

B.65 IN-VITRO-PRÜFMETHODE ZUR UNTERSUCHUNG DER MEMBRAN-BARRIERE AUF HAUTVERÄTZUNGEN

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 435 (2015). Als Hautverätzung wird das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie im Sinne der Definition des Global harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Gefahrstoffen der UN (GHS) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung) (1)] bezeichnet. Diese Prüfmethode entspricht der aktualisierten OECD Prüfrichtlinie 435 und besteht in einer *In-vitro*-Prüfmethode zur Untersuchung der Membranbarriere, mit der ätzende Chemikalien ermittelt werden können. Bei dieser Prüfmethode wird eine künstliche Membran verwendet, die *in situ* auf ätzende Chemikalien ähnlich reagiert wie Tierhaut.
2. Hautverätzungen wurden gewöhnlich durch Auftragen der Prüfchemikalie auf die Haut lebender Tiere und durch anschließende Bewertung des Umfangs von Gewebeschäden nach einem bestimmten Zeitraum bewertet (2). Außer dieser Prüfmethode wurden alternativ (3) (4) zum *In-vivo*-Standardverfahren zur Untersuchung von Kaninchenhaut (Kapitel B.4, entsprechend OECD TG 404) noch mehrere weitere *In-vitro*-Prüfmethode zur Ermittlung ätzender Chemikalien (2) angenommen. In der abgestuften Prüf- und Bewertungsstrategie nach dem UN GHS zur Bewertung und Beurteilung von Hautverätzungen und im OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von Hautverätzungen und -reizungen wird die Verwendung validierter und akzeptierter *In-vitro*-Prüfmethode in den Modulen 3 und 4 beschrieben (1) (5). Die IATA beschreiben mehrere Module, in denen Informationsquellen und Analyseinstrumente zu Gruppen zusammengefasst werden. Sie enthalten i) Leitlinien dazu, wie vorhandene Daten aus Versuchen und aus anderen Quellen integriert und verwendet werden können, um das Hautreizungs- und das Hautverätzungspotenzial von Chemikalien zu bewerten, und ii) einen Vorschlag zur Durchführung ggf. erforderlicher weiterer Versuche (u. a. bei negativen Ergebnissen) (5). Bei diesem modularen Ansatz können Chemikalien aufgrund von positiven Ergebnissen, die in *In-vitro*-Prüfmethode ermittelt wurden, als ätzend eingestuft werden, ohne Tierversuche durchführen zu müssen; dadurch wird die Verwendung von Tieren reduziert und optimiert, um Schmerzen und Qualen zu vermeiden, denen für diesen Zweck zu verwendende Tiere ausgesetzt würden.
3. Das im Handel unter der Bezeichnung Corrositex[®] erhältliche *In-vitro*-Membran-Barrieremodell (6) (7) (8) wurde in Validierungsstudien untersucht; dabei wurden für eine Datenbank mit 163 Stoffen und Gemischen eine Gesamtgenauigkeit zur Vorhersage von Hautverätzungen von 79 % (128/163), eine Empfindlichkeit von 85 % (76/89) und eine Spezifität von 70 % (52/74) ermittelt (7). Aufgrund ihrer anerkannten Validität wurde diese validierte Referenzmethode (VRM) zur Verwendung im Rahmen einer abgestuften Prüfstrategie zur Bewertung des hautätzenden Gefährdungspotenzials von Chemikalien empfohlen (5) (7). Bevor ein *In-vitro*-Membran-Barrieremodell zur Untersuchung auf Hautverätzungen für regulatorische Zwecke verwendet werden kann, sollten nach den Anforderungen der Leistungsstandards (10) Verlässlichkeit, Relevanz (Genauigkeit) und die Grenzen des Verfahrens für den vorgeschlagenen Verwendungszweck bestimmt werden, um sicherzustellen, dass es nach den vordefinierten Leistungsstandards (PS) mit der VRM vergleichbar ist (9). Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen wird erst dann garantiert, wenn vorgeschlagene neue oder aktualisierte Methoden auf der Grundlage der Leistungsstandards überprüft und in die gleichwertige OECD-Prüfrichtlinie aufgenommen wurden. Gegenwärtig ist das im Handel unter der Bezeichnung Corrositex[®] angebotene Modell die einzige *In-vitro*-Methode, die der OECD-Prüfrichtlinie 435 entspricht.
4. Andere Prüfmethode zur Untersuchung auf Hautverätzungen beruhen auf der Verwendung rekonstituierter menschlicher Haut (OECD TG 431) (3) und isolierter Rattenhaut (OECD TG 430) (4). Diese Prüfrichtlinie sieht die Möglichkeit der Einstufung ätzender Chemikalien nach ihrer Verätzungswirkung in drei UN-GHS-Unterkategorien und nach der Verätzungsgefahr in drei UN-Verpackungsgruppen vor. Die OECD-Prüfrichtlinie wurde ursprünglich im Jahr 2006 angenommen und 2015 unter Berücksichtigung des IATA-Leitliniendokuments sowie zur Anpassung der Liste der Leistungsstoffe aktualisiert.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

5. Es gelten die Begriffsbestimmungen der Anlage.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

6. Die in dieser Prüfmethode beschriebene Untersuchung ermöglicht die Ermittlung ätzender Prüfchemikalien und die Unterkategorisierung ätzender Prüfchemikalien nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung (Tabelle 1). Außerdem kann eine solche Prüfmethode als Entscheidungsgrundlage für die Beurteilung einer ätzenden bzw. nicht ätzenden Wirkung spezifischer Chemikalienklassen (z. B. organischer und anorganischer Säuren, Säurederivate (2) und Basen für die Zwecke der Untersuchung bestimmter Transportwirkungen) dienen (7) (11) (12). Diese Prüfmethode beschreibt ein allgemeines Verfahren ähnlich der validierten Referenzprüfmethode (7). Sie liefert keine geeigneten Informationen

(1) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

(2) Der Begriff „Säurederivat“ bezeichnet eine nicht spezifische Klasse im Allgemeinen bestehend aus Chemikalien, die mittelbar oder unmittelbar oder durch Modifikation oder partielle Substitution aus einer Säure hervorgegangen sind. Zu dieser Klasse zählen Anhydride, Halosäuren, Salze und andere Arten von Chemikalien.

über Hautreizungen; mit PM B.46 (gleichwertig OECD TG 439) werden jedoch gezielt die gesundheitlichen Auswirkungen von Hautreizungen *in vitro* untersucht (13). Eine umfassende Evaluierung lokaler Auswirkungen auf die Haut nach einer einmaligen dermalen Exposition ist dem OECD-Leitliniendokument über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA) zu entnehmen (5).

Tabelle 1

Die Hautverätzungskategorien und -unterkategorien des UN GHS (1) (1)

Verätzungskategorie (Kategorie 1) (für Behörden, die keine Unterkategorien verwenden)	Potenzielle Unterkategorien von Verätzungswirkungen (1) (für Behörden, die Unterkategorien (u. a. die der CLP-Verordnung) verwenden)	Hautätzend bei ≥ 1 von 3 Tieren	
		Exposition	Beobachtung
Hautätzend	Hautätzend Unterkategorie 1A	≤ 3 Minuten	≤ 1 Stunde
	Hautätzend Unterkategorie 1B	> 3 Minuten / ≤ 1 Stunde	≤ 14 Tage
	Hautätzend Unterkategorie 1C	> 1 Stunde / ≤ 4 Stunden	≤ 14 Tage

(1) Für die EU sieht die CLP-Verordnung für Hautverätzungen die drei Unterkategorien 1A, 1B und 1C vor.

7. Eine Begrenzung der validierten Referenzmethode (7) besteht darin, dass viele nicht ätzende Chemikalien und einige ätzende Chemikalien aufgrund der Ergebnisse der ursprünglichen Kompatibilitätsprüfung für eine Untersuchung möglicherweise nicht in Betracht kommen (Nummer 13). Wässrige Chemikalien mit pH-Werten im Bereich von 4,5 bis 8,5 können häufig nicht untersucht werden; allerdings erwiesen sich 85 % der in diesem pH-Bereich untersuchten Chemikalien in Tierversuchen als nicht ätzend (7). Die Prüfmethode mit der *In-vitro*-Membranbarriere kann zur Untersuchung von (in Wasser löslichen oder nicht löslichen) Feststoffen, (wässrigen oder nicht wässrigen) Flüssigkeiten und Emulsionen verwendet werden. Prüfchemikalien, die bei der Kompatibilitätsprüfung jedoch keine nachweisbare Änderung bewirken (d. h. keine farbliche Veränderung im CDS (Chemical Detection System) der validierten Referenzprüfmethode) können mit der Prüfmethode unter Verwendung der Membranbarriere nicht untersucht werden. Bei diesen Chemikalien sollten andere Prüfmethoden zur Anwendung kommen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

8. Das Prüfsystem umfasst zwei Bestandteile: eine synthetische makromolekulare Biobarriere und ein CDS (Chemical Detection System); bei dieser Prüfmethode werden mit dem CDS Schäden der Membranbarriere erkannt, die durch ätzende Prüfchemikalien nach der Aufbringung der Prüfchemikalien auf die synthetische makromolekulare Membranbarriere hervorgerufen wurden (7) und die vermutlich auf denselben Verätzungsmechanismus bzw. dieselben Verätzungsmechanismen zurückzuführen sind, die auch auf lebende Haut einwirken.
9. Die Durchdringung (oder der Durchbruch) der Membranbarriere kann mit verschiedenen Verfahren oder mit einem CDS gemessen werden, u. a. anhand von Verfärbungen eines pH-Indikatorfarbstoffs oder anderer Merkmale der Indikatorlösung unter der Barriere.
10. Die Validität der Membranbarriere, d. h. die Eignung und die Zuverlässigkeit für die beabsichtigte Verwendung, sollte nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist auch sicherzustellen, dass unterschiedliche Zubereitungen hinsichtlich der Barriereeigenschaften einheitlich sind (z. B. dass sie eine Barriere gegenüber nicht ätzenden Chemikalien aufrechterhalten können, oder dass sie die Verätzungsmerkmale von Chemikalien in den verschiedenen Unterkategorien von Verätzungswirkungen nach dem UN GHS unterscheiden können (1). Die vorgenommene Einstufung richtet sich nach dem Zeitraum, den eine Chemikalie benötigt, um durch die Membranbarriere in die Indikatorlösung zu gelangen.

NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

11. Vor der routinemäßigen Anwendung der Prüfmethode mit der *In-vitro*-Membranbarriere nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Einstufung der zwölf in Tabelle 2 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Wenn ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist bzw. wenn dies gerechtfertigt ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind (z. B. aus der Liste der Referenzchemikalien (10)), sofern die in Tabelle 1 beschriebenen Auswahlkriterien berücksichtigt werden.

Tabelle 2
Leistungsstoffe ⁽¹⁾

Stoff ⁽²⁾	CAS-Nr.	Chemikalienklasse	<i>In-vivo</i> -UN-GHS-Unterkategorie ⁽³⁾	<i>In-vitro</i> -UN-GHS-Unterkategorie ⁽³⁾
Bortrifluoridhydrat	13319-75-0	Anorganische Säuren	1A	1A
Salpetersäure	7697-37-2	Anorganische Säuren	1A	1A
Phosphorpentachlorid	10026-13-8	Ausgangsstoffe anorganischer Säuren	1A	1A
Valerylchlorid	638-29-9	Säurechloride	1B	1B
Natriumhydroxid	1310-73-2	Anorganische Basen	1B	1B
1-(2-Aminoethyl)piperazin	140-31-8	Aliphatische Amine	1B	1B
Benzolsulfonylchlorid	98-09-9	Säurechloride	1C	1C
N,N-Dimethylbenzylamin	103-83-3	Aniline	1C	1C
Tetraethylenepentamin	112-57-2	Aliphatische Amine	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Phenole	NC	NC
Nonylacrylat	2664-55-3	Acrylate/Methacrylate	NC	NC
Natriumbicarbonat	144-55-8	Anorganische Salze	NC	NC

⁽¹⁾ Die zwölf oben genannten Stoffe enthalten jeweils drei Stoffe aus den drei UN-GHS-Unterkategorien ätzender Stoffe und drei nicht ätzende Stoffe, die im Handel leicht erhältlich sind; die Einstufungen in die UN-GHS-Unterkategorien wurden anhand der Ergebnisse leistungsfähiger *In-vivo*-Prüfungen vorgenommen. Diese Stoffe wurden aus der Liste mit den 40 Referenzstoffen im Mindestverzeichnis der Chemikalien ausgewählt, die als zum Nachweis der Genauigkeit und der Zuverlässigkeit von Prüfmethoden geeignet ermittelt wurden, strukturell und funktionell der validierten Referenzprüfmethode ähnlich sind und unter den 163 Referenzchemikalien ausgewählt wurden, die ursprünglich zur Validierung der Referenzprüfmethode verwendet wurden (Corrositex[®]) (7) (10) (14). Durch diesen Auswahlprozess sollten in größtmöglichem Umfang Chemikalien berücksichtigt werden, die die folgenden Anforderungen erfüllten: Sie waren repräsentativ für die Verätzungswirkungen (z. B. nicht ätzende Chemikalien oder ätzende Chemikalien der UN-Verpackungsgruppen I, II und III), die mit der validierten Referenzprüfmethode gemessen oder vorhergesagt werden können; sie waren repräsentativ für die im Validierungsprozess verwendeten Chemikalienklassen; sie wiesen klar definierte chemische Strukturen auf; sie führten in der *In-vivo*-Referenzprüfung zu eindeutigen Ergebnissen; sie waren im Handel erhältlich; sie waren nicht mit nicht tragbaren Entsorgungskosten verbunden (14).

⁽²⁾ Stoffe, die rein bzw. mit einer Reinheit von $\geq 90\%$ geprüft wurden.

⁽³⁾ Den UN-GHS-Unterkategorien 1A, 1B und 1C entsprechen die UN-Verpackungsgruppen I, II und III. NC (nicht ätzend)

VERFAHREN

12. In den folgenden Absätzen werden die Elemente und Verfahren einer Prüfmethode mit einer künstlichen Membranbarriere zur Beurteilung der Verätzungswirkung (7) (15) auf der Grundlage der aktuellen VRM (d. h. mit der im Handel erhältlichen Membran Corrositex[®]) beschrieben. Die Membranbarriere und die Kompatibilitäts-/Indikator- und Kategorisierungslösungen können hergestellt, zubereitet und im Handel bezogen werden. Dies gilt beispielsweise im Falle der VRM für Corrositex[®]. Für die validierte Referenzprüfmethode wurde ein Prüfmethodenprotokoll als Beispiel beschrieben (7). Die Prüfung sollte bei Umgebungstemperatur (17-25 °C) vorgenommen werden, und die verwendeten Elemente sollten die folgenden Anforderungen erfüllen.

Kompatibilitätsprüfung der Prüfchemikalie

13. Vor der Durchführung der Prüfung mit der Membranbarriere wird eine Kompatibilitätsprüfung vorgenommen, um festzustellen, ob die Prüfchemikalie vom CDS erkannt wird. Wenn das CDS die Prüfchemikalie nicht erkennt, ist die Prüfmethode mit der Membranbarriere zur Beurteilung der potenziellen Verätzungswirkung dieser Prüfchemikalie nicht geeignet. In diesem Fall sollte eine andere Prüfmethode gewählt werden. Das CDS und die Expositionsbedingungen bei der Kompatibilitätsprüfung sollten der Exposition in der anschließenden Prüfung mit der Membranbarriere entsprechen.

Prüfung zur Ermittlung der Zeitkategorie für Prüfchemikalien

14. Wenn für die Prüfmethode relevant, sollten in der Kompatibilitätsprüfung als geeignet befundene Prüfchemikalien einer Prüfung zur Ermittlung der Zeitkategorie, d. h. einer Screening-Prüfung zur Unterscheidung zwischen schwachen und starken Säuren bzw. Basen, unterzogen werden. Bei der validierten Referenzprüfmethode beispielsweise wird durch eine Zeitkategorieprüfung anhand des Nachweises einer starken sauren bzw. alkalischen Reserve festgestellt, welche der beiden Zeitkategorien anzunehmen ist. Die Verätzungswirkung und die UN-GHS-Unterkategorie der hautverätzenden Wirkung sollten je nach der sauren oder alkalischen Reserve der Prüfchemikalie mit zwei unterschiedlichen Durchbruchzeiten bestimmt werden.

ELEMENTE DER PRÜFMETHODE UNTER VERWENDUNG EINER MEMBRANBARRIERE

Membranbarriere

15. Die Membranbarriere besteht aus zwei Elementen: einem makromolekularen wässrigen Protein-Gel und einer permeablen Trägermembran. Das Protein-Gel sollte für Flüssigkeiten und Feststoffe undurchlässig sein. Eine Durchlässigkeit kann aber infolge einer Verätzung entstehen. Die vollständige Membranbarriere sollte unter festgelegten Bedingungen aufbewahrt werden, bei der sich die Beschaffenheit des Gels nachweislich nicht verändert (etwa durch Austrocknung, Wachstum von Mikroorganismen, Verrutschen oder Risse, die das Verhalten der Barriere beeinträchtigen würden). Wie lange die Membranbarriere aufbewahrt werden kann, sollte ermittelt werden. Nach Ablauf der betreffenden Frist sollten die zubereiteten Membranbarrieren nicht mehr verwendet werden.
16. Die permeable Trägermembran dient beim Geliervorgang und bei der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie als mechanische Unterlage für das Proteingel. Die Trägermembran sollte dafür sorgen, dass das Gel nicht sackt oder verrutscht und für alle Prüfchemikalien leicht durchlässig sein.
17. Das Protein-Gel (bestehend z. B. aus Keratin, Kollagen oder Gemischen von Proteinen, die eine Gelmatrix bilden) fungiert als Zielmaterial für die Prüfchemikalie. Das Proteinmaterial wird auf die Trägermembran aufgebracht, wo es gelieren kann, bevor die Indikatorlösung mit der Membranbarriere verschlossen wird. Das Protein-Gel sollte eine einheitliche Stärke und Dichte haben und keine Lufteinschlüsse oder Schäden aufweisen, die seine Funktion beeinträchtigen könnten.

CDS (Chemical Detection System)

18. Die Indikatorlösung (die gleiche Lösung, die auch für die Kompatibilitätsprüfung verwendet wurde), sollte das Vorhandensein von Prüfchemikalien anzeigen. Für die Prüfung sollten ein pH-Indikatorfarbstoff oder eine Kombination von Farbstoffen (z. B. Kresolrot und Methylorange) verwendet werden, deren Farbe sich verändert, wenn eine Prüfchemikalie vorhanden ist. Das Messsystem kann visuell oder elektronisch sein.
19. Detektionssysteme, die zur Detektion des Durchgangs der Prüfchemikalie durch die Membranbarriere entwickelt wurden, sollten in Bezug auf ihre Relevanz und Zuverlässigkeit geprüft werden, um das Spektrum der erkennbaren Chemikalien und die quantitativen Detektionsgrenzen nachzuweisen.

DURCHFÜHRUNG DER PRÜFUNG

Anordnung der Elemente der Prüfmethode

20. Die Membranbarriere wird so in ein Fläschchen (oder Röhrchen) mit der Indikatorlösung gegeben, dass die Trägermembran vollflächig mit der Indikatorlösung in Berührung kommt und keine Luftblasen vorhanden sind. Dabei ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Barriere nicht beschädigt wird.

Applikation der Prüfchemikalie

21. Eine geeignete Menge der Prüfchemikalie (z. B. 500 µl einer Flüssigkeit oder 500 mg eines fein vermahlenden Feststoffs (7) wird vorsichtig auf die Oberfläche der Membranbarriere aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Für jede Prüfchemikalie und für die entsprechenden Kontrollen wird eine angemessene Anzahl an Replikaten (z. B. vier) (7) zubereitet (Nummern 23 bis 25). Der Zeitpunkt, zu dem die Prüfchemikalie auf die Membranbarriere aufgetragen wird, ist zu protokollieren. Um sicherzustellen, dass kurze Verätzungszeiten präzise protokolliert werden, wird die Prüfchemikalie zeitlich abgestuft auf die Replikatfläschchen gegeben.

Messung der Durchdringung der Membranbarriere

22. Die Fläschchen werden jeweils angemessen überwacht, und der Zeitpunkt der ersten Änderung der Indikatorlösung (d. h. der Zeitpunkt der Durchdringung der Barriere) wird protokolliert, und die Zeit vom Auftragen der Chemikalie bis zur Durchdringung der Membranbarriere wird ermittelt.

Kontrollen

23. Bei Prüfungen, bei denen in Verbindung mit der Prüfchemikalie ein Vehikel oder ein Lösungsmittel eingesetzt wird, sollte das Vehikel bzw. das Lösungsmittel kompatibel mit dem Membranbarrieresystem sein, d. h. es sollte die Integrität des Membranbarrieresystems nicht verändern und keine Auswirkungen auf die Verätzungswirkung der Prüfchemikalie haben. Die Lösungsmittelkontrolle (bzw. die Vehikelkontrolle) sollte ggf. gleichzeitig mit der Prüfchemikalie geprüft werden, um die Kompatibilität des Lösungsmittels mit dem Membranbarrieresystem nachzuweisen.
24. Eine positive (hautätzende) Kontrolle mit mittlerer Verätzungswirkung (z. B. 110 ± 15 mg Natriumhydroxid (Verätzung der UN-GHS-Unterkategorie 1B)) (7) sollte gleichzeitig mit der Prüfchemikalie geprüft werden, um festzustellen, ob die Leistung des Prüfsystems annehmbar ist. Eine zweite Positivkontrolle derselben Chemikalienklasse wie die Prüfchemikalie kann zur Beurteilung des relativen Verätzungspotenzials einer ätzenden Prüfchemikalie hilfreich sein. Die ausgewählte(n) Positivkontrolle(n) sollte(n) eine mittlere Verätzungswirkung haben (z. B. UN-GHS-Unterkategorie 1B), damit Änderungen der Durchdringungszeit erkannt werden können, die den ermittelten Referenzwert in unannehmbare Weise über- oder unterschreiten und damit darauf hindeuten, dass das Prüfsystem nicht ordnungsgemäß funktioniert. Für diesen Zweck sind sehr stark ätzende Chemikalien (UN-GHS-Unterkategorie 1A) oder nicht ätzende Chemikalien nur begrenzt verwendbar. Eine ätzende Chemikalie der UN-GHS-Unterkategorie 1B würde die Erkennung einer zu kurzen oder zu langen Durchbruchzeit ermöglichen. Eine schwach ätzende Chemikalie der UN-GHS-Unterkategorie 1C könnte als Positivkontrolle eingesetzt werden, um zu prüfen, ob mit der Prüfmethode konsistent zwischen schwach ätzenden und nicht ätzenden Chemikalien unterschieden werden kann. Unabhängig vom verwendeten Ansatz sollte ein annehmbarer Reaktionsbereich der Positivkontrolle auf der Grundlage des historischen Bereichs der Durchbruchzeiten bei der (den) eingesetzten Positivkontrolle(n) entwickelt werden (beispielsweise der Mittelwert $\pm 2-3$ Standardabweichungen). Bei jeder Prüfung sollte die genaue Durchbruchzeit der Positivkontrolle ermittelt werden, damit Abweichungen außerhalb des annehmbaren Bereichs erkannt werden können.
25. Gleichzeitig mit der Prüfchemikalie sollte als weitere Maßnahme zur Qualitätskontrolle auch eine Negativkontrolle (nicht ätzend) (z. B. 10 %ige Zitronensäure oder 6 %ige Propionsäure) (7) geprüft werden, um die uneingeschränkte Funktion der Membranbarriere nachzuweisen.

Akzeptanzkriterien der Untersuchung

26. Auf der Grundlage der ermittelten Zeitparameter der UN-GHS-Unterkategorien der Verätzungswirkung wird anhand des Zeitraums (in Minuten) vom Auftragen einer Prüfchemikalie auf die Membranbarriere bis zur Durchdringung der Barriere die Verätzungswirkung der Prüfchemikalie vorhergesagt. Damit eine Prüfung als annehmbar betrachtet werden kann, sollte sich bei der gleichzeitigen Positivkontrolle die erwartete Reaktionszeit für die Durchdringung ergeben (z. B. für Natriumhydroxid als Positivkontrolle 8-16 Minuten); außerdem sollte die gleichzeitige Negativkontrolle nicht ätzend sein, und die gleichzeitige Lösungsmittelkontrolle sollte – wenn berücksichtigt – weder ätzend sein noch sich auf das Verätzungspotenzial der Prüfchemikalie auswirken. Vor der routinemäßigen Durchführung einer Prüfung nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung anhand der zwölf in Tabelle 2 empfohlenen Leistungsstoffe nachweisen. Die Zuverlässigkeit und die Genauigkeit neuer vergleichbarer Methoden („Me-too-Methoden“), die ausgehend von dieser Prüfmethode entwickelt wurden und strukturell und funktionell mit der validierten Referenzmethode vergleichbar sind, (14) sollten vor ihrer Verwendung für vorgeschriebene Prüfungen anhand der vordefinierten Leistungsstandards nachgewiesen werden (10).

Auswertung von Ergebnissen und Einstufung der Verätzungswirkung von Prüfchemikalien

27. Anhand der Zeit (in Minuten) von der Auftragung der Prüfchemikalie auf die Membranbarriere bis zur Durchdringung der Barriere werden die Prüfchemikalien nach ihrer Verätzungswirkung nach UN-GHS-Unterkategorien (1) sowie ggf. nach UN-Verpackungsgruppen eingestuft (16). Bei allen vorgeschlagenen Prüfmethoden sind für jede der drei Unterkategorien ätzender Chemikalien die Schwellenwerte der Zeiträume zu ermitteln. Bei der endgültigen Entscheidung über diese Schwellenwerte ist zu beachten, dass zu niedrige Einstufungen einer Verätzungsgefahr (d. h. falsch negative Ergebnisse) möglichst minimiert werden müssen. Bei dieser Prüfmethode sollten die Schwellenwerte für Corrositex[®] aus Tabelle 3 angenommen werden, da die Prüfung mit Corrositex[®] gegenwärtig die einzige Prüfung ist, die unter die Prüfrichtlinie fällt (7).

Tabelle 3
Vorhersagemodell Corrositex®

Mittlere Durchbruchzeit (min.)		UN-GHS-Vorhersage ⁽³⁾
Prüfchemikalien der Kategorie 1 ⁽¹⁾ (mit dem Einstufungstest der Methode ermittelt)	Prüfchemikalien der Kategorie 2 ⁽²⁾ (mit dem Einstufungstest der Methode ermittelt)	
0-3 min.	0-3 min.	Hautätzend opt. Unterkategorie 1A
> 3 bis 60 min.	> 3 bis 30 min.	Hautätzend opt. Unterkategorie 1B
> 60 bis 240 min.	> 30 bis 60 min.	Hautätzend opt. Unterkategorie 1C
> 240 min.	> 60 min.	Nicht hautätzend

⁽¹⁾ Prüfchemikalien mit stark saurer/alkalischer Reserve (6).

⁽²⁾ Prüfchemikalien mit schwach saurer/alkalischer Reserve (6).

⁽³⁾ Die UN-GHS-Unterkategorien 1A, 1B und 1C entsprechen den UN-Verpackungsgruppen I, II und III.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

28. Die Zeiten (in Minuten) von der Auftragung bis zur Durchdringung der Barriere bei der Prüfchemikalie und der (den) Positivkontrolle(n) sollten in einer Tabelle zum einen für die einzelnen Replikate und zum anderen als Mittelwerte \pm der einzelnen Versuche angegeben werden.

Prüfbericht

29. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien:

- Einkomponentiger Stoff: chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- mehrkomponentiger Stoff, UVCB und Gemische: möglichst weit gehende Charakterisierung durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten;
- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Herkunft, Chargennummer, sofern vorhanden;
- Behandlung der Prüfchemikalien/Kontrollstoffe vor der Prüfung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt;
- Lagerungsbedingungen.

Vehikel:

- Angaben zur Identität, (gegebenenfalls) Konzentration; Einsatzvolumen;
- Begründung der Auswahl des Vehikels.

*In-vitro-Membran-Barrieremodell und verwendetes Protokoll einschließlich nachgewiesener Genauigkeit und Zuverlässigkeit**Prüfbedingungen:*

- Beschreibung der verwendeten Geräte und der Versuchsvorbereitung;
- Herkunft und Zusammensetzung der verwendeten *In-vitro*-Membranbarriere;
- Zusammensetzung und Merkmale der Indikatorlösung;
- Nachweismethode;
- Mengen der Prüfchemikalie und der Kontrollchemikalien;
- Anzahl der Replikate;
- Beschreibung und Begründung der Prüfung zur Einstufung der Zeiten;
- Anwendungsmethode;
- Beobachtungszeiten;
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Einstufungskriterien;
- Nachweis der Befähigung zur Durchführung der Prüfmethode vor der regelmäßigen Verwendung durch die Prüfung von Leistungschemikalien.

Ergebnisse:

- Tabellarische Darstellung einzelner Rohdaten aus einzelnen Prüfungen und Kontrollen für die einzelnen Replikate;
- Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;
- abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

*Erörterung der Ergebnisse.**Schlussfolgerungen.***LITERATUR**

- (1) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), fünfte überarbeitete Ausgabe, UN New York und Genf, 2013. Abrufbar unter:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Kapitel B.4 dieses Anhangs, Akute Hautreizung/-verätzung.
- (3) Kapitel B.40bis dieses Anhangs, *In-vitro*-Prüfung auf hautätzende Wirkung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner Epidermis (RHE).

- (4) Kapitel B.40 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautverätzung: TER-Prüfmethode.
- (5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G. und Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicology In Vitro* 12, 483-524.
- (7) ICCVAM (1999). Corrositex[®]. *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No. 99-4495).
- (8) Gordon, V.C., Harvell, J.D. und Maibach, H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex[®] System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Photo-toxicity, Sensitization. *Alternative Methods in Toxicology* 10, 37-45.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).
- (10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris. Abrufbar unter:<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.
- (11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX[®] Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italien. ATLA 29, 96-97.
- (12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). 20. September 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Kapitel B.46 dieses Anhangs, *In-vitro*-Hautreizung: Prüfmethode mit rekonstruierter humaner Epidermis. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Abrufbar unter:http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Abrufbar unter:<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) Vereinte Nationen (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Abrufbar unter:http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

CDS (Chemical Detection System): Ein visuelles oder elektronisches Messsystem mit einer Indikatorlösung, die bei Vorhandensein einer Prüfchemikalie reagiert (beispielsweise durch eine Verfärbung eines pH-Indikatorfarbstoffs oder einer Kombination von Farbstoffen aufgrund des Vorliegens der Prüfchemikalie oder durch andere chemische oder elektrochemische Reaktionen).

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (9).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

Hautverätzung, in vivo: Das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfchemikalie für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Verätzungsreaktionen sind gekennzeichnet durch Geschwüre, Blutungen, blutige Verschorfungen und am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen durch eine auf ein Ausbleichen der Haut zurückzuführende Verfärbung, komplett haarlose Bereiche und Narben. Bei der Beurteilung fragwürdiger Schädigungen ist die Histopathologie mit zu berücksichtigen.

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment = integrierter Prüfungs- und Bewertungsansatz.

Leistungsstandards: Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode, (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden, und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien demonstrieren sollte (9).

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens $\geq 10\%$ w/w und $< 80\%$ w/w vorhanden sind. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

NC: Nicht hautätzend

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem die Prüfmethode die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (9).

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Übereinstimmung: Die Übereinstimmung ist ein Maß der Leistung einer Prüfmethode für Prüfverfahren mit kategorialen Ergebnissen und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird gelegentlich gleichbedeutend mit Genauigkeit verwendet und als Anteil aller geprüften Chemikalien definiert, die korrekt als positiv oder negativ eingestuft werden. Die Übereinstimmung hängt in hohem Maße von der Prävalenz bei den Typen der untersuchten Prüfchemikalien ab (9).

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zuverlässigkeit: Beschreibung der Beziehung zwischen der Prüfung und der untersuchten Wirkung und ob die Prüfung aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit bewertet (9).