

DIN EN ISO 23196



ICS 13.060.70

Einsprüche bis 2023-08-02

Entwurf

**Wasserbeschaffenheit –
Berechnung biologischer Äquivalenzkonzentrationen (BEQ)
(ISO 23196:2022);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 23196:2023**

Water quality –

Calculation of biological equivalence (BEQ) concentrations (ISO 23196:2022);
German and English version prEN ISO 23196:2023

Qualité de l'eau –

Calcul des concentrations en équivalent biologique (BEQ) (ISO 23196:2022);
Version allemande et anglaise prEN ISO 23196:2023**Anwendungswarnvermerk**

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-06-02 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 48 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 23196:2022 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ als prEN ISO 23196:2023 übernommen, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 119-01-03-05-12 AK „Querschnittsthemen in der Ökotoxikologie“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) erarbeitet.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Bezeichnung des Verfahrens:

Berechnung biologischer Äquivalenzkonzentrationen (BEQ) (T 11):

Verfahren DIN EN ISO 23196 — T 11

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 7405:2018	siehe	DIN EN ISO 7405:2019-03
ISO 15839:2003	siehe	DIN EN ISO 15839:2007-02
ISO 15952:2018	siehe	DIN EN ISO 15952:2018-12

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft — Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) — gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Berechnung biologischer Äquivalenzkonzentrationen (BEQ) (T 11).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „*Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Telefon 030 2601–2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin, Auskunft.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 7405:2019-03, *Zahnheilkunde — Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten (ISO 7405:2018, korrigierte Fassung 2018-12); Deutsche Fassung EN ISO 7405:2018*

DIN EN ISO 15839:2007-02, *Wasserbeschaffenheit — Online-Sensoren/Analysengeräte für Wasser — Spezifikationen und Leistungsprüfungen (ISO 15839:2003); Deutsche Fassung EN ISO 15839:2006*

DIN EN ISO 15952:2018-12, *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Jungtiere von Landschnecken (Helicidae) — Bestimmung der Wirkungen auf das Wachstum durch Bodenverunreinigung (ISO 15952:2018); Deutsche Fassung EN ISO 15952:2018*

**Wasserbeschaffenheit – Berechnung biologischer Äquivalenzkonzentrationen (BEQ)
(ISO 23196:2022)**

Water quality – Calculation of biological equivalence (BEQ) concentrations (ISO 23196:2022)

Qualité de l'eau – Calcul des concentrations en équivalent biologique (BEQ) (ISO 23196:2022)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Grundlage des Verfahrens	7
5 Durchführung	10
5.1 Allgemeines	10
5.2 Verfahren zur Berechnung der biologischen Äquivalenzkonzentrationen (BEQ-Konzentration)	10
5.2.1 Bewertung der Eignung der experimentellen Daten für die Berechnung einer biologischen Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration)	10
5.2.2 Kurvenanpassung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die Referenzsubstanz	12
5.2.3 Berechnung von Qualitätsmaßen für die Kurvenanpassung	13
5.2.4 Normalisierung der Daten der Referenzsubstanz und der Probe	15
5.2.5 Berechnung des x -%-Effekts der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Referenzsubstanz und des entsprechenden RC_x -Werts	15
5.2.6 Bewertung der Gültigkeit der experimentellen Daten für die Berechnung der biologischen Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration)	16
5.2.7 Berechnung des Konzentrationsfaktors der Probe bei einer Effektstärke von x % durch lineare Interpolation	17
5.2.8 Berechnung der biologischen Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration)	18
6 Gültigkeitskriterien	18
7 Untersuchungsbericht	19
Anhang A (informativ) Veranschaulichung der χ^2 -Statistik anhand der Daten aus Tabelle 1	20
A.1 Allgemeines	20
A.2 Bewertung der Anpassungsqualität anhand der Daten aus Tabelle 2	20
Literaturhinweise	23

Bilder

Bild 1 — Grundprinzip der Ableitung einer biologischen Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration)	8
Bild 2 — Grafische Darstellung des RC_x -Ansatzes zur Ableitung einer biologischen Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration)	9
Bild 3 — Beispiele zur Bewertung der Eignung von Versuchsdaten	12
Bild 4 — Beispiel für Effektdaten der Referenzsubstanz 17 β -Estradiol (die Kreise zeigen Triplika)	13
Bild 5 — Berechnung der Konzentration der Referenzsubstanz (17 β -Estradiol), die x % des maximalen Effekts hervorruft (RC_x)	16
Bild 6 — Beispiel für die Berechnung des Konzentrationsfaktors einer Probe bei einer Effektstärke von x % durch lineare Interpolation	18
Bild A.1 — χ^2 -Verteilung mit vier Freiheitsgraden ($\vartheta = 4$) und integralen Wahrscheinlichkeiten für $\chi^2 = 7,27$ (a) und $\chi^2 = 9,487\,73$ (b) mit $P_\chi = 0,122\,3$ bzw. $P_\chi = 0,05$	21

Tabellen

Tabelle 1 — Berechnete Parameter für die Kurvenanpassung der Daten der Referenzsubstanz .	13
Tabelle 2 — Beispiel für die Berechnung von χ^2 und χ^2_{red}	14
Tabelle A.1 — Wahrscheinlichkeitsintegrale $P_{\chi^2(\chi^2; \nu)}$ von (χ^2 bis ∞)	21

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 23196:2022 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ als prEN ISO 23196:2023 übernommen, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 23196:2022 wurde von CEN als prEN ISO 23196:2023 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Directives, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Directives, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147, *Water quality*, Unterkomitee SC 5, *Biological methods*, erarbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt die Ableitung von biologischen Äquivalenzkonzentrationen (BEQ) für Ergebnisse von *in-vitro*-Bioassays fest, die auf der Messung von Effekten auf biologische Prozesse wie eine Enzyminduktion oder Zellwachstum beruhen. Das hier beschriebene Konzept kann nach dem Nachweis seiner Anwendbarkeit für jeden biologischen Assay verwendet werden.

Zur Ableitung einer BEQ-Konzentration wird der durch eine Probe verursachte Effekt auf einen biologischen Prozess – d.h. die Aktivität der Probe – als Konzentration einer Referenzverbindung ausgedrückt, die einen gleichen Effekt hervorruft. Der in diesem Dokument verwendete Begriff „Probe“ bezieht sich sowohl auf Umweltproben als auch auf definierte Gemische und reine Verbindungen, die als Prüfgegenstand in einem Bioassay verwendet werden. BEQ-Konzentrationen können für wässrige Umweltproben, Extrakte von wässrigen Umweltproben einschließlich Leitungswasser oder Lösungen von reinen Chemikalien oder Chemikaliengemischen abgeleitet werden.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

biologische Äquivalenzkonzentration BEQ-Konzentration

Konzentration einer *Referenzsubstanz* (3.6), die den gleichen Effekt hervorruft wie der in einer Probe, einer Probenverdünnung oder einer Lösung mit einer oder mehreren Chemikalien gemessene Effekt

3.2

Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

Reaktion auf einen Konzentrationsgradienten einer Umweltprobe oder einer bekannten Substanz oder eines Substanzgemischs, der durch vorher festgelegte diagnostische Indikatoren beschrieben wird

[QUELLE: ISO 6107:2021, 3.127, modifiziert – der Begriff „Umweltprobe“ wurde hinzugefügt; Anmerkung 1 zum Begriff wurde gestrichen.]

3.3

Konzentrationsfaktor

CF

Verhältnis der tatsächlichen Konzentration der Probe im Vergleich zur ursprünglichen Probe unter Berücksichtigung aller Anreicherungs- und Verdünnungsschritte der Probe

3.4

Quantifizierungsgrenze

LOQ, en: Limit of Quantification

kleinster Wert eines Determinanten, der mit einem vertretbaren Niveau an Genauigkeit und Präzision bestimmt werden kann

[QUELLE: ISO 15839:2003, 3.18]

3.5

Negativkontrolle

NC

gut charakterisiertes Material und/oder eine gut charakterisierte Substanz, die bei der Bewertung durch ein spezifisches Prüfverfahren die Eignung des Prüfsystems nachweist, eine reproduzierbare, angemessen negative, nicht reaktive oder minimale Reaktion im Prüfsystem hervorzurufen

Anmerkung 1 zum Begriff: In der Praxis gehören zu den Negativkontrollen Leerwerte, Lösemittel und Referenzmaterialien.

[QUELLE: ISO 7405:2018, 3.4, modifiziert – Anmerkung 1 zum Begriff wurde gestrichen.]

3.6

Referenzsubstanz

RC

Verbindung mit einem oder mehreren Eigenschaftswerten, die ausreichend reproduzierbar und etabliert sind, um die Kalibrierung der Messmethode zu ermöglichen

Anmerkung 1 zum Begriff: Für die Zwecke dieses Dokuments ist eine Referenzverbindung jedes gut charakterisierte Material und/oder jede gut charakterisierte Substanz, die, wenn sie nach dem beschriebenen Verfahren geprüft wird, die Eignung des Verfahrens zur Erzielung einer reproduzierbaren, vorhersehbaren positiven Reaktion nachweist.

[QUELLE: ISO 7405:2018, 3.5, modifiziert – „Verbindung“ ersetzt „Material“; „die Kalibrierung des Messverfahrens“ ersetzt „die Verwendung des Materials oder der Substanz für die Kalibrierung eines Geräts, die Bewertung eines Messverfahrens oder für die Zuordnung von Werten zu Materialien“. Anmerkung 1 wurde geändert, um nur eine Referenzverbindung zu erfassen, die zu einer positiven Antwort führt – ansonsten ist das vorgeschlagene Konzept nicht anwendbar.]

3.7

x %-Effektkonzentration

EC_x

Konzentration, bei der ein bestimmter Effekt gemessen wird; x ist der Prozentsatz (z. B. 10, 25, 50) dieses Effekts, z. B. eine Wachstumshemmung

[QUELLE: ISO 15952:2018, 3.6]

3.8

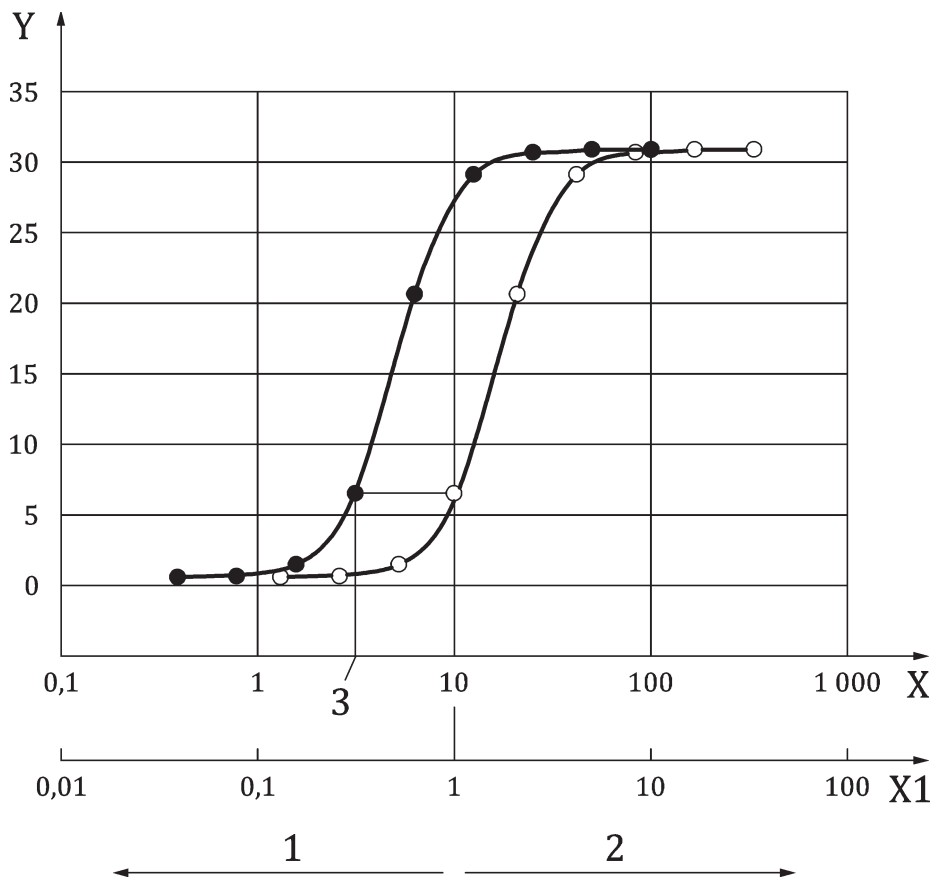
X %-Effektkonzentration der Referenzsubstanz

RC_x

Konzentration einer *Referenzsubstanz* (3.6), bei der ein bestimmter Effekt festgestellt wird; x ist der Prozentsatz (z. B. 10, 25, 50) dieses Effekts, z. B. eine Wachstumshemmung

4 Grundlage des Verfahrens

Das allgemeine Konzept für die Ableitung von BEQ-Konzentrationen, die durch das Untersuchungsverfahren ermittelt werden, ist in Bild 1 dargestellt. Die biologische Aktivität einer Probe wird durch die Konzentration einer Referenzverbindung ausgedrückt, die einen biologischen Prozess in gleichem Maße beeinflusst. Auf diese Weise ermöglichen BEQ-Konzentrationen eine indirekte Quantifizierung der Ergebnisse und damit einen Vergleich von Ergebnissen, die durch verschiedene Laboratorien gemessen wurden. Darüber hinaus ist eine robuste Methode zur Berechnung von BEQ-Konzentrationen eine notwendige Voraussetzung für die mögliche Verwendung von effektbezogenen (wirkungsbezogenen) Schwellenwerten (en: Effect based trigger values, EBT) in der Regulatorik [5], [6], [7], [8].



Legende

- X Konzentration der Referenzsubstanz, z. B. in ng/l
- X1 Konzentrationsfaktor der Probe im Vergleich zur ursprünglichen Wasserprobe
- Y Effekt in willkürlichen Einheiten
- 1 Probe ist verdünnt
- 2 Probe ist angereichert
- 3 biologische Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration)
- Referenzsubstanz
- Probe

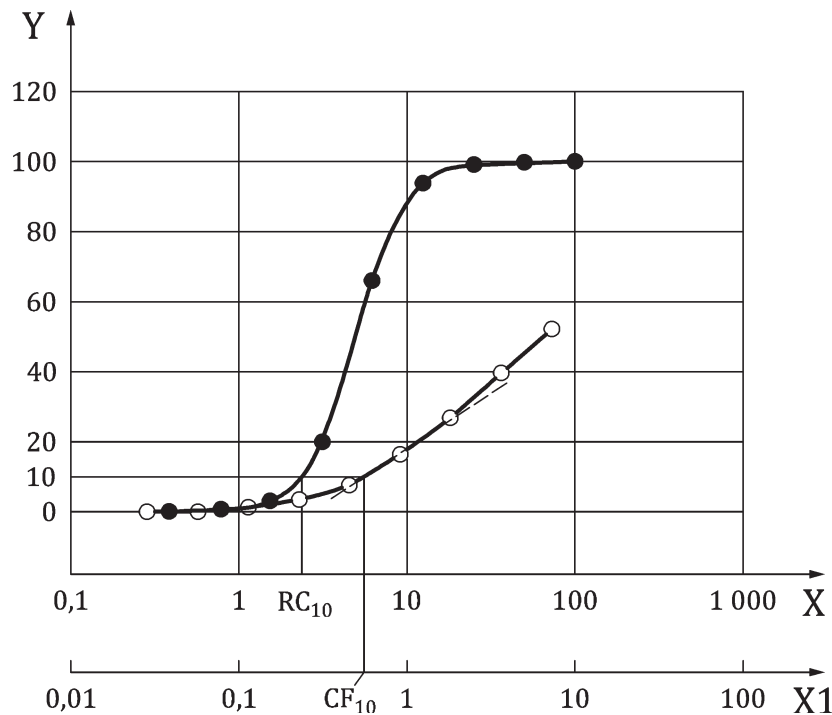
ANMERKUNG Der gemessene Effekt einer Probe oder einer Probenverdünnung wird auf die Konzentration einer Referenzsubstanz extrapoliert, die den Bioassay in gleichem Maße aktiviert wie die Probe oder die Probenverdünnung, um eine biologische Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration) abzuleiten. Hier gezeigt ist ein Beispiel für eine agonistische Wirkung.

Bild 1 — Grundprinzip der Ableitung einer biologischen Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration)

Es wurden verschiedene Methoden zur Ableitung von BEQ-Konzentrationen veröffentlicht, aber nicht alle Methoden sind auf alle Formen von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen anwendbar. Eine ausführliche Erörterung der Vor- und Nachteile der verschiedenen mathematischen Ansätze findet sich in [1], [3], [5], [6]. Die in diesem Dokument beschriebene Methode, die als RC_x -Ansatz bezeichnet wird, ist der Literatur zufolge eine robuste Methode für die Ableitung von BEQ-Konzentrationen [11], [12], die auch in der OECD 455 [13] beschrieben wird.

ANMERKUNG In der Literatur finden sich möglicherweise andere Bezeichnungen für RC_x , wie z. B. PC_{10} . PC_{10} beschreibt die Konzentration einer Positivkontrolle, die eine 10 %ige Wirkung hervorruft. In diesem Dokument wird der Begriff „Referenzsubstanz“ anstelle von „Positivkontrolle“ verwendet. Daher wird RC anstelle von PC verwendet.

Dieser Ansatz ist in Bild 2 dargestellt. Im ersten Schritt des RC_x -Ansatzes wird die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Referenzsubstanz modelliert, um den maximalen Effekt des Assays für die Referenzsubstanz zu bestimmen. Anschließend werden die Effekte auf eine Prozentskala normiert, wobei der Effekt der Negativkontrolle auf 0 % und der maximale Effekt der Referenzsubstanz auf 100 % gesetzt wird. Dann wird die Konzentration der Referenzsubstanz berechnet, die den Assay bis zur festgelegten x -%-Effektstärke (RC_x) aktiviert.



Legende

X Konzentration der Referenzsubstanz, z. B. in ng/l

X1 Konzentrationsfaktor der Probe im Vergleich zur ursprünglichen Wasserprobe

Y normalisierter Effekt in %

RC_{10} Konzentration der Referenzsubstanz bei einer Effektstärke von 10 %

CF_{10} Konzentrationsfaktor der Probe bei einer Effektstärke von 10 % in Bezug auf die Referenzsubstanz

● Referenzsubstanz

○ Probe

ANMERKUNG Darstellung nach der Normalisierung der Daten, wobei 0 % der Effektstärke der Negativkontrolle entspricht und 100 % des modellierten maximalen Effekts der Referenzsubstanz. Der Konzentrationsfaktor der Probe (CF) und die Konzentration der Referenzsubstanz (RC), die erforderlich sind, um eine Effektstärke von x % (hier 10 %) zu erreichen, werden aus den Daten durch lineare Interpolation (gestrichelte Linie) interpoliert. Die BEQ-Konzentration ergibt sich durch die Division von RC_x durch CF_x .

Bild 2 — Grafische Darstellung des RC_x -Ansatzes zur Ableitung einer biologischen Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration)

Im nächsten Schritt wird der Konzentrationsfaktor der Probe bestimmt, bei dem die Probe den Assay auf die gewählte x -%-Effektstärke (CF_x) aktiviert. Wie in 3.3 definiert, beschreibt der Konzentrationsfaktor das Verhältnis der tatsächlichen Konzentration der Probe im Vergleich zur ursprünglichen Wasserprobe unter Berücksichtigung aller Anreicherungen und Verdünnungsschritte der Probe. Wird eine Probe unter der Annahme eines quantitativen Verfahrens durch eine Festphasenextraktion 1 000-fach angereichert, beträgt der endgültige Konzentrationsfaktor der Probe nach einer 100-fachen Verdünnung mit Wachstumsmedium den Wert 10. Wird diese Probe in einer Reihe von sechs 1→2-Verdünnungen getestet, ergeben sich gerundete Konzentrationsfaktoren von 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31 und 0,15. Die biologische Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration) der Probe ist schließlich durch das Verhältnis RC_x/CF_x gegeben.

5 Durchführung

5.1 Allgemeines

In der Regel sind die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Referenzsubstanzen und Proben (siehe Abschnitt 1) in Reportergergen-Assays und Proliferationsassays sigmoidal. Je nach der individuellen Form der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung muss ein geeignetes mathematisches Modell für die Kurvenanpassung ausgewählt werden. Im Allgemeinen kann ein fünfparametrisches logistisches Modell [14] [15] – wie in 5.2 dargestellt – verwendet werden.

Das Gesamtverfahren zur Berechnung der BEQ-Konzentration besteht aus den folgenden Schritten, die in 5.2 ausführlich beschrieben werden:

- Bewertung der Eignung der experimentellen Daten für die Berechnung einer biologischen Äquivalenzkonzentration (siehe 5.2.1);
- Kurvenanpassung der Konzentrations-Wirkungs-Daten für die Referenzsubstanz (siehe 5.2.2);
- Berechnung von Qualitätsmaßen für die Kurvenanpassung (siehe 5.2.3);
- Normalisierung der Daten der Referenzsubstanz und der Probe (siehe 5.2.4);
- Berechnung der x -%-Effektstärke der Referenzsubstanz und des entsprechenden RC_x -Werts (siehe 5.2.5);
- Bewertung der Gültigkeit der experimentellen Daten für die Berechnung einer biologischen Äquivalenzkonzentration (siehe 5.2.6);
- Berechnung des Konzentrationsfaktors der Probe auf dem Niveau des x -%-Effekts durch lineare Interpolation (siehe 5.2.7);
- Berechnung der biologischen Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration) (siehe 5.2.8).

5.2 Verfahren zur Berechnung der biologischen Äquivalenzkonzentrationen (BEQ-Konzentration)

5.2.1 Bewertung der Eignung der experimentellen Daten für die Berechnung einer biologischen Äquivalenzkonzentration (BEQ-Konzentration)

Um die Gültigkeit der experimentellen Daten für die Berechnung der biologischen Äquivalenzkonzentrationen (BEQ) (siehe 5.2.6) nach dem in diesem Dokument beschriebenen Verfahren zu beurteilen, sollten verschiedene Berechnungen durchgeführt werden. Die experimentellen Daten sollten zuerst wie unten beschrieben bewertet werden, um ihre allgemeine Eignung zu beurteilen. Verwenden Sie für die Berechnung der biologischen Äquivalenzkonzentrationen (BEQ-Konzentration) nur experimentelle Daten, die die Gültigkeitskriterien der jeweiligen Norm oder Richtlinie erfüllen.

Verwenden Sie die folgenden Kriterien, um die allgemeine Eignung der Daten zu beurteilen:

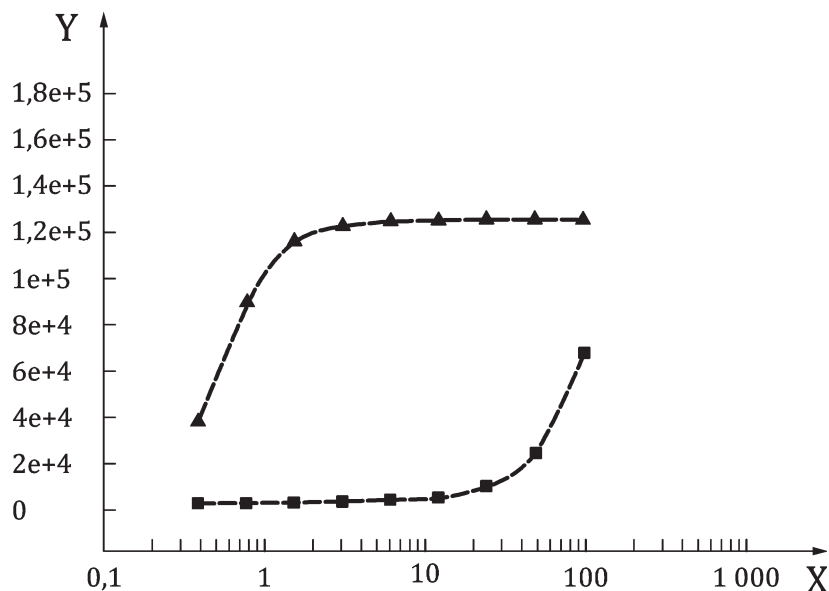
- a) für die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Referenzsubstanz sind mindestens zwei Datenpunkte mehr erforderlich als die Anzahl der Parameter, die die logistische Funktion der Kurve beschreiben, d. h. im Fall der in 5.2.2 beschriebenen fünfparametrischen logistischen Funktion sind sieben Datenpunkte erforderlich;
- b) das obere Kurvenplateau der sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Referenzsubstanz lässt sich aus den Daten ableiten, dies kann mit dem menschlichen Auge abgeschätzt werden;
- c) das untere Kurvenplateau der sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Referenzsubstanz lässt sich aus den Daten ableiten, dies kann mit dem menschlichen Auge abgeschätzt werden;

- d) mindestens eine durch die getesteten Probenkonzentrationen hervorgerufenen Effektstärken überschreitet die gewählte x %-Effektschwelle.

Bild 3 zeigt zwei Beispiele, die bei der Beurteilung der Eignung der experimentellen Daten für die Berechnung einer Äquivalenzkonzentration helfen sollen.

Bild 3 a) zeigt zwei Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Referenzsubstanz, die für die Berechnung der biologischen Äquivalenzkonzentrationen (BEQ-Konzentration) nicht geeignet sind. Im Falle der oberen Kurve (schwarze Dreiecke, Kurve mit starkem Effekt) ist der untere Teil der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung nicht definiert. Im Falle der unteren Kurve (schwarze Quadrate, Kurve mit schwachem Effekt) ist der obere Teil (maximal bis unendlich) der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung nicht definiert. In solchen Fällen muss der Konzentrationsbereich für die Referenzsubstanz angepasst werden, um eine vollständige Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zu erhalten.

Bild 3 b) zeigt eine geeignete Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die Referenzsubstanz, aber der Effekt der Probe ist zu gering, um die 10 %ige Effektschwelle der Referenzsubstanz zu erreichen oder zu überschreiten (RC_{10} -Wert, 10 % ist durch eine Linie gekennzeichnet).



a)