband grundar sig på två antaganden: 1) det är främst jordens organiska material som påverkar hur ett ämne adsorberas, och 2) de växelverkansprocesser som förekommer är i huvudsak opolära. Det innebär att dessa samband 1) inte, eller bara delvis, kan tillämpas på polära ämnen, och 2) inte kan tillämpas i fall där jordens halt av organiskt material är mycket låg (12). Vidare gäller att samma sak inte kan konstateras angående sambandet mellan vattenlöslighet och adsorptionens omfattning (19)(21), även om man har funnit tillfredsställande korrelation mellan P_{ow} och adsorption (19). Hittills gjorda undersökningar har gett motsägelsefulla resultat.

3. I tabell 1 ges några exempel på samband mellan adsorptionens fördelningskoefficient och fördelningskoefficienten oktanol-vatten. I tabell 2 ges några exempel på samband mellan adsorptionens fördelningskoefficient och vattenlösligheten.

Tabell 1. Exempel på samband mellan adsorptionens fördelningskoefficient och fördelningskoefficienten oktanol-vatten. Ytterligare exempel finns i (12) (68).

Ämne	Samband	Författare
Substituerad urea	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromatiska klorerade ämnen	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Diverse bekämpningsmedel	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl och Mingelgrin (1984) (66)
Aromatiska kolväten	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles och Mantoura (1987) (67)

Tabell 2. Exempel på samband mellan adsorptionens fördelningskoefficient och vattenlösligheten. Ytterligare exempel finns i (68) (69).

Ämne	Samband	Författare
Diverse bekämpningsmedel	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl och Mingelgrin (1984) (66)
Alifatiska, aromatiska, klorerade ämnen	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α -naftol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Cykliska, alifatiska aromatiska ämnen	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Diverse föreningar	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

BILAGA 4

BERÄKNINGAR FÖR BESTÄMNING AV CENTRIFUGERINGSBETINGELSER

1. Centrifugeringstiden fås fram genom följande formel, under antagande att partiklarna är sfäriska:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Av praktiska skäl ges parametrarna i måttenheterna g, cm etc. i stället för de normala SI-enheterna.

där:

ω	=	rotationshastighet (=2 π rpm/60), rad s ⁻¹
rpm	=	varv per minut
η	=	lösningens viskositet, g s ⁻¹ cm ⁻¹
r_p	=	partikelradie, cm
ρ_s	=	jordens densitet, g cm ⁻³
ρ_{aq}	=	lösningens densitet, g cm ⁻³
R_t	=	avstånd från centrifugrotorns centrum till lösningens övre yta i centrifugeringsröret, cm
R_b	=	avstånd från centrifugrotorns centrum till centrifugeringsrörets botten, cm
$R_b - R_t$	=	jord-lösningblandningens höjd i centrifugeringsröret, cm.

För att säkerställa fullständig separation får centrifugen som regel gå två gånger den framräknade tiden.

2. Ekvation 1 kan förenklas ytterligare om lösningens viskositet (η) och densitet (ρ_{aq}) kan anses vara samma som viskositeten och densiteten för vatten vid 25 °C, dvs. $\eta = 8.95 \times 10^{-3}$ g s⁻¹ cm⁻¹ och $\rho_{aq} = 1.0$ g cm⁻³.

Då fås centrifugeringstiden genom ekvation 2:

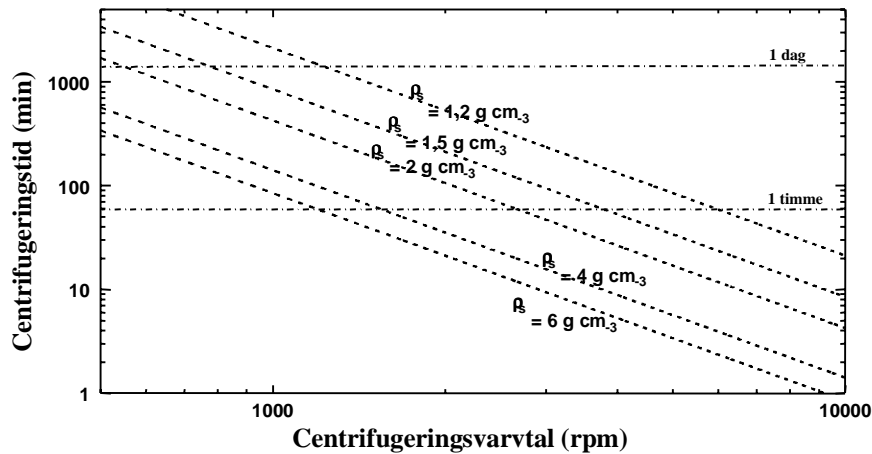
$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. Av ekvation 2 framgår tydligt att det är två faktorer som har stor betydelse när det gäller att bestämma de centrifugeringsbetingelser, dvs. tid (t) och varvtalet (rpm), som behövs för att åstadkomma separation av partiklar av en viss storlek (i detta fall med radien 0,1 μ m): 1) jordens densitet och 2) blandningens höjd i centrifugeringsröret ($R_b - R_t$), dvs. det avstånd som en jordpartikel färdas från lösningens övre yta till rörets botten. För en given volym bestäms blandningens höjd självfallet av rörets radie.

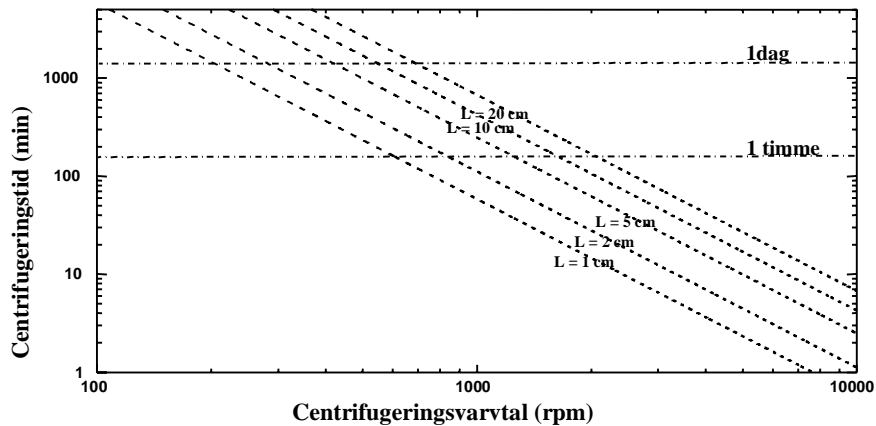
4. I figur 1 visas centrifugeringstiden (t) som funktion av varvtalet (rpm) för olika jorrdensiteter (ρ_s) (figur 1 a) och för olika blandningshöjder i centrifugeringsröret (figur 2 a). Av figur 1 a framgår inverkan av jordens densitet tydligt – vid klassisk centrifugering med 3000 rpm är centrifugeringstiden cirka 240 minuter när jordens densitet är 1,2 g cm³, men bara 50 minuter när densiteten är 2,0 g cm³. Likaså visar figur 1 b att centrifugeringstiden vid klassisk centrifugering med 3000 rpm är cirka 50 minuter om blandningens höjd är 10 cm men bara 7 minuter om höjden är 1 cm. Det är dock viktigt att finna en optimal avvägning mellan å ena sidan så liten blandningshöjd som möjligt för centrifugeringen och å andra sidan enkel hantering när det gäller att separera faserna efter centrifugering.

5. När testbetingelserna för separering av jord- och lösningsfaserna skall bestämmas är det också viktigt att beakta eventuell förekomst av en tredje "pseudofas", dvs. kolloider. Dessa partiklar är mindre än $0,2 \mu\text{m}$ och kan ha viktig inverkan på hela adsorptionsmekanismen för ett ämne i en jordsuspension. När centrifugeringen utförs på ovan beskrivet sätt blir kolloiderna kvar i vattenfasen och analyseras då tillsammans med den. Då går informationen om deras inverkan förlorad.

Om laboratoriet har möjligheter till ultracentrifugering eller ultrafiltrering kan adsorptionen och desorptionen av ett ämne i jord studeras mer ingående, även beträffande ämnets adsorption på kolloiderna. Då skall ultracentrifugering med 60.000 rpm/min eller ultrafiltrering med filterporositeten 100.000 Dalton användas för att separera de tre faserna jord, kolloider och lösning. Då skall också testschemat ändras så att alla tre faserna tas med i ämnesanalysen.



Figur 1a. Samband mellan centrifugeringstid (t) och centrifugeringsvarvtal (rpm) för olika jorddensiteter (ρ_s). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ och $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ vid $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

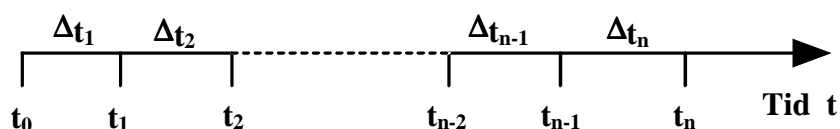


Figur 1b. Samband mellan centrifugeringstid (t) och centrifugeringsvarvtal (rpm) för olika höjder på blandningen i centrifugeringsröret ($R_b - R_t = L$; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ vid $25 \text{ }^\circ\text{C}$ och $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

BILAGA 5

BERÄKNING AV ADSORPTION A (%) OCH DESORPTION D (%)

Procedurens tidsschema är följande:



För samtliga beräkningar gäller antagandet att testämnet är stabilt och att det inte i någon signifikant grad adsorberas på kärlets väggar.

ADSORPTION A (%)

a) Parallellmetoden

Den procentuella adsorptionen beräknas för varje provrör (i) vid varje tidpunkt (t_i), enligt följande ekvation:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (1)^4$$

Ekvationens termer beräknas enligt följande:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

där:

A_{t_i} = den procentuella adsorptionen (%) vid tidpunkten t_i ,

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = testämnets massa i jorden vid tidpunkten t_i då analysen utförs (μg),

m_0 = testämnets massa i provröret vid testets början (μg),

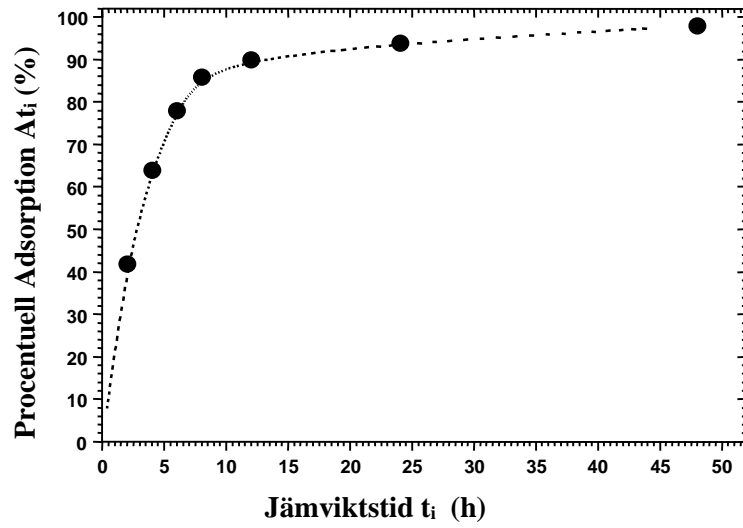
C_0 = ursprunglig masskoncentration i testlösningen som är i kontakt med jorden ($\mu\text{g cm}^{-3}$),

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ = ämnets masskoncentration i vattenfasen vid tidpunkten t_i då analysen utförs ($\mu\text{g cm}^{-3}$).
Denna koncentration bestäms analytiskt med beaktande av värdena från blindproven.

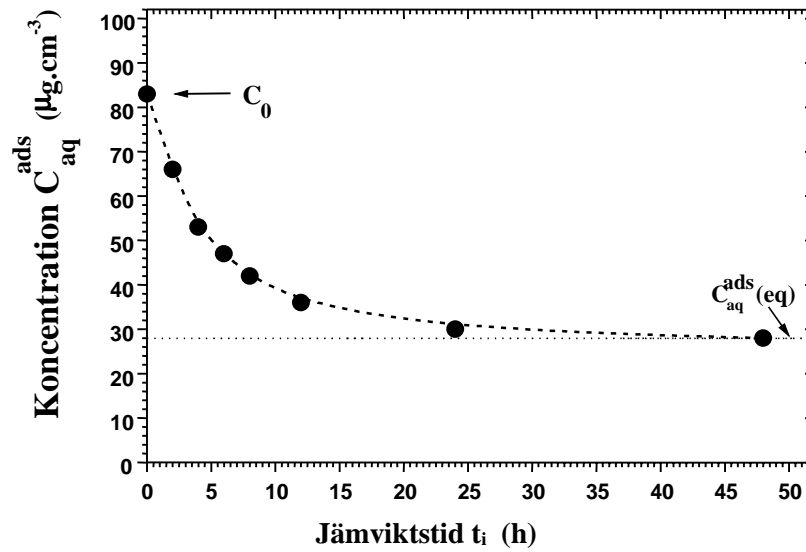
V_0 = ursprunglig volym för den testlösning som är i kontakt med jorden (cm^3).

Värdet på den procentuella adsorptionen A_{t_i} eller $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ avsätts mot tiden i ett diagram, och kurvan används för att bestämma tiden för när sorptionsjämvikt inträder. Exempel på sådana kurvor finns i figur 1 och figur 2.

⁴ Ekvationen gäller för både direkt och indirekt metod.



Figur 1. Kurva för bestämning av adsorptionsjämvikt



Figur 2. Testämnetets masskoncentration i vattenfasen (C_{aq}) som funktion av tiden.

b) Seriemetoden

I ekvationerna som följer är utgångspunkten att adsorptionen undersöks genom mätning av testämnet i små delprover av vattenfasen med bestämda tidsintervall.

- Den mängd ämne som adsorberats i jorden under varje tidsintervall beräknas på följande sätt:

– för det första tidsintervallet $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

– för det andra tidsintervallet $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

– för det tredje tidsintervallet $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

– för det n:te tidsintervallet $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

- Den procentuella adsorptionen under varje tidsintervall $A_{\Delta t_i}$ beräknas genom ekvationen

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (8)^5$$

och den procentuella adsorptionen vid tidpunkten t_i (A_{t_i}) fås genom ekvationen

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (9)^5$$

⁵ Ekvationen gäller för både direkt och indirekt metod. De övriga ekvationerna gäller bara när den indirekta metoden används.

Adsorptionsvärdena A_{t_1} eller $A_{\Delta t_1}$ (beroende på vad som krävs i undersökningen) ritas upp som funktion av tiden i ett diagram, och kurvan används för att bestämma tidpunkten för när sorptionsjämvikt inträder.

- Vid jämviktstiden t_{eq} gäller följande:

– massan av testämne som adsorberats i jorden:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^5$$

– massan av testämne i lösningen:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^5$$

– och den procentuella adsorptionen vid jämvikt:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)^5$$

De ovan använda parametrarna definieras enligt följande:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = massan av ämne som adsorberats i jorden under tidsintervallen $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg),

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$ = massan av ämne som uppmätts i ett delprov v_a^A vid tidpunkterna t_1, t_2, \dots, t_n (μg),

$m_s^{ads}(eq)$ = massan av ämne som adsorberats i jorden vid adsorptionsjämvikt (μg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massan av ämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt (μg),

v_a^A = volymen av det delprov i vilket testämnet uppmätts (cm^3),

$A_{\Delta t_1}$ = procentuell adsorption under tidsintervallet Δt_1 (%),

A_{eq} = procentuell adsorption vid adsorptionsjämvikt (%).

DESORPTION D (%)

Som starttid t_0 för desorptionskinetiktestet räknas den tidpunkt då den maximala tillvaratagna volymen av testämneslösning (efter att adsorptionsjämvikt har inträtt) ersätts med en lika stor volym 0,01 M CaCl_2 -lösning.

a) Parallellmetoden

Vid tidpunkten t_i uppmäts massan av testämnet i volymen av den vattenfas som tagits ur rör nummer i (V_r^i), och den desorberade massan beräknas enligt följande ekvation:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Vid desorptionsjämvikt är $t_i = t_{eq}$, och därför är $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Massan av testämne som har desorberats under ett tidsintervall (Δt_i) ges av ekvationen:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Den procentuella desorptionen beräknas

- för tidpunkten t_i enligt ekvationen

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (15)$$

- och för tidsintervallet Δt_i enligt ekvationen

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (16)$$

där:

D_{t_i} = procentuell desorption vid tidpunkten t_i (%),

$D_{\Delta t_i}$ = procentuell desorption under tidsintervallet Δt_i (%),

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massan av testämne som desorberats vid tidpunkten t_i (μg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = massan av testämne som desorberats under tidsintervallet Δt_i (μg),

$m_m^{des}(t_i)$ = massan av testämne som uppmäts analytiskt vid tidpunkten t_i i den lösningsvolym V_r^i som har tagits för analysen (μg),

m_{aq}^A = massan av testämne som blivit över från adsorptionsjämvikten på grund av ofullständig volymersättning (μg),

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massan av testämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt (μg),

V_R = volymen av supernatant som tagits ur röret efter uppnådd adsorptionsjämvikt och som ersatts med samma volym 0,01 M CaCl_2 -lösning (cm^3),

V_T^i = volymen av lösning som tagits ur rör nummer i för uppmätning av testämnet i desorptionskinetiktestet (cm^3).

Desorptionsvärdena D_{t_i} eller $D_{\Delta t_i}$ (beroende på vad som krävs i undersökningen) ritas upp som funktion av tiden i ett diagram, och kurvan används för att bestämma när desorptionsjämvikt inträder.

b) Seriemetoden

I ekvationerna som följer är utgångspunkten att den föregående adsorptionsundersökningen utförts genom att mäta testämnet i små delprovsvolymer (v_a^A) av vattenfasen (seriemetoden, se avsnitt 1.9 "Mätförfarande"). Härvid antas a) att volymen av den supernatant som avlägsnats ur röret efter adsorptionskinetiktestet har ersatts med en lika stor volym av 0,01 M CaCl_2 -lösning (V_R) och b) att den totala volymen av vattenfasen som är i kontakt med jord (V_T) under desorptionskinetiktestet förblir konstant och ges av följande ekvation:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

Vid tidpunkten t_i gäller följande:

- Massan av testämne mäts i ett litet delprov (v_a^D) och den desorberade massan beräknas enligt följande ekvation:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

- Vid desorptionsjämvikt är $t_i = t_{eq}$, och därför är $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.
- Den procentuella desorptionen D_{t_i} beräknas enligt följande ekvation:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (20)$$

För tidsintervallet Δt_i gäller följande:

- Mängden desorberat ämne beräknas för varje tidsintervall, enligt följande:

— för det första tidsintervallet $\Delta t_1 = t_1 - t_0$:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad \text{och} \quad m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_1) = m_{\text{s}}^{\text{aq}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— för det andra tidsintervallet $\Delta t_2 = t_2 - t_1$:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) \quad \text{och}$$

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_2) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \left[m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) \right] \quad (22)$$

— för det n:te tidsintervallet $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-1) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-i) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \cdot m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right) \right]$$

$$\text{och} \quad m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_n) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Till slut beräknas den procentuella desorptionen under varje tidsintervall $D_{\Delta t_i}$ med hjälp av ekvationen

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (24)$$

och den procentuella desorptionen D_{t_i} vid tidpunkten t_i ges av ekvationen

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

där de ovan använda parametrarna definieras på följande sätt:

$m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = massan av testämne som förblir adsorberat i jorden efter tidsintervallen $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg),

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = massan av testämne som desorberas under tidsintervallen $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg),

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$ = massan av ämne som uppmätts i ett delprov (v_a^D) vid tidpunkterna t_1, t_2, \dots, t_n (μg),

V_T = totala volymen av vattenfas som är i kontakt med jorden under desorptionskinetiktestet enligt seriemetoden (cm^3),

m_{aq}^A = massan av testämne som blivit över efter uppnådd adsorptionsjämvikt på grund av ofullständig volymersättning (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 = volymen av supernatant som avlägsnats ur röret efter att adsorptionsjämvikt inträtt och som ersatts med samma volym av 0,01 M CaCl_2 -lösning (cm^3)

v_a^D = volymen av det delprov som tagits för analys ur rör nummer i under desorptionskinetiktestet enligt seriemetoden (cm^3).

$$v_a^D \leq 0.02 \cdot V_T \quad (27)$$

BILAGA 6

TEST AV ADSORPTION OCH DESORPTION I JORDAR – RAPPORTBLANKETTER

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Analysmetodens lämplighet

Uppvägt jordprov	g	
Jordens torrmasa	g	
CaCl ₂ -lösningens volym	cm ³	
Slutlösningens nominella koncentration	µg cm ⁻³	
Slutlösningens analyserade koncentration	µg cm ⁻³	

Princip för den använda analysmetoden:

Kalibrering av analysmetoden:

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Adsorptionstest: blind- och kontrollprov

	Beteckning	Mått-enhet	Blindprov		Blindprov		Kontrollprov	
Rör nr								
Uppvägt jordprov	–	g					0	0
Uppvägda jordprovets vattenvolym (beräknat värde)		cm ³					-	-
Tillsatt volym av 0,01 M CaCl ₂ -lösning		cm ³						
Tillsatt volym av testämnets stamlösning		cm ³	0	0				
Vattenfasens totalvolym (beräknat värde)		cm ³					-	-
Testämnets ursprungliga koncentration i vattenfasen		µg cm ⁻³						
Efter omröring och centrifugering								
Koncentration i vattenfasen		µg cm ⁻³						

Anmärkning: Lägg till kolumner efter behov.

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Massbalans

	Beteckning	Mått-enhet				
Rör nr						
Uppvägt jordprov	–	g				
Jordens torrmasa	m_{soil}	g				
Uppvägda jordprovets vattenvolym (beräknat värde)	V_{WS}	ml				
Volym av 0,01 M CaCl ₂ -lösning för att få jorden i jämvikt		ml				
Stamlösningens volym		cm ³				
Total volym av vattenfas i kontakt med jord	V_0	cm ³				
Testlösningens ursprungliga koncentration	C_0	µg cm ⁻³				
Jämviktstid	-	h				
Efter omrörning och centrifugering						
Testämnets koncentration i vattenfasen (med blindprovskorrigerig)	$C_{\text{aq}}^{\text{S}}(\text{eq})$	µg cm ⁻³				
Jämviktstid	t_{eq}	h				
1:a utspädning med lösningsmedel						
Avlägsnad volym av vattenfas	V_{rec}	cm ³				
Tillsatt volym av lösningsmedel	ΔV	cm ³				
1:a extraktion med lösningsmedel						
Signalutslag vid analys av lösningsmedlet	S_{E1}	varie-rande				
Testämnets koncentration i lösningsmedlet	C_{E1}	µg cm ⁻³				
Massan av ämne som extraherats från jord och kärlets väggar	m_{E1}	µg				
2:a utspädning med lösningsmedel						
Avlägsnad volym av lösningsmedel	ΔV_{s}	cm ³				
Tillsatt volym av lösningsmedel	$\Delta V'$	cm ³				
2:a extraktion med lösningsmedel						
Signalutslag vid analys av lösningsmedlet	S_{E2}	varie-rande				
Testämnets koncentration i lösningsmedlet	C_{E2}	µg cm ⁻³				
Massan av testämne som extraherats från jord och kärlets väggar	m_{E2}	µg				
Total massa av testämne som extraherats i två steg	m_{E}					
Massbalans	MB	%				

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Adsorptionsisotermer

	Beteckning	Mått-enhet								
Rör nr										
Uppvägt jordprov	-	g								
Jordprovets torrmasa	E	g								
Uppvägda jordprovets vattenvolym (beräknat värde)	V_{ws}	cm^3								
Volym av 0,01 M $CaCl_2$ -lösning för att få jorden i jämvikt		cm^3								
Volym av tillsatt stamlösning		cm^3								
Total volym av vattenfas i kontakt med jord (beräknat värde)	V_0	cm^3								
Lösningens koncentration	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Jämviktstid	-	h								
Efter omröring och centrifugering										
Testämnets koncentration i vattenfasen (med blindprovskorrigerig)	$C_{aq}^{ads}\ (eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Temperatur		°C								
Adsorberad massa per enhet jord	$C_s^{ads}\ (eq)$	$\mu g\ g^{-1}$								

Regressionsanalys:

värdet på K_F^{ads} :

värdet på $1/n$:

regressionskoefficient r^2 :

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Analysmetod: Indirekt metod Parallellmetod Seriemetod

Desorptionstest

	Beteckning	Måttenhet	Tidsintervall	Tidsintervall	Tidsintervall	Tidsintervall
Numret på röret som kommer från adsorptionssteget						
Massan av testämne som adsorberats i jord vid adsorptionsjämvikt	$m_s^{ads}(eq)$	μg				
Avlägsnad volym av vattenfas, ersatt med 0,01 M CaCl ₂	V_R	cm^3				
Total volym av vattenfas i kontakt med jord	PM	V_0	cm^3			
	SM	V_T	cm^3			
Massan av testämne som blivit över efter uppnådd adsorptionsjämvikt på grund av ofullständig volymersättning	m_{aq}^A	μg				
Desorptionskinetik						
Uppmätt massa av testämne som desorberats ur jorden vid tidpunkten t_i	$m_m^{des}(t_i)$	μg				
Volym av lösning som tagits ur rör nummer i för uppmätning av testämnet	PM	v_r^i	cm^3			
	SM	v_a^D	cm^3			
Massan av testämne som desorberats ur jorden vid tiden t_i (beräknat värde)	$m_{aq}^{des}(t_i)$	μg				
Massan testämne som desorberats ur jorden under tidsintervallet Δt_i (beräknat värde)	$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	μg				
Procentuell desorption						
Desorption vid tidpunkten t_i	D_{t_i}	%				
Desorption under tidsintervallet Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Skenbar desorptionskoefficient	K_{des}					

PM: Parallellmetod
SM: Seriemetod

C.19. UPPSKATTNING AV ADSORPTIONSKOEFFICIENTEN (K_{oc}) I JORD OCH AVLOPPSSLAM MED ANVÄNDNING AV HÖGTRYCKSVÄTSKEKROMATOGRAFI (HPLC)

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG121 (2000).

1.1 INLEDNING

Sorptionsbeteendet hos ämnen i jord eller avloppsslam kan beskrivas med hjälp av parametrar som bestämts på experimentell väg med testmetod C.18. En viktig parameter är adsorptionskoefficienten. Den definieras som förhållandet mellan ämnets koncentration i jorden/slammet och ämnets koncentration i vattenfasen vid adsorptionsjämvikt. En adsorptionskoefficient som är normaliserad till jordens halt av organiskt bundet kol (K_{oc}) är en värdefull indikator på en kemikalies bindningsförmåga till det organiska materialet i jord och avloppsslam och ger möjlighet att jämföra olika kemikalier. Denna parameter kan uppskattas genom korrelationer med vattenlösligheten och fördelningskoefficienten n-oktanol/vatten (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Vid den försöksmetod som beskrivs här används HPLC för uppskattning av adsorptionskoefficienten K_{oc} i jord och avloppsslam (8). Dessa uppskattningar är tillförlitligare än resultaten från QSAR-beräkningar (9). En uppskattningsmetod kan aldrig helt ersätta mätningar vid jämvikt i uppslammat prov (testmetod C.18). Det uppskattade värdet på K_{oc} kan dock användas som stöd vid valet av lämpliga testparametrar för adsorptions-/desorptionsundersökningar enligt testmetod C.18, genom beräkning av K_d (distributionskoefficient) eller K_f (Freundlich-adsorptionskoefficient) enligt ekvation 3 (se avsnitt 1.2).

1.2 DEFINITIONER

K_d : Distributionskoefficienten definieras som förhållandet mellan jämvikt-koncentrationerna C för ett upplöst testämne i ett tvåfasssystem som består av sorbent (jord eller avloppsslam) och en vattenfas. Förhållandet har ingen måttenhet när koncentrationerna i båda faserna uttrycks som vikt per vikt. Om koncentrationen i vattenfasen ges som vikt per volym blir måttenheten $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$. K_d kan variera beroende på sorbentens egenskaper och kan vara koncentrationsberoende.

$$K_d = \frac{C_{jord}}{C_{vatten}} \text{ eller } \frac{C_{slam}}{C_{vatten}} \quad (1)$$

där

C_{jord} = testämnets koncentration i jord vid jämvikt ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

C_{slam} = testämnets koncentration i slam vid jämvikt ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

C_{vatten} = testämnets koncentration i vattenfasen vid jämvikt ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

K_f: Freundlich-adsorptionskoefficienten definieras som testämnets koncentration i jord eller avloppsslam (x/m) när jämviktskoncentrationen C_{vatten} i vattenfasen har värdet ett. Måttenheten är µg·g⁻¹ sorbent. Värdet kan variera beroende på sorbentens egenskaper.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{\text{vatten}} \quad (2)$$

där

x/m = mängden testämne x (µg) som adsorberats på mängden sorbent m (g) vid jämvikt

1/n = lutningen hos Freundlich-adsorptionsisotermen

C_{vatten} = testämnets koncentration i vattenfasen vid jämvikt (µg · ml⁻¹)

$$\text{När } C_{\text{vatten}} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Distributionskoefficienten (K_d) eller Freundlich-adsorptionskoefficienten (K_f) normaliserad till sorbentens halt av organiskt kol (f_{oc}). Särskilt för icke-joniserade kemikalier utgör den en ungefärlig indikator på omfattningen av adsorption mellan ett ämne och sorbenten och ger möjlighet att göra jämförelser mellan olika kemikalier. Beroende på måttenheterna för K_d och K_f, kan K_{oc} sakna måttenhet eller ha måttenheten ml · g⁻¹ eller µg · g⁻¹ organiskt material.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (utan måttenhet eller ml} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \text{ eller } \frac{K_f}{f_{oc}} \text{ (}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

Förhållandet mellan K_{oc} och K_d är inte alltid linjärt och därför kan K_{oc}-värdena variera mellan olika typer av jord men värdenas variabilitet är betydligt mindre jämfört med K_d- eller K_f-värden.

Adsorptionskoefficienten (K_{oc}) härleds från kapacitetsfaktorn (k') med användning av en kalibreringskurva log k' mot log K_{oc} för valda referensföreningar.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

där

t_R : HPLC retentionstiden för test- och referensämne (minuter)

t₀ : HPLC dödtid (minuter) (se avsnitt 1.8.2).

P_{ow} : Fördelningskoefficienten oktanol-vatten definieras som förhållandet mellan koncentrationerna för upplösta ämnen i n-oktanol och vatten. Värdet har ingen måttenhet.

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{oktanol}}}{C_{\text{vatten}}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

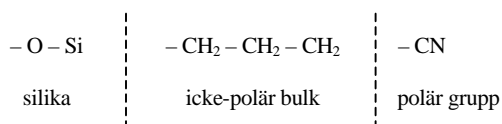
1.3 REFERENSÄMNEN

Strukturformeln, renheten och dissociationskonstanten (i tillämpliga fall) bör vara kända innan metoden används. Helst skall man också ha tillgång till information om lösligheten i vatten och organiska lösningsmedel, fördelningskoefficienten oktanol-vatten och hydrolysegenskaperna.

För att korrelera uppmätta HPLC-retentionsdata för ett testämne med ämnets adsorptionskoefficient K_{oc} behövs en kalibreringskurva för $\log K_{oc}$ mot $\log k'$. För kurvan krävs minst sex referenspunkter, av vilka minst en ligger ovanför och en under det förväntade värdet för testämnet. Metodens resultat blir betydligt mer exakt om man använder referensämnen som är strukturellt besläktade med testämnet. Om sådana data inte finns tillgängliga ligger valet av lämpliga kalibreringsämnen hos användaren. Då bör en mer allmän uppsättning av strukturellt heterogena ämnen väljas. I tabell 1 görs en uppräknig av ämnen och K_{oc} -värden som kan användas för avloppsslam och i tabell 3 ges motsvarande uppgifter för jord. Om andra kalibreringsämnen används måste detta motiveras.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

HPLC utförs med analytiska kolonner som är packade med kommersiellt tillgänglig stationär fas av cyanopropyl med lipofila och polära grupper. Den stationära fasen är måttligt polär och baserad på en silikamatrix, enligt följande:



Principen för testmetoden är densamma som för testmetod A.8 (Fördelningskoefficient, HPLC-metod). När testämnet passerar genom kolonnen tillsammans med den rörliga fasen växelverkar testämnet med den stationära fasen. Testämnet fördelas mellan den rörliga och stationära fasen och bromsas därför upp. I och med den stationära fasens sammansättning med både polära och icke-polära bindningsställen kan en molekyls polära och icke-polära grupper växelverka på liknande sätt som när det gäller organiskt material i jord eller i avloppsslam. Det betyder att man kan bestämma förhållandet mellan retentionstiden i kolonnen och adsorptionskoefficienten i organiskt material.

pH-värdet har stor inverkan på sorptionsbeteendet, särskilt när det gäller polära ämnen. I jordbruksjord eller tankar i avloppsreningsverk varierar pH-värdet i regel mellan 5,5 och 7,5. För joniserbara ämnen bör man utföra två test i lämpliga buffertlösningar där det ena testet utförs med joniserad form och det andra med icke-joniserad form, men endast i fall där minst 10 % av testämnet dissocieras inom pH-intervallet 5,5 – 7,5.

Eftersom endast förhållandet mellan retentionen i HPLC-kolonnen och adsorptionskoefficient används för utvärderingen behövs ingen kvantitativ analytisk metod och endast retentionstiden behöver bestämmas. Om en lämplig uppsättning referensämnen och standardbetingelser kan användas för testet ger denna metod tillgång till ett snabbt och effektivt sätt för bestämning av adsorptionskoefficienten K_{oc} .

1.5 TESTETS TILLÄMPBARHET

HPLC-metoden kan användas på kemiska ämnen (märkta eller omärkta) för vilka det finns tillgång till ett lämpligt detektionssystem (t.ex. spektrofotometer, radioaktivitetsdetektor) och som är tillräckligt stabila under den tid testet varar. Testet kan vara särskilt användbart för kemikalier som är svåra att undersöka i andra försökssystem (t.ex. flyktiga ämnen, ämnen som inte är lösliga i vatten vid koncentrationer som kan mätas analytiskt, ämnen med en hög affinitet till ytan i inkubationssystem). Metoden kan användas för blandningar som ger olösta elutionsband. I sådana fall bör man ange log K_{oc} -värdenas övre och undre gränser för testblandningens föreningar.

Orenheter kan i bland leda till problem vid tolkningen av HPLC-resultaten, men orenheterna har inte så stor betydelse så länge som testämnet klart kan identifieras analytiskt och separeras från orenheterna.

Metoden är validerad för de ämnen som räknas upp i tabell 1 i bilagan och metoden har också tillämpats på ett antal andra kemikalier i följande kemikalieklasser:

- Aromatiska aminer (t.ex. trifluralin, 4-kloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-metylanilin, N-metylanilin, 1-naftylamin).
- Estrar av aromatiska karboxylsyror (t.ex. bensoesyrametylester, 3,5-dinitrobensoesyraetylester).
- Aromatiska kolväten (t.ex. toluen, xylen, etylbensen, nitrobensen).
- Aryloxifenoxipropionsyraestrar (t.ex. diklofop-metyl, fenoxaprop-etyl, fenoxaprop-P-etyl).
- Bensimidazol- och imidazol-fungicider (t.ex. karbendazim, fuberidazol, triazoxid).
- Karboxylsyraamider (t.ex. 2-klorbensamid, N,N-dimetylbensamid, 3,5-dinitrobensamid, N-metylbensamid, 2-nitrobensamid, 3-nitrobensamid).
- Klorerade kolväten (t.ex. endosulfan, DDT, hexaklorbensen, quintozen, 1,2,3-triklorbensen).
- Bekämpningsmedel typ organiska fosforföreningar (t.ex. azinfosmetyl, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos).
- Fenoler (t.ex. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaklorofenol, 2,4,6-triklorfenol, 1-naftol).
- Fenylureaderivat (t.ex. isoturon, monolinuron, pencycuron).
- Pigmentfärgämnen (t.ex. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81).
- Polyaromatiska kolväten (t.ex. acenaften, naftalen).
- 1,3,5-triazin-herbicider (t.ex. prometryn, propazin, simazin, terbutryn).
- Triazolderivat (t.ex. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Metoden kan inte tillämpas på ämnen som reagerar med eluenten eller den stationära fasen. Metoden är heller inte tillämplig på ämnen som har specifik växelverkan med oorganiska komponenter (t.ex. genom bildning av klusterkomplex med lermineraller). Metoden fungerar eventuellt inte för ytaktiva ämnen, oorganiska föreningar och måttliga eller starka organiska syror och baser. Log K_{oc} -värden från 1,5 till 5,0 kan bestämmas. Joniserbara ämnen måste mätas med hjälp av en buffrad rörlig fas, men stor vikt måste fästas vid att undvika utfällning av buffertkomponenter eller testämne.

1.6 KVALITETSKRITERIER

1.6.1 Noggrannhet

I regel kan adsorptionskoefficient för ett testämne bestämmas inom $\pm 0,5$ logaritmiska enheter av det värde som kan bestämmas med mätningar vid jämvikt i uppslammat prov (se tabell 1 i bilagan). Noggrannheten förbättras om det finns tillgång till referensämnen som är strukturellt besläktade med testämnet.

1.6.2 Repeterbarhet

Bestämningarna bör köras minst två gånger. De $\log K_{oc}$ -värden som härletts från individuella mätningar bör ligga inom ett område på 0,25 logaritmiska enheter.

1.6.3 Reproducerbarhet

De erfarenheter man hittills har från metoden ger belägg för metodens validitet. En undersökning av HPLC-metoden med 48 ämnen (i huvudsak bekämpningsämnen) för vilka det fanns tillgång till tillförlitliga data om K_{oc} i jord gav en korrelationskoefficient på $R = 0,95$ (10) (11).

Ett jämförelsetest utfördes av elva deltagande laboratorier för att förbättra och validera metoden (12). Resultaten anges i tabell 2 i bilagan.

1.7 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.7.1 Preliminär uppskattning av adsorptionskoefficienten

Fördelningskoefficienten oktanol-vatten P_{ow} ($= K_{ow}$) och, i viss utsträckning, vattenlösligheten kan användas som indikatorer för adsorptionens omfattning, särskilt för icke-joniserande ämnen. Det betyder att dessa indikatorer kan användas för preliminära orienterande test. Korrelationer för flera grupper av kemikalier finns angivna i ett antal publikationer (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2 Apparatur

För testet krävs en vätskekromatograf försedd med en pulsfri pump och lämplig detekteringsutrustning. Det är tillrådligt att använda en injektionsventil med en injektionsslinga. Kolonnen skall vara packad med kommersiellt tillgängligt kemiskt bundet cyanopropylharts på silikabas (t.ex. Hypersil och Zorbax CN). En guardkolonn av samma material kan placeras mellan injektionssystemet och analyskolonnen. Kolonner från olika tillverkare kan vara mycket olika när det gäller separationseffektivitet. Som riktvärden för den kapacitetsfaktor k' som bör uppnås gäller följande: $\log k' > 0,0$ för $\log K_{oc} = 3,0$ och $\log k' > -0,4$ för $\log K_{oc} = 2,0$ när man använder metanol/vatten 55/45 % som rörlig fas.

1.7.3 **Rörlig fas**

Flera olika rörliga faser har testats och följande två rekommenderas:

- metanol/vatten (55/45 % v/v)
- metanol/0,01 M citratbuffert pH 6,0 (55/45 % v/v)

För beredning av det eluerande lösningsmedlet används HPLC-klassificerad metanol och destillerat vatten eller citratbuffert. Blandningen avgasas före användningen. Isokratisk eluering bör användas. Om blandningar av metanol och vatten inte är lämpliga kan man försöka med andra blandningar av organiskt lösningsmedel och vatten, t.ex. etanol och vatten eller acetonitril och vatten. För joniserbara blandningar rekommenderas användning av buffertlösningar för stabilisering av pH. Stor vikt måste fästas vid att undvika saltutfällning och kolonnförsämring, vilket kan inträffa med vissa blandningar av organisk fas/buffert.

Inga tillsatser av typen jonparsreagenser bör användas, eftersom de kan påverka den stationära fasens sorptions-egenskaper. Sådana ändringar i den stationära fasen kan i vissa fall vara irreversibla. Därför måste alla försök där tillsatser används utföras med separata kolonner.

1.7.4 **Upplösta ämnen**

Test- och referensämnen upplöses i den rörliga fasen.

1.8 TESTETS UTFÖRANDE

1.8.1 **Testbetingelser**

Temperaturen under mätningarna bör registreras. Det är högst tillrådligt att hålla kolonnen i temperaturkontrollerad miljö för att garantera konstanta betingelser under kalibrerings- och bestämningskörningarna och vid mätning av testämnet.

1.8.2 **Bestämning av dödtiden t_0**

För bestämning av dödtiden t_0 kan två olika metoder användas (se även avsnitt 1.2).

1.8.2.1 *Bestämning av dödtiden t_0 med användning av en homolog serie*

Detta förfarande har visat sig ge tillförlitliga och standardiserade värden på t_0 . Närmare uppgifter finns i testmetod A.8 (Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten), HPLC-metoden).

1.8.2.2 *Bestämning av dödtiden t_0 med användning av inerta ämnen som inte bromsas upp i kolonnen*

Denna teknik baserar sig på injicering av lösningar av formamid, urea eller natriumnitrat. Mätningarna bör utföras minst två gånger.

1.8.3 Bestämning av retentionstiderna t_R

Referensämnen bör väljas enligt beskrivningen i avsnitt 1.3. Vid bestämning av retentionstiderna kan de injiceras som en blandad standard, förutsatt att det finns belegg för att retentionstiden för varje referensstandard inte påverkas av närvaron av de andra referensstandarderna. Kalibreringen bör utföras med regelbundna intervall minst två gånger dagligen så att man kan beakta inverkan av oväntade förändringar i kolonnens prestanda. Det bästa förfarandet är att göra injektionerna före och efter injektionerna av testämnet, för att bekräfta att retentionstiderna inte har förskjutits. Testämnena injiceras i så små mängder som möjligt (för att undvika överbelastning på kolonnen) och deras retentionstider bestäms.

Bestämningarna bör göras minst dubbelt för att öka mätningarnas tillförlitlighet. De värden på $\log K_{oc}$ som härletts från individuella mätningar bör falla inom ett område på 0,25 logaritmiska enheter.

1.8.4 Utvärdering

Kapacitetsfaktorerna k' beräknas utifrån dödtiden t_0 och retentionstiderna t_R hos de valda referensämnena enligt ekvation 4 (se avsnitt 1.2). Referensämnenas värden på $\log k'$ plottas sedan mot deras värden på $\log K_{oc}$ från mätningar vid jämvikt i uppslammat prov (se tabellerna 1 och 2 i bilagan). Med hjälp av den erhållna kurvan kan $\log k'$ -värdet för ett testämne därefter användas för att bestämma ämnets $\log K_{oc}$ -värde. Om de aktuella resultaten visar att $\log K_{oc}$ för testämnet ligger utanför kalibreringsområdet måste testet upprepas med användning av andra, lämpligare referensämnen.

2. DATA OCH RAPPORTERING

Rapporten måste innehålla följande uppgifter:

- Identifiering av test- och referensämnen och deras renhet samt, om det är relevant, pK_a -värden.
- Beskrivning av utrustningen och testbetingelserna, t.ex. analyskolonnens (och guardkolonnens) typ och mått, detekteringsmetoden, den rörliga fasen (komponenternas förhållande, pH), temperaturområdet under mätningarna.
- Dödtid och den metod som har använts för att bestämma den.
- Mängderna test- och referensämnen som har tillförts kolonnen.
- Retentionstiderna för de referensämnen som har använts för kalibrering.
- Närmare uppgifter om den anpassade regressionslinjen ($\log k'$ mot $\log K_{oc}$) och en grafisk framställning av regressionslinjen.
- Medelvärden för retentionsdata och uppskattat $\log K_{oc}$ -värde för testämnet.
- Kromatogram.

3. **HÄNVISNINGAR**

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (red). (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.

BILAGA

Tabell 1

Jämförelse av K_{oc} -värden för jord och avloppsslam och beräknade värden från HPLC-screeningmetoden^{1,2}

Ämne	CAS-nr	log K_{oc} avlopps- slam	log K_{oc} HPLC	Δ	log K_{oc} jord	log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Bensoesyrafenylester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Bensamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobensamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dikloranilin	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.

Tabell 2

Resultat av jämförelsetest mellan laboratorier (11 deltagande laboratorier) som har utförts för att förbättra och validera HPLC-metoden¹

Ämne	CAS-nr	Log K_{oc} [OECD 106]	K_{oc}	log K_{oc}
			[HPLC-metoden]	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fention	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

¹ W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995), "HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test", *Chemosphere*, **30(7)**, 1373–1384.

Tabell 3**Rekommenderade referensämnen för HPLC-screeningmetoden på grundval av jordadsorptionsdata.**

Referensämne	CAS-nr	log K _{oc} -medelvärden från mätningar vid jämvikt i uppslammat prov	antal K _{oc} -data	log S.D.	källa
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	a
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	a
2-nitrobensamid	610-15-1	1,45	3	0,90	b
N,N-dimetylbensamid	611-74-5	1,52	2	0,45	a
4-metylbensamid	619-55-6	1,78	3	1,76	a
Metylbensolat	93-58-3	1,80	4	1,08	a
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	c
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	c
3-nitrobensamid	645-09-0	1,95	3	1,31	b
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	a
3,5-dinitrobensamid	121-81-3	2,31	3	1,27	b
Karbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	c
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	c
Triazoxid	72459-58-6	2,44	3	1,66	c
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	c
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	c
Naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	a
Endosulfandiol	2157-19-9	3,02	5	2,29	c
Metiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	c
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	a
1,2,3-triklorbensen	87-61-6	3,16	4	1,40	a
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	a
Fention	55-38-9	3,31	3	2,49	c
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	a
Pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	c
α-endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	c
Diklofop-metyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	c
Fenantren	85-01-8	4,09	4	3,83	a
Basic Blue 41 (blandning)	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 från industrin.

C.20 REPRODUKTIONSTEST PÅ *DAPHNIA MAGNA*

1. METOD

Denna testmetod för reproduktionstoxicitet motsvarar OECD TG 211 (1998).

1.1 INLEDNING

Det primära syftet med detta test är att bedöma kemikaliers verkningar på reproduktionskapaciteten hos *Daphnia magna*.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Föräldrageneration: de *Daphnia*-honor som finns närvarande vid testets början och vars reproduktionskapacitet testas.

Avkomma: de unga *Daphnia* som produceras av föräldragenerationen under testets gång.

Lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): den lägsta testkoncentrationen vid vilken ämnet inom en fastställd exponeringsperiod framkallar statistiskt signifikanta verkningar på reproduktion och på föräldragenerationens mortalitet (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC måste framkalla skadliga verkningar som är lika stora eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte uppfylls måste en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och NOEC).

Koncentration vid vilken inga verkningar observeras (No Observed Effect Concentration, NOEC): den testkoncentration omedelbart under LOEC som inom en fastställd exponeringsperiod inte framkallar några statistiskt signifikanta verkningar ($p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen.

EC_x: den koncentration av testämnet upplöst i vatten som inom en fastställd exponeringsperiod leder till en minskning på x % av reproduktionskapaciteten hos *Daphnia magna*.

Inneboende tillväxthastighet: ett mått på populationens tillväxt vilket omfattar reproduktionskapacitet och åldersspecifik mortalitet (20), (21), (22). I steady state-populationer är värdet på detta mått noll. För växande populationer är värdet positivt och för minskande populationer är värdet negativt. Det senare är inte hållbart och leder i slutändan till utrotning.

Detektionsgräns: den lägsta koncentration som kan detekteras men inte kvantifieras.

Bestämningsgräns: den lägsta koncentration som kan mätas kvantitativt.

Mortalitet: ett djur registreras som dött när det är orörligt, dvs. när det inte kan simma eller om man inte kan observera rörelser hos bihang eller bakkropp inom 15 sekunder efter en försiktig omrörning i testkärlet. (Eventuell annan definition som används måste rapporteras tillsammans med motsvarande hänvisning).

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Unga honor av *Daphnia* (föräldragenerationen) som är yngre än 24 timmar vid testets början exponeras för testämnet som tillsätts vatten i en serie koncentrationer. Testperiodens längd är 21 dagar. Vid testets slut görs en bedömning av mängden levande avkomma per föräldrageneration. Sådan avkomma som producerats under testet men som dör under testets gång räknas inte med. Föräldragenerationens reproduktionskapacitet kan uttryckas på andra sätt (t.ex. mängden avkomma som producerats per djur per dag från och med första dagen då avkomma observerades). Sådana andra sätt måste i förekommande fall rapporteras separat, utöver varje föräldragenerations totala mängd levande avkomma vid testets slut. Reproduktionskapaciteten hos djur som exponeras för testämnet jämförs med kontrollgruppens (kontrollgruppernas) reproduktionskapacitet i syfte att fastställa den lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (LOEC) och den koncentration vid vilken inga verkningar observeras (NOEC). Dessutom bör data i så stor utsträckning det är möjligt analyseras med en regressionsmodell i syfte att uppskatta den koncentration som skulle leda till en minskning på x % av reproduktionskapaciteten (t.ex. EC₅₀, EC₂₀ eller EC₁₀).

Föräldragenerationens överlevnad och tiden fram till produktion av den första satsen avkomma måste också rapporteras. Övriga testämnesrelaterade verkningar på parametrar såsom tillväxt (t.ex. längd) och eventuellt inneboende tillväxthastighet kan också undersökas.

1.4 INFORMATION OM TESTÄMNET

Resultat från test avseende akut toxicitet (se metod C.2, del I) som utförts på *Daphnia magna* bör finnas tillgängliga. Resultaten kan vara användbara vid valet av lämpliga testkoncentrationer för reproduktionstest. Data om testämnets vattenlöslighet och ångtryck bör vara kända och man bör ha tillgång till en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av ämnet i testlösningarna med rapporterad återhämtningsgrad och bestämningsgräns.

För definition av testförhållandena bör man ange bl.a. testämnets strukturformel, renhet, stabilitet i ljus, stabilitet vid testförhållandena, pKa, Pow och resultaten från test för biologisk lättnedbrytbarhet (se metod C. 4).

1.5 TESTETS GILTIGHET

För att ett test skall vara giltigt måste följande kriterier uppfyllas för kontrollgruppen (kontrollgrupperna):

- Föräldragenerationens mortalitet (honor av *Daphnia*) får inte överskrida 20 % vid testets slut.
- Det genomsnittliga antalet avkommor som har producerats per föräldradjur och som lever vid testets slut måste vara ≥ 60 .

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 Utrustning

Testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testämnet bör vara tillverkade av glas eller annat kemiskt inert material. I regel används glasbägare.

Dessutom behövs åtminstone en del av följande utrustning:

- Syrgasmätare (med mikroelektrod eller annan lämplig anordning för mätning av löst syrgas i lågvolymsprover).
- Utrustning för temperaturregulering.
- pH-meter.
- Utrustning för bestämning av vattnets hårdhetsgrad.
- Utrustning för bestämning av totalt organiskt kol (TOC) i vattnet eller utrustning för bestämning av kemisk syreförbrukning (COD).
- Apparatur för reglering av belysningen och mätning av ljusets intensitet.

1.6.2 Testorganism

Testet utförs på *Daphnia magna* Straus. Andra *Daphnia*-arter kan användas förutsatt att de uppfyller tillämpliga giltighetskriterier (ett relevant giltighetskriterium är reproduktionskapaciteten i kontrollgrupperna). Om andra arter av *Daphnia* används måste de identifieras ordentligt och det skall motiveras varför de används.

Klonen skall helst identifieras med hjälp av genotypen. Forskningsresultat (1) har visat att reproduktionskapaciteten hos klon A (som härrör från IRCHA i Frankrike) (3) genomgående uppfyller giltighetskriteriet som gäller ett genomsnitt på ≥ 60 överlevande avkomor per föräldradjur vid odling i de betingelser som beskrivs i denna metod. Andra kloner kan godtas förutsatt att *Daphnia*-odlingen kan påvisas uppfylla giltighetskriterierna för ett test.

Vid testets början måste djuren vara yngre än 24 timmar och får inte tillhöra den första satsen avkomma. Djuren måste komma från en frisk stam (dvs. de får inte uppvisa tecken på stress, t.ex. hög mortalitet, förekomst av hanar och *ephippia*, fördröjd produktion av första satsen avkomma, missfärgade djur osv.). Stamdjuren måste hållas vid samma odlingsbetingelser (ljus, temperatur, medium, utfodring och djur per volymenhet) som används vid testet. Om annat än normalt odlingsmedium för *Daphnia* används vid testet är det tillrådligt med en aklimatiseringsperiod på i regel cirka 3 veckor (dvs. en generation) innan testets inleds, för att undvika stress på föräldragenerationen.

1.6.3 Testmedium

För testet rekommenderas ett fullständigt definierat medium. Avsaknaden av tillsatser (t.ex. alger, jordextrakt osv.) som är svåra att karakterisera möjliggör bättre standardisering mellan laboratorier. Elendt M4- (4) och M7-medier (se bilaga 1) har konstaterats vara lämpliga för ändamålet. Andra medier (se t.ex. (5) och (6)) kan godtas förutsatt att det kan visas att *Daphnia*-odlingen uppfyller giltighetskriterierna för testet.

Vid användning av medier som innehåller icke definierade tillsatser skall dessa tillsatser klart specificeras och uppgifter om deras sammansättning lämnas i testrapporten. Det är särskilt viktigt att ange kolhalten, eftersom kol kan utgöra ett fodertillskott. Det rekommenderas att totalt organiskt kol (TOC) och/eller kemisk syreförbrukning (COD) bestäms i en stamberedning av den organiska tillsatsen och att en uppskattning görs av hur denna påverkar TOC/COD i testmediet. TOC-nivån i mediet (dvs. före tillsats av alger) bör vara lägre än 2 mg/l (7).

Vid testning av ämnen som innehåller metaller är det viktigt att beakta det faktum att testmediets egenskaper (t.ex. hårdhet och kelateringsförmåga) kan ha inverkan på testämnets toxicitet. Därför rekommenderas ett fullständigt definierat medium. För närvarande är Elendt M4 och M7 de enda medier som vederligen är lämpliga för långtidsodling av *Daphnia magna*. Båda medierna innehåller kelatbildaren EDTA. Det finns resultat (2) som tyder på att toxiciteten hos kadmium i regel förefaller vara lägre när reproduktionstestet genomförs i M4- och M7-medier än i när det genomförs i medier som inte innehåller EDTA. M4 och M7 rekommenderas därför inte för testning av ämnen som innehåller metaller. Likaså bör andra medier som innehåller kända kelatbildare undvikas. I fråga om metallhaltiga ämnen kan det vara tillrådligt att använda ett alternativt medium såsom ASTM-rekonstruerat hårt sötvatten (7) som inte innehåller EDTA, med tillsats av algextrakt (8). Kombinationen av ASTM-rekonstruerat hårt sötvatten och algextrakt är också lämplig för långtidsodling och testning av *Daphnia magna* (2), även om det fortfarande förekommer en svag keleringseffekt på grund av den organiska komponenten i det tillförda algextraktet.

Vid testets början och under testets gång bör halten upplöst syrgas ligga över 3 mg/l. pH-värdet bör ligga inom området 6–9 och bör i regel inte variera med mer än 1,5 enheter inom ett test. En vattenhårdhet över 140 mg/l (som CaCO₃) rekommenderas. Vid test med denna nivå och över har man kunnat observera en reproduktionskapacitet som uppfyller giltighetskriterierna (9), (10).

1.6.4 **Testlösningar**

Testlösningar av de valda koncentrationerna bereds i regel genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningarna bör helst beredas genom upplösning av ämnet i testmediet.

I vissa fall behövs organiska lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att få en stamlösning av lämplig koncentration, men användningen av sådana hjälpämnen bör undvikas med alla medel. Lämpliga lösningsmedel är t.ex. aceton, etanol, metanol, dimetylformamid och trietylglykol. Exempel på lämpliga dispergeringsmedel är Cremophor RH40, metylcellulosa (0,01 %) och HCO-40. Testämnets halt i testlösningarna bör under inga omständigheter överskrida lösligheten i testmediet.

Lösningsmedel används för att producera en stamlösning som kan doseras exakt i vatten. Vid den rekommenderade lösningsmedelskoncentrationen i det slutliga testmediet ($\leq 0,1$ ml/l) är de ovan uppräknade lösningsmedlen inte toxiska och ökar inte ämnets vattenlöslighet.

Dispergeringsmedel kan underlätta dispergering och exakt dosering. Vid den rekommenderade koncentrationen i det slutliga testmediet ($\leq 0,1$ ml/l) är de ovan uppräknade dispergeringsmedlen inte toxiska och ökar inte ämnets vattenlöslighet.

1.7 TESTETS UTFORMNING

Fördelningen av behandlingar och den efterföljande hanteringen av testkärlen bör vara slumpmässig. I annat fall kan man få missvisande resultat som kan tolkas som en koncentrationsrelaterad verkan. Särskilt om testenheter hanteras i koncentrationsordning kan vissa tidsrelaterade faktorer, såsom trötthet hos personalen eller andra felfaktorer, leda till större verkningar vid de högre koncentrationerna. Om testresultaten sannolikt kommer att påverkas av omständigheter i början av testet eller av miljöbetingelser, såsom placering i laboratoriet, bör man överväga blockuppdelning.

1.8 FÖRFARANDE

1.8.1 **Exponeringsförhållanden**

1.8.1.1 *Testperiodens längd*

Testperiodens längd är 21 dagar.

1.8.1.2 *Djurtäthet*

Föräldradjuren hålls individuellt, ett djur per testkärl, med 50 – 100 ml medium per kärl.

I vissa fall behövs större volymer med tanke på de krav som gäller för den analytiska procedur som används för bestämning av testämnets koncentration, även om det för den kemiska analysen är tillåtet med pooling av replikat. Om volymer över 100 ml används måste eventuellt den dos som ges till *Daphnia* ökas för att garantera tillräcklig tillgång på foder och förenlighet med giltighetskriterierna. Vid genomflödestest kan alternativ testutformning övervägas av tekniska skäl (t.ex. fyra grupper med 10 djur per grupp i en större volym), men varje ändring av testutformningen måste rapporteras.

1.8.1.3 *Antalet djur*

För halvstatiskt test behövs minst 10 djur per testkoncentration och minst 10 individuellt hållna djur i kontrollserierna.

För genomflödestest har en uppdelning med 40 djur i fyra grupper om 10 djur per testkoncentration visat sig vara lämplig (1). Ett mindre antal testorganismer kan användas och man rekommenderar ett minimum på 20 djur per koncentration uppdelade i två eller flera replikat med samma antal djur (t.ex. fyra replikat med fem *Daphnia* per replikat). I fråga om test där djuren hålls i grupper bör man dock beakta att reproduktionskapaciteten inte kan uttryckas som totalantalet överlevande avkomor per föräldradjur om föräldradjur dör. I sådana fall måste reproduktionskapaciteten uttryckas som "totalantalet överlevande avkomor som har producerats per föräldradjur som fanns närvarande vid testets början".

1.8.1.4 *Utfodring*

Vid halvstatiskt test ges foder helst dagligen men minst tre gånger per vecka (vid byte av medium). Avvikelser från detta (t.ex. vid genomflödestest) måste rapporteras.

Under testet bör föräldradjuren helst utfodras med levande algceller. En eller flera av följande arter kan användas: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* (numera *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) och *Scenedesmus subspicatus*. Utfodringen bör grunda sig på mängden organiskt kol (C) som ges till varje föräldradjur. Forskningsresultat (12) för *Daphnia magna* har visat att det är tillräckligt med dosnivåer mellan 0,1 och 0,2 mg organiskt kol per *Daphnia* och dag för att nå upp till den mängd avkomma som behövs med tanke på giltighetskriterierna för testet. Dosen kan ges med konstant dosering under hela testet eller, om så önskas, med lägre dosering i början och därefter ökande dosering i takt med föräldradjurens tillväxt. I det senare fallet bör dosen ändå alltid hållas inom det rekommenderade området 0,1 – 0,2 mg organiskt kol per *Daphnia* och dag.

Om andra mätningssätt (t.ex. antalet algceller eller ljusabsorbans) används för att kontrollera utfodringens dosnivå (av bekvämlighetsskäl, eftersom mätning av kolhalten är tidskrävande) måste varje laboratorium upprätta egna nomogram för mätningarna av algodlingens kolhalt (i bilaga 2 finns anvisningar för hur man upprättar nomogram). Nomogrammen måste ses över minst årligen, och oftare om algodlingsbetingelserna har förändrats. Ljusabsorbans har konstaterats vara en bättre metod än cellräkning när det gäller bestämning av kolhalten (13).

Algsuspensionen som används för utfodring av *Daphnia* bör vara koncentrerad, så att minimal volym algodlingsmedium överförs till testkärnen. För att höja algkoncentrationen kan man använda centrifugering med påföljande återsuspension i destillerat vatten, avjoniserat vatten eller *Daphnia*-odlingsmedium.

1.8.1.5 *Ljus*

Ljuset hålls på i 16 timmar med en intensitet som inte överskrider $15 - 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.8.1.6 *Temperatur*

Temperaturen i testmediet bör hållas inom området 18–22°C. Inom ett och samma försök får temperaturen i mån av möjlighet inte variera med mer än 2°C inom de angivna gränserna (t.ex. 18–20, 19–21 eller 20–22°C). Temperaturövervakningen kan gärna ordnas med hjälp av ett extra testkärl.

1.8.1.7 *Luftning*

Testkärnen får inte luftas under testet.

1.8.2 Testkoncentrationer

I regel används minst fem testkoncentrationer. Koncentrationerna bör ligga i en geometrisk serie med en separationsfaktor som helst inte bör överskrida 3,2. Dessutom bör ett lämpligt antal replikat användas för varje testkoncentration (se avsnitt 1.8.1.3). Om mindre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Ämnen får inte testas i koncentrationer som överskrider löslighetsgränsen i testmediet.

Vid valet av koncentrationsområde bör man beakta följande:

- i. Om syftet är att få värden på LOEC eller NOEC måste den lägsta testkoncentrationen vara tillräckligt låg för att fertiliteten vid den koncentrationen inte skall vara signifikant lägre än i kontrollgruppen. I annat fall måste testet upprepas med en lägre lägsta koncentration.
- ii. Om syftet är att få värden på LOEC eller NOEC måste den högsta testkoncentrationen vara tillräckligt hög för att fertiliteten vid den koncentrationen skall vara signifikant lägre än i kontrollgruppen. I annat fall måste testet upprepas med en högre högsta koncentration.
- iii. Om man bestämmer EC_x för verkningar på reproduktionskapaciteten är det tillrådligt att använda tillräckligt antal koncentrationer för att möjliggöra bestämning av EC_x med tillräcklig konfidensnivå. Om man bestämmer EC_{50} för verkningar på reproduktionskapaciteten är det tillrådligt att den högsta testkoncentrationen är högre än detta värde på EC_{50} . I annat fall blir konfidensintervallet för EC_{50} mycket brett, även om det fortfarande är möjligt att bestämma värdet på EC_{50} , och då blir det kanske inte möjligt att få en tillfredsställande bedömning av den anpassade modellens lämplighet.
- iv. Testkoncentrationsområdet bör helst inte innehålla koncentrationer som framkallar en statistiskt signifikant verkan på vuxna exemplars överlevnad. I ett sådant fall övergår nämligen testets natur från ett enkelt reproduktionstest till ett kombinerat reproduktions- och mortalitetstest, för vilket det krävs en mycket mer komplex statistisk analys.

Tidigare kunskap om testämnets toxicitet (t.ex. från test avseende akut toxicitet eller preliminära test) är till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används för att underlätta beredningen av testlösningar (se avsnitt 1.6.4) får slutkoncentrationen i testkärlet inte överskrida 0,1 ml/l och samma slutkoncentration bör användas i alla testkärn.

1.8.3 Kontrollserier

En kontrollserie för testmediet och i förekommande fall en kontrollserie med lösnings- eller dispergeringsmedlet bör köras utöver testserierna. Kontrollseriernas lösningsmedel eller dispergeringsmedel bör ha samma koncentration som i testserierna. Lämpligt antal replikat bör användas (se avsnitt 1.8.1.3).

I ett väl utfört test bör variationskoefficienten kring det genomsnittliga antalet levande avkommor som i kontrollgrupperna produceras per föräldradjur i regel vara 25 %. Värdet måste rapporteras i testutformningar där djuren hålls individuellt.

1.8.4 Förnyelse av testmediet

Frekvensen för förnyelse av testmediet beror på testämnets stabilitet, men får inte underskrida tre gånger i veckan. Om resultaten från preliminära stabilitetstest (se avsnitt 1.4) visar att testämnet inte hålls stabilt (dvs. utanför området 80–120 % av nominell koncentration eller under 80 % av uppmätt startkoncentration) under det maximala förnyelseintervallet (dvs. tre dagar) bör man överväga förnyelse med kortare intervall eller användning av genomflödestest.

Vid halvstatistiskt test görs förnyelse av mediet genom att en ny serie testkärn ställs i ordning och föräldradjuren överförs till de nya kärnen t.ex. med en glaspipett av lämplig diameter. Volymen medium som överförs med *Daphnia* bör vara så liten som möjligt.

1.8.5 **Observationer**

Resultaten av de observationer som görs under testet registreras på blanketter (se exempel i bilagorna 3 och 4). Om andra mätningar krävs (se 1.3 och 1.8.8) behövs eventuellt tilläggsobservationer.

1.8.6 **Avkomma**

Det rekommenderas att avkommorna från varje föräldradjur tas bort och räknas dagligen efter det att produktionen av avkomma har satt i gång, för att hindra avkommorna från att konsumera foder som är avsett för vuxna exemplar. I test enligt denna metod behöver bara levande avkommor räknas, men förekomsten av aborterade ägg eller döda avkommor bör registreras.

1.8.7 **Mortalitet**

Mortaliteten bland föräldradjuren bör registreras, helst dagligen och minst varje gång avkommorna räknas.

1.8.8 **Övriga parametrar**

Även om denna metod främst är avsedd för bedömning av verkningarna på reproduktionskapaciteten är det möjligt att övriga verkningar kan kvantifieras i tillräcklig grad med tanke på statistisk analys. Tillväxtmätningar är mycket önskvärda eftersom de ger information om eventuella subletala verkningar. Sådan information kan vara mer användbar än informationen från rena reproduktionsmätningar. Mätning av föräldradjurens längd (t.ex. kroppslängd exklusive analfenan) vid testets slut rekommenderas. Övriga parametrar som kan mätas eller beräknas är tiden fram till att den första satsen avkomma (och efterföljande sats) produceras, satsernas antal och storlek per djur, antalet aborterade sats, förekomsten av hanar eller *ephippia* och den inneboende tillväxthastigheten.

1.8.9 **Frekvensen för analytiska bestämningar och mätningar**

Syrgashalten, temperaturen, hårdheten och pH bör mätas minst en gång i veckan i färska och gamla medier, i kontrollsatserna och i den högsta testämneskoncentrationen.

Under testets gång bör testämnets koncentrationer bestämmas med regelbundna intervall.

Vid halvstatiskt test, där testämnets koncentration bör hållas inom 20 % av den nominella koncentrationen (dvs. inom området 80 – 120 %, se avsnitten 1.4 och 1.8.4), rekommenderas att de högsta och lägsta testkoncentrationerna analyseras minst en gång under testets första vecka, strax efter beredningen och vid förnyelse (analyserna görs alltså på ett prov av samma lösning – när den är nyberedd och när den förnyas). Dessa bestämningarna upprepas därefter minst varje vecka.

Vid test där testämnets koncentration inte förväntas hållas inom ± 20 % av den nominella koncentrationen är det nödvändigt att analysera alla testkoncentrationer, när de är nyberedda och när de förnyas. Vid test där testämnets uppmätta startkoncentration inte ligger inom ± 20 % av den nominella koncentrationen men det finns tillräckliga bevis på att startkoncentrationerna är repeterbara och stabila (dvs. inom området 80– 120 % av startkoncentrationerna), kan de kemiska bestämningarna under testets vecka 2 och 3 begränsas till de högsta och lägsta testkoncentrationerna. Under alla omständigheter behöver bestämning av testämnets koncentration före förnyandet bara göras för ett enda replikatkärl per testämneskoncentration.

Vid genomflödestest kan man lämpligen använda samma provtagningschema som vid halvstatiska test (även om mätningen av "gammal" lösning då inte är tillämplig). Det kan dock vara tillrådligt att utöka antalet provtagningsstillfällen under den första veckan (t.ex. tre mätningar) som kontroll på att testkoncentrationerna hålls stabila. Vid dessa typer av försök bör strömningshastigheten för spädningsmedel och testämne kontrolleras dagligen.

Om det däremot finns bevis på att testämnets koncentration i lösningen har hållits tillfredsställande inom $\pm 20\%$ av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen under hela testperioden, kan nominella eller uppmätta startvärden användas som grund för resultaten. Om avvikelser från nominell eller uppmätt startkoncentration är större än 20% bör resultaten uttryckas i form av tidsvägda medelvärden (se bilaga 5).

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Syftet med testet är att bestämma hur testämnet påverkar antalet levande avkommor som produceras av varje föräldradjur som har överlevt testet. Totalantalet avkommor per föräldradjur beräknas för varje testkär (varje replikat). Om föräldradjuret i något av replikaten dör under testet eller visar sig vara en hane, tas replikatet i fråga inte med i analysen. I ett sådant fall baserar sig analysen på ett reducerat antal replikat.

För uppskattning av LOEC och NOEC med avseende på kemikaliens verkan på reproduktionskapaciteten är det nödvändigt att beräkna den genomsnittliga reproduktionskapaciteten för replikaten per koncentration och den resterande standardavvikelsen. Detta kan göras med variansanalys (ANOVA). Medelvärdet för varje koncentration bör därefter jämföras med kontrollgruppen med hjälp av en lämplig metod för multipeljämförelse. Dunnetts eller Williams test kan användas för ändamålet (14), (15), (16), (17). Det är nödvändigt att kontrollera hållbarheten hos ANOVA:s antagande om variansens homogenitet. Det är tillrådligt att detta görs grafiskt, hellre än genom ett test avseende formell signifikans (18). Ett lämpligt alternativ är att köra ett Bartlett-test. Om antagandet inte är hållbart måste man överväga att transformera data för att homogenisera varianserna innan ANOVA utförs, eller att utföra viktad ANOVA. Storleken på den verkan som kan detekteras med ANOVA (dvs. den minst signifikanta skillnaden) beräknas och rapporteras.

För uppskattningen av den koncentration som skulle orsaka en minskning på 50% av reproduktionskapaciteten (dvs. EC_{50}) bör en lämplig kurva, t.ex. den logistiska kurvan, anpassas till data med hjälp av en statistisk metod, t.ex. minsta kvadrat-metoden. Kurvan bör parametriseras så att EC_{50} och standardfelet kan uppskattas direkt. Därigenom underlättas beräkningen av konfidensintervallen kring EC_{50} . Tvåsidiga konfidensintervall på 95% bör tillämpas, utom om det finns goda skäl för att välja andra konfidensnivåer. Anpassningsproceduren bör helst ge tillgång till ett medel för bedömning av signifikansen eller bristen på signifikans. Detta kan göras grafiskt eller genom att dela kvadraternas restsumma i "brist på passning" och "rena felkomponenter" och utföra ett signifikantstest avseende brist på passning. När man jämför behandlingar som ger låg fertilitet med behandlingar som ger hög fertilitet är det mer sannolikt att de senare leder till en högre varians avseende antalet avkommor som produceras. Därför bör man överväga viktning av de observerade värdena så att de återspeglar de olika varianserna i de olika behandlingsgrupperna (bakgrundsinformation finns i hänvisning 18).

Vid analysen av data från det slutliga ringtestet (2) anpassades en logistisk kurva med hjälp av följande modell (även andra lämpliga modeller kan användas):

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

där

Y: det totala antalet avkommor per föräldradjur som är vid liv vid testets slut (beräknat för varje testkär).l.

x ämnets koncentration.

c: det förväntade antalet avkommor när $x = 0$.

x_0 : EC_{50} i populationen.

b: lutningsparametern.

Denna modell kan tillämpas i många situationer, även om den inte är lämplig för alla test. En kontroll av modellens giltighet bör göras på det sätt som föreslås ovan. I vissa fall kan det vara lämpligt med en hormesis-modell där låga koncentrationer ger ökade verkningar (19).

Man kan även uppskatta koncentrationerna för övriga verkningar, t.ex. EC_{10} eller EC_{20} . Det kan dock vara bättre att använda en annan parametrering än den som används för uppskattning av EC_{50} .

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten skall innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 Testämne:

- Aggregationstillstånd och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Kemiska identifieringsdata, inbegripet renhet.

2.2.2 Försöksdjur:

- Klonen (om den har identifierats med genotypen eller inte), leverantör eller ursprung (om uppgiften är känd) och de odlingsbetingelser som har använts. Om annan art än *Daphnia magna* har använts måste detta rapporteras och motiveras.

2.2.3 Testförhållanden:

- Använt testförfarande (t.ex. halvstatistiskt test eller genomflödestest, volym, antal *Daphnia* per liter).
- Ljusperiod och ljusintensitet.
- Testets utformning (t.ex. antalet replikat, antalet föräldradjur per replikat).
- Detaljuppgifter om det odlingsmedium som har använts.
- I förekommande fall uppgifter om tillsatser av organiskt material och information om sammansättning, ursprung, beredningsmetod, TOC och COD för stambereidningar, uppskattning av resulterande TOC och COD i testmediet.
- Detaljerad information om utfodringen, inbegripet mängd (uttryckt som mg kol per *Daphnia* per dag) och schema (t.ex. typen av foder, och i fråga om alger specifikt namn (arter) och i den mån uppgifter finns, stam och odlingsbetingelser).
- Metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall måste även lösnings- eller dispergeringsmedlet och dess koncentration anges).

2.2.4

Resultat:

- Resultaten från eventuella preliminära test gällande testämnets stabilitet.
- De nominella testkoncentrationerna och resultaten av alla analyser för att fastställa koncentrationen av testämnet i testkärlen (exempel på blanketter finns i bilaga 4). Metodens återhämtningsgrad och bestämningsgränsen måste även rapporteras.
- Vattenkvaliteten i testkärlen (pH, temperatur och halten upplöst syrgas, i förekommande fall TOC eller COD och hårdhet) (exempel på blanketter finns i bilaga 3).
- Fullständig registrering av levande avkommor från varje föräldradjur (exempel på blankett finns i bilaga 3).
- Antalet föräldradjur som dött och den dag de dött (exempel på blankett finns i bilaga 3).
- Variationskoefficienten för kontrollgruppens fertilitet (baserad på det totala antalet levande avkommor per föräldradjur som är vid liv vid testets slut).
- Kurva som visar det totala antalet levande avkommor per föräldradjur (för varje replikat) som är vid liv vid testets slut som funktion av testämneskoncentrationen.
- Den lägsta koncentrationen vid vilken verkan observeras på reproduktionskapaciteten (LOEC), inklusive en beskrivning av de statistiska metoder som har använts, en indikation om de observerade verkningarnas styrka och koncentrationen vid vilken ingen verkan på reproduktionen observeras (NOEC). I tillämpliga fall bör även LOEC och NOEC för föräldradjurens mortalitet rapporteras.
- I tillämpliga fall EC_x för reproduktion, konfidensintervall och en kurva för den anpassade modell som har använts för beräkningen, lutningen hos dos-responskurvan och dess standardavvikelse.
- Övriga observerade biologiska verkningar eller mätningar: Varje observerad eller uppmätt biologisk verkan (t.ex. föräldradjurens tillväxt) tillsammans med alla tillbörliga motiveringar.
- Motiveringar för varje avvikelse från testmetoden.

3.

HÄNVISNINGAR

- 1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, Förenade kungariket, den 20–21 mars 1993.
- 2) OECD Environmental Health and Safety Publications, "Series on Testing and Assessment No.6", rapport från slutligt ringtest för reproduktionstest på *Daphnia magna*, Paris, 1997.
- 3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. och Calow P. (1991), "A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21, s. 257–265.
- 4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, **154**, 25–33.
- 5) EPA (1993), "Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms", (4:e uppl.), EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (Ed.), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- 6) Vigano L., (1991), "Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, s. 775–782.
- 7) ASTM (1988), "Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians", E729–88a, American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 s.

- 8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. och Calow P. (1989), "The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects", I: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology, Köpenhamn 1988 (redaktörer H.Løkke, H. Tyle och F. Bro-Rasmussen) s. 144–148.
- 9) Parkhurst B.R., Forte J.L. och Wright G.P. (1981), "Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*" Bull. Environ. Contam. and Toxicol., **26**, s. 1–8.
- 10) Cowgill U.M. och Milazzo D.P. (1990), "The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness", Arch. Hydrobiol., **120**(2), s. 185–196.
- 11) Korshikov (1990), "*Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990", Biologice Prace, **36**, s. 209.
- 12) Sims I.R., Watson S. och Holmes D. (1993), "Toward a standard *Daphnia* juvenile production test", Environmental Toxicology and Chemistry, **12**, s. 2053–2058.
- 13) Sims I. (1993), "Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth", Arch. Hydrobiol., **128**, s. 459–466.
- 14) Dunnett C.W., (1955), "A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control", J. Amer. Statist. Assoc., **50**, s. 1096–1121.
- 15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, **20**, 482–491.
- 16) Williams D.A. (1971), "A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control", Biometrics **27**, s. 103–117.
- 17) Williams D.A. (1972), "The comparison of several dose levels with a zero dose control", Biometrics, **28**, s. 510–531.
- 18) Draper N.R. och Smith H. (1981), Applied Regression Analysis, andra upplagan, Wiley, N.Y..
- 19) Brain P. and Cousens R. (1989), "An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses", Weed Research, **29**, s. 93–96.
- 20) Wilson E.O. och 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, s. 532.
- 22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. och Boyce M.S. (1986), "Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques", Ecology, **67**, s. 1156–1166.

BILAGA 1

BEREDNING AV FULLSTÄNDIGT DEFINIERADE ELENDT M7- OCH M4-MEDIER

Aklimatisering till Elendt M7- och M4-medier

I vissa laboratorier har man stött på svårigheter vid direkt överföring av *Daphnia* till M4- (1) och M7-medier. Man har haft vissa framgångar med stegvis aklimatisering, dvs. först en överflyttning till 30 % Elendt, sedan till 60 % Elendt och därefter till 100 % Elendt. I vissa fall måste aklimatiseringsperioden utsträckas till en månad.

BEREDNING

Spårelement

Separata stamlösningar (I) av enskilda spårelement bereds först i vatten av lämplig renhet (renat t.ex. genom avjonisering, destillering eller omvänd osmos). Utifrån dessa stamlösningar (I) bereds en andra stamlösning (II) som innehåller alla spårelement (kombinerad lösning), enligt tabellen nedan.

Stamlösningar I (enskilt ämne)	Mängd som sätts till vatten mg/l	Koncentration (i förhållande till medium M4), faktor	För beredning av kombinerad stamlösning II tillsätts följande mängd stamlösning I till vatten 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	–	–
Na ₂ EDTA- och FeSO ₄ -lösningarna bereds separat, hålls samman och sätts omedelbart i autoklav. Det ger följande:				
21 Fe-EDTA-lösning		1 000-faldig	20,0	5,0

M4- och M7-medier

M4- och M7-medier bereds med användning av stamlösning II, makronäringsämnen och vitaminer, enligt tabellen nedan.

	Mängd som sätts till vatten mg/l	Koncentration (i förhållande till medium M4), faktor	Mängd stamlösning som tillsätts för beredning av medium ml/l	
			M 4	M 7
Stamlösning II med kombination av spårelement		20	50	50
Stamlösningar med makronäringsämnen (enskilt ämne)				
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
Kombinerad vitaminstamlösning	–	10 000	0,1	0,1
Den kombinerade vitaminstamlösningen bereds genom att sätta till de tre vitaminerna till en liter vatten enligt nedan.				
Tiaminhydroklorid	750	10 000	–	–
Cyanokobalamin (B ₁₂)	10	10 000	–	–
Biotin	7,5	10 000	–	–

Den kombinerade vitaminstamlösningen lagras nedfryst i små alikvoter. Vitaminerna sätts till medierna strax före användningen.

OBS 1: För att undvika utfällning av salter vid beredning av det kombinerade mediet skall man tillsätta stamlösningaliquoterna till cirka 500–800 ml avjoniserat vatten och därefter fylla upp till en liter.

OBS 2: Den första offentliggjorda informationen om M4-medium finns i Elendt, B.P. (1990), "Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus", *Protoplasma*, 154, s. 25–33.

BILAGA 2

ANALYS AV TOTALT ORGANISKT KOL (TOC) OCH

UPPRÄTTANDE AV NOMOGRAM FÖR TOC I ALGFODER

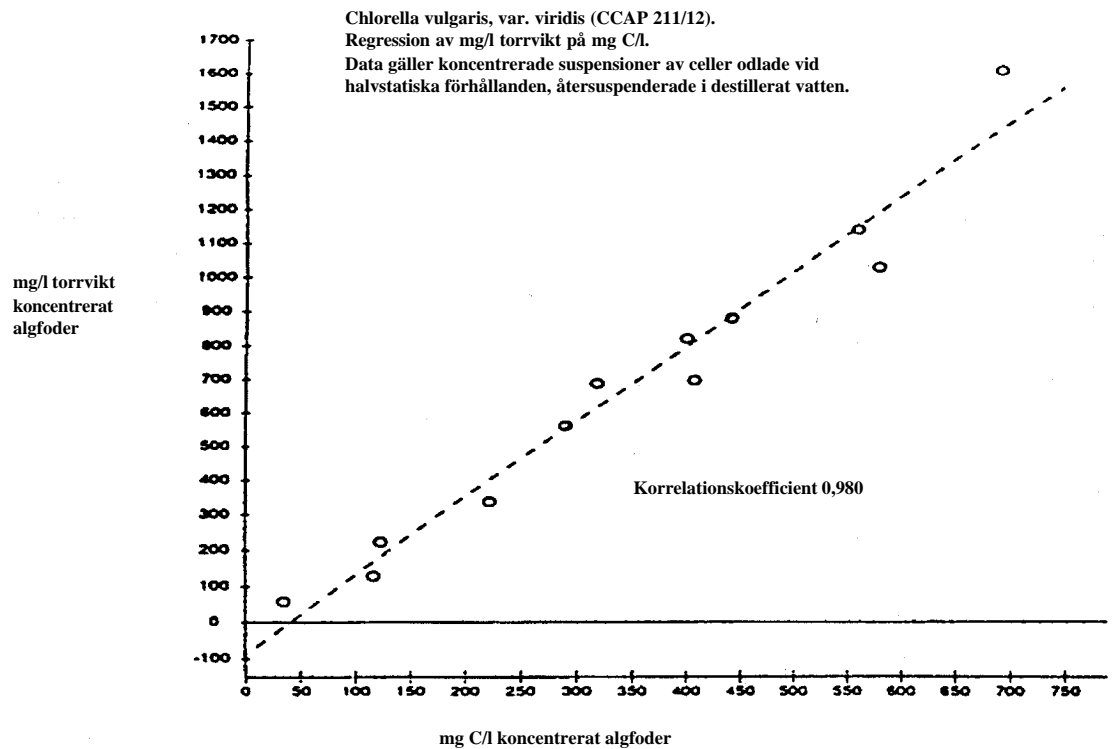
Det är allmänt känt att kolhalten i algfodret i regel inte mäts direkt utan fås genom korrelationer (nomogram) med surrogatmätningar av t.ex. antalet algceller eller ljusabsorbans.

För mätning av TOC är högtemperaturoxidation att föredra framför UV- eller persulfatmetoder. (Se *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands*, 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

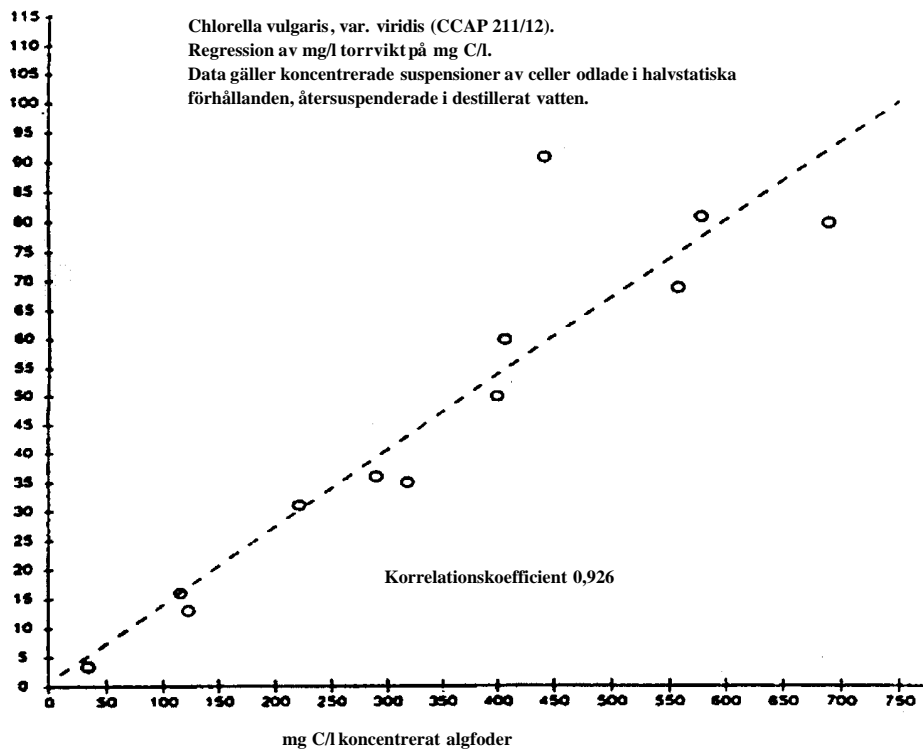
Före mätningarna för nomogrammet separeras algerna från tillväxtmediet genom centrifugering med påföljande återsuspension i destillerat vatten. För varje prov mäts surrogatparametern och TOC tre gånger. Blindprov med destillerat vatten bör analyseras och TOC-värdet härledas från det TOC-värde som erhållits för algprovet.

Nomogrammet bör vara linjärt över det avsedda kolhaltområdet. Nedan visas några exempel.

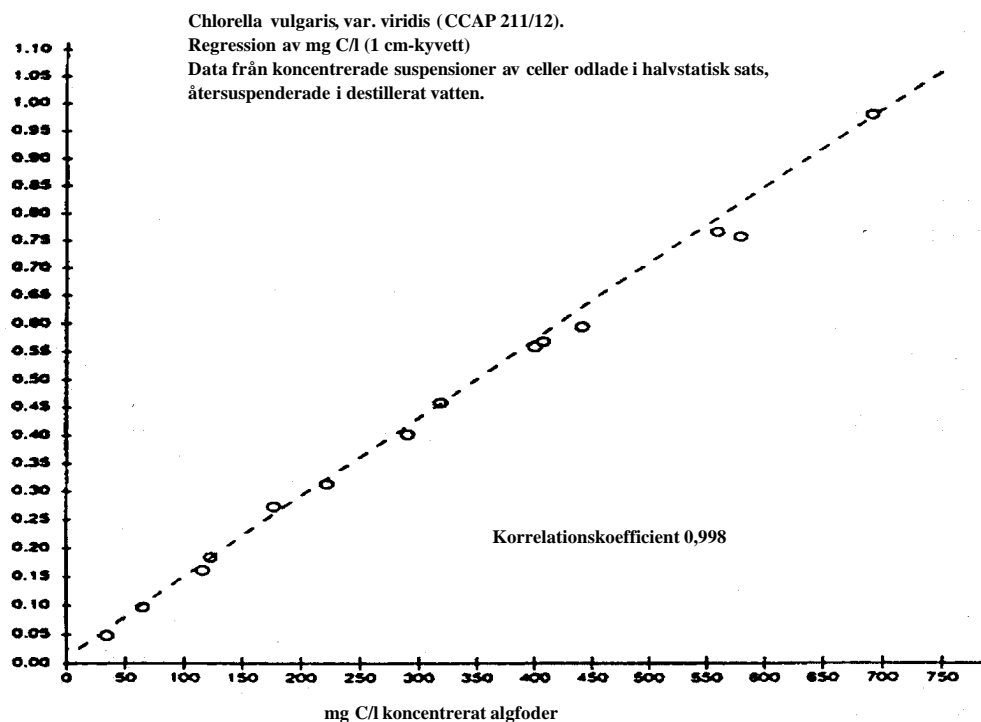
OBS: Dessa exempel bör inte användas för konversioner. Det är väsentligt att laboratorierna upprättar egna nomogram.



Antalet
celler/l ($\times 10^8$)
i koncentrerat
algfoder



Absorbansen vid
440 nm hos en
1:10-utspädning
av koncentrerat
algfoder



BILAGA 3

EXEMPEL PÅ BLANKETT FÖR REGISTRERING AV MEDIUMFÖRNYELSE, FYSIKALISK-KEMISKA

UPPFÖLJNINGSDATA, UTFODRING, DAPHNIA-REPRODUKTION OCH VUXENMORTALITET

Försök nr: Data fr.o.m. : Klon: Medium : Typ av foder: Testämne: Nominell konc:

Dag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Medium-förnyelse (bocka för)																									
pH *																									
O ₂ mg/l *																									
Temp. (°C) *																									
Utfodring (bocka för)																									
Antal levande avkommor †																									Totalt
Kärl 1																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
Kumulativ vuxenmortalitet ‡																									

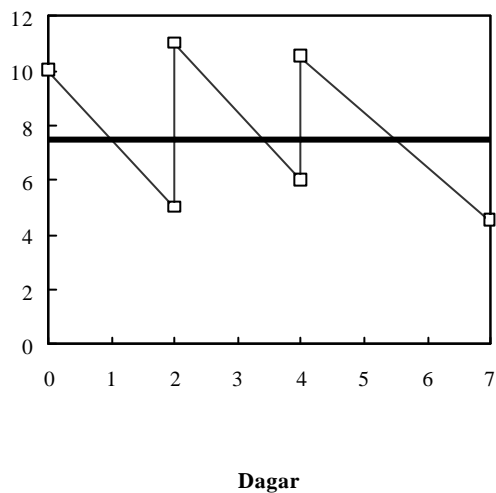
*Ange vilket kärl som användes för försöket.
 ‡ Registrera varje dött vuxenexemplar med "M" i relevant ruta.
 † Registrera aborterade avkommor med "AB" i relevant ruta.

BILAGA 5

BERÄKNING AV TIDSVÄGT MEDELVÄRDE

Tidsvägt medelvärde

Utifrån det faktum att testämnets koncentration kan sjunka under perioderna mellan mediumförnyelse är det nödvändigt att överväga vilken koncentration man skall anse utgöra representativ koncentration för det koncentrationsområde som föräldragenerationen av *Daphnia* exponeras för. Valet skall basera sig på både biologiska och statistiska faktorer. Om man t.ex. tror att fortplantningen mest påverkas av den högsta koncentrationen som förekommer skall den koncentrationen användas som representativ koncentration. Om däremot ackumulerade verkningar eller långtidsverkningar av det toxiska ämnet anses vara viktigare skall medelkoncentrationen användas. I det fallet är det lämpligt att använda tidsvägt medelkoncentration eftersom den beräknas med beaktande av de variationer som den momentana koncentrationen genomgår över tiden.



Figur 1: Exempel på tidsvägt medelvärde

I figur 1 visas ett exempel på ett (förenklat) test som omfattar 7 dagar och där mediumförnyelse görs dag 0, 2 och 4.

- Den tunna linjen som går upp och ned representerar momentana koncentrationer. Koncentrations-sänkningen antas följa en exponentiell sönderfallsprocess.
- De sex punkterna representerar observerade koncentrationer som har uppmätts vid början och slutet av varje förnyelseperiod.
- Den tjocka horisontella linjen indikerar nivån för det tidsvägda medelvärdet.

Det tidsvägda medelvärdet beräknas så, att ytan under det tidsvägda medelvärdet är lika stor som ytan under koncentrationskurvan. Beräkningen för exemplet i figuren ovan illustreras i tabell 1.

Tabell 1: Beräkning av tidsvägt medelvärde

Förnyelse nr	Dagar	Konc0	Konc1	Ln(Konc0)	Ln(Konc1)	Yta
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
Dagar totalt: 7					Totalyta	50,091
					Tidsvägt medeltal	7,156

Dagar avser antalet dagar i förnyelseperioden

Konc0 är den uppmätta koncentrationen vid varje förnyelseperiods början.

Konc1 är den uppmätta koncentrationen vid varje förnyelseperiods slut.

Ln(Konc0) är den naturliga logaritmen av *Konc0*

Ln(Konc1) är den naturliga logaritmen av *Konc1*

Yta är ytan under den exponentiella kurvan för varje förnyelseperiod. Den beräknas enligt följande:

$$Yta = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times dagar$$

Det tidsvägda medelvärdet är värdet för *Totalyta* dividerat med värdet för *Dagar totalt*.

För *Daphnia*-reproduktionstest måste tabellen självfallet utökas så att den sträcker sig över 21 dagar.

När observationer görs endast i början och slutet av varje förnyelseperiod är det uppenbart att det inte är möjligt att bekräfta att sönderfallsprocessen verkligen är exponentiell. En annorlunda kurva skulle resultera i en annorlunda beräkning av värdet för *Yta*. Det är dock inte osannolikt att sönderfallsprocessen är exponentiell och därför är en sådan kurva troligen det bästa alternativet, i brist på annan information.

Däremot finns det anledning att se upp om man genom den kemiska analysen vid förnyelseperiodens slut inte lyckas få fram någon halt av ämnet. Om det inte är möjligt att uppskatta hur snabbt ämnet har försvunnit ur lösningen är det inte möjligt att få en realistisk yta under kurvan, och följaktligen inte heller möjligt att få ett meningsfullt tidsvägt medelvärde.