

## Súčasná kritériá toxikologického hodnotenia aditívnych látok do potravín

MÁRIA VARGOVÁ

**Súhrn.** V práci sa uvádzajú kritériá pre hygienicko-toxikologické posudzovanie aditívnych látok do potravín zo zákonodarného hľadiska. Súčasťou práce sú metodické postupy založené na najnovších vedeckých poznatkoch a aktuálnych požiadavkách v zahraničí i u nás.

Ochrana zdravia človeka je nepochybne prioritnou otázkou pri hodnotení nových chemických látok pridávaných do potravín. Pretože tieto látky sa do potravín pridávajú zámerne, je v záujme spotrebiteľa nevyhnutná účinná zdravotnícka kontrola. Pre hodnotenie bezpečnosti aditív v potravinách majú zásadný význam kritériá experimentálnej toxikológie.

Za posledných 30 rokov sa podstatne zmenili požiadavky na toxikologické skúšanie chemických látok v potravinách a relatívne jednoduché testovanie sa vyvinulo do komplikovaných skúšobných postupov. Úlohou týchto postupov je zistiť nielen bežné vedľajšie reakcie, ku ktorým môže dôjsť pri kontakte s chemickou látkou, ale aj jemnejšie a komplikovanejšie prejavy toxicity, ktoré možno pozorovať iba v priebehu celého života zvierata (napr. v testoch chronickej toxicity alebo v multigeneračných štúdiách).

Významnou súčasťou toxikologického hodnotenia chemických látok je štúdium ich vplyvu na genetický materiál. V poslednom období sa totiž ukázalo, že mnohé nové chemické látky, ale aj také, ktoré sú podľa tradičných toxikologických kritérií neškodné, majú výrazný genotoxický efekt a môžu zapríčiniť ireparabilné poškodenie genetického materiálu.

Mutagénny účinok chemických látok (náhla, neusmernená a trvalá zmena vlastností alebo znakov organizmu podmienená zmenou genetického materiálu) predstavuje v súčasnosti závažný problém, pretože expozícia chemickým látkam vo vonkajšom prostredí sa neustále zvyšuje. Stále máme málo infor-

---

MUDr. Mária Vargová, CSc., Výskumný ústav preventívneho lekárstva, Limbová 14, 833 01 Bratislava.

máci o možnom mutagénnom účinku rôznych chemických látok v prostredí. Pritom je alarmujúce najmä to, že v najnovších výskumoch sa zisťuje tesná korelácia medzi karcinogénnymi (t. j. schopnosť spôsobiť nádorový rast) a mutagénnymi účinkami chemických látok.

Uvedené problémy sa dostali v posledných rokoch do popredia ochrany zdravia človeka vo všetkých rozvinutých krajinách a stali sa predmetom pozornosti významných vedeckých spoločností. V krajinách EHS sa zaviedlo povinné testovanie na mutagenitu všetkých nových látok, ktoré sa dostávajú na trh. Vznikla teda nová situácia aj z hľadiska medzinárodného obchodu s chemickými látkami a produktmi. Tomuto trendu sa musia vo vlastnom záujme prispôbiť aj krajiny, ktoré nie sú členmi OECD.

Vzhľadom na túto situáciu pripravila v ČSSR skupina expertov návrh kritérií toxikologického hodnotenia nových chemických látok. Tieto kritériá zodpovedajú najnovším vedeckým poznatkom z hľadiska ochrany zdravia obyvateľstva a požiadavkám medzinárodného obchodu s chemickými látkami a produktmi.

Od 1. 1. 1986 je v SSR v platnosti vyhláška MZ SSR hlavného hygienika SSR č. 20/1984 „Úprava o hygienických požiadavkách pri schvaľovaní chemických látok a prípravkov z hľadiska ochrany zdravia“ [2]. Podobná úprava vstúpi do platnosti v krátkom čase aj v ČSR. Podľa tejto úpravy každá nová chemická látka a produkt čs. priemyslu musia byť toxikologicky otestované skôr, ako sa začnú používať v národnom hospodárstve. Organizácie vyrábajúce a dovážajúce chemické látky musia teda predkladať hlavnému hygienikovi ČSR a SSR všetky potrebné údaje o účinkoch vyrábaných a dovážaných chemických látok a zabezpečiť ich skúšanie.

Výsledky testov na zisťovanie zdravotného rizika látky podľa prílohy 2 tejto úpravy (tab. 1) sú súčasťou požadovanej dokumentácie, ktorú musia organizácie predkladať hlavnému hygienikovi pri žiadosti o záväzný posudok na povolenie sériovej výroby a použitia danej látky.

Uvádžame stručný prehľad testov na hodnotenie zdravotného rizika nových chemických látok tak, ako sú uvedené vo vyhláške, a súčasne pripájame niekoľko vysvetlení o okolnostiach použitia daných testov.

Druh a rozsah testov všeobecne závisí od identity látky, jej štruktúrneho vzorca, fyzikálnochemických vlastností, rozsahu výroby a spôsobu a rozsahu prepokladaného použitia.

Základnými povinným testmi (bez ohľadu na rozsah výroby a spôsob použitia) sú testy na akútnu a subchronickú toxicitu a testy na mutagenitu (Testy na zisťovanie zdravotného rizika látky, príloha 2 úpravy hlavného hygienika SSR č. 20/1984).

T a b u l k a 1. Testy na zisťovanie zdravotného rizika látky [1]

T a b l e 1. Indication tests of noxious matters [1]

- I. Všeobecné testy toxicity
  - General toxicological tests
  1. Akútna toxicita
    - Acute toxicity
    - 1.1. LD<sub>50</sub>, perorálna aplikácia potkanom  
LD<sub>50</sub>, peroral application to rats
    - 1.2. LD<sub>50</sub>, kožná aplikácia potkanom  
LD<sub>50</sub>, skin application to rats
    - 1.3. LD<sub>50</sub>, inhalačná aplikácia potkanom  
LD<sub>50</sub>, inhalent application to rats
  2. Kožná dráždivosť a senzibilizácia  
Skin irritability and sensibility
    - 2.1. Primárna kožná dráždivosť  
Primary skin irritability
    - 2.2. Primárna očná dráždivosť  
Primary eye irritability
    - 2.3. Kožná senzibilizácia  
Skin sensibility
  3. Subchronická toxicita  
Subchronic toxicity
  - 3.1. 90-denná toxicita na potkanoch  
90 days' toxicity in rats
  4. Chronická toxicita (viac ako 90 dní)  
Chronic toxicity (more than 90 days)
- II. Špeciálne testy toxicity (včítane genotoxicity)
  - Special toxicological tests (including genotoxicity)
  1. Mutagenita
    - Mutagenicity
    - 1.1. Povinné testy  
Officially required tests
      - jeden test na a) génové mutácie  
one test for gene mutations
      - b) chromozómové mutácie  
chromosome mutations
      - c) detekciu poškodenia a opravy DNA  
detection of DNA damage and reparation
    - 1.2. Overovacie testy  
Check tests  
(ďalšie testy na odhalenie génových mutácií, chromozómových mutácií a poškodení DNK sú povinné)  
(other tests for indication of gene and chromosome mutations and DNA damages are officially required)

Tabuľka 1. (pokračovanie)  
Table 1. (Continued)

- a) ak aspoň jeden povinný test má pozitívny výsledok,  
if at least one of obligatory tests results positive
- b) ak si to vyžaduje charakter a rozsah použitia látky (podľa rozhodnutia hlavného hygienika)  
if it is necessary for the nature and extent of usage of the matter (according to the decision of Chief Hygienist)

1.3. Doplnkové testy

Complementary tests

sa uskutočnia v prípade potreby na základe rozhodnutia hlavného hygienika, podľa charakteru a rozsahu použitia látky (pomocou nich sa nezistujú génové alebo chromozómové mutácie, prípadne poškodenie a reparácie DNK, ale príbuzné genotoxické fenomény

can be performed if required by the Chief Hygienist, according to the nature and extent of usage of the matter (they are not applied for determining gene or chromosome mutations or DNA damages and reparations, but for the related genotoxic phenomena)

- 2. Karcinogenita  
Carcinogenicity
- 3. Účinky na reprodukciu vrátane teratogénnych účinkov  
Effects on their reproduction including teratogenic effects
- 4. Biochemická kinetika  
Biochemical kinetics
- 5. Neurotoxická  
Neurotoxicity
- 6. Účinky na imunitný systém  
Effects on immunity system

### Všeobecné testy toxicity

*Akútna toxicita.* Pri toxikologickom hodnotení sa predovšetkým stanoví hodnota LD<sub>50</sub> (stredná smrtná dávka je dávka, po ktorej hynie 50 % zvierat). Toto vyšetrenie je povinné pre každú látku a informuje nás, či ide o látku s vysokou, strednou alebo nízkou toxicitou. Hodnota akútnej toxicity vyjadruje súčasne nebezpečenstvo akútnej otravy pri danom spôsobe expozície. Odporúča sa, aby sa akútna toxicita stanovila spolu s vyšetrením symptomatológie otravy na potkanoch oboch pohlaví. Látka sa podáva pokusným zvieratám najmenej v troch rôznych dávkach, pričom v každej skupine má byť minimálne 6–10 zvierat.

Testy akútnej toxicity sú významným ukazovateľom profesionálnej expozície pracovníkov, ktorí pracujú s chemickými látkami, a sú podkladom pre legislatívne zaradenie prípravkov podľa toxicity.

*Očná a kožná dráždivosť a senzibilizácia.* Skúšky dráždivosti očí sú vhodné pre tie látky, pri ktorých sa predpokladá, že sa môžu dostať človekovi do oka. Ak sa predpokladá, že daná látka bude vo väčších množstvách prichádzať do styku s pokožkou, musí sa robiť testovanie kožnej dráždivosti. Informácie o schopnosti látky senzibilizovať kožu sa vyžadujú popri údajoch o kožnej dráždivosti pri všetkých látkach, ktoré sa budú dostávať do styku s kožou opakovane. Ide o zistenie reakcie na druhú alebo nasledujúcu expozíciu látky spôsobenú imunologickým mechanizmom.

*Subchronická toxicita.* Štúdium subchronických účinkov chemických látok je povinné. Štandardným testom na objasnenie účinku opakovanej expozície chemickým látkam je denné podávanie látky v strave zvieratám počas 90 dní (90-dňová toxicita).

Testy sa spravidla robia na potkanoch, niekedy možno použiť aj iné druhy zvierat. Dávky treba zvoliť tak, aby vyššie dávkovanie vyvolávalo niektoré vedľajšie účinky. Zvieratá treba dôkladne sledovať, pátrať po nežiadúcich účinkoch, zisťovať cieľové orgány pôsobenia (hromadenie látky). Na základe výsledkov sa stanovuje tzv. „no adverse effect level“, dávka, ktorá nemá nepriaznivé účinky na organizmus. Test si vyžaduje 6–8 mesiacov.

*Chronické toxické účinky.* Vzhľadom na časovú a materiálovú náročnosť dlhodobého testu je rozhodnutie o jeho potrebe kritické a závažné. Vždy treba najprv dôkladne vedecky zvážiť všetky príslušné faktory, vrátane údajov o bezpečnosti látky, ktoré máme k dispozícii.

Chronická štúdia sa robí najmenej na dvoch druhoch cicavcov, z ktorých jeden je hlodavec, najčastejšie potkan, druhý nehlodavec, najčastejšie pes. Používa sa 50 hlodavcov každého pohlavia na skupinu (najmenej tri dávkovacie skupiny a kontrola). Dĺžka experimentu pre hlodavcov je zvyčajne 24 mesiacov. Úplné vyhodnotenie chronického testu si vyžaduje asi 2,5 roka. V priebehu testu sa zaznamenáva telesná hmotnosť zvierat, spotreba potravy, zmeny v biochemických a hematologických ukazovateľoch a všeobecné klinické ukazovatele. Na konci štúdie sa robí pitva a histopatologické vyšetrenie.

Test chronickej toxicity je potrebný, ak sa predpokladá, že nepriaznivé účinky alebo poškodenie pozorované v subchronickom pokuse sa ozrejmi alebo zvýrazní počas dlhšieho obdobia; ak chemická štruktúra látky naznačuje, že chronická intoxikácia môže mať významné nepriaznivé účinky; ak bezpečnostný faktor v subchronickej štúdii bol nižší ako 100 (používa sa pre extrapo-

láciu údajov zo zvierat na človeka); ak je predpoklad, že pozorovaná hladina bez nepriaznivého účinku sa pri chronickej expozícii zníži; ak sa látka alebo jej metabolit kumuluje v organizme.

Chronický test je menej potrebný v prípade, ak sa látka pri očakávanom spôsobe expozície absorbuje iba málo (menej ako 1 %); ak sa látka metabolizuje, vylučuje, ak bezpečnostný faktor v subchronickom pokuse presahuje hodnotu 1000 alebo ak sa látka svojou chemickou štruktúrou podobá známej bezpečnej látke.

### Špeciálne testy toxicity

*Testy na mutagenitu.* Testy na mutagenitu uvedené v kapitole II [1] prílohy 2 sú povinné pre všetky chemické látky (tab. 1).

Minimálny súbor testov na mutagenitu zahrnuje:

1. Informáciu o génových mutáciách (zmeny na molekulárnej úrovni) v teste na *S. typhimurium* (Amesov test). Okrem tohto bakteriálneho modelu možno použiť testy na *E. coli*, testy na *Saccharomyces cerevisiae* a testy na *Drosophila melanogaster*.

2. Informáciu o chromozómových mutáciách (zmeny chromozómových štruktúr alebo počtu chromozómov). Testy na detekciu chromozómových mutácií sú rozpracované na najrozličnejších organizmoch.

Veľa klastogénov zvyšuje frekvenciu mikronukleov v polychromatických erythrocytoch prítomných v preparátoch kostnej drene. Test je relatívne jednoduchý.

Alternatívnym a komplexnejším postupom je cytogenetická analýza buniek kostnej drene zvierat a lymfocytov periférnej krvi človeka. Najmä cytogenetická analýza buniek kostnej drene je pre hodnotenie mutagénnej aktivity veľmi citlivým indikátorom.

3. Informáciu o poškodení DNA (kyselina deoxyribonukleová). Odporúča sa reparačný test na *S. typhimurium* a na *E. coli*.

Aby sa vyhovel požiadavkám minimálneho súboru testov na mutagenitu, stačí z každej skupiny uskutočniť iba jeden test.

Ak všetky uvedené základné testy majú negatívne výsledky, netreba látku ďalej testovať na mutagénne vlastnosti.

V prípade, ak aspoň jeden povinný test má pozitívny výsledok alebo ak to vyžaduje charakter a rozsah použitia látky, pristupuje sa k overovacím, prípadne doplnkovým testom, ktorých cieľom je stanoviť relevanciu pozitívnych výsledkov.

Ak v niekoľkých testoch vychádzajú silne pozitívne výsledky, neodporúča sa látku používať.

*Karcinogenita.* Jediný test vhodný na určenie karcinogénneho potenciálu chemickej látky je dlhodobá štúdia na zvieratách. Test je veľmi nákladný a nemožno ho preto používať ako skriningový test pre veľké počty nových látok. Testovať sa musí najmenej na dvoch druhoch experimentálnych zvierat, najčastejšie hlodavcoch (potkan, myš). Musí sa použiť rovnaký počet zvierat oboch pohlaví, najmenej však 50 na skupinu.

Látka sa podáva minimálne 24 mesiacov, nie dlhšie ako 30 mesiacov. Podávajú sa najmenej tri rôzne dávky spôsobom, aký sa očakáva pri ľudskej expozícii. Tento test si vyžaduje približne tri roky.

Testy na karcinogenitu sa vyžadujú, ak látka obsahuje vo svojej štruktúre reaktívnu skupinu, ktorá sa pri iných látkach dáva do súvislosti s karcinogenitou, ak látka mala pozitívne výsledky v bakteriálnom teste na mutagenitu, ak metabolit (známy alebo predpokladaný) látky má chemickú štruktúru alebo reaktívnu skupinu, ktorá sa pri iných látkach dáva do súvislosti s karcinogenitou a ak sa látka alebo jej metabolit kumuluje v organizme.

Štúdie karcinogenity nie sú potrebné, ak sa látka pri očakávanom spôsobe expozície neabsorbuje, ak sa rýchlo metabolizuje na inertnú látku alebo takú, ktorá sa prirodzene nachádza v organizme, ak bakteriálne testy na mutagenitu dávajú negatívne výsledky a ak expozícia látke bude krátkodobá a zriedkavá.

### Účinky na reprodukciu vrátane teratogénnych účinkov

*Teratogénne účinky.* Hlavným cieľom testov na teratogenitu a reprodukciu je identifikovať látky, ktoré môžu mať účinok na vznik a normálny vývin plodu a potomstva.

V teste na teratogenitu sa podáva testovaná látka najmenej v troch rôznych koncentráciách gravidným samicám počas citlivého obdobia organogenézy. Plody sa vyberajú sekčne pred očakávaným dátumom vrhu a vyšetrujú sa skeletálne anomálie mäkkých tkanív. Test sa musí robiť na dvoch druhoch cicavcov. Vhodné sú potkan, myš, škrečok alebo králik. Test trvá približne 5–6 mesiacov.

*Štúdium reprodukčných účinkov.* Robí sa aspoň na jednom druhu cicavcov. Testovaná látka sa v troch rôznych dávkach podáva dvom generáciám zvierat ( $F_0$  a  $F_1$ ). Tretia generácia zvierat sa exponuje testovanej látke in utero a v priebehu dojčenia. Hodnotí sa fertilita, prežívanie potkanov, laktácia a každá prípadná abnormalita plodov. Jednogenečná štúdia trvá 5–6 mesiacov, dvojgeneračná 12–14 mesiacov.

Tieto testy sú potrebné, ak je pravdepodobné, že účinku látky budú vysta-

vení ľudí v plodnom veku, ak ide o látku štruktúrou podobnú iným látkam, o ktorých je známe, že ich používanie malo nepriaznivé účinky na reprodukčné funkcie človeka alebo na vývoj plodu.

Popri kritériách „klasickej toxikológie“ dnes už treba brať do úvahy aj otázky, ktoré presahujú rámec tradičného toxikologického posudzovania aditívnych látok, ako sú napr. otázky neznášanlivosti. U citlivých jednotlivcov sa opisuje relatívne častý výskyt nežiadúcich reakcií. Zatiaľ sa nevie, do akej miery sú tieto reakcie prejavom imunologickej precitlivelosti alebo idiosynkratickej hyperreaktivity. Obidva typy reakcií možno však považovať za formu neznášanlivosti. Problémom alergizujúceho účinku sa zaoberala aj 17. správa komisie expertov WHO/FAO [1], v ktorej sa zdôraznilo, že ak látka vyvoláva vážne alebo časté reakcie z precitlivelosti, nemožno ju pripustiť na použitie ako aditívum do potravín. Ukazuje sa, že počet látok, ktoré môžu vyvolávať alergické prejavy u citlivých jednotlivcov, je veľký. Schopnosť vyvolávať alergické reakcie bola dokázaná pri potravinárskych farbivách (Tartrazin, Amarant, Erytrozin, Sunset, kyselina karmínová), konzervačných látkach (oxid siričitý, soli kyseliny benzoovej), látkach na úpravu arómy potravín (vanilín), sladidiel (sacharín, cyklamáty) a pod.

Zdá sa, že zatiaľ jediným vhodným spôsobom je označenie prípadného nebezpečenstva pre vnímavých jednotlivcov (etiketa).

Predpokladá sa, že do konca 20. storočia dôjde v štúdiu toxicity k ďalším zlepšeniam. Toxikológia je veľmi dynamická disciplína a niet pochybností o tom, že v multidisciplinárnej spolupráci s ďalšími vednými odbormi biologických, lekárskeho a chemických vied sa postupne dosiahne optimalizácia hodnotenia nových aditív a ostatných cudzorodých látok v potravinách ako základný predpoklad prevencie niektorých nežiadúcich účinkov civilizačného procesu.

## Literatúra

- [1] Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. 20th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 696, 1983.
- [2] Vestník MZ SSR Hlavného hygienika SSR č. 20/1984 „Úprava o hygienických požiadavkách pri schvaľovaní chemických látok a prípravkov z hľadiska zdravia“.



## **Современные критерии токсикологической оценки пищевых добавок в пищевые продукты**

### **Резюме**

В работе приведены критерии для гигиеническо-токсикологической оценки пищевых добавок в пищевые продукты с точки зрения законодательства. Составной частью работы являются методические приемы, основанные на новейших научных познаниях и на актуальных требованиях за рубежом и в СССР.

### **Current criteria for the toxicological evaluation of food additives**

### **Summary**

The paper describes new criteria for the hygienic and toxicological evaluation of food additives according to law-making view. Methodic procedures based on the current scientific information and up-to-date requirements both abroad and in Slovakia have been comprised in this paper.