

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Stanovení LD₅₀ na potkanech po různé inhalační aplikaci a vliv délky expozice - analýza QSAR

**Bakalářská práce studijního oboru
Klinická a toxikologická analýza**

Praha 2007

Ondřej Hruboš

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. M. Tichého, DrSc. a školitele – garanta Doc. RNDr. Z. Bosákové, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Státní zdravotní ústav je možné pouze po písemném souhlasu.

v Praze dne 7.6.07

.....

podpis

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. M. Tichému, DrSc. a svému školiteli – garantovi Doc. RNDr. Z. Bosákové, CSc. za zadání tématu, podporu, trpělivost a rady při vypracování bakalářské práce.

Děkuji svým rodičům a všem svým přátelům za podporu během celého studia.

OBSAH

Seznam zkratk a symbolů	5
1 ÚVOD	6
1.1 Cíl práce	6
2 MATERIÁL A METODY	7
2.1 Popis objektu	7
2.2 Metody stanovení inhalační LC ₅₀	7
2.2.1 Akutní toxicita inhalační	7
2.3 Chemikálie	8
2.4 Analýza QSAR	8
2.5 Výpočty	9
2.6 Výběr a zpracování dat	9
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	11
4 ZÁVĚR	20
5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	21
6 PŘÍLOHY	22

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

A - biologická účinnost látky

c - koncentrace (mmol/l, ppm)

HAZARDTEXT - Hazard Management = datová báze vedoucí seznam nebezpečných látek

HSDB - Hazardous Substance Data Bank = datová banka nebezpečných látek

LC₅₀ - koncentrace, která způsobí úhyn 50 % jedinců z testovaného souboru

log c - logaritmus hodnoty molární koncentrace

log P - logaritmus rozdělovacího koeficientu látky mezi n-oktanol a vodu

M_r – relativní molekulová hmotnost

n - počet testovaných chemických sloučenin

p - hladina statistické významnosti

P(o/v) – rozdělovací koeficient látky mezi n-oktanol a vodu

QAAR - Quantitative Activity - Activity Relationships = kvantitativní vztahy mezi různými účinnostmi

QSAR - Quantitative Structure - Activity Relationships = kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností

r - korelační koeficient

RTECS - Registry of Toxic Effects of Chemical Substance = seznam toxických účinků chemických látek

SD - standardní odchylka

1. ÚVOD

K rozvoji chemického průmyslu a využívání chemických látek a jejich směsí se nedílně váže potřeba společnosti chránit sebe i životní prostředí před nežádoucími účinky těchto látek a směsí. V důsledku toho je kladen důraz na bezpečnost těchto látek a jejich používání a vývoj metod, které by to zaručovaly.

Cílem experimentů a testů na pokusných zvířatech je chránit společnost i životní prostředí před toxickými a nežádoucími účinky chemických látek a jejich směsí. Na druhé straně je jedním z požadavků dnešní společnosti, k němuž se nedílně váže koncepce 3R (reduce, refine, replace), omezení pokusů na laboratorních zvířatech. Výsledkem je snaha používat místo savců nižší organismy, buňky a tkáňové kultury a využívat chemické struktury a počítače jako alternativní metody.

Alternativní metody jsou tedy metody, které pomáhají snížit, vylepšit či nahradit pokusy na laboratorních zvířatech k testování toxicity v případě, že podávají informace stejné úrovně jako jsou informace získané z testů na zvířatech [1].

Je tedy důležité nalézt takové metody testování toxicity chemických látek a jejich směsí, které budou vyhovovat všem požadavkům (spolehlivost, nákladnost, časová dostupnost, šetření laboratorních zvířat) jako již známé alternativní metody *in vitro* a *in silico*. Testy *in vitro* rozumíme testy na tkáních, tkáňových řezech a buňkách. Metody *in silico* jsou odhady výpočtem pomocí modelů vytvořených na počítači. Mezi tyto modely patří především QSAR (Quantitative Structure – Activity Relationships), tedy kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností [2]. Dále pak model QAAR (Quantitative Activity – Activity Relationships), tedy kvantitativní vztahy mezi různými účinnostmi (extrapolace toxických indexů mezi druhy) [3].

V této práci je pracováno s hodnotami LC_{50} (potkan, inh.), protože jedinou expozicí, kterou jsem se zabýval je inhalační cesta. S organickými rozpouštědly jsou nejčastěji ve styku hlavně pracovníci v chemickém průmyslu, v chemických laboratořích, atd. Organická rozpouštědla se snadno odpařují a dochází k expozici pracovníků těmito rozpouštědly inhalační cestou.

1.1 Cíl práce

1. Vytvoření databáze hodnot LC_{50} pro potkany při různé době aplikace.

2. Testování korelace mezi hodnotami LC_{50} naměřených po různé expozici a parametrech hydrofobnosti látek – logaritmem rozdělovacího koeficientu látky mezi n-oktanol a vodu; $\log P$.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 Popis objektu

Potkan laboratorní (*Rattus norvegicus* var. alba)

Laboratorní potkan byl vyšlechtěn z divoce žijícího potkana a černé krysy (*Rattus rattus*). Je to všežravec (omnivor) a k jeho přednostem patří, že se velmi dobře aklimatizuje ve změněných životních podmínkách.

V dospělosti dosahuje hmotnosti 250 - 400 g (v závislosti na pohlaví a druhu), počet mláďat ve vrhu je 12 – 13 a délka březosti je 19 - 22 dní. Nejpoužívanější jsou kmeny: Wistar albino (původ Wistar Institute ve Filadelfii, USA) a Sprague – Dawley (farma Sprague – Dawley v Madisonu ve Wisconsinu, USA) [4].

2.2 Metody stanovení inhalační LC_{50}

2.2.1 Akutní toxicita inhalační

Principem této metody je, že několik skupin pokusných zvířat je exponováno studované látce po určenou dobu v odstupňovaných koncentracích, a to jedné koncentraci v každé skupině. Potom jsou zvířata pozorována a zjišťují se účinky a případy uhynutí. Zvířata, která během pokusu uhynou, i ta, která přežijí do konce pokusu, jsou pitvána.

POPIS METODY

Zvířata jsou bezprostředně před expozicí zvážena. Pro každou dávkovou hladinu je třeba použít nejméně 10 hlodavců (5 samic a 5 samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Počet úrovní dávek, nejméně 3, má být vhodně odstupňován tak, aby byl u testovacích skupin viditelný rozsah toxických účinků a mortality. Získané údaje musí stačit na znázornění vztahu mezi dávkou a mortalitou a pokud je to možné, musí umožnit stanovení LC_{50} s přijatelnou spolehlivostí.

Zvířata jsou vystavena účinku látky nejméně po dobu 4 hodin od ustavení rovnováhy její koncentrace. Teplota během pokusu má být $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Relativní vlhkost má být ideálně mezi 30 až 70 %.

Je třeba zajistit monitorování podmínek expozice; tj. skutečná koncentrace studované látky se měří v dýchací zóně alespoň třikrát během expozice; průtok, teplota a vlhkost vzduchu se měří kontinuálně. Během expozice i po jejím skončení se pozorování provádějí a zaznamenávají systematicky. První den je potřeba provádět pozorování často. Minimálně jednou každý pracovní den je třeba provést pečlivě klinické vyšetření. 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.

Doba pozorování by měla trvat nejméně 14 dní, může však záviset na toxických reakcích, na rychlosti jejich vzniku a na trvání fáze zotavení, proto ji lze dle potřeby prodloužit. Rozhodující je doba, kdy se objeví a opět odezní projevy otravy.

Pozorování zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchacího a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatické aktivity a chování. Hmotnost jednotlivých zvířat se stanovuje po expozici týdně a v okamžiku uhynutí. Zvířata, která během pokusu uhynou i ta, která přežijí do konce pokusu, jsou pitvána se zvláštním zřetelem ke všem změnám horní i dolní části dýchacího traktu [5].

2.3 Chemikálie

Chemikálie a jejich hodnoty $\log LC_{50}$ po inhalační expozici 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 7; 8 a 10 hodin jsou uvedeny v tabulkách A - C. Látky postihují široký rozsah chemické struktury a zahrnují alkoholy, aldehydy, chlorované aniliny, estery a několik dalších látek mimo tyto strukturální skupiny. Kromě malých neutrálních sloučenin a poměrně inertních sloučenin (alkoholy, estery) soubor obsahuje i sloučeniny reaktivní jako jsou aldehydy.

2.4 Analýza QSAR

Metody QSAR se zabývají kvantitativními vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností. Analýza QSAR spočívá v tom, že pro vybranou sérii chemických látek lze matematickou formulí kvantitativně vyjádřit závislost mezi změnou chemické

struktury dané látky a změnou měřené biologické účinnosti, která po změně struktury následuje. Pro popis chemické struktury se nejčastěji používá rozdělovací koeficient dané látky mezi n-oktanol a vodu. To znamená, že převážná většina rovnic QSAR obsahuje jako nezávisle proměnnou stejnou veličinu [3].

2.5 Výpočty

Pro výpočet inhalační LC_{50} z primárních údajů uvedených v ppm bylo použito vzorce:

$$c(\text{mmol/m}^3) = c(\text{ppm})/24,34$$

kde koncentrace v ppm (ml/m^3) = $c(\text{mg/m}^3) \cdot (24,34/M_r)$

Koeficient 24,34 (objem 1 mol látky v plynném stavu při 25°C) byl vypočítán pomocí stavové rovnice ideálního plynu.

Pro inhalační LC_{50} uvedených v mg/m^3 bylo použito vzorce:

$$c(\text{mmol/m}^3) = c(\text{mg/m}^3)/M_r$$

2.6 Výběr a zpracování dat

Údaje inhalační LC_{50} pro potkany byly získány z datové databáze Thomson Micromedex. Všechny údaje byly sbírány z datových databází RTECS, HSDB, HAZARTEXT z datového souboru Thomson Micromedex [6].

Index akutní toxicity LC_{50} je smrtná (smrtná, letální) koncentrace, při které zahyne 50 % jedinců z testovaného souboru. Hodnota LC_{50} se udává jako hmotnost testované látky ve standardním objemu vzduchu mg.l^{-1} [4] (pro potřeby této práce byly hodnoty přepočteny na jednotky mmol/l). Tento index akutní toxicity je využíván tam, kde je známá hodnota koncentrace látky v prostředí, ve kterém se organismus pohybuje.

Byly vyhledávány LC_{50} měřené po různém čase expozice a to 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 7; 8 a 10 hodin.

V práci byly použity průměrné hodnoty nalezených údajů.

Údaje uvedené v tabulkách byly zpracovány metodami matematicko-statistické analýzy. Rovnice QSAR byly vypočteny regresní analýzou, ke které byl použit počítačový program Origin®7.0 (1991-2002), OriginLab Corporation.

Přímky v grafech vyznačené tečkovanou čarou představují vypočtené rovnice, žádný jiný význam nemají.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Nalezené a přepočítané údaje inhalační LC_{50} jsou shrnuty v tabulkách A-C. V tabulce A jsou původní nalezené hodnoty inhalační LC_{50} včetně zdrojů. Tabulka B představuje tyto hodnoty v mmol/l a tabulka C jejich logaritmy.

Korelaci mezi $\log LC_{50}$ a $\log P$ nalezených a přepočítaných údajů inhalační LC_{50} při 4 hodinové expozici shrnuje graf 1. Jelikož zde nebyl nalezen žádný lineární vztah, rozdělili jsme soubor látek do souborů látek se stejnou funkční skupinou. Do hodnocení jsme zařadili pouze soubory o minimálně 4 členech z nalezeného souboru dat.

Korelace mezi $\log LC_{50}$ a $\log P$ při 4 hodinové expozici uhlovodíků včetně rovnice lineární regrese je znázorněna v grafu 2. Je zde patrná korelace mezi hodnotami $\log LC_{50}$ a $\log P$.

Graf 3 znázorňuje vztah inhalační LC_{50} a $\log P$ pro alifatické alkoholy. Hodnota směrnice ukazuje na vztah těchto hodnot.

Nízká hodnota směrnice lineární regrese pro graf 4 už takovou silnou závislost nenaznačuje, jak tomu bylo v případě grafu 2 a 3.

Graf 5 zobrazující vztah mezi $\log LC_{50}$ a $\log P$ vykazuje zanedbatelnou hodnotu směrnice lineární regrese. Daný graf tak ukazuje nezávislost $\log LC_{50}$ na $\log P$. Důvodem může být různý mechanismus účinku aldehydů.

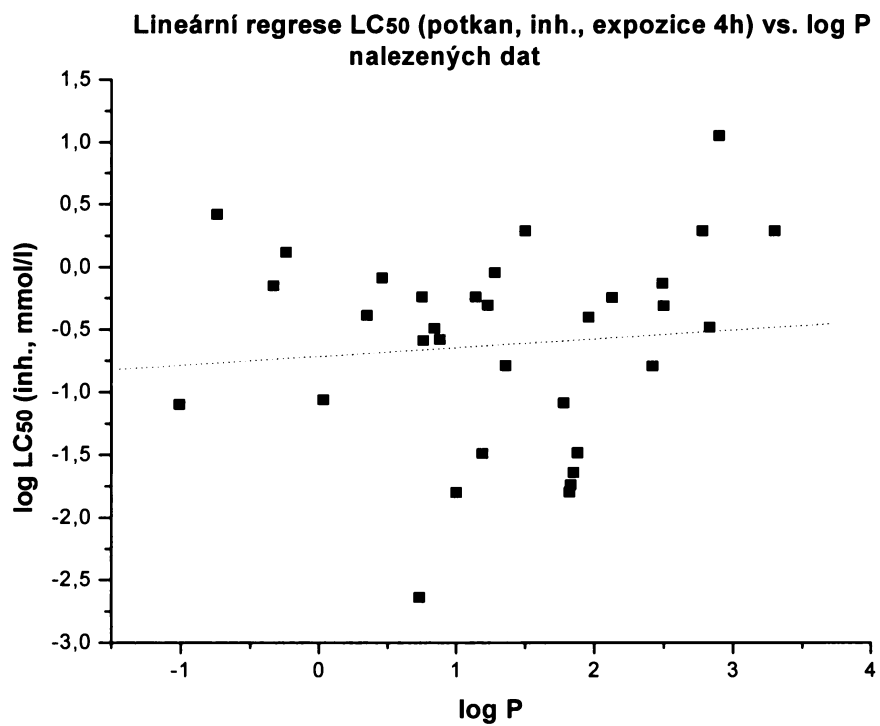
Vztah $\log LC_{50}$ a $\log P$ nalezených a přepočítaných údajů inhalační LC_{50} při 2 hodinové expozici zobrazuje graf 6. Hodnota směrnice (-2,336) ukazuje významnou závislost $\log LC_{50}$ na $\log P$. I korelace při 8 hodinové expozici vykazuje významnou závislost inhalační $\log LC_{50}$ a $\log P$ nalezených a přepočítaných údajů inhalační LC_{50} . Tato významná závislost může být ale způsobena i malým souborem nalezených dat pro graf 6 a 7.

Graf 8 zobrazuje lineární regresi $\log LC_{50}$ proti době expozice. Tento graf potvrzuje skutečnost, že s narůstající dobou se potřebná koncentrace, zde LC_{50} , pro dosažení stejného účinku snižuje.

Vzhledem k nedostatku dat při různých dobách expozice nemohla být tato případná korelace studována.

Rozptyl použitých dat lze vysvětlit dvěmi různými důvody. Buď jde opravdu o nevýznamnou až žádnou závislost hodnot $\log LC_{50}$ na $\log P$ anebo může jít o nepřesnosti při získávání experimentálních hodnot LC_{50} a $P(o/v)$ různých laboratoří.

Graf 1



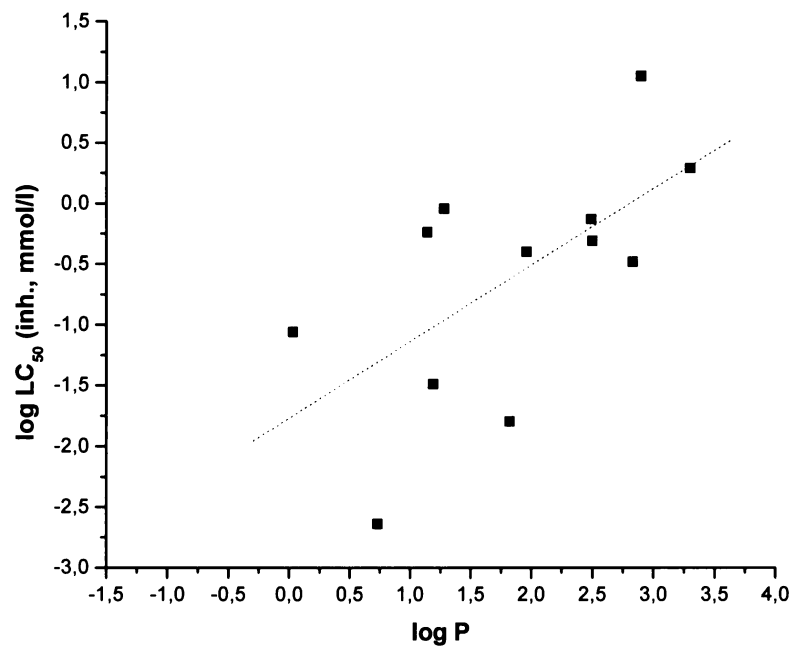
Rovnice regrese:

$$\log LC_{50} (\text{potkan, inh}) = 0,071 \log P - 0,716$$

$n = 34$; $r = 0,094$; $SD = 0,803$; $p = 0,595$

Graf 2

Lineární regrese log LC₅₀ (potkan, inh., expozice 4h) vs. log P (uhlovodiky)



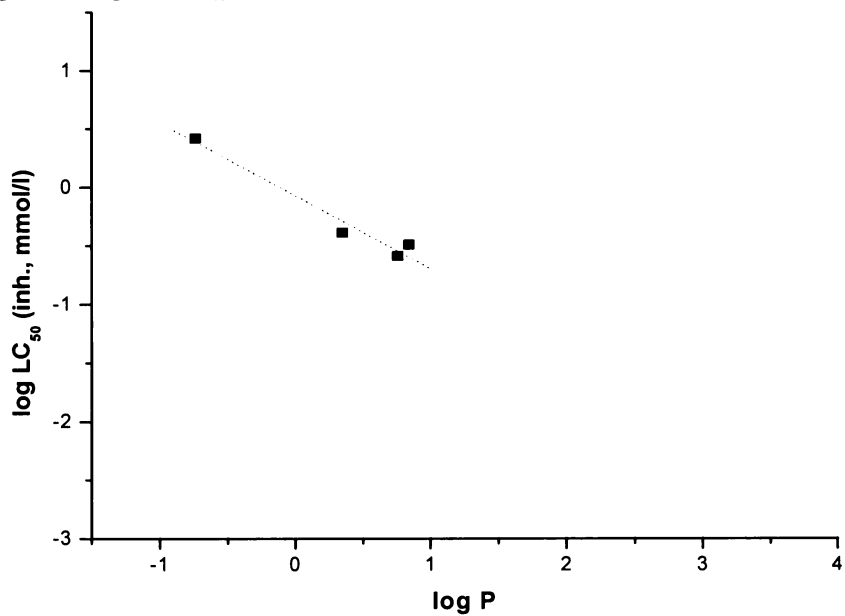
Rovnice regrese:

$$\log LC_{50} (\text{potkan, inh.}) = 0,630 \log P - 1,768$$

n = 12; r = 0,628; SD = 0,813; p = 0,029

Graf 3

Lineární regrese log LC₅₀ (potkan, inh., expozice 4h) vs. log P (alifatické alkoholy)



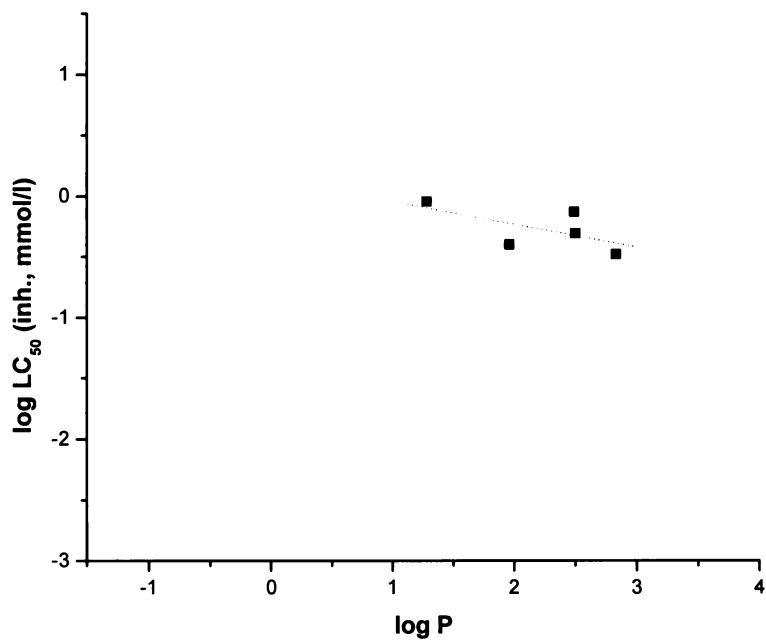
Rovnice regrese:

$$\log LC_{50} (\text{potkan, inh}) = -0,623 \log P - 0,072$$

n = 4; r = -0,982; SD = 0,107; p = 0,018

Graf 4

Lineární regrese LC₅₀ (potkan, inh., expozice 4h) vs. log P (chlorovane uhlovodiky)



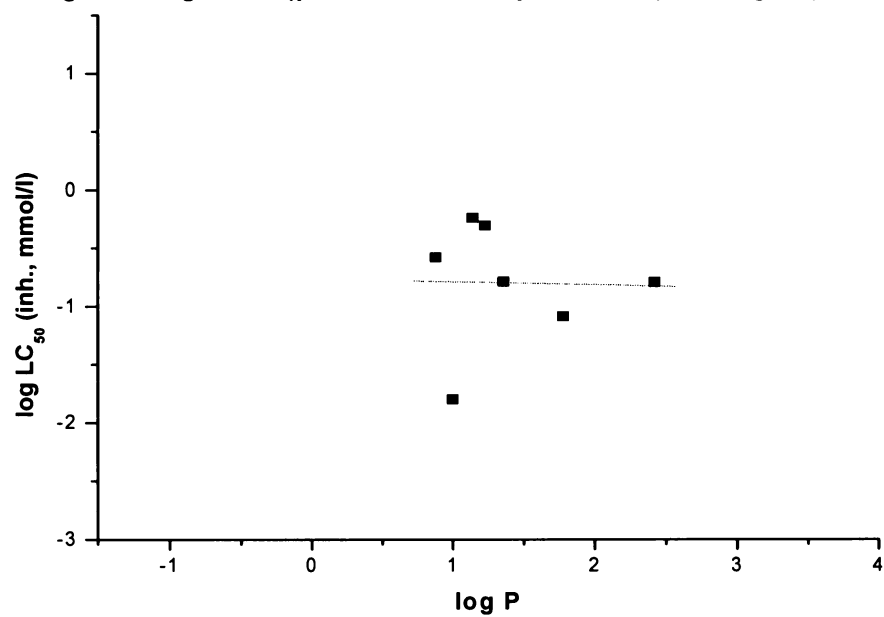
Rovnice regrese:

$$\log LC_{50} (\text{potkan, inh.}) = -0,190 \log P + 0,147$$

$n = 5$; $r = -0,632$; $SD = 0,164$; $p = 0,253$

Graf 5

Lineární regrese log LC₅₀ (potkan, inh., expozice 4h) vs. log P (aldehydy)

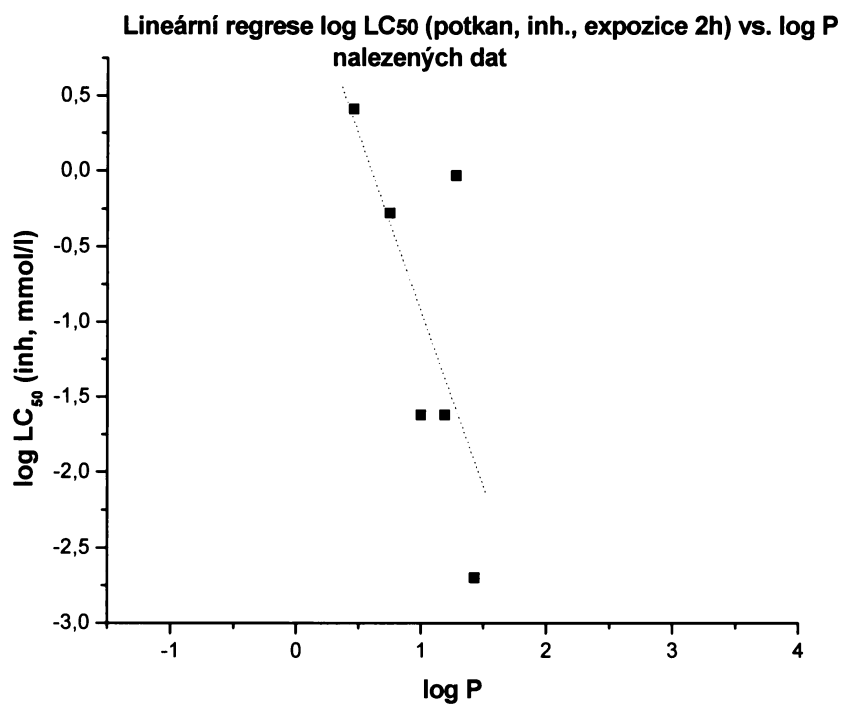


Rovnice regrese:

$$\log LC_{50} (\text{potkan, inh.}) = -0,027\log P - 0,762$$

n = 7; r = -0,027; SD = 0,581; p = 0,954

Graf 6

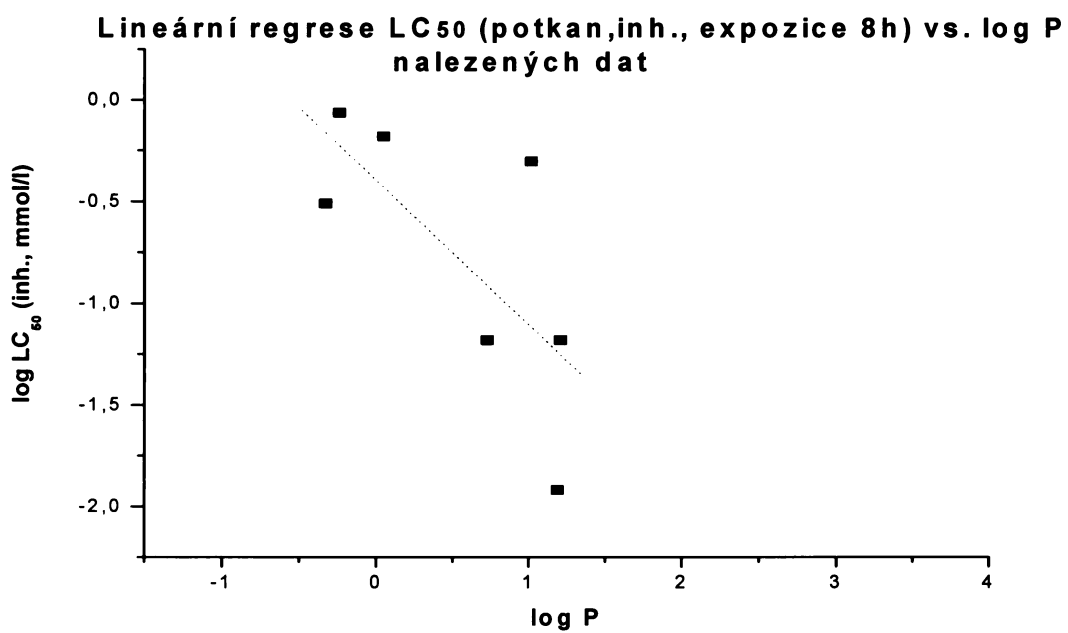


Rovnice regrese:

$$\log LC_{50} (\text{potkan, inh}) = -2,336 \log P + 1,405$$

n = 6; r = -0,708; SD = 0,941; p = 0,116

Graf 7



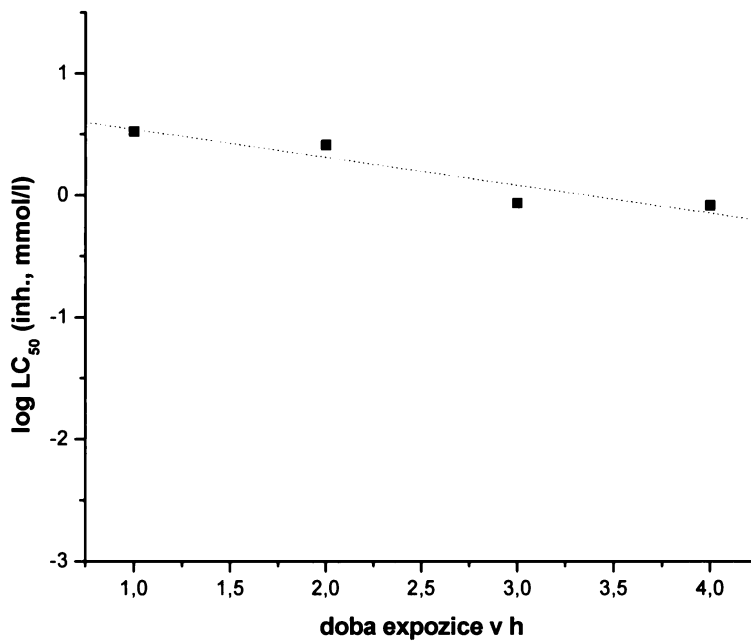
Rovnice regrese:

$$\log LC_{50} (\text{potkan, inh.}) = -0,709 \log P - 0,396$$

n = 7; r = -0,703; SD = 0,531; p = 0,078

Graf 8

Lineární regrese log LC₅₀ (potkan, inh.) vs. doba expozice (tetrahydrofuran)



Rovnice regrese:

$$\log LC_{50} (\text{potkan, inh}) = -0,229(\text{doba expozice v h}) + 0,768$$

$n = 4$; $r = -0,938$; $SD = 0,134$; $p = 0,062$

4 ZÁVĚR

Cíle práce byly splněny.

Byla vytvořena databáze indexů akutní inhalační toxicity LC_{50} . Byla testována korelace mezi logaritmem indexu akutní toxicity a logaritmem rozdělovacího koeficientu látek mezi n-oktanol a vodu při různých dobách expozice.

Vztah mezi dobou expozice a expozicí nemohl být pro nedostatek nalezených dat hodnocen.

Z výsledků je patrné, že můžeme mluvit o vztahu mezi logaritmem rozdělovacího koeficientu látek mezi n-oktanol a vodu a logaritmem akutní inhalační toxicity LC_{50} , přinejmenším u strukturně homogenních souborů látek.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TICHÝ, M. Co a k čemu jsou alternativní metody *in vitro* a *in silico*. V Alternativní metody testování toxicity chemikálií 2: sborník semináře. Ekomonitor spol.s.r.o, Chrudim – Píšťovy, 2006
s. 26-31. ISBN 80-86832-19-8
- [2] TICHÝ, M. Účinnost xenobiotik a chemická struktura. Praha: Avicenum, 1983. 1. vydání
- [3] Zákon č443/2004 Sb., příloha1, o základních pojmech a metodách pro zkoušení toxicity chemických látek nebo chemických přípravků. Částka 147, s. 8552
- [4] RUSEK, V. Základy toxikologie a úvod do problematiky hygieny a bezpečnosti práce v chemické laboratoři [on-line]. Pardubice : Univerzita Pardubice, Ústav ochrany životního prostředí, 9.7.2004[cit. 28.5.2007].
Dostupné na WWW: <http://www.upce.cz/asc/fakulty/fcht/fcht-katedry/fcht-katedry-uo zp/uo zp-pro_studenty/uo zp-stud_literatura/uo zp-skripta-tox.html>
- [5] Zákon č. 443/2004 Sb., B.2 AKUTNÍ TOXICITA INHALAČNÍ. Částka 147, s.8580-8585 (2004)
- [6] Toxikoogická databáze Thomson Micromedex Chemknowledge (R) System, Vol. 72 (1974-2007)
- [7] TICHÝ, M. Toxikologie pro chemiky. Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativní. Praha:UK, 2003. ISBN 80-246-0566-X
- [8] KOPOVÁ, J. Porovnání LD₅₀ na potkanech po různé aplikaci – analýza QAAR. Bakalářská práce. UK, Přírodovědecká fakulta Praha, 2006

číslo	Primární hodnoty										bez udaje	
	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	7h	8h	10h			
	ppm* mg/m ³	ppm* mg/m ³	ppm* mg/m ³	ppm* mg/m ³	ppm* mg/m ³	ppm* mg/m ³	ppm* mg/m ³	ppm* mg/m ³	ppm* mg/m ³	ppm* mg/m ³		
28					2340 ^[16]							
29				556 ^[17]								
30				797 ^[18]								
31				500-800 ^[27]								
32				9770	47702 ^[30]							
33				44660		10000 ^[2]	32600					
34				18400 ^[19]								
35		24000 ^[30]		18000 ^[30]		14000 ^[30]						
36		25850		12000								
37				316								
38				8000 ^[25]		46000 ^[9,12]						
39				280800	58000 ^[30]							
40				48000								

* předpokládáme objemové ppm

Podle toxikologické databáze Thomson Micromedex Chemknowledge © Systém, Vol. 72 (1974 - 2007)
HAZARTEXT, HSDB, RTECS

[1] American Industrial Hygiene Association Journal 20, 364 (1959)

[2] *Chimia*, str. 97 (1994)

[3] *Chimia*, str. 102 (1984)

[4] *Chimia*, str. 10 (1984)

[5] *Chimia*, str. 373 (1984)

[6] *Chimia*, str. 377 (1984)

[7] *Chimia*, str. 376 (1984)

[8] *Chimia*, str. 197 (1994)

[9] *Chimia*, str. 339 (1990)

[10] Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, 6th Edition I,II,III, 569 (1991)

- [11]Gigiena i Sanitariya 41, 103 (1976)
- [12]Hazardous Substances: Halogenated hydrocarbons
- [13]Inhalation Toxicology, Taylor & Francis Health 9, 623 (1997)
- [14]National Technical Informational Service (Springfield VA 22161) OTS0572351
- [15]National Technical Informational Service (Springfield VA 22161) OTS0535072
- [16]National Technical Informational Service (Springfield VA 22161) OTS0546450
- [17]National Technical Informational Service (Springfield VA 22161) OTS0570970
- [18]National Technical Informational Service (Springfield VA 22161) OTS0571625
- [19]National Technical Informational Service (Springfield VA 22161) OTS0534501
- [20]National Technical Informational Service (Springfield VA 22161) OTS0556791
- [21]Organic solvents 1, 74 (1974)
- [22]Organic solvents 1, 44 (1974)
- [23]Organic solvents 1, 100 (1974)
- [24]Organic solvents 1, 10 (1974)
- [25]Organic solvents 1, 19 (1974)
- [26]Science Reports of the Research Institutes, Tohoku University 36, 10 (1989)
- [27]Bingham, Toxicology, 5th Edition, str. 1002
- [28]Toxicology and Biochemistry of Aromatic Hydrocarbons, Gerarde. H, NY, Elsevier, str. 113 (1960)
- [29]Union Carbide Data Sheet 10, 5 (1972)

[30]Podle ekotoksikologické databáze www.piskac.cz/ETD (1996 - 2004)

číslo	látka	CAS číslo	M _r	log P (o/v)	LC ₅₀ (mmol/l)											
					0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	7h	8h	10h			
28	4-chloranilin	106-47-8	127,58	1,83						0,018						
29	nitrobenzen	98-95-3	123,12	1,85						0,023						
30	2-chloranilin	95-51-2	127,58	1,88						0,033						
31	3-chloranilin	108-42-9	127,58	1,88						0,027						
32	chloroform	67-66-3	119,38	1,96						0,4						
33	benzen	71-43-2	78,12	2,13						0,37			0,415			
34	heptanal	111-71-7	114,21	2,42						0,16						
35	1,1,1-trichlorethan	71-55-6	133,4	2,49				0,99		0,74		0,74		0,56		
36	trichloroethylen	79-01-6	131,39	2,50				1,06		0,49						
37	2,4-dichloranilin	554-00-7	162,02	2,78						0,002						
38	tetrachlormethan	56-23-5	153,81	2,83						0,33		0,3				
39	butan	106-97-8	58,12	2,90						11,43						
40	hexan	110-54-3	86,18	3,30						1,97						

číslo	látka	CAS číslo	M _r	log P (o/v)	log LC ₅₀												
					0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	7h	8h	10h				
28	4-chloranilin	106-47-8	127,58	1,83						-1,737							
29	nitrobenzen	98-95-3	123,12	1,85						-1,638							
30	2-chloranilin	95-51-2	127,58	1,88						-1,485							
31	3-chloranilin	108-42-9	127,58	1,88						-1,483							
32	chloroform	67-66-3	119,38	1,96						-0,4							
33	benzen	71-43-2	78,12	2,13						-0,243					-0,386		
34	heptanal	111-71-7	114,21	2,42						-0,793							
35	1,1,1-trichlorethan	71-55-6	133,4	2,49					-0,004	-0,13	-0,13	-0,24					
36	trichloroethylen	79-01-6	131,39	2,50					0,025								
37	2,4-dichloranilin	554-00-7	162,02	2,78						0,29							
38	tetrachlormethan	56-23-5	153,81	2,83						-0,483	-0,524						
39	butan	106-97-8	58,12	2,90						1,05							
40	hexan	110-54-3	86,18	3,30						0,29							