

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DISERTAČNÍ PRÁCE

2018

Ing. Ladislav Novák

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

PRAKTICKÉ DOPADY NOVÉHO SYSTÉMU ZKOUŠENÍ CHEMICKÝCH
LÁTEK

Ing. Ladislav Novák

Disertační práce

2018

Prohlašuji: Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 6. 2018

Ing. Ladislav Novák

ANOTACE

Práce je věnována problematice registrace chemické látky podle požadavků evropské legislativy. Všechny látky vyráběné a dovážené do Evropské unie musí mít prozkoumány nebezpečné vlastnosti. V rámci práce byla provedena ukázková registrace látky používané k povrchovým úpravám, využity byly rešeršní informace o vlastnostech této látky, které byly zpracovány v oficiálním nástroji pro zpracování dat, který je využíván při skutečné registraci.

KLÍČOVÁ SLOVA

registrace, REACH, vlastnosti, zkoušky, IUCLID, data

TITLE

The practical implications of the new testing system of chemicals

ANNOTATION

The thesis deals with the issue of registration of chemical substances in compliance with the requirements of European legislation. All substances manufactured in and imported to the European Union must have their hazardous properties examined. For the purpose of the thesis, an example of the registration of a chemical substance used for surface treatment was performed, with research information on the properties of this substance which was processed with the use of a data processing tool used in real registration.

KEYWORDS

registration, REACH, properties, tests, IUCLID, data

CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo po vzniku nařízení REACH udělat ukázkovou registraci samostatně registrované látky k osvětovým účelům. Jako ukázková látka byla vybrána chemikálie používaná v povrchových úpravách a ochraně Methylethylketoxim, která v době zahájení práce ještě nebyla registrována.

V době dokončení práce, již sice není možné podat samostatnou registraci, ale to nijak nebrání cílům této práce, což je seznámení s postupem registrace od studia předpisu, přes shromáždění dat až po využití nástrojů pro zpracování dat.

V rámci práce je představen vývoj legislativy, požadavky na registraci, což znamená soubor testů, které jsou vyžadovány pro identifikaci rizik, systém, jak by registrant postupoval, pokud by je musel provádět.

Jedním ze základních principů nařízení REACH je i ochrana zvířat proti týrání, to znamená, že pokud je test vlastnosti na obratlovci, již v minulosti proveden, nesmí se opakovat a musí být využity rešeršní údaje. Proto je podstatnou součástí práce i rešerše dat pro registraci.

Získaná data pak byla zpracována do databázového systému, kterým se data pro registraci předkládají, aby byl splněn cíl práce, zpracování ukázkové registrace.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Stručný Přehled evropské chemické legislativy.....	9
3	Hlavní principy chemické politiky uplatněné v nařízení REACH.....	11
4	Povinné údaje o vlastnostech	12
4.1	Literární řešerše.....	13
4.2	Metody „ <i>in silico</i> “ (výpočtové metody).....	13
4.3	Využití podobnosti (metody Read Across).....	13
4.4	Alternativní metody zkoušení	14
4.5	Orientační zkoušky s omezeným počtem zvířat.....	14
4.6	Plný test za využití zvířat	14
5	Metody „ <i>in silico</i> “ (výpočtové metody).....	15
6	Alternativní metody zkoušení	22
	Příloha č. 1	27
	Praktická část	134
7	Závěr	190
8	Literatura.....	191

1 ÚVOD

Na konci devadesátých let byly ministry životního prostředí členských států EU, projednány a zhodnoceny tehdy platné podmínky pro uvádění chemických látek a přípravků na trh. Bylo konstatováno, že je velká nerovnováha mezi znalostmi vlastností přibližně 2 500 tzv. nových chemických látek, které musely být před jejich uvedením na trh registrovány podle směrnice 67/548/EHS a přibližně 30 000 tzv. starých látek, o jejichž vlastnostech nemají správní úřady prakticky žádné informace.

Ministři životního prostředí zadali Komisi EU úkol, připravit koncepci nové chemické politiky, která by zajistila hlavní cíl, přibližně do roku 2020 dosáhnout stavu, že budou v Evropské unii vyráběny a uváděny na trh pouze látky se známými vlastnostmi, které budou používány způsobem, jehož bezpečnost bude prověřena. Přitom by nemělo dojít k ohrožení konkurenceschopnosti evropského chemického průmyslu a měla by být uplatněna zásada preventivní bezpečnosti.

V roce 2001 byly zveřejněny zásady nové chemické politiky v tzv. Bílé knize. Na konci roku 2003 zveřejnila Komise první návrh nařízení, který byl následně v internetové diskusi podroben veřejné kritice, po které byl návrh upraven a předložen Radě a Parlamentu EU k projednání. K další úpravě návrhu nařízení došlo v době mezi 1. a 2. čtením v Parlamentu v letech 2005 – 2006. Před vánocemi roku 2006 byl návrh schválen Parlamentem a Radou a 30. 12. 2006 byl v Úředním věstníku (Official Journal) zveřejněn výsledný text nařízení (ES) č. 1907/2006 známý pod zkráceným názvem nařízení REACH (1) [Nařízení Evropského parlamentu a Rady \(ES\) č. 1907/2006 \(REACH\)](#). Znění nařízení aktuálně platné po opravě chyb bylo zveřejněno v Úředním věstníku na konci května 2007.

Definitivní znění nařízení pak bylo zveřejněno v prosinci roku 2006 jako legislativní úprava, která působí přímo ve všech členských zemích EU bez dalšího schvalování.

Cílem nařízení REACH je zajistit, aby se na území EU pohybovaly pouze látky, které mají známé vlastnosti z hlediska účinků na zdraví a životní prostředí, látky s vyhodnocenými riziky používání. To zajistí, aby se s těmito látkami nakládalo bezpečně.

Jednou ze základních povinností výrobců a dovozců chemických látek, při tonáži více jak 1 tuna za rok, je registrace látek. V rámci registrace shromažďuje každý registrant data o látce, kterou chce registrovat. K jejich zjištění provede nezbytné testy vlastností, tak jak k dané tonážní hladině požaduje nařízení. Zjištěné informace registrant zpracuje

do dokumentu, který se jmenuje dossier, k němu dále zpracuje zprávu o chemické bezpečnosti (Chemical Safety Report – CSR), v rámci které vyhodnotí rizika používání v dokumentu, který se jmenuje expoziční scénář. Registrantů jedné látky je samozřejmě více a každý jednotlivý registrant nezpracovává dokumentaci sám. To ani není cílem nařízení. Platí princip jedna látka, jedna registrace. Registranti konkrétní látky se proto spojí, mezi sebou domluví a finančně vyrovnají, jmenují hlavního registranta, který zajistí vše potřebné a hotovou dokumentaci odevzdá na ECHA (Evropská chemická agentura). Získá tak číslo hlavního registranta a přístupové klíče k již odevzdané dokumentaci na základě kterých se k registraci přihlásí i ostatní registranti dané látky. Takto získá registrační číslo každý jednotlivý výrobce nebo dovozce.

Registrační proces je velmi nákladný z pohledu prakticky všech parametrů. Ale společným postupem registrantů se náklady mezi ně rozdělí, i když celý proces je doprovázen někdy obtížným dojednáváním spolupráce.

Registrace probíhá ve třech vlnách podle tonáže vyrobené nebo dovezené za kalendářní rok, první vlna v roce 2010 byla pro látky nad 1000 tun, druhá v roce 2013 pro látky od 100 do 1000 tun a třetí vlna v roce 2018 je pro látky od 1 do 100 tun. Látky vyráběné a dovážené pod 1 tunu za rok, se registrovat nemusí.

V prvních dvou vlnách byla registrace spojena s dohadováním mezi jednotlivými registranty jedné látky, třetí vlna už předpokládá, že většina z pohledu tonáže malých registrantů, si přístup k datům zakoupí a registrace tak pro ně bude snazší. Agentura ECHA v jedné z novel nařízení, nastavila podmínky spravedlivé ceny pro tyto případy.

Toto nařízení se týká všech typů chemických produktů, tedy i chemikálií pro užití v povrchových úpravách a ochraně.

2 STRUČNÝ PŘEHLED EVROPSKÉ CHEMICKÉ LEGISLATIVY

V následující kapitole je v krátkosti podán přehled vývoje tzv. chemické legislativy (tj. takové, která se zásadním způsobem dotýká chemie a produktů chemického průmyslu) v EU a tedy i v ČR.

Směrnice Rady 67/548/EHS z 27. června 1967

Založen harmonizovaný systém klasifikace, balení a označování chemických látek, vydán seznam chemických látek klasifikovaných jako nebezpečné (první verze přílohy I).

Směrnice Rady 76/769/EHS z 27. července 1976

Položeny základy systému zákazů a omezování mimořádně rizikových chemických látek a přípravků.

Směrnice Rady 79/831/EHS (6. novely Směrnice Rady 67/548/EHS)

Notifikace (v českém zákoně „registrace“) nových chemických látek, seznam EINECS (100 106 tzv. starých látek, u kterých není povinná registrace), seznam ELINCS (dosud více než 4 000 látek, registrovaných podle této směrnice), systematické posuzování rizik notifikovaných látek příslušnými úřady členských států.

Směrnice Rady 88/379/EHS z 7. června 1988

Klasifikace, balení a označování nebezpečných přípravků.

Směrnice 91/155/EHS z 5. března 1991

Jednotné požadavky na bezpečnostní list.

Směrnice Komise 92/69/EHS (17. přizpůsobení technickému pokroku) ze dne 31. července 1992

Nebezpečnost pro životní prostředí, upřesněna definice polymeru, sestaven seznam NLP (No Longer Polymer List).

Narizení Rady (ES) č. 793/93 z 23. března 1993 o hodnocení a kontrole rizika existujících látek

Inventarizace existujících chemikálií uváděných na trh v tonáži vyšší než 10 t/r.

Hodnocení prioritních existujících látek příslušnými úřady členských zemí.

Bílá kniha o strategii budoucí politiky managementu chemických látek (v únoru 2001 přijata Evropskou komisí)

Vytyčen politický cíl: uplatnit nový systém kontroly chemikálií, kterým by se mělo zajistit, aby se nejpozději do roku 2020 používaly pouze chemikálie se známými vlastnostmi způsobem, který nepoškozuje zdraví a životní prostředí.

I.9. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 (REACH) ze dne 18. prosince 2006

Legislativní nástroj, který by měl splnit cíle politiky stanovené v Bílé knize.

3 HLAVNÍ PRINCIPY CHEMICKÉ POLITIKY UPLATNĚNÉ V NAŘÍZENÍ REACH

Hlavními nástroji nové politiky chemických látek na cestě k dosažení deklarovaných cílů ochrany zdraví a bezpečnosti lidí a životního prostředí jsou:

- a) registrace chemických látek (**R**egistration),
- b) hodnocení registračních dokladů a hodnocení látek (**E**valuation),
- c) povolování mimořádně rizikových látek (**A**uthorisation),
- d) omezení a zákazy mimořádně rizikových látek (**R**estriction of **C**hemicals).

Jednotného postupu při uplatňování nových zásad managementu chemických látek by mělo být dosaženo tím, že hlavní úkoly vyplývající z uplatnění nařízení REACH pro správní úřady plní Evropská agentura pro chemické látky ECHA (agentura) se sídlem v Helsinkách. Agentura byla formálně založena nařízením REACH. V jejích řídicích i pracovních orgánech je kombinován princip odbornosti s principem poměrného zastoupení členských zemí, který by měl zajistit jak odbornou úroveň rozhodování, tak i základní principy demokratického spolurozhodování všech členských států Evropské unie o nejzávažnějších společných problémech. Agentura je financována částečně z rozpočtu Unie a částečně z výnosu poplatků za úkony, které zajišťuje ve vztahu k povinným osobám z oblasti průmyslu a obchodu.

Úloha národních pověřených úřadů je omezena na spolupráci vyžádanou od agentury a na účast při hodnocení prioritních látek zařazených do agenturou koordinovaného plánu hodnocení látek.

Nařízení REACH je poměrně rozsáhlé samo o sobě. Vedle toho se však opírá o množství souvisejících legislativních dokumentů, jako jsou např. Technical Guidelines (TGD), které stanoví způsoby provádění jednotlivých předepsaných zkoušek k získávání požadovaných údajů, dále způsob přípravy studie nazvané Chemical Safety Report (Zpráva o chemické bezpečnosti) a řadu dalších. Pro provedení vlastní registrace pak bylo vypracováno několik elektronických nástrojů, mezi hlavní patří registrační dokumentace IUCLID 5, která byla převzata z agendy OECD jakožto unifikovaný IT nástroj pro registraci chemikálií, biocidů apod.

4 POVINNÉ ÚDAJE O VLASTNOSTECH

Klíčovým krokem pro přípravu registrační dokumentace chemické látky je získání údajů o vlastnostech dané chemikálie. Je možné je rozdělit do těchto skupin:

- fyzikální,
- fyzikálně-chemické,
- ekotoxikologické,
- toxikologické.

Každá z těchto skupin zahrnuje celou řadu údajů, které je nezbytné získat některým z níže popsaných postupů. Seznam těchto zkoušek je v příloze č. 1 této práce.

REACH jako první „registrační“ nařízení reguluje používání laboratorních zvířat (konkrétně obratlovců) za účelem zjištění vlastností látek. Zakazuje provádění testů na zvířatech v případě, že je možné využít již existujících údajů, nebo je získat jinou cestou (výpočtové metody, alternativní postupy testování,...). K tomu byla vytýčena strategie, jak data získat:

- literární rešerše,
- metody „*in silico*“ (výpočtové metody),
- využití podobnosti (metody Read Across),
- alternativní metody zkoušení (buněčné kultury,...),
- orientační zkoušky s omezeným počtem zvířat,
- plný test za využití zvířat.

Jako velmi cenný zdroj informací o vlastnostech látek jsou považovány dlouhodobé lékařské záznamy o pracovnících z výroby dané látky, případně o pracovnících, kteří s ní dlouhodobě přicházeli do styku. Nejedná se přitom o klasické epidemiologické studie (ty je velmi obtížné provést vzhledem k obvykle kombinované expozici a jejich nákladnosti), jde skutečně jen o údaje o nemocnosti, obtížích apod., ze kterých lze usuzovat na např. alergologický potenciál, schopnost působení na krevtvorbu apod.

Je nezbytné podotknout, že všechny experimenty musí být veden v režimu Správné laboratorní praxe (SLP) jakožto nejvyššího a nejsložitějšího stupně řízení jakosti práce, což výrazně prodraží celý proces získávání údajů. Jedinou výjimkou t tohoto pravidla jsou fyzikální a fyzikálně-chemické vlastnosti, kde je možno zkoušky provádět i mimo systém SLP (byť je preferován), doporučuje se však alespoň nějaký systém řízení jakosti (akreditace,...).

Validita získaných údajů se hodnotí podle tzv. Klimischovy stupnice od jedné do čtyř, kde věrohodnost klesá se stoupajícím číslem. Nejlepší jsou tedy ty, které jsou označeny jedničkou:

- 1 – údaje získané v systému SLP podle předepsaných metodik (TGD),
- 2 – údaje získané v systému SLP podle jiných metodik než předepsaných, ale podobných,
- 3 – údaje získané mimo systém SLP podle předepsaných metodik nebo metodik podobných,
- 4 – ostatní údaje, použitelné pouze jako podpůrné.

4.1 LITERÁRNÍ REŠERŠE

Údaje získané touto cestou nestačí v registrační dokumentaci pouze konstatovat (např. akutní toxicita je 250 mg/kg). Musí být získána originální práce a pečlivě prostudována s cílem zhodnotit dle výše uvedené Klimischovy stupnice (jakou metodou byl údaj získán, SLP ano/ne,...). Častým problémem bývá fakt, že u řady látek lze nalézt pro stejnou látku velmi odlišné hodnoty u stejné vlastnosti. Potom je nezbytná spolupráce s odborníkem v dané oblasti (toxikolog, ekotoxikolog, analytik,...). Podle zjištěných podmínek provádění zkoušek se pak provádí hodnocení dle Klimische od 1 do 4.

4.2 METODY „IN SILICO“ (VÝPOČTOVÉ METODY)

Tyto postupy jsou založeny na složitém matematickém modelování. Dělí se na dvě základní skupiny QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) a SAR (Structure Activity Relationship). Bližší podrobnosti budou popsány v dalším. Obvykle se těmto výsledkům přiřazuje hodnocení dle Klimische 2.

4.3 VYUŽITÍ PODOBNOSTI (METODY READ ACROSS)

Jedná se o přenos známých vlastností (resp. odhad dané vlastnosti) z jedné látky na druhou, kde dané vlastnosti známa není. Pro použití tohoto postupu je nutno doržet řadu podmínek,

především pak podobnost srovnávaných látek. Jedná se v podstatě o techniku, která je popsána jako Humánní expertní systém v kapitole č. 5, která se týká výpočetních metod. Také zde je hodnocení dle Klimische 2.

4.4 ALTERNATIVNÍ METODY ZKOUŠENÍ

Jedná se o experimentální metody, které v současné době procházejí bouřlivým vývojem. Tyto metody používají namísto laboratorních zvířat vhodné modely (buněčné kultury, bakterie,...), nebo využívají postupů, které omezují počet zvířat v pokusu, nebo snižují jejich eventuální utrpení. Bližší bude uvedeno v dalším. Tyto zkoušky se provádí v systému SLP dle TGD a hodnotí se Klimischovým stupněm 1.

4.5 ORIENTAČNÍ ZKOUŠKY S OMEZENÝM POČTEM ZVÍŘAT

Tyto zkoušky se provádí před každým „plným“ testem (viz 4.6) na jednom či dvou zvířatech (závisí na typu zjišťované vlastnosti). Pokud je výsledek tohoto „předtestu“ zcela jednoznačný, dále se nepokračuje.

4.6 PLNÝ TEST ZA VYUŽITÍ ZVÍŘAT

Jde o experimentální zjištění podle předepsané metodiky (TGD) v systému SLP, tento výsledek pak je hodnocen dle Klimische jako 1. Principy těchto zkoušek jsou uvedeny jednak v „OECD Testing Guidelines of Chemicals“, jednak jako součást nařízení REACH. Jejich základní principy jsou uvedeny v příloze č. 1 této práce.

5 METODY „IN SILICO“ (VÝPOČTOVÉ METODY)

Základní informace o výpočtových metodách (Q)SAR

(Q)SAR je zkratkou anglického výrazu „(Quantitative) Structure – Activity Relationship“. Další ekvivalentní zkratky: QSAA („Quantitative Structure – Activity Analysis“), QPAR („Quantitative Property – Activity Relationship“) mají spíše historický původ a dnes se s nimi již téměř nesetkáme.

Analýzu (Q)SAR lze (jednoduše) definovat jako analýzu dat o biologických a chemických vlastnostech látek, většinou pomocí metod matematické statistiky. Tak jsou zobecňovány fyzikálně-chemické, toxikologické a ekotoxikologické údaje vybraných (známých) látek (= základní databáze, „training set“) na všechny látky základní databázi „podobných“. Pojem podobnosti je zde přitom míněn ve zcela obecné rovině a bude dále diskutován. Cílem metod (Q)SAR je, jinými slovy, kvantitativní nebo kvalitativní odhad definované vlastnosti chemické látky na základě podobnosti této látky s jinými, známými látkami. Množství nahromaděných experimentálních dat o jednotlivých látkách vede ke snaze zobecňování získaných poznatků. Metody (Q)SAR se snaží toto zobecňování přenést z roviny empirické do roviny vědecky formální s využitím matematické – statistické analýzy, logiky a algoritmizace.

Rozvoj těchto metod je nedílně spojen s využitím výpočetní techniky, proto se rovněž ujal pojem *in-silico* testování chemických látek. Tento pojem se užívá především v kontextu testování biologické účinnosti (zjišťování toxikologických a ekotoxikologických vlastností látek), jako alternativa metod *in-vitro* (testy na tkáňových, buněčných kulturách, biologických preparátech) a *in-vivo* (testy na – vyšších – živých organismech).

Jediným vstupem (Q)SAR metod (algoritmů) je strukturní vzorec testované látky (molekuly). Jedná se tedy o hledání souvislostí mezi strukturou látky a jejími fyzikálně – chemickými, toxickými či ekotoxickými vlastnostmi nevyjímaje ani biokinetiku či distribuci a odbouratelnost v životním prostředí.

Výstupem je pak tzv. end-point: přesně definovaná vlastnost chemické látky (např. *Daphnia magna* LC50, 48 hodin, apod.)

Podle použitého algoritmu lze (Q)SAR výpočetní systémy dělit na QSAR a SAR (expertní). QSAR algoritmy poskytují kvantitativní výstup měřitelné vlastnosti látky (jako fyz. - chem.

parametry, LC50, LD50, NOEL („No Observed Effect Level“),..., popřípadě pravděpodobnost nekvantifikovatelného toxikologického účinku (mutagenita,...). Expertní systémy poskytují kvalitativní informaci typu klasifikace sledovaného toxikologického účinku (vysoce mutagenní, málo karcinogenní,...), z principu nejsou schopny poskytovat kvantitativní informaci.

Existuje celá řada dalších přístupů využívajících pokročilejší matematické metody (3D-(Q)SAR, neuronové sítě, třídící algoritmy,...), které však zatím nejsou ve stadiu použitelném pro legislativní účely.

Základní informace o výpočtových metodách SAR

SAR systémy se snaží o počítačovou simulaci člověkem konaného ohodnocení neznámé látky na základě jeho zkušeností a znalostí.

Využívají přitom počítače jako nástroje k vyhodnocení značně obsáhlého souboru pravidel zohledňujících přítomnost jistých (vytipovaných) substituentů či strukturních fragmentů (tzv. alertů, toxikoforů) vzhledem k reaktivitě, aktivitě, metabolismu apod. molekul tyto alerty obsahujících.

„Human expert systems“ (Humánní expertní systémy) jsou založené na pravidlech vytvořených člověkem – expertní analýza. „Artificial systems“ (Umělé expertní systémy) automatizují proces nacházení a zobecňování těchto pravidel, jedná se o („samoučící se“) algoritmy: generické algoritmy, umělé neuronové sítě, „Decision trees“,...

V prvním kroku je tedy nutné vytvořit definovanou množinu „podezřelých“ strukturních fragmentů a substituentů (alertů, toxikoforů) a zároveň podmínek a pravidel jejich vlivu na chování molekuly. U Humánních expertních systémů je tento krok prováděn člověkem, u umělých expertních systémů je automatizován. Tato množina je následně algoritmizována a softwarově implementována. Tím vzniká tzv. databáze toxikoforů a databáze znalostí. U Humánních systémů zůstávají až do dalšího vnějšího zásahu tyto databáze neměnné. U Umělých systémů je zpravidla zabudován proces učení, to je lze vkládat nové molekuly se známým toxikologickým účinkem za znovu uplatnění algoritmu pro tvorbu těchto databází.

Při ohodnocení neznámé látky jsou pak v její struktuře softwarově identifikovány známé alerty a jejich počet a kombinace a spolu s aplikací databáze znalostí – je rovněž zohledňována (stejným softwarovým mechanismem) snadnost průniku látky do místa

působení (např. pravděpodobnost průniku kůží apod.) atd. – se získává výstup v podobě ohodnocení pravděpodobnosti toxikologického účinku studované molekuly. Výstupem je tedy kvalitativní informace.

Expertní systémy jsou často využívány pro odhad mutagenity a karcinogenity a také reaktivity, metabolismu, odbouratelnosti a distribuce v životním prostředí. Rovněž na nich bývají založeny 3D-SAR modely – studování farmaceutické účinnosti léků v závislosti na přítomných substituentech, pomoc při vytipování nových léčiv.

Principy QSAR

QSAR systémy jsou založeny na představě, že ke sledovanému end-pointu přispívají jednotlivé dílčí vlastnosti molekuly. To lze vyjádřit obecnou rovnicí:

$$Q = f(X_i)$$

kde Q je sledovaný *end-point* a X jsou vytipované fyzikálně-chemické či strukturní vlastnosti molekuly. Hledání vhodné funkce F je předmětem teoretických výzkumů, ovšem dnes je téměř výhradně využívám lineární model, tedy předpokládá se aditivní příspěvek jednotlivých dílčích vlastností k vlastnosti sledované:

$$Q = \sum \alpha_i A_i$$

Q je (většinou logaritmická) hodnota *end-pointu* α jsou regresní koeficienty a A jsou jednotlivé fyzikálně-chemické či strukturní vlastnosti (deskriptory) molekuly. Hodnoty α mohou být jak kladné, tak záporné. Během vývoje modelu a statistického testování jsou vyloučeny bezvýznamné ($\alpha = 0$) členy.

Ukazuje se vhodné vyjadřovat lineární model v logaritmické škále, což se vysvětluje termodynamickou podstatou problému (chemický potenciál látky v organismu a logaritmická závislost chem. potenciálu na aktivitě látky). (Q je tedy např. $\log(\text{LC50})$ apod.)

Některé QSAR modely (Free – Wilsonova analýza) jsou jakýmsi zobecněním Expertních systémů, stejně jako ony využívají přítomnosti vytipovaných molekulárních fragmentů, avšak expertní analýzu (vykonávanou člověkem) nahrazují, rovněž numerickou, analýzou statistickou. Je hledána korelace mezi přítomností daného *alertu* v molekule a její účinností molekuly vzhledem ke stanovovanému *end-pointu*. Každému *alertu* je tak statisticky přidělen

jakýsi „impakt faktor“ (váha) – regresní koeficient. V tom případě symbol A výše uvedené rovnice označuje jednotlivé *alerty*, symbol α váhu těchto *alertů*. Tyto systémy tedy pracují s molekulárními fragmenty, avšak nedisponují databází znalostí závislé na předchozí expertní analýze.

Jiné modely využívají jako deskriptorů (A) jiných, měřitelných fyzikálně-chemických vlastností studovaných látek. Byla a je vyvíjena řada takových modelů v závislosti na volbě a počtu deskriptorů (Hanschova rovnice, Hammetovy rovnice, ...). Jedním ze základních deskriptorů je však $\log(P)$, to je logaritmus rozdělovacího koeficientu *n*-oktanol/voda, což je vysvětlováno souvislostí tohoto parametru s distribucí látky v organismu. Hodnoty některých deskriptorů přitom mohou být získávány opět numericky např. jinými QSAR rovnicemi či kvantově chemické výpočty (energie HOMO, LUMO,...).

SAR oproti QSAR metodám jsou považovány za algoritmy s jasněji definovanou podstatou, průhledností a interpretovatelností a za snadněji modifikovatelné – lze rozšiřovat databázi toxikoforů i znalostí pouze jako vstupních dat algoritmu (bez zásahu do algoritmu jako takového). Za nevýhodu SAR systémů je naopak považována jejich závislost na kvalitě expertní analýzy – u Humánních systémů snadněji hrozí lidská chyba, u Umělých systémů zase může být biologická účinnost snadněji asociována s nesprávnými fragmenty. U QSAR systémům bývá oceňována schopnost poskytnutí kvantitativního odhadu sledované vlastnosti včetně odhadu nejistoty takového stanovení. Kvalita QSAR predikčního modelu je však značně závislá na volbě deskriptorů a počtu vstupních dat – na rozdíl od SAR systémů nevede vždy zvýšení počtu vstupních dat ke zvýšení kvality modelu, ale může tomu být i naopak.

Problém chemické podobnosti

Správnost predikce vybraného end-pointu (Q)SAR modelem závisí především na „podobnosti“ sledované molekuly molekulám základní databáze predikčního modelu. Posouzení této podobnosti je velmi obtížné a může se stát, že i strukturně velmi podobné molekuly mají naprosto odlišný biologický účinek, vzhledem k odlišnému mechanismu působení. Naopak i strukturně velmi rozdílné molekuly mohou vykazovat podobnou aktivitu. Navíc není snadné ani definovat znaky podobnosti jednotlivých molekul.

V rámci jednoho predikčního modelu je každá molekula plně popsána množinou svých deskriptorů (ať již strukturních nebo fyzikálně – chemických). Tím jsou v rámci daného predikčního modelu definovány „znaky podobnosti“ jednotlivých látek, které tvoří

n-rozměrný prostor (n = počet deskriptorů). Látky pak mohou být podle těchto znaků analyzovány a tříděny.

Model využívající určitých vstupních parametrů nebývá vhodný pro celou škálu existujících molekul (např. vzhledem k různým mechanismům účinku). I v rámci jednoho software pak může pro odhad téhož *end-pointu* existovat několik „sub-modelů“ – vlastně samostatných QSAR rovnic – každý vhodný pro jiný typ (skupinu) molekul (např. sub-model pro alifatické uhlovodíky; (organické) kyseliny; aromatické uhlovodíky;...) Algoritmy umožňující hodnocení podobnosti pak umožňují automatický výběr vhodného sub-modelu pro konkrétní hodnocenou látku. Obecně však (Q)SAR rovnice/algoritmy nebývají schopny hodnotit anorganické sloučeniny a organo-kovové sloučeniny. Rovněž platí obecné pravidlo: „čím jednodušší hodnocená molekula – tím spíše lze očekávat, že predikovaný výsledek je správný“.

Jedním z legislativních požadavků na systémy QSAR je schopnost hodnotit „vhodnost“ testované molekuly pro použitý model na základě kritéria „podobnosti“. V této souvislosti se často používá pojem „predictability domain“ – jako pomyslný n-rozměrný prostor definovaný konkrétním QSAR modelem – do kterého hodnocená molekula buď spadá (pak je model považován za vhodný pro její hodnocení), nebo naopak.

Je však třeba zdůraznit, že zda-li či nikoli daná molekula spadá do *predictability domain* konkrétního modelu nemá v konečném důsledku žádný vliv na posuzování spolehlivosti získané predikce. Látka mimo *predictability domain* může být modelem ohodnocena správně, stejně jako látka uvnitř *predictability domain* může být modelem ohodnocena špatně.

Validace

Validace softwarů je klíčovým a požadovaným procesem pro možnost zavedení (Q)SAR systémů do (legislativní) praxe.

Provádí se interní validace („cross-validation“), kdy je využíváno cíleného přeskupování vstupních dat za účelem sledování vlivu těchto změn na kritické parametry modelu. Nevýhodou *cross-validation* je samozřejmě její „uzavřenost“ (hodnocení „sama sebou“).

Cennější údaje lze získat externí validací – sledováním spolehlivosti výsledků predikovaných pro modelu neznámé molekuly. Zde však vzniká dilema: „Je vhodnější molekulu o známém účinku použít pro tvorbu modelu, nebo pro účely externí validace“.

V rámci OECD jsou již řadu let vyvíjeny aktivity směřující k výběru využitelných modelů / software a jejich „uznání za vhodné“. Byla ustanovena skupina expertů „Ad-hoc expert group on (Q)SARs“, která dostala za úkol zvýšení akceptovatelnosti systémů (Q)SAR pro legislativní účely v oblasti regulace chemických látek, a tato skupina byla dále rozšířena o další experty členských států (včetně ČR). Dalším milníkem těchto aktivit bylo definování tzv. „Setubalských principů“ definujících (ideální) podmínky přijatelnosti (Q)SAR systémů. Následně je připravována směrnice (Guideline) OECD definující podmínky a postupy validace predikčních systémů. Úsilí vyústilo dokumentem ENV/JM/MONO(2007)2: GUIDANCE DOCUMENT ON THE VALIDATION OF (QUANTITATIVE)STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS [(Q)SAR] MODELS.

Legislativní rámec

Již dnes je zřejmé, že se vážně počítá se zavedením *in-silico* metod jako seriózních testovacích metod toxikologických účinků a parametrů a to jak pro nové látky, tak především v rámci programu REACH. Hlavní přínos je spatřován z hlediska ekonomického (dopadové studie EU (2005) hovořily o ušetření až 1mld. EUR – v rámci REACH), časové náročnosti dosavadních (in-vivo ale i in-vitro) testů a z hlediska zacházení člověka s živými organismy – tzv. princip 3R („Replace, Reduce, Refine“) (dopadové studie předpokládaly ušetření asi 1,5 mil. zvířat – v rámci REACH).

V souvislosti s nařízením REACH je vhodné zmínit články 13, 138, dále přílohu VI, „KROK 1“ a „KROK 4“, také „požadavek na posouzení všech dostupných údajů“ kladený pro všechny tonáže a především pa přílohu XI, bod 1.3 – ze všech těchto částí nařízení zřetelně vyplývá úmysl využití (Q)SAR odhadů jako zdrojů informací.

V praxi se rovněž stále častěji setkáváme s požadavky na využití *in-silico* metod, především tam, kde nelze požadovanou informaci získat jiným způsobem. Také některé evropské metodiky testování (např. A.8-„Partition coefficient“, A.4-„Vapour pressure“) přímo obsahují doporučení týkající se využití QSAR odhadů – a jsou také prakticky naplňovány.

Využití *in-silico* metod se tak jeví jako nevyhnutelné, a navíc je zřejmá potřeba rychlého řešení tohoto problému, což přispívá k politickému tlaku na co nejrychlejší zavedení alternativních metod do (klinicko-)chemické praxe (2) Dubský Pavel a kol.: Zpráva o řešení projektu VaV MŽP, VÚOS a.s. 2008.

Zaváděním predikčních systémů a odpovídajícím legislativním rámcem se zabývá řada expertních skupin v rámci jednotlivých světových autoritativních úřadů. Mezi nejdůležitější patří ECB („European Chemical Bureau“), EC – JRC – IHCP – ECVAM („European Commission – Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection – European Centre for the Validation of Alternative Methods“), OECD („Organization for Economic Cooperation and Development“), US EPA („Environmental Protection Agency“):

- ECB podporuje vývoj (Q)SAR nástrojů, které by mohly být potenciálně vhodné pro legislativní účely: ToxTree je program pro klasifikaci nebezpečnosti látek na základě jejich chemické struktury. Danish (Q)SAR database je databáze informací o asi 166 000 organických látkách získaných pomocí (Q)SAR modelů. ECB Inventory of (Q)SAR models je aktivita vyvíjená přímo pro účely nařízení REACH a představuje shromažďování informací o potenciálně použitelných modelech a „produktech“ (Q)SAR.
- OECD vyvíjí již řadu let značnou aktivitu v této oblasti, zahrnující formulaci principů validace software, návrhy Guidelines pro vývoj, validaci a používání (Q)SAR nebo shromažďování poznatků o možnosti praktického využití metod (Q)SAR.

http://www.oecd.org/document/23/0,2340,en_2649_34373_33957015_1_1_1_1,00.html#

- US EPA poskytuje (Q)SAR produkt EPI Suit pro hodnocení fyzikálně-chemických a (bio)degradačních vlastností látek.

<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedl.htm>

6 ALTERNATIVNÍ METODY ZKOUŠENÍ

Alternativní metody jsou neustále vyvíjeny a ověřovány pro použití v praxi. Tyto metody mohou mnohdy poskytovat stejnou úroveň informací jako současné testy na zvířatech a přitom využívají menšího počtu zvířat, způsobují méně utrpení nebo se úplně obejdou bez použití zvířat v souladu s koncepcí 3R.

V souladu s příslušnými právními předpisy, které upravují ochranu zvířat, je nutno ověřovat v registrech mezinárodně ověřených a uznaných metod, zda k plánovanému pokusu existuje alternativní metoda, při které nemusí být použito zvíře. Pokud jsou takové metody k dispozici, tak musí být pro charakterizaci rizika, následnou klasifikaci a označení chemické látky podle nebezpečnosti brány v úvahu.

Alternativní metody jsou velkým přínosem hlavně v oblasti testování kosmetických přípravků. V České republice je testování kosmetických přípravků na zvířatech legislativně zakázáno. V této oblasti tak plně nahrazují testy prováděné na zvířatech.

KONCEPCE 3R

V roce 1959 publikovali Russell a Burch svou knihu „The principles of humane experimental technique“. Ústředním motivem publikace je otázka, zda mohou být omezeny nebo odstraněny nehumánní aspekty experimentu na zvířeti. Návrhem je právě koncepce 3R, která se dodnes vžila a patří mezi hlavní zásady odpovědného a rozumného užití zvířat v pokusech. 3R jsou navíc přijímány řadou ochránářských organizací a bezesporu vytváří platformu, na níž je možno začít oboustranný dialog. Nejen tento důvod, ale i přesná a srozumitelná formulace zásad pro užití zvířat v experimentu byly velkým přínosem při formulaci legislativy v celé řadě zemí, včetně České republiky. 3R jsou počáteční písmena anglických slov Replacement, Reduction, Refinement (3) Basketter D.A., Scholes E.W., Chamberlain A., Barratt M.D.: An Alternative strategy to the Use of Guinea Pigs for the Identification of Skin Sensitization Hazard; Chem.Toxic. Vol. 33, No. 12, pp. 1051-1056, 1995, (4) Basketter D.A., Lea L.J., Cooper K., Stocks J., Dickens A., Pate I., Dearman R.J., Kimber I.; Threshold for Classification as a Skin Sensitizer in the Local lymph Node Assay: a Statistical Evaluation; Food and Chemical Toxicology 37 (1999) 1167-1174, (5) Ehling G., Hecht M., Heusener A., Huesler J., Gamer A.O., H. van Loveren, Maurer Th., Riecke K., Ullmann L., Ulrich P., Vandebriel R., Vohr H.-W.: An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: First round; Toxicology 212 (2005) 60-68.

Náhrada (Replacement)

Jde o nahrazení zvířat v pokusech. Za nahrazovací alternativu může být považována jakákoli experimentální metoda, která nevyžaduje použití celého, živého zvířete. Některé z těchto metod umožní náhradu pouze částečně, jelikož s sebou nesou humánní zabíjení zvířat pro získání buněk, tkání nebo orgánů pro následné studie *in vitro*. Jiné metody nahrazují plně, jelikož nevyžadují žádný biologický materiál získaný od zcela vyvinutého obratlovce. V některých případech mohou být součástí studie pouze nahrazující metody. Jindy doplňují pokusy na zvířatech a přispívají ke snížení jejich počtu použitých v celém projektu.

Možnosti náhrady pokusů na zvířatech alternativními metodami:

- fyzikálně-chemické metody,
- matematické a počítačové modely,
- použití nižších organismů (bezobratlí, rostliny, mikroorganismy),
- použití raných vývojových stádií obratlovců,
- *in vitro* techniky.

Snížení (Reduction)

Pojem snižování v sobě zahrnuje jakýkoli postup, který vede k dosažení minimálně stejného množství informací za použití nižšího počtu zvířat nebo k maximalizování získaných informací z jednoho zvířete a tím následně k omezení nebo vyvarování se použití dodatečných nebo dalších zvířat. Především jde o výběr samotné metody a uspořádání experimentu, ne méně významným faktorem je volba vhodného zvířecího modelu na základě znalostí biologie voleného druhu a tím vyloučení cesty zbytečných omylů a z hlediska fyziologie a chování příslušného živočišného druhu potlačit nebo zcela vyloučit nežádoucí proměnné v pokusu. S tím úzce souvisí i kontrola faktorů životního prostředí zvířat v uživatelských zařízeních i chovech samotných. K významné redukci vede i kvalita zvířat používaných v pokusech.

Ohleduplnost (Refinement)

Jde o snahu snížit až úplné vyloučení bolestivých a stresujících přístupů a experimentálních postupů. Vychází z biologických potřeb zvířete a jim odpovídající technologie chovu a podmínek životního prostředí tak aby mohli být splněny veškeré fyziologické požadavky příslušného druhu a udržena homeostáze organismu. V průběhu experimentu pak vedle zacházení se zvířetem, je důležitá volba co nejšetrnější metody za současného podání lokální nebo celkové anestezie, pokud je tím vyloučena bolest nebo neúměrný stres. Nedílnou součástí pokusu je i pooperační péče se souběžným podáváním analgetik, je-li to nutné.

K naplnění obsahu 3R je vyžadován značný rozsah znalostí a praktických zkušeností, získaných odpovídajícím vzděláním a praxí. Tím jsou pak vytvořeny podmínky nejen pro odpovídající kvalitu prováděného výzkumu, ale i odpovědnému užití laboratorních zvířat.

Typickými příklady alternativních postupů jsou např.:

IRE - The Isolated Rabbit Eye (IRE) Test Method

Princip metody: metoda IRE, používá králičí oči, získané z jatečních králíků na porážecím místě.

Před použitím je oko vyšetřeno, pomocí šterbinové lampy a fluoresceinu, poškozené oči musí být vyřazeny. Oko je odebráno a připevněno do speciálního držáku tak, aby rohovka byla umístěna ve vertikální poloze. Oko je dále umístěno do speciální komůrky, kde je udržována předepsaná teplota a jednou za minutu je oko zvlhčeno jednou kapkou fyziologického roztoku. Tím je oko udržováno v aktivovaném stavu. Testované látky, negativní a pozitivní kontroly jsou aplikovány přímo na rohovku. Pro každou látku jsou použity tři oči. Poškození rohovky je zjišťováno vyšetřením pomocí šterbinové lampy v různých časových intervalech. Dále je zjišťován otok rohovky pomocí hloubkového měřicího příslušenství nebo ultrazvukového pachymetru (také v různých časových intervalech) a jako poslední parametr je zjišťován průchod fluoresceinu. Jednotlivé parametry jsou vyhodnoceny samostatně. Z těchto parametrů je pak proveden konečný výpočet k určení potenciálu dráždivosti pro každou látku.

HET-CAM - The Hen's Egg Test - Chorionallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method

Princip metody: potenciální dráždivost látek je detekována pozorováním změn na chorionalantoidní membráně slepičího vejce po expozici testovanou chemikálií.

Látka je aplikována přímo na chorionalantoidní membránu slepičího vejce po dobu 5 minut. Po tuto dobu je sledován čas, potřebný k poškození membrány. Po ukončení expozice je membrána vyšetřena na cévní poškození. Podle intenzity a rychlosti vzniku poškození je odvozena dráždivost testované látky. Metoda je velmi náročná na standardizaci kvality vajec – fertilita a schopnost líhnutí (10 – 15 % vajec je nutno vyřadit z důvodu infertility, 20 – 30 % vajec pro nahodilé léze.). Nevýhodou je subjektivní povaha vyhodnocení.

Test oční dráždivosti na trojrozměrném modelu lidské tkáně (EpiOcular™)

EpiOcular™ – umělá lidská kožní tkáň, jejímž základem jsou lidské kožní buňky, kultivované na plastové matrici.

Princip metody: testovaný materiál je nanesen na povrch trojrozměrného modelu rohovky sestávajícího z normálních epidermálních keratinocytů kultivovaných do formy vrstevnatého šupinatého epitelu podobně jako v rohovce. Následně je zjišťován účinek látky na životnost buněk. Cytotoxicita je vyjádřena jako redukce aktivity mitochondriální dehydrogenázy měřením aktivity tvorby formazanu z MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Testované látky jsou umístěny na stratum corneum epidermálního modelu ve 3 různých expozičních časech. Expozice je ukončena omytím fosfátovým pufrům. Poté jsou tkáně inkubovány s MTT (žlutá tetrazoliová sůl). Pokud buňky zůstaly živé, MTT je v mitochondriích redukována sukcinát dehydrogenázou na modrofialový formazanový precipitát. Ten je pak z buněk vyextrahován isopropanolem a kvantifikován spektrofotometricky (při 540 nebo 570 nm). Výsledkem je číselná hodnota tzv., životaschopnost buněk.

ICE – The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method

OECD Test Guideline No. 438 Isolated Chicken eye (ICE) Test Method for identifying Ocular Corrosives and severe irritants . Adopted September 7, 2009.

Princip metody: test na izolovaném kuřecím oku je *in vitro* metoda, která může být použita pro klasifikaci chemických látek resp. oční leptavosti/dráždivosti. Metoda ICE používá oči z jatečních kuřat získaných na porážecím místě. Oko je odebráno a připevněno do držáku tak, aby rohovka byla umístěna vodorovně. Testované látky, negativní a pozitivní kontroly jsou aplikovány přímo na rohovku. Poškození rohovky je měřeno jako kvalitativní stanovení

opacity, kvalitativní stanovení poškození epitelu založené na uchování fluoresceinu, kvantitativní měření zesílení (otoku) a kvalitativní hodnocení makroskopického poškození povrchu. Výsledky jsou vyhodnoceny odděleně a tvoří třídy ICE pro každý výsledek, dále jsou kombinovány k určení potenciálu dráždivosti pro každou látku.

BCOP – The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method

OECD Test Guideline No. 437 Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for identifying Ocular Corrosives and severe irritants . Adopted September 7, 2009.

Princip metody: test BCOP je organotypický model, který zajistí krátkodobé udržení normální fyziologické a biochemické funkce hovězí rohovky *in vitro*. V tomto testu je poškození rohovky testovanou látkou zjištěno kvantitativními měřeními změn permeability (propustnosti pro fluorescein - UV/VIS pomocí spektrofotometru) a opacity (propustnost pro světlo – měřené opacitometrem) izolované hovězí rohovky. Obě měření jsou pak použity pro výpočet IVIS (*in vitro* irritancy score), pomocí něhož je přiřazena kategorie dráždivosti pro odhad *in vivo* očního dráždivého potenciálu testované látky (6) OECD Test Guideline No. 437 - Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosive and Severe Irritants, Adopted 7th September 2009, (7) OECD DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, May 2009, (8) INVITTOX Protocol 124: The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd., UK.

V současné době jsou vyvinuty desítky podobných metod pro řadu vlastností, problémem však zůstává skutečnost, že řada z nich není dosud validována a zařazeno do portfolia uznaných testovacích metod. Dalším problémem pak je skutečnost, že v řadě případů se jedná o mimořádně technicky náročné metody, které vyžadují profese, které nejsou v běžných toxikologických pracovištích obvyklé, dále pak nutnost pořizování nových, často velmi komplikovaných a nákladných zařízení. To je důvodem, proč jsou uvedené zkoušky v praxi těžko dostupné, např. v ČR je v povinném režimu SLP provádí jediné pracoviště.

PŘÍLOHA č. 1**PŘEDEPSANÉ ÚDAJE A METODY JEJICH EXPERIMENTÁLNÍHO ZÍSKÁVÁNÍ**

V dalším je krátký popis jednotlivých zkušebních metod a podmínky jejich aplikace dle nařízení REACH (9) Nařízení komise (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek.

INFORMACE O FYZIKÁLNĚ – CHEMICKÝCH VLASTNOSTECH LÁTKY**Stav látky při 20 °C a 101,3 kPa (State of the substance at 20 °C and 101,3 kPa)****Bod tání nebo tuhnutí (Melting/Freezing point)**

Metoda: A.1 Bod tání/bod tuhnutí (A.1 Melting/Freezing temperature)

Identická metoda: OECD No.102: Melting Point /Melting Range

Princip, definice:

Bod tání je definován jako teplota, při níž dochází za atmosférického tlaku k přechodu z tuhého do kapalného skupenství a která za ideálních podmínek odpovídá bodu tuhnutí. Vzhledem k tomu, že u mnoha látek dochází k fázovému přechodu v rozmezí teplot, je toto rozmezí často nazýváno rozmezím bodu tání.

Podstata zkušebních metod:

Stanovuje se teplota (teplotní rozmezí) fázového přechodu z tuhého do kapalného skupenství nebo z kapalného do tuhého skupenství. V praxi se při zahřívání/ochlazování vzorku zkušební látky za atmosférického tlaku stanoví teploty počátku tání/tuhnutí a konce tání/tuhnutí. Výběr metody závisí na povaze látky, která má být zkoumána. Omezením je skutečnost, zda lze danou látku rozmělnit na prášek snadno, obtížně nebo zda ji nelze rozmělnit. Je popsáno 5 typů metod:

a/ Kapilární metoda, kdy je látka v kapiláře postupně zahřívána v kapalinové lázni (uvedeno v normě JIS K 0064), nebo v kovovém bloku (uvedeno v normě ISO 1218(E)), nebo se v kovovém válci detekuje přechod z tuhé fáze do kapalné fotočlánkem.

b/ Metody používající zahřívací bloky, kdy je látka přímo nanesena na tzv. Koflerův stolek (uvedeno v normě ANSI/ASTM D 345176) nebo na tavící mikroskop (uvedeno v normě DIN 53736) či se použije menisková metoda vhodná pro polyamidy (uvedeno v normě ISO 1218 (E)).

c/ Stanovení bodu tuhnutí, kdy se vzorek za míchání ochlazuje a zaznamenává se teplota (uvedeno např. v normě BS 4695).

d/ Metody termické analýzy, kdy je zkoušená látka podrobena řízenému teplotnímu programu. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna zaznamenána jako endotermická (tání) nebo exotermická (tuhnutí) odchylka od základní linie záznamu teploty. Zaznamenává se buď teplotní rozdíl mezi zkoušenou a referenční látkou (DTA – Diferenční termická analýza) nebo rozdíl energie absorbované danou látkou a referenční látkou jako funkce teploty (DSC – Diferenční skenovací kalorimetrie). Obě metody jsou uvedeny v normě ASTM E 53776.

e/ Stanovení bodu tekutosti, který se stanovuje tak, že se vzorek po počátečním zahřátí určitou rychlostí ochlazuje a v určitých intervalech se stanovuje jeho tekutost. Nejnižší teplota, při níž je ještě pozorován pohyb látky, se zaznamená jako bod tekutosti. Uvedeno v normě ASTM D 9766.

Zatímco metody uvedené pod body a/, b/ a c/ jsou použitelné pro rozsah teplot přibližně od -20 °C do 300 °C, je použitelnost metody uvedena pod bodem e/ pouze od -50 °C do 50 °C. Metody termické analýzy (viz bod d/) je možné použít pro široký rozsah teplot od -100 °C do 1000 °C.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést pod hranicí -20 °C.

Bod varu (Boiling point)

Metoda: A.2 Bod varu (A.2 Boiling temperature)

Identická metoda: OECD No.103: Boiling Point

Princip, definice:

Standardní bod varu je definován jako teplota, při které je tlak par dané kapaliny roven 101,325 kPa. Bod varu se uvádí s ohledem na okolní tlak při měření.

Podstata zkušebních metod:

Metoda popisuje 6 hlavních metod stanovení bodu varu.

a/ Stanovení ebulliometrem, kdy je kapalina zahřívána za rovnovážných podmínek při atmosférickém tlaku, dokud nezačne vřít. Uvedeno v normě ASTM D 112072.

b/ Dynamická metoda, kdy se měří teplota kondenzace páry vhodným teploměrem umístěným za varu ve zpětném toku (refluxu). U této metody lze měnit tlak.

c/ Destilační metoda, kdy se kapalina destiluje a zjišťuje se teplota kondenzace páry, přičemž se stanovuje také množství destilátu. Využívá se při zjišťování rozmezí bodu varu. Uvedeno v normách ISO / R 918, DIN 53171, BS 4591/71.

d/ Postup podle Siwoloboffa, kdy se vzorek zahřívá ve zkumavce, která je ponořena do tepelné lázně. Do zkumavky se vzorkem je zasunuta zatavená kapilára, v jejíž spodní části se nachází vzduchová bublinka. Krátce před dosažením bodu varu začnou z varné kapiláry rychle unikat bublinky. Bodu varu je dosaženo, když při ochlazování náhle ustane unikání bublinek a kapalina začne v kapiláře stoupat. Příslušný údaj na teploměru je bodem varu látky.

e/ Detekce fotočlánkem, kdy se vzorek vyhřívá v kapiláře v kovovém bloku. Otvory v bloku se vede světelný paprsek tak, aby procházel látkou na přesně kalibrovaný fotočlánek. Při zvyšování teploty vzorku stoupají z kapiláry jednotlivé vzduchové bublinky. Při dosažení bodu varu počet bublinek značně vzroste. To vede ke změně intenzity světla zaznamenané fotočlánkem a vyvolá signál v měřicím přístroji, kterým se zastaví zaznamenávání teploty měřené platinovým odporovým teploměrem umístěným v bloku. Tato metoda je zvláště vhodná, protože umožňuje stanovení teplot nižších než laboratorní teplota až do -20 °C bez jakékoli úpravy přístroje. Pouze je třeba umístit přístroj v chladicí lázni.

f/ Metody termické analýzy, kdy je zkoušená látka podrobena řízenému teplotnímu programu. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato

změna zaznamenána jako endotermická (var) odchylka od základní linie záznamu teploty. Zaznamenává se buď teplotní rozdíl mezi zkoušenou a referenční látkou (DTA – Diferenční termická analýza) nebo rozdíl energie absorbované danou látkou a referenční látkou jako funkce teploty (DSC - Diferenční skenovací kalorimetrie). Obě metody jsou uvedeny v normě ASTM E 53776.

Zatímco metody uvedené pod body a/, b/, c/, d/, e/ jsou použitelné pro teploty přibližně do 330 °C, jsou metody termické analýzy (viz bod f/) použitelné až do teplot 1000 °C.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést

- *pro plyny nebo*
- *pro pevné látky, které tají při teplotách vyšších než 300 °C nebo se před dosažením bodu varu rozkládají.*

V těchto případech je možné odhadnout nebo změřit bod varu při sníženém tlaku nebo

- *pro látky, které se rozkládají před dosažením bodu varu (např. autooxidace, přeskupení, rozklad atd.).*

Relativní hustota (Relative density)

Metoda: A.3 Relativní hustota (A.3 Relative Density)

Identická metoda: OECD No.109: Density of Liquids and Solids

Princip, definice:

Relativní hustota D_4^{20} tuhých látek nebo kapalin je poměr mezi hmotností určitého objemu zkoumané látky stanovenou při 20 °C a hmotností stejného objemu vody stanovenou při 4 °C. Relativní hustota nemá rozměr. Hustota látky ρ je podíl hmotnosti látky a jejího objemu.

Podstata zkušebních metod:

Používají se 4 skupiny metod:

a/ Vztlakové metoda, využívající

- hustoměrů (pro kapaliny), kdy se měří hloubka ponoření hustoměru do kapaliny (uvedeno v normách ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050),
- hydrostatických vah (pro kapaliny a tuhé látky), kdy se zjišťuje rozdíl mezi hmotností stanovenou na vzduchu a ve vhodné kapalině (uvedeno v normách ISO 901 a 758),
- metody ponořené kuličky (pro kapaliny), kdy se zjišťuje rozdíl váhy kapaliny před ponořením kuličky známého objemu a po něm (uvedeno v normě DIN 53217).

b/ Pyknometrická metoda, kdy se hustota zjišťuje z rozdílu výsledků vážení plného a prázdného pyknometru a z jeho známého objemu. Používá se pro tuhé látky (ISO 3508, ISO 1183(B), NF T 20053) a kapaliny (ISO 758).

c/ Metoda vzduchového srovnávacího pyknometru, kdy se měří objem látky ve vzduchu v kalibrovaném válci a hmotnost se zjišťuje vážením. Používá se pro tuhé látky (uvedeno v normě DIN 55999, část 2 a DIN 53243),

d/ Metoda s oscilačním densimetrem, kde mechanický oscilátor konstruovaný ve tvaru U-trubice se rozkmitá na rezonanční kmitočet, který závisí na jeho hmotnosti. Po vložení vzorku se rezonanční kmitočet oscilátoru změní. Aparaturu je nutné kalibrovat dvěma kapalinami o známé hustotě. Metoda se používá pro kapaliny.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, je-li látka

- *stabilní pouze v roztoku v určitém rozpouštědle a hustota roztoku je podobná hustotě rozpouštědla. V těchto případech stačí uvést, zda je hustota roztoku vyšší nebo nižší než hustota rozpouštědla nebo - plyn. V tomto případě je nutné provést odhad na základě výpočtu z molekulové hmotnosti a zákonů ideálního plynu.*

Tlak par (Vapour pressure)

Metoda: A.4 Tlak par (A.4 Vapour Pressure)

Identická metoda: OECD No.104: Vapour Pressure

Princip, definice:

Tlak par látky je definován jako tlak nasycené páry nad tuhou nebo kapalnou látkou. Při termodynamické rovnováze je tlak par čisté látky pouze funkcí teploty. Jednotkou tlaku v soustavě SI je pascal (Pa). Další běžně používané jednotky jsou:

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

$$1 \text{ fyzikální atmosféra (atm)} = 1,013 \cdot 10^5 \text{ Pa}$$

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

Podstata zkušebních metod:

Je navrženo 7 metod, které lze používat v různých oblastech hodnot tlaku par. Každou z metod se stanovuje tlak par při různých teplotách. V omezeném rozsahu teplot je logaritmus tlaku par čisté látky nepřímo úměrný teplotě.

a/ Dynamická metoda – kdy se měří teplota varu při dané teplotě. Doporučený rozsah použití je 10^3 až 10^5 Pa.

b/ Statická metoda, kdy se měří tlak par, který se ustaví při termodynamické rovnováze v uzavřeném systému při dané teplotě. Tato metoda je vhodná pro jednosložkové a vícesložkové tuhé látky a kapaliny. Doporučený rozsah použití je 10 až 10^5 Pa. Uvedeno v normě NF T 20048.

c/ Metoda isoteniskopu, což je statická metoda, použitelná pouze pro jednosložkové systémy.

Doporučený rozsah použití je 100 až 10^5 Pa. Uvedeno v normě ASTM D 287986.

d/ Efusní metoda, s použitím vah pro měření tlaku par, kdy se ve vakuu stanoví množství látky, které opustí měřicí celu za časovou jednotku otvorem známé velikosti tak, že může být zanedbán návrat látky do měřicí cely. Doporučený rozsah použití je 10^{-3} až 1 Pa. Uvedeno v normě NF T 20047.

e/ Efusní metoda s měřením hmotnostního úbytku nebo měření záchytem parní fáze, kdy se stanovuje hmotnost par zkušební látky unikající za jednotku času z Knudsenovy komůrky mikrodýzou za podmínek vysokého vakua. Hmotnost difundujících par může být zjištěna buď

stanovením úbytku hmotnosti komůrky nebo kondenzací par při nízké teplotě a stanovením jejich množství chromatografickou analýzou. Doporučený rozsah použití je 10^{-3} až 1 Pa.

f/ Metoda nasycení plynu, kdy se nad látkou vede proud inertního nosného plynu tak, že se nasytí jejími párami. Množství látky, které se přenesení známým množstvím nosného plynu, lze stanovit zachycením ve vhodném lapači nebo průtokovou analytickou technikou. Z něho se vypočte tlak par při dané teplotě. Doporučený rozsah použití je 10^{-4} až 1 Pa.

g/ Metoda rotujícího tělíska, kdy je malá rotující ocelová kulička zavěšena v magnetickém poli. Tlak plynu se odvozuje ze zpomalení ocelové kuličky, která je závislá na tlaku plynu. Doporučený rozsah použití je 10^{-4} až 0,5 Pa.

Stanovení tlaku par kteroukoli z výše popsaných metod by se mělo provést nejméně při dvou teplotách. Aby se ověřil lineární průběh křivky tlaku par v oblasti teplot od 0 °C do 50 °C, doporučuje se měření při třech nebo více teplotách.

Pro určení vhodnosti výše uvedených metodik se používá metoda odhadu, kterou je vhodné provést před volbou metodiky a při předpokládaném velmi nízkém tlaku par sledované látky (obvykle $< 10^{-5}$ Pa), kdy je experimentální provedení obtížné.

Tlak par kapalin a tuhých látek může být odhadnut pomocí modifikovaného Watsonova korelačního vztahu, přičemž k výpočtu je třeba pouze jeden experimentální údaj a to je bod varu za normálního tlaku. Odhad tlaku par lze obvykle pomocí komerčních výpočetních programů. Informace lze nalézt např. na:

www.acdlabs.com (software ACD/I-lab: Advance Chemistry Development Inc., Canada)
<http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm> (software EPI Suite: Estimation Program Interface).

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, je-li bod tání vyšší než 300 °C.

Je-li bod tání mezi 200 °C a 300 °C, postačuje mezní hodnota stanovená na základě měření nebo uznávanou metodou výpočtu.

Povrchové napětí (Surface tension)

Metoda: A.5 Povrchové napětí (A.5 Surface Tension)

Identická metoda: OECD No.115: Surface Tension of Aqueous Solutions

Princip, definice:

Povrchové napětí je definováno jako povrchová volná enthalpie vztažená na jednotku povrchu. Povrchové napětí se vyjadřuje v těchto jednotkách: $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ (v soustavě SI) nebo $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (odvozená jednotka v soustavě SI).

Přepočet na jiné používané jednotky:

$$1 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1} = 103 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-1}$$

$$1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1} = 1 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-1}$$

Podstata zkušebních metod:

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

Látky, jejichž rozpustnost ve vodě dosahuje hodnoty alespoň $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, se zkoušejí ve vodných roztocích při jedné koncentraci.

Měření se provádí za těchto podmínek:

- koncentrace roztoku v destilované vodě by měla být 90% koncentrace nasyceného roztoku,
- pokud koncentrace nasyceného roztoku přesáhne $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, použije se k měření roztok o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$,
- pro látky, jejichž rozpustnost je menší než $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, měření není nutné provést.

Používané metody:

a/ Destičková metoda - uvedena v metodě ISO 304 a NF T 73060

b/ Třmínková metoda - uvedena v metodě ISO 304 a NF T 73060

c/ Prstencová metoda - uvedena v metodě ISO 304 a NF T 73060

d/ Harmonizovaná prstencová metoda OECD - je odvozena od metod ISO 304-1985, DIN 53914, ASTM-D-1590 a ASTM-D-1331.

Pravidla REACH

Studii je nutné provést, pouze pokud

- *lze na základě struktury povrchové napětí předpokládat nebo je lze předvídat nebo*
- *je povrchové napětí žádanou vlastností materiálu.*

Je-li rozpustnost ve vodě menší než 1 mg/l při 20 °C, není nutné zkoušku provést.

Rozpustnost ve vodě (Water solubility)

Metoda: A.6 Rozpustnost ve vodě (A.6 Water Solubility)

Identická metoda: OECD No.105: Water Solubility

Princip, definice:

Rozpustnost látky ve vodě je definována hmotnostní koncentrací jejího nasyceného roztoku ve vodě při dané teplotě. Rozpustnost ve vodě se udává v jednotkách hmotnosti na objem roztoku. Jednotkou v soustavě SI je $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (může se také používat $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$).

Podstata zkušebních metod:

Používají se 2 metody, které pokrývají celý rozsah rozpustnosti, nejsou však použitelné pro těkavé látky. Před určením vhodnosti metody je nutné provést jednoduchou předběžnou zkoušku rozpustnosti - k navážce látky se postupně přidává určené množství destilované vody a rozpustnost se zjišťuje vizuálně. Podle výsledků předběžné zkoušky se použije metoda:

a/ Sloupcová eluční metoda se používá pro rozpustnost $< 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

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

b/ Baňková metoda se používá pro rozpustnost $> 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

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

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

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, je-li látka

- *hydrolyticky nestálá při pH 4, 7 a 9 (poločas rozpadu kratší než 12 hodin) nebo*
- *ve vodě snadno oxidovatelná.*

Jeví-li se látka ve vodě „nerozpustná“, provede se limitní zkouška až do limitu analytické metody.

Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (Partition coefficient n-octanol/water)

Metoda: A.8 Rozdělovací koeficient (A.8 Partition Coefficient)

Identické metody: OECD No.107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method

OECD No.117: Partition Coefficient (n-octanol/water): HPLC Method

Princip, definice:

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

$$P_{o/v} = \frac{c_{oktan-1-ol}}{c_{voda}}$$

Rozdělovací koeficient je poměrem dvou koncentrací a je obvykle udáván ve formě logaritmu ($\log P_{o/v}$).

Podstata zkušebních metod:

Používají se 2 metody ke stanovení rozdělovacího koeficientu.

a/ Metoda třepací láhve se používá tehdy, je-li hodnota $\log P_{o/v}$ v rozmezí -2 až 4. Je použitelná pouze pro látky, které se rozpouštějí ve vodě a n-oktanolu. Pro stanovení rozdělovacího koeficientu musí být dosaženo rovnováhy mezi všemi vzájemně působícími složkami systému a musí být stanoveny koncentrace látek rozpuštěných v obou fázích. K řešení tohoto problému se používá nejčastěji důkladné promíchání obou fází a jejich následné oddělení za účelem stanovení rovnovážných koncentrací vyšetřované látky.

b/ Metoda HPLC se používá tehdy, je-li rozdělovací koeficient $\log P_{o/v}$ v rozmezí 0 až 6. Metoda je méně citlivá na přítomnost nečistot. Nelze ji použít pro silné kyseliny a zásady, komplexní sloučeniny kovů, povrchově aktivní látky a látky, které reagují s eluentem.

HPLC se provádí na analytických kolonách plněných komerčně dostupnou pevnou fází obsahující dlouhé uhlovodíkové řetězce (např. C8, C18) chemicky vázané na oxid křemičitý. Chemické látky nastříknuté do této kolony se v ní pohybují různou rychlostí v důsledku různých stupňů rozdělení mezi mobilní fází a uhlovodíkovou stacionární fází. Směsi chemikálií se eluují v pořadí své hydrofobnosti, přičemž se látky rozpustné ve vodě eluují jako první a látky rozpustné v olejích jako poslední, úměrně svému rozdělovacímu

koeficientu. To umožňuje určit vztah mezi retenčním časem v této koloně (s reversními fázemi) a rozdělovacím koeficientem n-oktanol/voda. Rozdělovací koeficient se odvodí z kapacitního faktoru k , daného výrazem:

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

kde t_R = retenční čas zkušební látky, t_0 = průměrná doba, kterou molekula rozpouštědla potřebuje k průchodu kolonou (mrtvá doba).

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

Za účelem korelace hodnot naměřených pro danou sloučeninu metodou HPLC s její hodnotou P je nutné sestavit kalibrační graf závislosti $\log P$ na chromatografických datech tvořený nejméně 6 referenčními body. Vhodné referenční látky zvolí uživatel. Pokud je to možné, měla by mít alespoň jedna referenční látka $P_{o/v}$ vyšší než zkušební látka a jiná referenční látka $P_{o/v}$ nižší než zkušební látka. U hodnot $\log P$ nižších než 4 může být kalibrace založena na údajích získaných metodou třepací lahve. U hodnot $\log P$ vyšších než 4 může být kalibrace založena na ověřených hodnotách z literatury, pokud jsou v souladu s vypočtenými hodnotami. Za účelem dosažení vyšší přesnosti je vhodnější volit látky, které mají podobnou strukturu jako zkušební látka.

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

Před rozhodnutím, zda použít metodu třepací lahve či HPLC, se obvykle provádí předběžný odhad na základě výpočtu. Všechny výpočtové metody jsou založeny na formálním dělení molekul do vhodných podstruktur, pro něž jsou známy spolehlivé hodnoty přírůstků $\log P_{o/v}$.

Hodnota $\log P_{o/v}$ celé molekuly se poté vypočte jako součet hodnot pro příslušné fragmenty plus součet korekčních členů pro intramolekulární interakce.

Při výpočtech lze použít komerčně dostupných výpočetních programů – např. www.acdlabs.com (software ACD/I-lab: Advance Chemistry Development Inc., Canada)

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud se jedná o anorganickou látku. Pokud zkoušku nelze provést (např. látka se rozkládá, má vysokou povrchovou aktivitu, během zkoušky silně reaguje nebo se nerozpouští ve vodě nebo oktanolu, nebo není možné získat dostatečně čistou látku), uvede se vypočtená hodnota $\log P$ a podrobné údaje o metodě výpočtu.

Bod vzplanutí (Flash - point)

Metoda: A.9 Bod vzplanutí (A.9 Flash-Point)

Princip, definice:

Bod vzplanutí je nejnižší teplota t (°C) korigovaná na tlak 101,325 kPa, při které kapalina za podmínek definovaných ve zkušebních metodách uvolňuje páry v takovém množství, že se z nich ve zkušebním kelímku při smíchání se vzduchem vytvoří výbušná směs.

Pro převod absolutní teploty T (K) na °C platí vztah: $t = T - 273,15$.

Kapalná látka nebo přípravek se vpraví do zkušební kelímku, v němž se zahřívá nebo chladí na zkušební teplotu podle postupu popsaného v jednotlivé zkušební metodě. Ke zjištění, zda vzorek při zkušební teplotě vzplane či nevzplane, se provádějí zkoušky zapálením.

Používá se velké množství metod, jsou to metody buď rovnovážné nebo nerovnovážné.

a/ rovnovážné zkušební metody – používají se metody uzavřeného kelímku, jsou uvedeny v normách ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

b/ nerovnovážné zkušební metody – používají se následující zkušební zařízení:

- zkušební zařízení podle Abela (v uzavřeném kelímku), jsou uvedeny v normách BS 2000 část 170, NF M07-011, NF T66-009,
- zkušební zařízení dle Abela-Penskyho (v uzavřeném kelímku), jsou uvedeny v normách EN 57, DIN 51755 část 1 (pro teploty 5 to 65 °C), DIN 51755 část2 (pro teploty pod 5 °C), NF M07-036,
- zkušební zařízení podle Taga (uvedeno v normě ASTM D 56),

- zkušební zařízení podle Penskyho-Martense (v uzavřeném kelímku), jsou uvedeny v normách ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud

- *látka je anorganická nebo*
- *látka obsahuje pouze prchavé organické složky s bodem vzplanutí nad 100 °C pro vodné roztoky nebo*
- *odhadovaný bod vzplanutí je nad 200 °C nebo*
- *bod vzplanutí lze přesně předpokládat na základě interpolace ze stávajících popsanych materiálů.*

Hořlavost (Flammability)

Metoda: A.10 Hořlavost (pevné látky) (A.10 Flammability (solids))

Princip, definice:

Látka nebo přípravek se zformují do tvaru neporušeného pásku nebo prachové housenky o délce 250 mm. Provede se předběžná orientační zkouška ke zjištění, zda po zapálení zkušebního vzorku plamenem plynového hořáku nastane šíření plamene nebo žhnutí. Pokud se hoření za předepsanou dobu (2 nebo 5 minut podle typu materiálu) rozšíří na 200 mm délky zkušebního vzorku, provede se řádná zkouška ke stanovení rychlosti hoření.

Doba hoření je doba, za kterou odhoří 100 mm vzorku za podmínek zkoušky; vyjadřuje v sekundách (s). Rychlost hoření je vyjádřena délkou odhořelého vzorku v milimetrech za sekundu a je vypočtena z doby hoření; vyjadřuje se ($\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$).

Tato metoda se používá pouze pro práškovité, zrnité a pastovité látky a přípravky.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést,

- *jedná-li se o pevnou látku s výbušnými nebo samozápalnými vlastnostmi. Tyto vlastnosti je vždy nutné zvážit před posouzením hořlavosti nebo*
- *pro plyny, je-li koncentrace hořlavého plynu ve směsi s netečnými plyny natolik nízká, že při smísení se vzduchem je koncentrace stále pod mezní hodnotou nebo*
- *pro látky, které se samovolně zapalují při kontaktu se vzduchem.*

Výbušné vlastnosti (Explosive properties)

Metoda: A.14 Výbušné vlastnosti (A.14 Explosive properties)

Princip, definice:

Za výbušnou látku se považuje taková chemická látka nebo chemický přípravek, která je schopna vybuchnout působením tepla nebo která z hlediska možnosti vybuchnout je citlivá na náraz nebo na tření.

Podstata zkušební metody:

Látka se podrobí následujícím zkouškám

a) zkouška citlivosti na působení tepla

Při této zkoušce se látka zahřívá v ocelové trubce uzavřené clonami. Zjišťuje se, zda je látka náchylná k výbuchu za podmínek intenzivního zahřívání a předepsaného utěsnění.

b) zkouška citlivosti na náraz

Při této zkoušce se látka zkouší závažím předepsané hmotnosti, které se spouští z předepsané výšky.

c) zkouška citlivosti na tření

Při této zkoušce se pevná nebo pastovitá látka zkouší třením mezi standardními povrchy za předepsaných podmínek zatížení a vzájemného pohybu. U kapalin se zkouška třením neprovádí.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud

- *v molekule nejsou žádné chemické skupiny s výbušnými vlastnostmi nebo*
- *látka obsahuje chemické skupiny s výbušnými vlastnostmi s obsahem kyslíku a vypočtená kyslíková bilance je méně než -200 nebo*
- *organická látka nebo homogenní směs organických látek obsahuje chemické skupiny s výbušnými vlastnostmi, avšak energie exotermního rozkladu je méně než 500 J/g a začátek exotermního rozkladu je při teplotě nižší než 500° C, nebo*
- *u směsi anorganických oxidantů (podtřída UN 5.1) s organickými materiály, koncentrace anorganického oxidantu je*
- *nižší než 15 % hmotnostních, pokud patří do balící skupiny UN I (vysoká nebezpečnost) nebo II (střední nebezpečnost)*
- *nižší než 30 % hmotnostních, pokud patří do balící třídy UN III (malá nebezpečnost).*

Poznámka: Nevyžaduje se zkouška šíření výbuchu ani zkouška citlivosti na detonační rázové vlny, je-li energie exotermního rozkladu nižší než 800 J/g.

Bod samozápalu (Self-ignition temperature)

Metoda: A.16 Relativní bod samozápalu pevných látek (A.16 Relative Self-ignition Temperature for Solids)

Princip, definice:

Účelem této metody je poskytnout informaci o vznětlivosti pevných látek nebo přípravků za zvýšených teplot. Relativní teplota vznícení je minimální teplota pícky, při které určité

množství látky nebo přípravku za definovaných podmínek dosáhne samovolně 400 °C a vznítí se; vyjadřuje se ve °C.

Podstata zkušební metody:

Vzorek zkoušené látky se při pokojové teplotě vloží do pícky. Zaznamenává se křivka teplota - čas, vztahující se na podmínky ve středu zkušebního vzorku, zatímco teplota pícky se zvyšuje rychlostí 0,5 °C min⁻¹ do 400 °C nebo na teplotu bodu tání vzorku (pokud je nižší).

Pravidla REACH

Studii není nutné provést,

- *je-li látka výbušná nebo se samovolně zapaluje na vzduchu při pokojové teplotě nebo*
- *pro kapaliny, které jsou na vzduchu nehořlavé, např. pokud mají bod vzplanutí nad 200 °C nebo*
- *pro nehořlavé plyny nebo*
- *pro pevné látky s bodem tání < 160 °C, nebo pokud předběžné výsledky vylučují vlastní zahřívání látky do 400 °C.*

Oxidační vlastnosti (Oxidising properties)

Metoda: A.17 Oxidační vlastnosti (pevné látky) (A.17 Oxidising Properties (Solids))

Princip, definice:

Oxidační vlastnosti mají látky nebo přípravky

- a) u nichž je při předběžné zkoušce zjištěna prudká reakce, nebo
- b) jejichž maximální rychlost hoření je stejná nebo vyšší v porovnání s maximální rychlostí hoření referenční směsi celulózy a dusičnanu barnatého.

Rychlost hoření se vyjadřuje v mm·s⁻¹.

Maximální rychlost hoření je nejvyšší hodnota z rychlostí hoření, které byly naměřeny na směsích obsahujících 10 % hm. až 90 % hm. oxidantu.

Doba hoření je doba reakce v sekundách potřebná k průchodu reakční zóny zkušebním vzorkem podle striktně předepsaného postupu.

Podstata zkušební metody:

Prokáže-li se předběžnou zkouškou, že látka nebo přípravek nemají oxidační vlastnosti, provádí se rozhodčí zkouška.

Při rozhodčí zkoušce se látka nebo přípravek a definovaná hořlavá látka (celulosa) mísí v různých poměrech. Každá směs je poté zformována do zkušebního vzorku, který se na jednom konci zapálí. Stanovená maximální rychlost hoření se porovná s maximální rychlostí hoření referenční směsi.

Metoda: A.21 Oxidační vlastnosti kapalin (A.21 Oxidising Properties (Liquids))

Princip, definice:

Kapalina je smíšena v poměru 1:1 s vláknitou celulosou a umístěna do tlakové nádoby. Pokud se testovaná látka při mísení nebo plnění vznítí, další testování se neprovádí. V případě, že nedojde ke spontánnímu vznícení, pak se provádí plný test. Směs se zahřívá v nádobce a stanovuje se průměrná doba nutná ke zvýšení tlaku z 690 kPa do 2070 kPa. Hodnota se srovnává s hodnotou průměrného času směsi 1:1 celulosy a referenční látky (65% kyselina dusičná).

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, je-li látka

- *výbušná nebo*
- *vysoce hořlavá nebo*
- *organický peroxid nebo*
- *neschopná exotermicky reagovat s hořlavými materiály, například na základě chemické struktury (např. organické látky, které neobsahují atomy kyslíku nebo halogenu a tyto prvky nejsou chemicky vázané na dusík nebo kyslík, nebo anorganické látky, které neobsahují atomy kyslíku nebo halogenu).*

Úplné zkoušky není nutné provádět pro pevné látky, pokud předběžná zkouška jednoznačně ukazuje, že testovaná látka má oxidační vlastnosti.

Pokud neexistuje zkušební metoda k určení oxidačních vlastností plynných směsí, musí se vyhodnocení těchto vlastností provést metodou odhadu na základě srovnání oxidačního potenciálu plynů ve směsi s oxidačním potenciálem kyslíku ve vzduchu.

Granulometrie (Granulometry)

Metoda: TG EUR 20268 EN (2002) OECD No.110: Particle Size Distribution /Fibre Length and Diameter Distributions

Princip, definice:

Granulometrie (rozdělení velikosti částic) je metoda, při které se stanoví velikost částic látky která je ve formě vlákna, prášku nebo granulí.

Používané metody:

Metody je možné rozdělit podle toho, v jaké je látka formě.

a/ Metody, při kterých se zjišťuje se rozdělení velikosti částic u látky ve formě, jaká je.

Používají se následující metody.

- Mikroskopické, které jsou použitelná pro částice všeho druhu o velikosti 0,01 – 5000 mikronů. Jsou vhodné pro měření velikosti částic, které jsou respirovatelné a inhalovatelné.
- Prosevací, které jsou použitelné pro suché prášky a granule o velikosti 5 - 10 000 mikronů. Je vhodná pro měření inhalovatelných částic.
- Sedimentační, které jsou vhodné pro suché prášky a granule. Jsou založeny na sedimentaci částic v kapalině. Jsou použitelné pro velikost částic 1 – 1000 mikronů a vhodné pro měření respirovatelných a inhalovatelných částic.
- Coulter metody, které jsou vhodné pro suché prášky a granule. Jsou použitelné pro vzorky suspendované v elektrolytických roztocích, vhodné pro velikost částic 2 – 200 mikronů. Použitelné pro měření respirovatelných a inhalovatelných částic.

- PDA (Phase Doppler Anemometry) metody, které jsou vhodné pro suché prášky a granule. Tyto metody jsou nákladné, rozdělení velikosti částic lze stanovit ve vzduchu (0,5 – 80 mikronů) nebo v kapalině (0,5 – 500 mikronů).
- Metody pro stanovení rozdělení délky vlákna a průměru, které se používají pro vlákna průměru 0,1 – 100 mikronů a délky 5 – 300 mikronů. Metody jsou vhodné pro stanovení velikosti vláken respirovatelné a inhalovatelné velikosti.

U všech uvedených metod v odstavci a/ nemůže být stanoven MMAD (Mass Median Average Diametre), který je charakteristickou hodnotou pro rozdělení velikosti částic.

b/ Metody, při kterých se zjišťuje rozdělení velikosti částic polétavých, dispergovaných nebo rozprášených.

Tyto metody potřebují vhodné generační zařízení pro tvorbu částic. Používají se následující metody.

- Kaskádové stlačení, použitelné pro velikost částic 0,1 – 20 a 0,5 – 80 mikronů a pro všechny typy částic.
- Laserová difrakce, použitelná pro velikost částic 0,1 – 100 mikronů a pro všechny typy částic. Velikost částic je určena opticky.

Metody kaskádového stlačení a laserové difrakce umožňují stanovit MMAD.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud se látka uvádí na trh nebo používá v nepevném stavu nebo ve formě granulí.

Stálost v organických rozpouštědlech a určení příslušných produktů rozkladu

(Stability in organic solvents and identity of relevant degradation products)

Pravidla REACH

Vyžaduje se pouze tehdy, považuje-li se stálost látky za rozhodující. Studii není nutné provést, pokud se jedná o anorganickou látku.

Disociační konstanta (Dissociation constant)

Metoda: OECD No.112: Dissociation Constants in Water

Princip, definice:

Disociace je reversibilní rozštěpení chemické látky na 2 nebo více složek, které mají iontový charakter. Stanovení disociační konstanty vyžaduje měření koncentrací disociované a nedisociované formy látky. Ze znalostí stechiometrie disociační reakce lze stanovit disociační konstantu. V případech, kdy se látka chová jako kyselina nebo báze, provádí se stanovení koncentrací ionizované a neionizované formy a měření pH roztoku.

K analýze se nejčastěji používají metody titrační, spektrofotometrické a metody konduktometrické.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud

- *je látka hydrolyticky nestálá (poločas rozpadu kratší než 12 hodin) nebo je ve vodě snadno oxidovatelná nebo*
- *z vědeckých důvodů není možné zkoušku provést, například pokud analytická metoda není dostatečně citlivá.*

Viskozita (Viscosity)

Metoda: OECD No.114: Viscosity of Liquids

Princip, definice:

Viskozita je veličina charakterizující vnitřní tření a závisí především na přitažlivých silách mezi částicemi. Kapaliny s větší přitažlivou silou mají větší viskozitu, větší viskozita znamená větší *brzdění* pohybu kapaliny nebo těles v kapalině.

Dynamická viskozita je veličina, udávající poměr mezi tečným napětím a změnou rychlosti v závislosti na vzdálenosti mezi sousedními vrstvami při proudění skutečné kapaliny. Jednotkou viskozity je v soustavě SI Pascal·sec (Nsm^{-2}), značka Pa s.

Tekutost je převrácená hodnota dynamické viskozity.

Kinematická viskozita je podíl dynamické viskozity a hustoty kapaliny. Jednotkou je $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Používané metody:

a/ Kapilární viskozimetr umožňuje měřit kinematickou viskozitu v rozsahu $0,5 - 10^5$ mPa s (metoda uvedena v normě ISO 3014).

b/ Průtokový viskozimetr umožňuje měřit kinematickou viskozitu v rozsahu $8 - 700$ mPa s (metoda uvedena v normě ISO 3015).

c/ Rotační viskozimetr umožňuje měřit dynamickou viskozitu v rozsahu $10 - 10^9$ mPa s (metoda uvedena v normě ISO 3218.2).

d/ Viskozimetr s valící se kuličkou (Höpplerův) umožňuje měřit dynamickou viskozitu v rozsahu $0,5 - 10^5$ mPa s (metoda uvedena v normě DIN 53015).

e/ Viskozimetr s taženou kuličkou umožňuje měřit dynamickou viskozitu v rozsahu $0,5 - 10^7$ mPa s (metoda uvedena v normě DIN 52007, část 2).

TOXIKOLOGICKÉ INFORMACE

Kožní dráždivost nebo leptavé účinky na kůži (Skin irritation or skin corrosion)

Posouzení zahrnuje tyto postupné kroky:

- 1) posouzení dostupných údajů o účincích na člověka a zvířata,
- 2) posouzení kyselé nebo alkalické rezervy,
- 3) studie *in vitro* týkající se leptavých účinků na kůži,
- 4) studie *in vitro* týkající se kožní dráždivosti.

Metody in vitro týkající se leptavých účinků na kůži: B.40 Leptavé účinky na kůži *in vitro*: Zkouška transkutánního elektrického odporu (TER) (B.40 *In vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER))

Identická metoda: OECD No.430: *In vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)

Princip, definice:

Transkutánní elektrický odpor (TER): je mírou elektrické impedance kůže, vyjádřenou hodnotou elektrického odporu v kiloohmech. Jednoduchá a robustní metoda posouzení bariérové funkce, která spočívá ve sledování průchodu iontů kůží užitím Wheatstoneova můstku.

Podstata zkušební metody:

Zkoušený materiál je aplikován až 24 hodin na epidermální stranu terčičků kůže ve dvoukomorovém zkušebním systému, ve kterém terčičky kůže oddělují obě komory. Terčičky kůže jsou odebrány z humánně usmrcených potkanů starých 28 – 30 dní. Materiály s leptavými účinky jsou identifikovány schopností způsobit ztrátu normální integrity a bariérové funkce rohovité vrstvy (stratum corneum), která je měřena jako snížení vlastního TER pod určitou prahovou úroveň.

Pro potkany byla vybrána jako hraniční hodnota TER 5 k Ω a to na základě rozsáhlých údajů pro široké spektrum chemických látek, pro něž hodnota TER v převážné většině případů byla

buď značně nad (často $> 10 \text{ k}\Omega$), nebo značně pod (často $< 3 \text{ k}\Omega$) touto hraniční hodnotou. Všeobecně platí, že materiály, které nejsou žíravé pro zvířata, ale jsou dráždivé nebo nedráždivé, nesnižují TER pod tuto hraniční hodnotu.

B.40a Leptavé účinky na kůži *in vitro*: Zkouška pomocí modelu lidské kůže (B.40 bis. *In vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test)

Identická metoda: OECD No 431: *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test

Princip:

Zkoušený materiál je aplikován na trojrozměrný model lidské kůže sestávající se přinejmenším z rekonstruované epidermis a funkční rohovité vrstvy (stratum corneum). Materiály s leptavými účinky jsou identifikovány schopností způsobit při specifikované expoziční době pokles životaschopnosti buněk (stanovený např. použitím zkoušky redukce vitálního barviva MTT) pod definovanou prahovou úroveň. Podstata stanovení pomocí modelu lidské kůže je založena na hypotéze, že chemické látky s leptavými účinky jsou ty, jež jsou schopny proniknout rohovitou vrstvou (stratum corneum) difuzí nebo erozí a jsou cytotoxické pro buňky v hlubších buněčných vrstvách.

Modely lidské kůže lze vyrobit nebo získat komerčně (např. modely EpiDermTM a EPISKINTM).

Provedení zkoušky:

Testované materiály jsou umístěny na stratum corneum epidermálního modelu (jeden vzorek (koncentrace) na epidermis) ve 2 expozičních časech. Expozice je ukončena omytím fosfátovým puforem. Poté jsou tkáně inkubovány s MTT (žlutá tetrazoliová sůl). Pokud jsou buňky živé, MTT je v mitochondriích redukován sukcinát dehydrogenázou na modrý formazanový precipitát. Ten je přes noc z buněk vyextrahován okyseleným isopropanolem a kvantifikován spektrofotometricky.

Vyhodnocení leptavých účinků se provádí na základě životnosti tkáně ve formě % absorbance z negativní kontroly.

Metody *in vitro* týkající se kožní dráždivosti

Byly validovány 2 metody na modelech lidské kůže – EpiDerm™ a EPISKIN™ a jsou připraveny k zařazení do metodik EU.

Princip:

Princip metody je stejný jako u kožní leptavosti – testovaný materiál se nanáší na povrch trojrozměrného modelu lidské kůže sestávající z rekonstruované epidermis s funkční stratum corneum. Následně se zjišťuje účinek látky na životnost buněk. Cytotoxicita je vyjádřena jako redukce aktivity mitochondriální dehydrogenázy měřením aktivity tvorby formazanu z MTT.

Modely lidské kůže lze vyrobit nebo získat komerčně (např. modely EpiDerm™ a EPISKIN™).

Provedení zkoušky:

Testované materiály jsou umístěny na stratum corneum epidermálního modelu (jeden vzorek (koncentrace) na epidermis) ve 2 expozičních časech. Expozice je ukončena omytím fosfátovým pufrům. Poté jsou tkáně inkubovány 42 hod (uvolnění zánětlivých intermediátorů). Po preinkubaci se tkáně inkubují s MTT (žlutá tetrazoliová sůl). Pokud jsou buňky živé, MTT je v mitochondriích redukován sukcinát dehydrogenázou na modrý formazanový precipitát. Ten je přes noc z buněk vyextrahován okyseleným isopropanolem a kvantifikován spektrofotometricky. Vyhodnocení dráždivých účinků se provádí na základě životnosti tkáně ve formě % absorbance z negativní kontroly.

Jako pomocný parametr se také zjišťuje interleukin IL-1 α , který je hlavním spínačem spuštění zánětu a je uvolňován z porušených buněk při poruše membrány.

Pravidla REACH

Kroky 3 a 4 není nutné provádět, pokud

- *dostupné informace naznačují, že jsou splněna kritéria pro klasifikaci jako látka s leptavými účinky na kůži nebo dráždící oči, nebo*
- *látka je hořlavá na vzduchu při pokojové teplotě nebo*
- *látka je klasifikována jako velmi toxická při styku s kůží nebo*

- studie akutní toxicity dermální cestou nenaznačuje kožní dráždivost až do mezní hodnoty dávky (2 000 mg/kg tělesné hmotnosti).

Kožní dráždivost *in vivo* (In vivo skin irritation)

Metoda: B.4 Akutní toxicita: Dráždivé a leptavé účinky na kůži (B.4 Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion)

Identická metoda: OECD No.404: Acute Dermal Irritation/Corrosion

Princip metody:

Látka se v jedné dávce nanese na kůži pokusného zvířete, přičemž oblasti neexponované kůže pokusného zvířete slouží jako kontrola. Ve stanovených intervalech se určí, vyhodnotí a následně popíše stupeň dráždivých/leptavých účinků, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost pozorovaných účinků. Pokusná zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení nebo bolesti, se humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí.

Definice:

Dráždivé účinky na kůži: vyvolání vratných změn na kůži do 4 h po aplikaci zkoušené látky.

Leptavé účinky na kůži: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážít histopatologie.

Provedení:

Provádí se na albinotických králících, použije se maximálně tři zvířata. Asi 24 h před zahájením zkoušky se pokusným zvířatům ostříhá srst na zádech. Zkoušená látka se nanese na malou plochu kůže (asi 6 cm²) a pokryje se plátkem mulu s nedráždivou náplastí. V případech, kdy přímá aplikace není možná (např. kapaliny nebo některé pasty), by se měla zkoušená látka nejprve nanést na plátek mulu, který se následně přiloží na kůži. Na testovací

místo se nanese 0,5 ml kapaliny nebo 0,5 g tuhé látky nebo pasty. Po dobu trvání expozice je třeba přidržovat plátek volně na kůži vhodným semiokluzivním obvazem.

Po uplynutí doby expozice, která je obvykle 4 h, se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo vhodným rozpouštědlem, aniž by došlo k ovlivnění odezvy nebo celistvosti kůže.

Všechna pokusná zvířata se pozorují na příznaky erytému a edému a reakce kůže se hodnotí po 60 min a dále po 24, 48 a 72 h po odstranění náplasti se zkoušenou látkou. V počáteční zkoušce na jednom pokusném zvířeti se po odstranění náplasti okamžitě vyšetří také testovací místo. Kožní reakce se vyhodnotí a zaznamenají podle stupnice.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud

- *je látka klasifikována jako látka s leptavými účinky na kůži nebo jako dráždiví kůži nebo*
- *je látka silně kyselá ($pH < 2,0$) nebo zásaditá ($pH > 11,5$) nebo*
- *je látka hořlavá na vzduchu při pokojové teplotě nebo*
- *je látka klasifikována jako velmi toxická při styku s kůží nebo*
- *studie akutní toxicity dermální cestou nenaznačuje kožní dráždivost až do mezní hodnoty dávky (2 000 mg/kg tělesné hmotnosti).*

Oční dráždivost (Eye irritation)

Posouzení této sledované vlastnosti zahrnuje tyto postupné kroky:

- 1) posouzení dostupných údajů o účincích na člověka a zvířata,
- 2) posouzení kyselé nebo alkalické rezervy,
- 3) studie *in vitro* týkající se oční dráždivosti.

Metody in vitro týkající se oční dráždivosti

Metody jsou v procesu validace. Jako příklad je uvedena metoda stanovení oční dráždivosti *In vitro* Eye Irritation - Model EpiOcular™ (fa Matek, USA).

Princip metody:

Testovaný materiál se nanese na povrch trojrozměrného modelu umělé tkáně EpiOcular™ pocházející z lidských keratinocytů kultivovaných do podoby vrstevnatého dlaždicovitého epitelu podobného tomu v lidské rohovce. Následně se zjišťuje účinek látky na životnost buněk. Cytotoxicita je vyjádřena jako redukce aktivity mitochondriální dehydrogenázy měřením aktivity tvorby formazanu z MTT (vitálního barviva).

Provedení:

Testované materiály jsou umístěny na povrch modelu (jeden vzorek (koncentrace)) na epidermis) ve 3 expozičních časech. Poté jsou tkáně inkubovány při 37 °C, s 5% CO₂ ve 3 časových intervalech – 3 , 30 a 60 minut. Současně jsou ošetřeny i tkáně inkubované s pozitivní (Triton X-100) a negativní kontrolou (destilovaná voda). Expozice je ukončena omytím fosfátovým pufrem. Poté jsou tkáně umístěny do MTT média a jsou opět ponechány 3 hodiny v CO₂ inkubátoru. Pokud jsou buňky živé, MTT je v mitochondriích redukován sukcinát dehydrogenázou na modrý formazanový precipitát. Po 3 hodinách se tkáně opět omyjí pufrem a formazan je extrahován okyseleným isopropanolem buď 2 hodiny za třepání, nebo přes noc.

Vyhodnocení testu se provádí tak, že se v intervalech spočítá % životnosti vzhledem k negativní kontrole. Výsledkem testu je hodnota ET-50 (padesátiprocentní životnost), která se stanoví lineární interpolací mezi dvěma body, jedním, který přesahuje 50% životnost a jedním, který nedosahuje 50% životnosti.

Pravidla REACH

Krok 3 není nutné provést, pokud

- dostupné informace naznačují, že jsou splněna kritéria pro klasifikaci jako látka s leptavými účinky na kůži nebo dráždicí oči, nebo*
- látka je hořlavá na vzduchu při pokojové teplotě.*

Oční dráždivost *in vivo* (In vivo eye irritation)

Metoda: B.5 Akutní toxicita: Dráždivé/leptavé účinky na oči (B.5 Acute toxicity: Eye Irritation/Corrosion)

Identická metoda: OECD No.405: Acute Eye Irritation/Corrosion

Princip metody:

Látka se nanese v jedné dávce na jedno oko pokusného zvířete, přičemž neexponované oko slouží jako kontrola. V určitých intervalech se na základě určení lézí spojivky, rohovky a duhovky vyhodnotí stupeň dráždivých/leptavých účinků na oči. Popíše se také jiné účinky na oko a nežádoucí systémové účinky, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost účinků.

Definice:

Dráždivé účinky na oči: vyvolání změn v oku po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Tyto změny jsou plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

Leptavé účinky na oči: vyvolání poškození oční tkáně nebo závažné fyzické zhoršení vidění po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Toto poškození není plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

Provedení:

Provádí se na albinotických králících, použije se maximálně tři zvířata.

Zkoušená látka se aplikuje každému pokusnému zvířeti do spojivkového vaku jednoho oka. Druhé oko, do kterého se látka neaplikuje, slouží jako kontrola. Oči pokusných zvířat se do 24 hodin po instilaci zkoušené látky nevyplachují, s výjimkou pevných látek nebo v případě okamžitých leptavých nebo dráždivých účinků.

Oči se vyšetří po 1, 24, 48 a 72 h po podání zkoušené látky.

Pokusná zvířata, u nichž oční léze nevzniknou, nelze utratit dříve než 3 dny po instilaci. Pokusná zvířata s mírnými až středními lézemi se pozorují, dokud léze nevymizí, nebo po 21 dnů, po jejichž uplynutí se studie ukončí. Po 7, 14 a 21 dnech se provádí pozorování,

aby se určil stav lézí a jejich vratnost nebo nevratnost. Stupeň reakce oka (spojivek, rohovky a duhovky) se hodnotí podle stupnice a zaznamenává při každém vyšetření. Uvedou se také jakékoli jiné oční léze (např. panus, zbarvení) nebo nežádoucí systémové účinky.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, je-li látka

- *klasifikována jako dráždící oči s rizikem vážného poškození očí nebo*
- *klasifikována jako látka s leptavými účinky na kůži a za předpokladu, že ji žadatel o registraci klasifikoval jako látku dráždící oči, nebo*
- *silně kyselá ($pH < 2,0$) nebo zásaditá ($pH > 11,5$) nebo*
- *hořlavá na vzduchu při pokojové teplotě.*

Senzibilizace kůže (Skin sensitisation)

Posouzení této sledované vlastnosti zahrnuje tyto postupné kroky:

- 1) posouzení dostupných údajů o účincích na člověka, zvířata a alternativních údajů,
- 2) zkoušky *in vivo*

Metody týkající se zkoušek in vivo:

Metoda: B.42 Senzibilizace kůže: Zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (B.42 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay)

Identická metoda: OECD No.429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay

Princip metody:

Základní princip metody LLNA (Local Lymph Node Assay) spočívá v tom, že senzibilizátory navozují primární proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace chemické látky. Toto zmnožení je úměrné aplikované dávce (a potenciálu alergenu) a poskytuje jednoduchý prostředek pro získání objektivního, kvantitativního měření senzibilizace. LLNA hodnotí tuto proliferaci jako vztah dávka-odezva a za tímto účelem se porovnává proliferace ve zkušebních skupinách s proliferací u skupin, kterým se podává

vehikulum. Poměr proliferace u exponovaných skupin a u skupin s vehikulem, nazvaný index stimulace, musí být alespoň 3, než lze zkoušenou látku dále hodnotit jako možný senzibilizátor kůže. Metoda, popsaná dále, je založená na používání radioaktivního značení pro měření proliferace buněk. Pro hodnocení této proliferace je však možné použít i další koncová vyhodnocení, a to za předpokladu, že jsou zdůvodněná a existují pro ně vhodné vědecké důkazy, včetně úplných citací a popisu metodiky.

Provedení:

Používají se mladé dospělé samice myši z kmene CBA/Ca nebo CBA/J. Dávky se vybírají z řady koncentrací 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit již existující údaje o akutní toxicitě a kožní dráždivosti, jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, ale aby současně nevyvolala systémovou toxicitu a nadměrné podráždění kůže. Vehikulum by mělo být vybráno tak, aby se maximalizovaly zkušební koncentrace a rozpustnost k přípravě roztoku/suspenze vhodné pro aplikaci zkoušené látky.

Provede se otevřená aplikace 25 μ l příslušného ředění zkoušené látky, samotného vehikula nebo pozitivní kontrolní látky (podle vhodnosti) na dorsální část obou uší pokusného zvířete. To se opakuje druhý i třetí den. Šestý den se myším přes ocasní žílu vpíchne roztok [3H]thymidinu a o pět hodin později se myši usmrtí.

Drenující aurikulární lymfatické uzliny z obou uší se vyjmou a uloží se do PBS (fosfátovém pufru). Pak se připraví buněčná suspenze buněk lymfatických uzlin pomocí jemné mechanické deagregace. Lymfatické buňky se dvakrát propláchnou v dostatečném množství PBS a nechají se vysrážet v roztoku s 5 % trichloroctovou kyselinou (TCA) při 4°C po dobu 18 h. Stanoví se buněčná proliferace pomocí inkorporace [3H]thymidinu scintilační metodou a vyjádří se v rozpadech za minutu dpm.

Výsledky se vyjádří jako index stimulace (SI) skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Hodnota SI pro kontrolní skupiny s vehikulem je 1. Použití individuálního hodnocení při výpočtu SI umožňuje provést statistickou analýzu dat. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu si musí být experimentátor vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci dat nebo neparametrickou statistickou analýzu. Do rozhodování, zda jde o pozitivní odezvu, se zahrnuje index stimulace ≥ 3 a zohledňuje se závislost odezvy na dávce a popřípadě statistická významnost.

Poznámka:

Tato metoda vyžaduje vybudovat a udržovat specializované pracoviště pro práci s radioizotopy podle platné legislativy.

Další metody zkoušení senzibilizace in vivo:

Ve výjimečných případech, např. když je zkouška technicky neproveditelná, lze místo LLNA metody použít klasických metod zkoušení senzibilizačních účinků. Potom lze použít některou variantu z klasických metod určení senzibilizace, jak to uvádí metoda níže uvedená.

Metoda: B.6 Senzibilizace kůže (B.6 Skin Sensitisation)

Identická metoda: OECD No.406: Skin Sensitisation

Princip metody:

Pokusným zvířatům je nejdříve aplikována zkoušená látka intradermálními injekcemi a/nebo epidermální aplikací (indukční expozice). Po období klidu 10 až 14 dnů (indukční období), v průběhu kterého se může rozvinout imunitní reakce, je zvířatům aplikována provokační dávka. Rozsah a stupeň kožní reakce pokusných zvířat na provokační expozici je porovnáván s rozsahem a stupněm reakce u kontrolních zvířat, která podstoupí negativní expozici v průběhu indukce a je jim aplikována provokační dávka.

Byly vyvinuty dva typy zkoušek na morčatech:

- zkoušky s adjuvanty, ve kterých je alergický stav umocněn rozpuštěním nebo suspendováním zkoušené látky ve Freundově kompletním adjuvantu (FCA) – nejrozšířenější zkouškou je Maximalizační zkouška na morčatech (Guinea Pig Maximisation Test – GPMT)
- zkoušky bez adjuvantů (např. Bühlerova zkouška).

Pravidla REACH

Krok 2 není nutné provést, pokud

- *dostupné informace naznačují, že by látka měla být klasifikována pro senzibilizaci kůže nebo leptavé účinky na kůži, nebo*

- látka je silně kyselá ($pH < 2,0$) nebo zásaditá ($pH > 11,5$) nebo
- látka je hořlavá na vzduchu při pokojové teplotě.
- Zkouška s vyšetřením lokálních mízních uzlin (*Murine Local Lymph Node Assay (LLNA)*) je první metodou, která se volí pro zkoušky *in vivo*. Pouze ve výjimečných případech by se měly použít jiné zkoušky. Použití jiné zkoušky se odůvodní.

Mutagenita (Mutagenicity)

Definice:

Termín *mutagenita* se vztahuje k indukci trvalých přenosných změn v množství nebo struktuře genetického materiálu buněk nebo organismů. Tyto změny (*mutace*) mohou postihnout jediný gen nebo segmenty genů, blok genů nebo celé chromozómy. Účinky na celé chromozómy se mohou projevovat změnou jejich struktury a/nebo počtu.

Metody:

Mutagenní aktivita látky se stanoví

a/ *in vitro* testy

- testy na genové (bodové) mutace v bakteriích (viz dále kapitola 8.4.1) nebo
- testy na strukturální chromozómové aberace v savčích buňkách (viz dále kapitola 8.4.2) nebo
- testem genových mutací v savčích buňkách (viz dále kapitola 8.4.3).

b/ *in vivo* testy

- mikronukleus test nebo
- metafázní analýza chromozomů buněk kostní dřeně.

***In vivo* mikronukleus test**

Metoda: B.12 Mutagenita – Test savčích erytrocytárních mikrojadér *in vivo* (B.12 Mutagenicity – *In vivo* Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test)

Identická metoda: OECD No.474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test

Princip:

Zvířata (obvykle potkani – 50 samců a 50 samic) jsou exponována (perorálně) testované látky. Ve vhodnou chvíli se usmrtí (po 24 a 48 hod) a izolovaná kostní dřev se izoluje a připraví se preparáty, které jsou selektivně obarveny. V preparátech se detekují mikrojádra, která vznikají poruchami dělení během mitózy, v polychromních erythrocytech. Výsledkem cytogenetického poškození je kromě vzniku i změna v poměru zralých a nezralých erythrocytů v kostní dřev.

Pravidla REACH

V případě pozitivních výsledků testů in vitro se zváží další studie mutagenity.

Je-li výsledek některé ze studií in vitro genotoxicity (viz dále 8.4.1, 8.4.2 a 8.4.3) pozitivní, je nutno provést zkoušku in vivo u somatických buněk, a to v závislosti na kvalitě a významu dostupných údajů.

Je-li k dispozici pozitivní výsledek studie in vivo somatických buněk, měla by se na základě všech dostupných údajů, včetně toxikokinetických důkazů, zvážit mutagenita v zárodečných buňkách. Není-li možné učinit jasný závěr ohledně mutagenity v zárodečných buňkách, zváží se další zkoumání.

Studie genových mutací u bakterií in vitro (In vitro gene mutation study in bacteria)

Metoda: B.13/14 Mutagenita – zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (B.13/14 Mutagenicity: Reverse Mutation Test Using Bacteria)

Identická metoda: OECD No.471: Bacterial Reverse Mutation Test

Princip metody:

Při bakteriálním testu reverzních mutací (často nazýván Amesův test) se používají k detekci genových mutací kmeny

- *Salmonella typhimurium* (auxotrofní ve vztahu k aminokyselině histidin) a
- *Escherichia coli* (auxotrofní ve vztahu k aminokyselině tryptofan).

Pomocí uvedených systémů lze detekovat genové mutace vzniklé mechanismem substituce, adice nebo delecce jednoho nebo několika nukleotidů v chromozómu indikátorových bakteriálních kmenů. Princip bakteriálního testu reverzních mutací spočívá v tom, že se zjišťují mutace, které zpětně vracejí mutace přítomné v testovacím kmenu do původního stavu a obnovuje se funkční schopnost bakterie syntetizovat určitou základní aminokyselinu. Takto změněná bakteriální buňka je detekována na základě své schopnosti růst za nepřítomnosti aminokyseliny, kterou vyžaduje mateřský zkušební kmen.

Provedení:

Suspenze bakteriálních buněk se vystaví působení testované látky za přítomnosti a za nepřítomnosti exogenního systému metabolické aktivace. Při klasické miskové metodě "plate incorporation" se suspenze smísí s vrchním agarem a vylije na misky s minimální živnou půdou. Při preinkubační metodě se pokusná směs inkubuje a smísí s vrchním agarem a až potom se očkuje na minimální živnou půdu. Při obou metodách se dva až tři dny po inkubaci revertantní kolonie spočítají a výsledek se porovná s počtem spontánně revertujících kolonií na kontrolních miskách s rozpouštědlem.

Použije se minimálně pět bakteriálních kmenů, které budou zahrnovat čtyři kmeny *S. typhimurium* (TA1535; TA1537 nebo TA97a nebo TA97; TA98; a TA100); u nichž byla prokázána spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků mezi různými laboratořemi. Doporučená inkubační teplota činí 37 °C.

Bakterie se působení testované látky vystaví jak za přítomnosti, tak za nepřítomnosti vhodného systému metabolické aktivace. Nejčastěji se používá kofaktorem suplementovaná post-mitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců po indukci enzymů látkami jako je Aroclor 1254 nebo kombinace fenobarbitalu a β -naftoflavonu.

Používá se minimálně pět různých analyzovatelných koncentrací se zhruba póllogaritmickým intervalem mezi jednotlivými body. Doporučená maximální pokusná koncentrace je u rozpustných necytotoxických látek 5 mg/misku.

Každý test musí zahrnovat i souběžnou kmenově specifickou pozitivní (pozitivní mutageny) a negativní (rozpouštědlo nebo vehikulum) kontrolu, jak s metabolickou aktivací, tak bez ní.

Vyhodnocení a interpretace výsledků

Výsledky se prezentují jako počet revertantních kolonií na jednu misku. Rovněž se uvede počet revertantních kolonií jak z negativní kontroly (rozpouštědlo, popřípadě kontrola bez působení, byla-li použita), tak z kontroly pozitivní. Pro testovanou látku i pro pozitivní a negativní kontrolu (resp. bez působení rozpouštědla) se uvedou počty pro jednotlivé misky a průměrný počet revertantních kolonií na jednu misku včetně směrodatné odchylky.

Negativní výsledky se doporučuje potvrdit opakovaným experimentem. Pokud se potvrzení negativních výsledků nepovažuje za nutné, je třeba to zdůvodnit. V následných experimentech je třeba zvážit modifikaci experimentálních parametrů jako je koncentrace testované látky, metoda působení ("plate incorporation" nebo preinkubace v tekutém prostředí) a podmínky metabolické aktivace.

Ke stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, například dávkově závislý nárůst ve sledovaném rozmezí a/nebo reprodukovatelný nárůst počtu revertantních kolonií na jednu misku při jedné nebo více koncentracích u minimálně jednoho kmene s metabolickým aktivačním systémem nebo bez něj. Jako první se uvažuje biologická relevance výsledků. Jako pomůcku při vyhodnocování výsledků testu je možno využít statistické metody, statistická významnost by však neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní reakci. Testovaná látka, jejíž výsledky výše uvedená kritéria nesplňují, se v tomto testu považuje za nemutagenní.

Studie cytogenetických účinků na buňkách savců *in vitro* nebo *in vitro* mikronukleus test

(*In vitro* cytogenetic study in mammalian cells or *in vitro* micronucleus study)

Metoda: B.10 Mutagenita – zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro* (B.10 Mutagenicity – *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test)

Identická metoda: OECD No.473: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test

Princip metody:

Buněčné kultury se vystaví působení testované látky, a to s metabolickou aktivací a bez ní. Ve stanovených intervalech po expozici buněčné kultury testované látce, se metafáze zastaví

například Colcemidem® nebo kolchicinem, buňky se sklídí, obarví se a v metafázických buňkách se mikroskopicky zjišťují chromozómové aberace.

Provedení:

Je možno použít celou řadu buněčných linií, kmenů nebo primárních buněčných kultur, včetně buněk lidských (například fibroblasty čínské křečka nebo lymfocyty periferní krve člověka či jiného savce).

K udržování kultur je třeba používat vhodná kultivační média a inkubační podmínky (kultivační nádoby, koncentrace CO₂, teplota a vlhkost). Je třeba znát normální dobu buněčného cyklu a kultivační podmínky.

Na buňky se testovanou látkou působí v přítomnosti i v nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Nejobvyklejší je kofaktory suplementovaná mitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců, ovlivněná činidly indukujícími enzymy jako je Aroclor 1254, nebo směs fenobarbitalu a β-naftoflavonu.

Mezi kritéria, jež se uvažují při stanovování nejvyšší koncentrace, patří cytotoxicita, rozpustnost v systému a změny pH resp. osmolality. Je vhodné stanovit cytotoxicitu a rozpustnost v předběžných experimentech.

Je třeba použít minimálně tři analyzovatelné koncentrace. Dochází-li k cytotoxicitě, musí tyto koncentrace pokrývat rozsah od maximální do nízké nebo nulové toxicity. U relativně necytotoxických látek činí maximální koncentrace testované látky nejnižší z hodnot 5 μl/ml, 5 mg/ml nebo 0,01M.

Do každého experimentu, ať již s metabolickou aktivací nebo bez ní, je třeba zařadit souběžné pozitivní (známé klastogeny) a negativní kontroly (rozpouštědlo, nebo vehikulum).

Na proliferující buňky se působí testovanou látkou za přítomnosti i nepřítomnosti metabolického aktivačního systému. V případě lymfocytů je třeba začít působit asi 48 hodin po stimulaci mitogenem. Buňky se vystaví testované látce s metabolickou aktivací i bez ní po dobu 3 - 6 hodin a vzorky se odebírají v čase odpovídajícím zhruba 1,5-násobku normální délky buněčného cyklu od začátku expozice.

Na buněčné kultury se působí Colcemidem® nebo kolchicinem obvykle po dobu 1 – 3 hodin před ukončením kultivace. Každá buněčná kultura se pro přípravu chromozómů zpracovává zvlášť. Příprava chromozómů (preparátů pro mikroskopické hodnocení) sestává z ovlivnění buněk hypotonickým roztokem, fixace a obarvení.

Pro každou koncentraci a kontrolu je třeba hodnotit minimálně 200 dobře rozprostřených metafází, stejnoměrně z obou kultur, pokud byly použity. V případě, že je počet aberací vysoký, může se počet analyzovaných metafází snížit.

Vyhodnocení a interpretace výsledků:

Jelikož experimentální jednotkou je buňka, je třeba vyhodnotit procento buněk se strukturálními chromozómovými aberacemi. Je třeba registrovat jednotlivé typy strukturálních aberací včetně jejich počtu a četnosti u experimentálních i kontrolních kultur. Současně je třeba v testu zaznamenávat také zjištěnou cytotoxicitu v experimentálních i kontrolních kulturách.

Pravidla REACH

Studii není obvykle nutné provést,

- *jsou-li k dispozici patřičné údaje ze zkoušky cytogenetických účinků in vivo nebo,*
- *je látka známa jako karcinogenní kategorie 1 nebo 2 nebo mutagenní kategorií 1, 2 nebo 3.*

Studie genových mutací na buňkách savců in vitro

(In vitro gene mutation study in mammalian cells)

Metoda: B.17 Mutagenita – Zkouška na genové mutace v buňkách savců *in vitro* (B.17 Mutagenicity – *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test)

Identická metoda: OECD No.476: *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test

Princip metody:

Princip metody: Buňky, deficientní na thymidinkinázu (TK⁻) v důsledku mutace, jsou rezistentní vůči cytotoxickému působení pyrimidinového analogu trifluorthymidinu (TFT).

Buňky produkující thymidinkinázu (TK⁺) jsou vůči TFT citlivé, což způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavuje další buněčné dělení. Za přítomnosti TFT proto mohou proliferovat mutované buňky, zatímco normální buňky, obsahující thymidinkinázu, proliferovat nemohou.

Provedení:

Lze použít celou řadu typů buněk, přičemž musí být prokázána citlivost vůči chemickým mutagenům, vysoká klonovací účinnost a stabilní frekvence spontánních mutací. Na proliferující buňky se působí testovanou látkou jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Použijí se minimálně čtyři analyzovatelné koncentrace. V rámci každého experimentu se musejí provést i souběžné pozitivní a negativní (rozpuštědlo, vehikulum) kontroly, a to jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Expozice probíhá po vhodnou dobu (obvykle je účinná doba 3-6 hodin). Doba expozice může přesáhnout jeden nebo více buněčných cyklů.

Frekvence mutantů se stanoví inokulací známého počtu buněk v médiu obsahujícím selekční činidlo pro detekci mutovaných buněk (TFT) a v médiu bez tohoto činidla, ke stanovení klonovací účinnosti (cloning efficiency), (životnosti). Mutační frekvence se vyjadřuje jako počet mutovaných buněk dělený počtem přežívajících buněk.

Vyhodnocení a interpretace výsledků:

Jako podklady slouží výsledky stanovení cytotoxicity a životnosti, počty kolonií a mutační frekvence u experimentálních a kontrolních kultur. Verifikace zjevně pozitivní reakce se nepožaduje. Nejednoznačné a negativní výsledky se objasňují dalším testováním, nejlépe za modifikovaných experimentálních podmínek.

Pozitivní výsledky testu na genové mutace v savčích buňkách *in vitro* ukazují, že testovaná látka vyvolává v kultuře savčích buněk genové mutace. Negativní výsledky ukazují, že za daných experimentálních podmínek testovaná látka v kultuře savčích buněk nevyvolává genové mutace.

Pravidla REACH

Studie se provádí:

- *pokud jsou výsledky studie genových mutací in vitro (viz 8.4.1) a výsledky studie cytogenetických účinků na buňkách savců in vitro nebo in vitro mikronukleus test (viz 8.4.2) negativní.*

Studie se obvykle neprovádí:

- *jsou-li k dispozici patřičné údaje ze spolehlivé zkoušky mutagenity in vivo na savcích.*

Studie genových mutací na buňkách savců in vitro (In vitro gene mutation study in mammalian cells)

Metoda: B.17 Mutagenita – Zkouška na genové mutace v buňkách savců *in vitro* (B.17 Mutagenicity – *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test)

Identická metoda: OECD No.476: *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test

Princip metody:

Princip metody: Buňky, deficientní na thymidinkinázu (TK^-) v důsledku mutace, jsou rezistentní vůči cytotoxickému působení pyrimidinového analogu trifluorthymidinu (TFT). Buňky produkující thymidinkinázu (TK^+) jsou vůči TFT citlivé, což způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavuje další buněčné dělení. Za přítomnosti TFT proto mohou proliferovat mutované buňky, zatímco normální buňky, obsahující thymidinkinázu, proliferovat nemohou.

Provedení:

Lze použít celou řadu typů buněk, přičemž musí být prokázána citlivost vůči chemickým mutagenům, vysoká klonovací účinnost a stabilní frekvence spontánních mutací. Na proliferující buňky se působí testovanou látkou jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Použijí se minimálně čtyři analyzovatelné koncentrace. V rámci každého experimentu se musejí provést i souběžné pozitivní a negativní (rozpuštědlo, vehikulum) kontroly, a to jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Expozice probíhá po vhodnou dobu (obvykle je účinná doba 3-6 hodin). Doba expozice může přesáhnout jeden nebo více buněčných cyklů.

Frekvence mutantů se stanoví inokulací známého počtu buněk v médiu obsahujícím selekční činidlo pro detekci mutovaných buněk (TFT) a v médiu bez tohoto činidla, ke stanovení klonovací účinnosti (cloning efficiency), (životnosti). Mutační frekvence se vyjadřuje jako počet mutovaných buněk dělený počtem přežívajících buněk.

Vyhodnocení a interpretace výsledků:

Jako podklady slouží výsledky stanovení cytotoxicity a životnosti, počty kolonií a mutační frekvence u experimentálních a kontrolních kultur. Verifikace zjevně pozitivní reakce se nepožaduje. Nejednoznačné a negativní výsledky se objasňují dalším testováním, nejlépe za modifikovaných experimentálních podmínek.

Pozitivní výsledky testu na genové mutace v savčích buňkách *in vitro* ukazují, že testovaná látka vyvolává v kultuře savčích buněk genové mutace. Negativní výsledky ukazují, že za daných experimentálních podmínek testovaná látka v kultuře savčích buněk nevyvolává genové mutace.

Pravidla REACH

Studie se provádí:

pokud jsou výsledky studie genových mutací in vitro (viz 8.4.1) a výsledky studie cytogenetických účinků na buňkách savců in vitro nebo in vitro mikronukleus test (viz 8.4.2) negativní.

Studie se obvykle neprovádí:

jsou-li k dispozici patřičné údaje ze spolehlivé zkoušky mutagenity in vivo na savcích.

Akutní toxicita (Acute toxicity)

Definice:

Akutní toxicita zahrnuje nepříznivé účinky, které se objeví během určité doby (většinou 14 dní) po podání jedné dávky chemické látky. Podle způsobu podání chemické látky se zjišťuje

a/ akutní orální toxicita, kdy je látka aplikována do žaludku pokusných zvířat (viz 8.5.1)

b/ akutní inhalační toxicita, kdy látka je aplikována inhalačním způsobem – pokusné zvíře je exponováno chemické látce, která je ve formě par nebo aerosolu (viz 8.5.2)

c/ akutní dermální toxicita, kdy látka je aplikována na kůži pokusných zvířat (viz 8.5.3).

Akutní toxicita je charakterizována následujícími hodnotami.

LD50 (střední smrtná dávka), což je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, která pravděpodobně způsobí za definovanou dobu smrt 50% zvířat, kterým byla podána. Hodnota LD50 se udává jako hmotnost testované látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti).

LC50 (střední smrtná koncentrace) je statisticky vypočtená koncentrace látky, která pravděpodobně způsobí smrt do určité doby po expozici u 50% pokusných zvířat, exponovaných po definovanou dobu. Hodnota LC50 se udává jako hmotnost testované látky ve standardním objemu vzduchu ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

V závislosti na toxicitě látky lze použít různých postupů od limitního testu až po kompletní stanovení hodnoty LD50. Pro inhalační toxicitu není limitní test definován.

Pravidla REACH

Studie není obecně nutné provést, pokud je látka klasifikována jako látka s leptavými účinky na kůži. Kromě orální cesty (8.5.1) se pro látky jiné než plyny uvede alespoň ještě jedna další cesta. Výběr druhé cesty závisí na povaze látky a na pravděpodobné cestě expozice člověka. Pokud existuje pouze jedna cesta expozice, poskytnou se informace jen pro tuto cestu.

Orální cestou (By oral route)

Metoda: B.1.a Akutní orální toxicita – metoda fixní dávky (B.1 bis. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure)

Identická metoda: OECD No.420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure

B.1.b Akutní orální toxicita – metoda stanovení třídy akutní toxicity (B.1 tris. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method)

Identická metoda: OECD No.423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method

Princip:

a/ Metoda fixní dávky

Jsou dány fixní dávky 5, 50, 300 a 2000 mg/kg. Nejprve se provede orientační pokus, kde je zvířatům podávána vybraná startovní dávka. Výchozí dávka se zvolí jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá toxicitu nebo uhynutí. Aplikace se provádí u jednoho zvířete a další zvíře je aplikováno až po vyhodnocení výsledku u prvního zvířete, maximálně je aplikováno pět zvířat. Pokud výsledek orientačního pokusu nepostačuje ke klasifikaci, látka je testována v hlavní studii na skupině dalších pěti zvířat. Těm je podávána vyšší nebo nižší dávka podle předchozích příznaků toxicity nebo uhynutí. Takto se pokračuje, dokud dávka nevyvolá zřejmou toxicitu nebo není pozorováno více než jedno uhynutí, anebo pokud nejsou při nejvyšší dávce zjištěny žádné účinky nebo pokud dochází k úhynům při nejnižší dávce.

b/ Metoda třídy akutní toxicity

Látka se skupině pokusných zvířat podává orálně v jedné ze stanovených dávek 5, 50, 300 a 2000 mg/kg. Zkouší se metodou po krocích, přičemž u každého kroku se používají tři pokusná zvířata stejného pohlaví (obvykle samice). Přítomnost nebo nepřítomnost mortality vyvolané látkou u pokusných zvířat, jimž byla látka podána v jednom kroku, rozhodne o dalším kroku, tj.:

- není třeba žádné další zkoušení,
- podá se stejná dávka dalším třem pokusným zvířatům,
- látka se podá dalším třem pokusným zvířatům v nejbližší vyšší nebo nejbližší nižší úrovni dávky.

Obě metody umožňují rozhodnout o zařazení zkoušené látky do jedné z řady tříd toxicity definovaných fixními hraničními hodnotami LD50. Obě metodiky používají k testování hlodavce, nejčastěji potkany. Pozorování a hodnocení stavu zvířat se děje okamžitě po aplikaci, dále po 4hod, pak po 24 hod po dobu 14 dní. Stanovuje se změna tělesné hmotnosti a patologické nálezy po pitvě.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, je-li k dispozici studie o akutní toxicitě inhalací (8.5.2)

Inhalací (By inhalation)

Metoda: B.2 Akutní toxicita (inhalační) (B.2 Acute Toxicity (Inhalation))

Identická metoda: OECD No.403: Acute Inhalation Toxicity

Princip:

Od metody orální toxicity se liší způsobem expozice a vyjádřením výsledku.

Pro pokusy se zvířaty je třeba použít inhalační zařízení, které umožňuje dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně dvanáctkrát za hodinu, aby byl zaručen přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Použije-li se expoziční box, je třeba ho konstruovat tak, aby se co nejvíce omezovalo shlukování zvířat a aby inhalační expozice testované látky byla maximální. Pro zajištění stability atmosféry v inhalačním boxu by neměl v zásadě celkový objem pokusných zvířat přesáhnout 5 % objemu boxu. Je také možné použít inhalační expozice orálně - nasální, samotné hlavy nebo individuální celotělové expozice; první dva způsoby expozice minimalizují příjem látky jinými cestami.

Zvířata se exponují se po dobu 4 hodin od ustavení rovnováhy koncentrace studované látky. Nastavení rovnováhy by mělo být rychlé. Teplota během pokusu má být $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Relativní vlhkost má být ideálně mezi 30 % a 70 %, s výjimkou případů, kde to není možné (např. experimenty s aerosoly). Udržování mírného podtlaku uvnitř komory (5 mm vodního sloupce) zabrání unikání testované látky do okolí. Během expozice se nepodává potrava ani voda. Používají se vhodné systémy pro vytvoření a monitorování testovací atmosféry. Konstrukce a provoz boxu má zajišťovat homogenní distribuci testované atmosféry v komoře. Je třeba zajistit měření nebo monitorování podmínek expozice.

Vyhodnocení a interpretace výsledků:

Má být dostatečný počet expozičních koncentrací, nejméně tři. Hodnotí se mortalita. Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na stres a bolesti vyvolané podanou

látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolané touto látkou. Nakonec se vypočte LC50 uznávanou metodou.

V rámci OECD jsou ve finálním stadiu přípravy alternativní metody s podobným provedením jako v případě akutní toxicity orální.

Pravidla REACH

Zkoušky inhalací jsou vhodné, je-li expozice člověka prostřednictvím inhalace pravděpodobná, přičemž se zohlední tlak par látky nebo možnost expozice aerosolům, částicím nebo kapénkám inhalovatelných rozměrů.

Dermální cestou (By dermal route)

Metoda: B.3 Akutní toxicita (dermální) (B.3 Acute Toxicity (Dermal))

Identická metoda: OECD No.402: Acute Dermal Toxicity

Princip:

Od metody orální toxicity se liší způsobem expozice a vyjádřením výsledku.

Testovaná látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. Pro vysoce toxické látky může být tato plocha menší; mělo by se však aplikovat stejnoměrně na co největší část této plochy. Testovaná látka je po expoziční dobu 24 hodin udržována v kontaktu s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Testovanou plochu je dále třeba vhodným způsobem překrýt, aby se mulový obvaz a testovaná látka fixovaly a aby se zabránilo orálnímu příjmu. K zamezení požití látky je možno použít i prostředků pro omezení volnosti pohybu, úplnou imobilizaci však nelze doporučit. Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky testované látky, pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem se provede očištění pokožky.

Vyhodnocení a interpretace výsledků:

Má být dostatečný počet dávkových úrovní, nejméně tři. Hodnotí se mortalita. Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na stres a bolesti vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolané touto látkou. Nakonec se vypočte LD50 uznávanou metodou.

V rámci OECD jsou ve finálním stadiu přípravy alternativní metody s podobným provedením jako v případě akutní toxicity orální.

Pravidla REACH

Zkoušky dermální cestou jsou vhodné, pokud

- 1) je inhalace látky nepravděpodobná a*
- 2) je pravděpodobný kontakt s kůží při výrobě nebo používání a*
- 3) z fyzikálně-chemických a toxikologických vlastností vyplývá potenciál pro značnou míru absorpce kůží.*

Toxicita po opakovaných dávkách

Definice:

Toxicita po opakované dávce (subakutní nebo subchronická toxicita) - zahrnuje nepříznivé účinky, které se objeví u pokusných zvířat v důsledku opakovaného denního podávání nebo expozice chemické látky, po dobu představující určitý úsek (desítky dnů) očekávané délky života příslušného živočišného druhu. Jako nejvyšší dávka v těchto studiích je doporučována MTD a účelem studie je určení dávky NOAEL.

Nejvyšší tolerovaná dávka (MTD - maximum tolerated dose) je nejvyšší dávka, která u zvířat vyvolává zřetelné projevy toxicity, avšak bez podstatného vlivu na přežití s ohledem na účinek, který je testován.

NOAEL („No Observed Adverse Effect Level“) je nejvyšší dávka nebo expoziční koncentrace látky, při které není pozorován žádný statisticky významný nepříznivý účinek na organismus v porovnání s kontrolní skupinou.

Chronická toxicita - zahrnuje nepříznivé účinky, které se objeví u pokusných zvířat v důsledku opakovaného denního podávání nebo expozice chemické látky, po dobu představující podstatnou část (řada měsíců až roky) očekávané délky života příslušného živočišného druhu.

Pravidla REACH

Vhodná cesta podávání se vybere na tomto základě:

Zkoušky dermální cestou jsou vhodné, pokud

1) je pravděpodobný kontakt s kůží při výrobě nebo používání a

2) z fyzikálně-chemických vlastností vyplývá potenciál pro značnou míru absorpce kůží a

3) je splněna jedna z těchto podmínek:

- při zkoušce akutní dermální toxicity je pozorována toxicita nižší než při zkoušce orální toxicity nebo
- při studiích kožní nebo oční dráždivosti jsou pozorovány systemické účinky nebo jiné příznaky absorpce nebo
- zkoušky in vitro naznačují významnou dermální absorpci nebo
- u strukturně příbuzných látek je zjištěna značná dermální toxicita nebo pronikání kůží.

Zkoušky inhalací jsou vhodné, pokud

- je expozice člověka prostřednictvím inhalace pravděpodobná, přičemž se zohlední tlak par látky nebo možnost expozice aerosolům, částicím nebo kapénkám inhalovatelných rozměrů.

Studie subakutní toxicity po opakovaných dávkách (28 dnů) (Short-term repeated dose toxicity study (28 days))

Provádí se u jednoho druhu, hlodavec, nejčastěji potkan, samec a samice, volí se nejvhodnější způsob podávání, s ohledem na možnou cestu expozice člověka.

a) Orální cestou (By oral route)

b) Metoda: B.7 Orální toxicita (28 denní opakovaná aplikace) (B.7 Repeated Dose (28 days) Toxicity (Oral))

Identická metoda: OECD No.407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents

Princip:

Testovaná látka se podává denně po 28 dní v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat orálně, a to každé skupině 1 úroveň dávky. Během období podávání se zvířata denně pečlivě pozorují (klinické pozorování), aby se zjistily všechny příznaky toxicity. Pitva se provede u všech zvířat, která uhynou nebo jsou utracena během pokusu; také zvířata, která přežijí konec pokusu, se utratí a pitvají. Před pitvou je zvířatům odebrána krev na hematologické a biochemické vyšetření. Po pitvě je provedeno makroskopické ohledání povrchu těla, tělních dutin a orgánů a odeberou se vzorky orgánů pro přípravu histopatologických preparátů.

Kromě běžných systémových toxických účinků by metoda měla odhalit i chemické látky s neurotoxickým potenciálem, u nichž může být nezbytné další hlubší zkoumání tohoto aspektu. Metoda může upozornit na imunologické účinky a toxicitu pro reprodukční orgány.

Aplikace, dávkování:

Zvířatům se podává testovaná látka 7 dní v týdnu po dobu 28 dnů. Denní dávka se podává jednorázově žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou.

Je třeba použít nejméně tři úrovně dávek a jednu kontrolní skupinu. S výjimkou aplikace testované látky se zachází se zvířaty v kontrolní skupině stejně jako s pokusnými. Používá-li se vehikulum pro usnadnění aplikace, podává se kontrolní skupině stejným způsobem jako pokusným skupinám, a to ve stejném množství, které obdrží skupina, které se aplikuje nejvyšší dávka.

Pro každou hladinu dávek se použije nejméně 10 zvířat (5 samic a 5 samců). Mimo to je možno podávat další skupině (satelitní skupině) 10ti zvířat (5 zvířat každého pohlaví) po dobu 28 dnů nejvyšší dávku a během následujících 14 dnů po podávání sledovat vratnost, trvání nebo zpožděný výskyt toxických účinků. Používají se také satelitní skupiny 10 kontrolních zvířat (5 zvířat každého pohlaví) u nejvyšší dávky a negativní kontroly.

Klinické vyšetření:

Sleduje se tělesná hmotnost a příjem potravy a vody.

Pozorování zahrnuje změny kůže, srsti, očí a sliznic, přítomnost sekretů a exkretů, změny dýchání a vegetativních funkcí (slzení, zježení srsti, velikost zornic) a případně další. Zaznamenávají se změny chůze, polohy, dále reakce na manipulaci, přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (vytrvalé čisticí pohyby nebo kroužení) nebo bizarních vzorců chování (např. sebepoškozování, pohyb pozadu).

Ve čtvrtém týdnu aplikace se otestují reakce na různé sensorické podněty (např. sluchové, zrakové, proprioceptivní), změní se síla úchopu a celková motorická aktivita.

Hematologie:

Hematologické vyšetření na konci pokusu zahrnuje stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů, počtu trombocytů a změření srážlivosti krve.

Biochemická analýza:

Vyšetření plazmy a séra zahrnuje stanovení sodíku, draslíku, glukózy, celkového cholesterolu, močoviny, kreatininu, celkových proteinů, albuminu, aktivity alespoň dvou enzymů indikujících účinky na jaterní buňky (jako alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, alkalická fosfatáza, gama glutamyltranspeptidáza, sorbitoldehydrogenáza). Změření dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a žlučových kyselin může v některých případech poskytnout užitečné informace. Dále se provádí sběr a vyšetření moči během posledního týdne studie: hodnotit je možno vzhled, objem, osmolalitu nebo specifickou hmotnost, pH, bílkoviny, glukózu a krev příp. krvinky.

Patologické vyšetření při pitvě:

Zahrnuje pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů, dutiny lební, hrudní a břišní, a jejich obsahu, tj. orgánů. Játra, ledviny, nadledviny, varlata, nadvarlata, brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat se řádně očistí od ulpěných tkání a co nejdříve po sekci se zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání.

Histopatologické vyšetření:

Zahrnuje následující tkáně: mozek (reprezentativní oblasti včetně hemisfér, mozečku a mostu), míchu, žaludek, tenké i tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, ledviny,

nadledvinky, slezinu, srdce, brzlík, štítnou žlázu, průdušnici a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a pak ponořením), gonády a přídatné pohlavní orgány (např. dělohu, prostatu), močový měchýř, lymfatické uzliny (přednostně jedna pro oblast aplikace a jedna vzdálená pro pokrytí systémových účinků), periferní nerv (n. ischiadicus nebo n. tibialis), nejlépe v blízkosti svalu, řez kostní dřevě (nebo čerstvý nátěr z nasáté kostní dřevě). Podle klinických nebo jiných nálezů je možno zvolit i další tkáň. Každý orgán, který by mohl být cílovým orgánem pro působení testované látky, je třeba uchovat.

Sběr a záznam údajů:

K dispozici musí být údaje o každém jednotlivém zvířeti. Navíc jsou veškeré údaje sumarizovány do tabulkové formy, uvádějící u každé testované skupiny počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu testu nebo utracených z humanitních důvodů, dobu úmrtí jednotlivých zvířat, popis toxických příznaků včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého příznaku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat s jednotlivými typy lézí. Výsledky v číselné formě je třeba vyhodnotit vhodnou a uznávanou statistickou metodou. Statistickou metodu je třeba zvolit již při plánování studie.

b) Inhalační cestou (By inhalation)

Metoda: B.8 Inhalační toxicita (28denní opakovaná aplikace) (B.8 Repeated Dose (28 days) Toxicity (Inhalation))

Identická metoda: OECD No.412: Repeated Dose Inhalation Toxicity: 28-Day or 14-Day Study

Od metody orální toxicity se liší pouze způsobem expozice.

Aplikace, dávkování:

Zvířata se exponují testované látce denně, 5-7 dnů v týdnu, po dobu 28 dnů. Zvířata v satelitních skupinách, která jsou určena k následnému pozorování, jsou pozorována dalších 14 dnů bez aplikace, k posouzení zotavení z otravy nebo přetrvávání toxických účinků. Teplota během experimentu má být $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Relativní vlhkost má být mezi 30 % a 70 %, s výjimkou případů, kde to není možné (např. experimenty s aerosoly). Udržování

mírného podtlaku uvnitř komory (5 mm vodního sloupce) zabrání unikání testované látky do okolí. Denní expozice má trvat 6 hodin. Během expozice se nepodává potrava ani voda.

Používá se dynamický inhalační systém s vhodnou analytickou kontrolou koncentrace. Doporučuje se provést předběžný pokus pro získání potřebných koncentrací. Rychlost průtoku vzduchu je třeba nastavit tak, aby podmínky v celém expozičním boxu byly stejné. Systém musí zaručovat, že stabilních podmínek expozice bude dosaženo co nejrychleji.

Měření nebo monitorování podmínek expozice:

a) Měření průtoku vzduchu (kontinuálně)

b) Skutečná koncentrace studované látky se měří v dýchací zóně. Během jedné expozice se nemá koncentrace odchylovat od střední hodnoty o více než $\pm 15\%$. U některých prachů a aerosolů, kde této úrovně regulace není možné dosáhnout, se připouští větší rozsah kolísání. Po celou dobu trvání experimentu mají být koncentrace tak stabilní, jak je to prakticky možné. Pokud se týká částic a aerosolů, měří se distribuce velikosti částic týdně v každé testované skupině

c) Teplota a vlhkost vzduchu se sleduje kontinuálně.

c) Dermální cestou (By dermal route)

Metoda: B.9 Dermální toxicita (28denní opakovaná aplikace) (B.9 Repeated Dose (28 days) Toxicity (Dermal))

Identická metoda: OECD No.410: Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-Day Study

Od metody orální toxicity se liší pouze způsobem expozice.

Aplikace, dávkování:

Testovaná látka se nanáší na kůži denně po 28 dní v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat. Krátce před začátkem pokusu se ostříhá srst na zádech. Vyholení srsti je rovněž možné, mělo by se však provést cca 24 hodin před experimentem. Ostříhání nebo oholení je potřeba opakovat každý týden. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se nepoškodila kůže (např. abrazy). Pro nanášení se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Je třeba vzít v úvahu hmotnost zvířat při rozhodování o velikosti připravované plochy

kůže a o velikosti krycího obvazu. Při pokusech s tuhými látkami, které mohou být případně upraveny do práškové formy, je třeba danou látku dostatečně navlhčit vodou, případně vhodným vehikulem, aby byl zaručen dobrý kontakt s kůží. Testované kapaliny se zpravidla aplikují neředěné. Látka se nanáší denně 5 až 7 dnů v týdnu.

Pravidla REACH

Studii subakutní toxicity (28 dní) není nutné provést, pokud:

- *je k dispozici spolehlivá studie subchronické (90 dnů) nebo chronické toxicity za předpokladu, že byl použit vhodný druh, dávka, rozpouštědlo a způsob podávání, nebo*
- *látka prochází okamžitým rozpadem a k dispozici jsou dostatečné údaje o produktech štěpení nebo*
- *lze vyloučit příslušnou expozici člověka.*

Studie subchronické toxicity (90 dnů) (Sub-chronic toxicity study (90-day))

Provádí se u jednoho druhu, hlodavec, nejčastěji potkan, samec a samice, volí se nejvhodnější způsob podávání, s ohledem na možnou cestu expozice člověka.

a) Orální cestou (By oral route)

Metoda: B.26 Zkouška subchronické orální toxicity na hlodavcích (90denní opakovaná aplikace) (B.26 Sub-chronic Oral Toxicity Test Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents)

Identická metoda: OECD No.408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents

Princip metody:

Testovaná látka se podává denně orálně po 90 dní v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Během podávání se zvířata pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která uhynou během pokusu nebo jsou utracena, i zvířata, která přežijí konec pokusu, se pitvají.

Aplikace, dávkování:

Testovaná látka se zvířatům aplikuje 7 dní v týdnu po dobu 90 dnů. Denní dávka se podává jednorázově žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou. U látek podávaných potravou nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství podávané látky neovlivnilo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se testovaná látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm nebo $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ potravu) nebo konstantní dávkování, ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete; použitou alternativu je třeba uvést.

Je třeba použít nejméně tři úrovně dávek a jednu kontrolní skupinu. S výjimkou aplikace testované látky se zachází se zvířaty v kontrolní skupině stejně jako s pokusnými. Používá-li se vehikulum pro usnadnění aplikace, podává se kontrolní skupině stejným způsobem jako pokusným skupinám, a to ve stejném množství, které obdrží skupina, které se aplikuje nejvyšší dávka.

Pro každou hladinu dávek se použije nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 samců).

Používají se také satelitní skupiny 10 kontrolních zvířat (5 zvířat každého pohlaví) u nejvyšší dávky a negativní kontroly

Klinické pozorování:

Běžné klinické pozorování je třeba provádět nejméně jednou denně, nejlépe vždy ve stejnou denní dobu, v době očekávaného maximálního účinku. Klinický stav zvířat se zaznamenává. Nejméně dvakrát denně, obvykle na začátku a na konci každého dne, se provede prohlídka u všech zvířat za účelem zjištění úmrtí a příznaků onemocnění.

Alespoň jednou před první aplikací látky a dále jednou týdně se provede důkladné klinické pozorování všech zvířat za účelem intraindividuálního srovnání. Pozorování je třeba provádět mimo chovnou klec, nejlépe ve standardním pozorovacím prostoru a pokaždé ve stejnou dobu. Výsledky pozorování se pečlivě zaznamenávají, nejlépe s použitím skórovacího systému (včetně doby nástupu, stupně a trvání), standardizovaného v testující laboratoři. Je třeba zajistit, aby se podmínky pozorování měnily minimálně. Pozorování zahrnuje přinejmenším změny kůže, srsti, očí a sliznic, přítomnost sekretů a exkretů a změny autonomních funkcí (slzení, piloerекce, velikost zornic, poruchy dýchání). Zaznamenávají se změny chůze a držení těla, dále reakce na manipulaci, přítomnost klonických nebo tonických pohybů, stereotypů (např. nadměrné čištění, opakované kroužení) nebo bizarní chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku).

Ke konci pokusu, ale ne dříve než v 11. týdnu, se otestují reakce na senzorické podněty (např. sluchové, zrakové a proprioceptivní), změní se síla úchopu a celková motorická aktivita.

Hematologie:

Z odběrů krve na konci testování a během studie se provádí následující hematologická vyšetření: stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počet erytrocytů, celkový a diferenciální počet leukocytů, počet destiček, test na srážlivost krve a stanoví se protrombinový čas.

Biochemická analýza:

Vyšetření plazmy a séra zahrnuje stanovení sodíku, draslíku, glukózy, celkového cholesterolu, močoviny, dusíku močoviny, kreatininu, celkových proteinů a albuminu, nejméně dva enzymy indikující hepatocelulární účinky (například alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, alkalická fosfatáza, gamaglutamyltranspeptidáza a sorbitoldehydrogenáza). Zahrnout lze také stanovení dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a také stanovení žlučových kyselin může v určitých případech poskytnout užitečné informace.

Dále se provádí sběr a vyšetření moči během posledního týdne studie: hodnotit je možno vzhled, objem, osmolalitu nebo specifickou hmotnost, pH, bílkoviny, glukózu a krev/krvinky.

Patologické vyšetření při pitvě:

U všech zvířat použitých ve studii se provede podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledviny, varlata, nadvarlata, děloha, vaječníky, brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat (kromě těch, která byla nalezena uhynulá nebo byla usmrcena v průběhu testu) se pečlivě očistí od ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí.

Zahrnuje pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů, dutiny lební, hrudní a břišní, a jejich obsahu, tj. orgánů. Játra, ledviny, nadledviny, varlata, nadvarlata, brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat se řádně očistí od ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání.

Histopatologické vyšetření:

Následující tkáně je třeba přechovávat ve vhodném fixačním médiu pro daný typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření: všechny tkáně s makroskopickými lézemi, mozek (reprezentativní oblasti včetně předního mozku, mozečku a prodloužené míchy), mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a lumbální), hypofýza, štítná žláza, příštítná tělíska, brzlík, jícen, slinné žlázy, žaludek, tenké a tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, slinivka, ledviny, nadledviny, slezina, srdce, průdušnice a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a následným ponořením), aorta, gonády, děloha, přídatné pohlavní orgány, samičí mléčná žláza, prostata, močový měchýř, žlučník (myš), lymfatické uzliny (přednostně jedna pro oblast aplikace a jedna vzdálená pro pokrytí systémových účinků), periferní nerv (n. ischiadicus nebo n. tibialis) nejlépe v blízkosti svalu, řez kostní dřevě (a/nebo čerstvý nátěr z nasáté kostní dřevě), kůže a oči (byly-li při oftalmologických vyšetřeních pozorovány změny). Podle klinických nebo jiných nálezů je možno zkoumat i další tkáně. Každý orgán, který by mohl být cílovým orgánem pro působení testované látky, je třeba konzervovat.

U všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u zvířat kontrolní skupiny je třeba provést histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Pokud se v orgánech a tkáních ve skupině s nejvyšší dávkou objeví poškození způsobená testovanou látkou, je nutno provést histologické vyšetření těchto tkání i u všech skupin s nižšími dávkami. Všechny makroskopické léze je třeba vyšetřit.

U zvířat satelitních skupin, pokud byly do studie zařazeny, je třeba provést histopatologické vyšetření se zvláštním důrazem na orgány a tkáně, ve kterých se objevily účinky u ostatních exponovaných zvířat.

Sběr a záznam údajů, výsledky:

K dispozici musí být údaje o každém jednotlivém zvířeti. Navíc jsou veškeré údaje sumarizovány do tabulkové formy, uvádějící u každé testované skupiny počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu testu nebo utracených z humánních důvodů, dobu úmrtí jednotlivých zvířat, popis toxických příznaků včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého příznaku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat s jednotlivými typy lézí. Výsledky v číselné formě je třeba vyhodnotit vhodnou a uznávanou statistickou metodou.

b) Inhalační cestou (By inhalation)

Metoda: B.29 Studie subchronické inhalační toxicity (90denní opakovaná inhalační expozice na hlodavcích) (B.29 Sub-chronic Inhalation Toxicity Study 90-Day Repeated Inhalation Dose Study Using Rodent Species))

Identická metoda: OECD No.413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study

Od metody orální toxicity se liší pouze způsobem expozice

b) Dermální cestou (By Dermal Route)

Metoda: B.28 Studie subchronické dermální toxicity (90denní opakovaná kožní aplikace na hlodavcích) (B.28 Sub-chronic Dermal Toxicity Study 90-Day Repeated Dermal Dose Study Using Rodent Species))

Identická metoda: OECD No. 411: Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study

Od metody orální toxicity se liší pouze způsobem expozice.

Pravidla REACH

Studii subchronické toxicity (90 dní) není nutné provést, pokud

- *je k dispozici spolehlivá studie subakutní toxicity (28 dnů), která prokazuje závažné toxické účinky, u níž zaznamenaná hodnota NOAEL-28 dnů při použití odpovídajícího faktoru nejistoty umožňuje extrapolaci na NOAEL-90 dnů pro stejnou cestu expozice, nebo*
- *je k dispozici spolehlivá studie chronické toxicity, pokud byl použit vhodný druh a způsob podávání, nebo*
- *látka prochází okamžitým rozpadem a jsou k dispozici dostatečné údaje o produktech štěpení (jak pro systemické účinky, tak i pro účinky v místě absorpce) nebo*
- *je látka nereaktivní, nerozpustná a neinhlovatelná a neexistuje důkaz absorpce a toxicity při 28denní „limitní zkoušce“, zejména pokud k expozici člověka dochází pouze v omezené míře.*

Studie chronické opakované toxicity (≥ 12 měsíců) (Long-term repeated toxicity study (≥ 12 months))

Metoda: B.30 Zkouška chronické toxicity (B.30 Chronic Toxicity Test)

Identická metoda: OECD No.452: Chronic Toxicity Studies

Provedení:

Je analogické jako u subchronického testu s tím že:

Dva hlavní způsoby aplikace jsou orální a inhalační. Tam, kde se testovaná látka vstřebává z gastrointestinálního traktu a je-li požití jednou z cest, jimiž může být exponován člověk, dává se přednost orální aplikaci, pokud nejsou proti tomu nějaké důvody. Zvířata mohou dostat testovanou látku v potravě, rozpuštěnu v pitné vodě nebo podanou v tobolce. Látka se aplikuje minimálně podobu 12 měsíců.

Preferovaným druhem je potkan. Je třeba použít zdravé a mladé jedince běžně chovaných. Pro každou úroveň dávky je třeba použít nejméně 40 zvířat (20 samic a 20 samců).

Pro histopatologické vyšetření se odebírají následující orgány a tkáně: mozek (prodloužené míchy/mostu, mozečkové kory, kory mozkové), podvěsek mozkový, štítnou žlázu a příštítná tělíska, thymus, trachea a plíce, srdce, aortu, slinnou žlázu, játra, slezinu, ledviny, nadledviny, jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, slepé střevo, tračník, konečník, močový měchýř, lymfatické uzliny, slinivku, gonády, akcesorní pohlavních orgány, samičí mléčné žlázy, kůži, svalovinu, periferní nervy, míchu (krční, hrudní a bederní), sternum s kostní dřeví, stehenní kost včetně kloubů, a oči. Ve speciálních studiích jako jsou inhalační studie, má být studován celý respirační trakt včetně nosu, hltanu a hrtanu.

Pravidla REACH

Studii může navrhnout žadatel o registraci nebo si ji vyžádat agentura, pokud frekvence a délka trvání expozice člověka naznačuje, že je vhodná dlouhodobá studie, a je splněna jedna z těchto podmínek:

- *ve 28denní nebo 90denní studii byly pozorovány vážné nebo těžké toxické účinky vyvolávající zvláštní obavy a dostupné důkazy jsou nedostatečné pro toxikologické vyhodnocení nebo charakterizaci rizika nebo*

- *ve 28denní nebo 90denní studii nebyly odhaleny účinky pozorované u látek se zjevně příbuznou molekulovou strukturou, jako má zkoumaná látka, nebo*
- *látka může mít nebezpečnou vlastnost, kterou není možné odhalit v 90denní studii.*

Reprodukční toxicita (Reproductive toxicity)

Princip:

Studie reprodukční toxicity jsou studie, které poskytují informace o možných toxických účincích testované látky na reprodukční schopnosti samce či samice či na vývoj potomstva, tj.

- *na funkci pohlavních žláz samce či samice,*
- *na průběh estrálního cyklu samice,*
- *na chování při páření, březosti, porodu a laktaci,*
- *na mortalitu, růst a vývoj potomstva.*

Pravidla REACH

Studie není nutné provést, je-li látka

- *známa jako genotoxický karcinogen a byla provedena odpovídající opatření k řízení rizik nebo,*
- *známa jako mutagen působící na zárodečné buňky a byla provedena odpovídající opatření k řízení rizik nebo - málo toxikologicky aktivní (nezjistily se důkazy o toxicitě při dostupných zkouškách),*
- *z toxikokinetických údajů lze dokázat, že nedochází k systemické absorpci příslušnými cestami.*

Expozice (např. koncentrace v plazmě nebo krvi jsou pod mezními hodnotami detekce při použití citlivé metody a nepřítomnosti látky a jejich metabolitů v moči, žluči nebo vydechovaném vzduchu) a nedochází k žádné nebo k žádné významné expozici člověka.

Je-li o látce známo, že má nepříznivé účinky na plodnost (fertility) a splňuje kritéria pro klasifikaci jako toxická pro reprodukci kategorie 1 nebo 2: R 60 a dostupné údaje

poskytují dostatečnou podporu pro podrobné posouzení rizik; v tom případě nebudou nutné zkoušky účinků na plodnost. Zkoušky vývojové toxicity však musí být zváženy.

Je-li o látce známo, že způsobuje vývojovou toxicitu (developmental toxicity) a splňuje kritéria pro klasifikaci jako toxická pro reprodukci kategorie 1 nebo 2: R 61 a dostupné údaje poskytují dostatečnou podporu pro podrobné posouzení rizik; v tom případě nebudou nutné zkoušky vývojové toxicity. Zkoušky účinků na plodnost však musí být zváženy.

Posouzení reprodukční/vývojové toxicity (Screening for reproductive/developmental toxicity)

Metoda: Metoda není uvedena v nařízení REACH o zkušebních metodách, jsou doporučeny metody OECD.

OECD No.421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test

OECD No.422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test

Provádí se u jednoho druhu, pokud neexistují dostupné informace o strukturně příbuzných látkách z odhadů (Q)SAR nebo z metod *in vitro*, že látka může být toxická pro vývoj.

Reprodukční/vývojová toxicita – screening test

- poskytuje prvotní informace o vlivu testované látky na funkci pohlavních žláz, chování při páření, schopnost zabřeznutí, vývoj plodu a porod,
- může sloužit jako pilotní studie složitějších reprodukčních a vývojových studií,
- pozitivní výsledek je užitečný pro prvotní odhad rizika,
- negativní výsledek není důkazem toho, že látka nemá účinky na reprodukci či vývoj (počet zvířat a délka expozice jsou zkrácené).

Princip metody:

- aplikace testované látky samcům minimálně po dobu 4 týdnů (minimálně 2 týdny před pářením, po dobu páření a přibližně 2 týdny po páření) a poté pitva se zaměřením na pohlavní orgány,

- aplikace testované látky samicím 2 týdny před pářením, 2 týdny po dobu páření, po dobu březosti (tj. asi 22 dnů) a 3 dny laktace a poté pitva se zaměřením na pohlavní orgány a na vyšetření mláďat, (celková délka studie ve zvířinci: asi 54 dnů).

Provedení:

Pokusná zvířata:

- doporučený druh dle metodiky: potkan (kmen, věk, hmotnost),
- pohlavně dospělé samice, nullipary, pohlavně dospělí samci,
- počet: 10 samců a 10 samic v každé skupině (minimálně 8 březích samic ve skupině).

Podmínky chovu:

teplota: $22 \pm 3^\circ\text{C}$, relativní vlhkost: 30 – 70 %, osvětlení: 12 hodin světlo/12 hodin tma, krmení a voda: ad libitum.

Dávkové hladiny: minimálně 3 úrovně dávek a kontrola (vehikulum).

Úrovně dávek vycházejí z výsledků akutních a dlouhodobých studií toxicity, literatury a případně výsledků pilotního testu s omezeným počtem zvířat.

Aplikace: orální (sondou do žaludku, možnost podávání i v krmivu či v napájecí vodě), objem 1 ml/100g živé hmotnosti (vodné roztoky až 2 ml/100 g živé hmotnosti), denně, ve stejnou dobu.

Páření: systém 1:1

Průběh testu:

samci: 5 dnů aklimatizace → 2 týdny aplikace → 2 týdny páření a aplikace → cca 2 týdny aplikace (aplikace celkem min. 4 týdny) → pitva, vyšetření spermií,

samice: 5 dnů aklimatizace → 2 týdny aplikace → 2 týdny páření a aplikace → 21 – 22 dnů březost a aplikace → 3 dny, laktace a aplikace → pitva samic a mláďat.

Vyšetření:

- vaginální výplachy ke zjištění přítomnosti spermií: následující den po zahájení páření a poté,
- denně až do zjištění spermií,
- kontrola zdravotního stavu: denně před aplikací,
- klinické vyšetření samců a samic: minimálně 1x denně po aplikaci,
- tělesná hmotnost a spotřeba krmiva samců a samic: v týdenních intervalech,
- hmotnost vrhu: 0. nebo 1. a 4. den po porodu,
- klinické vyšetření mlád'at: co nejdříve po narození,
- patologické vyšetření samců: po ukončení aplikace (tj. nejdříve po 4 týdnech),
- patologické vyšetření samic a plodů: 4. den laktace.

Klinické vyšetření mlád'at:

- počet a pohlaví mlád'at živě narozených,
- předčasně narozená a výrazně menší mlád'ata,
- viditelné anomálie,
- abnormální chování mlád'at.

Patologické vyšetření samců:

- makroskopická revize orgánů dutiny hrudní a břišní,
- hmotnost varlat, nadvarlat, hypofýzy,
- odběr pohlavních orgánů k histologickému vyšetření: varlata, nadvarlata, semenné včky, koagulační žláza, prostata, hypofýza (fixace: modifikovaná Davidsonova tekutina, 4% formaldehyd),

- vyšetření spermií – hodnotí se motilita spermií (kvalitativně mikroskopicky), vitalita spermií (barvením spermií a hodnocením pod mikroskopem) a morfologický obraz.

Patologické vyšetření samic a mlád'at

- makroskopická revize orgánů dutiny hrudní a břišní,
- hmotnost dělohy a vaječnicků,
- počet nidačních bodů v děloze,
- počet žlutých tělísek na vaječnicích,
- odběr vaječnicků a dělohy k histologickému vyšetření (fixace ve 4% formaldehydu),
- pečlivá pitva mlád'at se zjištěním pohlaví a zaměřením na zjištění anomálií.

Histologické vyšetření

- pečlivé mikroskopické vyšetření varlat (se zaměřením na spermiogenesi – krátká expozice před pářením), nadvarlat, prostaty, semenných váčků s koagulační žlázou, vaječnicků, dělohy a hypofýzy
- ostatní orgány – pouze v případě zjištění makroskopických změn při pitvě.

Výpočty parametrů reprodukce:

Individuální

- preimplantační ztráty: žlutá tělíška - implantace,
- postimplantační ztráty: implantace - živě narozená mlád'ata,
- postnatální ztráty: živě narozená mlád'ata - živá mlád'ata 4. den.

Skupinové

- procento páření: (počet samic spářených/počet samic pářených) x 100,
- index fertility: (počet březích samic/počet pářených samic) x 100,

- index plození: (počet březích samic/počet spářených) x 100,
- index březosti: (počet samic s živými mláďaty/počet březích samic) x 100,
- index životaschopnosti: (počet živých mláďat 4. den po porodu/počet živých narozených mláďat) x 100,
- procento novorozenecké úmrtnosti: (počet mrtvých mláďat 4. den po porodu/počet živých mláďat při 1. kontrole vrhu) x 100.

Pravidla REACH

Test reprodukční toxicity není nutné provést, pokud:

- *je látka známa jako genotoxický karcinogen a byla provedena odpovídající opatření k řízení rizik nebo*
- *je látka známa jako mutagen působící na zárodečné buňky a byla provedena odpovídající opatření k řízení rizik nebo*
- *lze vyloučit příslušnou expozici člověka nebo*
- *je k dispozici prenatální toxikologická studie (viz 8.7.2) nebo dvougenerační reprodukční toxikologická studie (viz 8.7.3).*

V případě, že existují vážné obavy o možných nepříznivých účincích na plodnost nebo vývoj, může žadatel o registraci namísto screeningové studie navrhnout studii prenatální vývojové toxicity (viz 8.7.2) nebo dvougenerační studii reprodukční toxicity (viz 8.7.3).

Studie prenatální vývojové toxicity (Pre-natal developmental toxicity study)

Metoda: B.31 Studie prenatální vývojové toxicity (B.31 Prenatal Developmental Toxicity Study)

Identická metoda: OECD No.414: Prenatal Development Toxicity Study

Princip:

Studie prenatální vývojové toxicity (obvykle nazývané teratogenita) poskytne informace o účinku opakované expozice látky na březí samice a na nitroděložní vývoj jejich potomstva.

Obvykle se zkušební látka podává březím pokusným zvířatům od implantace až do dne před plánovaným usmrcením, který by se měl co nejvíce přiblížit očekávanému dni vrhu, aniž se riskuje ztráta údajů v důsledku předčasného vrhu. Metoda by měla zachytit účinky testované látky v období před implantací vajíčka, v období organogeneze a pak až do ukončení gestace císařským řezem. Hodnotí se zevní viditelné anomálie, změny měkkých tkání a skeletu plodu a toxicita pro matku.

Definice:

Vývojová toxikologie: studie nepříznivých účinků na vyvíjející se organismus, které mohou vyplývat z expozice před početím, během prenatálního vývoje nebo v postnatálním období až do doby pohlavní zralosti. Hlavní projevy vývojové toxicity zahrnují 1) úhyn organismu, 2) strukturální odchylky, 3) změněný růst a 4) funkční poruchu. Vývojová toxikologie se původně nazývala teratologie.

Nepříznivý účinek: jakákoliv odchylka od normálního stavu spojená s aplikací, která snižuje schopnost organismu přežít, rozmnožovat se nebo se přizpůsobit prostředí. Pokud jde o vývojovou toxikologii v nejširším slova smyslu, zahrnuje tento pojem jakýkoliv účinek, který brání normálnímu vývoji plodu, a to jak před narozením, tak i po něm.

Změněný růst: změna hmotnosti nebo velikosti orgánu nebo těla u potomstva.

Odchylky (anomálie): strukturální změny ve vývoji, které zahrnují jak malformace, tak i odchylky.

Malformace/velká odchylka: strukturální změna považovaná za škodlivou pro pokusné zvíře (může být i letální); obvykle je vzácná.

Odchylka/malá odchylka: strukturální změna, která nemá žádný nebo má jen malý škodlivý účinek na pokusné zvíře poměrně často.

Zárodek: celkové množství derivátů oplodněného vajíčka v jakékoliv fázi vývoje od oplodnění až do narození, včetně dalších zárodečných membrán, embrya nebo plodu.

Implantace (nidace): přichycení blastocysty k epitelové výstelce dělohy, včetně její penetrace do děložního epitelu a zahnízdění v děložní sliznici.

Embryo: raná vývojová fáze organismu, vyvíjející se po oplodnění vajíčka poté, co se objeví dlouhá osa, a dokud nejsou přítomné všechny hlavní struktury.

Embryotoxicita: toxicita škodlivá pro normální strukturu, vývoj, růst nebo životaschopnost embrya.

Fétus (plod): nenarozený potomek v post-embryonálním období.

Fetotoxicita: toxicita škodlivá pro normální strukturu, vývoj, růst nebo životaschopnost plodu.

Potrat: předčasné vyloučení produktů oplodnění - embrya nebo plodu neschopného života – z dělohy.

Resorpce: zárodek, který po implantaci do dělohy později odumřel a vstřebává se nebo se již vstřebal.

Raná resorpce: důkaz o zahníždění (implantaci) bez rozeznatelného embrya/plodu.

Pozdní resorpce: mrtvé embryo nebo plod se zevními degenerativními změnami.

Provedení:

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan a upřednostňovaným druhem nehlodavce je králík.

Každá experimentální a kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet samic, abychom při pitvě získali přibližně 20 samic s implantací plodu. Skupiny s méně než 16 pokusnými zvířaty s implantací plodu nejsou vhodné. Mortalita samic nemusí nutně znamenat znehodnocení studie za předpokladu, že nepřekročí přibližně 10 %. Použijí se alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Aplikace obvykle intubací. Zkoušená látka se obvykle podává denně od implantace (např. pátý den po spáření) až do dne před plánovaným císařským řezem. Pokud z případných předběžných studií nevyplývá vysoký potenciál předimplantačních ztrát, lze aplikaci prodloužit tak, aby zahrnovala celé období gestace, od spáření až do dne před plánovaným usmrcením.

Pitva a vyšetření plodů:

Samice se usmrtí jeden den před očekávaným dnem vrhu a podrobí důkladnému makroskopickému vyšetření na patologické změny. Okamžitě po usmrcení nebo co nejdříve po uhynutí se samicím vyjme děloha a zjistí se stav březosti. Dělohy, které nesvědčí o graviditě, se dále vyšetří (např. pomocí barvení sulfidem amonným u hlodavců a pomocí Salewského barvení nebo vhodnou alternativní metodou u králíků) a potvrdí se negravidní stav. Gravidní děloha včetně děložního hrdla se zváží. U březích pokusných zvířat se zjistí počet žlutých tělísek. U děložního obsahu se vyšetří počet úhynů embrya nebo plodu a počet životaschopných plodů. Popíše se stupeň resorpce, aby bylo možné odhadnout relativní dobu uhynutí zárodku. Zjistí se pohlaví a tělesná hmotnost každého plodu. U každého plodu se vyšetří zevní odchylky. U plodů se vyšetří změny kostry a měkkých tkání (např. odchylky a malformace nebo anomálie). Zvláštní pozornost je třeba věnovat rozmnožovací soustavě, která se vyšetří na přítomnost známek změněného vývoje. U hlodavců se připraví přibližně polovina každého vrhu, u něhož se vyšetří změny skeletu. Zbytek se připraví a vyšetří na přítomnost změn měkkých tkání pomocí uznaných nebo vhodných metod postupného krájení histologických řezů nebo důkladné pitvy.

Vyhodnocení a interpretace výsledků:

Výsledky se zaznamenají do tabulky samostatně pro samice a pro jejich potomky a u každé pokusné skupiny a každé generace se uvede počet pokusných zvířat na začátku zkoušky, počet pokusných zvířat uhynulých během zkoušky nebo usmrcených z humánních důvodů, doba úhynu nebo humánního usmrcení, počet březích samic, počet pokusných zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis příznaků zjištěné toxicity včetně nástupu, trvání a závažnosti případných toxických účinků, typy pozorování embryí/plodů a všechny důležité údaje o vrhu.

Pravidla REACH

Studie se nejprve provede u jednoho druhu. Rozhodnutí o provedení studie v tomto objemu výroby rozmezí nebo v dalším u dalšího druhu by mělo být založeno na výsledku první zkoušky a všech jiných příslušných údajů, které jsou k dispozici.

Dvougenerační studie reprodukční toxicity (Two-generation reproductive toxicity study)

Metoda: B.35 Dvougenerační studie reprodukční toxicity (B.35 Two-Generation Reproduction Toxicity Study)

Identická metoda: OECD No.416: Two-Generation Reproduction Toxicity

Princip:

Zkoušená látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám samců a samic. Samcům z generace P (parentální) se látka podává během růstu a během minimálně jednoho dokončeného spermatogenetického cyklu (přibližně 56 dnů u myši a 70 dnů u potkana), aby bylo možné zachytit jakékoliv nepříznivé účinky na spermatogenezi. Účinky na spermie se stanoví pomocí parametrů pro spermie (např. morfologie a motilita spermií) a z přípravy tkání a podrobné histopatologie. Samicím z generace P se látka podá během růstu a během několika dokončených estrálních cyklů, aby bylo možné odhalit jakékoliv nepříznivé účinky zkoušené látky na normální průběh estrálního cyklu. Zkoušená látka se podává rodičovské (P) generaci pokusných zvířat během jejich páření, následné březosti a až do doby odstavení jejich potomstva F1. Po odstavení se u generace F1 v podávání látky pokračuje během růstu až do dospělosti, v průběhu páření a produkce generace F2 a až do doby, kdy dojde k odstavení generace F2.

U všech pokusných zvířat se provádějí klinická sledování a patologická vyšetření příznaků toxicity, a to se zvláštním důrazem na její vliv na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy a na růst a vývoj jejich potomstva.

Provedení:

Nejvhodnějším druhem pro testování je potkan.

Každá experimentální i kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet pokusných zvířat, aby bylo možné získat minimálně 20 březích samic s přibližně stejným termínem vrhu. Cílem je získat dostatečný počet březích samic, a tím zajistit významné hodnocení potenciálu dané látky ovlivnit plodnost, březost, chování samic a kojených mláďat, růst a vývoj potomstva generace F1 od doby početí až do doby dospělosti a vývoj jejich potomstva (F2) až do odstavení. Nepodaří-li se však dosáhnout požadovaného počtu březích pokusných zvířat (tj. 20), nemusí to vždy nutně znamenat znehodnocení studie.

Není-li jiný vhodnější způsob aplikace (např. kožní nebo inhalační), doporučuje se orální podávání zkoušené látky (v krmivu, pitné vodě nebo pomocí žaludeční sondy). Použijí se alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. S každodenním podáváním zkoušené látky se u rodičovské generace (P) samců a samic zahájí od 5. do 9. týdne věku. Denní podávání látky u samců a samic generace F1 je třeba zahájit po jejich odstavení; stále je třeba mít na paměti, že v případě, kdy se zkoušená látka podává prostřednictvím krmiva nebo pitné vody, může docházet k přímé expozici mláďat F1 zkoušené látce již během laktačního období. U obou pohlaví (P i F1) by se mělo s podáváním látky pokračovat alespoň 10 týdnů před obdobím páření. S dávkováním se u obou pohlaví pokračuje i během dvoutýdenního období páření. Nejsou-li samci již nezbytní k hodnocení reprodukčních účinků, měli by být humánním způsobem usmrceni a vyšetřeni. U rodičovské generace (P) samic dávkování pokračuje i během březosti a až do odstavení potomstva generace F1. Obvykle by dávka pro jednotlivá pokusná zvířata měla vycházet z aktuální zjištěné tělesné hmotnosti. Podávání látky samcům a samicím generací P a F1 pokračuje až do doby jejich utracení. Všichni dospělí samci a samice generace P a F1 se humánním způsobem utratí, pokud již nejsou nezbytní k hodnocení reprodukčních účinků. Potomstvo generace F1, které není vybráno k páření, a celé potomstvo generace F2 se po odstavení humánním způsobem utratí.

Vyšetření:

Před pářením a popřípadě i během páření se u samic generace P a F1 hodnotí délka a normálnost estrálního cyklu pomocí vaginálních stěrů, dokud se nezíská důkaz o zabřeznutí. U všech samců generace P a F1 se po utracení zaznamená hmotnost varlat a nadvarlat a jeden z každého orgánu se ponechá pro histopatologické vyšetření. Zbylá varlata a nadvarlata z podskupiny alespoň deseti samců z každé generace P a F1 se použijí pro výpočet homogenizačně odolných spermatid a kaudálních epididymálních rezerv spermií. Od stejné podskupiny samců se shromáždí spermie z kaudálních částí nadvarlat nebo spermie z chámovodů za účelem vyhodnocení jejich motility a morfologie. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací látky anebo jsou z jiných studií k dispozici důkazy o možném účinku na spermatogenezi, provede se hodnocení spermatu u všech samců z každé skupiny podle dávky; jinak se výpočet omezí pouze na samce z kontrolní skupiny a ze skupiny generace P a F1 s vysokou dávkou.

Vypočítá se celkový počet homogenizačně odolných testikulárních spermatid a spermií z kaudální části nadvarlat. Analýza u vybrané podskupiny samců ze všech dávkových skupin

se provádí okamžitě po utracení pokusných zvířat. V těchto případech se nejprve provádí analýza u kontrolní skupiny a u skupiny s vysokou dávkou. Pokud se nezjistí žádné účinky spojené s aplikací (např. vliv na počet, motilitu nebo morfologii spermií), není nutné provádět analýzu u ostatních dávkových skupin. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací u skupiny s vysokou dávkou, je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami. Motilita epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodů) se vyhodnotí nebo zaznamená na video okamžitě po utracení. Procento progresivně pohyblivých spermií se stanoví subjektivně, nebo objektivně (videozáznam, počítačová analýza).

Provede se morfologické hodnocení vzorků epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodů). Spermie (minimálně 200 na vzorek) se vyšetří jako stabilní, mokré preparáty a klasifikují se jako normální nebo abnormální. Příklady morfologických odchylek spermií by měly zahrnovat syntézu, izolované a zdeformované hlavičky nebo ocásky.

Všechny vrhy se vyšetří co nejdříve po vrhu (v nultý den laktace), aby bylo možné stanovit počet a pohlaví mlád'at, počet mrtvě a živě narozených mlád'at a přítomnost nápadných anomálií. Mlád'ata, která byla nalezena mrtvá v den 0, se vyšetří na možné defekty a příčinu smrti (nejsou-li rozložená) a posléze se uchovají. Živá mlád'ata se spočítají a individuálně zváží ihned po narození (v nultý den laktace) nebo během 1. dne a poté se váží v pravidelných intervalech, např. v 4., 7., 14., a 21. den laktace. Zaznamenají se fyzické nebo behaviorální abnormality zjištěné u samic nebo jejich potomstva.

Fyzický vývoj u potomstva se zaznamenává hlavně podle přírůstku tělesné hmotnosti. Další fyzické parametry (např. otevření uší a očí, prořezávání zubů, růst srsti) mohou poskytnout doplňkové informace, ale u těchto údajů se dává přednost hodnocení v rámci kontextu údajů o pohlavní zralosti (např. stáří a tělesná hmotnost při vaginálním otevření nebo odpojení předkožky). Doporučuje se provést funkční vyšetření (např. pohybová aktivita, smyslové funkce, reflexní ontogeneze) potomstva generace F1 před nebo po odstavení, a to zvláště vyšetření týkající se pohlavní zralosti, nejsou-li taková vyšetření součástí samostatných studií. U odstavených potomků generace F1 vybraných k připuštění je třeba stanovit stáří, ve kterém došlo k vaginálnímu otevření a odloučení předkožky.

U mlád'at generace F2 je třeba změřit anogenitální vzdálenost během postnatálního dne 0, je-li vyvolána změnami v poměru pohlaví u generace F1 nebo načasováním pohlavní zralosti.

Pitva:

Po utracení nebo uhynutí během studie se všechna pokusná zvířata rodičovské generace (P a F1), všechna mláďata se zevními odchylkami nebo klinickými známkami a rovněž jedno náhodně vybrané mládě z každého pohlaví a vrhu z obou generací F1 a F2 makroskopicky vyšetří na jakékoliv strukturální abnormality anebo patologické změny. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. U mláďat, která jsou humánním způsobem utracena ve stavu agónie, a u mrtvých mláďat, která nejsou rozložena, se provede vyšetření za účelem zjištění možných defektů nebo příčiny uhynutí. Mláďata se uchovají. Dělohy všech samic prvorodiček se vyšetří na přítomnost a počet zachycených vajíček v děloze.

V okamžiku utracení se u všech rodičovských pokusných zvířat generace P a F1 stanoví tělesná hmotnost a hmotnost těchto orgánů (párové orgány je třeba vážit jednotlivě):

- děloha, vaječníky,
- varlata, nadvarlata (celkem a kaudální),
- prostata,
- semenné vajíčky s koagulačními žlázami a jejich tekutinami a s prostatou (jako jedna jednotka),
- mozek, játra, ledviny, slezina, hypofýza, štítná žláza a nadledvinky a známé cílové orgány.

U mláďat generace F1 a F2 vybraných k pitvě se stanoví tělesná hmotnost v okamžiku utracení. U jednoho náhodně vybraného mláděte z každého pohlaví a vrhu se zváží tyto orgány: mozek, slezina a brzlík.

Histopatologie:

Rodičovská zvířata:

Pro histopatologické vyšetření se připraví a ve vhodném prostředí uchovají tyto orgány a tkáně rodičovských pokusných zvířat (P a F1) nebo jejich reprezentativní vzorky:

- pochva, děloha s děložním hrdlem a vaječníky (uložené ve vhodném konzervačním prostředí),
- jedno varle (uložené v Bouinově roztoku nebo jiném srovnatelném prostředí), jedno nadvarle, semenné vajíčky, prostata a koagulační žláza,
- již dříve určený cílový orgán nebo orgány od všech pokusných zvířat generace P a F1 vybraných k páření.

U všech pokusných zvířat generace P a F1 ze skupiny s vysokou dávkou a z kontrolní skupiny vybraných k páření se provede kompletní histopatologické vyšetření všech výše vyjmenovaných uchovaných orgánů a tkání. Vyšetření vaječnicků u pokusných zvířat generace P není povinné. Provede se rovněž vyšetření orgánů vykazujících změny spojené s aplikací látky u pokusných zvířat ze skupiny s nízkou a střední dávkou, které mohou napomoci stanovit dávku NOAEL. Histopatologické vyšetření se navíc provede u reprodukčních orgánů pokusných zvířat ze skupiny s nízkou a střední dávkou, u kterých je podezření na sníženou plodnost, např. u těch, u kterých nedošlo k páření, zabřeznutí, oplodnění nebo k vrhu zdravého potomstva nebo u kterých byl ovlivněn estrální cyklus nebo počet, motilita nebo morfologie spermií. Vyšetří se všechny makroskopické léze, jako např. atrofie nebo tumory.

Za účelem zjištění účinků spojených s aplikací, jako jsou např. nevyvinuté spermatidy, chybějící vrstva nebo typ zárodečných buněk, mnohojaderné obří buňky nebo rozrušení spermatických buněk v dutině, se provede podrobné histopatologické vyšetření varlat. Vyšetření intaktního nadvarlete by mělo zahrnovat vyšetření hlavy, těla a kaudální části, čehož lze dosáhnout vyhodnocením podélné ho řezu. U nadvarlete se vyšetří leukocytová infiltrace, změna v prevalenci typů buněk, aberantní typy buněk a fagocytóza spermií.

Postlaktanční vaječník by měl obsahovat původní a rostoucí folikuly a rovněž zvětšená žlutá tělíska z období laktace. Histopatologické vyšetření by mělo odhalit kvalitativní snížení celkového počtu původních folikulů. U samic generace F1 se provede kvantitativní vyhodnocení původních folikulů. K vyhodnocení použitého postupu je nutné mít statisticky odpovídající počet pokusných zvířat, výběr řezů vaječnicků a velikost vzorků řezů. S cílem umožnit srovnání vaječnicků u testované a kontrolní skupiny by mělo vyšetření zahrnovat výpočet počtu původních folikulů, které lze zkombinovat s malými rostoucími folikuly.

Odstavená mláďata:

Pro histopatologické vyšetření se ve vhodném prostředí připraví a uchová makroskopicky abnormální tkáň a cílové orgány od všech mláďat se zevními odchylkami nebo klinickými příznaky a rovněž od jednoho náhodně vybraného mláďete z každého pohlaví a vrhu z obou generací F1 a F2, které nebyly vybrány k páření. Kompletní histopatologická charakterizace uchovaných tkání se provede se speciálním důrazem na orgány rozmnožovací soustavy.

Pravidla REACH

Studie se provede pokud 28denní nebo 90denní studie naznačují nepříznivé účinky na reprodukční orgány nebo tkáň. Studie se nejprve provede u jednoho druhu. Rozhodnutí o provedení studie v tomto množstevním rozmezí nebo v dalším u dalšího druhu by mělo být založeno na výsledku první zkoušky a všech jiných příslušných údajů, které jsou k dispozici.

Toxikokinetika (Toxicokinetics)

Toxikokinetické studie pomáhají při interpretaci a vyhodnocení údajů o toxicitě, objasňují specifické aspekty toxicity testované chemické látky a výsledky mohou pomoci při návrhu dalších studií toxicity. Nepředpokládá se, že bude v každém případě zapotřebí stanovit všechny parametry. Pouze v ojedinělých případech bude nezbytná celá posloupnost toxikokinetických studií (studie absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece).

Informace o chemické struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech mohou také poskytnout údaje, umožňující odhad charakteristik absorpce při plánovaném způsobu aplikace, metabolismu a distribuce do tkání. Přispět mohou také informace o toxikokinetických parametrech z předcházejících toxikologických a toxikokinetických studií.

Metoda: B.36 Studie toxikokinetiky (B.36 Toxicokinetics)

Princip metody:

Zkoušená látka se podává vhodným způsobem. V závislosti na účelu studie je možné látku podávat v jednorázové dávce nebo v opakovaných dávkách po stanovenou dobu jedné nebo několika skupinám pokusných zvířat. Látka a/nebo její metabolity se poté podle typu studie stanoví v tělních tekutinách, tkáních a/nebo v exkretech.

Studie mohou být prováděny s „neznačenou“ nebo „značenou“ formou zkoušené látky. Jestliže se použije značená látka, musí být značena tak, aby se získalo co nejvíce informací o osudu sloučeniny v organismu.

Pravidla REACH

Posouzení toxikokinetického chování látky do té míry, kterou lze odvodit z příslušných dostupných informací. Čili speciální experimentální toxikokinetické studie nejsou vyžadovány.

Studie karcinogenity (Carcinogenicity study)

Metoda: B.32 Zkouška karcinogenity (B.32 Carcinogenicity Test)

Identická metoda: OECD No.451: Carcinogenicity Studies

B.33 Kombinovaná zkouška chronické toxicity a karcinogenity (B.33 Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Test)

Identická metoda: OECD No.453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies

Provedení:

Je analogické jako u testu chronické toxicity.

Preferovaným druhem je potkan.

Zvolí se při nejmenším tři dávkové úrovně kromě souběžné kontrolní skupiny. Nejvyšší dávková úroveň by měla vyvolat příznaky minimální toxicity, jako je mírný pokles váhových přírůstků (méně než 10 %), bez podstatnějších změn normální doby dožití daných jinými účinky než tumory. Látka se aplikuje denně, je preferován orální způsob podávání v potravě nebo v pitné vodě. Lze zvolit i cestu dermální nebo inhalační.

Doba aplikace musí pokrývat převážnou část života zvířat, u hlodavců to jsou cca 2 roky. Pro hlodavce se užije nejméně 100 zvířat (50 samic a 50 samců) pro každou úroveň dávky a souběžná kontrolní skupina. Je-li plánováno průběžné utrácení zvířat, počty je třeba zvýšit o počet zvířat, která budou takto utracena před koncem studie. Tyto počty zvířat v kombinaci s počtem parametrů při biochemickém a hematologickém vyšetření a zejména v kombinaci s rozsahem vyšetření histopatologických umožňují získat představu, jak je taková studie

náročná na čas, spotřebu materiálu, organizaci práce a erudici pracovníků, z čehož pak vyplynou příslušné náklady.

Pokud je známo s dostatečným předstihem, že studie karcinogenity bude požadována, je možno ji kombinovat se studií chronické toxicity (metoda B.33) a tak docílit částečné úspory nákladů.

Pitva a odběr orgánů pro histopatologické vyšetření:

Kompletní pitva by měla být provedena u všech zvířat, včetně těch, která zemřela během pokusu nebo byla utracena, protože byla nemocná. Všechny viditelné tumory nebo léze, nebo léze, které by mohly být tumory, je třeba uchovat.

Následující orgány a tkáně by měly být uchovány ve vhodných médiích pro možné budoucí histopatologické vyšetření: mozek (včetně řezů prodloužené míchy/mostu, mozečkové kory, kory mozkové), podvěsek mozkový, štítná žláza a příštítná tělíska, tkáň thymu, trachea a plíce, srdce, aorta, slinné žlázy, játra, slezina, ledviny, nadledviny, pankreas, gonády, děloha, akcesorní pohlavní orgány, kůže, jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, slepé střevo, tračník, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatická uzlina, samičí mléčná žláza, svalovina stehna, periferní nerv, sternum s kostní dřeví, stehenní kost včetně kloubu, mícha na třech úrovních (krční, střední hrudní a bederní) a oči. V inhalačních studiích by měl být uchován celý respirační trakt včetně nosní dutiny, hltanu a hrtanu.

Pravidla REACH

Studii karcinogenity může navrhnout žadatel o registraci nebo si ji může vyžádat v případě, že

- látka má široké použití nebo existují důkazy o časté nebo dlouhodobé expozici člověka,*
- látka je klasifikována jako mutagenní kategorie 3 nebo ze studií toxicity po opakovaných dávkách vyplývají důkazy, že látka může vyvolat hyperplazii nebo preneoplastické léze.*

Je-li látka klasifikována jako mutagenní kategorie 1 nebo 2, výchozí domněnka je, že genotoxický mechanismus pro karcinogenitu je pravděpodobný. V těchto případech se obvykle nebude vyžadovat zkouška karcinogenity.

EKOTOXIKOLOGICKÉ INFORMACE

Toxicita pro vodní prostředí (Aquatic toxicity)

Zkoušky subakutní toxicity na bezobratlých (upřednostňuje se rod *Daphnia*) (Short-term toxicity testing on invertebrates)

Metoda: C.2 Zkouška akutní imobilizace dafnií (*Daphnia sp.*) (C.2 *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test)

Identická metoda: OECD No.202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test

Princip:

Účelem této zkoušky je stanovit střední účinnou koncentraci látky pro imobilizaci (EC50) dafnií ve sladkovodním prostředí. Akutní toxicita se v této zkoušce vyjadřuje střední účinnou koncentrací látky pro imobilizaci (EC50) dafnií. Je to koncentrace (rozumí se výchozí koncentrace), která během nepřetržité expozice po určité stanovenou dobu imobilizuje 50 % dafnií ve zkušební skupině během doby působení (doby expozice).

Dafnie se 48 hodin exponují zkušební látce přidané v různých koncentracích do vody. Použije-li se kratší doba, zdůvodní se ve zprávě.

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg/l, s cílem prokázat, že EC50 je vyšší než tato koncentrace.

Provedení:

Látky se obvykle zkoušejí až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou rozdělovacího koeficientu oktanol/voda, nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stabilní disperse než pravé roztoky) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stabilitě. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícímu oksličení vody atd.).

Zvolené zkušební koncentrace se připraví ředěním zásobního roztoku. Jsou-li zkoušeny vysoké koncentrace látky, lze látku rozpustit přímo v ředící vodě.

Přednost se dává druhu *Daphnia magna*, ačkoliv se připouští také druh *Daphnia pulex*. Testovací dafnie musí být na začátku zkoušky mladší než 24 hodin, musí být laboratorně odchované, bez zjevných nemocí a musí být známého původu (např. chov, předchozí ošetření, atd.).

Pro tuto zkoušku se použije upravená voda podle ISO 6341.

Před vlastní zkouškou může být provedena předběžná zkouška s cílem získat informace o rozsahu koncentrací, které mají být použity v hlavní zkoušce.

Kromě sérií zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkušební látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou.

Dafnie se exponují zkušební látce následujícím způsobem:

- délka expozice: 48 hodin,
- počet dafnií: nejméně 20 na každou zkušební koncentraci, nejlépe rozdělených na čtyři skupiny po pěti dafniích nebo na dvě skupiny po 10 dafniích,
- obsádka: na každou dafnií by měly připadat 2 ml zkušebního roztoku,
- zkušební koncentrace: zkušební roztok se připraví bezprostředně před nasazením dafnií, nejlépe bez použití jiného rozpouštědla než vody.

Připraví se koncentrace tvořící geometrickou řadu, přičemž poměr mezi koncentracemi nesmí být vyšší než 2,2. Zároveň s kontrolami se zkoušejí koncentrace dostatečné pro to, aby po 48 hodinách vyvolaly nulovou a 100% imobilizaci, a dále mezilehlé koncentrace umožňující výpočet 48 hodinovou EC50.

Kritéria kvality:

Kritéria kvality se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na úplný zkušební postup.

- Imobilizace v kontrolních zkouškách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 %.
- Dafnie se v kontrolních zkouškách nesmí trvale zdržovat u hladiny.

- Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve zkušební nádrži musí být po celou dobu zkoušky vyšší než 3 mg/l. Koncentrace kyslíku však nesmí v žádném případě klesnout pod 2 mg/l.

Koncentrace zkušební látky nesmí po celou zkoušku klesnout pod 80 % původní hodnoty koncentrace. U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají stabilní roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, hydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy. Dodržení koncentrací uvedených výše musí být po dobu zkoušky analyticky monitorováno. Použitá analytická metoda musí být validována pro stanovený účel v potřebném rozsahu.

Výsledky a hodnocení:

Pokud je to možné, odhadnou se pro každé pozorovací období EC50 a meze spolehlivosti ($p = 0,05$); tyto hodnoty se zaokrouhlí na jednu nebo nejvýše na dvě platné číslice.

V případech, kdy je sklon křivky závislosti mortality v procentech na koncentraci látky příliš strmý, aby umožnil výpočet hodnoty EC50, postačuje grafický odhad této hodnoty. Jestliže dvě po sobě jdoucí koncentrace, lišící se faktorem 2,2, vyvolají nulovou a 100% imobilizaci, jsou dostatečnou informací o rozpětí, ve kterém EC50 leží.

Zjistí-li se, že není možné udržet stabilitu nebo homogenitu zkušební látky, uvede se to ve zprávě a výsledky se interpretují s opatrností.

Závěry:

- hodnoty EC50 při každé z doporučených dob pozorování (při 95% intervalu spolehlivosti),
- použité statistické metody stanovení hodnot EC50,
- při použití referenční látky údaj o získaných výsledcích,
- nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky imobilizaci,
- nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100% imobilizaci.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud

- *existují polehčující faktory, které naznačují, že toxicita pro vodní prostředí není pravděpodobná, například je-li látka vysoce nerozpustná ve vodě nebo není pravděpodobné, že by látka pronikla biologickými membránami nebo*
- *je k dispozici studie chronické toxicity pro vodní prostředí provedená na bezobratlých nebo*
- *jsou k dispozici příslušné informace pro environmentální klasifikaci a označení.*

Studie inhibice růstu vodních rostlin (upřednostňují se řasy)

(Growth inhibition study aquatic plants)

Metoda: C.3 Zkouška inhibice růstu řas (C.3 Algal Inhibition Test)

Identická metoda: OECD No.201: Alga, Growth Inhibition Test

Princip:

Účelem této zkoušky je stanovit účinky látky na růst jednobuněčných zelených řas. Relativně krátkodobými zkouškami (72 hodin) lze posoudit účinky na několik generací řas. Exponenciálně rostoucí kultury vybraných zelených řas jsou po několik generací vystaveny za definovaných podmínek různým koncentracím zkušební látky.

Zkušební roztoky se kultivují 72 hodin, během nichž se alespoň každých 24 hodin měří hustota buněk v každém roztoku. Stanoví se snížení růstu ve srovnání s kontrolní kulturou.

V této zkoušce se akutní toxicita vyjadřuje prostřednictvím střední letální koncentrace (LC50).

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg/l, s cílem prokázat, že EC50 je vyšší než tato koncentrace.

Definice:

Hustota buněk: počet buněk na jeden mililitr

Růst: zvyšování hustoty buněk během doby trvání zkoušky

Růstová rychlost: nárůst hustoty buněk za jednotku času

EC50: koncentrace zkušební látky, která má za následek 50% snížení růstu (EbC50) nebo růstové rychlosti (ErC50) vzhledem ke kontrole

NOEC („No Observed Effect Concentration“): nejvyšší zkoušená koncentrace, při níž není pozorováno žádné významné snížení růstu nebo růstové rychlosti ve srovnání s kontrolou.

Provedení:

Látky se obvykle zkouší až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou rozdělovacího koeficientu oktanol/voda, nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stabilní disperse než pravé roztoky) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stabilitě. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícímu okysličení vody atd.). Pro přípravu zásobních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo pro usnadnění rozptýlení látky ve zkušebním médiu lze použít ultrazvukovou dispergaci, organická rozpouštědla či emulgátory nebo dispergátory. Zásobní roztoky o požadované koncentraci se připraví rozpuštěním látky v použitém zkušebním médiu. Zvolené zkušební koncentrace testované látky se připraví přidáním vhodného alikvotního podílu k předkulturám řas.

Pro zkoušku se používá speciální médium (upravená voda), jehož složení je dáno metodikou. Je doporučeno použít rychle rostoucí druhy zelených řas vhodné pro kultivaci a zkoušení. Dává se přednost následujícím druhům: *Selenastrum capricornutum* a *Scenedesmus subspicatus*.

Koncentrační rozmezí, ve kterém lze očekávat účinky, se určí na základě výsledků orientačních zkoušek.

Dva parametry, jež jsou mírou růstu (biomasa a růstová rychlost), mohou poskytovat zcela rozdílné hodnoty snížení růstu. V orientační zkoušce by měly být použity oba parametry, aby mohlo zajištěno, že geometrická řada koncentrací umožní odhadnout jak EbC50, tak ErC50.

Doporučuje se, aby byla počáteční hustota buněk řasy *Selenastrum capricornutum* a řasy *Scenedesmus subspicatus* ve zkušebních roztocích přibližně 104 buněk na ml. Použije-li se jiný druh řasy, měla by být biomasa srovnatelná.

Kultivační baňky se protřepou a umístí se do kultivačního zařízení. Buňky řas se udržují v suspensi třepáním, mícháním nebo probubláváním vzduchem, aby se zlepšila výměna plynů a zmenšilo se kolísání pH ve zkušebních roztocích. Kultury se udržují při teplotě 21 – 25 °C.

Hustota buněk v každé baňce se stanoví nejméně po 24, 48 a 72 hodin po zahájení zkoušky. Používá-li se měření hustoty buněk jiná metoda, než je jejich přímé počítání, použije se ke stanovení pozadí filtrované médium pro kultivaci řas obsahující odpovídající koncentraci zkušební látky. pH se měří na začátku zkoušky a po 72 hodinách

Pro zkoušku se připraví geometrická řada nejméně pěti koncentrací testované látky lišících se od sebe vždy faktorem nepřekračujícím 2,2. Nejnížší zkoušená koncentrace by neměla vykazovat žádný pozorovatelný účinek na růst řas. Nejvyšší zkoušená koncentrace by měla omezit růst ve srovnání s kontrolní zkouškou nejméně o 50 %, nejlépe by měla růst zcela zastavit.

Plán zkoušky by měl zahrnovat 3 opakování s každou zkušební koncentrací. Dále se provedou 3 kontroly bez zkušební látky, a je-li použita pomocná látka, též 3 kontroly s touto látkou. Je-li pro to důvod, může být plán zkoušky upraven tak, že se použije více koncentračních úrovní a sníží se počet opakování zkoušky s každou koncentrací.

Kritéria kvality:

Kritéria kvality se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na celý zkušební postup.

- Hustota buněk v kontrolních kulturách by se měla za 3 dny zvýšit alespoň šestnáctkrát.
- Koncentrace zkušební látky nesmí po celou dobu zkoušky klesnout pod 80 % původní hodnoty koncentrace. U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají

stabilní roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy. Dodržení koncentrací uvedených výše musí být po dobu zkoušky analyticky monitorováno. Použitá analytická metoda musí být validována pro stanovený účel v potřebném rozsahu.

Výsledky a hodnocení:

Naměřené hustoty buněk ve zkušební kultuře a v kontrolách se spolu s koncentracemi zkušební látky a dobami měření shrnou do tabulky. Střední hodnota hustoty buněk pro každou zkušební koncentraci a pro kontroly se vynese proti času (0 – 72 hodin) a sestrojí se růstová křivka.

Některé látky mohou růst při nízkých koncentracích stimulovat. V úvahu by měla být vzata pouze data udávající potlačení růstu mezi 0 a 100 %.

Vztah koncentrace/účinek se stanoví dvěma následujícími postupy:

- a) Porovnání ploch pod růstovými křivkami,
- b) Porovnání růstových rychlostí.

Hodnota koncentrace nezpůsobující žádné pozorovatelné účinky (NOEC) se stanoví vhodnou statistickou metodou pro srovnávání více vzorků (např. analýza rozptylu a Dunnettův test) s využitím jednotlivých hodnot ploch pod růstovými křivkami nebo specifických růstových rychlostí.

Závěry:

- růstové křivky,
- grafické znázornění vztahu koncentrace – účinek,
- hodnoty EC a metoda výpočtu,
- hodnoty NOEC.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, existují-li polehčující faktory, které naznačují, že toxicita pro vodní prostředí není pravděpodobná, například je-li látka vysoce nerozpustná ve vodě nebo není-li pravděpodobné, že by látka pronikla biologickými membránami.

Studie subakutní toxicity na rybách (Short-term toxicity testing on fish)

Metoda: C.1 Akutní toxicita pro ryby (C.1 Acute Toxicity for Fish)

Identická metoda: OECD No.203: Fish, Acute Toxicity Test

Princip:

Účelem této zkoušky je stanovit akutní letální toxicitu látek pro sladkovodní ryby.

Akutní toxicitou se rozumí zřetelný nepříznivý účinek, který je v krátké době (řádově ve dnech) v organismu vyvolán expozicí látky. Akutní toxicita je vyjádřena prostřednictvím střední letální koncentrace (LC50), tj. takové koncentrace látky ve vodě, která během nepřetržité expozice po určitou dobu způsobí úhyn 50 % jedinců ve zkušební skupině ryb. Ryby se vystaví účinku různým koncentracím zkušební látky přidané do vody po dobu 96 hodin. Úhyn se zaznamenává nejméně každých 24 hodin a je-li to možné, vypočtou se při každém pozorování koncentrace, které způsobí úhyn 50 % ryb (LC50).

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg/l, s cílem prokázat, že EC50 je vyšší než tato koncentrace.

Provedení:

Látky se obvykle zkouší až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou rozdělovacího koeficientu oktanol/voda nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stabilní disperse než pravé roztoky) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stabilitě. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícímu okysličení vody atd.). Pro přípravu zásobních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo pro usnadnění rozptýlení látky ve zkušebním médiu lze použít ultrazvukovou dispergaci, organická rozpouštědla či emulgátory nebo dispergátory.

Pro zkoušku může být použita pitná voda (nekontaminovaná potenciálně škodlivými koncentracemi chloru, těžkých kovů nebo jiných látek), kvalitní přírodní voda nebo upravená voda (ISO 6341). Upřednostňuje se voda o celkové tvrdosti od 10 do 250 mg/l (vztaženo na CaCO₃) a pH od 6,0 do 8,5.

Ryby by měly být zdravé a bez zjevných malformací. Při výběru druhu ryb by měla být zohledněna potřeba srovnatelnosti získaných dat a mezinárodní harmonizace.

Před vlastní zkouškou může být provedena předběžná zkouška s cílem získat informace o rozsahu koncentrací, které mají být použity v hlavní zkoušce. Kromě sérií zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkušební látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou. V závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech zkušební látky se zvolí statická, semistatická nebo průtoková zkouška, aby byla splněna kritéria kvality.

Ryby se exponují zkušební látce za níže uvedených podmínek:

- délka expozice: 96 hodin,
- počet ryb: nejméně 7 na každou koncentraci,
- nádrže: vhodný objem vzhledem k doporučené obsádce,
- obsádka: pro statickou a semistatickou zkoušku se doporučuje 1,0 g na litr; v průtokovém systému je přijatelná vyšší obsádka,
- zkušební koncentrace: nejméně 5 koncentrací, které jsou odstupňovány faktorem nepřevyšujícím 2,2 a které pokrývají rozsah mortality od 0 % do 100 %.

Kritéria kvality:

Kritéria kvality se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na úplný zkušební postup.

- Mortalita v kontrolních skupinách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 % (nebo jednu rybu, pokud se použije méně než deset ryb).
- Koncentrace rozpuštěného kyslíku musí být po celou dobu zkoušky vyšší než 60 % hodnoty nasycení vzduchem.

- Koncentrace zkušební látky nesmí po celou zkoušku klesnout pod 80 % původních hodnot koncentrací. U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají stabilní roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy a že kritéria jakosti byla dodržena.

Dodržení koncentrací uvedených výše musí být po dobu zkoušky analyticky monitorováno

Použitá analytická metoda musí být validována pro stanovený účel v potřebném rozsahu.

Výsledky a hodnocení:

Pokud je to možné, odhadnou se standardními postupy pro každou délku expozice hodnoty LC50 a meze spolehlivosti ($p = 0,05$); tyto hodnoty se zaokrouhlí na jednu nebo nejvýše na dvě platné číslice.

V případech, kdy je sklon křivky závislosti mortality v procentech na koncentraci látky příliš strmý, aby umožnil výpočet hodnoty LC50, postačuje grafický odhad této hodnoty. Jestliže dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 2,2 vyvolají mortalitu 0 a 100 %, jsou dostatečnou informací o tom, že se LC50 nachází mezi těmito hodnotami. Zjistí-li se, že není možné udržet stabilitu nebo homogenitu zkušební látky, uvede se to ve zprávě a výsledky se interpretují s opatrností.

Závěry:

- hodnoty EC50 při každé z doporučených dob pozorování (při 95% intervalu spolehlivosti),
- použité statistické metody stanovení hodnot EC50,
- při použití referenční látky údaj o získaných výsledcích,
- nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky imobilizaci,
- nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100% imobilizaci.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud

- *existují polehčující faktory, které naznačují, že toxicita pro vodní prostředí není pravděpodobná, například je-li látka vysoce nerozpustná ve vodě nebo není pravděpodobné, že by látka pronikla biologickými membránami, nebo*
- *je k dispozici studie chronické toxicity pro vodní prostředí provedená na rybách.*

Zkoušky inhibice respirace aktivovaného kalu (Activated sludge respiration inhibition testing)

Metoda: C.11 Biologická rozložitelnost – Zkouška na inhibici dýchání aktivovaného kalu (C.11 Biodegradation – Activated Sludge Respiration Inhibition)

Identická metoda: OECD No.209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test

Princip:

Metoda hodnotí vliv zkoušené látky na mikroorganismy měřením intenzity jejich dýchání za definovaných podmínek v přítomnosti různých koncentrací zkoušené látky. Účelem této metody je poskytnout rychlou vyhledávací metodu, kterou je možné určit látky, které mohou nepříznivě ovlivnit aerobní mikrobiální čistírny vod, a naznačit vhodné koncentrace zkoušených látek, které nejsou inhibující a které je možno použít ve zkouškách biologické rozložitelnosti.

Rychlost dýchání aktivovaného kalu vyživovaného standardním množstvím syntetické odpadní vody se měří po době kontaktu 30 minut, 3 hodiny nebo v obou časech. Měří se také rychlost dýchání téhož aktivovaného kalu v přítomnosti různých koncentrací zkoušené látky za stejných podmínek.

Inhibiční efekt zkoušené látky při určité koncentraci se vyjadřuje jako procento průměrné rychlosti dýchání ze dvou kontrolních pokusů. Hodnota EC50 se vypočítá ze stanovení při různých koncentracích.

Definice:

Respirační rychlost je spotřeba kyslíku mikroorganismy odpadních vod v aerobním kalu, obecně vyjádřená jako mg O₂ na 1 mg kalu za hodinu.

EC50 je koncentrace zkoušené látky, při které respirační rychlost činí 50 % hodnoty vycházející z kontrolní zkoušky za podmínek popsanych v této metodě.

Provedení:

Jako mikrobiální inokulum pro zkoušku se používá aktivovaný kal z čistírny odpadních vod čistící převážně domovní odpadní vody.

Trvání/doba kontaktu: 30 minut a (nebo) 3 hodiny, během kterých probíhá provzdušňování

Voda: Pitná voda (v případě potřeby zbavená chlóru)

Přívod vzduchu: Čistý vzduch, prostý oleje, průtok 0,1 – 1 l/min

Měřicí aparatura: Baňka s plochým dnem

Měřič obsahu kyslíku: Vhodná kyslíková elektroda, se zapisovačem

Živný roztok: Syntetická odpadní voda

Zkoušená látka: Roztok zkoušené látky se připraví čerstvý na začátku zkoušky

Referenční látka: např. 3,5-dichlorfenol (nejméně 3 koncentrace)

Kontrolní zkouška: Roztok s kalem bez zkoušené látky

Teplota: 20 ± 2 °C

Používané koncentrace: Alespoň 5 koncentrací, odstupňovaných o konstantní faktor nepřevyšující pokud možno 3,2.

Kritéria kvality:

Výsledky zkoušky jsou platné, jestliže:

- respirační rychlosti dvou kontrolních pokusů se od sebe liší nejvýše o 15 %

- EC50 (pro 30 minut nebo pro 3 hodiny) 3,5- dichlorfenolu leží v přijatém rozmezí 5 – 30 mg/l.

Výsledky a vyhodnocení:

Rychlost dýchání se vypočítá mezi přibližně 6,5 mg/l a 2,5 mg/l, nebo za 10 minutovou periodu, je-li rychlost dýchání nízká. Část respirační křivky, ze které se vyhodnocuje rychlost dýchání, musí být lineární.

Pro každou zkušenskou koncentraci se vypočte inhibice v %. Inhibice v % se vynese graficky proti koncentraci a odečte se hodnota EC50.

Standardními postupy je možné stanovit pro hodnoty EC50 95% meze spolehlivosti.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud

- *nedochází k emisím do čistíren odpadních vod nebo*
- *existují polehčující faktory, které naznačují, že mikrobiální toxicita není pravděpodobná, například*
 - *látka je vysoce nerozpustná ve vodě, nebo*
 - *se u látky zjistí, že je snadno biologicky rozložitelná a použité koncentrace při zkoušce jsou v rozmezí koncentrací, jež lze předpokládat v přítoku do čistírny odpadních vod.*

Studii je možné nahradit zkouškou inhibice nitrifikace, pokud dostupné údaje prokazují, že látka je pravděpodobně inhibitorem růstu nebo funkce mikroorganismů, zejména nitrifikačních bakterií.

Zkoušky chronické toxicity na bezobratlých (upřednostňuje se rod *Daphnia*) (**Long-term toxicity testing on invertebrates**)

Metoda: C.20 Zkouška toxicity pro reprodukci *Daphnia magna* (C.20 *Daphnia magna* Reproduction Test)

Identická metoda: OECD No.211: *Daphnia magna* Reproduction Test

Princip metody:

Mladé samičí dafnie (matečné organismy) na začátku zkoušky mladší než 24 hodin se exponují zkoušené látce přidané do vody v určitém rozsahu koncentrací. Zkouška trvá 21 dní. Na konci zkoušky se odhadne celkový počet vylíhnutých živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu, který přežil do konce zkoušky. To znamená, že nedospělé dafnie pocházející z dospělých dafnií, které v průběhu zkoušky uhynuly, se z odhadů vyloučí. Reprodukční schopnost matečných organismů lze vyjádřit jiným způsobem (např. jako počet živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu za den, a to od prvního dne, kdy bylo potomstvo pozorováno), který se však uvede doplňkově vedle celkového počtu nedospělých dafnií pocházejících z jedné matečné dafnie živé na konci zkoušky.

Reprodukční schopnost organismů exponovaných zkoušené látce se porovná s reprodukční schopností kontrolní skupiny (kontrolních skupin) s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky (LOEC) a tím i koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC). Kromě toho se data pokud možno analyzují pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která vyvolává x% snížení reprodukční schopnosti, (tj. EC50, EC20 nebo EC10).

Musí být rovněž uvedeno přežití matečných organismů a okamžik vylíhnutí prvních potomků. Zkoumány mohou být také jiné účinky vyvolané látkou, které mají vliv na charakteristiky, jako jsou růst (např. vliv na délku) a případně vnitřní míra růstu populace.

Definice:

Matečné organismy: dafnie samičího pohlaví, které jsou přítomné na začátku zkoušky, a jejich reprodukční schopnost je předmětem studie.

Potomstvo: mladé dafnie pocházející z matečných organismů v průběhu zkoušky.

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (lowest observed effect concentration, LOEC): je nejnižší zkoušená koncentrace, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek látky na reprodukci a na mortalitu matečných organismů (na úrovni pravděpodobnosti falešně pozitivního hodnocení $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolní skupinou, v průběhu stanovené expoziční doby. Všechny zkoušené koncentrace vyšší než LOEC musí mít stejné nebo vážnější škodlivé účinky, než účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (no observed effect concentration, NOEC): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolní skupinou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek ($p < 0,05$).

EC_x: je koncentrace zkoušené látky rozpuštěné ve vodě, která pro danou expoziční dobu vede k x% snížení reprodukce dafnií *Daphnia magna*.

Vnitřní míra růstu populace: je míra růstu populace, v níž je zahrnuta reprodukční schopnost a mortalita specifická z hlediska stáří (20, 21, 22). V ustáleném stavu bude nulový. Pro rostoucí populaci bude kladný a pro snižující se populaci bude záporný. Je zřejmé, že při záporném růstu nelze druh zachovat a nakonec dojde k jeho vyhynutí.

Mez detekovatelnosti: je nejnižší koncentrace, v níž lze látku detekovat, nikoli však stanovit.

Mez stanovitelnosti: je nejnižší koncentrace, v níž lze látku kvantitativně naměřit.

Mortalita: organismus se zaznamená jako mrtvý, je-li nepohyblivý, tj. není-li schopen plavat nebo není-li u končetin (přívěsků) nebo u postabdomen pozorován pohyb do 15 sekund po lehkém zatřepání zkušební nádobou.

Provedení:

Ke zkoušce se použije druh *Daphnia magna* Straus. Použijí-li se jiné druhy dafnií, musí být jasně identifikovány a jejich použití musí být zdůvodněno.

Na začátku zkoušky musí být dafnie 24 hodin staré a nesmí být první generací. Musí pocházet ze zdravé kultury. Organismy ze zásobní kultury musí být chovány v podmínkách podobným těm, které mají být použity při zkoušce (osvětlení, teplota, médium, krmení a počet dafnií na jednotku objemu).

Doporučuje se, aby bylo použito přesně definované médium. Tím se lze vyhnout použití přísad, které je obtížné charakterizovat (např. mořských řas, půdy, extraktu atd.) a zvýšit vyhlídky mezilaboratorní standardizace. Jako vyhovující pro tento účel byla shledána Elendtova média M4 a M7.

Aby bylo možné splnit požadavky analytické metody použité pro stanovení koncentrace zkoušené látky, může být v některých případech nezbytné použít větší objemy, přípustné je rovněž sdružování paralelních vzorků k chemické analýze. Jsou-li použity objemy větší než

100 ml, může být nezbytné zvýšit krmné dávky podávané dafniím, aby se zajistila odpovídající dostupnost stravy a splnila kritéria validity.

U průtokových zkoušek mohou být z technických důvodů zvážena jiná uspořádání (např. 4 skupiny po 10 organismech ve větším zkušebním objemu).

U semistatických zkoušek se nasadí jednotlivě alespoň 10 organismů pro každou zkušební koncentraci a alespoň 10 organismů jednotlivě do zkušebních skupin.

U průtokových zkoušek se ukázalo vhodným rozdělit pro každou koncentraci 40 organismů do čtyř skupin po 10 organismech. Může být použit menší počet zkušebních organismů, přičemž se doporučuje na 1 koncentraci rozdělit minimálně 20 organismů do 2 nebo více paralelních skupin o stejném počtu organismů (např. 4 paralelní skupiny po 5 dafniích). U zkoušek, při níž se organismy nasazují jako skupiny, nebude však možné vyjádřit reprodukční schopnost jako počet živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu, který přežil do konce zkoušky v případě, že matečný organismus uhyne. V takovém případě se reprodukční schopnost vyjádří jako „celkový počet živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu přítomného na začátku zkoušky“.

Volba koncentrací:

Zpravidla se použije alespoň 5 zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2 a přiměřený počet paralelních zkušebních skupin v rámci každé zkušební koncentrace. Látky by neměly být zkoušeny pro koncentrace vyšší, než je jejich rozpustnost ve zkušebním médiu. Při volbě rozsahu koncentrací by měly být zohledněny následující zásady:

- a) Je-li cílem získat LOEC/NOEC, musí být nejnižší zkušební koncentrace dostatečně nízká, aby nebyla plodnost při této koncentraci významně nižší, než plodnost v kontrolní skupině. V opačném případě bude muset být zkouška opakována se sníženou nejnižší koncentrací;
- b) Je-li cílem získat LOEC/NOEC, musí být nejvyšší zkušební koncentrace dostatečně vysoká, aby byla plodnost při této koncentraci významně nižší, než plodnost v kontrolní skupině. V opačném případě bude muset být zkouška opakována se zvýšenou nejvyšší koncentrací;

c) Má-li být pro účinky na reprodukci odhadnuta EC_x, doporučuje se, aby byl použit dostatečný počet koncentrací s cílem zjistit EC_x s přijatelným intervalem spolehlivosti. Je-li znám odhad EC₅₀ pro účinky na reprodukci, doporučuje se, aby byla nejvyšší zkušební koncentrace vyšší než tato EC₅₀.

d) Do rozsahu zkušebních koncentrací by nejlépe neměly spadat koncentrace, které mají statisticky významný účinek na přežití dospělých, neboť by mohl být změněn charakter zkoušky z pouhé zkoušky toxicity pro reprodukci na kombinovanou zkoušku toxicity pro reprodukci a mortality, která vyžaduje daleko složitější statistickou analýzu.

Měřené parametry:

- Alespoň jednou týdně se měří koncentrace kyslíku, teplota, tvrdost a pH v čerstvém a ve starém médiu, v kontrolních nádobách a u nejvyšší zkušební koncentrace.
- Během zkoušky se v pravidelných intervalech stanoví koncentrace zkoušené látky.

U semistatických zkoušek (s obnovením média), u nichž se má zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí +/-20 % nominálních hodnot (tj. od 80 do 120 %), se doporučuje analyzovat alespoň nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace na začátku studie ihned po jejich přípravě a při obnovování, a to jednou během prvního týdne zkoušky (tj. analýzy se provedou na vzorku z téhož roztoku - při jeho přípravě a při obnovování). Tato stanovení se poté opakují alespoň v týdenních intervalech.

U průtokových zkoušek je vhodný podobný vzorkovací režim, jako je popsán u semistatických zkoušek (v tomto případě se však neprovádí měření „starých“ roztoků). Doporučuje se však zvýšit počet odběrů v 1. týdnu (např. 3 sady měření) pro ujištění, že jsou zkušební koncentrace stálé. V těchto typech zkoušky se průtok ředící vody a zkoušené látky kontroluje denně.

Kritéria kvality:

U kontrolní skupiny (kontrolních skupin) musí být splněna tato kritéria reprodukční schopnosti:

- mortalita matečných organismů (dafnií samičího pohlaví) nesmí na konci zkoušky překročit 20 %,

- střední hodnota počtu živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu živého na konci zkoušky je minimálně 60.

Výsledky:

Výsledky zkoušek zahrnují:

- nominální zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace; zkoušené látky ve zkušebních nádobách; uvede se také výtěžek metody a mez stanovitelnosti
- kvalitu vody ve zkušebních nádobách (tj. pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a TOC (celkový organický uhlík) a/nebo CHSK a dále podle potřeby tvrdost);
- celkový počet živých potomků na každý matečný organismus;
- počet uhynulých matečných organismů a den, kdy k úhynu došlo;
- variační koeficient kontrolní reprodukční schopnosti (založený na celkovém počtu živých potomků na matečný organismus, který přežil do konce zkoušky);
- křivku závislosti celkového počtu živých potomků na matečný organismus, který přežil do konce zkoušky (pro každou paralelní nádobu), na koncentraci zkoušené látky;
- nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) na reprodukci včetně popisu použitých statistických metod a údaje o velikosti účinku, který by mohl být detekován, a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) na reprodukci; jeli k dispozici, uvede se LOEC/NOEC pro mortalitu matečných organismů;
- je-li k dispozici, EC_x pro reprodukci a interval spolehlivosti, dále graf křivky modelu použitého pro její výpočet, směrnice křivky závislosti dávka-reakce a její směrodatná odchylka.

Hodnocení:

Účelem této zkoušky je stanovit účinek zkoušené látky na celkový počet živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu, který přežil do konce zkoušky. Celkový počet potomků na matečný organismus se vypočte pro každou zkušební nádobu (tj. pro každou

paralelní nádobu). Jestliže v kterékoli paralelní nádobě matečný organismus během zkoušky uhynie nebo se zjistí, že jde o samečka, vyloučí se nádoba z experimentu. Analýza se poté provede se zmenšeným počtem paralelních nádob.

Pro odhad LOEC a tedy i NOEC, vztahujících se k účinkům chemické látky na reprodukční schopnosti, je nezbytné vypočítat střední hodnotu reprodukční schopnosti přes všechny paralelní nádoby pro každou koncentraci a spojený residuální rozptyl, a to lze provést analýzou rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci musí být poté porovnána se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou metodou mnohonásobného porovnání. Užitečnými mohou být Dunnettův nebo Williamsův test. Je nezbytné ověřit, že je splněn předpoklad homogenity rozptylu nezbytný pro ANOVA. Doporučuje se provést ověření raději graficky než formálním testem významnosti; vhodnou alternativou je Bartlettův test.

Pro odhad koncentrace, která způsobuje 50% snížení reprodukční schopnosti (tj. EC50), se daty proloží vhodná křivka (vhodné křivky), jako např. logaritmická křivka, a to statistickou metodou, např. metodou nejmenších čtverců nebo nelineární metodou nejmenších čtverců. Křivka by měla být tak parametrizována, aby bylo možné přímo odhadnout EC50 a její směrodatnou odchylku.

Zkoušky chronické toxicity na rybách (Long-term toxicity testing on fish)

Existují 3 zkoušky, pomocí nichž lze stanovit chronickou toxicitu na rybách.

- 1) FELS test (viz dále 9.1.6.1)
- 2) Testy na embryích (viz dále 9.1.6.2)
- 3) Testy na nedospělých rybách (viz dále 9.1.6.3)

Pravidla REACH

Vybere se jedna ze zkoušek uvedených v bodech 9.1.6.1, 9.1.6.2, 9.1.6.3.

Zkouška toxicity u ryb v raných vývojových stádiích (FELS) (Fish early-life stage (FELS) toxicity test)

Metoda:

Metoda není uvedena v nařízení REACH o testovacích metodách.

Existuje metoda: OECD No.210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test

Princip:

Ryby v ranných vývojových stádiích jsou exponovány látkou ve vhodném koncentračním rozmezí. Látka je rozpuštěna ve vodě, test probíhá nejlépe za průtokových podmínek, nebo (když je to vhodné) za semistatických podmínek. Test je zahájen umístěním oplodněných vajíček do testovacích nádobek a pokračuje až do vylíhnutí ryb. Jsou zjišťovány letální a subletální účinky a srovnány s kontrolními hodnotami ke zjištění LOEC (lowest observed effect concentration) a dále NOEC (no observed effect concentration).

Zkouška subakutní toxicity na rybních embryích a plůdcích se žloutkovým váčkem (Fish short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages)

Metoda: C.15 Zkouška krátkodobé toxicity na rybním embryu a váčkovém plůdku (C.15 Fish, Short – term Toxicity Test on *Embryo* and Sac-Fry Stages)

Identická metoda: OECD No.212: Fish, Short – term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages

Princip:

Rybní embrya a váčkové plůdky se vystaví rozsahu koncentrací zkoušené látky rozpuštěné ve vodě. Zkouška umožňuje volit mezi semistatickým a průtokovým uspořádáním. Volba závisí na povaze zkoušené látky. Zkouška se zahájí umístěním oplodněných jiker do zkušebních nádrží a ukončí se těsně před tím, než dojde k úplné absorpci žloutkového váčku čerstvých plůdků v některé ze zkušebních nádrží, nebo než začne v kontrolních skupinách docházet k úhynu v důsledku hladovění. Posoudí se letální a subletální účinky a porovnájí se s hodnotami kontrolních skupin s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky,

a tedy koncentraci bez pozorovaných účinků. Mohou být popřípadě analyzovány za použití regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která způsobuje určitý procentuálně vyjádřený účinek (tj. LC/EC_x, kde x je definovaný procentuální účinek).

Růstová zkouška na nedospělých rybách (Fish, juvenile growth test)

Metoda: C.14 Růstová zkouška na nedospělých rybách (C.14 Fish Juvenile Growth Test)

Identická metoda: OECD No.215: Fish, Juvenile Growth Test

Princip:

Zkouška je určena k posouzení účinků dlouhodobé expozice chemickým látkám na růst nedospělých ryb. Je založena na metodě pro posouzení účinků chemických látek na růst nedospělého pstruha duhového (*Onchorynchus mykiss*) při průtokových podmínkách. Mohou být použity také jiné dobře popsání druhy. Byly například získány zkušenosti z růstových zkoušek s daniem pruhovaným (*Danio rerio*) a halančíkem japonským (*Oryzias latipes*).

Provedení:

Nedospělé ryby v exponenciální fázi růstu se po zvážení umístí do zkušebních nádrží a vystaví se řadě subletálních koncentrací zkoušené látky přednostně za průtokových podmínek, nebo pokud to není možné, za vhodných semistatických podmínek (statické podmínky s obnovováním média). Zkouška trvá 28 dnů. Ryby se krmí denně. Přísun potravy se řídí počáteční hmotností ryb a může být po 14 dnech nově vypočten. Na konci zkoušky se ryby opět zváží. Účinky na rychlost růstu se analyzují pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která vyvolává x % změnu rychlosti růstu, tj. EC_x (např. EC₁₀, EC₂₀, nebo EC₃₀). Údaje mohou být popřípadě porovnány s hodnotami pro kontrolní skupiny s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky (LOEC), a tím i koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC).

Rozklad (Degradation)**Biotický rozklad (Biotic degradation)****Snadná biologická rozložitelnost (Ready biodegradability)**

Metody: C.4 Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti (C.4 Determination of „Ready“ Biodegradability)

Identická metoda: OECD No.301: Ready Biodegradability

Je popsáno šest metod, které umožňují screeningové posouzení snadné biologické rozložitelnosti chemických látek v aerobním vodním prostředí:

a) Zkouška na úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC) (metoda C.4-A) (DOC Die-Away Test (Method C.4-A))

b) Modifikovaná screeningová zkouška OECD – na úbytek DOC (metoda C.4-B) (Modified OECD Screening Test (Method C.4-B))

c) Zkouška na uvolňování oxidu uhličitého (CO₂) (modifikovaná Sturmova zkouška) (metoda C.4-C) (CO₂ Evolution Test (Method C.4-C))

d) Zkouška manometrickou respirometrií (metoda C.4-D) (Manometric Respirometry Test (Method C.4-D))

e) Zkouška v uzavřených lahvičkách (metoda C.4-E) (Closed Bottle Test (Method C.4-E))

f) zkouška MITI (metoda C.4-F) (M.I.T.I. TEST (Method C.4-F))

Princip zkušebních metod:

Roztok nebo suspence zkoušené látky v minerálním prostředí se inokuluje a kultivuje v aerobních podmínkách v temnu nebo v difuzním světle. Množství DOC (rozpuštěného organického uhlíku) ve zkušebním roztoku pocházející z inokula se musí udržovat ve srovnání s DOC pocházejícího ze zkoušené látky co nejnižší. Endogenní aktivita inokula se zohlední na základě souběžné slepé zkoušky s inokulem, avšak bez zkoušené látky, třebaže endogenní aktivita buněk v přítomnosti látky přesně neodpovídá aktivitě v endogenní

kontrolní zkoušce. Za účelem kontroly postupu se souběžně provádí zkouška s referenční látkou.

Obecně se rozklad sleduje stanovením parametrů jako DOC, tvorba CO₂ nebo spotřeba kyslíku a měření se provádějí v dostatečně krátkých intervalech, aby bylo možné identifikovat začátek a konec biologického rozkladu. Měření automatickými respirometry je kontinuální. Někdy se doplňkově k jinému parametru měří DOC, avšak obvykle pouze na začátku a na konci zkoušky. Lze rovněž použít specifickou chemickou analýzu, kterou se vyhodnotí primární rozklad zkoušené látky nebo kterou se stanoví koncentrace kteréhokoli

vzniklého meziprojektu (ve zkoušce MITI povinné).

Zkouška obvykle trvá 28 dnů. Je však možné ukončit měření před uplynutím 28 dní, tj. jakmile vykazuje křivka biologického rozkladu plató po tři po sobě následující měření. Je také možné měření po 28 dnech prodloužit, jestliže z křivky vyplývá, že biologický rozklad začal, avšak 28. dne ještě nebylo ještě dosaženo plató.

Kritéria kvality:

- Vzhledem k charakteru biologického rozkladu a směsných populací bakterií používaných jako inokula se stanovení provádějí nejméně duplicitně.
- Zkouška se považuje za platnou, je-li na konci zkoušky nebo popřípadě na konci 10denního období rozkladu rozdíl hodnot krajních výsledků vícenásobných měření rozkladu zkušební chemické látky v oblasti plató křivky menší než 20 % a dosáhl-li stupeň rozkladu referenční látky vyjádřený v procentech úrovně snadné biologické rozložitelnosti do 14 dní. Není-li splněna kterákoli z těchto podmínek, měření se opakuje.

Vzhledem k náročnosti metod neznamení nízké hodnoty nutně skutečnost, že zkušební látka není v podmínkách životního prostředí biologicky rozložitelná, ale znamenají, že k prokázání biologické rozložitelnosti jsou třeba další studie.

Jestliže ve zkoušce toxicity zahrnující jak zkušební látku, tak referenční chemickou látku došlo během 14 dnů k méně než 35 % rozkladu (stanoveného podle DOC) nebo k méně než 25 % rozkladu (stanoveného podle TSK (teoretické spotřeby kyslíku) nebo TCO₂ (teoretického oxidu uhličitého)), lze zkušební chemické látky považovat za inhibující.

Série zkoušek by měla být opakována, pokud možno s nižší koncentrací zkušební chemické látky a/nebo s vyšší koncentrací inokula, avšak ne s koncentrací vyšší než 30 mg tuhých látek v litru.

- Při výpočtu rozkladu v procentech D_t , se použijí střední hodnoty z měření parametrů provedených duplicitně v obou zkušebních nádobách a ze slepého pokusu s inokulem. Průběh rozkladu se znázorní graficky a vyznačí se 10denní období rozkladu. Vypočte se a uveďte úbytek v procentech dosažený na konci 10denního období rozkladu a hodnota pro plató křivky nebo popřípadě hodnota odpovídající konci zkoušky.
- V respirometrických zkouškách mohou v důsledku nitrifikace ovlivnit spotřebu kyslíku látky obsahující dusík.
- Měření rozkladu prostřednictvím stanovení DOC by se měla hodnota rozkladu D_t v procentech v každém časovém okamžiku, ve kterém se odebral vzorek, vypočítat odděleně pro každou baňku obsahující zkušební látku, a to pomocí středních hodnot měření DOC provedených duplicitně.

Výsledky a hodnocení:

Výsledkem zkoušky je

- graf závislosti rozkladu v procentech na čase pro zkušební a referenční látku; je třeba zřetelně označit fázi iniciace, fázi rozkladu, 10denní období rozkladu a směrnici. Vyhovuje-li zkouška kritériím jakosti, je možné v grafu použít střední hodnotu rozkladu v procentech v baňkách obsahujících zkušební látku;
- rozklad v procentech po 10denním období rozkladu, v oblasti plató a na konci zkoušky.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud se jedná o anorganickou látku.

Simulační zkoušky konečného rozkladu v povrchových vodách (Simulation testing on ultimate degradation in surface water)

Metoda:

Metoda není uvedena v nařízení REACH o testovacích metodách.

Existuje metoda: OECD No.309: Aerobic Mineralisation in Surface Water - Simulation Biodegradation Test

Princip:

Účelem testu je měření času degradace testované látky v nízké koncentraci v aerobní přírodní vodě a ke kvantifikaci ve formě vyjádření kinetické rychlosti. Test je proveden buď jako test v mořské vodě, nebo jako suspendovaný sedimentační test k simulaci vody se suspendovanými pevnými částicemi nebo nesuspendovaným sedimentem.

Provedení:

Testované látky jsou inkubovány v temnu za aerobních podmínek a za míchání během 60 dní. Používají se 2 různé koncentrace testované látky (netěkavé nebo slabě těkavé organické látky). Maximální koncentrace by měla být méně než 100 µg/L (biodegradace je řízená kinetikou prvního řádu) a nejnižší koncentrace by měla být v rozmezí 1-10µg/L. V každém testovacím čase by měly být odebrány z každé testovací láhve 2 subvzorky. Degradace se sleduje ve vhodných časových intervalech, měřením buď zbytkového 14C nebo zbytkové koncentrace testované látky. Celková mineralizace a primární biodegradace je stanovena rozdílným označením 14C v molekule. Zároveň se musí měřit periodicky pH a obsah kyslíku v testovacím systému.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, je-li látka

- *ve vodě vysoce nerozpustná nebo*
- *snadno biologicky rozložitelná.*

Simulační zkoušky půdy (u látek s vysokým potenciálem adsorpce na půdu) (Soil simulation testing)

Metoda: C.23 Aerobní a anaerobní transformace v půdě (C.23 Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil)

Identická metoda: OECD No.307: Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil

Princip:

Vzorky půdy se exponují zkušební látce a inkubují se v temnu v biometrických baňkách nebo v průtokových systémech za řízených laboratorních podmínek (při konstantní teplotě a vlhkosti půdy). Ve vhodných intervalech se vzorky půd extrahují a analyzuje se obsah výchozí látky a transformačních produktů. Vhodným absorpčním zařízením se k analýze shromáždí také těkavé produkty. Prostřednictvím materiálu značeného isotopem ^{14}C lze po zachycení uvolněného $^{14}\text{CO}_2$ měřit různé rychlosti mineralizace zkoušené látky a dále lze stanovit látkovou bilanci včetně tvorby vázaných reziduí v půdě.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, je-li

- *látka snadno biologicky rozložitelná nebo*
- *přímá a nepřímá expozice půdy nepravděpodobná.*

Simulační zkoušky sedimentu (u látek s vysokým potenciálem adsorpce na sediment) (Sediment simulation testing)

Metoda: C.24 Aerobní a anaerobní transformace v systémech voda/sediment (C.24 Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems)

Identická metoda: OECD No.308: Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems

Princip:

V metodě se používají aerobní i anaerobní systémy voda/sediment, které umožňují:

- a) měřit rychlost transformace zkoušené látky v systému voda/sediment,
- b) měřit rychlost transformace zkoušené látky v sedimentu,
- c) měřit rychlost mineralizace zkoušené látky a/nebo produktů její transformace (pokud se použije zkoušená látka značená isotopem ^{14}C),
- d) identifikaci a kvantifikaci produktů transformace ve vodě a v sedimentu, včetně látkové bilance (pokud se použije značená zkoušená látka),
- e) měřit distribuci zkoušené látky a produktů její transformace mezi dvěma fázemi během inkubace v temnu (aby nedošlo např. k vykvetení řas) při konstantní teplotě. Pokud to údaje umožňují, stanoví se poločasy a hodnoty DT50, DT75 a DT90 (doby odbourání), které by však neměly být příliš extrapolovány mimo obor experimentálních hodnot.

Pro aerobní i anaerobní studie jsou nezbytné alespoň dva sedimenty a příslušné vodní fáze.

V některých případech by však měly být použity více než dva systémy voda/sediment, např. u chemických látek, které mohou být přítomny ve sladkovodním i mořském ekosystému.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, je-li

- *látka snadno biologicky rozložitelná nebo*
- *přímá a nepřímá expozice sedimentu nepravděpodobná.*

Abiotický rozklad (Abiotic degradation)

Hydrolýza jako funkce pH (Hydrolysis as a function of pH)

Metoda: C.7 Abiotický rozklad – Hydrolýza jako funkce Ph (C.7 Degradation – Abiotic Degradation: Hydrolysis as a Function of pH)

Identická metoda: OECD No.111: Hydrolysis as a Function of pH

Princip:

Sterilní vodní pufrální roztoky různých hodnot pH (pH 4, 7 a 9) se podrobují chemickému působení zkušební látkou a inkubují v temnu za regulovaných laboratorních podmínek (při konstantních teplotách). Po příslušném časovém intervalu se pufrální roztoky analyzují pro přítomnost zkoušené látky a produktů hydrolýzy. Látkovou bilanci lze snadněji stanovit u radioizotopově značených zkoušených látek (např. ¹⁴C).

Tato zkušební metoda je navržena jako stupňovitý přístup. Každý stupeň závisí na výsledcích předchozího stupně.

Provedení:**a) Předběžná zkouška (stupeň 1)**

Předběžná zkouška se provede při teplotě $50 \pm 0,5$ °C a při hodnotách pH 4,0; 7,0 a 9,0. Pokud se po 5 dnech pozoruje stupeň hydrolýzy nižší než 10 % (poločas rozkladu při 25 °C je větší než 1 rok), považuje se zkoušená látka za hydrolyticky stálou a obvykle nejsou žádné zkoušky potřeba. Je-li o látce známo, že je za teplot běžných v životním prostředí nestálá, není předběžná zkouška nutná. Analytická metoda musí být dostatečně přesná a citlivá pro zjištění úbytku počáteční koncentrace o 10 %.

b) Hydrolýza nestabilních látek (stupeň 2)

Zkoušky vyššího stupně by se měly provádět při hodnotách pH, při kterých bylo na základě předběžné zkoušky zjištěno, že je zkoušená látka nestálá. Pufrální roztoky zkoušených látek by se měly přechovávat v termostatech při zvolených teplotách. Pro zkoušku reakce prvního řádu by se měl každý reakční roztok analyzovat v časových intervalech, které dávají minimálně šest bodů obvykle mezi 10 % a 90 % hydrolýzy zkoušené látky. Měly by se odebrat jednotlivé paralelní zkušební vzorky (minimálně dva vzorky obsažené v oddělených reakčních nádobách) a jejich obsah by se měl při každém z minimálně šesti odběrů vzorků analyzovat (pro získání minimálně dvanácti paralelních bodů). Na konci zkoušky vyššího stupně (tj. buď při dosažení 90 % hydrolýzy, nebo po 30 dnech) by se měly provést zkoušky potvrzení sterility. Pokud však není pozorován žádný rozklad (tj. přeměna), nepovažují se zkoušky sterility za nutné.

c) Určení produktů hydrolýzy (stupeň 3)

Všechny důležité produkty hydrolýzy, alespoň ty, které představují více než 10 % aplikované dávky, by se měly identifikovat pomocí příslušných analytických metod.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, je-li látka

- *snadno biologicky rozložitelná nebo*
- *ve vodě vysoce nerozpustná.*

Určení produktů rozkladu (Identification of degradation products)

Pravidla REACH

Není-li látka snadno biologicky rozložitelná, zkouška se neprovádí.

Osud a chování v životním prostředí

Screening adsorpce nebo desorpce (Adsorption/desorption screening)

Metoda: C.19 Odhad adsorpčního koeficientu K_{OU} pro půdy a čistírenské kaly pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (C.19 Estimation of the Adsorption Coefficient (K_{OC}) on Soil and on Sewage Sludge Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC))

Identická metoda: OECD No.121: Estimation of the Adsorption Coefficient (K_{oc}) on Soil and on Sewage Sludge Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Princip:

Metoda používá k odhadu adsorpčního koeficientu K_{ou} v půdě a v čistírenských kalech vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Tyto odhady jsou spolehlivější než odhady z výpočtů metodikou QSAR. Jako metoda odhadu nemůže plně nahradit šaržovitou rovnovážnou metodu použitou v metodě C.18 (Stanovení adsorpce/desorpce šaržovitou rovnovážnou metodou). Odhady K_{ou} však mohou být užitečné pro volbu vhodných parametrů

pro adsorpční/desorpční studie podle zkušební metody C.18, a to výpočtem K_d (distribučního koeficientu) nebo K_f (Freundlichova adsorpčního koeficientu).

Provedení:

HPLC se provádí na analytických kolonách plněných komerčně dostupnou kyanopropylovou stacionární fází obsahující lipofilní a polární skupiny. Podstata zkušební metody je obdobná jako ve zkušební metodě A.8 (rozdělovací koeficient, metoda HPLC). Při průchodu kolonou s mobilní fází zkoušená látka interaguje se stacionární fází. V důsledku distribuce mezi mobilní a stacionární fází se postup zkoušené látky zpomaluje. Dvojití složení stacionární fáze s polárními a nepolárními místy umožňuje interakci polárních a nepolárních skupin molekuly podobně jako v organickém materiálu v půdě nebo v matici čistírenského kalu. To umožňuje stanovit vztah mezi retenčním časem v koloně a adsorpčním koeficientem na organickém materiálu.

pH má významný vliv na sorpční chování zejména u polárních látek. U zemědělských půd nebo nádrží s čistírenskými kaly se pH normálně pohybuje od pH 5,5 do 7,5. U ionizovatelných látek se ve vhodném pufru provedou dvě zkoušky, a to jak s ionizovanou formou, tak s neionizovanou formou, avšak pouze v případě, že v rozmezí pH 5,5 až 7,5 je ionizováno alespoň 10 % zkoušené sloučeniny.

Vzhledem k tomu, že se k hodnocení použije pouze vztah mezi retencí na koloně HPLC a adsorpčním koeficientem, není nutná žádná kvantitativní metoda, nýbrž pouze stanovení retenčního času. Je-li k dispozici vhodný soubor referenčních látek a lze-li užít standardní experimentální podmínky, poskytuje metoda rychlý a účinný způsob odhadu adsorpčního koeficientu K_{ou} .

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud

- *na základě fyzikálně-chemických vlastností látky lze předpokládat, že má malou schopnost adsorpce (např. látka má nízký rozdělovací koeficient oktanol/voda), nebo*
- *látka a její příslušné produkty rozkladu se rychle rozkládají.*

Bioakumulace ve vodních druzích, přednostně u ryb (Bioaccumulation in aquatic species)

Metoda: C.13 Bioakumulace: Průtoková zkouška na rybách (C.13 Bioconcentration: Flow-through Fish Test)

Identická metoda: OECD No.305: Bioconcentration: Flow-through Fish Test

Princip:

Metoda popisuje postup pro charakterizaci schopnosti látek bioakumulovat se v rybách za průtokových (event. semistatických) podmínek.

Biokoncentrace/bioakumulace je nárůst koncentrace zkoušené látky v organismu (v jeho specifikované tkáni) nebo na něm vzhledem ke koncentraci zkoušené látky v okolním médiu.

Bioakumulační faktor (BCF nebo KB) je koncentrace zkoušené látky v rybách nebo na nich nebo v jejich specifikovaných tkáních (C_r v $\mu\text{g/g}$ (ppm)) dělená koncentrací chemikálie v okolním médiu (C_w v $\mu\text{g/ml}$ (ppm)), a to kdykoliv ve fázi příjmu při této zkoušce.

Bioakumulační faktor v ustáleném stavu (BCFUS nebo KB) se po dlouhou dobu výrazně nemění; koncentrace zkoušené látky v okolním médiu je po tuto dobu konstantní.

Analýza vzorků vod a ryb se nejčastěji provádí pomocí radioaktivně značených látek.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud

- *má látka malý potenciál pro bioakumulaci (např. $\log K_o/v < 3$) nebo malý potenciál proniknout biologickými membránami nebo*
- *přímá a nepřímá expozice vodního prostředí není pravděpodobná.*

Další informace o adsorpci nebo desorpci (Further information on adsorption/desorption)

Metoda: C.18 Stanovení adsorpce/desorpce šaržovitou rovnovážnou metodou (C.18 Adsorption/Desorption Using a Batch Equilibrium Method)

Identická metoda: OECD No.106: Absorption – Desorption Using a Batch Equilibrium Method

Princip:

a) Nepřímá metoda

Znamé objemy roztoků zkoušené látky isotopově značené nebo neznačené, o známé koncentraci, se v 0,01 M CaCl₂ přidají k půdním vzorkům o známé suché hmotnosti, které byly předem uvedeny do rovnováhy s 0,01 M CaCl₂. Směs se přiměřenou dobu míchá. Půdní suspence se poté oddělí centrifugací a popřípadě zfiltruje a vodná se fáze se analyzuje. Množství zkoušené látky adsorbované v půdním vzorku se vypočte z rozdílu mezi počátečním množstvím zkoušené látky v roztoku a množstvím, které v něm zbylo na konci experimentu.

b) Přímá metoda

Alternativně lze adsorbované množství zkoušené látky stanovit také přímo analýzou půdy. Tato metoda, která zahrnuje postupnou extrakci vhodným rozpouštědlem, se doporučuje v případech, kdy nelze přesně stanovit rozdíl koncentrací látky v roztocích. Jde například o tyto případy: adsorpce zkoušené látky na stěnách zkušebních nádobek, nestálost zkoušené látky vzhledem k délce experimentu, nízká adsorpce s malou změnou koncentrace v roztoku a vysoká adsorpce, jejímž důsledkem je nízká koncentrace, kterou nelze přesně stanovit. Použije-li se látka isotopově značená, lze se extrakci půdy vyhnout analýzou půdní fáze spálením a počítáním scintilací v roztoku. To je však nespécifická technika, která nerozlišuje mezi výchozími a transformačními produkty; měla by tedy být použita pouze tehdy, je-li zkoušená chemická látka po dobu studie stálá.

Pravidla REACH

Studii není nutné provést, pokud

- *lze na základě fyzikálně-chemických vlastností látky předpokládat, že má malou schopnost adsorpce (např. látka má nízký rozdělovací koeficient oktanol/voda) nebo*
- *se látka a její produkty rozkladu rychle rozkládají.*

Další informace o osudu a chování látky nebo produktů rozkladu (Further information on the environmental fate and behaviour of the substance and/or degradation products)

Pravidla REACH

Další zkoušky navrhne žadatel o registraci nebo je může vyžadovat agentura, pokud je nutné dále zkoumat osuda chování látky. Výběr vhodných zkoušek závisí na výsledcích posouzení chemické bezpečnosti.

Účinky na suchozemské organismy (Effects on terrestrial organisms)

Pravidla REACH

Tyto studie není nutné provést, pokud přímá ani nepřímá expozice půdního prostředí není pravděpodobná. Při neexistenci údajů o toxicitě pro půdní organismy je možné k posouzení nebezpečí pro půdní organismy použít metodu rovnovážné distribuce.

Subakutní toxicita u bezobratlých (Short-term toxicity to invertebrates)

Účinky na půdní mikroorganismy (Effects on soil micro-organisms)

Subakutní toxicita u rostlin (Short-term toxicity to plants)

Zkoušky chronické toxicity na bezobratlých (Long-term toxicity testing on invertebrates)

Zkoušky chronické toxicity na rostlinách (Long-term toxicity testing on plants)

Chronická toxicita u organismů v sedimentu (Long-term toxicity to sediment organisms)

Chronická nebo reprodukční toxicita u ptáků (Long-term or reproductive toxicity to birds)

Metody zjišťování a analýzy (Methods of Detection and Analysis)

Pravidla REACH

Popis analytických metod pro příslušné složky životního prostředí, u nichž se studie prováděly s využitím dotyčné analytické metody.

PRAKTICKÁ ČÁST

1. Obecný úvod k registraci látky methylethylketoxim
2. Rešerše látky
3. UKÁZKA DATABÁZOVÉHO PROSTŘEDÍ IUCLID 5
4. Data použitá pro ukázkový dossier

V praktické části práce je řešena modelová registrace látky methylethylketoxim (butanonoxim).

OBECNÝ ÚVOD K NÁVRHU REGISTRACE LÁTKY

Základní informace o látce:

Název: Methylethylketoxim (Butanonoxim)

Identifikace látky:

Číslo Chemical Abstracts (CAS): 96-29-7

Číslo EINECS: 202-496-6

Identifikační číslo: 616-014-00-0

Sumární vzorec: C_4H_9NO

Molekulová hmotnost: 87

V době zahájení práce nebyla látka methylethylketoxim registrována. Byla zvolena jako látka, která je využívána jako součást nátěrových hmot a pro ukázkovou registraci byla zvolena výroba ve fiktivní tonáži 1 – 100 tun za rok, tj. základní rozsah údajů pro registraci.

Při přípravě modelové registrační dokumentace byla nejprve připravena literární rešerše dostupnosti dat k této látce v oblasti vlastností fyzikálně chemických, toxikologických a ekologických. Cílem rešerše je usnadnění získání dat do registračního dossieru.

V rešerši jsou uvedena data, která jsou k dané látce k dispozici spolu se zdrojem, odkud by se v případě použití literárních dat do registrační dokumentace, informace čerpaly.

Jedná se vesměs o informace staršího data, u kterých je předpoklad, že v případě testů nejsou tyto v systému GLP, jak přednostně REACH požaduje. Proto by v případě jejich použití byl potřeba odborný posudek.

Výsledkem rešerše je tabulka „potřeby dat“ poskytuje přehled o tom, zda jsou data dostupná, pokud ano, zda je to literární údaj nebo údaj z testů a která data nejsou k dispozici vůbec a je třeba zvážit možnost testování.

Tabulka potřeby dat

Ethylmethylketoxim (Butanonoxim)			
Typ látky	látka -kapalina		
Tonáž	1 – 100 t/rok		
CAS	96-29-7		
EINECS	202-496-6		
Molecular formula			
Molecular weigt	87	Harmonizovaná klasifikace: ano	
Legenda	Dohoda SIEF	Doporučen test	Test není nutné provádět

Oranžově označené testy nejsou předmětem sdílení

FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI

Poř. číslo	Typ informace	Base set (př. VIII)	Nalezené údaje	Použitelnost dat a reliabilita	Doporučení
7.1	Stav látky při 20 °C a 101,2 kPa	+	Literární data	Plně použitelná data	Pro dossier lze použít literární zdroj nebo vizuální pozorování (doložené protokolem výrobce)
7.2	Bod tání nebo tuhnutí	+	Literární data	Plně použitelná data	Pro dossier lze použít literární zdroj
7.3	Bod varu	+	Literární data	Plně použitelná data	Pro dossier lze použít literární zdroj
7.4	Relativní hustota	+	Literární data	Plně použitelná data	Pro dossier lze použít literární zdroj
7.5	Tlak par	+	Údaje nenalezeny	Plně použitelná data	Pro dossier lze použít literární zdroj
7.6	Povrchové napětí	+	Údaje nenalezeny		Test není doporučen nebezpečí aspirace nehrozí. (Povrchové napětí je klíčové pro stanovení potenciálního nebezpečí aspirace.)
7.7	Rozpustnost ve vodě	+	Literární data	Plně použitelná data	Pro dossier lze použít literární zdroj
7.8	Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda	+	Údaje nenalezeny	Plně použitelná data	Pro dossier lze použít literární zdroj
7.9	Bod vzplanutí	+		Plně použitelná data	Pro dossier lze použít literární zdroj
7.10	Hořlavost	+	Údaje nenalezeny		Dohoda – nákup v SIEF Nebo doporučen test

7.11	Výbušné vlastnosti	+	Údaje nenalezeny		Test není nutné provést neobsahující výbušné skupiny v molekule
7.12	Bod samozápalu	+	Údaje nenalezeny	Plně použitelná data	Pro dossier lze použít literární zdroj
7.13	Oxidační vlastnosti	+	Údaje nenalezeny		Dohoda – nákup v SIEF Nebo doporučen test
7.14	Granulometrie	+			Test není nutné provést látka je kapalina

TOXIKOLOGICKÉ INFORMACE

Poř. číslo	Typ informace	Base set (př. VIII)	Nalezené údaje	Použitelnost dat a reliabilita	Doporučení
8.1	Kožní dráždivost nebo žíravost (<i>in vitro</i>)		Látka nevyhovuje kritériím pro posouzení, musí se testovat.		
8.1.1	Kožní dráždivost (<i>in vivo</i>)	+	Údaje nalezeny		Nákup od majitele dat Dohoda nákup v SIEF
8.2	Oční dráždivost (<i>in vitro</i>)		Látka nevyhovuje kritériím pro posouzení, musí se testovat.		
8.2.1	Oční dráždivost (<i>in vivo</i>)	+	Látka je klasifikována jako nebezpečná pro oko. Údaje nalezeny		Nákup od majitele dat Dohoda nákup v SIEF
8.3	Senzibilizace kůže	+	Látka je klasifikována jako senzibilizující Údaje nalezeny		Nákup od majitele dat Dohoda nákup v SIEF
8.4	Mutagenita				
8.4.1	<i>In vitro</i> studie týkající se genové mutace u bakterií	+	Literární data Ames test	Před návrhem testu posoudit data <i>in vivo</i>	<p>Není testem na obratlovci nemusí být povinně sdílen</p> <p>Nutno vyhledat a posoudit jednotlivé články popřípadě primární prameny, na základě posouzení rozhodnout o dalším postupu</p> <p style="text-align: center;">Pokud nebudou literární zdroje použitelné doporučen test</p>

8.4.2	<i>In vitro</i> studie týkající se cytogenity na buňkách savců nebo mikronukleární studie in vitro	+	Údaje nalezeny	Před návrhem testu posoudit data <i>in vivo</i>	Pro dossier jsou předepsány dva testy mutagenity
					Není testem na obratlovci nemusí být povinně sdílen
					Nákup od majitele dat Dohoda nákup v SIEF
8.4.3	<i>In vitro</i> studie týkající se genetické mutace na buňkách savců	(2+)	Údaje nenalezeny – test podmíněn výsledky testu 8.4.1 a 8.4.2		Není testem na obratlovci nemusí být povinně sdílen
					Pokud jsou výsledky testů 8.4.1 a testu 8.4.2 negativní je potřeba provést tento test.
8.5	Akutní toxicita				
8.5.1	Orální cestou	+	Literární data, žádná nejsou pod GLP		Nutno vyhledat a posoudit článek popřípadě získat primární pramen.
					Pokud nepůjdou použít literární data Dohoda nákup v SIEF
8.5.2	Inhalací	(+)	Literární data, žádná nejsou pod GLP		Inhalace může být cestou expozice
					Pokud nepůjdou použít literární data Dohoda nákup v SIEF
8.5.3	Dermální cestou	+	Literární data, žádná nejsou pod GLP		Pokud nepůjdou použít literární data Dohoda nákup v SIEF

8.6	Toxicita po opakovaných dávkách				
8.6.1	Studie subakutní toxicity po opakovaných dávkách (28 dnů)	+	Údaje nalezeny		Dohoda nákup v SIEF Test není nutný pokud bude 90 denní test nebo chronická studie
8.6.2	Studie subchronické toxicity (90dnů)		Literární data nalezena		Není povinným base set testem Nutno vyhledat primární články, popřípadě studie a na jejich posouzení rozhodnout o dalším postupu
8.7	Reprodukční toxicita				
8.7.1	Posouzení rozvojové/reprodukční toxicity Je-li předpoklad, že je látka toxická pro reprodukci navrhnout rovnou místo skríningu studii 8.7.2 nebo 8.7.3	+	Literární údaje		k dispozici dvougenerační studie toxicity nákup dat v SIEF
8.8	Toxikokinetika				
8.8.1	Posouzení toxikokinetického chování látky	+	Literární údaje		Vyhodnocení toxikokinetiky se provádí až po získání všech dat do dossieru a pouze do té míry do jaké to data umožňují

EKOTOXIKOLOGICKÉ VLASTNOSTI					
Poř. číslo	Typ informace	Base set (př. VIII)	Nalezené údaje	Použitelnost dat a reliabilita	Doporučení
9.1	Toxicita pro vodní prostředí				
9.1.1	Zkoušky subakutní toxicity na bezobratlých (<i>Daphnia</i>)	+	Literární data Data nalezeny – majitel		Není testem na obratlovci nemusí být povinně sdílen Bude potřeba vyhledat tyto primární zdroje, posoudit a poté rozhodnout o dalším postupu Pokud nebudou literární zdroje použitelné doporučen test
9.1.2	Studie inhibice růstu vodních rostlin (řasy)	+	Data nenalezeny		Není testem na obratlovci nemusí být povinně sdílen doporučen test
9.1.3	Studie subakutní toxicity na rybách	+	Literární data Data nalezeny – majitel		Bude potřeba vyhledat tyto primární zdroje, posoudit a poté rozhodnout o dalším postupu Pokud nebudou literární zdroje použitelné Dohoda – nákup v SIEF
9.1.4	Studie inhibice respirace aktivovaného kalu	+			Pokud látka neproniká do čistíren odpadních vod není test nutný. Doporučen test pokud není splněna podmínka

9.2	Rozklad				
9.2.1	Biotický				
9.2.1.1	Snadná biologická rozložitelnost	+	Data k dispozici		Nutné provést posouzení eventuelně nákup u majitele Dohoda v SIEF ?
9.2.2	Abiotický				
9.2.2.1	Hydrolyza jako funkce pH	+			Doporučen test
9.3	Osud a chování v životním prostředí				
9.3.1	Screening adsorpce a desorpce	+	nutnost testu nelze vyloučit		posoudit potřebu dat, popřípadě test.

Při průzkumu a vyhledávání dostupných dat bylo zjištěno, že k látce existuje dataset IUCLID 4, což znamená, že látka již byla někdy v minulosti registrována podle směrnice 67/548/EHS.

Znamená to, že původní registrant již jednou shromáždil a zpracoval data, které odevzdal svému národnímu orgánu a k endpointům, které byly požadovány pro registraci podle směrnice 67/548/EHS, existují souhrny studií.

Dataset IUCLID byl vydán 19. února 2000. Látka byla ve starém systému registrována před více než 10 lety, a je tedy možné tyto údaje získat dotazem u agentury ECHA, budou volně dostupné a použitelné. V opačném případě, pokud lhůta neproběhla, předá agentura potenciálnímu registrantovi kontakt na hlavního registranta, s kterým se lze domluvit buď na ceně při předání testů k obratlovcům, nebo na ceně za přístupový klíč k již zaregistrované látce.

Aby mohla být látka registrována, muselo dojít v předepsaném termínu k přeregistraci. Každý registrant, který přeregistroval, získá přístup do SIEF (sdružení předregistantů) a má možnost zjistit, které firmy mají záměr danou látku registrovat, kdo je koordinátorem registračního procesu (faciliátor), popřípadě zda již byl jmenován hlavní registrant.

Pro potřeby práce není možné tyto údaje zjistit, protože do systému REACH IT (elektronický systém pro komunikaci s agenturou ECHA) se nelze přihlásit z cvičných důvodů, to může pouze skutečný výrobce nebo dovozce.

Modelová registrace předpokládá, že registrant sám zpracovává dokumentaci. Byly k tomu použity data z volně přístupného IUCLIDU 4, ten v době, kdy byl používán neměl tak rozsáhlé požadavky na data jako má IUCLID 6 používaný v současnosti.

Pokud by registrant chtěl použít data z registrace podle původního systému (směrnice 67/548/EHS) musel by požádat agenturu ECHA, která by zprostředkovala předání původních již volně dostupných testů. U modelové registrace v této práci to nebylo možné, autor není registrant a nemůže si od agentury vyžádat oficiální primární data, proto byly do ukázkového dossier použity pouze volně dostupná data.

Součástí registrační dokumentace pro tonáž 1-100 tun je i zpráva o chemické bezpečnosti, tu v případě modelové registrace nelze udělat, protože je navázána na kompletně vyplněný dossier a řadu údajů, které nejsou volně dostupné a při skutečné registraci by byly předmětem finančního vyrovnání.

Rovněž je velmi obtížné, odhadnout finanční náročnost registrace látky při dané tonáži. Cenu bude ovlivňovat celá řada faktorů. Především spolupráce registrantů, sdílení nákladů na testy (čím více registrantů, tím nižší podíl každého z nich bude). Pokud by se v tomto případě získaly údaje ze studií zdarma, protože doba, kdy jsou chráněny autorskými právy, již uplynula, je potřeba počítat s náklady na odborné posouzení, staré testy nemusí splňovat všechna požadovaná kritéria.

Práce byla zahájena v době, kdy bylo možné podat samostatnou registraci, tj pokud by se náš hypotetický registrant nedohodl s ostatními (důvodem nedohody mohla být i cena), může si vše, s výjimkou testů na obratlovcích, udělat sám, popřípadě si sám zadat potřebné testy. U testů na obratlovcích musí dojít k dohodě s hlavním registrantem a tyto testy nebo přístup k nim, protože je nelze podle pravidel REACH opakovat, by bylo nutné od hlavního registranta zakoupit.

V průběhu zpracování praktické části práce došlo v legislativě k několika významným změnám. Od roku 2016 již není možné podat samostatnou registraci látky. A rovněž došlo k vývoji prostředí, ve kterém se data zpracovávají a v současné době je platná verze databáze IUCLID 6.

Práce byla v té době ve své praktické části zpracování ukázkové registrační dokumentace dokončena a to v IUCLIDU 5. Po prozkoumání podmínek přechodu na vyšší verzi IUCLID 6 jsem se rozhodl nechat dokumentaci v původní verzi. IUCLID 6 má jiné nároky na zpracování dat uvnitř databáze a prakticky by to znamenalo celou práci předělat.

Pokud by mělo v současné době dojít k registraci látky, byl by postup následující:

1. V případě, že by látka byla předregistrována musel by potenciální registrant zjistit, kdo je hlavním registrantem dané látky. Toto lze zjistit ze seznamu hlavních registrantů na stránkách ECHA. Od hlavního registranta je pak potřeba zjistit podmínky shodnosti látky, kterou chci registrovat s látkou, která je již registrována. Pokud jsou obě látky shodné, lze od hlavního registranta zakoupit LoA (přístup k již odevzdaným registračním datům). Důležité je v tomto případě číslo předregistrace, bez něho nelze registrovat.
2. V případě že látka předregistrována nebyla, musí se nejprve dle požadavků provést analytické testy látky. Ty se pak použijí při sestavení inquiry dossieru, tj dodazu

na stránky ECHA, zda látka již byla registrována. Pokud ano, přidělí ECHA látce inquiry číslo a sdělí totožnost hlavního registranta. Následuje dohoda o koupi LoA. Bez čísla inquiry nelze registrovat, i kdyby registrant totožnost hlavního registranta znal dopředu.

3. V obou případech, jakmile registrant získá LoA, zpracuje v databázi IUCLID 6 údaje, které se vztahují k podání dokumentace člena společného podání (malý dossier) a podá registraci s přístupovým kódem LoA agentuře ECHA.
4. V rámci kompletní dokumentace lze zakoupit i přístup ke zprávě o chemické bezpečnosti.
5. Po přijetí dokumentu agenturou ECHA obdrží registrant registrační číslo.

V době dokončení práce je látka již registrována. V dokumentaci na stránkách ECHA je uvedeno celkem 14 registrantů. (Jeden hlavní registrant a 13 členů společného podání).

Látka je již registrována pro následující určená použití:

- vlastní výroba látky,
- použití jako meziprodukt,
- výroba kapalných nátěrových hmot,
- obecně výroba směsí (nátěry a barvy, ředidla, odstraňovače nátěrů),
- průmyslová aplikace nátěrů,
- výroba speciálních chemikálií,
- výroba polymerních přípravků a látek.

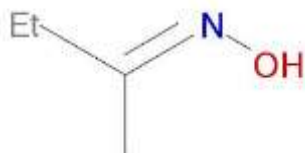
Autor práce není registrant, proto je ukázková registrace látky Methylethylketoxim pouze modelová a pro reálnou registraci nepoužitelná, ta by se řešila zakoupením přístupu LoA.

Pro modelovou ukázkou rovněž nebylo možné použít již zveřejněná registrační data na stránkách agentury ECHA, ty jsou majetkem registrantů a volně s nimi nelze nakládat. Agentura výslovně uvádí, že nesmí být použita k nové registraci bez finančního vyrovnání s majiteli dat.

REŠERŠE LÁTKY

Vyhledání zdrojů dat pro registraci látky Ethylmethylketoxim (Butanonoxim)

Strukturní vzorec:



Harmonizovaná klasifikace:

Indexové číslo: 616-014-00-0

Dle Nařízení ES 1272/2008

Klasifikace	H.-věta	vysvětlivka	
Carc. 2	H351	Carc. 2	Karcinogenita, kategorie 2
		H351	Podezření na vyvolání rakoviny
Acute Tox. 4	H312	Acute Tox. 4	Akutní toxicita (dermální), kategorie 4
		H312	Zdraví škodlivý při styku s kůží.
Eye Dam. 1	H318	Eye Dam. 1	Vážné poškození očí / podráždění očí, kategorie 1
		H318	Způsobuje vážné poškození očí.
Skin Sens. 1	H317	Skin Sens. 1	Senzibilizace kůže, kategorie 1
		H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.

Značení:

Výstražný symbol nebezpečnosti:	
Signální slovo	Nebezpečí
Standardní věty o nebezpečnosti:	<p>Podezření na vyvolání rakoviny Zdraví škodlivý při styku s kůží. Způsobuje vážné poškození očí Může vyvolat alergickou kožní reakci.</p>
Pokyny pro bezpečné zacházení:	<p>Uchovávejte mimo dosah dětí. Nevdechujte mlhu/páry/aerosoly. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv, ochranné brýle.</p>

FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI

STAV LÁTKY PŘI 20 °C a 103,1 kPa

Kapalina.

Primární zdroj: bezpečnostní list firmy Henkel

Sekundární zdroj: neuveden

BOD TÁNÍ / TUHNUTÍ

Studie: Melting/Freezing point

Hodnota: = -20 °C

Rozklad: ne

Primární zdroj: BASF AG, Sicherheitsdatenblatt Luaktin M (04/90)

Sekundární zdroj: IUCLID 4

BOD VARU

Studie: Boiling Point

Hodnota: 152 °C při 1013 hPa

Poznámka: Decomposition will occur above 100 °C. When heated, decomposition will be promoted by contamination with acids and metals

Primární zdroj: Federal Register (USA) 1986. Vol 51, no 220, Friday, November 14th.

Sekundární zdroj: IUCLID

RELATIVNÍ HUSTOTA

Studie: Relative density

Hodnota: 0,915 g/cm³ při 20 °C

Primární zdroj: BASF AG, Sicherheitsdatenblatt Luaktin M (04/90)

Sekundární zdroj: IUCLID 4

TLAK PAR

Studie: Vapour pressure

Hodnota: 3,5 hPa při 20 °C

Primární zdroj: BASF AG, Sicherheitsdatenblatt Luaktin M (04/90)

Sekundární zdroj: IUCLID

Studie: Vapour pressure

Hodnota: 13,3 hPa při 50 °C

Primární zdroj: DSM Material Safety Data Sheet

Sekundární zdroj: IUCLID

POVRCHOVÉ NAPĚTÍ

Studie: Surface Tension

Hodnota: Data nenalezena

Poznámka: Test není nutné provést.

ROZPUSTNOST VE VODĚ

Studie: Water Solubility

Hodnota: 100 g/l při 20 °C

pH: 6,5 (roztok 114 g/l při 20 °C)

Primární zdroj:

DSM Special Products B.V. Geleen

Sekundární zdroj: IUCLID

Studie: Water Solubility

Hodnota: 100 g/l při 20 °C,

Poznámka: pH 6,5 (roztok 114 g/l při 20 °C)

Primární zdroj: DSM Special Products B.V. Geleen

Sekundární zdroj: IUCLID

ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT N-OKTANOL/VODA

Studie: Partition coefficient

Výsledek: 0.59 při 20 °C

Primární zdroj: SERVO DELDEN BV DELDEN DSM Special Products B.V. Geleen

Studie: Partition coefficient

Výsledek: 0.65 při 25 °C

Metoda: OECD Guide–line 107 "Partition Coefficient (n–octanol/water), Flask–shaking Method"

Primární zdroj: BASF AG. Aalytisches Labor, unpublsh data (J.Nr. 101219 10/10/1988).
DSM Special Products B.V. Geleen

BOD VZPLANUTÍ

Studie: Flash Point

Hodnota: 62 °C (uzavřený kelímek)

Primární zdroj: SERVO DELDEN BV DELDEN DSM Special Products B.V. Geleen BASF AG, Sicherheitsdatenblatt Luaktin M

Sekundární zdroj: IUCLID 4

HOŘLAVOST

Typ: Flammability

Výsledek: není hořlavý

Primární zdroj: SERVO DELDEN BV DELDEN DSM Special Products B.V. Geleen

Sekundární zdroj: IUCLID 4

VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI

Studie: Explosive Properties

Výsledek: nemá výbušné vlastnosti

Poznámka: Explosion Limits in air: 3,1 – 50 Volume % at 60 °C and 1013 hPa.

Primární zdroj: SERVO DELDEN BV DELDEN DSM Special Products B.V. Geleen BASF AG Safety Data Sheet.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

TEPLOTA SAMOVZNÍCENÍ

Studie: Self-ignition temperature

Výsledek: 315 °C při 1013 hPa

Primární zdroj: SERVO DELDEN BV DELDEN DSM Special Products B.V. Geleen

Sekundární zdroj: IUCLID 4

OXIDAČNÍ VLASTNOSTI

Studie: Oxidizing Properties

Výsledek: nemá oxidační vlastnosti

Primární zdroj: SERVO DELDEN BV DELDEN DSM Special Products B.V. Geleen

Sekundární zdroj: IUCLID 4

GRANULOMETRIE

Studie: Granulometry

Výsledek: Data nenalezena.

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok.

STABILITA V ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDLECH A IDENTIFIKACE PŘÍPADNÝCH ROZKLADNÝCH PRODUKTŮ

(není nutné pro tonáž do 100 tun)

Studie: Stability in organic solvents and identity,

Výsledek: Data nenalezena.

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok.

DISOCIAČNÍ KONSTANTA

(není nutné pro tonáž do 100 tun)

Studie: Dissociation constant

Výsledek: Data nenalezena.

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok.

VISKOZITA

(není nutné pro tonáž do 100 tun)

Studie: Viscosity

Výsledek: Data nenalezena.

Poznámka: Test není nutné provést.

TOXIKOLOGICKÉ VLASTNOSTI

KOŽNÍ DRÁŽDIVOST NEBO ŽÍRAVOST

KOŽNÍ DRÁŽDIVOST *IN VIVO*

Studie: Skin Irritation

Druh: Králík

Výsledek: slabě dráždivý

Klasifikace EU: dráždivý

Metoda: ostatní

Rok: 1989 **GLP:** ne

Poznámka: Probably according to USA guidelines so 24 hour exposure of skin instead of 4 hours in EC.

Primární zdroj: Allied Corporation 1989. The toxicology of MEKO, a summary and position statement, report no MA-224-82-28, prepared by M.J. Derelanko and W.E. Rinehart, Allied USA.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Skin Irritation

Druh: Králík

Výsledek: nedráždivý

Metoda: ostatní

Rok: 1971 **GLP:** ne

Primární zdroj: BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/1971.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Skin Irritation

Druh: Králík

Výsledek: slabě dráždivý

Klasifikace EU: nedráždivý

Metoda: ostatní

Rok: 1978 **GLP:** ne

Primární zdroj: Study from 1978, TSCATS fiche OTS0524679

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Skin Irritation

Druh: Králík

Výsledek: slabě dráždivý

Klasifikace EU: dráždivý

Metoda: Draize Test

Rok: **GLP:** ne

Primární zdroj: Study from 1978, TSCATS fiche OTS0524679

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Skin Irritation

Druh: Králík

Výsledek: slabě dráždivý

Klasifikace EU: dráždivý

Metoda: ostatní

Rok: 1989 **GLP:** ne

Poznámka: Probably according to USA guidelines so 24 hour exposure of skin instead of 4 hours in EC.

Primární zdroj: Allied Corporation 1989. The toxicology of MEKO, a summary and position statement, report no MA-224-82-28, prepared by M.J. Derelanko and W.E. Rinehart, Allied USA.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Skin Irritation

Druh: Králík

Výsledek: nedráždivý

Klasifikace EU: ne

Metoda: ostatní: BASF test

Rok: 1971 **GLP:** ne

Primární zdroj: BASF AG: Abt. Toxikologie, unveroeffentlichte Untersuchung, (XXI 168), 09.11.1971.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Skin Irritation

Druh: Potkan

Výsledek: dráždivý

Klasifikace EU: dráždivý

Metoda: ostatní

Rok: 1988 **GLP:** ne

Poznámka: Probably 24 hours exposure.

Primární zdroj: SERVO DELDEN BV DELDEN DSM Special Products B.V. Geleen Federal Register USA (1988) 53, 178, 35838-35846.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

OČNÍ DRÁŽDIVOST

OČNÍ DRÁŽDIVOST *IN VIVO*

Studie: *In vivo* Eye Irritation

Druh: Králík

Výsledek: vysoce dráždivý

Klasifikace EU: dráždivý

Metoda: ostatní

Rok: 1989 **GLP:** ne

Primární zdroj: SERVO DELDEN BV DELDEN DSM Special Products B.V. Geleen Allied Corporation 1989. The toxicology of MEKO, a summary and statement, report no MA-224-82-28, prepared by M.J. Derelanko and W.E. Rinehart, Allied USA.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Eye Irritation

Druh: králík

Výsledek: dráždí

Klasifikace EU: dráždivý

Metoda: ostatní

Rok: 1971 **GLP:** ne

Poznámka: BASF in house test.

Primární zdroj: BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/1971.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Eye Irritation

Druh: králík

Výsledek: vysoce dráždí

Klasifikace EU: dráždivý

Metoda: ostatní

Rok: 1963 **GLP:** ne

Poznámka:

Primární zdroj: Study from 1963, TSCATS fiche OTS0524693

Sekundární zdroj: IUCLID 4

SENZIBILIZACE

Studie: Skin Sensation (Guinea pig maximization test)

Druh: morče

Výsledek: senzibilizující

Klasifikace EU: senzibilizující

Metoda: Directive 84/449/EEC, B.6 "Acute toxicity (skin sensitization)"

Rok: 1990 **GLP:** ne

Primární zdroj: RCC NOTOX project 018990 (1990). Committed by DSM Special Products.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Skin Sensation Guinea pig maximization test

Druh: morče

Výsledek: senzibilizující

Klasifikace EU: senzibilizující

Metoda: Directive 84/449/EEC, B.6 "Acute toxicity (skin sensitization)"

Rok: 1983 **GLP:** ano

Primární zdroj: GLP–study from 1983, TSCATS fiche OTS0524684

Sekundární zdroj: IUCLID 4

MUTAGENITA

IN VITRO TEST GENOVÝCH MUTACÍ NA BAKTERIÍCH

Studie: Ames test

Druh: *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA 2637 and *E. Coli* uvra/pKM101

Metabolická aktivace: with and without

Výsledek: negativní

Metoda: Ames test

Rok: 1986 **GLP:** ne

Primární zdroj: Araki, A. et al (1986). Mutagenicities of oxime compounds in *S.typh.* and *E. coli*, Mutation Research, 164, 4, 263.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Mouse lymphoma assay

Testovací systém: Mouse lymphoma L5178Y TK+/-, Concentration: up to 5 mg/pl

Metabolická aktivace: with and without

Výsledek: negativní

Metoda: ostatní

Rok: 1988 **GLP:** ne

Primární zdroj: Rogers-back, A.M., et al (1988). Genotoxicity of six oxime compounds in the *S. typh* assay and the mouse lymphoma TK +/- assay, Mutation Research, 204, 149-162.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Sister chromatid exchange assay

Testovací systém: Chinese hamster (CHO) cells, Concentration: tot 1%

Metabolická aktivace: neuvedeno

Výsledek: negativní

Metoda: ostatní

Rok: **GLP:**

Primární zdroj: Spahn, M.C. et al., Evaluation of methyl ethyl ketoxim (MEKO) in the sister chromatid exchange (SCE) test: *in vitro* results in Chinese hamster ovary (CHO) cells., AlleidSignal report no. MA-224-82-6, 1983.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Unscheduled DNA synthesis

Testovací systém: -

Metabolická aktivace: neuvedeno

Výsledek: negativní

Metoda: ostatní

Rok: **GLP:** ano

Primární zdroj: Unscheduled DNA Synthesis Assay. Study performed by Microbiological Associates, Inc., Rockville, Maryland USA.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

IN VITRO CYTOGENETICKÁ STUDIE NA SAVČÍCH BUŇKÁCH NEBO MIKRONUKLEÁRNÍ

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: *In vitro* cytogenetic study in mammalian cells or *in vitro* micronucleus study

Výsledek: Data nenalezena.

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok.

No.473: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test

IN VITRO STUDIE GENOVÝCH MUTACÍ NA SAVČÍCH BUŇKÁCH

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: *In vitro* gene mutation study in mammalian cells**Výsledek:** Data nenalezena.**Poznámka:** Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok.**IN VIVO STUDIE MUTAGENITY**

(není nutný pro tonáž do 100 tun)

Studie: Cytogenetic assay**Typ:****Živočišný druh:** Krysa **Pohlaví:** samec/samice**Dávky:** Single dose: 300, 600, 1200 mg/kg**Výsledek:****Metoda:** ostatní**Rok:** 1990 **GLP:** ano**Primární zdroj:** Acute in-vivo cytogenetics assay in rats. MBA study T9293.105009 (1990). Test performed by Microbiological Associates Inc., Bethesda, Maryland USA. Committed by USA producers and importers of MEKO, in regard of EPA final test rule under TSCA.**Sekundární zdroj:** IUCLID 4**Studie:** Cytogenetic assay**Typ:****Živočišný druh:** *Drosophila melanogaster* **Pohlaví:****Dávky:** 7500 ppm**Route of admin.:** drinking water**Exposure period:** 3 days**Výsledek:** It is concluded that MEKO does not induce mutations in the post-meiotic germ cells of *Drosophila melanogaster* when administered by feeding to adult males.**Metoda:** ostatní**Rok:** 1991 **GLP:** ano**Poznámka:****Primární zdroj:** Sex-linked recessive lethal test. Report no. T9293.160003 (1991) Test performed by University of Wisconsin, Madison USA.**Sekundární zdroj:** IUCLID 4**Studie:** Cytogenetic assay**Typ:****Živočišný druh:** potkan **Pohlaví:** samec/samice**Dávky:** 300, 600, 1200 mg/kg**Route of admin.:** drinking water**Exposure period:** 1 day**Výsledek:** The results of the assay indicate that under the conditions described in the report, 2-Butanonoxim did not induce chromosomal aberrations in bone marrow cells of male or female rats.**Metoda:** ostatní

Rok: 1990 **GLP:** ne

Primární zdroj: Test performed by Microbiological Associates, Inc. Bethesda, Maryland USA

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Cytogenetic assay

Typ:

Živočišný druh: potkan **Pohlaví:** samec/samice

Dávky: Single dose 300, 600, 1200 mg/kg

Výsledek: The high dose was set as the MTD. Bone marrow cells, arrested in metaphase and collected 6, 24, 48 hours after dosing, were examined microscopically for structural chromosome aberrations. No significant effects were seen, regardless of treatment or bone marrow collection time.

Metoda: ostatní

Rok: 1990 **GLP:** ano

Primární zdroj: Microbiological Associations USA (1990). Acute *in-vivo* cytogenetics assay in rats. MBA study T9293.105009. Committed by USA producers and importers of MEKO, in regard of EPA final test rule under TSCA.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Micronucleus assay

Typ:

Živočišný druh: myš **Pohlaví:**

Dávky:

Výsledek: The National Toxicology Program annual plan for fiscal year 1994 indicates an *in-vivo* micronucleus test was completed on MEKO in 1993. The results of this test are indicated as negative suggesting that MEKO did not cause an increase in micronuclei in either peripheral blood or bone marrow cells.

Metoda: ostatní

Rok: 1993 **GLP:** ne

Primární zdroj: United States National Toxicology Program, Public Health Service, Department of Health and Human Services, United States of America, (unpublished findings)

Sekundární zdroj: IUCLID 4

AKUTNÍ TOXICITA

ORÁLNÍ CESTOU

Studie: Acute Oral Toxicity

Živočišný druh: Krysa

Hodnota: LD50 = 2528 mg/kg živé váhy

Metoda: ostatní

Rok: 1971 **GLP:** ne

Primární zdroj: BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/71.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Acute Oral Toxicity

Živočišný druh: Krysa

Hodnota: LD50 = 2326 mg/kg živé váhy

Metoda: ostatní

Rok: 1978 **GLP:** ne

Primární zdroj: Study from 1978, TSCATS fiche OTS0524679

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Acute Oral Toxicity

Živočišný druh: Krysa

Hodnota: LD50 = 3700 mg/kg živé váhy

Metoda: ostatní

Rok: **GLP:** ne

Primární zdroj: Product safety data sheet methylethylketoxime, Allied Signal USA, September 1990

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Acute Oral Toxicity

Živočišný druh: Krysa

Hodnota: LD50 = 930 mg/kg živé váhy

Metoda: ostatní

Rok: 1986 **GLP:** ne

Primární zdroj: Federal Register USA (1986) 51, 220, 41430–41432. Methyl ethyl ketonoxime.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

INHALAČNÍ CESTOU

Studie: Acute Inhalation Toxicity

Živočišný druh: Krysa

Hodnota: LC0 = 3-4 mg/l/4 hour

Metoda: ostatní

Rok: 1986 **GLP:** ne

Primární zdroj: BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/71.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Acute Inhalation Toxicity

Živočišný druh: Krysa

Hodnota: LC100 = 5000 ppm/4 hour

Metoda: ostatní

Rok: 1965 **GLP:** ne

Primární zdroj: Study from 1965, TSCATS fiche OTS0524695

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Acute Inhalation Toxicity

Živočišný druh: Krysa

Hodnota: LC50 = 20 mg/l/4 hour

Metoda: ostatní

Rok: 1986 **GLP:** ne

Primární zdroj: Federal register USA (1986) 51, 220, 41430–41432. methylethyl ketonoxime.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Acute Inhalation Toxicity

Živočišný druh: Krysa

Hodnota: - /8 hour

Metoda: ostatní

Rok: 1971 **GLP:** ne

Primární zdroj: BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/1971.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

DERMÁLNÍ CESTOU

Studie: Acute Dermal Toxicity

Živočišný druh: králík

Hodnota: LD50 = 1000 – 2000 mg/kg

Metoda: ostatní

Rok: **GLP:** ne

Primární zdroj: SERVO DELDEN BV DELDEN

Sekundární zdroj: IUCLID 4

TOXICITA PŘI OPAKOVANÉ DÁVCE

Krátkodobá toxicita při opakované dávce (28 denní)

Studie: Repeated Dose Toxicity

Živočišný druh: Krysa

Expozice: inhalation, 28 days

Dávka: 0.21, 1.02, 1.92, 2.57 mg/l

frekvence podávání: 6 hod/den and 5 dní/týden

kontrolní skupina: ano

Metoda: ostatní

Výsledek: NOAEL: = 1.02 mg/l

LOAEL: = 1.92 mg/l

Rok: 1989 **GLP:** ne

Primární zdroj: Allied Corporation 1989. The toxicology of MEKO, a summary and position statement, report no MA-224-82-28, prepared by M.J. Derelanko and W.E. Rinehart, Allied USA.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Repeated Dose Toxicity

Živočišný druh: Krysa

Expozice: inhalation, 28 days

Dávka: 25, 100, 400 ppm

frekvence podávání: 6 hod/den a 5 dní/týden

kontrolní skupina: ano

Metoda: ostatní

Výsledek: NOAEL: = 25 ppm

LOAEL: = 100 ppm

Rok: 1990 **GLP:** ano

Primární zdroj: Study performed by Bio/dynamics Inc., East Millstone, New Jersey, USA

Sekundární zdroj: IUCLID 4

ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ TOXICITY (90 DENNÍ)

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN, ALE LZE POUŽÍT MÍSTO 28 DENNÍ POKUD JE K DISPOZICI)

Studie: Repeated Dose Toxicity

Živočišný druh: Krysa **Pohlaví:** samec/samice

Expozice: orální, 13 week

Dávka: 25, 75, 225 mg/kg/day

frekvence podávání: 5 dní/týden

kontrolní skupina: ano

Metoda: ostatní

Výsledek: NOAEL: = < 25 mg/kg

LOAEL: = 25 mg/kg

Rok: 1986 **GLP:** ano

Primární zdroj: Allied Corporation 1989. The toxicology of MEKO, a summary and position statement, report no MA-224-82-28, prepared by M.J. Derelanko and W.E. Rinehart, Allied USA.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Repeated Dose Toxicity

Živočišný druh: Krysa **Pohlaví:** samec/samice

Expozice: orální, 13 week

Dávka: 40, 125, 400 mg/kg/day

frekvence podávání: 5 dní/týden

kontrolní skupina: ano

Metoda: ostatní

Výsledek: NOAEL: = < 40 mg/kg

LOAEL: = 40 mg/kg

Rok: 1991 **GLP:** ano

Primární zdroj: Hazleton Washington USA, (1991). Subchronic neurotoxicity study with MEKO in rats (HWA 2088-109). Committed by USA producers and importers of MEKO, in regard of EPA final test rule under TSCA.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

DLOUHODOBÁ ZKOUŠKA CHRONICKÉ TOXICITY (> 12 MĚSÍCŮ)

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Long-term repeated toxicity study**Výsledek:** Data nenalezena.**Poznámka:** Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok.**REPRODUKČNÍ TOXICITA**

POSOUZENÍ REPRODUKČNÍ/VÝVOJOVÉ TOXICITY

Studie: Screening for reproductive/developmental toxicity**Výsledek:** Data nenalezena.**Poznámka:** Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok.

STUDIE PRENATÁLNÍ VÝVOJOVÉ TOXICITY

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Pre-natal developmental toxicity study**Výsledek:** Data nenalezena.**Poznámka:** Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok.**DVOUGENERAČNÍ ZKOUŠKA REPRODUKČNÍ TOXICITY**

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Two generation study**Živočišný druh:** Krysa **Pohlaví:** samec/samice**Expozice:** 13 week**Dávka:** 10, 100, 200 mg/kg*frekvence podávání:* samec: 10 weeks
samice: 10 weeks*kontrolní skupina:* ano**Metoda:** ostatní**Výsledek:** NOAEL rodiče: = < 10 mg/kg/bw

NOAEL 1 generace: = 200 mg/kg/bw

NOAEL 2 generace: = 200 mg/kg/bw

Rok: 1992 **GLP:** ano**Primární zdroj:** Two-generation reproduction study of MEKO administered by gavage to Sprague-Dawley rats. Study performed by Research Triangle Institute, Research Triangle Park, North Carolina, USA. RTI project 60C-4692 (1992). Committed by producers and importers of MEKO in the USA, in regard of the EPA final test rule for MEKO under TSCA.**Sekundární zdroj:** IUCLID 4**Studie:** Two generation study**Živočišný druh:** Krysa **Pohlaví:** samec/samice**Expozice:** 10 week**Dávka:** drinking water 2 ml/l/den*dávka:* 0, 10, 100, 200 mg/kg/dag, doserings volume 2,0 ml/kg, 30 dieren/sex/dose*frekvence podávání:* samec: 10 weeks
samice: 10 weeks*kontrolní skupina:* ano

Metoda: ostatní

Rok: 1990 **GLP:** no

Primární zdroj: Study performed by Research Triangle Institute, Research Triangle Park, North Carolina, USA

Sekundární zdroj: IUCLID 4

TOXIKOKINETIKA

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

odhad toxikokinetického chování na základě dostupných informací

Studie: Toxicokinetics

Výsledek: Data nenalezena.

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok.

STUDIE KARCINOGENITY

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Carcinogenicity

Živočišný druh: Krysa pohlaví: samec/samice

Expozice: inhalation 26 months

Dávka: 0, 15, 75, 375 ppm, 80/sex/group, 4 groups

frekvence podávání: 6 hod/den a 5 den/týden

kontrolní skupina: ano

Metoda: ostatní

Rok: 1993 **GLP:** ano

Primární zdroj: An inhalation oncogenicity study of Methylenechloroform in rats and mice. Part II – rats. Study performed by Pharmaco LSR Inc., East Millstone, New Jersey, USA. Committed by producers and importers of MEKO in the USA, in regard of the EPA final test rule for MEKO under TSCA.

Study performed by Pharmaco LSR Inc., East Millstone, New Jersey, USA

Sekundární zdroj: IUCLID 4

EKOTOXIKOLOGICKÉ VLASTNOSTI

TOXICITA PRO VODNÍ PROSTŘEDÍ

ZKOUŠKY SUBAKUTNÍ TOXICITY NA BEZOBRATLÝCH (*DAPHNIA*)

Studie: Acute Toxicity to Aquatic Invertebrates

Živočišný druh: *Daphnia magna* (Crustacea)

Expozice: 48 hodin

Hodnota: EC0 = 500 mg/l

EC50 = > 500 mg/l

EC100 = > 500 mg/l

Metoda: Directive 84/449/EEC, C.2 "Acute toxicity for Daphnia"

Rok: 1988 **GLP:** ne

Primární zdroj: BASF AG Ecotoxicology Laboratory. Unpublished results. 1/1327/2/88–1327/88.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Acute Toxicity to Aquatic Invertebrates

Druh: *Daphnia magna* (Crustacea)

Expozice: 48 hodin

Hodnota: EC50 = 750 mg/l

Metoda: ostatní

Rok: 1986 **GLP:** ne

Primární zdroj: SERVO DELDEN BV DELDEN DSM Special Products B.V. Geleen Allied Signal USA in house data.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

STUDIE INHIBICE RŮSTU VODNÍCH ROSTLIN (ŘAS)

Studie: Toxicity to Aquatic Plants e.g. Algae

Druh: *Scenedesmus sp.* (Algae)

Endpoint: growth rate

Expozice: -

Hodnota: LOEC = 1000 mg/l

Metoda: ostatní

Rok: 1968 **GLP:** ne

Primární zdroj: Meinck, F. et al. 1968) Industrie–Abwaesser, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Toxicity to Aquatic Plants e.g. Algae

Druh: *Scenedesmus sp.* (Algae)

Endpoint:

Expozice: -

Hodnota: LOEC = 1000 mg/l

Metoda: ostatní

Rok: **GLP:** ne

Primární zdroj: Handbook of environmental data of organic chemicals 2nd edition. Karel Verschueren p. 304 Algae: *Scenedesmus*: still toxic at 1 g/l.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Toxicity to Aquatic Plants e.g. Algae

Druh: *Scenedesmus sp.* (Algae)

Endpoint:

Expozice: 72 hodin

Hodnota: EC50 = 83 mg/l

EC90 = 121 mg/l

Metoda: Algentest in Anlehnung an UBA (DIN 38 412/9)

Rok: **GLP:** ne

Primární zdroj: BASF AG, Labor Oekologie; unveroeffentlichte Untersuchung (2/1327/88/t72)

Sekundární zdroj: IUCLID 4

STUDIE SUBAKUTNÍ TOXICITY NA RYBÁCH

Studie: Acute/ Prolonged Toxicity to Fish

Typ: průtoková

Živočišný druh: *Pimephales promelas* (sladkovodní ryba)

Doba expozice: 96 hodin

Teplota: -

Výsledek: LC50 = 843 mg/l

Rok: 1984 **GLP:** ne

Primární zdroj: Cis Acquire online database 1992.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

Studie: Acute/ Prolonged Toxicity to Fish

Typ: statická

Živočišný druh: *Leuciscus idus* (sladkovodní ryba)

Doba expozice: 96 hodin

Teplota: -

Výsledek: LC50 = 320 – 1000 mg/l

NOEC = 320 mg/l

Rok: 1982 **GLP:** ne

Metoda: DIN 38 412

Primární zdroj: BASF Ecotoxicology Laboratory. 89/54 30/3/89.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

ZKOUŠKY INHIBICE AKTIVOVANÉHO KALU

Studie: Activated sludge respiration inhibition testing

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

ZKOUŠKA CHRONICKÉ TOXICITY NA BEZOBRATLÝCH

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Long-term toxicity testing on invertebrates

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

ZKOUŠKA CHRONICKÉ TOXICITY NA RYBÁCH

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Long-term toxicity testing on fish*Výsledek:* Data nenalezena*Poznámka:* Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok**ZKOUŠKA TOXICITY NA RYBÍM PLŮDKU (FELS)**

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Fish early-life stage (FELS) toxicity test*Výsledek:* Data nenalezena*Poznámka:* Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok*Metoda:* OECD No.210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test**ZKOUŠKA KRÁTKODOBÉ TOXICITY NA RYBÍCH EMBRYÍCH A NA VÁČKOVÉM STÁDIU**

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Fish short-term toxicity on embryo and sac-fry stages*Výsledek:* Data nenalezena*Poznámka:* Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok**RŮSTOVÁ ZKOUŠKA NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH**

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Fish short-term toxicity on embryo and sac-fry stages*Výsledek:* Data nenalezena*Poznámka:* Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok**ROZKLAD**

BIOTICKÝ

Snadný rozklad (ready biodegradability)

Studie: Biodegradation*Typ:* aerobní*Inoculum:* aktivovaný kal*Koncentrace:* 400 mg/l related to DOC (Dissolved Organic Carbon)*Výsledek:* Degradation: cca. 70 % za 14 dní*Metoda:* OECD Guide–line 302 B "Inherent biodegradability: Modified Zahn–Wellens Test"*Primární zdroj:* MITI. Biodegradation and bioaccumulation data of existing chemicals based on the CSCL Japan. JETOC October 1992.*Sekundární zdroj:* IUCLID 4*Studie:* Biodegradation*Typ:* aerobní, inherently biodegradable*Inoculum:* aktivovaný kal*Koncentrace:* 30 mg/l related to Test substance*Výsledek:* Degradation: cca 25% za 28 dní*Metoda:* ostatní*Rok:* 1992

Poznámka: Degree of biodegradation was 24.7 % by BOD after 28 days. Test substance concentration 30 mg/l and activated sludge concentration 100 mg/l (as suspended solid).

Primární zdroj: MITI. Biodegradation and bioaccumulation data of existing chemicals based on the CSCL Japan. JETOC October 1992.

Sekundární zdroj: IUCLID 4

SIMULAČNÍ ZKOUŠKY KONEČNÉHO ROZKLADU V POVRCHOVÝCH VODÁCH

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Simulation testing on ultimate degradation in surface water

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

SIMULAČNÍ ZKOUŠKA PŮDY

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Soil simulation testing

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

SIMULAČNÍ ZKOUŠKA V SEDIMENTU

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Sediment simulation testing

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

ABIOTICKÝ ROZKLAD

Hydrolyza jako funkce pH

Studie: Hydrolysis as a function pH

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

IDENTIFIKACE PRODUKTŮ ROZKLADU

(není nutný pro tonáž do 100 tun)

Studie: Identification of degradation product

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

OSUD A CHOVÁNÍ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

SKRINING ADSORPCE/DESORPCE

Studie: Adsorption/desorption screening

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

BIOAKUMULACE VE VODNÍCH ORGANISMECH, PŘEDNOSTNĚ U RYB

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Bioaccumulation in aquatic species

Druh: Cyprinus carpio (Fish, fresh water)

Expozice: 42 dní při 25 °C

Koncentrace: 2 mg/l

BCF: ca 5-6

Metoda: OECD Guide–line 305 C "Bioaccumulation: Test for the Degree of Bioconcentration in Fish"

Primární zdroj: Biodegradation and Bioaccumulation Data of Existing Chemicals Based on the CSCL Japan, edited by Chemicals Inspection & Testing Institute Japan, published by Japan Chemical Industry Ecology–Toxicology & Information Center, October 1992

Sekundární zdroj: IUCLID 4

DALŠÍ INFORMACE O ADSORPCI/DESORPCI

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Adsorption/desorption

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

DALŠÍ INFORMACE O OSUDU A CHOVÁNÍ LÁTKY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ NEBO ROZKLADNÝCH PRODUKTŮ

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Stability in water

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

ÚČINEK NA SUCHOZEMSKÉ ORGANISMY KRÁTKODOBÁ ZKOUŠKA NA BEZOBRATLÝCH

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Short-term toxicity on invertebrates

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

ÚČINKY NA PŮDNÍ MIKROORGANISMY

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Effects on soil micro-organism

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

KRÁTKODOBÁ ZKOUŠKA NA ROSTLINÁCH

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Short-term toxicity to terrestrial plants

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

ZKOUŠKY CHRONICKÉ NA BEZOBRATLÝCH

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Long-term toxicity testing on invertebrates

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

ZKOUŠKY CHRONICKÉ TOXICITY NA ROSTLINÁCH

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Long-term toxicity testing on plants

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

CHRONICKÁ TOXICITA U ORGANISMŮ V SEDIMENTU

(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Long-term toxicity to sediment organisms

Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

CHRONICKÁ TOXICITA REPRODUKČNÍ TOXICITY U PTÁKŮ

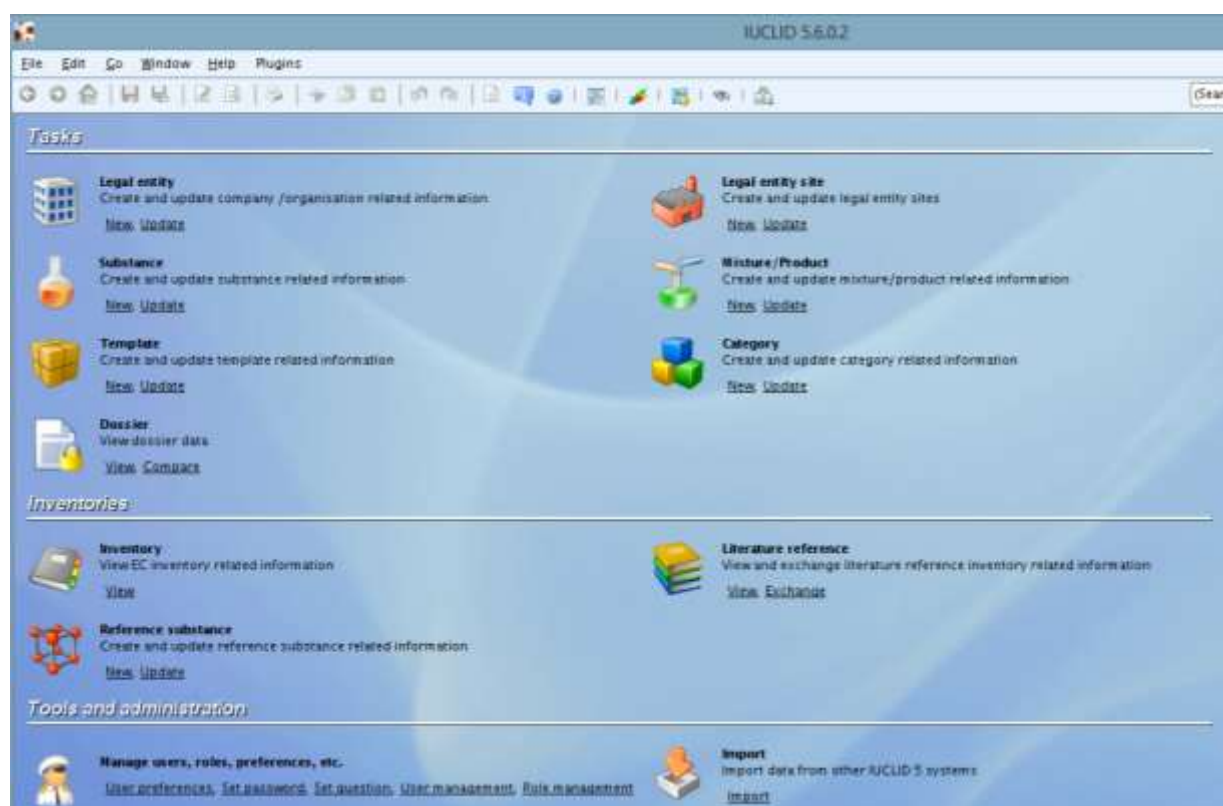
(NENÍ NUTNÝ PRO TONÁŽ DO 100 TUN)

Studie: Long-term or reproductive toxicity on birds

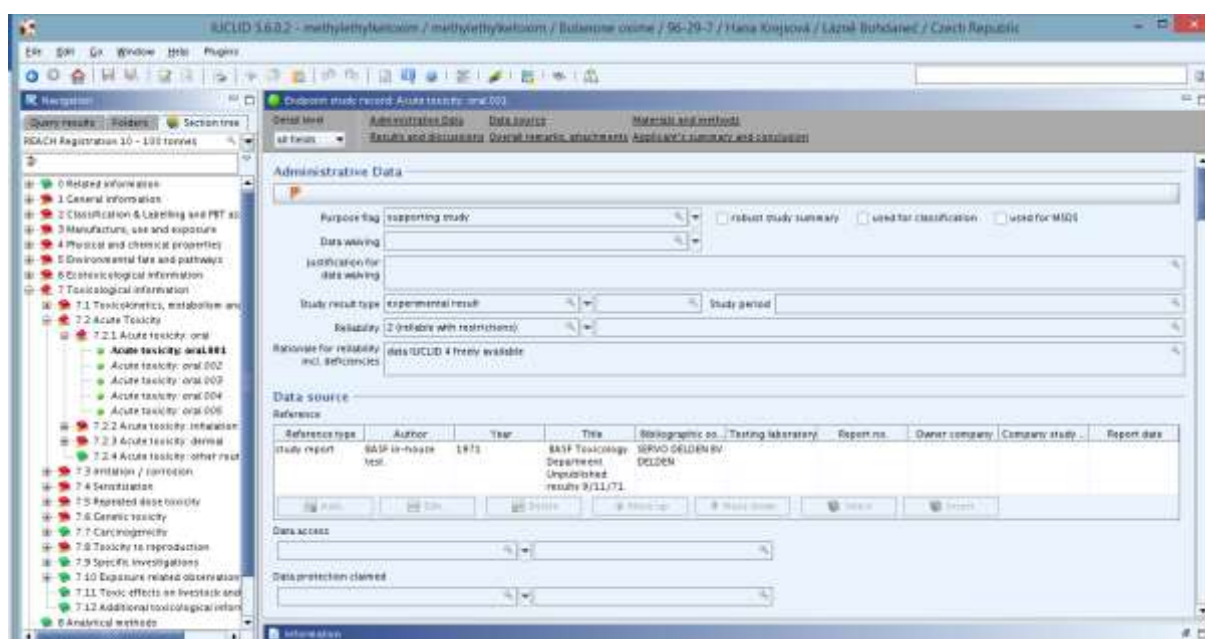
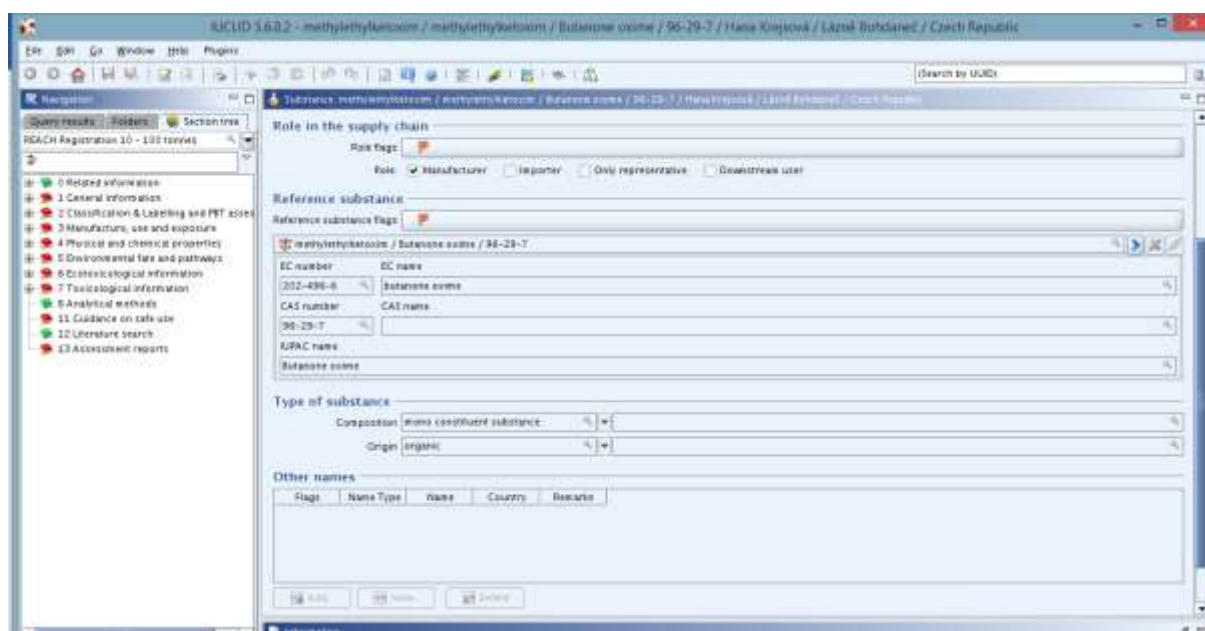
Výsledek: Data nenalezena

Poznámka: Doporučen test pro tonáž nad 1000 t za rok

UKÁZKA DATABÁZOVÉHO PROSTŘEDÍ IUCLID 5



Úvodní obrazovka, základní „strom“ požadovaných údajů – endpointů



DATA POUŽITÁ PRO UKÁZKOVÝ DOSSIER

Na údaje z volně dostupného Datasetu IUCLID 4, které lze podle pravidel využít pro registraci, uplynula již ochranná lhůta dat.

V původních požadavcích registrace, ke které se vztahuje starý dataset dat nebyly požadavky na podrobnost údajů až tak rozsáhlé a protože, jak již bylo vysvětleno nneí pro ukázkový dossier možnost získat plné znění studií nejsou v databázovém programu vždy všechna pole, která se vztahují k danému end pointu vyplněna.

Proto nebyl zvolen tiskový výstup z databáze (pouze v ukázce jednoho vyplněného endpointu), ale je zde uveden celý souhrn dat, které byli do databázového prostředí zaneseny.

Data jsou ponechána v angličtině, protože do IUCLID se obvykle anglicky zapisuje. Je možné použít i národní jazyk, ale celá řada údajů se tam vyplňuje z číselníků (roletek), u kterých změna jazyka není možná a text by pak byl dvojjazyčný a takto se registrační dokumentace neodevzdává.

Na základě rešeršních údajů byly do ukázkového registračního dossieru z datasetu IUCLID 4 vybrány následující údaje:

Použití:

Production from hydroxylamine and 2-butanone by oximation in closed system.

Exposure – sources: – drumming and filling of containers–tankcars

- at production of paints, lacquers, oxime–silanes and oxime–silicone sealents
- at industrial or do–it yourself use of paints, lacquers, oxime–silanes and oxime–silicone sealents

Production from hydroxylamine and 2-butanone by oximation in closed systems. Personal sampling indicates low exposures.

Fyzikálně chemická data:**Melting Point**

- 20 °C

Thermal decomposition: > 150 °C

Formation of hydroxylamine possible.

(10) BASF AG, Sicherheitsdatenblatt Luaktin M (04/90).

Boiling Point

cca 153 °C at 1013 hPa

Decomposition: yes

Decomposition will occur above 100 °C. When heated, decomposition will be promoted by contamination with acid and metal

(11) Weast, R.C. (ed) Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press Inc USA 1988.

Density

relative density

ca. 0,92 g/cm³ at 20 °C

(10) BASF AG, Sicherheitsdatenblatt Luaktin M (04/90).

(12) Stoerfall-Verordnung vom 20.09.1991.

Vapour Pressure

4.4 hPa at 20 °C

19.5 hPa at 50 °C

(10) BASF AG, Sicherheitsdatenblatt Luaktin M (04/90).

Partition Coefficient

log Pow: 0.65 at 25 °C

Method: OECD Guide-line 107 "Partition Coefficient (n-octanol/water), Flask-shaking Method"

Year: 1988

(13) BASF AG. Analytisches Labor, unpublished data (J.Nr. 101219 10/10/1988).

(14) BASF AG, Analytisches Labor, unveroeffentlichte Untersuchungen (J.Nr. 101219 vom 10.10.1988).

Water Solubility

100 g/l at 20 °C

6.5 at 114 g/l and 20 °C

Year: 1988 soluble

(10) BASF AG, Sicherheitsdatenblatt Luaktin M (04/90).

Flash Point

ca. 62 °C

Type: closed cup

PENSKY MARTENS CC, ASTM D93 ISO 3679

(10) BASF AG, Sicherheitsdatenblatt Luaktin M (04/90).

Auto Flammability

ca. 315 °C at 1013 hPa

Method: Directive 84/449/EEC, A.15 "Auto-flammability of volatile liquids or gases"

(15) BASF AG Safety Data Sheet.

Flammability

Result: non flammable

Method: Directive 84/449/EEC, A.13 "Flammability (solids and liquids)"

GLP: no

(16) SERVO DELDEN BV DELDEN.

Explosive Properties

Result: not explosive

Method: Directive 84/449/EEC, A.14 "Explosive properties"

Remark: Explosion Limits in air: 3.1 – 50 Volume % at 60 C and 1013 hPa.

(15) BASF AG Safety Data Sheet.

Oxidizing Properties

Result: no oxidizing properties

Method: Directive 84/449/EEC, A.17 "Oxidizing properties"

Source:

(16) SERVO DELDEN BV DELDEN.

Additional Remarks

When heated strong exothermic reactions may occur.

Životní prostředí :***Biodegradation***

Type: aerobic

Inoculum: activated sludge

Concentration: 400 mg/l related to DOC (Dissolved Organic Carbon)

Degradation: ca. 70 % after 14 day

Result: readily biodegradable

Method: OECD Guide–line 302 B "Inherent biodegradability: Modified Zahn–Wellens Test"

Year: GLP: no

(17) MITI. Biodegradation and bioaccumulation data of existing chemicals based on the CSCL Japan. JETOC October 1992.

Type: aerobic

Inoculum: activated sludge

Concentration: 30 mg/l related to Test substance

Degradation: = 25 % after 28 day

Result: inherently biodegradable

Method: other

Year: 1992 **GLP:** yes

Test substance: other TS

Remark: Degree of biodegradation was 24.7% by BOD after 28 days. Testsubstance concentration 30 mg/l and activated sludge concentration 100 mg/l (as suspended solid).

(18) Biodegradation and Bioaccumulation Data of Existing Chemicals Based on the CSCL Japan, edited by Chemicals Inspection & Testing Institute Japan, published by Japan Chemical Industry Ecology–Toxicology & Information Center, October 1992.

Type: aerobic

Inoculum: other: Belebtschlamm der BASF–Klaeranlage

Concentration: related to DOC (Dissolved Organic Carbon)

Degradation: = 70 % after 18 day

(19) BASF AG, Labor Oekologie; unveroeffentlichte Untersuchung (23.11.1978).

Type: aerobic

Inoculum: other

Concentration: related to DOC (Dissolved Organic Carbon)

Degradation: = 70 % after 18 day

Result: readily biodegradable

(20) BASF AG. Ecotoxicology Laboratory, unpublished results, date 32/11/1978.

Bioaccumulation

Species: *Cyprinus carpio* (Fish, fresh water)

Exposure period: 42 day at 25 °C

Concentration: 2 mg/l

BCF: ca. 0.5 – 0.6

Elimination:

Method: OECD Guide–line 305 C "Bioaccumulation: Test for the Degree of Bioconcentration in Fish"

Year: GLP:

Test substance:

Source: BASF AG Ludwigshafen

Test condition: Lipid: 4.9% (av.)

(18) Biodegradation and Bioaccumulation Data of Existing Chemicals Based on the CSCL Japan, edited by Chemicals Inspection & Testing Institute Japan, published by Japan Chemical Industry Ecology–Toxicology & Information Center, October 1992.

Toxicita pro vodní organismy:

Acute/Prolonged Toxicity to Fish

Type: flow through

Species: *Pimephales promelas* (Fish, fresh water)

Exposure period: 96 hour(s)

Unit: mg/l

Analytical monitoring: no data

LC50: = 843

Method: other

Year: 1984 **GLP:** no data

Test substance: other TS

(21) Cis Acquire online database 1992.

Type: static

Species: *Leuciscus idus* (Fish, fresh water)

Exposure period: 96 hour(s)

Unit: mg/l **Analytical monitoring:** no data

NOEC: = 320

LC50: = 320 – 1000

Method: other

Year: 1982 **GLP:** no

Test substance: other TS

(22) BASF Ecotoxicology Laboratory. 89/54 30/3/89.

Type: static

Species: *Leuciscus idus* (Fish, fresh water)

Exposure period: 96 hour(s)

Unit: mg/l

Analytical monitoring: yes

NOEC: 320

LC50: 320 – 1000

Method: other: nach Guideline DIN 38 412 "Bestimmung der Wirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Fische – Fischtest"

Year: 1982 **GLP:** no

Test substance: as prescribed by 1,1 – 1,4

(23) BASF AG: Abt. Toxikologie unveroeffentlichte Untersuchung, (89/54), 30.03.1989.

Type: static

Species: *Poecilia reticulata* (Fish, fresh water)

Exposure period: 96 hour(s)

Unit: mg/l

Analytical monitoring: no

LC50: = 760

Method: ISO 7346/1–3

Year: 1989 **GLP:** no

Test substance: other TS

(24) BO–MVR 1989.

Acute Toxicity to Aquatic Invertebrates

Species: *Daphnia magna* (Crustacea)

Exposure period: 48 hour(s)

Unit: mg/l

Analytical monitoring: no data

EC0: = 500

EC50: > 500

EC100: > 500

Method: Directive 84/449/EEC, C.2 "Acute toxicity for *Daphnia*"

Year: 1988 **GLP:** no data

Test substance: other TS

Remark: BASF in–house test with *Daphnia magna* Straus.

(25) BASF AG Ecotoxicology Laboratory. Unpublished results. 1/1327/2/88–1327/88.

Species: *Daphnia magna* (Crustacea)

Exposure period: 48 hour(s)

Unit: mg/l

Analytical monitoring: no data

EC50: = 750

Method: other

Year: 1986 **GLP:** no data

Test substance: other TS

(26) Allied Signal USA in house data.

Toxicity to Aquatic Plants e.g. Algae

Species: *Scenedesmus sp.* (Algae)

Endpoint: growth rate

Exposure period:

Unit: mg/l

Analytical monitoring: no data

LOEC: = 1000

Method: other

Year: 1968 **GLP:** no data

Test substance: other TS

(27) Meinck, F. et al. (1968) *Industrie–Abwaesser*, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.

Species: *Scenedesmus subspicatus* (Algae)

Endpoint:

Exposure period: 72 hour(s)

Unit: mg/l

Analytical monitoring:

EC50: = 83

EC90: = 121

Method: other: Algentest in Anlehnung an UBA (DIN 38 412/9)

Year: **GLP:**

Test substance:

Remark: EC20(72 h)= 55 mg/l

(28) BASF AG, Labor Oekologie; unveroeffentlichte Untersuchung (2/1327/88/t72).

Species: *Scenedesmus subspicatus* (Algae)

Endpoint:

Exposure period: 72 hour(s)

Unit: mg/l

Analytical monitoring:

EC50: = 83

EC100: = 121

Method:

Year: **GLP:**

Test substance:

Remark: BASF in–house test DIN 38 412/9. EC20 72 hours = 55 mg/l

(29) BASF Ecotoxicology Laboratory. Unpublished results (2/1327/88/t72).

Toxicity to Microorganisms e.g. Bacteria:

Type: aquatic

Species: *Pseudomonas putida* (Bacteria)

Exposure period: 17 hour(s)

Unit: mg/l

Analytical monitoring: no data

EC10: = 177

EC50: = 281

EC90: = 544

Method: other

Year: 1988 **GLP:** no data

Test substance: other TS

Remark: Growth inhibition. BASF in house test.

(30) BASF Ecotoxicology Laboratory. Unpublished data 9/1327/88.

Type: aquatic

Species: *Pseudomonas sp.* (Bacteria)

Exposure period:

Unit: g/l

Analytical monitoring:

LOEC: 0,63

Method: other

Year: **GLP:** no data

Test substance: as prescribed by 1.1 – 1.4

(31) Handbook of environmental data on organic chemicals 2nd edition, Karel Verschueren p. 304.

Type: aquatic

Species: other protozoa

Exposure period:

Unit: g/l

Analytical monitoring:

LOEC: 2,5

Method: other

Year: **GLP:** no data

Test substance: as prescribed by 1.1 – 1.4

(32) Handbook of environmental data on organic chemicals 2nd edition, Karel Verschueren p. 304.

Biotransformation and Kinetics

Type: animal

Remark: Pregnant mice were administered a single oral dose of ¹⁴C 2-butanoneoxime on day 14 of gestation. In addition a male mouse was administered a single oral dose of ¹⁴C 2-butanone oxime. It appears that the substance is rapidly absorbed via the oral route, and distributed intact through the body. Urine and bile contained significant activity throughout the study. Intestinal activity was minimal. This suggests that the substance is primarily excreted via the kidneys.

(33) Allied Signal Inc USA (1961). Whole body autoradiography of the deposition of ¹⁴C 2-butanoneoxime in mice.

AKUTNÍ TOXICITA
Akutní orální toxicita**Type:** LD50**Species:** rat**Value:** 2528 mg/kg bw**Method:** other**Year:** 1971 **GLP:** no**Test substance:** other TS**Remark:** BASF in-house test. SERVO DELDEN BV DELDEN
(34) BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/71.**Type:** LD50**Species:** rat **Sex:****Number of Animals:****Vehicle:****Value:** 2326 mg/kg bw**Method:** other**Year:** 1978 **GLP:** no data**Test substance:** other TS

(35) Study from 1978, TSCATS fiche OTS0524679.

Type: LD50**Species:** rat **Sex:****Number of Animals:****Vehicle:****Value:** 2400 – 3700 mg/kg bw**Method:** other**Year:** **GLP:** no data**Test substance:** as prescribed by 1.1 – 1.4

(36) Product safety data sheet methylethylketoxime, Allied Signal USA, September 1990.

Type: LD50**Species:** rat **Sex:****Number of Animals:****Vehicle:****Value:** 930 mg/kg bw**Method:** other**Year:** 1986 **GLP:** no data**Test substance:** other TS

(37) Federal Register USA (1986) 51, 220, 41430–41432. Methyl ethyl ketonoxime.

Type: LD50**Species:** rat **Sex:****Number of Animals:****Vehicle:****Value:** = 2528 mg/kg bw**Method:** other**Year:** 1971 **GLP:** no**Test substance:** other TS

Remark: BASF in house test.

(38) BASF Toxicologie Department. Unpublished results 9/11/71. BASF AG: Abt. Toxikologie, unveroeffentlichte Untersuchung, (XXI 168), 09.11.1971.

Acute Inhalation Toxicity

Type: LC0

Species: rat **Sex:**

Number of Animals:

Vehicle:

Exposure time: 4 hour(s)

Value: = 3.6 – 4 mg/l

Method: other

Year: 1986 **GLP:** no data

Test substance: other TS

Remark: BASF in-house test. SERVO DELDEN BV DELDEN

(39) BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/71.

Type: LC50

Species: rat **Sex:**

Number of Animals:

Vehicle:

Exposure time: 4 hour(s)

Value: = 20 mg/l

Method: other

Year: 1986 **GLP:** no data

Test substance: other TS

Remark: BASF in-house test. SERVO DELDEN BV DELDEN

(39) BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/71.

(40) Federal register USA (1986) 51, 220, 41430–41432. methylethyl ketonoxime.

Type: other

Species: rat

Sex:

Number of Animals:

Vehicle:

Exposure time: 8 hour(s)

Value: =

Method: other

Year: 1971 **GLP:** no

Test substance: other TS

Remark: 8 hour exposure of 12 rats to a MEKO saturated atmosphere at 20 C, resulted in no deaths. BASF in house test.

(39) BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/1971.

(41) BASF AG: Abt. Toxikologie, unveroeffentlichte Untersuchung, (XX) 168), 09.11.1971.

Acute Dermal Toxicity

Type: LD50

Species: rabbit

Sex:

Number of Animals:

Vehicle:**Value:** 1000 – 2000 mg/kg bw**Method:** other**Year:** GLP: no data**Test substance:** other TS

(42) Allied Signal info.

Corrosiveness and Irritation**Skin Irritation****Species:** rabbit**Concentration:****Exposure:****Exposure Time:****Number of Animals:****PDII:****Result:** moderately irritating**EC classificat.:** irritating**Method:** other**Year:** 1989 **GLP:** no data**Test substance:** other TS**Remark:** Probably according to USA guidelines so 24 hour exposure of skin instead of 4 hours in EC.

(43) Allied Corporation 1989. The toxicology of MEKO, a summary and position statement, report no MA-224-82-28, prepared by M.J. Derelanko and W.E. Rinehart, Allied USA.

Species: rabbit**Concentration:****Exposure:****Exposure Time:****Number of Animals:****PDII:****Result:** not irritating**EC classificat.:****Method:** other: BASF-Test**Year:** GLP: no**Test substance:** as prescribed by 1.1 – 1.4**Source:** BASF AG Ludwigshafen

(44) BASF AG: Abt. Toxikologie, unveroeffentlichte Untersuchung, (XXI 168), 09.11.1971.

Species: rat**Concentration:****Exposure:****Exposure Time:****Number of Animals:****PDII:****Result:** irritating**EC classificat.:** irritating**Method:** other**Year:** 1988 **GLP:** no data

Test substance: other TS

Remark: Probably 24 hours exposure.

(45) Federal Register USA (1988) 53, 178, 35838–35846.

Eye Irritation

Species: rabbit

Concentration:

Dose:

Exposure Time:

Comment:

Number of Animals:

Result: highly irritating

EC classificat.: irritating

Method: other

Year: 1989 **GLP:** no data

Test substance: other TS

(46) Study from 1963, TSCATS fiche OTS0524693.

Species: rabbit

Concentration:

Dose:

Exposure Time:

Comment:

Number of Animals:

Result: irritating

EC classificat.: irritating

Method: other

Year: 1971 **GLP:** no

Test substance: other TS

(47) BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/1971.

Sensitization

Type: Guinea pig maximization test

Species: guinea pig

Number of Animals:

Vehicle:

Result: sensitizing

Classification: sensitizing

Method: Directive 84/449/EEC, B.6 "Acute toxicity (skin sensitization)"

Year: 1990 **GLP:** yes

Test substance: other TS

(48) RCC NOTOX project 018990 (1990). Committed by DSM Special Products.

Type: Guinea pig maximization test

Species: guinea pig

Number of Animals:

Vehicle:

Result: sensitizing

Classification: sensitizing

Method: OECD Guide–line 406 "Skin Sensitization"

Year: 1983 **GLP:** yes
Test substance: other TS
(49) GLP–study from 1983, TSCATS fiche OTS0524684.

Repeated Dose Toxicity

Species: rat **Sex:** male/female

Strain: Fischer 344

Route of admin.: inhalation

Exposure period: 4 weeks

Frequency of treatment: 6h/d and 5d/w

Post. obs. period:

Doses: 25, 100, 400 ppm

Control Group: yes

NOAEL: = 25 ppm

LOAEL: = 100 ppm

Method: other

Year: 1990 **GLP:** yes

Test substance: other TS (75)

Remark: The rats were exposed by inhalation to MEKO vapour. Exposure levels were analysed and particle size distribution measured. Ten animals/sex/group were used. At 100 ppm increased methemoglobin was observed in female rats. At 400 ppm significant alterations in most hematological parameters (increased methemoglobin, increased reticulocytes, increased platelets, increased MCW and MCH, increased total leucocytes counts, in addition decreased hemoglobin, hematocrit, erythrocytes and MCHC) were observed for both male and female rats. At 400 ppm remarkable erythrocyte morphology included increased numbers of nucleated erythrocytes and polychromia, were seen in male and female rats. At 400 ppm increased absolute and relative organ weights of liver and spleen in males and females was seen.

(44) Bio/Dynamics Inc USA project 90–8249 (1990). A four week inhalation study of MEKO in the rat and mouse. Committed by MEKO producers and importers in the USA, in regard of a EPA final test rule under TSCA.

Species: rat **Sex:** male/female

Strain:

Route of admin.: inhalation

Exposure period: 28 days

Frequency of treatment: 6h/d and 5d/w

Post. obs. period:

Doses: 0.21, 1.02, 1.92, 2.57 mg/l

Control Group: yes

NOAEL: = 1.02 mg/l

LOAEL: = 1.92 mg/l

Method: other

Year: 1989 **GLP:** no data

Test substance: other TS (74)

Remark: Study performed by DOW–Corning USA. Minor changes in hematological parameters at doses 1,92 mg/l and higher.

Changes in organ weight (spleen, liver) at doses 1.92 mg/l and higher. Accumulation of iron in spleen at 1,92 mg/l and higher.

(51) Allied Corporation 1989. The toxicology of MEKO, a summary and position statement, report no MA-224-82-28, prepared by M.J. Derelanko and W.E. Rinehart, Allied USA.

Species: rat **Sex:** male/female

Strain:

Route of admin.: gavage

Exposure period: 13 weeks

Frequency of treatment: 5 days/week

Post. obs. period:

Doses: 40, 125, 400 mg/kg

Control Group: yes

NOAEL: < 40 mg/kg

LOAEL: = 40 mg/kg

Method: other

Year: 1991 **GLP:** yes

Test substance: other TS

Remark: In this subchronic neurotoxicity study (10–14 rats/sex/group) effects on hematological parameters were seen again in all dose groups. The NOEL was estimated to be <40 mg/kg/day. At dose levels of 40 and 125 mg/kg/day no consistent or apparant treatment related change in neurobehavioral function or nervous system structure were seen. Transient neurobehavioral changes occurred following dosing with 400 mg/kg/day, immediately after dosing, but these had resolved by the next day. No progressive long term, irreversible neurotoxicity was observed. The NOEL for neurotoxicity was set at 125 mg/kg/day.

(52) Hazleton Washington USA, (1991). Subchronic neurotoxicity study with MEKO in rats (HWA 2088-109). Committed by USA producers and importers of MEKO, in regard of EPA final test rule under TSCA.

Species: rat **Sex:** male

Strain: Fischer 344

Route of admin.: gavage

Exposure period: 28 days

Frequency of treatment: once daily

Post. obs. period: –

Doses: 0, 250, 500 mg/kg/day

Control Group: other: see remark 1

Method: other

Year: 1995 **GLP:** yes

Test substance: other TS

Remark: Control animals (15/group) received distilled water (negative control), 0.5% methylcellulose (vehicle control) or clofibric acid, 250 mg/kg (positive control), at the same dose volume as administered to the treated animals.

Result: Under the conditions of this study, MEKO did not produce any significant hepatic peroxisome proliferation in the rat, as indicated by a lack of effect on palmitoyl-CoA oxidation and by electron microscopy. The potential responsiveness of the animals used in this study was confirmed by the marked induction of palmitoyl-CoA in the rats treated with clofibric acid. While MEKO was not a peroxisome proliferator in the rat, significant increases in the levels of hepatic glutathione (primarily reduced glutathione) were observed in rats given 250 and 500 mg/kg/day MEKO for 14 days. This lack of an effect after 7 days of dosing correlated with the hepatocellular hypertrophy which was seen microscopically after 14 and 28 but not 7 days of treatment.

(53) Study performed by Pharmaco–LSR Inc., East Millstone, New Jersey, USA.(1995). Study no. 94–2368 Committed by AlliedSignal Inc., in regard of EPA final test rule under TSCA.

Species: rat **Sex:** male/female
Strain: Sprague–Dawley
Route of admin.: gavage
Exposure period: 13 weeks
Frequency of treatment: 5 days/week
Species: rat **Sex:** male/female
Strain:
Route of admin.: gavage
Exposure period: 13 weeks
Frequency of treatment: 5 days/week
Post. obs. period:
Doses: 40, 125, 400 mg/kg
Control Group: yes
NOAEL: < 40 mg/kg
LOAEL: = 40 mg/kg
Method: other
Year: 1991 **GLP:** yes
Test substance: other TS

Remark: In this subchronic neurotoxicity study (10 – 14 rats/sex/group) effects on hematological parameters were seen again in all dose groups. The NOEL was estimated to be < 40 mg/kg/day. To check for neurotoxicity the standard "Functional Operational Battery", motor–activity data and neurohistopathology were performed. As positive control acrylamide was used. At dose levels of 40 and 125 mg/kg/day no consistent or apparant treatment related change in neurobehavioral function or nervous system structure were seen. Transient neurobehavioral changes occurred following dosing with 400 mg/kg/day, immediately after dosing, but these had resolved by the next day. No progressive long term, irreversible neurotoxicity was observed. The NOEL for neurotoxicity was set at 125 mg/kg/day.

(54) Hazleton Washington USA, (1991). Subchronic neurotoxicity study with MEKO in rats (HWA 2088–109). Committed by USA producers and importers of MEKO, in regard of EPA final test rule under TSCA.

Genetic Toxicity 'in Vitro'

Type: Ames test
System of testing: *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA 2637 and *E. Coli* uvra/pKM101
Concentration:
Metabolic activation: with and without
Result: negative
Method: other
Year: 1986 **GLP:** no data
Test substance: other TS

(55) Araki, A. et al (1986). Mutagenicities of oxime compounds in *S.typh.* and *E. coli*, *Mutation Research*, 164, 4, 263.

Type: Mouse lymphoma assay
System of testing: Mouse lymphoma L5178Y TK+/-

Concentration: up to 5 mg/pl

Metabolic activation: with and without

Result: negative

Method: other

Year: 1988 **GLP:** no data

Test substance: other TS

Remark: The test was positive without metabolic activation, but negative with metabolic activation. For activation S9 homogenate of liver from male Fischer 344 rats and Syrian golden hamsters induced with Aroclor 1254, was used. The negative result in the presence of metabolizing system indicates that no mutagenicity in *in vivo* will occur.

(56) Rogers-back, A.M., et al (1988). Genotoxicity of six oxime compounds in the *S. typh* assay and the mouse lymphoma TK +/- assay, *Mutation Research*, 204, 149–162.

Genetic Toxicity '*in Vivo*'

Type: Cytogenetic assay

Species: rat **Sex:** male/female

Strain: Sprague–Dawley

Route of admin.: gavage

Exposure period: Single dose

Doses: 300, 600, 1200 mg/kg

Result:

Method: other

Year: 1990 **GLP:** yes

Test substance: other TS

Remark: The high dose was set as the MTD. Bone marrow cells, arrested in metaphase and collected 6, 24, 48 hours after dosing, were examined microscopically for structural chromosome aberrations. No significant effects were seen, regardless of treatment or bone marrow collection time.

Type: Cytogenetic assay

Species: *Drosophila melanogaster*

Sex: male

Strain:

Route of admin.: drinking water

Exposure period: 3 days

Doses: 7500 ppm

Result:

Method: other

Year: 1991 **GLP:** no data

Test substance: other TS

Result: It is concluded that MEKO does not induce mutations in the post-meiotic germ cells of *Drosophila melanogaster* when administered by feeding to adult males.

(57) Sex-linked recessive lethal test. Report no. T9293.160003 (1991) Test performed by University of Wisconsin, Madison USA.

Carcinogenicity

Species: rat **Sex:** male/female

Strain: Fischer 344

Route of admin.: inhalation

Exposure period: 26 months

Frequency of treatment: 6h/d and 5d/w

Post. obs. period: see remark 1

Doses: 0, 15, 75, 375 ppm, 80/sex/group, 4 groups

Result:

Control Group: yes, concurrent no treatment

Method: other

Year: 1993 **GLP:** yes

Test substance: other TS

Remark: Body weight measurements were recorded once pretest, weekly through week 13, monthly through week 113 and just prior to sacrifice. Hematology and clinical chemistry parameters were evaluated for up to 10 animals/sex/group sacrificed at month 3, 12 and 18 and at study termination. Differential white blood cell counts were analyzed for all survivors at month 12 and 18 and at termination of the study. Following approximately 3, 12 and 18 months of exposure, up to 10 animals/sex/group were sacrificed, selected organs were weighed and organ/body and organ/brain weight ratios calculated. Following approximately 26 months of exposure, all survivors were sacrificed, selected organs were weighed and organ/body and organ/brain weight ratios calculated. Histopathological evaluation of selected tissues was performed for all Group I and IV animals and sentinel animals and all animals in Groups II and III which were found dead or sacrificed in a moribund condition prior to study termination. In addition, the eyes, liver, lungs, nasopharyngeal tissues, ovaries, spleen and testes were examined for all animals in Groups II and III.

Result: At termination of the study, in the control group survivorship was 34% in the males and 60% in the females. There was no difference in survivorship among any of the exposure groups including control. There were no physical observations which were considered MEKO related. Ophthalmoscopic examinations of the animals found a treatment-exaggerated incidence of corneal dystrophy and opacities. The dystrophic changes seen in the 374 ppm group were far more severe than in other groups. This increase was probably a result of MEKO exaggerating a strain-related condition already present. Mean body weights and body weight gains from study initiation were significantly elevated by exposure to MEKO in both the males and the females. After 13 weeks of exposure, the 374 ppm males were 13% heavier than the control males and the females were 4% heavier. At the 3 month sacrifice in the 374 ppm group, methemoglobin was elevated in the males from 0.4 to 1.2%; hemoglobin was decreased 4%; erythrocytes were decreased 7%; mean corpuscular volume was increased 2%; mean corpuscular hemoglobin concentration was decreased 4%; platelets were increased 25% and leukocyte counts were increased 6%. Similar effects were seen in the females. The differences were still statistically significantly different at 12 months in the 374 ppm group but tolerance or adaptation seemed to occur for the effects. Most were no longer significantly different by 18 months in the males or 24 months in both sexes. MEKO-related increases in absolute and relative organ weights were seen in the liver, spleen and testes. At three months in the 374 ppm group, liver weights were elevated about 18% and spleen weights were elevated by about 33%. Tolerance or adaptation occurred and the liver and spleen differences decreased over time. However the increase in testes weight did not. At study termination the 374 ppm group's testes weighed 82% more than the control group's. Treatment-related macroscopic findings were not observed at 3 or 12 months. At 18 months an increased incidence of red/tan discoloration of the liver and enlarged testes in treated animals appeared to be treatment related. In the chronic study (24 months and all unscheduled deaths), an increased incidence of red/tan discoloration and nodules/masses of the liver, enlarged testes, and opacity enlarged spleens in animals of Group IV appeared to be treatment related. There were a number of treatment related microscopic findings. Congestion of the spleen with pigment in reticuloendothelial cells and extramedullary hematopoiesis appeared to be

treatment related in the 374 ppm animals at 3 months, 12 months and 18 months sacrifices. However, at the terminal sacrifice these findings were masked by the high incidence of mononuclear cell leukemia in animals other than the 374 ppm animals and could not be evaluated. Findings which appeared treatment related at 12 and 18 months and in the chronic study were seen in the liver and nasal turbinates. The liver changes were increased incidence of basophilic foci and hepatocellular vacuoles and decreased incidence of hyperplasia/proliferation of the biliary duct and peribiliary fibrosis. The turbinate changes were degenerative changes of olfactory epithelium eosinophilic/basophilic material/erythrocytes in the lumen of nasal turbinate section 2, 3 and 4; and a decrease in the incidence of eosinophilic droplets in olfactory epithelium in treated animals. Further findings which appeared treatment related only in the chronic study animals were seen in the liver. The liver changes were increased incidence of hepatocellular carcinoma and adenoma and spongiosis hepatis. In conclusion, under the exposure conditions of this study, MEKO was a liver oncogen in the male rat at 75 ppm.

(58) An inhalation oncogenicity study of Methylethylketoxim in rats and mice. Part II – rats. Study performed by Pharmaco LSR Inc., East Millstone, New Jersey, USA. Committed by producers and importers of MEKO in the USA, in regard of the EPA final test rule for MEKO under TSCA.

Species: rat **Sex:** male/female

Strain: Fischer 344

Route of admin.: inhalation

Exposure period: 24 months

Frequency of treatment: 6h/d and 5d/w

Post. obs. period:

Doses: 15, 75, 375 ppm

Result:

Control Group: yes

Method: other

Year: 1993 **GLP:** yes

Test substance: other TS

Remark: The final report of this carcinogenicity study performed in the USA will not be available until end of 1994. Only interim results are available so far. 80 rats/sex/group were used. No indications for carcinogenicity were found so far.

(59) Bio/Dynamics Inc USA (1992). Inhalation oncogenicity study of MEKO in rats and mice. Interim report april 1992. Committed by producers and importers of MEKO in the USA, in regard of the EPA final test rule for MEKO under TSCA.

Toxicity to Reproduction

Type: Two generation study

Species: rat **Sex:** male/female

Strain: Sprague–Dawley

Route of admin.: gavage

Exposure Period: 13 weeks

Frequency of treatment: once daily

Premating Exposure Period male: 10 weeks

female: 10 weeks

Duration of test:

Doses: 10, 100, 200 mg/kg

Control Group: yes

NOAEL Parental: < 10 mg/kg bw
NOAEL F1 Offspr.: = 200 mg/kg bw
NOAEL F2 Offspr.: = 200 mg/kg bw

Method: other

Year: 1992 **GLP:** yes

Test substance: other TS

Remark: Male and female CD Sprague–Dawley weanling rats (F0) were administered MEKO in deionised/distilled water by gavage at 0, 10, 100, 200 mg/kg/d at a dosing volume of 2.0 ml/kg, 30 animals/sex/dose, for 10 weeks. Animals were then randomly mated for a three week mating period to produce the F1, with dosing continued. Selected F1 weanlings, 30/sex/dose, were administered MEKO and mated as above. Hematologic evaluations and histopathology were performed.

Result: Adult toxicity was observed in both generations and in both sexes at all doses of MEKO with clear dose–related incidences and severity of findings. Consistent evidence of treatment related anemia was observed at 200 mg/kg/d with concomitant histologic evidence of extramedullary hematopoiesis and hemosiderosis in adult livers and spleens; spleen weights were increased at this dose level as well. At 100 mg/kg/d, these effects were also seen. At 10 mg/kg/d only histologic evidence of extramedullary hematopoiesis and hemosiderosis was observed in spleens and livers of F0 and F1 males and females. Therefore no NOEL for adult toxicity could be established. There was no evidence of reproductive organ or mammary gland histopathology at any dose tested. There was no evidence of reproductive or postnatal toxicity at any dose tested. There was no "no observable adverse effect level" (NOAEL) detected for adult toxicity in this study due to histologic evidence of hepatic and splenic involvement at the low dose. The NOAEL for this reproductive and postnatal toxicity was at least 200 mg/kg/d under the conditions of this study.

Source: SERVO DELDEN BV DELDEN

(60) Two–generation reproduction study of MEKO administered by gavage to Sprague–Dawley rats. Study performed by Research Triangle Institute, Research Triangle Park, North Carolina, USA. RTI project 60C–4692 (1992). Committed by producers and importers of MEKO in the USA, in regard of the EPA final test rule for MEKO under TSCA.

Developmental Toxicity/Teratogenicity

Species: rat **Sex:** female

Strain:

Route of admin.: drinking water

Exposure period: dag 6 tot en met dag 15

Frequency of treatment: 10ml/kg/dag

Duration of test: dag 0 tot en met dag 20

Doses: 60, 200, 600 mg/kg/dag, doseringsvolume 10 ml/kg, 3*25 dieren

Control Group: yes, concurrent vehicle

Method: other

Year: 1990 **GLP:** no data

Test substance: as prescribed by 1,1 – 1,4

Result: Oral administration of 2-Butanonoxim to pregnant rats for ten consecutive days produced maternal toxicity as expressed through post–dosing clinical signs and body weight and food consumption effects at dosage levels of 200 and 600 mg/kg/day. 2-Butanonoxim was not developmentally toxic or teratogenic at any of the dosage levels tested

(61) Test performed by Springborn Laboratories, Inc. (SLS) Spencerville, USA.

TISKOVÁ UKÁZKA ENDOINU K REPRODUKČNÍ TOXICITĚ



Printing Date: 2018-05-25 16:18:52 CEST

Restriction of specific regulatory purposes

Confidentiality

Owner methylethylketoxim / methylethylketoxim / Butanone oxime / 96-29-7 / Ladislav Novák / Pardubice / Czech Republic

Legal entity owner Ladislav Novák /Pardubice / Czech Republic

Endpoint study record: Repeated dose toxicity: inhalation.001

UUID IUC5-8763418f-0460-4837-9cd2-e83b514fe0e1
Dossier UUID 0
Author HK / Ladislav Novák / Pardubice / Czech Republic
Date 2018-05-10 11:34:13 CEST
Remarks

Administrative Data

Purpose flag supporting study
Study result type experimental result
Reliability 2 (reliable with restrictions)
Rationale for reliability incl. deficiencies data IUCLID 4 freely available

Data source

Reference

Reference type	Author	Year	Title	Bibliographic source	Testing laboratory	Report no.	Owner company	Company study no.	Report date
publication	BioDynamics Inc USA	1990		BioDynamics Inc USA project 90-8249 (1990). A four week inhalation study of MEKO in the rat and mouse. Committed by MEKO producers and importers in the USA, in regard of a EPA final test rule under TSCA.					

Materials and methods

Test type

subacute

GLP compliance

yes

Test materials

Identity of test material same as for substance defined in section 1 (if not read-across)

yes

Test animals**Species**

rat

Strain

Fischer 344

Sex

male/female

Administration / exposure**Route of administration**

Inhalation

Type of inhalation exposure

no data

Vehicle

no data

Frequency of treatment

6h/d and 5d/w

Doses/concentrations

25, 100, 400 ppm

Control animals

yes

Results and discussions**Effect levels**

Endpoint	Effect level	Based on	Sex	Basis for effect level / Remarks
NOAEL	>= 25 ppm			
LOAEC	>= 100 ppm			

Results of examinations**Details on results**

The rats were exposed by inhalation to MEKO vapour. Exposure levels were analysed and particle size distribution measured. Ten animals/sex/group were used. At 100 ppm increased methemoglobin was observed in female rats. At 400 ppm significant alterations in most hematological parameters (increased methemoglobin, increased reticulocytes, increased platelets, increased MCW and MCH, increased total leucocytes counts, in addition decreased hemoglobin, hematocrit, erythrocytes and MCHC) were observed for both male and female rats. At 400 ppm remarkable erythrocyte morphology included increased numbers of nucleated erythrocytes and polychromia, were seen in male and female rats. At 400 ppm increased absolute and relative organ weights of liver and spleen in males and females was seen.

Applicant's summary and conclusion**Conclusions**

NOAEL = 25 ppm
LOAEL = 100 ppm

7 ZÁVĚR

Nové principy pro uvádění chemikálií na evropský trh jsou mnohem náročnější než notifikace podle legislativy minulé. Na jedné straně by měly při striktním dodržení všech pravidel zajistit výrazně vyšší ochranu zdraví populace i životního prostředí před negativními vlivy výrobků chemického charakteru, na druhé straně má však několik rizik. Prvním z nich je jasné snížení konkurenceschopnosti evropského chemického průmyslu ve světě, dalším je zvýšení výrobních nákladů producentů chemikálií a tím i potenciální zvýšení cen nejen chemikálií, ale i následné produkce, která chemikálie využívá. V oblasti sociální pak hrozí ztráty pracovních míst. Jednou příčinou je bezprostřední ohrožení malých a středních firem díky tomu, že nemají prostředky na financování vysokých nákladů, spojených s registrací, další a velmi vážnou, je přesun výroben velkých firem mimo území EU, tj. tam. Kde nařízení REACH neplatí, a tudíž výroba není zatížena s ním spojenými náklady. První z nebezpečí je aktuální i v ČR, která má poměrně rozvinutý chemický průmysl, který však není příliš kapitálově silný. Pro ilustraci je v evropském chemickém průmyslu zaměstnáno přímo 1,2 milionu lidí, nepřímo pak přes 4 miliony, což znamená přibližně 3 % práce schopného obyvatelstva. V ČR je to pak přímo 110 000 pracovníků a v navazujících odvětví přes 300 000, což činí cca 10 % práce schopného obyvatelstva. Je zřejmé, že neúspěch aplikace nařízení by mohlo mít začne sociální a z toho plynoucí ekonomické následky. Pro zajímavost – podle provedených dopadových studií jsou odhadnutelné náklady na registraci chemikálií u českých firem vyšší než 10 miliard korun.

Nařízení REACH samo o sobě je velmi složitý a rozsáhlý dokument a plnit jeho podmínky v oblasti registrace není pro výrobce a dovozce nic jednoduchého, i když si mohou vzájemně pomoci dohodami a společnou prací na registračním dossier.

Ve zpracovaném dokumentu jsou vesměs použita literární publikovaná data a i dossier takto sestavený ukazuje, jak by dokumentace k registraci vypadala a co všechno musí registrant zjistit, aby ji vůbec bylo možné sestavit.

Ačkoliv práce byla zahájena v čase, kdy se o registraci vědělo velmi málo a končí v době, kdy se naopak o registraci již ví celkem dost, není rozhodně prací zbytečnou, protože registrace nekončí. Velmi reálně se uvažuje o snížení roční tonáže pro registraci, takže přibudou noví registranti, přibývají nové vlastnosti látek (endokrinní disruptory) a nové látky (např. čisté látky v nanoformě), které je třeba posuzovat a které budou podléhat registraci.

A že registrace není jednoduchý proces, ukazuje tato práce.

8 LITERATURA

1)	Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 (REACH)	
2)	Dubský Pavel a kol.: Zpráva o řešení projektu VaV MŽP, VÚOS a.s. 2008	
3)	Basketter D.A., Scholes E.W., Chamberlain A., Barratt M.D.: An Alternative strategy to the Use of Guinea Pigs for the Identification of Skin Sensitization Hazard; Chem.Toxic. Vol. 33, No. 12, pp. 1051-1056, 1995	
4)	Basketter D.A., Lea L.J., Cooper K., Stocks J., Dickens A., Pate I., Dearnam R.J., Kimber I.; Treshold for Classification as a Skin Sensitizer in the Local lymph Node Assay: a Statistical Evaluation; Food and Chemical Toxicology 37 (1999) 1167-1174.	
5)	Ehling G., Hecht M., Heusener A., Huesler J., Gamer A.O., H. van Loveren, Maurer Th., Riecke K., Ullmann L., Ulrich P., Vandebriel R., Vohr H.-W.: An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: First round; Toxicology 212 (2005) 60-68	
6)	OECD Test Guideline No. 437 - Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosive and Severe Irritants, Adopted 7 th September 2009	
7)	OECD DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, May 2009	
8)	INVITTOX Protocol 124: The Bovinne Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd., UK.	
9)	Nařízení komise (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek.	
		End point
10)	BASF AG, Sicherheitsdatenblatt Luaktin M (04/90)	Melting Point Density Vapour Pressure Water Solubility Flash Point
11)	Weast, R.C. (ed) Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press Inc USA 1988.	Boiling Point
12)	Stoerfall–Verordnung vom 20.09.1991	Density
13)	BASF AG. Analytisches Labor, unpublished data (J.Nr. 101219 10/10/1988).	Partition Coefficient
14)	BASF AG, Analytisches Labor, unveroeffentlichte Unter–suchungen (J.Nr. 101219 vom 10.10.1988)	Partition Coefficient
15)	BASF AG Safety Data Sheet	Auto Flammability Explosive

		Properties
16)	SERVO DELDEN BV DELDEN	Flammability Oxidizing Properties
17)	MITI. Biodegradation and bioaccumulation data of existing chemicals based on the CSCL Japan. JETOC October 1992.	Biodegradation
18)	Biodegradation and Bioaccumulation Data of Existing Chemicals Based on the CSCL Japan, edited by Chemicals Inspection & Testing Institute Japan, published by Japan Chemical Industry Ecology–Toxicology & Information Center, October 1992	Biodegradation BOD5, COD or BOD5/COD Ratio
19)	BASF AG, Labor Oekologie; unveroeffentlichte Untersuchung (23.11.1978)	Biodegradation
20)	BASF AG. Ecotoxicology Laboratory, unpublished results, date 32/11/1978.	Biodegradation
21)	Cis Acquire online database 1992.	Toxicity to Fish
22)	BASF Ecotoxicology Laboratory. 89/54 30/3/89.	Toxicity to Fish
23)	BASF AG: Abt. Toxikologie unveroeffentlichte Untersuchung, (89/54), 30.03.1989	Toxicity to Fish
24)	BO–MVR 1989	Toxicity to Fish
25)	BASF AG Ecotoxicology Laboratory. Unpublished results. 1/1327/2/88–1327/88.	Toxicity to Aquatic Invertebrates
26)	Allied Signal USA in house data	Toxicity to Aquatic Invertebrates
27)	Meinck, F. et al. (1968) Industrie–Abwaesser, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.	Toxicity to Aquatic Plants e.g. Algae
28)	BASF AG, Labor Oekologie; unveroeffentlichte Untersuchung (2/1327/88/t72)	Toxicity to Aquatic Plants e.g. Algae
29)	BASF Ecotoxicology Laboratory. Unpublished results (2/1327/88/t72)	Toxicity to Aquatic Plants e.g. Algae
30)	BASF Ecotoxicology Laboratory. Unpublished data 9/1327/88.	Toxicity to Microorganisms e.g. Bacteria
31)	Handbook of environmental data on organic chemicals 2nd edition, Karel Verschueren p. 304	Toxicity to Microorganisms e.g. Bacteria
32)	Handbook of environmental data on organic chemicals 2nd edition, Karel Verschueren p. 304	Toxicity to Microorganisms e.g. Bacteria
33)	Allied Signal Inc USA (1961). Whole body autoradiography of the deposition of ¹⁴ C 2–butanoneoxime in mice.	Biotransformation and Kinetics
34)	BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/71.	Acute toxic oral
35)	Study from 1978, TSCATS fiche OTS0524679	Acute toxic oral
36)	Product safety data sheet methylethylketoxime, Allied Signal USA, September 1990	Acute toxic oral

37)	Federal Register USA (1986) 51, 220, 41430–41432. Methylethyl ketonoxime.	Acute toxic oral
38)	BASF Toxicologie Department. Unpublished results 9/11/71. BASF AG: Abt. Toxikologie, unveroeffentlichte Untersuchung, (XXI 168), 09.11.1971	Acute toxic oral
39)	BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/71.	Acute Inhalation Toxicity
40)	Federal register USA (1986) 51, 220, 41430–41432. methylethyl ketonoxime.	Acute Inhalation Toxicity
41)	BASF AG: Abt. Toxikologie, unveroeffentlichte Untersuchung, (XX 168), 09.11.1971	Acute Inhalation Toxicity
42)	Allied Signal info.	Acute Dermal Toxicity
43)	Allied Corporation 1989. The toxicology of MEKO, a summary and position statement, report no MA–224–82–28, prepared by M.J. Derelanko and W.E. Rinehart, Allied USA.	Corrosive and Irritation
44)	BASF AG: Abt. Toxikologie, unveroeffentlichte Untersuchung, (XXI 168), 09.11.1971	Corrosive and Irritation
45)	Federal Register USA (1988) 53, 178, 35838–35846.	Corrosive and Irritation
46)	Study from 1963, TSCATS fiche OTS0524693	Corrosive and Irritation
47)	BASF Toxicology Department. Unpublished results 9/11/1971.	Corrosive and Irritation
48)	RCC NOTOX project 018990 (1990). Committed by DSM Special Products.	Sensitization
49)	GLP–study from 1983, TSCATS fiche OTS0524684	Repeated Dose Toxicity
50)	Bio/Dynamics Inc USA project 90–8249 (1990). A four week inhalation study of MEKO in the rat and mouse. Committed by MEKO producers and importers in the USA, in regard of a EPA final test rule under TSCA.	Repeated Dose Toxicity
51)	Allied Corporation 1989. The toxicology of MEKO, a summary and position statement, report no MA–224–82–28, prepared by M.J. Derelanko and W.E. Rinehart, Allied USA.	Repeated Dose Toxicity
52)	Hazleton Washington USA, (1991). Subchronic neurotoxicity study with MEKO in rats (HWA 2088–109). Committed by USA producers and importers of MEKO, in regard of EPA final test rule under TSCA.	Repeated Dose Toxicity
53)	Study performed by Pharmaco–LSR Inc., East Millstone, New Jersey, USA.(1995). Study no. 94–2368 Committed by AlliedSignal Inc., in regard of EPA final test rule under TSCA.	Repeated Dose Toxicity
54)	Hazleton Washington USA, (1991). Subchronic neurotoxicity study with MEKO in rats (HWA 2088–109). Committed by USA producers and importers of MEKO, in regard of EPA final test rule under TSCA.	Repeated Dose Toxicity
55)	Araki, A. et al (1986). Mutagenicities of oxime compounds in S.typh. and E. coli, Mutation Research, 164, 4, 263.	Genetic Toxicity 'in Vitro'

56)	Rogers-back, A.M., et al (1988). Genotoxicity of six oxime compounds in the S. typh assay and the mouse lymphoma TK +/- assay, Mutation Research, 204, 149-162.	Genetic Toxicity 'in Vitro'
57)	Sex-linked recessive lethal test. Report no. T9293.160003 (1991) Test performed by University of Wisconsin, Madison USA.	Genetic Toxicity 'in Vivo'
58)	An inhalation oncogenicity study of Methyl ethyl ketoxim in rats and mice. Part II – rats. Study performed by Pharmaco LSR Inc., East Millstone, New Jersey, USA. Committed by producers and importers of MEKO in the USA, in regard of the EPA final test rule for MEKO under TSCA.	Carcinogenicity
59)	Bio/Dynamics Inc USA (1992). Inhalation oncogenicity study of MEKO in rats and mice. Interim report april 1992. Committed by producers and importers of MEKO in the USA, in regard of the EPA final test rule for MEKO under TSCA.	Carcinogenicity
60)	Two-generation reproduction study of MEKO administered by gavage to Sprague-Dawley rats. Study performed by Research Triangle Institute, Research Triangle Park, North Carolina, USA. RTI project 60 C-4692 (1992). Committed by producers and importers of MEKO in the USA, in regard of the EPA final test rule for MEKO under TSCA.	Toxicity to Reproduction
61)	Test performed by Springborn Laboratories, Inc. (SLS) Spencerville, USA	Developmental Toxicity/Teratogenicity

Kromě výše uvedené literatury bylo využito studijních materiálů, které byly zpracovány pro potřeby výuky z oblasti nařízení REACH, která byla a jsou pořádána Svazem chemického průmyslu ČR a Výzkumným ústavem organických syntéz a.s., Rybitví.