

31992L0069

29.12.1992

EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA

L 383/113

**KOMISJONI DIREKTIIV 92/69/EMÜ,****31. juuli 1992,****millega seitsmeteistkümnendat korda kohandatakse tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta**

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

tehnilise arengu arvessevõtmiseks on samuti vaja läbi vaadata praegu komisjoni direktiivi 88/302/EMÜ lisas olev vetikate kasvu pidurdamise katse ja sel juhul viia see katsemeetod üle direktiivi 84/449/EMÜ lisasse;

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 27. juuni 1967. aasta direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta, <sup>(1)</sup> viimati muudetud direktiiviga 92/32/EMÜ, <sup>(2)</sup> eriti selle artikleid 28 ja 29,

vastavalt nõukogu direktiivile 86/609/EMÜ katseteks ja muudel teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitsega seotud liikmesriikide õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta <sup>(7)</sup> on asjakohane vähendada katsetes kasutatavate loomade hulka miinimumini;

ning arvestades, et:

direktiivi 67/548/EMÜ artikli 3 lõige 1 ja nõukogu 7. juuni 1988. aasta direktiivi 88/379/EMÜ (ohtlike valmististe liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta, <sup>(3)</sup> viimati muudetud nõukogu direktiiviga 90/492/EMÜ <sup>(4)</sup>) artikkel 3 sätestavad, et ainete ja valmististe füüsikalise-keemilised omadused, mürgisus ja keskkonnamürgisus määratakse direktiivi 67/548/EMÜ lisas V nimetatud meetodite abil;

käesoleva direktiivi sätted on kooskõlas komitee arvamusega, kelle ülesanne on kohandada ohtlike ainete ja valmististe tehniliste kaubandustõkete kõrvaldamist käsitlevad direktiivid tehnika arenguga,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

direktiivi 67/548/EMÜ lisa V tekst on praegu avaldatud kahes osas, mis on vastavalt komisjoni direktiivi 84/449/EMÜ <sup>(5)</sup> lisa ja komisjoni direktiivi 88/302/EMÜ <sup>(6)</sup> lisa;

*Artikkel 1*

tehnilise arengu arvessevõtmiseks on vaja läbi vaadata komisjoni direktiivi 84/449/EMÜ lisas nimetatud katsemeetodid;

Direktiivi 84/449/EMÜ lisa asendatakse käesoleva direktiivi lisaga.

<sup>(1)</sup> EÜT 196, 16.8.1967, lk 1.<sup>(2)</sup> EÜT L 154, 5.6.1992, lk 1.<sup>(3)</sup> EÜT L 187, 16.7.1988, lk 14.<sup>(4)</sup> EÜT L 275, 5.10.1990, lk 35.<sup>(5)</sup> EÜT L 251, 19.9.1984, lk 1.<sup>(6)</sup> EÜT L 133, 30.5.1988, lk 1 ja EÜT L 136, 2.6.1988, lk 20.<sup>(7)</sup> EÜT L 358, 18.12.1986, lk 1.

*Artikkel 2*

Direktiivi 88/302/EMÜ lisas kirjeldatud vetikate kasvu pidurdamise katse meetod tunnistatakse käesolevaga kehtetuks.

*Artikkel 3*

Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi täitmiseks vajalikud õigus- ja haldusnormid hiljemalt 30. oktoobril 1993. Liikmesriigid teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Kui liikmesriigid kõnealused normid vastu võtavad, lisavad nad nendesse või nende ametliku avaldamise korral nende juurde viite käesolevale direktiivile.

Sellise viitamise viisi näevad ette liikmesriigid.

*Artikkel 4*

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 31. juuli 1992

*Komisjoni nimel*  
*komisjoni liige*  
Karel VAN MIERT

**LISA**

Komisjoni 31. juuli 1992. aasta direktiivi 92/69/EMÜ (millega seitsmeteistkümnendat korda kohandatakse tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta) lisa <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> EÜT L 383, 29.12.1992, lk113.

## SISUKORD

### SISSEJUHATUS

|         |                                                                                                |     |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| A OSA:  | FÜÜSIKALIS-KEEMILISTE OMADUSTE MÄÄRAMISE MEETODID.....                                         | 5   |
| A.1.    | Sulamis-/külmumistemperatuur.....                                                              | 5   |
| A.2.    | Keemistemperatuur.....                                                                         | 15  |
| A.3.    | Suhteline tihedus.....                                                                         | 21  |
| A.4.    | Aururõhk.....                                                                                  | 26  |
| A.5.    | Pindpinevus.....                                                                               | 47  |
| A.6.    | Lahustuvus vees.....                                                                           | 54  |
| A.8.    | Jaotustegur.....                                                                               | 63  |
| A.9.    | Leekpunkt.....                                                                                 | 74  |
| A.10.   | Süttivus (tahked ained).....                                                                   | 76  |
| A.11.   | Süttivus (gaasid).....                                                                         | 79  |
| A.12.   | Süttivus (kokkupuutel veega).....                                                              | 81  |
| A.13.   | Tahkete ainete ja vedelike isesüttivus.....                                                    | 85  |
| A.14.   | Plahvatusohtlikkus.....                                                                        | 87  |
| A.15.   | Isesüttimistemperatuur (vedelikud ja gaasid).....                                              | 98  |
| A.16.   | Tahkete ainete suhteline isesüttimistemperatuur.....                                           | 99  |
| A.17.   | Oksüdeerivad omadused (tahked ained).....                                                      | 102 |
| B OSA:  | MÜRGISUSE MÄÄRAMISE MEETODID.....                                                              | 111 |
|         | Üldine sissejuhatus.....                                                                       | 107 |
| B.1.    | Äge mürgisus (suukaudne).....                                                                  | 110 |
| B.1 bis | Äge mürgisus (suukaudne), kindla annuse meetod.....                                            | 113 |
| B.2.    | Äge mürgisus (sissehingamisel).....                                                            | 117 |
| B.3.    | Äge mürgisus (nahakaudne).....                                                                 | 121 |
| B.4.    | Äge mürgisus (nahka ärritav).....                                                              | 124 |
| B.5.    | Äge mürgisus (silmi ärritav).....                                                              | 127 |
| B.6.    | Naha sensibiliseerimine.....                                                                   | 131 |
| B.7.    | Kordusdoosi mürgisus (28 päeva, suukaudne).....                                                | 136 |
| B.8.    | Kordusdoosi mürgisus (28 päeva, sissehingamisel).....                                          | 140 |
| B.9.    | Kordusdoosi mürgisus (28 päeva, nahakaudne).....                                               | 144 |
| B.10.   | Mutageensus ( <i>in vitro</i> tsütogeneetiline katse imetajate rakkudega).....                 | 148 |
| B.11.   | Mutageensus ( <i>in vivo</i> tsütogeneetiline test imetajate luuüdiga, kromosoomianalüüs)..... | 151 |
| B.12.   | Mutageensus (mikrotuuma katse).....                                                            | 154 |
| B.13.   | Mutageensus ( <i>Escherichia coli</i> – pöördmutatsioonikatse).....                            | 157 |
| B.14.   | Mutageensus ( <i>Salmonella typhimurium</i> – pöördmutatsioonikatse).....                      | 160 |

|        |                                                                    |     |
|--------|--------------------------------------------------------------------|-----|
| C OSA: | KESKKONNAMÜRGISUSE MÄÄRAMISE MEETOD.....                           | 163 |
| C.1.   | Äge mürgisus kaladele.....                                         | 163 |
| C.2.   | Äge mürgisus vesikirpudele ( <i>Daphnia</i> ).....                 | 172 |
| C.3.   | Vetikate kasvu pidurdamise katse.....                              | 179 |
| C.4.   | Biodegradatsioon: kohese biolagunduvuse määramine.....             | 187 |
|        | C.4-A: Lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) kõrvaldamine.....     | 194 |
|        | C.4-B: Muudetud OECD sõelkatse.....                                | 197 |
|        | C.4-C: Süsinikdioksiidi (CO <sub>2</sub> ) eraldumine.....         | 202 |
|        | C.4-D: Manomeetriline respiromeetria.....                          | 207 |
|        | C.4-E: Kinnine pudel.....                                          | 211 |
|        | C.4-F: MITI (Jaapani Väliskaubandus- ja Tööstusministeerium).....  | 216 |
|        | Lisad.....                                                         | 221 |
| C.5.   | Lagunemine: biokeemiline hapnikutarve.....                         | 226 |
| C.6.   | Lagunemine: keemiline hapnikutarve.....                            | 227 |
| C.7.   | Lagunemine: abiootiline lagunemine: hüdrolüüsi sõltuvus pH-st..... | 229 |

### SISSEJUHATUS

Käesolevas lisas sätestatakse direktiivi 79/831/EMÜ VII ja VIII lisas loetletud füüsikalis-keemiliste, toksikoloogiliste ja ökotoksikoloogiliste omaduste määramise meetodid. Meetodid põhinevad pädevate rahvusvaheliste organisatsioonide (eelkõige OECD) tunnustatud ja soovitatud meetoditel.

Selliste meetodite puudumisel on kasutusele võetud siseriiklikud standardid või teadusmaailmas üldtunnustatud meetodid. Üldjuhul tuleks katsed läbi viia direktiivis määratletud ainega. Silmas tuleb pidada lisandite võimalikku mõju katsetulemustele.

Kui käesolevas lisas osutatud meetodid ei sobi mingi kindla omaduse uurimiseks, peab teavitaja põhjendama muu meetodi kasutamist.

Loomkatsed ja -uuringud viiakse läbi kooskõlas siseriiklike õigusaktidega, võttes arvesse humaanseid põhimõtteid ja rahvusvahelisi suundumusi loomade heaolus.

Võrdväärsete katsemeetodite seast valitakse meetod, kus kasutatakse kõige vähem loomi.

**A OSA: FÜÜSIKALIS-KEEMILISTE OMADUSTE MÄÄRAMISE MEETODID****A.1. SULAMIS-/KÜLMUMISTEMPERATUUR****1. MEETOD**

Enamik kirjeldatud meetoditest põhineb OECD katsesuunis (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viidetes (2) ja (3).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Kirjeldatud meetodid ja seadmed on ette nähtud ainete sulamistemperatuuri määramiseks, olenemata nende puhtusastmest.

Meetodi valik sõltub analüüsitava aine iseloomust. Määravaks teguriks on see, kas aine on kergesti või raskesti või üldse mitte peenestatav.

Mõnede ainete puhul on kohasem määrata külmumis- või tahkumistemperatuur ning meetod sisaldab ka nende määramise standardeid.

Kui aine teatavate omaduste tõttu ei ole otstarbekohane määrata ühtki eespool toodud parameetrit, võib otstarbekas olla määrata hangumistemperatuur.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Sulamistemperatuuri defineeritakse temperatuurina, mille juures aine läheb tahkest olekust üle vedelasse ja ideaalis vastab see temperatuur külmumistemperatuurile.

Kuna paljude ainete puhul toimub faasisiire mingis temperatuurivahemikus, nimetatakse seda sageli sulamisvahemikuks.

Ühikute teisendamine (K °Cks)

$$t = T - 273,15$$

t: temperatuur Celsiuse skaalal, Celsiuse kraadides (°C)

T: termodünaamiline temperatuur, kelvinites (K)

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Mõned kaliibrimisained on loetletud viites (4).

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Määratakse temperatuur (temperatuurivahemik), mille juures toimub faasisiire tahkest olekust vedelasse või vedelast olekust tahkesse. Praktikas määratakse testaine proovi atmosfäärirõhul kuumutamisel/jahutamisel sulamise/külmumise alg- ja lõppfaasi temperatuurid. Kirjeldatud on viit tüüpi meetodeid, nimelt kapillaartorumeetodit, kuumlaua meetodeid, külmumistemperatuuri määramisi, termoanalüüsimeetodeid ja (naftaõlide jaoks välja töötatud) hangumistemperatuuri määramist.

Teatud juhtudel võib olla otstarbekas määrata külmumistemperatuuri asemel sulamistemperatuur.

#### 1.4.1. **Kapillaartorumeetod**

##### 1.4.1.1. *Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks*

Väike kogus peenestatud ainet viiakse kapillaartorusse ja surutakse tihedalt kokku. Kapillaartoru kuumutatakse koos termomeetriga, reguleerides temperatuuri tõusu nii, et tegeliku sulamisprotsessi ajal tõuseb temperatuur kiirusega umbes alla 1 K/min. Määratakse sulamise alg- ja lõpptemperatuur.

##### 1.4.1.2. *Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks*

Põhimõttelt analoogsed punktis 1.4.1.1 kirjeldatuga, kuid kapillaartoru ja termomeeter asuvad kuumutatavas metallplokis ning on vaadeldavad plokis olevate vaatlusavade kaudu.

##### 1.4.1.3. *Määramine fotoraku abil*

Kapillaartorus asuvat proovi kuumutatakse automaatrežiimil metallsilindris. Silindris oleva ava kaudu juhitakse läbi aine täppiskaliibritud fotorakule suunatud valguskiir. Enamiku ainete optilised omadused muutuvad sulades läbipaistmatust läbipaistvaks. Fotorakuni jõudva valguse intensiivsus suureneb ja saadab kuumkambris asuva plaatina-takistustermomeetri temperatuuri digitaalnäidikule stoppsignaali. Mõnede tugeva värvusega ainete jaoks see meetod ei sobi.

#### 1.4.2. **Kuumlauad**

##### 1.4.2.1. *Kofleri sulavuslaud*

Kofleri sulavuslaud koosneb kahest erineva soojujuhtivusega elektriliselt kuumutatavast metallosast, kusjuures laud on valmistatud selliselt, et temperatuurigradient on kogu selle pikkuses peaaegu lineaarne. Sulavuslaua temperatuur võib varieeruda piirides 283–573 K ning sellel on spetsiaalne temperatuurinäidik antud lauale kohandatud skaala, osuti ja jooksikuga. Sulamistemperatuuri määramiseks kantakse aine õhukese kihina otse sulavuslaua pinnale. Mõne sekundi jooksul kujuneb välja terav eraldusjoon vedela ja tahke faasi vahel. Temperatuuri eraldusjoonel loetakse osuti viimisega eraldusjoonele.

##### 1.4.2.2. *Sulavusmikroskoop*

Väga väikeste materjalikoguste sulamistemperatuuri määramisel kasutatakse mitmesuguste kuumlaudadega mikroskoobe. Enamiku kuumlaudade puhul mõõdetakse temperatuuri tundliku termopaari abil, vahel kasutatakse aga elavhõbetermomeetrit. Tüüpilises sulavusmikroskoobi kuumlauas on kuumkamber, milles olevale metallalusele asetatakse objektiklaasil olev proov. Metallaluse keskel on ava, mille kaudu siseneb mikroskoobi valguspeeglist lähtuv valgus. Kasutamise ajal suletakse kamber klaasplaadiga, mis takistab õhu juurdepääsu proovile.

Proovi kuumutamist reguleeritakse reostaadiga. Väga täpseteks mõõtmisteks optiliselt anisotroopsete ainete-ga võib kasutada polariseeritud valgust.

##### 1.4.2.3. *Meniskimeetod*

Seda meetodit kasutatakse eelkõige polüamiidide puhul.

Temperatuur, mille juures kuumlaua ja polüamiid-katseobjektile toetuva katteklaasi vahele paigutatud silikoonõli menisk nihkub, määratakse visuaalselt.

#### 1.4.3. **Külmumistemperatuuri määramise meetod**

Proov asetatakse spetsiaalsesse katseklaasi ja paigutatakse külmumistemperatuuri määramiseks seadmesse. Jahutamise ajal segatakse proovi pidevalt kergelt ja mõõdetakse sobivate vaheaegade tagant temperatuuri. Niipea, kui temperatuur paari mõõtmise kestel püsima jääb, registreeritakse see temperatuur külmumistemperatuurina (arvestades ka termomeetri viga).

Vältida tuleb allajahutamist, säilitades tahke ja vedela faasi vahel tasakaalu.

#### 1.4.4. Termoanalüüs

##### 1.4.4.1 Diferentsiaaltermoanalüüs (DTA)

Registreeritakse ühele ja samale juhitud temperatuuriprogrammile allutatud uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride erinevuse sõltuvus temperatuurist. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (sulamine) või eksotermilise (külmumine) kõrvalekaldena temperatuurikõvera nulljoonest.

##### 1.4.4.2 Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria (SDK)

Registreeritakse neelduva energia koguse sõltuvus temperatuurist ühele ja samale juhitud temperatuuriprogrammile allutatud uuritavas aines ja võrdlusmaterjalis. Neelduv energia kulutatakse uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride ühtlustamisele. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (sulamine) või eksotermilise (külmumine) kõrvalekaldena soojusbilansi kõvera nulljoonest.

#### 1.4.5. Hangumistemperatuur

Meetod on välja töötatud naftaõlide jaoks ja sobib kasutamiseks madala sulamistemperatuuriga õlitaoliste ainete puhul.

Peale algset kuumutamist jahutatakse proovi kindla kiirusega ja jälgitakse iga 3 K tagant selle voolavust. Madalaim temperatuur, mille juures aine liikumist täheldatakse, registreeritakse hangumistemperatuurina.

#### 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Erinevate sulamistemperatuuri/sulamisvahemiku määramise meetodite kohaldatavust ja täpsust kirjeldatakse järgmises tabelis.

**TABEL: MEETODITE KOHALDATAVUS**

##### A. Kapillaartorumeetodid

| Mõõtmismeetod                                                   | Peenestatavad ained | Raskesti peenestatavad ained    | Temperatuurivahemik | Hinnanguline täpsus <sup>(1)</sup> | Olemasolev standard |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|
| Vedelikuva-niga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks         | jah                 | Ainult mõnede puhul             | 273–573 K           | ± 0,3 K                            | JIS K 0064          |
| Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks           | jah                 | Ainult mõnede puhul             | 293 kuni >573 K     | ± 0,5 K                            | ISO 1218 (E)        |
| Määramine fotoraku abil                                         | jah                 | Lisaseadmete abil paljude puhul | 253–573 K           | ± 0,5 K                            |                     |
| <sup>(1)</sup> Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest |                     |                                 |                     |                                    |                     |

**B. Kuumlauad ja külmutamismeetodid**

| Mõõtmismeetod                                        | Peenestatavad ained | Raskesti peenestatavad ained | Temperatuurivahemik | Hinnanguline täpsus (°) | Olemasolev standard |
|------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| Kofleri sulavuslaud                                  | jah                 | ei                           | 283 kuni > 573 K    | ± 1,0 K                 | ANSI/ASTM D 3451-76 |
| Sulavusmikroskoop                                    | jah                 | Ainult mõnede puhul          | 273 kuni > 573 K    | ± 0,5 K                 | DIN 53736           |
| Meniskimeetod                                        | ei                  | Eelkõige polüamiidide puhul  | 293 kuni > 573 K    | ± 0,5 K                 | ISO 1218 (E)        |
| Külmumistemperatuuri meetodid                        | jah                 | jah                          | 223–573 K           | ± 0,5 K                 | nt BS 4695          |
| (°) Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest |                     |                              |                     |                         |                     |

**C. Termoaalüüs**

| Mõõtmismeetod                                        | Peenestatavad ained | Raskesti peenestatavad ained | Temperatuurivahemik | Hinnanguline täpsus (°)                         | Olemasolev standard |
|------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------|---------------------|
| Diferentsiaaltermoaalüüs                             | jah                 | jah                          | 173–1 273 K         | kuni 600 K<br>± 0,5 K kuni 1 273 K<br>K ± 2,0 K | ASTM E 537-76       |
| Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria                 | jah                 | jah                          | 173–1 273 K         | kuni 600 K<br>± 0,5 K kuni 1 273 K<br>K ± 2,0 K | ASTM E 537-76       |
| (°) Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest |                     |                              |                     |                                                 |                     |

**D. Hangumistemperatuur**

| Mõõtmismeetod                                        | Peenestatavad ained                    | Raskesti peenestatavad ained           | Temperatuurivahemik | Hinnanguline täpsus (°) | Olemasolev standard |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| Hangumistemperatuur                                  | Naftaõlide ja õlitaoliste ainete jaoks | Naftaõlide ja õlitaoliste ainete jaoks | 223–323 K           | ± 3,0 K                 | ASTM D 97-66        |
| (°) Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest |                                        |                                        |                     |                         |                     |

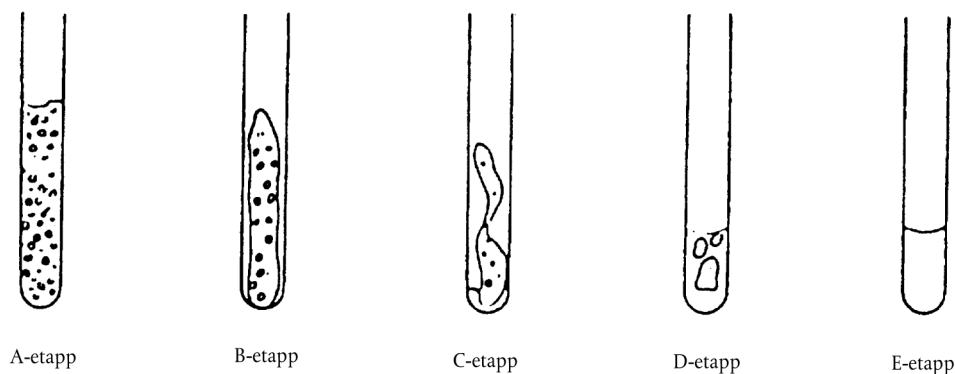
**1.6. MEETODITE KIRJELDUS**

Peaaegu kõigi katsemeetodite kirjeldus on ära toodud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standardites (vt liidet 1).

**1.6.1. Kapillaartorumeetodid**

Temperatuuri aeglasel tõstmisel ilmnevad peenestatud ainete puhul tavaliselt joonisel 1 näidatud sulamistapid.

Joonis 1



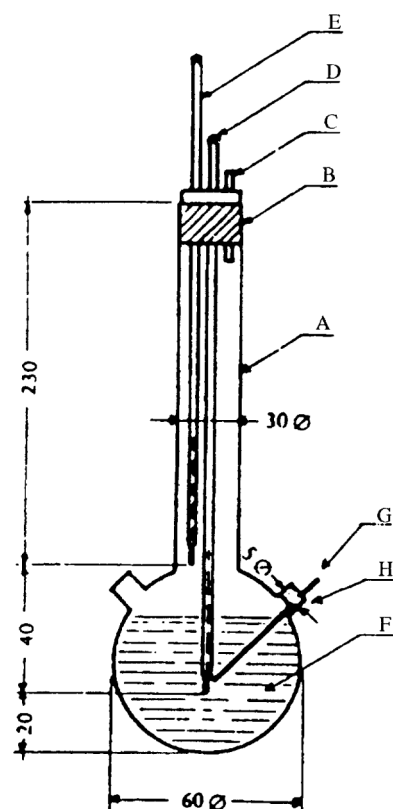
- A- etapp Sulamise algus: peened tilgakesed kinnituvad ühtlaselt kapillaartoru siseseinale.  
 B- etapp Kokkutõmbumine: proov eemaldub sulava massi kokkutõmbumise tõttu siseseinast.  
 C- etapp Kokkutõmbunud proov vajub kokku ja vedeldub.  
 D- etapp Vedeliku pinnal kujuneb välja täielik menisk, kuid arvestatav osa proovist jääb veel tahkeks.  
 E- etapp Sulamise lõppfaas: tahkeid osakesi enam pole.

Sulamistemperatuuri määramisel registreeritakse temperatuur nii sulamise alg- kui ka lõppfaasis.

#### 1.6.1.1. Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

Joonisel 2 on näidatud standarditud klaasist sulamistemperatuuri määramise seadet (JIS K 0064); kõik mõõdud on millimeetrites.

Joonis 2



- A: Mõõtmisnõu  
 B: Kork  
 C: Õhuava  
 D: Termomeeter  
 E: Lisatermomeeter  
 F: Vannivedelik  
 G: Klaasist kapillaartoru pikkusega 80–100 mm, sisediametriga  $1,0 \pm 0,2$  mm ja seinapaksusega 0,2–0,3 mm  
 H: Külgtoru

*Vedelikuvannis kuumutamisel kasutatav vedelik:*

Valida tuleks sobiv vedelik. Vedeliku valik sõltub määratavast sulamistemperatuurist, nt sobib parafiinõli sulamistemperatuuridele kuni 473 K, silikoonõli sulamistemperatuuridele kuni 573 K.

523 K ületavate sulamistemperatuuride puhul võib kasutada segu kolmest osast väävelhapest ja kahest osast (massisuhtes) kaaliumsulfaadist. Seesuguste segude kasutamisel tuleb rakendada kohaseid ettevaatusabinõusid.

*Termomeeter:*

Kasutada tuleks ainult järgmiste või nendega võrdväärsete standardite nõuetele vastavaid termomeetreid:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

*Katse käik:*

Kuiv aine peenestatakse uhmris ja viiakse ühest otsast kinnisesse kapillaartorusse nii, et peale kokkusurumist täidab aine kapillaartoru 3 mm ulatuses. Ühtlaselt tihendatud proovi saamiseks tuleks kapillaartorul lasta klaastorus umbes 700 mm kõrguselt vertikaalselt vastu kellaklaasi kukkuda.

Täidetud kapillaartoru paigutatakse vanni nii, et termomeetri elavhõbedareservuaari keskosa puutub kapillaartoruga kokku kohas, kus asub proov. Tavaliselt asetatakse kapillaartoru seadmesse temperatuuril umbes 10 K alla sulamistemperatuuri.

Vannivedelikku soojendatakse nii, et temperatuur tõuseb umbes 3 K/min. Soovitav on vedelikku segada. Umbes 10 K enne eeldatava sulamistemperatuurini jõudmist vähendatakse temperatuuri tõusu kiiruseni mitte üle 1 K/min.

*Arvutamine:*

Sulamistemperatuur arvutatakse järgmiselt:

$$T = T_D + 0,00016(T_D - T_E)n$$

kus:

$T$  = parandatud sulamistemperatuur (K)

$T_D$  = termomeetri D temperatuurinäit (K)

$T_E$  = termomeetri E temperatuurinäit (K)

$n$  = skaalajaotuste arv termomeetri D elavhõbedasamba väljaulatuval osal.

#### 1.6.1.2. Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

*Seade:*

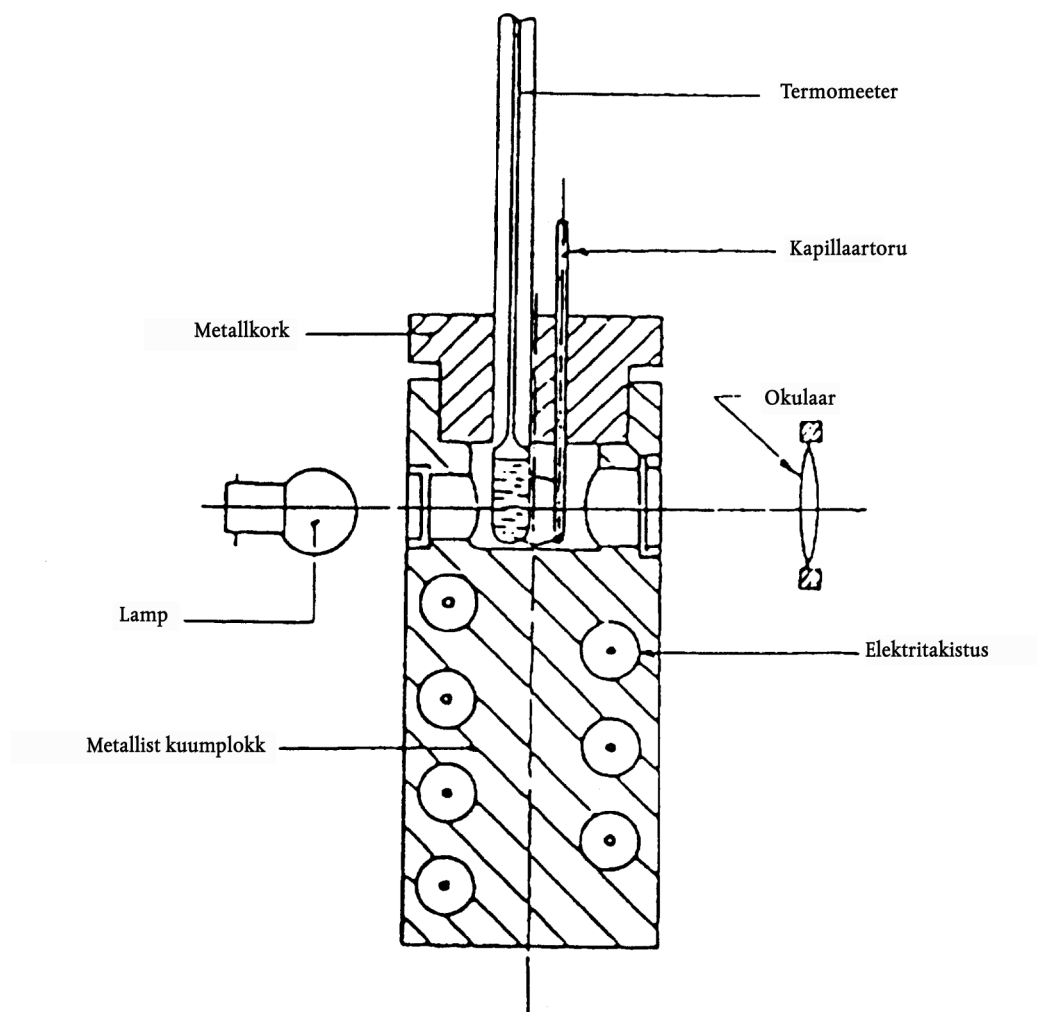
*Koosneb:*

- silindrilisest metallplokist, mille ülaosa on õõnes ja moodustab kambri (vt joonist 3),
- metallkorgist ühe või kahe avaga, mis võimaldavad metallplokki torusid paigaldada,
- metallplokki kütteseadmest, mis võib olla lahendatud näiteks elektritakistusena plokis,
- reostaadist võimsuse reguleerimiseks juhul, kui kasutatakse elektrilist kütteseadet,
- neljast üksteise suhtes täisnurga all paiknevast kuumuskindla klaasiga aknast kambri külgsentel. Ühe sellise akna ette on paigaldatud okulaar kapillaartoru jälgimiseks. Kolme ülejäänud akent kasutatakse sisemuse valgustamiseks lampide abil,
- ühest otsast kinnisest kuumuskindlast klaasist kapillaartorust (vt 1.6.1.1).

Termomeeter:

Vt punktis 1.6.1.1. nimetatud standardeid. Sobivad ka võrreldava täpsusega termoelektrilised mõõteseadmed.

Joonis 3



#### 1.6.1.3. Määramine fotoraku abil

Seade ja katse käik:

Seade koosneb automaatse küttesüsteemiga metallkambrist. Kolm kapillaartoru täidetakse vastavalt punktile 1.6.1.1 ja paigutatakse ahju.

Seadme kalibreerimiseks on võimalik kasutada mitmesuguseid lineaarseid temperatuuritõuse; sobivat temperatuuritõuse reguleeritakse elektriliselt vastavalt seadistatud konstantsele lineaarsele tõusukiirusele. Meerikud näitavad ahju tegelikku temperatuuri ja kapillaartorus oleva aine temperatuuri.

**1.6.2. Kuumlauad****1.6.2.1. Kofleri sulavuslaud**

Vt liidet.

**1.6.2.2. Sulavusmikroskoop**

Vt liidet.

**1.6.2.3. Meniskimeetod (polüamiididele)**

Vt liidet.

Sulamistemperatuuri vahemikus ei tohiks temperatuur tõusta kiiremini kui 1 K/min.

**1.6.3. Külumistemperatuuri määramise meetodid**

Vt liidet.

**1.6.4. Termoanalüüs****1.6.4.1. Diferentsiaaltermoanalüüs**

Vt liidet.

**1.6.4.2. Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria**

Vt liidet.

**1.6.5. Hangumistemperatuuri määramine**

Vt liidet.

**2. ANDMED**

Mõningatel juhtudel on termomeetri näitused vaja korrigeerida.

**3. ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- kasutatud meetodit,
- aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetapi kirjeldust (kui seda on rakendatud),
- hinnangulist täpsust.

Sulamistemperatuurina registreeritakse vähemalt kahe hinnangulise täpsuse piiridesse (vt tabeleid) jääva mõõtetulemuse keskmine.

Kui sulamise alg- ja lõppfaasi temperatuuride vahe jääb meetodi hinnangulise täpsuse piiridesse, registreeritakse sulamistemperatuurina sulamise lõppfaasi temperatuur; vastasel juhul registreeritakse mõlemad väärtused.

Kui aine enne sulamistemperatuurini jõudmist laguneb või sublimeerub, registreeritakse temperatuur, mille juures see aset leiab.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsilist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

#### 4. VIITED

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803-834.
3. R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.
4. IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

#### Liide

Täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks võib näidetena tutvuda järgmiste standarditega.

#### 1. Kapillaartorumeetodid

##### 1.1. Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

|               |                                                                                                               |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ASTM E 324-69 | Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals |
| BS 4634       | Method for the determination of melting point and/or melting range                                            |
| DIN 53181     | Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren                                           |
| JIS K 00-64   | Testing methods for melting point of chemical products                                                        |

##### 1.2. Metallplokiiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

|              |                                                                             |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| DIN 53736    | Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen |
| ISO 1218 (E) | Plastics – polyamides – determination of 'melting point'                    |

#### 2. Kuumlauad

##### 2.1. Kofleri sulavuslaud

|                     |                                                                      |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------|
| ANSI/ASTM D 3451-76 | Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------|

##### 2.2. Sulavusmikroskoop

|           |                                                                             |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------|
| DIN 53736 | Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------|

##### 2.3. Meniskimeetod (polüamiididele)

|                     |                                                                                    |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| ISO 1218 (E)        | Plastics – polyamides – determination of 'melting point'                           |
| ANSI/ASTM D 2133-66 | Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials |
| NF T 51-050         | Résines de polyamides. Détermination du 'point de fusion' Méthode du ménisque      |

3. **Külmumistemperatuuri määramise meetodid**
  - BS 4633 Method for the determination of crystallizing point
  - BS 4695 Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
  - DIN 51421 Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
  - ISO 2207 Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
  - DIN 53175 Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
  - NF T 60-114 Point de fusion des paraffines
  - NF T 20-051 Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
  - ISO 1392 Method for the determination of the freezing point
4. **Termoanalüüs**
  - 4.1. Diferentsiaaltermoanalüüs
    - ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
    - ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis
    - ASTM E 472-86 Standard practice for reporting thermoanalytical data
    - DIN 51005 Thermische Analyse, Begriffe
  - 4.2. Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria
    - ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
    - ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis
    - ASTM E 472-86 Standard practice for reporting thermoanalytical data
    - DIN 51005 Thermische Analyse, Begriffe
5. **Hangumistemperatuuri määramine**
  - NBN 52014 Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite - Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
  - ASTM D 97-66 Standard test method for pour point of petroleum oils
  - ISO 3016 Petroleum oils – Determination of pour point.

## A.2. KEEMISTEMPERatuur

### 1. MEETOD

Enamik kirjeldatud meetoditest põhineb OECD katsesuunisel (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viidetes (2) ja (3).

#### 1.1. SISSEJUHATUS

Siinkirjeldatud meetodeid ja seadmed saab kasutada vedelate ja madala sulamistemperatuuriga ainete korral eeldusel, et nendega ei toimu allpool keemistemperatuuri mingeid keemilisi reaktsioone (näiteks auto-oksüdatsiooni, ümberasetust, lagunemist jne). Meetodid sobivad kohaldamiseks nii puhastele kui ka lisanditega vedelikele.

Põhirõhk on pandud fotorakk-detektorit või termoaanalüüsi kasutavatele meetoditele, kuna need sobivad nii sulamis- kui ka keemistemperatuuri määramiseks. Lisaks on mõõtmised automatiseeritavad.

“Dünaamilise meetodi” eelis on sobivus ka aururõhu määramiseks ning puudub vajadus parandada keemistemperatuuri normaalrõhule (101 325 kPa), kuna rõhku on mõõtmise käigus võimalik manostaadi abil normaalrõhule reguleerida.

*Märkused:*

Lisandite mõju keemistemperatuuri määramisele sõltub olulisel määral lisandi iseloomust. Kui proov sisaldab tulemust mõjutada võivaid lenduvaid lisandeid, võib seda puhastada.

#### 1.2 MÕISTED JA ÜHIKUD

Keemistemperatuur normaalrõhul defineeritakse temperatuurina, mille juures vedeliku aururõhk on 101 325 kPa.

Kui keemistemperatuuri ei määrata normaalrõhul, kirjeldab aururõhu sõltuvust temperatuurist Clausius-Clapeyroni võrrand:

$$\log p = - \frac{\Delta H_v}{2,3 RT} + \text{const}$$

kus:

$p$  = aine aururõhk paskalites

$\Delta H_v$  = aine aurustumissoojus (J mol<sup>-1</sup>)

$R$  = universaalne gaasikonstant = 8,314 (J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)

$T$  = termodünaamiline temperatuur (K)

Keemistemperatuur registreeritakse mõõtmise-aegse õhurõhu suhtes.

*Teisendused:*

Rõhk (ühikud: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(ühik “bar” on lubatav, kuid ei ole soovitatav)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(ühikud “mm Hg” ja “Torr” ei ole lubatavad)

1 atm = normaalatmosfäär = 101 325 Pa

(ühik “atm” ei ole lubatav)

Temperatuur (ühikud: K)

$$t = T - 273,15$$

t: temperatuur Celsiuse skaalal, Celsiuse kraadides (°C)

T: termodünaamiline temperatuur, kelvinites (K)

### 1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Mõned kaliibrimisained on ära toodud liites loetletud meetodites.

### 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Viis meetodit keemistemperatuuri (keemistemperatuuri vahemiku) määramiseks põhinevad keemistemperatuuri mõõtmisel, ülejäänud kaks termoanalüüsil.

#### 1.4.1. Määramine ebulliomeetri abil

Ebulliomeetrid töötati algselt välja molaarmassi määramiseks keemistemperatuuri tõusu järgi, kuid nad sobivad ka keemistemperatuuri täpseks mõõtmiseks. Väga lihtsat seadet kirjeldatakse ASTM D 1120-72 (vt liidet). Selles seadmes kuumutatakse vedelikku atmosfäärirõhul tasakaalutingimustes kuni keemiseni.

#### 1.4.2. Dünaamiline meetod

Selle meetodi kohaselt mõõdetakse keemise ajal tagasijooksus sobiva termomeetri abil auru kondensatsioonitemperatuur. Meetod võimaldab rõhku varieerida.

#### 1.4.3. Destillatsioonimeetod keemistemperatuuri määramiseks

Selle meetodi kohaselt mõõdetakse vedeliku destillatsioonil auru kondensatsioonitemperatuur ja destillaadi kogus.

#### 1.4.4. Siwoloboffi meetod

Proovi kuumutatakse katseklaasis vedelikuvannil. Katseklaasi paigutatakse alt kinni joodetud kapillaartoru, mille alumises osas on õhumull.

#### 1.4.5. Määramine fotoraku abil

Mõõtmine viiakse eralduvate mullide põhjal läbi automaatselt ja fotoelektriliselt, järgides Siwoloboffi meetodit.

#### 1.4.6. Diferentsiaaltermoanalüüs

Registreeritakse ühele ja samale juhitud temperatuuriprogrammile allutatud uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride erinevuse sõltuvus temperatuurist. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (keemine) kõrvalekaldega temperatuurikõvera nulljoonest.

1.4.7. **Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria**

Registreeritakse neelduva energia koguse sõltuvus temperatuurist ühele ja samale juhitud temperatuuri-programmide allutatud uuritavas aines ja võrdlusmaterjalis. Neelduv energia kulutatakse uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride ühtlustamisele. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (keemine) kõrvalekaldena soojusbilansi kõvera nulljoonest.

1.5. **KVALITEEDINÕUDED**

Erinevate keemistemperatuuri/keemistemperatuuri vahemiku määramise meetodite kohaldatavust ja täpsust kirjeldatakse tabelis 1.

**TABEL 1: MEETODITE VÕRDLUS**

| Mõõtmismeetod                                                                                                                                                                                                                                                                 | Hinnanguline täpsus                                                                                              | Olemasolev standard              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Ebulliomeeter                                                                                                                                                                                                                                                                 | $\pm 1,4$ K (kuni 373 K) <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup><br>$\pm 2,5$ K (kuni 600 K) <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> | ASTM D 1120-72 <sup>(1)</sup>    |
| Dünaamiline meetod                                                                                                                                                                                                                                                            | $\pm 0,5$ K (kuni 600 K) <sup>(2)</sup>                                                                          |                                  |
| Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)                                                                                                                                                                                                                            | $\pm 0,5$ K (kuni 600 K)                                                                                         | ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71 |
| Siwoloboffi meetod                                                                                                                                                                                                                                                            | $\pm 2$ K (kuni 600 K) <sup>(2)</sup>                                                                            |                                  |
| Määramine fotoraku abil                                                                                                                                                                                                                                                       | $\pm 0,3$ K (373 K juures) <sup>(2)</sup>                                                                        |                                  |
| Diferentsiaaltermoanalüüs                                                                                                                                                                                                                                                     | $\pm 0,5$ K (kuni 600 K)<br>$\pm 2,0$ K (kuni 1 273 K)                                                           | ASTM E 537-76                    |
| Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria                                                                                                                                                                                                                                          | $\pm 0,5$ K (kuni 600 K)<br>$\pm 2,0$ K (kuni 1 273 K)                                                           | ASTM E 537-76                    |
| <sup>(1)</sup> See täpsus kehtib ainult lihtsa, näiteks ASTM D 1120-72 kirjeldusele vastava seadme puhul; keerukamate ebulliomeetrite abil on täpsust võimalik suurendada.<br><sup>(2)</sup> Kehtib ainult puhaste ainete puhul. Muudel puhkudel kasutamist tuleb põhjendada. |                                                                                                                  |                                  |

1.6. **MEETODITE KIRJELDUS**

Osade katsemeetodite kirjeldus on ära toodud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standardites (vt liidet).

1.6.1. **Ebulliomeeter**

Vt liidet.

1.6.2. **Dünaamiline meetod**

Vt katsemeetodit A.4 aururõhu määramiseks.

Registreeritakse 101 325 kPa avaldatavale rõhule vastav keemistemperatuur.

1.6.3. **Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)**

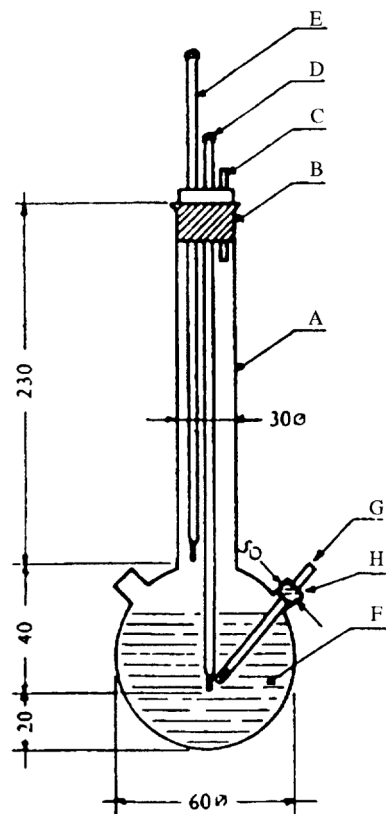
Vt liidet.

## 1.6.4. Siwoloboffi meetod

Ligikaudu 5 mm läbimõõduga katseklaasis olevat proovi kuumutatakse sulamistemperatuuri määramise seadmes (joonis 1).

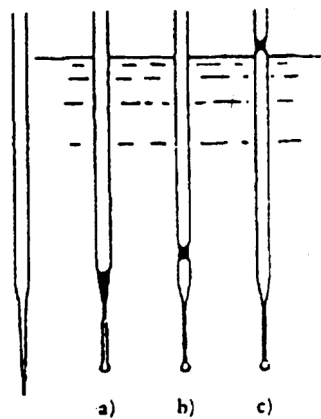
Joonisel 1 on näidatud standarditud klaasist sulamis- ja keemistemperatuuri määramise seade (JIS K 0064) (kõik mõõdud on millimeetrites).

Joonis 1



- A: Mõõtmisnõu
- B: Kork
- C: Õhuava
- D: Termomeeter
- E: Lisatermomeeter
- F: Vannivedelik
- G: Kuni 5 mm välisdiameetriga katseklaas, mille sees on ligikaudu 100 mm pikkune, ligikaudu 1 mm sisediameetri ja ligikaudu 0,2–0,3 mm seinapaksusega kapillaartoru
- H: Külgtoru

Katseklaasi paigutatakse alumisest otsast ligikaudu 1 cm kauguselt kinni joodetud kapillaartoru (keedukapillaar). Lisatava testaine kogus valitakse selline, et kapillaartoru kinnijoodetud osa jääb allapoole vedeliku pinda. Keedukapillaariga katseklaas seotakse kas kummipaelaga termomeetri külge või kinnitatakse külgtoe-ga (vt joonist 2).

Joonis 2  
Siwoloboffi meetodJoonis 3  
Muudetud meetod

Vedelikuvannis kuumutamisel kasutatav vedelik valitakse keemistemperatuuri järgi. Temperatuuridel kuni 573 K võib kasutada silikoonõli. Parafiinõli võib kasutada maksimaalselt temperatuurini 473 K. Vannivedelikku soojendatakse nii, et temperatuur tõuseb umbes 3 K/min. Vannivedelikku tuleb segada. Umbes 10 K enne eeldatava keemistemperatuurini jõudmist vähendatakse soojendamist nii, et temperatuur tõuseb kiirusega alla 1 K/min. Keemistemperatuuri lähenedes hakkab keedukapillaarist kiiresti mulle eralduma.

Keemistemperatuur on selline temperatuur, mille juures mullide voog kiirel jahutamisel katkeb ning vedelikunivoo kapillaartorus hakkab järsult tõusma. Termomeetri vastav näit ongi aine keemistemperatuur.

Muudetud meetodi (joonis 3) kohaselt määratakse keemistemperatuur sulamistemperatuuri määramisel kasutatavas kapillaartorus. Selle ots tõmmatakse umbes 2 cm pikkuses peeneks (a) ja kapillaartorusse imetakse väike kogus proovi. Kapillaartoru avatud ots joodetakse kinni, nii et tippu jääb väike õhumull. Kuumutamisel sulamistemperatuuri määramise seadmes (b) õhumull paisub. Keemistemperatuur vastab temperatuurile, mille juures ainekork tõuseb vannivedeliku pinna tasemeni (c).

#### 1.6.5. Määramine fotoraku abil

Kapillaartorus olevat proovi kuumutatakse soojendatavas metallplokis.

Plokis olevate vastavate avade kaudu juhatakse läbi aine täppiskaliibritud fotorakule suunatud valguskiir.

Proovi temperatuuri tõusmisel hakkab keedukapillaarist üksikuid mulle eralduma. Keemistemperatuurile lähenedes kasvab eralduvate mullide arv märgatavalt. Selle tulemusel fotorakus registreeritava valguse intensiivsus suureneb ja saadab plokis asuva plaatina-takistustermomeetri temperatuuri näidikule stoppsignaali.

Meetod on väga mugav, kuna võimaldab ilma seadet muutmata mõõta keemistemperatuuri ka allpool toatemperatuuri kuni 253,15 K (−20 °C). Selleks tuleb seade lihtsalt jahutusvanni paigutada.

#### 1.6.6. Termoanalüüs

##### 1.6.6.1. Diferentsiaaltermoanalüüs

Vt liidet.

##### 1.6.6.2. Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria

Vt liidet.

#### 2. ANDMED

Väikestel lahknevustel normaalrõhust (kuni  $\pm 5$  kPa) normaliseeritakse keemistemperatuuri väärtused keemistemperatuurile normaalrõhul ( $T_n$ ) järgmise Sidney Youngi arväärtus-võrrandi abil:

$$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$$

kus:

$$\Delta p = (101\,325 - p) \text{ [vt märki]}$$

$$p = \text{mõõdetud rõhk (kPa)}$$

$$f_T = \text{keemistemperatuuri muutuse sõltuvus rõhust (K/kPa)}$$

$$T = \text{mõõdetud keemistemperatuur (K)}$$

$$T_n = \text{normaalrõhule parandatud keemistemperatuur (K).}$$

Paljude ainete temperatuuriparandustegurid ( $f_T$ ) ning valemid nende ligikaudseks arvutamiseks on ära toodud eespool nimetatud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standardites.

Näiteks toob DIN 53171 ära järgmised ligikaudsed parandustegurid värvides kasutatavatele lahustitele:

**TABEL 2: TEMPERAATUURIPARANDUSTEGURID  $f_T$**

| Temperatuur T (K) | Parandustegur $f_T$ (K/kPa) |
|-------------------|-----------------------------|
| 323,15            | 0,26                        |
| 348,15            | 0,28                        |
| 373,15            | 0,31                        |
| 398,15            | 0,33                        |
| 423,15            | 0,35                        |
| 448,15            | 0,37                        |
| 473,15            | 0,39                        |
| 498,15            | 0,41                        |
| 523,15            | 0,44                        |
| 548,15            | 0,45                        |
| 573,15            | 0,47                        |

### 3. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- kasutatud meetodit,
- aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetapi kirjeldust (kui seda on rakendatud),
- hinnangulist täpsust.

Keemistemperatuurina registreeritakse vähemalt kahe hinnangulise täpsuse piiridesse (vt tabel 1) jääva mõõtetulemuse keskmine.

Ära tuuakse nii mõõdetud keemistemperatuurid kui ka nende keskmine; rõhud, mille juures mõõtmised teostati, registreeritakse kilopaskalites (kPa). Eelistatavalt peaks rõhk olema lähedane normaalrõhule.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

### 4. VIITED

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final.
2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, volume II.
3. R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

### Liide

Täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks võib näidetena tutvuda järgmiste standarditega:

#### 1. Ebulliomeeter

ASTM D 1120-72

Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)**

|             |                                                                             |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| ISO/R 918   | Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)    |
| BS 4349/68  | Method for determination of distillation of petroleum products              |
| BS 4591/71  | Method for the determination of distillation characteristics                |
| DIN 53171   | Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes             |
| NF T 20-608 | Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation |

3. **Diferentsiaaltermoanalüüs ja skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria**

|               |                                                                                                              |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ASTM E 537-76 | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis |
| ASTM E 473-85 | Standard definitions of terms relating to thermal analysis                                                   |
| ASTM E 472-86 | Standard practice for reporting thermoanalytical data                                                        |
| DIN 51005     | Thermische Analyse: Begriffe                                                                                 |

### A.3. SUHTELINE TIHEDUS

1. **MEETOD**

Kirjeldatud meetodid põhinevad OECD katsesuunis (1). Meetodite tööpõhimõte on ära toodud viites (2).

1.1. **SISSEJUHATUS**

Kirjeldatud suhtelise tiheduse määramise meetodid sobivad kohaldamiseks nii tahketele kui vedelatele ainetele, olenemata nende puhtusastmest. Tabelis 1 on ära toodud mitmesugused meetodid.

1.2. **MÕISTED JA ÜHIKUD**

Tahkete ainete ja vedelike suhteline tihedus  $D_4^{20}$  on 20 °C juures määratud kindla mahuga aine massi ja 4 °C juures määratud sama mahuga veekoguse massi suhe. Suhtelisel tihedusel puudub ühik.

Aine tihedus ( $\rho$ ) on tema massi ( $m$ ) ja mahu ( $v$ ) suhe.

Tihedus ( $\rho$ ) esitatakse SI-ühikutes ( $\text{kg/m}^3$ ).

1.3. **VÕRDLUSAINED (1), (3)**

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

1.4. **PÕHIMÕTE**

Kasutatakse nelja tüüpi meetodeid.

**1.4.1. Ujuvusmeetodid****1.4.1.1. Hüdromeetrid (vedelike jaoks)**

Küllalt täpselt ja kiiresti saab tihedust määrata ujukhüdromeetrite abil, mille skaalajaotised võimaldavad vedeliku tiheduse määrata sukeldunud osa pikkuse põhjal.

**1.4.1.2. Hüdrostaatilised kaalud (vedelike ja tahkete ainete jaoks)**

Proovi tihedust on võimalik määrata selle õhus ja sobivas vedelikus (nt vees) mõõdetud masside vahe põhjal.

Tahkete ainete puhul iseloomustab leitud tihedus ainult konkreetset proovi. Vedelike tiheduse määramiseks kaalutakse teadaoleva ruumalaga (v) keha kõigepealt õhus ja siis vedelikus.

**1.4.1.3. Sukeldatud keha meetod (vedelike jaoks)(4)**

Selle meetodi kohaselt määratakse vedeliku tihedus vedeliku kaalumisel enne ja peale teadaoleva ruumalaga keha sukeldamist uuritavasse vedelikku saadud masside vahe põhjal.

**1.4.2. Püknomeetrit rakendavad meetodid**

Meetodid sobivad nii tahketele ainetele kui ka vedelikele, võimalik on kasutada erineva kujuga ja kindla ruumalaga püknomeetreid. Tihedus arvutatakse täis ja tühja püknomeetri masside vahe ja püknomeetri teadaoleva ruumala põhjal.

**1.4.3. Õhkvõrdluspüknomeeter (tahkete ainete jaoks)**

Gaasvõrdluspüknomeetri abil on toatemperatuuril võimalik määrata mis tahes kujul oleva tahke aine tihedust. Aine ruumala mõõdetakse õhu või inertgaasiga täidetud muutuva kaliibritud mahuga silindris. Tiheduse arvutamiseks määratakse peale ruumala mõõtmist aine mass.

**1.4.4. Resonantstihedusmõõtur (5), (6), (7)**

Vedeliku tihedust on võimalik määrata resonantstihedusmõõturi abil. U-toruna konstrueeritud mehaaniline ostsillaator pannakse vibreerima ostsillaatori massist sõltuval resonantssagedusel. Proovi viimine U-torru muudab ostsillaatori resonantssagedust. Seade tuleb kaliibrida kahe vedelikuga, mille tihedus on teada. Vedelike valimisel tuleks eelistada selliseid, mille tihedused hõlmavad mõõdetavat vahemikku.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Erinevate suhtelise tiheduse määramise meetodite kohaldatast kirjeldatakse allpool olevas tabelis.

**1.6. MEETODITE KIRJELDUS**

Liites on täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks esitatud näidetena standardeid.

Katsed tuleb läbi viia 20 °C juures ja teha tuleb vähemalt kaks mõõtmist.

2. **ANDMED**

Vaata standardeid.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- kasutatud meetodit,
- aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetapi kirjeldust (kui seda on rakendatud).

Suhteline tihedus  $D_4^{20}$  registreeritakse vastavalt punkti 1.2 definitsioonile koos analüüsitava aine füüsikalise olekuga.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

**TABEL: MEETODITE KOHALDATAVUS**

| Mõõtmismeetod                    | Tihedus    |         | Maksimaalne võimalik dünaamiline viskoossus | Olemasolevad standardid               |
|----------------------------------|------------|---------|---------------------------------------------|---------------------------------------|
|                                  | tahke aine | vedelik |                                             |                                       |
| 1.4.1.1. Hüdromeetrid            |            | jah     | 5 Pa·s                                      | ISO 387,<br>ISO 649-2,<br>NF T 20-050 |
| 1.4.1.2. Hüdrostaatilised kaalud |            |         |                                             |                                       |
| a) tahked ained                  | jah        |         |                                             | ISO 1183 (A)                          |
| b) vedelikud                     |            | jah     | 5 Pa·s                                      | ISO 901 ja 758                        |
| 1.4.1.3. Sukeldatud keha meetod  |            | jah     | 20 Pa·s                                     | DIN 53217                             |
| 1.4.2. Püknomeeter               |            |         |                                             | ISO 3507                              |
| a) tahked ained                  | jah        |         |                                             | ISO 1183(B),<br>NF T 20-053           |
| b) vedelikud                     |            | jah     | 500 Pa·s                                    | ISO 758                               |
| 1.4.3. Õhkvõrdluspüknomeeter     | jah        |         |                                             | DIN 55990 Teil 3,<br>DIN 53243        |
| 1.4.4. Resonantstihedusmõõtur    |            | jah     | 5 Pa·s                                      |                                       |

4. **VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.
3. IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.
4. Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. 11, 427–430.
5. Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297–302.
6. Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen – Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717–726.
7. Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253–255.

## Liide

Täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks võib näidetena tutvuda järgmiste standarditega:

1. **UJUVUSMEETODID**

## 1.1. Hüdromeeter

|                    |                                                                                                                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DIN 12790, ISO 387 | Hydrometer; general instructions                                                                                                                         |
| DIN 12791          | Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use<br>Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation<br>Part III: Use and test |
| ISO 649-2          | Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose                                                                                            |
| NF T 20-050        | Chemical products for industrial use – Determination of density of liquids – Areometric method                                                           |
| DIN 12793          | Laboratory glassware: range find hydrometers                                                                                                             |

## 1.2. Hüdrostaatilised kaalud

*Tahkete ainete jaoks*

|                                                  |                                                                                                                                                     |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ISO 1183                                         | Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics                                          |
| NF T 20-049                                      | Chemical products for industrial use – Determination of the density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method |
| ASTM-D-792                                       | Specific gravity and density of plastics by displacement                                                                                            |
| DIN 53479                                        | Testing of plastics and elastomers; determination of density                                                                                        |
| <i>Vedelike jaoks</i>                            |                                                                                                                                                     |
| ISO 901                                          | ISO 758                                                                                                                                             |
| DIN 51757                                        | Testing of mineral oils and related materials; determination of density                                                                             |
| ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62 |                                                                                                                                                     |
| ASTM D 1298                                      | Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method                                      |
| BS 4714                                          | Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method                                      |

## 1.3. Sukeldatud keha meetod

|           |                                                                                                            |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DIN 53217 | Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

2. **PÜKNOMEETRIT RAKENDAVAD MEETODID**

## 2.1. Vedelike jaoks

|           |                                                                                                                                 |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ISO 3507  | Pycnometers                                                                                                                     |
| ISO 758   | Liquid chemical products; determination of density at 20 °C                                                                     |
| DIN 12797 | Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)                                                      |
| DIN 12798 | Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ at 15 °C) |

|      |                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | DIN 12800                    | Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)                                                                                                                                                                                                                                          |
|      | DIN 12801                    | Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90°C) |
|      | DIN 12806                    | Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)                                                                                                                                |
|      | DIN 12807                    | Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)                                                                                                                                                                                                                                       |
|      | DIN 12808                    | Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol-water mixture)                                                                                                                                                                                                                            |
|      | DIN 12809                    | Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)                                                                                                                                                                                   |
|      | DIN 53217                    | Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer                                                                                                                                                                                               |
|      | DIN 51757                    | Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density                                                                                                                                                                                                        |
|      | ASTM D 297                   | Section 15: Rubber products – chemical analysis                                                                                                                                                                                                                                         |
|      | ASTM D 2111                  | Method C: Halogenated organic compounds                                                                                                                                                                                                                                                 |
|      | BS 4699                      | Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)                                                                                                                                                                |
|      | BS 5903                      | Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary- stoppered pycnometer method                                                                                                                                                            |
|      | NF T 20-053                  | Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pycnometric method                                                                                                                                                                    |
| 2.2. | Tahkete ainete jaoks         |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|      | ISO 1183                     | Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics                                                                                                                                                                              |
|      | NF T 20-053                  | Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pycnometric method                                                                                                                                                                    |
|      | DIN 19683                    | Determination of the density of soils                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 3.   | <b>ÖHKVÖRDLUSPÜKNOMEETER</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|      | DIN 55990                    | Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte                                                                                                                                                                                |
|      | DIN 53243                    | Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung                                                                                                                                                                                                                                          |

**A.4. AURURÕHK****1. MEETOD**

Enamik kirjeldatud meetoditest põhineb OECD katsesuunis (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viidetes (2) ja (3).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine struktuuri, sulamistemperatuuri ja keemistemperatuuri.

Ühtki mõõtmismeetodit ei saa kohaldada kõigile võimalikele aururõhkudele. Seetõttu soovitatakse aururõhkude mõõtmiseks vahemikus  $< 10^{-4}$ – $10^5$  Pa mitmeid meetodeid.

Lisandid avaldavad üldjuhul aururõhule mõju, mis sõltub oluliselt lisandi iseloomust.

Kui proov sisaldab tulemust mõjutada võivaid lenduvaid lisandeid, võib seda puhastada. Kohane võib olla ka tehniliselt puhta materjali aururõhu registreerimine.

Mõnedes siinkirjeldatud meetoditest kasutatakse metalloosi sisaldavaid seadmeid, söövitavaid aineid analüüsi- des tuleks seda arvestada.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Aine aururõhk on defineeritud küllastusrõhuna tahke aine või vedeliku kohal. Termodünaamilise tasakaalu tingimustes sõltub puhta aine aururõhk ainult temperatuurist.

Rõhu mõõtühikuna tuleks kasutada SI-ühikut paskal (Pa).

Allpool on toodud varem kasutatud rõhuühikud koos vastavate teisendusteguritega:

|                     |                        |
|---------------------|------------------------|
| 1 Torr ( = 1 mm Hg) | $1,333 \times 10^2$ Pa |
| 1 atmosfäär         | $1,013 \times 10^5$ Pa |
| 1 bar               | $10^5$ Pa              |

Temperatuuri mõõtühikuks SI süsteemis on kelvin (K).

Universaalne gaasikontant R on  $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .

Temperatuuri sõltuvust aururõhust kirjeldatakse Clausius-Clapeyroni võrrandiga:

$$\log p = - \frac{\Delta H_v}{2,3 RT} + \text{const}$$

kus:

p = aine aururõhk paskalites

$\Delta H_v$  = aine aurustumissoojus ( $\text{J mol}^{-1}$ )

R = universaalne gaasikontant ( $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

T = termodünaamiline temperatuur (K)

### 1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

### 1.4. KATSEMEETODITE PÕHIMÕTE

Aururõhu määramiseks on välja pakutud seitse meetodit, mis sobivad erinevate aururõhu vahemike jaoks. Iga meetodi puhul määratakse aururõhk erinevatel temperatuuridel. Piiratud temperatuurivahemikus on puhta aine aururõhu logaritm lineaarses sõltuvuses temperatuuri pöördväärtusest.

#### 1.4.1. Dünaamiline meetod

Dünaamilise meetodi puhul mõõdetakse konkreetsele rõhule vastav keemistemperatuur.

Soovitav rõhuvahemik:

$10^3$ – $10^5$  Pa.

Seda meetodit on soovitatud ka keemistemperatuuri määramiseks normaالرõhul, sel juhul ulatub tema tööpiirkond temperatuurini 600 K.

#### 1.4.2. Staatile meetod

Staatile meetodi puhul määratakse suletud süsteemis kindlal temperatuuril termodünaamilise tasakaalu tingimustes välja kujunenud aururõhk. Meetod sobib nii ühe- kui ka mitmekomponendiliste tahkete ainete ja vedelike jaoks.

Soovitav rõhuvahemik:

$10$ – $10^5$  Pa.

Hoolikal käsitlemisel on meetodit võimalik rakendada ka vahemikus  $1$ – $10$  Pa.

#### 1.4.3. Isoteniskoop

See standarditud meetod on küll staatile, kuid ei ole üldjuhul kohaldatav mitmekomponendilistele süsteemidele. Täiendavat informatsiooni võib leida ASTM meetodist D-2879-86.

Soovitav rõhuvahemik:

$100$ – $10^5$  Pa.

#### 1.4.4. Efusioonmeetod: aururõhukaalud

Vaakumi tingimustes, kus tagasipöörduva aine voo võib arvestamata jätta, mõõdetakse rakust teadaoleva suurusega ava kaudu ajaühikus väljuva aine hulk (nt aurujoa poolt tundlikele kaaludele antud impulsi või massikao mõõtmise kaudu).

Soovitav rõhuvahemik:

$10^{-3}$ – $1$  Pa.

#### 1.4.5. Efusioonmeetod: massikao või aurustunud aine kogumise põhjal

Meetodi aluseks on ultravaakumi tingimustes Knudseni rakust (4) ajaühikus läbi mikrodüüsi auruna väljuva testaine massi määramine. Välja voolanud auru massi võib leida kas raku massikao määramise kaudu või auru madalal temperatuuril kondenseerimisel ja lendunud aine koguse kromatograafilisel määramisel. Aururõhk arvutatakse Hertz-Knudseni võrrandi abil.

Soovitav rõhuvahemik:

$10^{-3}$ –1 Pa.

#### 1.4.6. Gaasi küllastamise meetod

Üle aine suunatakse inertse kandegaasi voog, nii et gaas aine aurudega küllastub. Teadaoleva koguse kandegaasiga kaasa kandunud aine koguse saab määrata sobivasse püüdurisse kogumise või pideva analüüsitehnika abil. Selle põhjal arvutatakse seejärel aururõhk antud temperatuuril.

Soovitav rõhuvahemik:

$10^{-4}$ –1 Pa.

Hoolikal käsitlemisel on meetodit võimalik rakendada ka vahemikus 1–10 Pa.

#### 1.4.7. Pöörlev rootor

Pöördrootormõõduri mõõtelemendiks on väike teraskuul, mis hõljub magnetväljas ja pöörleb suurel kiirusel. Gaasirõhk leitakse teraskuuli gaasirõhust tingitud aeglustumise põhjal.

Soovitav rõhuvahemik:

$10^{-4}$ –0,5 Pa.

#### 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Järgmises tabelis võrreldakse omavahel erinevate aururõhu määramise meetodite kohaldatavust, korratavust, reprodutseeritavust, mõõtepiirkonda ja olemasolevat standardit.

#### KVALITEEDINÕUDED

| Määramismeetod                         | Ained                        |         | Hinnanguline korratavus <sup>1</sup> | Hinnanguline reprodutseeritavus <sup>1</sup> | Soovitav rõhuvahemik            | Olemasolev standard |
|----------------------------------------|------------------------------|---------|--------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
|                                        | tahke aine                   | vedelik |                                      |                                              |                                 |                     |
| 1.4.1. Dünaamiline meetod              | madala sulamistemperatuuriga | jah     | kuni 25 %                            | kuni 25 %                                    | $10^3$ Pa– $2 \times 10^3$ Pa   | —                   |
|                                        |                              |         | 1–5 %                                | 1–5 %                                        | $2 \times 10^3$ Pa– $10^5$ Pa   | —                   |
| 1.4.2. Staatiline meetod               | jah                          | jah     | 5–10 %                               | 5–10 %                                       | 10 Pa– $10^5$ Pa <sup>(2)</sup> | NFT 20-048 (5)      |
| 1.4.3. Isoteniskoop                    | jah                          | jah     | 5–10 %                               | 5–10 %                                       | $10^2$ Pa– $10^5$ Pa            | ASTM-D 2879-86      |
| 1.4.4. Efusioonmeetod – aururõhukaalud | jah                          | jah     | 5–20 %                               | kuni 50 %                                    | $10^{-3}$ Pa–1 Pa               | NFT 20-047 (6)      |
| 1.4.5. Efusioonmeetod – massikadu      | jah                          | jah     | 10–30 %                              | —                                            | $10^{-3}$ Pa–1 Pa               | —                   |
| 1.4.6. Gaasi küllastamise meetod       | jah                          | jah     | 10–30 %                              | kuni 50 %                                    | $10^{-4}$ Pa–1 Pa <sup>2</sup>  | —                   |
| 1.4.7. Pöörleva rootori meetod         | jah                          | jah     | 10–20 %                              | —                                            | $10^{-4}$ Pa–0,5 Pa             | —                   |

<sup>(1)</sup> Sõltub puhtusastmest

<sup>(2)</sup> Hoolikal käsitlemisel on neid meetodeid võimalik rakendada ka vahemikus 1–10 Pa.

## 1.6. MEETODITE KIRJELDUS

1.6.1. **Dünaamiline meetod**1.6.1.1. *Seade*

Mõõteseadet koosneb tavaliselt klaasist või metallist püstjahutiga varustatud keemiseks mõeldud anumast (joonis 1), temperatuuri mõõtmise ning rõhu reguleerimise ja mõõtmise seadmetest. Joonisel näidatud tüüpiline mõõteseadet on valmistatud kuumuskindlast klaasist ja koosneb viiest osast:

Suur, osaliselt topeltseintega toru, millel on tasalihviga äärikühendus, jahuti, jahutusnõu ja sisseviik.

Cottrelli pumbaga klaasilinder paikneb toru keetmisosas ning tõukelise keemise vältimiseks on silindril kare paagutatud klaasist sisepind.

Temperatuur määratakse sobiva temperatuurianduriga (nt takistustermomeeter, kattega termopaar), mis on mõõteseadmesse viidud vastava sisseviigu (nt lihvkerni) kaudu ja ulatub mõõtepunkti (nr 5 joonisel 1).

Rõhu reguleerimis- ja mõõteseadmed ühendatakse nii, nagu vaja.

Puhvermahutina toimiv kolb ühendatakse seadmega kapillaartoru abil.

Keetmis anumad kuumutatakse klaasseadmesse altpoolt sisestatud kütteleemendiga (nt padrunkuumutiga). Kuumutamiseks vajalikku voolutugevust seadistatakse ja reguleeritakse termopaari abil.

Vajalik vaakum vahemikus  $10^2$  Pa kuni ligikaudu  $10^5$  Pa tekitatakse vaakumpumba abil.

Õhu või lämmastiku sissepääsu rõhu reguleerimiseks (mõõtepiirkond ligikaudu  $10^2$ – $10^5$  Pa) või ventileerimiseks reguleeritakse sobiva klapi abil.

Rõhku mõõdetakse manomeetri abil.

1.6.1.2. *Mõõtmisprotseduur*

Aururõhk määratakse proovi keemistemperatuuri määramisega kindlatel rõhkudel vahemikus ligikaudu  $10^3$ – $10^5$  Pa. Keemistemperatuurini jõudmist näitab püsiv temperatuur konstantsel rõhul. Meetodit ei saa kasutada vahutavate ainete uurimiseks.

Aine pannakse puhtasse, kuiva proovinõusse. Probleeme võib tekkida peenestamata tahkete ainetega, kuid vahel on need jahutussärgi soojendamise lahendatavad. Pärast täitmist suletakse mõõteseadme äärikühendus ja aine degaseeritakse. Seejärel seadistatakse kõige madalam soovitud temperatuur ja lülitatakse küte tööle. Samal ajal ühendatakse temperatuuriandur merikuga.

Tasakaaluolekuni jõudmist näitab konstantsel rõhul registreeritav konstantne keemistemperatuur. Vältida tuleb tõukelist keemist. Lisaks peab jahutis toimuma täielik kondensatsioon. Madala sulamistemperatuuriga tahkete ainete sulamistemperatuuri määramisel tuleb jälgida, et jahuti ei ummistuks.

Pärast tasakaalupunkti registreerimist seadistatakse kõrgem rõhk. Protsessi jätkatakse, kuni jõutakse rõhuni  $10^5$  Pa (kokku ligikaudu 5–10 mõõtepunkti). Kontrollimiseks tuleb tasakaalupunkte alanevatel rõhkudel uuesti mõõta.

**1.6.2. Staatileine meetod****1.6.2.1. Seade**

Seade koosneb proovinõust, kütte- ja jahutussüsteemist proovi temperatuuri reguleerimiseks ja temperatuuri mõõtmise vahenditest. Seade sisaldab ka vahendeid rõhu seadistamiseks ja reguleerimiseks. Meetodi tööpõhimõtteid illustreerivad joonised 2a ja 2b.

Proovikambri (joonis 2a) üks avaus on suletud sobiva kõrgvaakumklapiga. Teine avaus on ühendatud sobivat rõhumõõtmisvedelikku sisaldava U-toruga. U-toru üks haru on ühendatud vaakumpumba, lämmastikusilindri või ventilatsiooniklapi ja manomeetriga.

U-toru asemel võib kasutada näidikuga rõhumõõturit (joonis 2b).

Proovi temperatuuri reguleerimiseks paigutatakse proovinõu koos klapi ja U-toru või rõhumõõturiga konstantsel temperatuuril (täpsusega  $\pm 0,2$  K) hoitavasse vanni. Temperatuuri mõõdetakse kas proovinõu välisseinal või proovinõu sees.

Vaakumi tekitamiseks kasutatakse seadmes ülesvoolu asuva külmpüüduriga vaakumpumpa.

Meetodi 2a puhul mõõdetakse aine aururõhk kaudselt, kasutades nullindikaatorit. Siin võetakse arvesse asjaolu, et temperatuuri märgataval muutumisel muutub ka U-torus oleva vedeliku tihedus.

Sõltuvalt rõhuvahemikust ja testaine keemilisest iseloomust sobivad U-torus nullindikaatorina kasutamiseks sellised vedelikud, nagu silikoonõlid ja ftalaadid. Testaine ei tohi U-toru vedelikus ei arvestataval määral lahustuda ega sellega reageerida.

Rõhuvahemikus normaalõhurõhust rõhuni  $10^2$  Pa sobib manomeetris kasutamiseks elavhõbe, rõhkudel alla  $10^2$  Pa kuni rõhuni 10 Pa aga silikoonõlid ja ftalaadid. Kuumutatavad mahtuvuslikud membraanrõhumõõturid on kasutatavad ka rõhul alla  $10^{-1}$  Pa. On ka muid rõhumõõtureid, mida saab kasutada rõhkudel alla  $10^{-2}$  Pa.

**1.6.2.2. Mõõtmisprotseduur**

Enne mõõtmist tuleb kõik joonisel 2 näidatud seadme osad hoolikalt puhastada ja kuivatada.

Meetodi 2a kasutamisel täidetakse U-toru valitud vedelikuga, mis tuleb enne mõõtmisi kõrgemal temperatuuril degaseerida.

Testaine viiakse seadmesse, mis seejärel suletakse ja temperatuuri alandatakse degaseerimiseks vajaliku tasemeni. Temperatuur peab olema piisavalt madal kindlustamiseks, et õhk välja imetaks, kuid mitmekomponentide süsteemide koostis ei muutuks. Vajadusel võib tasakaalu saavutamist segamisega kiirendada.

Proovi võib allajahutada, nt vedela lämmastikuga (vältides hoolikalt õhu ja pumbavedeliku kondenseerumist) või etanooli ja kuiva jää seguga. Mõõtmistel madalatel temperatuuridel kasutatakse krüostaadiga ühendatud vedelikuvanni.

Õhu kõrvaldamiseks avatakse proovi kohal asuv klapp ja hoitakse proovi õhu eemaldamiseks mitu minutit alandatud rõhul. Seejärel klapp suletakse ja proovi temperatuuri langetatakse madalaima soovitud tasemeni. Vajadusel tuleb degaseerimist korrata.

Proovi soojendamisel selle aururõhk tõuseb. See mõjutab U-torus oleva vedeliku tasakaaluasendit. Selle kompenseerimiseks lastakse klapi kaudu seadmesse lämmastikku või õhku, kuni rõhunäituri vedelik on jälle nullasendis. Selleks vajaliku rõhu näitu saab lugeda toatemperatuuril olevalt täppismanomeetrilt. Leitud rõhk vastab aine aururõhule antud mõõtmistemperatuuril.

Meetod 2b on eelmisega analoogne, kuid aururõhku loetakse otse.

Aururõhu temperatuurisõltuvus määratakse sobivalt väikeste vahemike tagant (kokku ligikaudu 5–10 mõõtepunkti) kuni kõrgeima soovitud temperatuurini. Madalaid temperatuurinäite tuleb kontrollimiseks korrata.

Kui kordamisel saadud väärtused ei lange kokku tõusva temperatuuri kõveraga, võib see olla tingitud ühest järgnevatest asjaoludest:

1. proov sisaldab veel õhku (nt kõrge viskoossusega materjalid) või madala keemistemperatuuriga aineid, mis kuumutamisel eralduvad ja mida on võimalik edasise allajahutamise käigus vaakumiga eemaldada;
2. jahutustemperatuur ei ole piisavalt madal. Sellisel juhul tuleb jahutajana kasutada vedelat lämmastikku.

Nii juhtumi 1 kui 2 puhul tuleb mõõtmisi korrata;

3. ainega toimub uuritavas temperatuurivahemikus keemiline reaktsioon (nt lagunemine või polümerisatsioon).

### 1.6.3. Isoteniskoop

Meetodi täielik kirjeldus on toodud viites (7). Mõõteseadme tööpõhimõte on näidatud joonisel 3. Analoogselt punktis 1.6.2 kirjeldatud staatilise meetodiga sobib isoteniskoop nii tahkete ainete kui ka vedelike uurimiseks.

Vedelike puhul täidab aine ise abimanomeetri rolli. Isoteniskoopi viiakse vedelikukogus, mis on küllaldane nii reservuaari kui ka manomeetri lühikese haru täitmiseks. Isoteniskoop ühendatakse vaakumsüsteemiga ja vakumeeritakse ning täidetakse seejärel lämmastikuga. Süsteemi vakumeerimist ja puhastamist korratakse jääkhapniku eemaldamiseks kahel korral. Täidetud isoteniskoop paigutatakse horisontaalasendisse, nii et proov valgub õhukese kihina üle proovireservuaari ja manomeetri (U-osa). Süsteemi rõhku alandatakse 133 paskalini ja soojendatakse proovi kergelt selle keemahakkamiseni (lahustunud gaaside kõrvaldamiseks). Isoteniskoop paigutatakse seejärel sellisesse asendisse, et proov voolab tagasi reservuaari ja manomeetri lühikesse harru, nii et mõlemad on täielikult vedelikuga täidetud. Hoitakse degaseerimisele vastavat rõhku ja proovireservuaari väljavenitatud tippu kuumutatakse väikesel leegil, kuni proovi aurud küllaldaselt paisuvad ning suruvad osa proovist reservuaari ülaosast ja manomeetri harust isoteniskoobi manomeetri-ossa, nii et tekib auruga täidetud lämmastikuvaba ruum.

Isoteniskoop paigutatakse seejärel konstantse temperatuuriga vanni ja lämmastiku rõhk võrdsustatakse proovi rõhuga. Rõhkude tasakaalustumist saab jälgida isoteniskoobi manomeetri-osa põhjal. Tasakaaluolekus on lämmastiku rõhk võrdne aine aururõhuga.

Tahkete ainete puhul kasutatakse olenevalt rõhust ja temperatuurivahemikust punktis 1.6.2.1 loetletud rõhunäiturivedelikke. Degaseeritud rõhunäiturivedelik viiakse isoteniskoobi pikema haru kumerasse ossa. Uuritav tahkis viiakse reservuaari ja degaseeritakse kõrgemal temperatuuril. Seejärel kallutatakse isoteniskoopi nii, et rõhunäiturivedelik voolab U-torusse. Aururõhu temperatuurisõltuvus määratakse vastavalt punktile 1.6.2.

### 1.6.4. Efusioonmeetod: Aururõhukaalud

#### 1.6.4.1. Seade

Kirjanduses (1) on kirjeldatud mitmesuguseid seadmeid. Siinkirjeldatud seade illustreerib meetodi üldist tööprintsipi (joonis 4). Joonisel 4 on näha aparatuuri peamised osad, sh roostevabast terasest või klaasist kõrgvaakumanum, seadmed vaakumi tekitamiseks ja mõõtmiseks ning katseseadme sees olevad seadmed aururõhu määramiseks kaalude abil. Katseseadmel on järgmised sisemised osad:

- aurustusahi ääriku ja pöörleva sisselaskeavaga. Aurustusahi on silindriline anum, mis on valmistatud nt vasest või keemiliselt inertsest, hea soojusjuhtivusega sulamist. Kasutada võib ka vaskseintega klaasanumat. Ahju läbimõõt on ligikaudu 3–5 cm ja kõrgus 2–5 cm. Ahjul on aurujoa tarvis 1–3 erineva suurusega ava. Ahju kütab kas allolev kütteplaat või ümbritsev küttespiraal. Et takistada soojust kadumist alusplaati, kinnitatakse ahi alusplaadi külge madala soojusjuhtivusega metalli (nikli-hõbedasulami või kroomnikkelterase) abil, mitme avaga ahju kasutamisel nt pöörleva sisselaskeava külge kinnitatud nikli-hõbedasulamist toru abil. Sellise ehituse eeliseks on vaskvarda kasutamise võimalus. Viimane võimaldab kasutada väljastpoolt seadet jahutusvanni abil rakendatavat jahutust,

- kui vasest ahjukaanel on kolm erineva läbimõõduga ava, mis paiknevad üksteise suhtes 90° nurga all, võimaldab see hõlmata tööpiirkonna erinevaid aururõhuvahemikke (avad läbimõõdudega ligikaudu 0,30–4,50 mm). Suuri avasid kasutatakse madala aururõhu puhul ja vastupidi. Ahju pöörates on auruvoolu (ahjuava – kaitseekraan – kaalukauss) ette võimalik seada mis tahes soovitud ava või vahepealne asend, nii et molekulide voog lastakse või suunatakse ahjuavast kaalukausi poole. Aine temperatuuri mõõtmiseks paigaldatakse sobivasse punkti termopaar või takistustermomeeter,
- kaitseekraani kohal on ülitundlike mikrokaalude kaalukauss (vt allpool). Kaalukausi läbimõõt on ligikaudu 30 mm. Sobivaks materjaliks on näiteks kullatud alumiinium,
- kaalukaussi ümbritseb silindriline messingist või vasest külmkamber. Sõltuvalt kaalu tüübist on sel avad kaalukangi jaoks ja kaitseekraanis ava molekulide voo jaoks ning see peaks tagama auru täieliku kondenseerumise kaalukaussil. Soojuse hajutamise seadmest väljapoole tagab nt külmkambril külge ühendatud vaskvarras. Varras on viidud läbi alusplaadi ja nende vahel on soojusisolatsioon, nt kroomnikkelterasest toru. Varras on kastetud alusplaadi all olevasse vedelat lämmastikku sisaldavasse Dewari anumasse või juhitakse vedelat lämmastikku läbi varda. Külmkambril hoitakse nii ligikaudu –120 °C juures. Kaalukauss jahtub ainult kiirguse abil, mis on uuritava rõhuvahemiku jaoks küllaldane (jahutamist alustatakse ligikaudu 1 tund enne mõõtmise algust),
- kaalud asuvad külmkambril kohal. Sobivateks kaaludeks on näiteks ülitundlikud 2 õlaga mikrokaalud (8) või ülitundlik liikuvpooliga mõõteriist (vt OECD katsesuunist 104, välja antud 12.5.81),
- alusplaadis on ka elektrilised kontaktid termopaaride (või takistustermomeetrite) ja küttespiraalide jaoks,
- vaakum tekitatakse anumasse osalise vaakum- või kõrgvaakumpumba abil (vajalik on ligikaudu  $1-2 \times 10^{-3}$  Pa vaakum, mis saavutatakse pärast umbes 2 h pumpamist). Rõhku reguleeritakse sobiva ionisatsioon-vaakummeetri abil.

#### 1.6.4.2. Mõõtmisprotseduur

Nõu täidetakse testainega ja suletakse kaanega. Kaitseekraan ja külmkamber paigutatakse ahju kohale. Seade suletakse ja käivitatakse vaakumpumbad. Lõplik rõhk peaks enne mõõtmiste alustamist olema ligikaudu  $10^{-4}$  Pa. Külmkambril jahutamist alustatakse  $10^{-2}$  Pa juures.

Vajaliku vaakumi saavutamisel alustatakse kaliibrimisprotseduuriga, alustades kõige madalamast vajalikust temperatuurist. Sobiv ava ahjukaanes seatakse paika, auruvoog läbib otse ava kohal oleva kaitseekraani ja põrkub jahutatud kaalukaussiga. Kaalukauss peab olema piisavalt suur tagamaks, et sellega põrkub kogu kaitseekraanist läbi juhitud auruvoog. Auruvoo impulss toimib jõuna vastu kaalukaussi ning molekulid kondenseeruvad selle külmal pinnal.

Ühel ajal toimivad impulss ja kondenseerumine tekitavad registreeritava signaali. Signaalid annavad kahesugust teavet.

1. Siinkirjeldatud seadme abil määratakse aururõhk otse kaaludele antud impulsi põhjal (molaarmassi ei ole selleks vaja teada (2)). Näitude hindamisel tuleb arvesse võtta geomeetrilisi tegureid, nagu ahju ava ja molekulivoo kaldenurka.
2. Ühel ajal on võimalik mõõta kondensaadi mass ja arvutada selle põhjal aurustumiskiirus. Aururõhu võib Herti võrrandi (2) abil arvutada ka aurustumiskiiruse ja molaarmassi põhjal.

$$p = G \sqrt{\frac{2 \pi R T \times 10^3}{M}}$$

kus:

$G$  = aurustumiskiirus ( $\text{kg s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ )

$M$  = molaarmass ( $\text{g mol}^{-1}$ )

$T$  = temperatuur (K)

$R$  = universaalne gaasikonstant ( $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

$p$  = aururõhk (Pa)

Vajaliku vaakumi saavutamisel alustatakse mõõtmisprotseduuriga, alustades kõige madalamast soovitud mõõtmistemperatuurist.

Mõõtmisi jätkatakse, tõstes temperatuuri väikeste vahemike võrra, kuni jõutakse kõige kõrgema soovitud temperatuurini. Seejärel jahutatakse proov uuesti maha ja registreeritakse teine aururõhkõver. Kui teine seeria esimese seeria tulemusi ei kinnita, on võimalik, et aine mõõdetavas temperatuurivahemikus laguneb.

#### 1.6.5. Efusioonmeetod: massikao järgi

##### 1.6.5.1. Seade

Efusiooniseade koosneb järgmistest põhiosadest:

- mahutist, mis on termostateeritav ja vakumeeritav ning milles asuvad efusioonirakud,
- vaakummeetriga kõrgvaakumpumbast (nt difusioonpump või turbomolekulaarpump),
- vedelat lämmastikku või kuiva jääd kasutavast püüdurist.

Joonisel 5 on näitena esitatud elektrikütte ja 4 roostevabast terasest efusioonirakuga alumiiniumist vaakummahuti. Umbes 0,3 mm paksuses roostevabas terasfooliumis on 0,2–1,0 mm läbimõõduga efusioonidüüs ja see on keermestatud katte abil efusiooniraku külge kinnitatud.

##### 1.6.5.2. Mõõtmisprotseduur

Uuritav ja võrdlusaine viiakse kumbki oma efusioonirakku, düüsiga metallmembraan kinnitatakse keermestatud katte abil ja kõik rakud kaalutakse 0,1 mg täpsusega. Rakud paigutatakse termostateeritud seadmesse, mille rõhk viiakse seejärel vähem kui kümnendikuni eeldatavast rõhust. Kindlaksmääratud, 5–30tunniste ajavahemike järel lastakse õhk seadmesse ning määratakse kaalumise teel efusiooniraku massikadu.

Tagamaks, et lenduvad lisandid tulemusi ei mõjuta, kaalutakse rakk kindlate ajavahemike järel üle, kontrollides, et aurustumiskiirus jääb vähemalt kahe sellise ajavahemiku kestel konstantseks.

Aururõhk  $p$  efusioonirakus arvutatakse järgmise võrrandi abil:

$$p = \frac{m}{KA\tau} \sqrt{\frac{2\pi RT}{M}}$$

kus:

$p$  = aururõhk (Pa)

$m$  = aja  $t$  jooksul rakust eemalduv ainekogus (kg)

$\tau$  = aeg (s)

$A$  = avause pindala ( $\text{m}^2$ )

$K$  = parandustegur

$R$  = universaalne gaasikonstant ( $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

$T$  = temperatuur (K)

$M$  = molaarmass ( $\text{kg mol}^{-1}$ )

Parandustegur  $K$  sõltub silindrilise düüsi pikkuse ja raadiuse suhtest:

|       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Suhe: | 0,1   | 0,2   | 0,6   | 1,0   | 2,0   |
| $K$ : | 0,952 | 0,909 | 0,771 | 0,672 | 0,514 |

Eespool esitatud võrrandi võib kirjutada kujul:

$$p = E \frac{m}{t} \sqrt{\frac{T}{M}}$$

kus:  $E = \frac{1}{KA} \sqrt{2 \pi R}$ .

Efusiooniraku konstandi  $E$  võib määrata võrdlusainete (2,9) abil, kasutades järgmist võrrandit:

$$E = \frac{p(r) \cdot t}{m} \sqrt{\frac{M(r)}{T}}$$

kus:

$p(r)$  = võrdlusaine aururõhk (Pa)

$M(r)$  = võrdlusaine molaarmass ( $\text{kg mol}^{-1}$ )

#### 1.6.6. Gaasi küllastamise meetod

##### 1.6.6.1. Seade

Tüüpiline katseseade koosneb mitmest joonisel 6a näidatud komponendist ja seda kirjeldatakse allpool (1).

*Inertgaas:*

Kandegaas ei tohi testainega keemiliselt reageerida. Üldjuhul sobib kandegaasiks lämmastik, kuid mõningatel juhtudel on vaja kasutada muid gaase (10). Kasutatav gaas peab olema kuiv (vt joonist 6a, tähist 4: suhtelise niiskuse andur).

*Gaasivoolu reguleerimine:*

Konstantse, seadistatud gaasivoolu tagamiseks küllastuskolonnis on vaja sobivat gaasivoolu reguleerimise süsteemi.

*Aurupüüdurid:*

Valitakse olenevalt konkreetse proovi omadustest ja valitud analüüsimeetodist. Püüdurid peavad auru kinni püüdma kvantitatiivselt ja järgnevat analüüsi võimaldaval kujul. Mõnele katseainetele sobivad vedelikke, nagu hekseeni või etüleenglükooli sisaldavad püüdurid. Teistele katseainetele võivad sobida tahked absorbendid.

Aurude kinnipüüdmise ja järgneva analüüsi asemel võib teadaoleva koguse kandegaasiga transporditava materjalikoguse kvantitatiivselt määramiseks kasutada pidevaid analüüsitehnikaid, nt kromatograafiat. Samuti võib mõõta proovi massikadu.

*Soojusvaheti:*

Erinevatel temperatuuridel mõõtmisi tehes võib olla vaja lisada katseseadmele soojusvaheti.

*Küllastuskolonn:*

Testaine kantakse lahusest sobivale inertsele tugiainele. Kaetud tugiainega täidetakse küllastuskolonn, mille mõõtmed ja voolukiirus valitakse sellised, et oleks tagatud kandegaasi täielik küllastatus. Küllastuskolonn peab olema termostateeritud. Toatemperatuurist kõrgemal temperatuuril mõõtmisi tehes tuleks küllastuskoloni ja püüdurite vahelist piirkonda soojendada, et vältida testaine kondenseerumist.

Difusioonist tingitud massiülekanne vähendamiseks võib küllastuskolonne järgi ühendada kapillaartoru (joonis 6b).

#### 1.6.6.2. Mõõtmisprotseduur

*Küllastuskolonne ettevalmistamine:*

Sobivale tugiainekogusele lisatakse hästilenduvas lahustis lahustatud testaine. Lisatava testaine kogus peaks olema piisav, et tagada küllastumine kogu katse ajaks. Lahusti aurustatakse õhus või rootoraurutis ning hoolikalt segatud materjal viiakse küllastuskolonne. Peale proovi termostateerimist juhitakse läbi katseseadme kuiva lämmastikku.

*Mõõtmine:*

Püüdurid või pideva toimega detektor ühendatakse kolonne väljavooluga ja registreeritakse vastav aeg. Voolukiirus määratakse kindlaks nii katse alguses kui ka kindlate ajavahemike tagant katse käigus mulkulumõõtu abil (või pidevalt massivoolumõõtu abil).

Määrata tuleb ka rõhk küllastuskolonne väljavoolus. Selleks on järgmised võimalused:

- küllastuskolonne ja püüdurite vahele lisatakse rõhumõõtur (meetod ei pruugi sobilik olla, kuna suurendab surnud ruumala ja adsorbeerivat pinda) või
- eraldi katses määratakse rõhulangus konkreetsetes püüdurisüsteemis sõltuvalt voolukiirusest (ei pruugi sobida vedelikpüüdurite puhul).

Erinevate analüüsimeetodite jaoks vajaliku ainekoguse kogumiseks vajalik aeg määratakse eelnevalt eelkatsete põhjal või hinnanguliselt. Järgneva analüüsi jaoks testaine kogumise asemel võib kasutada kvantitatiivset pidevat analüüsimeetodit (näiteks kromatograafiat). Enne antud temperatuurile vastava aururõhu arvutamist tuleb teha eelkatset, et teha kindlaks kõrgeim voolukiirus, mille juures kandegaas aine aurudega täielikult küllastub. Küllastatuses võib kindel olla, kui kandegaas läbib küllastuskolonne nii aeglaselt, et madalama voolukiirusega ei kaasne kõrgemat väljaarvutatud aururõhku.

Kasutatav analüütiline meetod (nt gaaskromatograafia või gravimeetria) sõltub uuritava aine iseloomust.

Määratakse teadaoleva koguse kandegaasiga kaasa kandunud ainekogus.

#### 1.6.6.3. Aururõhu arvutamine

Aururõhk arvutatakse auru tihedusest  $W/V$  järgmise võrrandi abil:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

kus:

$p$  = aururõhk (Pa)

$W$  = aurustunud testaine mass (g)

$V$  = küllastatud gaasi ruumala ( $m^3$ )

$R$  = universaalne gaasikonstant ( $J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

$T$  = temperatuur (K)

$M$  = testaine molaarmass ( $g \text{ mol}^{-1}$ )

Mõõdetud mahtusid tuleb voolumõõtu ja termostateeritud küllastuskolonne rõhu- ja temperatuurierinevusi arvestades korrigeerida. Kui voolumõõtur asub aurupüüdurist allavoolu, võib osutada vajalikuks teha ka püüdurite aurustunud koostisainete arvestavad parandusi (1).

1.6.7. **Pöörlev rootor (8), (11), (13)**1.6.7.1. *Seade*

Pöörleva rootori meetodi rakendamiseks sobib joonisel 8 näidatud pöörleva rootoriga viskoossusmõõtur. Katseaparatuuri skeem on esitatud joonisel 7.

Mõõteseadet koosneb tavaliselt pöörlevast rootormõõtepeast, mis on paigutatud 0,1 °C täpsusega termostateeritud kambrisse. Proovinõu paigutatakse 0,01 °C täpsusega termostateeritud kambrisse ning aparatuuri kõiki ülejäänud osi hoitakse kondensatsiooni vältimiseks kõrgemal temperatuuril. Kõrgvaakumklappide abil on süsteemiga ühendatud kõrgvaakumpump.

Pöördrootormõõtepea koosneb väikesest torus paiknevast teraskuulist (läbimõõduga 4–5 mm). Kuuli hõljutab ja stabiliseerib magnetväli, mida tavaliselt tekitavad püsिमagnetid koos juhtmähistega.

Kuul pannakse mähiste tekitatud väljade vaheldumisega pöörlema. Kuuli pöörlemiskiirust saab mõõta selle alalist nõrka polaarse magnetumust mõõtvate andurmähistega.

1.6.7.2. *Mõõtmisprotseduur*

Kui kuul on jõudnud ettenähtud pöörlemiskiiruseni  $v(o)$  (tavaliselt umbes 400 pöörte sekundis), lõpetatakse edasine kiirendamine ja kuul hakkab gaasikeskkonnast tingitud hõõrdumise tõttu aeglustuma.

Mõõdetakse pöörlemiskiiruse languse sõltuvust ajast. Kuna magnetilisest hõljutamisest tingitud hõõrdumise või gaasidest tingitud hõõrdumisega võrreldes arvestamata jätta, leitakse gaasirõhk  $p$  järgmisest valemist:

$$p = \frac{\pi \bar{c} \rho}{\sigma 10 t} \times \ln \frac{v(t)}{v(o)}$$

kus:

$\bar{c}$  = gaasimolekulide keskmine kiirus

$r$  = kuuli raadius

$\rho$  = kuuli tihedus

$\sigma$  = tangentsiaalse impulsiülekanne tegur ( $\epsilon = 1$  kuuli ideaalse kerakujulise pinna korral)

$t$  = aeg

$v(t)$  = pöörlemiskiirus peale aja  $t$  möödumist

$v(o)$  = algne pöörlemiskiirus

Võrrandi võib kirjutada ka kujul:

$$p = \frac{\pi \bar{c} r \rho}{10 \sigma} \times \frac{t_n - t_{n-1}}{t_n \times t_{n-1}}$$

kus  $t_n$  ja  $t_{n-1}$  on  $N$  arvu pöörete tegemiseks kulunud ajavahemikud. Need ajavahemikud järgnevad üksteisele ja  $t_n > t_{n-1}$ .

Gaasimolekuli keskmist kiirust väljendab valem:

$$\bar{c} = \left( 8 \frac{RT}{\pi M} \right)^{\frac{1}{2}}$$

kus:

$T$  = temperatuur

$R$  = universaalne gaasikonstant

$M$  = molaarmass

**2. ANDMED**

Mis tahes eelmise meetodi abil leitud aururõhk tuleks määrata vähemalt kahel temperatuuril. Vahemikus 0–50 °C tuleks aururõhukõvera lineaarsuse kontrollimiseks määrata rõhku kolm või enam korda.

**3. ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- kasutatud meetodit,
- aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetaapi kirjeldust (kui seda on rakendatud),
- vähemalt kaht aururõhu ja temperatuuri väärtust, eelistatavalt vahemikus 0–50 °C,
- kõiki katseandmeid,
- $\log p$  vs.  $1/T$  kõverat,
- hinnangulist aururõhu väärtust 20 või 25 °C juures.

Üleminekute (oleku muutus, lagunemine) täheldamisel tuleks üles märkida järgmine teave:

- ülemineku iseloom,
- temperatuur, mille juures üleminek atmosfäärirõhul toimub,
- aururõhk 10 ja 20 °C allpool üleminekutemperatuuri ning 10 ja 20 °C ülevalpool seda temperatuuri (välja arvatud juhul, kui üleminek toimus tahkest olekust gaasilisse).

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

**4. VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 104, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. Ambrose, D. in B. Le Neindre, B. Vodar, (Eds.): Experimental Thermodynamics, Butterworths, London, 1975, Vol. II.
3. R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed. Chapter IX, Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I.
4. Knudsen, M. Ann. Phys. Lpz., 1909, vol. 29, 1979; 1911, vol. 34, 593.
5. NF T 20-048 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use –Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$  Pa – Static method.
6. NF T 20-047 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from  $10^{-3}$  to 1 Pa – Vapour pressure balance method.
7. ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure–temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.
8. G. Messer, P. Röhl, G. Grosse and W. Jitschin. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1987, vol. 5 (4), 2440.
9. Ambrose, D.; Lawrenson, I.J.; Sprake, C.H.S. J. Chem. Thermodynamics 1975, vol. 7, 1173.
10. B.F. Rordorf. Thermochimica Acta, 1985, vol. 85, 435.
11. G. Comsa, J.K. Fremerey and B. Lindenau. J. Vac. Sci. Technol., 1980, vol. 17 (2), 642.
12. G. Reich. J. Vac. Sci. Technol., 1982, vol. 20 (4), 1148.
13. J.K. Fremerey. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1985, vol. 3 (3), 1715.

## 1. liide

## Hindamismeetod

## SISSEJUHATUS

Aururõhu arvutuslikke väärtusi saab kasutada:

- sobiva katsemeetodi valikul,
- hinnangu või piirväärtuse saamiseks juhtudel, kus katsemeetodit tehnilistel põhjustel (sh väga madal aururõhk) rakendada ei saa,
- identifitseerimaks juhtumeid, kus on õigustatud eksperimentaalse määramise kõrvalejätmine, kuna aururõhk toatemperatuuril on eeldatavalt alla  $10^{-5}$  Pa.

## HINDAMISMEETOD

Vedlike ja tahkete ainete aururõhku on võimalik hinnata muudetud Watsoni korrelatsiooni (a) abil. Ainus selleks vajalik eksperimentaalselt määratav väärtus on keemistemperatuur normaalrõhul. Meetod on kohaldatav rõhuvahemikus  $10^5$  Pa– $10^{-5}$  Pa.

Meetodi üksikasjaline kirjeldus on toodud väljaandes "Handbook of Chemical Property Estimation Methods" (b).

## ARVUTUSKÄIK

Viite b kohaselt arvutatakse aururõhk järgmiselt:

$$\ln P_{vp} = \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b} \left[ 1 - \frac{\left( 3 - 2 \frac{T}{T_b} \right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m \left( 3 - 2 \frac{T}{T_b} \right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b} \right]$$

kus:

$T$  = huvi pakkuv temperatuur

$T_b$  = keemistemperatuur normaalrõhul

$P_{vp}$  = aururõhk temperatuuril  $T$

$\Delta H_{vb}$  = aurustumissoojus

$\Delta Z_b$  = kokkusurutavusaste (hinnanguliselt 0,97)

$m$  = empiiriline tegur, mis sõltub füüsikalisest olekust huvi pakkuval temperatuuril.

Edasi,

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F (8,75 + R \ln T_b)$$

kus  $K_F$  on aine polaarsust arvestav empiiriline tegur. Paljude ühendiklasside  $K_F$  tegurid on loetletud viites (b).

Sageli on saadaval andmed keemistemperatuuri kohta alandatud rõhul. Sellisel juhul arvutatakse aururõhk viite (b) kohaselt järgmiselt:

$$\ln P_{vp} = \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1} \left[ 1 - \left( 3 - 2 \frac{T}{T_1} \right)^m \frac{T_1}{T} - 2m \left( 3 - 2 \frac{T}{T_1} \right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1} \right]$$

kus  $T_1$  on keemistemperatuur alandatud rõhul  $P_1$ .

## ARUANNE

Hindamismeetodi kasutamisel peab aruandes sisalduma põhjalik dokumentatsioon arvutuste kohta.

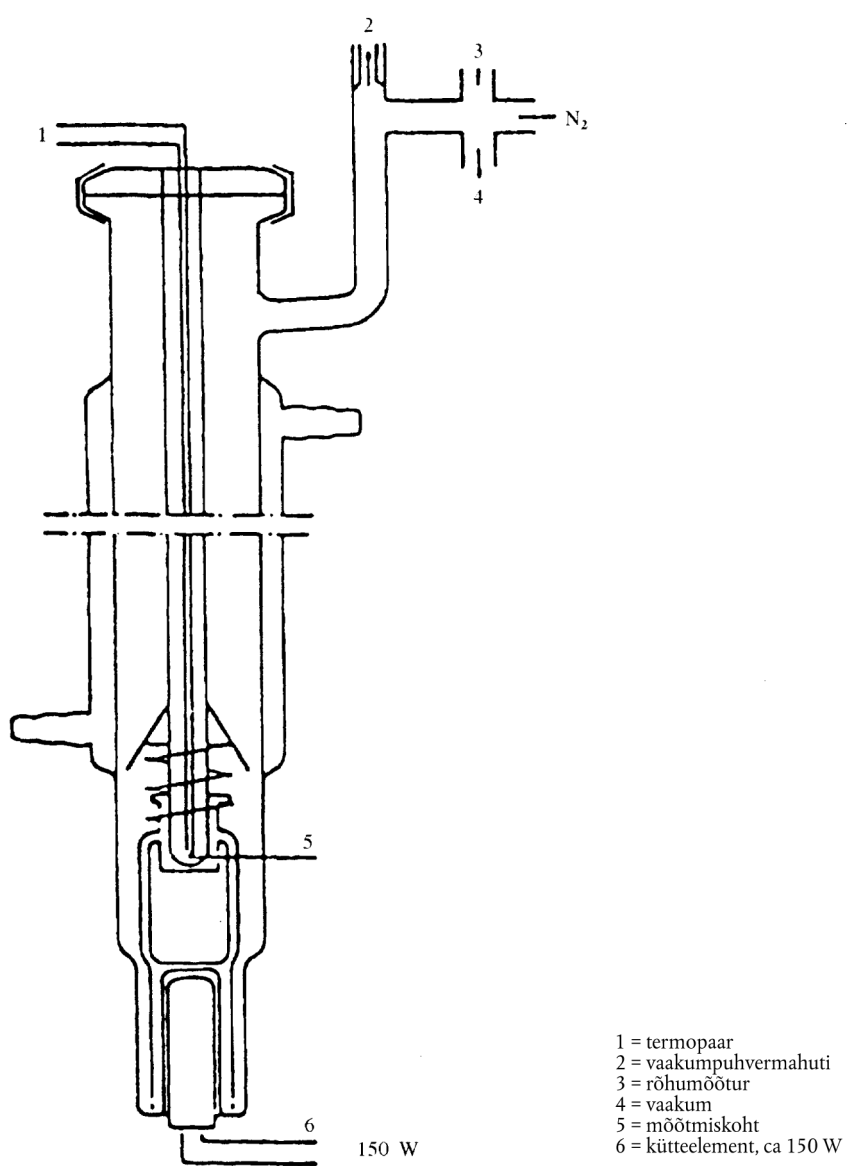
## KIRJANDUS

- a) K.M. Watson, Ind. Eng. Chem; 1943, vol. 35, 398.
- b) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt. Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, 1982.

## 2. liide

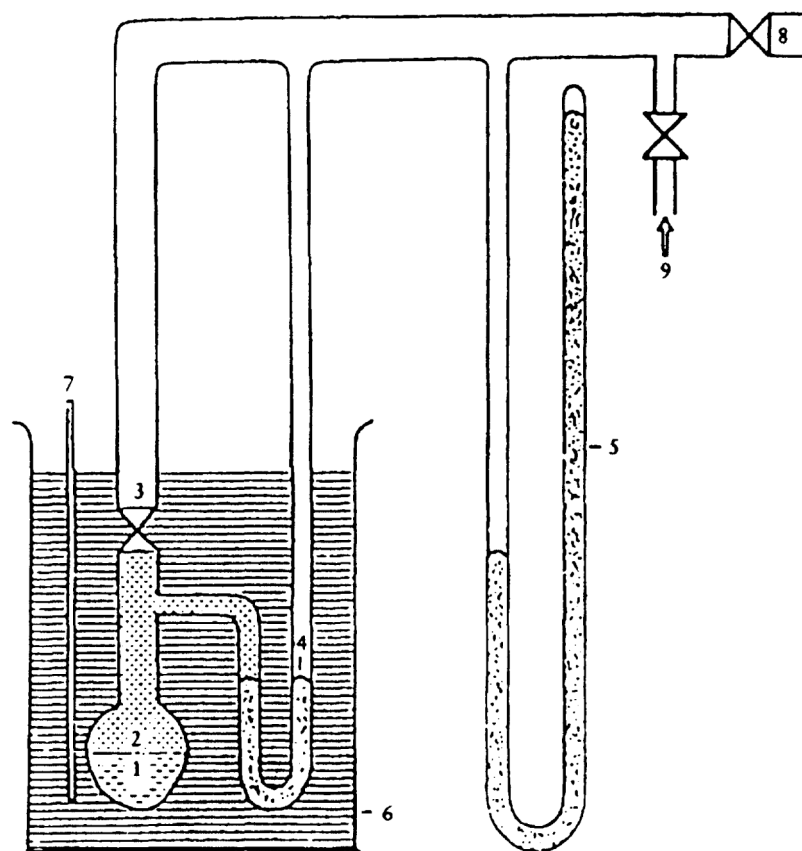
## Joonis 1

Seade aururõhukõvera määramiseks dünaamilise meetodi kohaselt



Joonis 2a

Seade aururõhukõvera määramiseks staatilise meetodi kohaselt (U-toru-manomeetri abil)

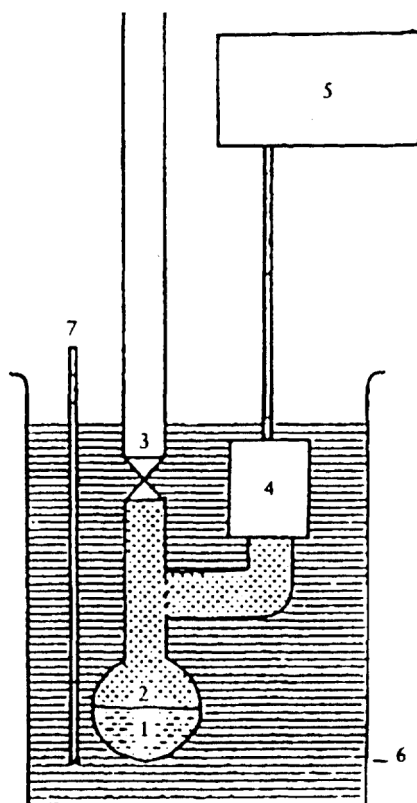


1. Testaine
2. Aurufaas
3. Kõrgvaakumklapp
4. U-toru (lisamanomeeter)
5. Manomeeter

6. Termostateerimisvann
7. Temperatuurimõõtur
8. Vaakumpump
9. Ventilatsioon

**Joonis 2b**

Seade aururõhukõvera määramiseks staatilise meetodi kohaselt (rõhunäituri abil)

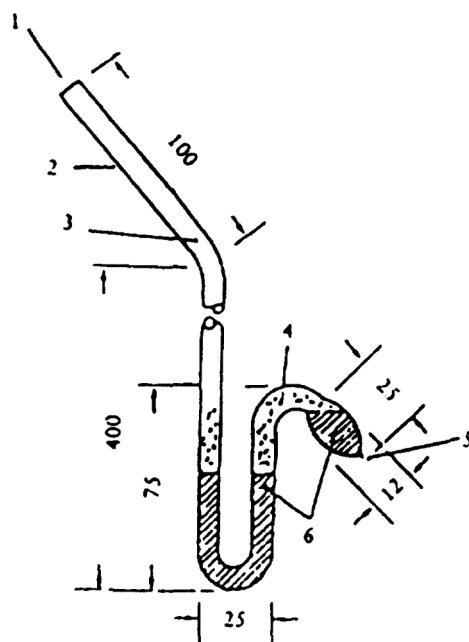


1. Testaine
2. Aurufaas
3. Kõrgvaakumklapp
4. Rõhumõõtur

5. Rõhunäitur
6. Termostateerimisvann
7. Temperatuurimõõtur

**Joonis 3**

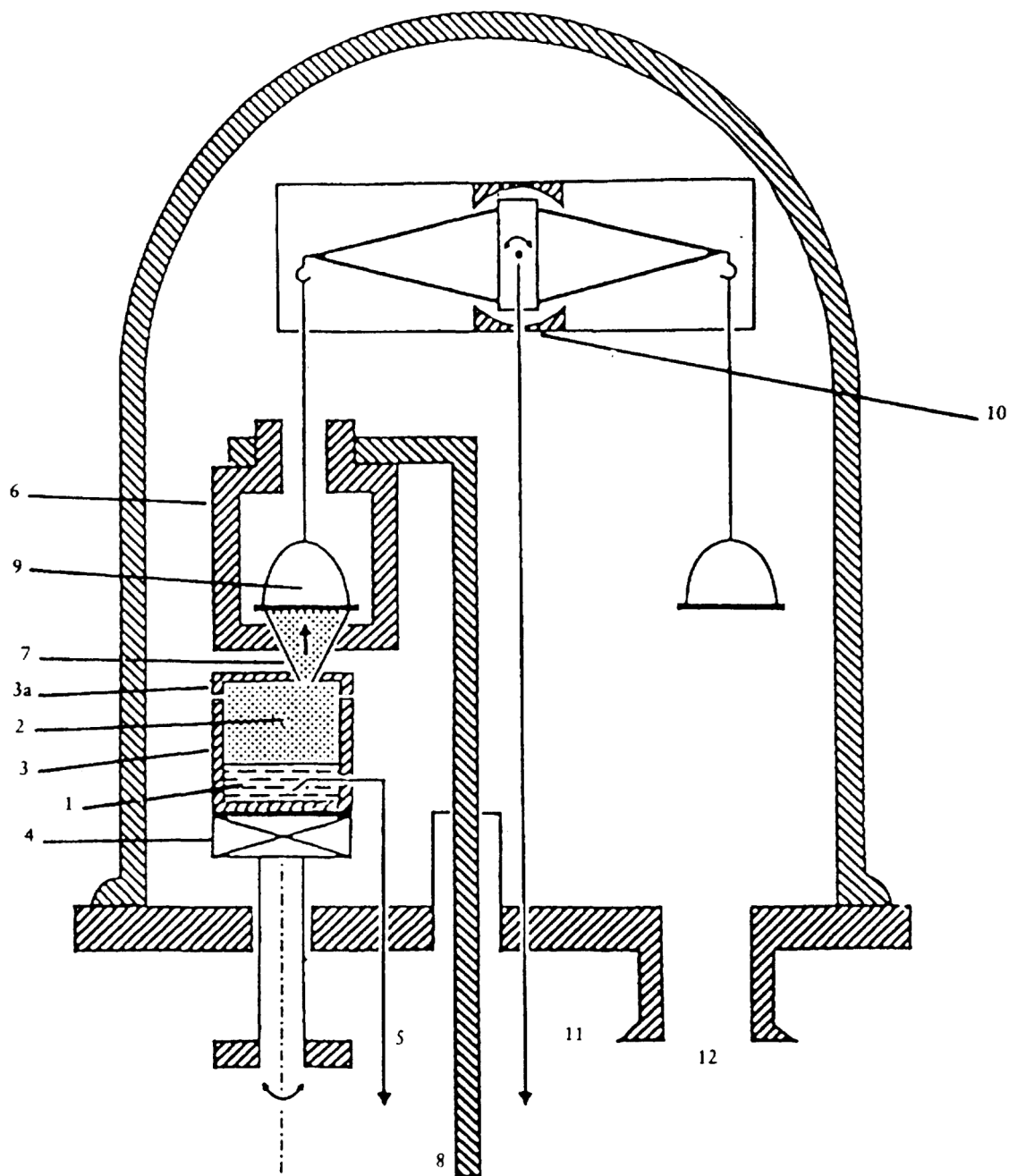
Isoteniskoop (vt viidet (7))



1. Ühendus rõhu reguleerimis- ja mõõtesüsteemiga
2. 8 mm välisdiameetriga toru
3. Kuiv lämmastik survestatud süsteemis
4. Proovi aur
5. Peenike ots
6. Vedelikuproov

Joonis 4

Seade aururõhukõvera määramiseks aururõhukaalude meetodi kohaselt

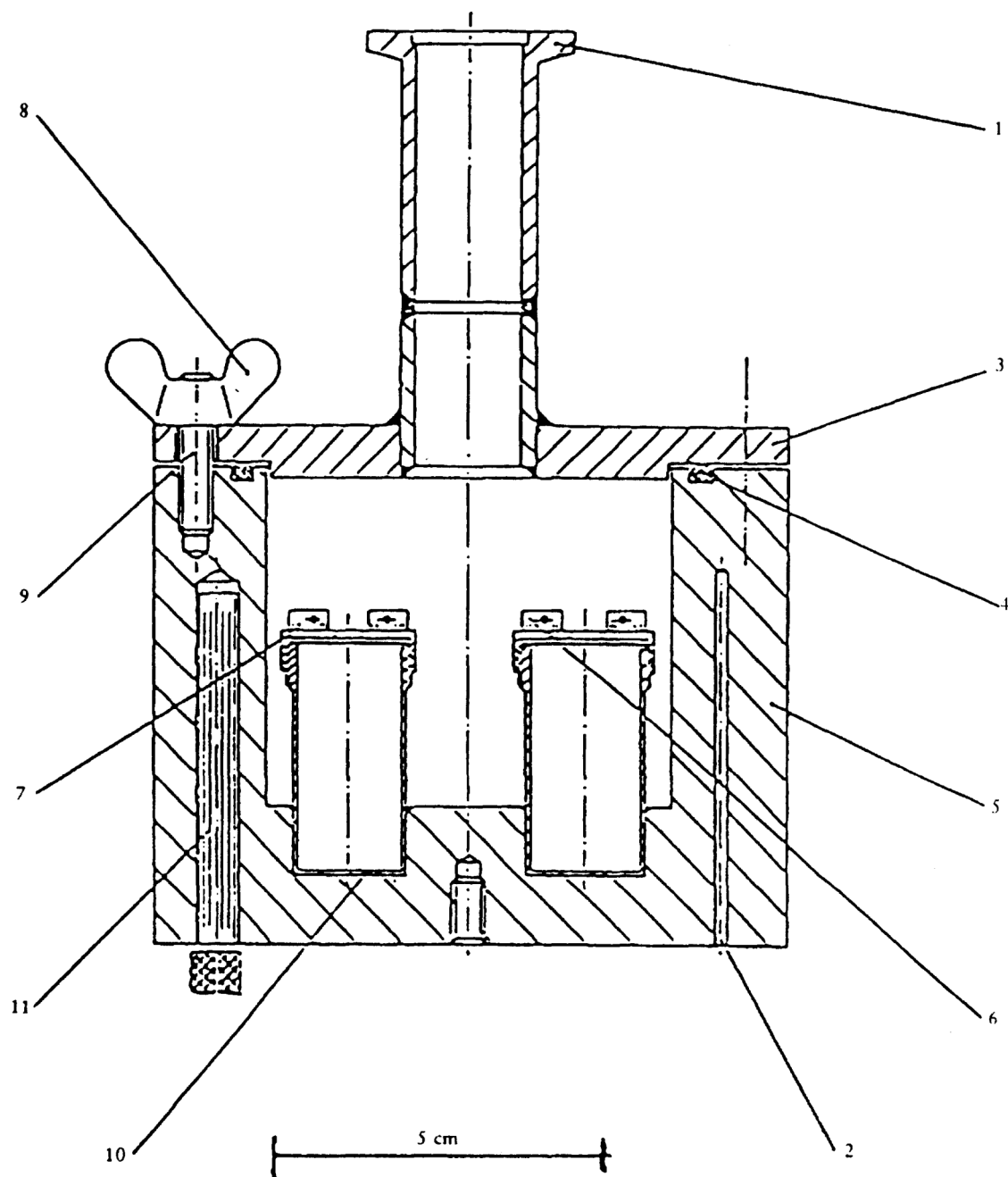


1. Testaine
2. Aurufaas koos auruvooga
3. Aurustusahi pöörleva sisselaskeava ja külmkambriga
- 3a. Avaga ahjukaas
4. Ahju küttesead (jahutusseade)
5. Proovi temperatuuri mõõtmine
6. Külmkamber

7. Kaitseekraan
8. Külmkambriga jahutusvarras
9. Kaalukauss
10. Mikrokaalud
11. Meerikusse
12. Kõrgvaakumpump

Joonis 5

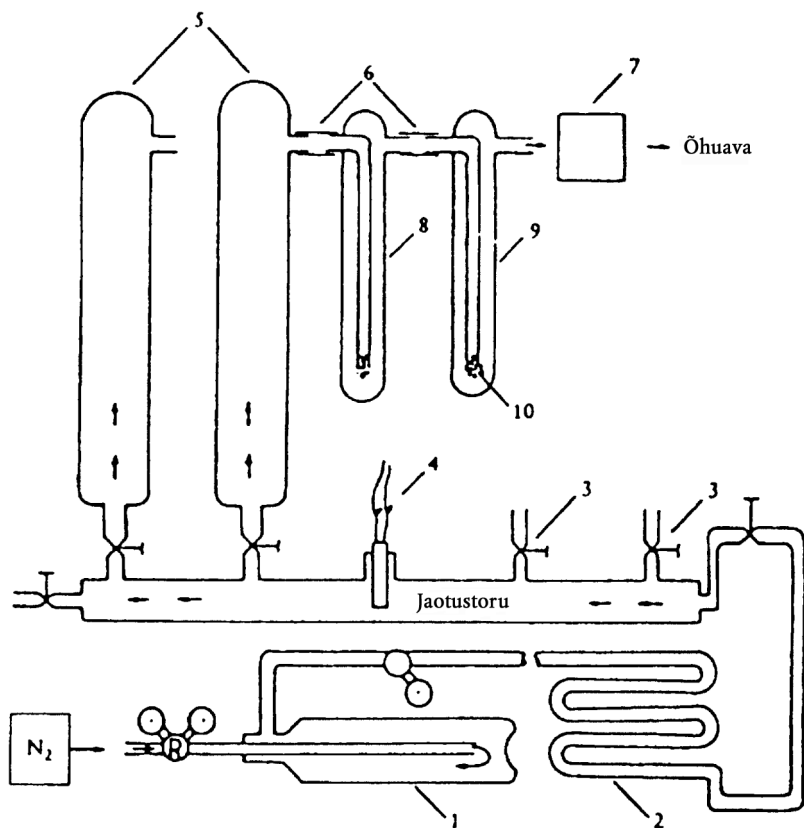
Näiteseade aurustumise uurimiseks madalal rõhul efusioonmeetodi abil, efusiooniraku mahuga 8 cm<sup>3</sup>



1. Ühendus vaakumiga
2. Pesad plaatina-takistustermomeetri või temperatuuri mõõtmis- ja reguleerimiseadme jaoks (2)
3. Vaakummahuti kaas
4. O-rõngas
5. Alumiiniumist vaakummahuti
6. Efusioonirakkude paigaldamise ja eemaldamise seade
7. Keermega kaas
8. Liblikmutrid (6)
9. Poldid (6)
10. Roostevabast terasest efusioonirakud
11. Padrunkuumutid (6)

Joonis 6a

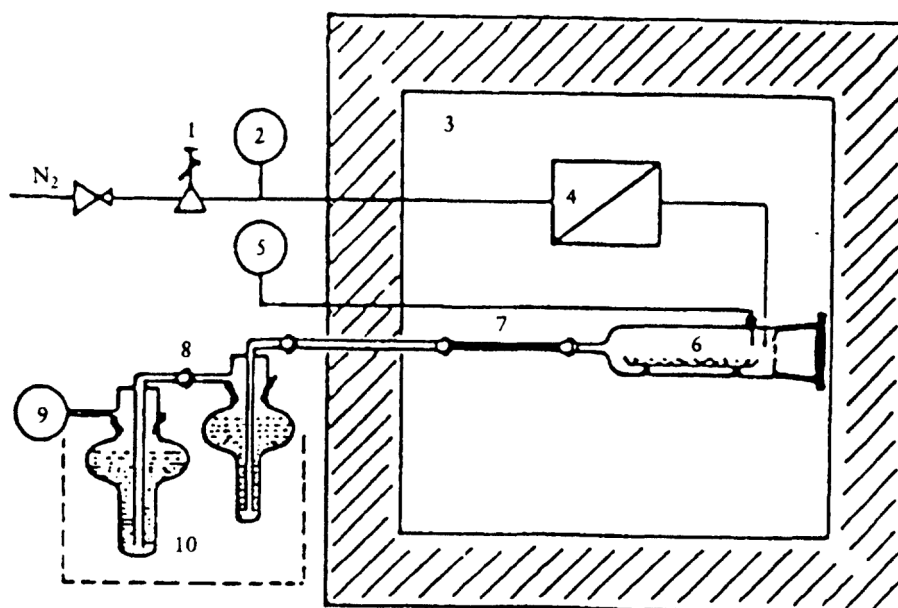
Näitlik läbivoolusüsteem aururõhu määramiseks gaasi küllastamise meetodi kohaselt



1. Vooluregulaator
2. Soojusvaheti
3. Nõelklapid
4. Suhtelise niiskuse andur
5. Küllastuskolonnid
6. PTFE liited
7. Voolumõõtur
8. Püüdur (absorber)
9. Õlipüüdur
10. Paagutatud mullitaja

Joonis 6b

Näitlik küllastuskolonne järgi ühendatud kapillaartoruga süsteem aururõhu määramiseks gaasi küllastamise meetodi kohaselt

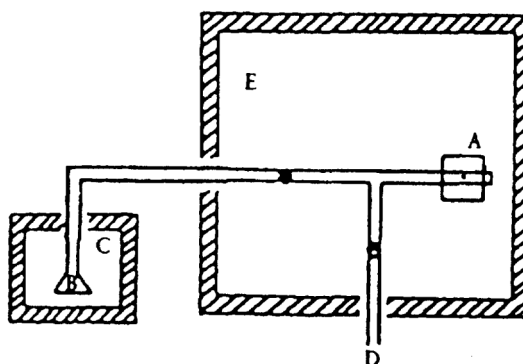


1. Termiline massivoolumõõtur
2. Manomeeter
3. Termostateeritud kamber
4. Kandegaasi termostateerimisspiraal
5. Termomeeter (Pt 100)

6. Gaasi küllastamise kamber
7. Kapillaartoru
8. Absorptsioonianumad
9. Gaasimõõtur
10. Külmpüüdur

Joonis 7

Näitlik katseaparatuur aururõhu uurimiseks pöörleva rootori meetodi kohaselt

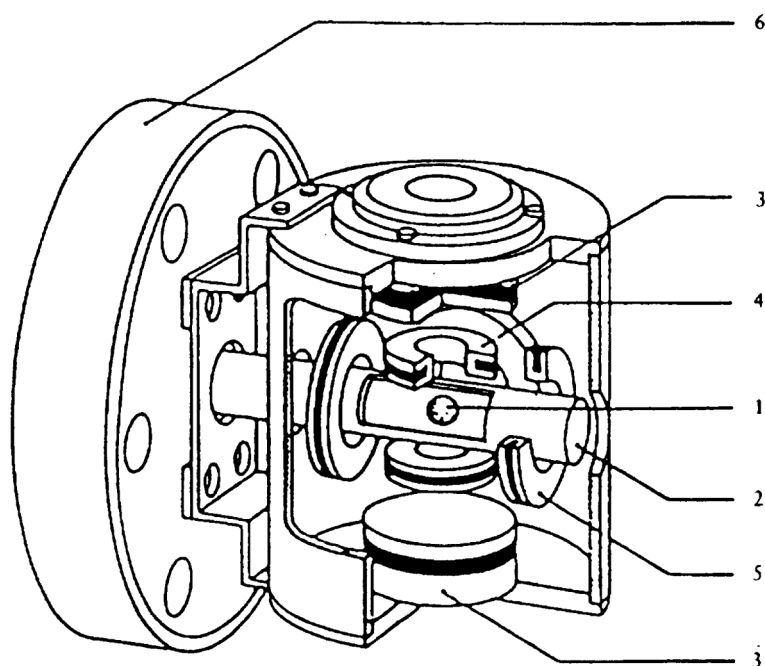


Aururõhu aparaat

- A. Pöörrootormõõdetepa
- B. Proovirakk
- C. Termostaat
- D. Ühendus vaakumseadmega (turbopump)
- E. Öhu termostaat

Joonis 8

Pöördrootormõõtepea näide



1. Kuul
2. Äärikliite 6 vakumeeritud torupikendus
3. Püsimagnetid (2)
4. Mähised püstsuunaliseks stabiliseerimiseks (2)
5. Ajam-mähised (4)
6. Äärikliide

#### A.5. PINDPINEVUS

##### 1. MEETOD

Kirjeldatud meetodid põhinevad OECD katsesuunis (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viites (2).

##### 1.1. SISSEJUHATUS

Kirjeldatud meetodid on ette nähtud vesilahuste pindpinevuse mõõtmiseks.

Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine lahustuvust vees, selle struktuuri, hüdrolüüsuvust ja mitsellitekke lävikontsentratsiooni.

Järgmised meetodid sobivad kohaldamiseks enamikule keemilistele ainetele, olenemata nende puhtusastmest.

Pindpinevust saab mõõta rõnga lahtirebimise meetodi abil ainult vesilahuste puhul, mille dünaamiline viskoossus on alla ca 200 mPa s.

##### 1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Pindpinevusena käsitletakse pinna vabaentalpiat pinnaühiku kohta.

Pindpinevust väljendatakse järgmistes ühikutes:

N/m (SI-ühik) või

mN/m (SI alamühik)

1 N/m = 10<sup>3</sup> dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm (aegunud CGS-süsteemis)

### 1.3. VÕRDUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Viidetes (1) ja (3) on ära toodud laia pindpinevuste vahemikku hõlmavad võrdlusained.

### 1.4. PÕHIMÕTE

Meetodite kohaselt mõõdetakse maksimaalne jõud, mida on vaja püstsuunas rakendada mõõtenõus oleva uuritava vedeliku pinnaga kokkupuutes olevale loogale või rõngale selle lahtirebimiseks pinnalt või pinnaga kokkupuutes oleva plaadi servale tekkinud kile ülestõmbamiseks.

Aineid, mille lahustuvus vees on vähemalt 1 mg/l, analüüsitakse vesilahuses ainult ühel kontsentratsioonil.

### 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Nende meetodite täpsus ületab tõenäolised vajadused keskkonnoahtlikkuse hindamisel.

### 1.6. MEETODITE KIRJELDUS

Valmistatakse aine lahus destilleeritud vees. Lahuse kontsentratsioon peaks olema 90 % aine küllastuskontsentratsioonist vees; kui kontsentratsioon ületab 1 g/l, kasutatakse katses kontsentratsiooni 1 g/l. Aineid, mille lahustuvus vees on alla 1 mg/l, pole vaja testida.

#### 1.6.1. **Plaadimeetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

#### 1.6.2. **Loogameetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

#### 1.6.3. **Rõngameetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

#### 1.6.4. **OECD ühtlustatud rõngameetod**

##### 1.6.4.1. *Seade*

Mõõtmiseks sobivad müügilolevad tensiomeetrid. Need koosnevad järgmistest osadest:

— liikuvast proovialusest,

— dünamomeetrist,

- mõõtekehast (rõngast),
- mõõtmisnõust.

#### 1.6.4.1.1. Liikuv proovialus

Liikuvale proovialusele asetatakse uuritavat vedelikku sisaldav termostateeritud mõõtmisnõu. Alus kinnitatakse koos dünamomeetriga statiivile.

#### 1.6.4.1.2. Dünamomeeter

Dünamomeeter (vt joonist) paikneb proovialuse kohal. Viga jõu mõõtmisel ei tohi ületada  $\pm 10^{-6}$  N, mis vastab veapiirile  $\pm 0,1$  mg massi mõõtmisel. Enamikul juhtudel on müügilolevate tensiomeetrite mõõteskaala kalibreeritud mN/m skaalas, nii et pindpinevuse saab skaalalt lugeda otse millinjuutonites meetri kohta täpsusega 0,1 mN/m.

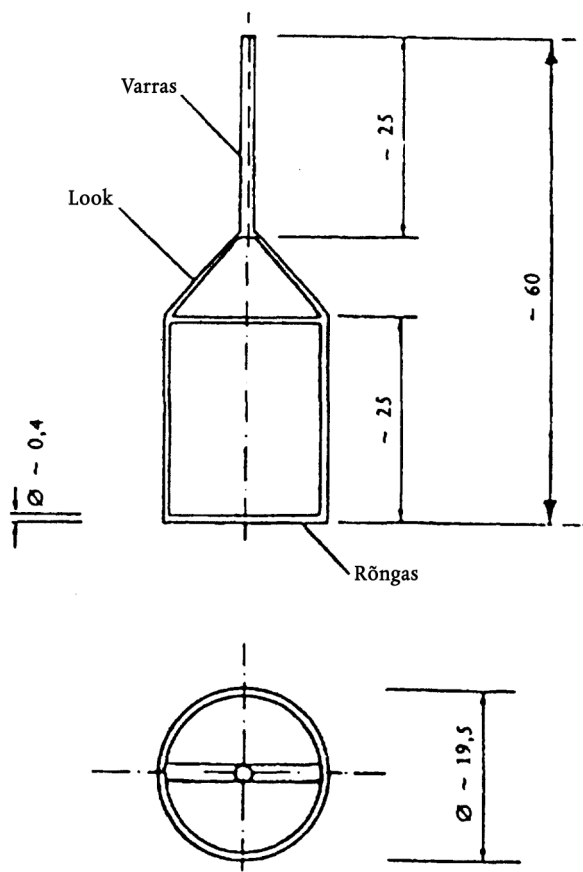
#### 1.6.4.1.3. Mõõtekeha (rõngas)

Rõngas on tavaliselt valmistatud 0,4 mm jämedusest plaatina-iriidiumtraadist ja selle keskmine ümbermõõt on 60 mm. Rõngas ripub horisontaalselt metallvarda ja looga otsas, mille kaudu ta on ühendatud dünamomeetriga (vt joonist).

### Joonis

#### Mõõtekeha

(Kõik mõõdud on väljendatud millimeetrites)



## 1.6.4.1.4. Mõõtmisnõu

Katselahust sisaldava mõõtmisnõuna kasutatakse termostateeritud klaasnõud. Nõu ehitus peab olema selline, et katselahuse ja selle kohal oleva gaasifaasi temperatuurid jäävad katse kestel konstantseks ning proov ei aurustu. Mõõtmisnõuks sobivad silindrilised klaasnõud sisediameetriga vähemalt 45 mm.

## 1.6.4.2. Seadme ettevalmistamine

## 1.6.4.2.1. Puhastamine

Klaasnõud puhastatakse hoolikalt. Vajadusel pestakse neid kuuma kroomseguga ja seejärel kontsentreeritud fosforhappega (83–98 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (massi järgi)), loputatakse põhjalikult kraaniveega, pestakse lõpuks bidestilleeritud veega neutraalse reaktsiooni saavutamiseni ja seejärel kuivatatakse või loputatakse osaga mõõdetavast vedelikuproovist.

Rõngast loputatakse kõigepealt põhjalikult veega, et eemaldada vees lahustuvad ained, kastetakse seejärel lühikeseks ajaks kroomsegusse, pestakse siis bidestilleeritud veega neutraalse reaktsiooni saavutamiseni ja kuumutatakse lõpuks lühikest aega metanoolileegi kohal.

Märkus:

Kroomsegus ja fosforhappes mittelahustuvad saasteained, nt silikoonid, eemaldatakse sobiva orgaanilise lahustiga.

## 1.6.4.2.2. Seadme kaliibrimine

Seadme kontrollimiseks kontrollitakse nullpunkti ja reguleeritakse seda nii, et seade võimaldab täpset mõõtmist mN/m skaalas.

Kinnitus:

Seade looditakse tensiomeetri aluse reguleerimiskruvide abil (näiteks alusel oleva loodinäidiku järgi).

Nullpunkti reguleerimine:

Pärast rõnga kinnitamist aparaadile ja enne selle vedelikku kastmist reguleeritakse tensiomeetri näit nulli ja kontrollitakse, et rõngas oleks vedeliku pinnaga paralleelne. Selleks võib vedelikupinda kasutada peeglina.

Kaliibrimised:

Seadme kaliibrimiseks võib kasutada üht kahest järgmisest meetodist:

- a) raskuste abil: kasutatakse rõngale asetatavaid kindla massiga (0,1–1,0 g) raskusi. Kaliibrimistegur  $\Phi_a$ , millega kõiki seadme näitusid tuleb korrutada, leitakse võrrandi 1 abil:

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \quad (1)$$

kus:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

$m$  = raskuse mass (g)

$g$  = raskuskiirendus (merepinnal 981 cm s<sup>-2</sup>)

$b$  = rõnga keskmine ümbermõõt (cm)

$\sigma_a$  = tensiomeetri näit peale raskuse asetamist rõngale (mN/m);

- b) vee abil: kasutatakse puhast vett, mille pindpinevus on näiteks 23 °C juures 72,3 mN/m. Selle meetodi kohaselt toimub kaliibrimine kiiremini kui massi abil, kuid alati eksisteerib oht, et vee pindpinevust mõjutavad pindaktiivsed lisandid.

Kaliibrimistegur  $\Phi_b$ , millega kõiki seadme näitusid tuleb korrutada, leitakse võrrandi 2 abil:

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \quad (2)$$

kus:

$\sigma_o$  = vee pindpinevus (mN/m) kirjanduse andmetel

$\sigma_g$  = mõõtmisel leitud vee pindpinevus (mN/m)

mõlemad samal temperatuuril.

#### 1.6.4.3. Proovide ettevalmistamine

Uuritavatest ainetest valmistatakse vajaliku kontsentratsiooniga vesilahused, kuhu ei tohi jääda lahustumatut jääki.

Lahust hoitakse püsival temperatuuril ( $\pm 0,5$  °C). Kuna mõõtmisnõus oleva lahuse pindpinevus muutub aja jooksul, tehakse erinevatel aegadel mitu mõõtmist ja koostatakse kõver pindpinevuse muutumise kohta ajas. Kui pindpinevus enam ei muutu, on saavutatud tasakaal.

Mõõtmistulemusi mõjutavad tolmu ja gaasilised lisandid. Seetõttu tuleb katsed teha suletud kambris.

#### 1.6.5. Katsetingimused

Mõõtmised tehakse ligikaudu 20 °C juures ja temperatuuri reguleeritakse  $\pm 0,5$  °C täpsusega.

#### 1.6.6. Katse tegemine

Mõõdetavad lahused viiakse põhjalikult puhastatud mõõtmisnõusse, vältides hoolikalt vahutamist, ja mõõtmisnõu paigutatakse katseseadmesse proovialusele. Proovialust mõõtmisnõuga tõstetakse, kuni rõngas on allpool mõõdetava lahuse pinda. Seejärel lastakse proovialust järk-järgult ühtlaselt allapoole (kiirusega ligikaudu 0,5 cm/min), eemaldades rõngast pinnast kuni maksimaalse tõmbejõu saavutamiseni. Rõnga külge kinnitunud vedelikukiht ei tohi sellest eralduda. Peale mõõtmiste lõppu viiakse rõngas jälle allapoole vedeliku pinda ja korratakse mõõtmisi, kuni jõutakse konstantsete pindpinevuse väärtusteni. Iga mõõtmise juures registreeritakse lahuse mõõtmisnõusse viimisest möödunud aeg. Näidud võetakse maksimaalse rõnga vedelikupinnast lahtirebimiseks vajaliku jõu juures.

#### 2. ANDMED

Pindpinevuse arvutamiseks tuleb seadme näit (mN/m) korrutada kaliibrimisteguriga  $\Phi_a$  või  $\Phi_b$  (sõltuvalt kasutatud kaliibrimismeetodist). Nii saadakse väärtus, mis on ainult ligikaudne ja vajab seega korrigeerimist.

Harkins ja Jordan (4) on empiirilisel kindlaks määranud rõngameetodi abil määratud pindpinevuse väärtuste parandustegurid, mis sõltuvad rõnga mõõtmest, vedeliku tihedusest ja pindpinevusest.

Kuna Harkinsi ja Jordani tabelitest iga mõõtmise jaoks eraldi parandustegurite leidmine vesilahuste pindpinevuse arvutamiseks on väga töömahukas, võib kasutada lihtsustatud meetodit, kus parandatud pindpinevuse väärtused loetakse otse tabelist. (Tabeliväärtuste vahele jäävate näitude puhul kasutatakse interpolatsiooni).

**TABEL: MÕÕDETUD PINDPINEVUSTE PARANDUSED**

Ainult vesilahuste jaoks,  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$

$R = 9,55 \text{ mm}$  (rõnga keskmine raadius)

$r = 0,185 \text{ mm}$  (rõngatraadi raadius)

| Katseliselt mõõdetud väärtus (mN/m) | Parandatud väärtus (mN/m)                |                                     |
|-------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------|
|                                     | Kaliibrimine raskustega (vt 1.6.4.2.2a)) | Kaliibrimine veega (vt 1.6.4.2.2b)) |
| 20                                  | 16,9                                     | 18,1                                |
| 22                                  | 18,7                                     | 20,1                                |
| 24                                  | 20,6                                     | 22,1                                |
| 26                                  | 22,4                                     | 24,1                                |
| 28                                  | 24,3                                     | 26,1                                |
| 30                                  | 26,2                                     | 28,1                                |
| 32                                  | 28,1                                     | 30,1                                |
| 34                                  | 29,9                                     | 32,1                                |
| 36                                  | 31,8                                     | 34,1                                |
| 38                                  | 33,7                                     | 36,1                                |
| 40                                  | 35,6                                     | 38,2                                |
| 42                                  | 37,6                                     | 40,3                                |
| 44                                  | 39,5                                     | 42,3                                |
| 46                                  | 41,4                                     | 44,4                                |
| 48                                  | 43,4                                     | 46,5                                |
| 50                                  | 45,3                                     | 48,6                                |
| 52                                  | 47,3                                     | 50,7                                |
| 54                                  | 49,3                                     | 52,8                                |
| 56                                  | 51,2                                     | 54,9                                |
| 58                                  | 53,2                                     | 57,0                                |
| 60                                  | 55,2                                     | 59,1                                |
| 62                                  | 57,2                                     | 61,3                                |
| 64                                  | 59,2                                     | 63,4                                |
| 66                                  | 61,2                                     | 65,5                                |
| 68                                  | 63,2                                     | 67,7                                |
| 70                                  | 65,2                                     | 69,9                                |
| 72                                  | 67,2                                     | 72,0                                |
| 74                                  | 69,2                                     | —                                   |
| 76                                  | 71,2                                     | —                                   |
| 78                                  | 73,2                                     | —                                   |

Tabel on koostatud Harkins-Jordani paranduste põhjal. Tabel on sarnane DIN standardi (DIN 53914) tabeliga vee ja vesilahuste jaoks (tihedus  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ ) ja kehtib müügil olevate rõngaste kohta mõõtmisega  $R = 9,55 \text{ mm}$  (rõnga keskmine raadius) ja  $r = 0,185 \text{ mm}$  (rõngatraadi raadius). Tabelis on esitatud peale raskuste või veega kaliibrimist mõõdetud pindpinevuse väärtuste ka parandatud väärtused.

Pindpinevuse võib arvutada ka ilma eelneva kaliibrimiseta, kasutades järgmist valemit:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4 \pi R}$$

kus:

$F$  = dünamomeetriga kile katkemisel mõõdetud jõud

$R$  = rõnga raadius

$f$  = parandustegur (1)

**3. ARUANDLUS****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- kasutatud meetodit,
- kasutatud vee või lahuse iseloomu,
- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid),
- mõõtmistulemusi: pindpinevuse väärtused, sh kõik üksiktulemused ja nende aritmeetiline keskmine ning parandatud keskmine (mis arvestab nii seadmetest tulenevat parandustegurit kui ka parandustabelit),
- lahuse kontsentratsiooni,
- katsetemperatuuri,
- lahuse vanust, st aega lahuse valmistamise ja mõõtmise vahel,
- pindpinevuse sõltuvust lahuse mõõtmisnõusse viimisest möödunud ajast,
- registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

**3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE**

Arvestades, et destilleeritud vee pindpinevus on 20 °C juures 72,75 mN/m, tuleks ained, mille pindpinevus käesoleva meetodi abil mõõtes on alla 60 mN/m, lugeda pindaktiivseteks aineteks.

**4. VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.
3. Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.
4. Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

## A.6. LAHUSTUVUS VEES

### 1. MEETOD

Kirjelatud meetodid põhinevad OECD katsesuunis (1).

#### 1.1. SISSEJUHATUS

Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine struktuuri, aururõhku, dissotsiatsioonikonstanti ja hüdrolüüsuvuse pH-sõltuvust.

Ükski meetod ei hõlma kogu vees lahustuvuste vahemikku.

Kaks allpool kirjeldatud meetodit hõlmavad kogu lahustuvuste vahemiku, kuid ei ole kohaldatavad lenduvatele ainetele:

- üht neist, mis on kohaldatav madala lahustuvusega ( $< 10^{-2}$  g/l) puhastele, vees stabiilsetele ainetele, nimetatakse "kolonn-elueerimismeetodiks",
- teist, mis on kohaldatav kõrgema lahustuvusega ( $> 10^{-2}$  g/l) puhastele, vees stabiilsetele ainetele, nimetatakse "kolvimeetodiks".

Testaine lahustuvus vees võib lisandite mõjul oluliselt muutuda.

#### 1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Aine lahustuvus vees on selle küllastuskontsentratsioon vees antud temperatuuril. Lahustuvust vees väljendatakse massiühikutes lahuse ruumala kohta. Lahustuvuse SI-ühik on  $\text{kg/m}^3$  (kasutada võib ka gramme liitris).

#### 1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

#### 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Küllastuskontsentratsiooni saavutamiseks vajalik ligikaudne proovi kogus ja aeg tuleks varem kindlaks teha lihtsas eelkatses.

##### 1.4.1. Kolonn-elueerimismeetod

Meetodi aluseks on testaine veega elueerimine mikrokolonnist, mis on täidetud testaine liiaga kaetud inertse tugiaine, nagu klaashelmeste või liivaga. Lahustuvus vees määratakse siis, kui eluaadi massikontsentratsioon on konstantne. Kontsentratsioon vs. aeg kõveral on see nähtav platoona.

##### 1.4.2. Kolvimeetod

Selle meetodi kohaselt lahustatakse aine (tahked ained peavad olema peenestatud) vees katsetemperatuurist mõnevõrra kõrgemal temperatuuril. Küllastumise saabumisel segu jahutatakse ja hoitakse katsetemperatuuril, segades seda tasakaalu saavutamiseks piisava aja jooksul. Mõõtmist võib alustada ka kohe katsetemperatuuril, kui sobivate proovide põhjal on teada, et küllastustasakaal on saavutatud. Järgnevalt määratakse sobiva analüüsimeetodi abil aine massikontsentratsioon vesilahuses, mis ei tohi sisaldada lahustumata osakesi.

## 1.5. KVALITEEDINÕUDED

1.5.1. **Korratavus**

Kolonn-elueerimismeetodil võib saavutada korratavuse < 30 %, kolvimeetodil peaks see olema < 15 %.

1.5.2. **Tundlikkus**

Sõltub analüüsimeetodist, kuid määrata saab massikontsentratsioone kuni  $10^{-6}$  g/l.

## 1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Katsetingimused**

Eelistatav katsetemperatuur on  $20 \pm 0,5$  °C. Kui eeldatakse võimalikku lahustuvuse sõltuvust temperatuurist (> 3 °C kohta), tuleks mõõtmised teha lisaks veel kahel temperatuuril, vähemalt 10 °C algselt valitud temperatuurist kõrgemal ja madalamal. Temperatuuri tuleks sellisel juhul reguleerida täpsusega  $\pm 0,1$  °C. Valitud temperatuuri tuleks aparatuuri kõigis olulistest osades konstantsena hoida.

1.6.2. **Eelkatse**

Umbes 0,1 g proovile (tahked ained peavad olema peenestatud) 10 ml klaaskorgiga silindris lisatakse toatemperatuuril järjest suuremad kogused destilleeritud vett vastavalt alltoodud tabelile:

| 0,1 g lahustuv "x" ml vees  | 0,1     | 0,5         | 1       | 2      | 10    | 100  | > 100 |
|-----------------------------|---------|-------------|---------|--------|-------|------|-------|
| Ligikaudne lahustuvus (g/l) | > 1 000 | 1 000–2 000 | 200–100 | 100–50 | 50–10 | 10–1 | < 1   |

Peale iga näidatud veekoguse lisamist loksutatakse segu tugevasti 10 minutit ja kontrollitakse visuaalselt lahustumata proovijääkide olemasolu. Kui proov või osa sellest pärast 10 ml vee lisamist ei lahustu, tuleb katset 100 ml mõõtesilindris suuremate veekogustega korrata. Madalamatel lahustuvustel võib aine lahustumiseks vajalik aeg olla oluliselt pikem (aega tuleks anda vähemalt 24 h). Ligikaudne lahustuvus on tabelis esitatud selle lisatud vee mahu all, mille juures proov täielikult lahustub. Kui aine ikka lahustumatu näib, tuleks lahustumiseks jätta rohkem kui 24 h (maksimaalselt 96 h) või segu edasi lahjendada, et veenduda, kas tuleks kasutada kolonn-elueerimis- või kolvimeetodit.

1.6.3. **Kolonn-elueerimismeetod**1.6.3.1. *Tugiaine, lahusti ja eluent*

Kolonn-elueerimismeetodi puhul kasutatav tugiaine peab olema inertne. Materjalidest on võimalik kasutada klaashelmeid ja liiva. Tugiaine katmisel testainega tuleks kasutada sobivat analüüsipuhast lahustit. Eluendina tuleks kasutada vett, mis on bidestilleeritud klaas- või kvartsseadmes.

Märkus:

Otse orgaanilisest ioonvahetist pärit vett kasutada ei tohi.

1.6.3.2. *Tugiaine katmine*

Kaalutakse ligikaudu 600 mg tugiainet ja viiakse see 50 ml ümarkolbi.

Sobiv kaalutis testainet lahustatakse valitud lahustis. Sobiv kogus saadud lahust lisatakse tugiainele. Lahusti tuleb täielikult aurustada, nt rootoraurutis, vastasel juhul tugiaine veega küllastumist ei saavutata jaotumiseffektide tõttu tugiaine pinnal.

Tugiaine katmisest võib tekkida probleeme (vigased tulemused) juhul, kui testaine ladestub tugiaine pinnale õli või eraldi kristalse faasina. Probleemi tuleks katseliselt uurida ja tulemuste üksikasjad registreerida.

Kaetud tugiainet lastakse umbes kaks tundi ligikaudu 5 ml vees seista ja viiakse suspensioon seejärel mikrokoloni. Teine võimalus on valada kuiv kaetud tugiaine veega täidetud mikrokoloni ja lasta sellel umbes kaks tundi tasakaalustuda.

*Katsemenetlus:*

Ainet võib tugiainelt elueerida kahel erineval moel:

— tsirkulatsioonpumbaga (vt joonist 1),

— ühtlustava anumaga (vt joonist 4).

1.6.3.3. *Kolonn-elueerimismeetod tsirkulatsioonpumbaga**Seade*

Joonisel 1 on skemaatiliselt kujutatud tüüpiline süsteem. Sobiv mikrokolonn on näidatud joonisel 2, ehkki sobiv on ka mis tahes muude mõõtmetega kolonn eeldusel, et täidetud on reprodutseeritavuse ja tundlikkuse kriteeriumid. Kolonni peas olev vaba ruum peab olema nii suur, et mahutab eeljooksu jaoks kolonni täitmiseks vajaliku vee vähemalt viiekordse ruumala ja sinna saab paigutada vähemalt 5 proovi. Seda vaba ruumi võib ka vähendada, kui lisandite kõrvaldamiseks kuluv viis kolonnitäit eluaati kompenseeritakse.

Kolonn tuleks ühendada tsirkulatsioonpumbaga, mis tagab voolukiiruse umbes 25 ml/h. Pump ühendatakse polütetrafluoreetüleen- (PTFE) ja/või klaasühenduste abil. Kolonnist ja pumbast koosneva seadme korral peab olema ette nähtud võimalus eluaadiproovide võtmiseks ning kolonni peas oleva vaba ruumi rõhu võrdsustamiseks atmosfäärirõhuga. Kolonni täidis toetub väikesele (5 mm) klaasvillast korgile, mis filtreerib ühtlasi välja osakesed. Tsirkulatsioonpumbana võib kasutada näiteks peristaltilist või membraanpumpa (hoolikalt tuleb vältida torustiku materjaliga seotud saastust ja/või absorptsiooni).

*Mõõtmisprotseduur*

Käivitatakse vool läbi kolonni. Soovitav on kasutada ligikaudset voolukiirust 25 ml/h (kirjeldatud kolonni puhul vastab see 10 kolonnitäiele tunnis). Vähemalt esimesed viis kolonnitäit väljavoolu kõrvaldatakse vees lahustuvate lisandite eemaldamiseks. Seejärel lastakse tsirkulatsioonpumbal töötada tasakaalu saavutamiseni, st senikaua, kuni viie järjestikuse proovi kontsentratsioonide juhuslikud erinevused ei ületa  $\pm 30\%$ . Nende proovide vahelised ajavahemikud peaksid vastama ajale, mis kulub vähemalt 10 kolonnitäiel eluendil kolonni läbimiseks.

1.6.3.4. *Kolonn-elueerimismeetod ühtlustava anumaga**Seade (vt jooniseid 4 ja 3)*

Ühtlustav anum: ühtlustav anum ühendatakse PTFE torudega ühendatud lihvühenduse abil. Soovitav on kasutada ligikaudset voolukiirust 25 ml/h. Koguda tuleks järjestikusi eluaadifraktsioone ja neid valitud meetodi abil analüüsida.

*Mõõtmisprotseduur*

Aine lahustuvus vees määratakse nende fraktsioonide põhjal eluaadi keskjooksust, mille kontsentratsioonid jäävad vähemalt viie järjestikuse proovi kestel konstantseks ( $\pm 30\%$ ).

Mõlemal juhul (nii tsirkulatsioonpumba kui ka ühtlustava anuma kasutamisel) tehakse ka teine katse esimesest poole madalama voolukiirusega. Kui mõlema katse tulemused kokku langevad, on katse rahuldavalt sooritatud, kui aga madalamal voolukiirusel mõõdetakse kõrgem näiline lahustuvus, tuleb voolukiirust järjest poole võrra vähendada senikaua, kuni kahel järjestikusel katsel leitakse ühesugune lahustuvus.

Mõlemal juhul (nii tsirkulatsioonpumba kui ka ühtlustava anuma kasutamisel) tuleb eluaadifraktsioonides kontrollida Tyndalli efekti (valguse hajumise) abil kolloidmaterjali olemasolu. Kolloidosakeste olemasolul tulemusi ei arvestata ja katset korratakse paremate filtreerivate omadustega kolonniga.

Kõigi proovide pH registreeritakse. Järjestikused katsed tuleks teha samal temperatuuril.

#### 1.6.4. **Kolvimeetod**

##### 1.6.4.1. *Seade*

Kolvimeetodi kasutamisel on vaja järgmisi vahendeid:

- tavalisi labori klaastarvikuid ja seadmeid,
- seadet lahuste segamiseks konstantsetel termostateeritud temperatuuridel,
- tsentrifuugi (eelistatavalt termostateeritud), kui seda on vaja tööks emulsioonidega ning
- analüüsiseadmeid.

##### 1.6.4.2. *Mõõtmisprotseduur*

Soovitud ruumala vee küllastamiseks vajalik ainekogus määratakse eelkatse abil. Vajalik veekogus sõltub analüüsimeetodist ja lahustuvuste vahemikust. Kolme klaaskorgiga klaasnõusse (nt tsentrifuugiklaasidesse või kolbidesse) kaalutakse igaühete umbes viiekordne eespool määratud ainekogus. Igasse nõusse lisatakse valitud veekogus ja suletakse nõu tihedalt. Seejärel segatakse suletud nõusid 30 °C juures. (Kasutada tuleks konstantset temperatuuril töötavat loksutit või segajat, nt magnetsegajat termostateeritud veevanniga.) Ühe päeva möödumisel võetakse üks nõu ja tasakaalustatakse seda aeg-ajalt loksutades 24 h katsetemperatuuril. Nõu sisu tsentrifuugitakse seejärel katsetemperatuuril ja määratakse seejärel selges veefaasis sobiva analüüsimeetodi abil testaine kontsentratsioon. Ülejäänud kaks nõud läbivad vastavalt kahe- ja kolmepäevase 30 °C juures tasakaalustamise järel sama töötuse. Kui vähemalt kahe järjestikuse nõu mõõtmisel saadud kontsentratsioonid nõutava reprodutseeritavuse piires kokku langevad, on katse rahuldavalt sooritatud. Kui esimese, teise ja kolmanda nõu mõõtmisel saadud väärtused kalduvad kasvama, tuleb katset pikemate tasakaalustamisperioodidega korrata.

Katse võib läbi viia ka ilma eelinkubeerimiseta 30 °C juures. Küllastustasakaalu saavutamise kiiruse hindamiseks võetakse proove senikaua, kuni segamisaeg enam katselahuse kontsentratsiooni ei mõjuta.

Kõigi proovide pH registreeritakse.

#### 1.6.5. **Analüüs**

Määramisel eelistatakse spetsiifilisi määramismeetodeid, kuna juba väikesed lisandikogused võivad mõõdetud lahustuvuse väärtuses anda suure vea. Sellised meetodid on näiteks gaas- ja vedelikromatograafia, tiitrimismeetodid, fotomeetrilised meetodid ja voltampermeetrilised meetodid.

**2. ANDMED****2.1. KOLONN-ELUEERIMISMEETOD**

Iga katse puhul tuleks välja arvutada vähemalt viie järjestikuse, küllastusplatool võetud proovi keskmine väärtus ning standardhälve. Tulemused tuleks väljendada massiühikutes lahuse ruumala kohta.

Võrreldakse kahe erineva voolukiirusega katse tulemusi ja nende korratavus peaks olema alla 30 %.

**2.2. KOLVIMEETOD**

Esitada tuleks kõigi kolme kolvi puhul saadud tulemused; konstantseks loetud tulemused (korratavusega alla 15 %) tuleks keskmistada ja väljendada massiühikutes lahuse ruumala kohta. Selleks võib olla vaja teisendada massiühikud ruumalaühikuteks, kasutades tihedust, kui lahustuvus on väga kõrge (> 100 g/l).

**3. ARUANDLUS****3.1. KOLONN-ELUEERIMISMEETOD**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- eelkatse tulemusi,
- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid),
- kõigi proovide kontsentratsiooni, voolukiirust ja pH-d,
- iga katse kohta vähemalt viie küllastusplatool võetud proovi keskvaartusi ja standardhälbeid,
- kahe järjestikuse, kriteeriumidele vastava katse keskmist väärtust,
- vee temperatuuri küllastamisprotsessis,
- kasutatud analüüsimeetodit,
- kasutatud tugiaine iseloomu,
- tugiaine katmisega seotud andmeid,
- kasutatud lahustit,
- andmeid aine mis tahes keemilise ebastabiilsuse kohta katse ja kasutatud meetodi tingimustes,
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevaid andmeid.

**3.2. KOLVIMEETOD**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- eelkatse tulemusi,
- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid),
- iga üksiku analüüsi tulemust ja tulemuste keskmist, juhul kui ühe kolvi kohta tehti mitu mõõtmist,
- kõigi proovide pH-d,

- erinevate, kokkulangevaid tulemusi andnud kolbide puhul mõõdetud tulemuste keskvaartusi,
- katsetemperatuuri,
- kasutatud analüüsimeetodit,
- andmeid aine mis tahes keemilise ebastabiilsuse kohta katse ja kasutatud meetodi tingimustes,
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid, eriti lisandeid ja aine füüsilist olekut käsitlevaid andmeid.

4.

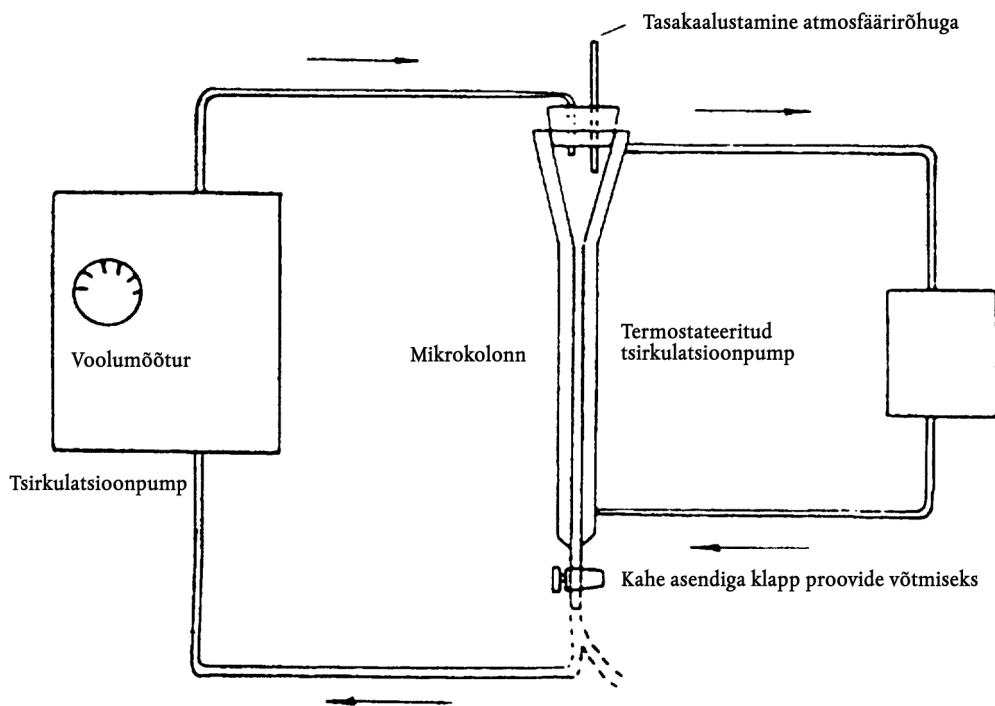
**VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.
3. NF T 20-046 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

Liide

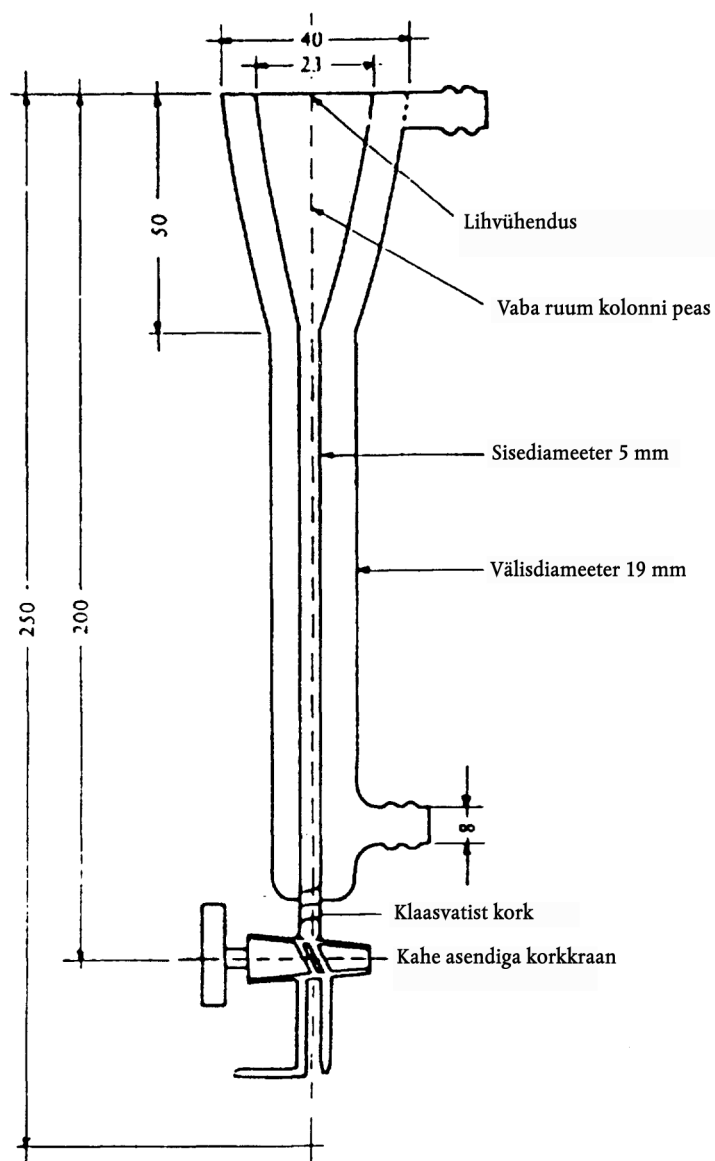
**Joonis 1**

Kolonn-elueerimismeetod tsirkulatsioonpumbaga



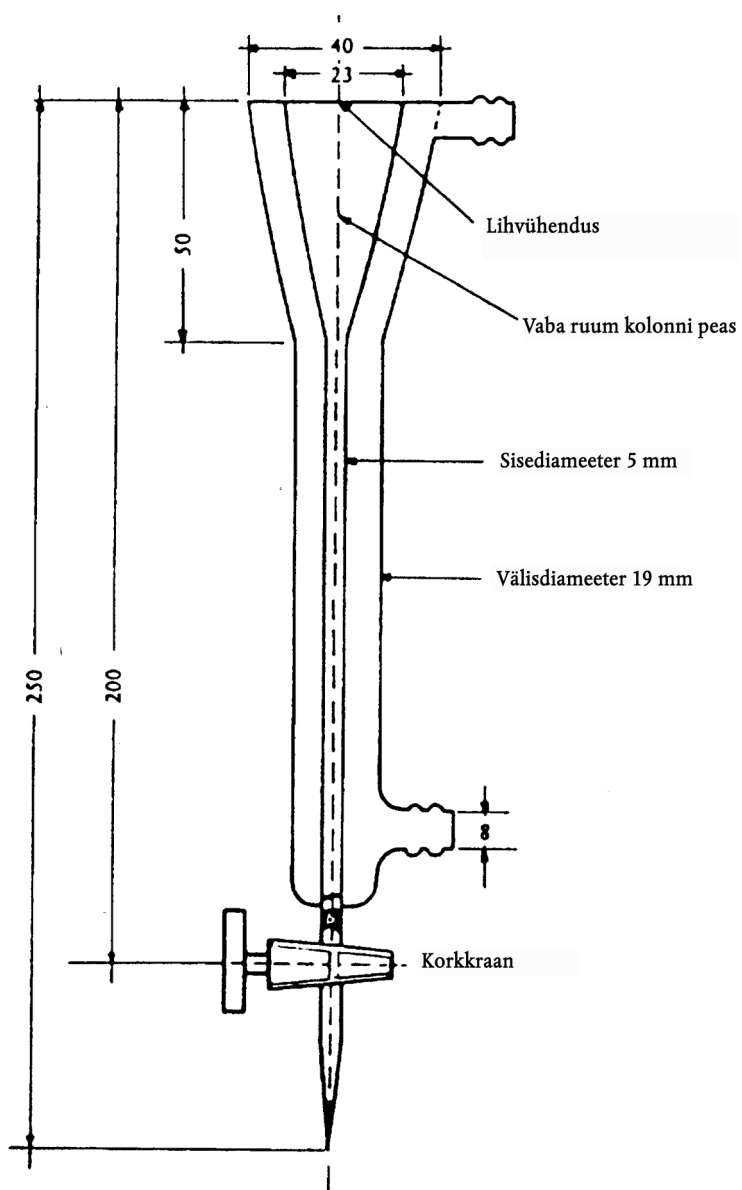
## Joonis 2

Tüüpiline mikrokolonn  
(Kõik mõõdud millimeetrites)



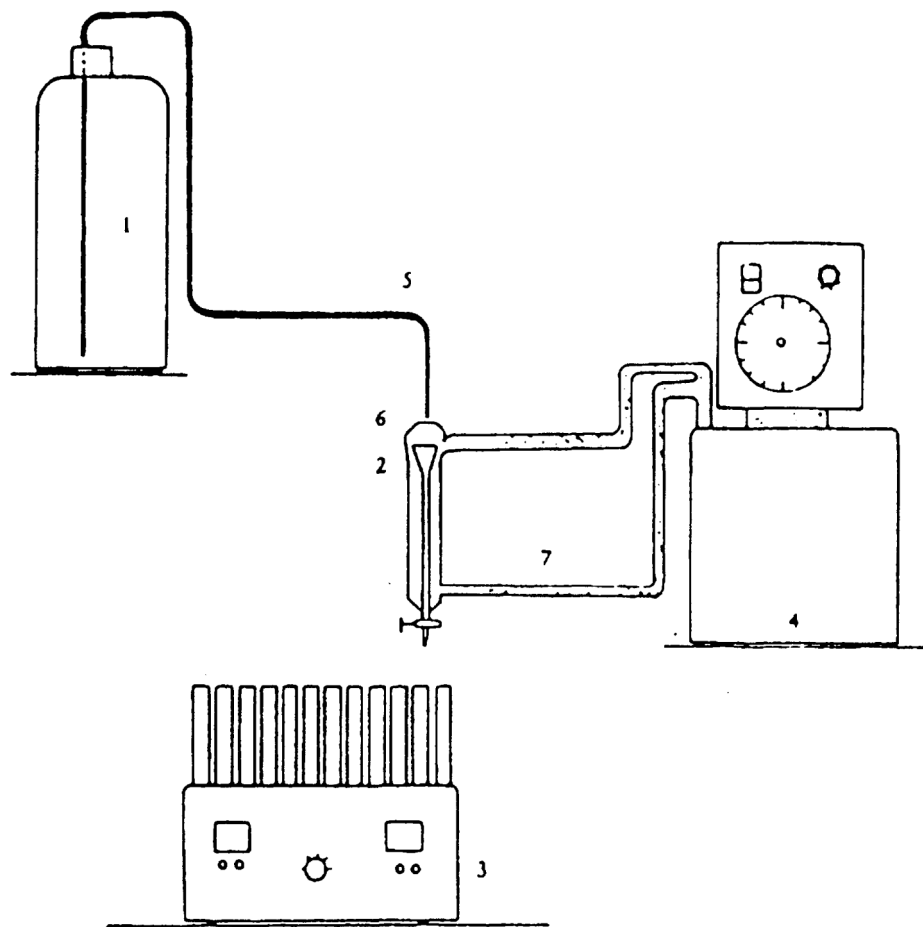
**Joonis 3**

Tüüpiline mikrokolonn  
(Kõik mõõdud millimeetrites)



## Joonis 4

Kolonn-elueerimismeetod ühtlustava anumaga



- 1 = Ühtlustav anum (nt 2,5 l kolb)
- 2 = Kolonn (vt joonist 3)
- 3 = Fraktsioonikoguja
- 4 = Termostaat
- 5 = Teflontoru
- 6 = Lihvühendus
- 7 = Veetoru termostaadi ja kolonni vahel (sisediameter ligikaudu 8 mm)

## A.8. JAOTUSTEGUR

### 1. MEETOD

Kirjeldatud "loksutamismeetod" põhineb OECD katsesuunis (1).

#### 1.1. SISSEJUHATUS

Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine struktuuri ja dissotsiatsioonikonstanti, lahustuvust vees, hüdrolüüsuvust, lahustuvust oktanoolis ja pindpinevust.

Sooli moodustavate ainete puhul tuleks mõõtmisi teha ainult vabas olekus ainega (vabal happel või vabal alusel), mis saadakse sobiva puhverlahuse kasutamisel pH-ga vähemalt ühe ühiku võrra alla (vaba happe saamiseks) või üle (vaba aluse saamiseks) vastava pK.

Katsemeetod sisaldab kaht eraldi protseduuri: loksutamismeetodit ja kõrge eraldusvõimega vedelikkromatograafiat (HPLC). Esimest meetodit kasutatakse ainetel log  $P_{ow}$  (definiitsioone vt allpool) väärtusega vahemikus 2–4, viimast ainetel log  $P_{ow}$  väärtusega vahemikus 0–6. Enne kummagi katseprotseduuri rakendamist tuleks eelnevalt kindlaks teha jaotusteguri hinnanguline väärtus.

Loksutamismeetodit saab kasutada ainult puhaste, vees ja oktanoolis lahustuvate ainete puhul. Seda ei saa kasutada pindaktiivsete ainete korral (viimaste puhul tuleks esitada arvutuslikult leitud väärtus või hinnanguline väärtus, mis on leitud üksikute lahustuvuste põhjal oktanoolis ja vees).

HPLC meetodit ei saa kasutada tugevate hapete ega aluste, metallikomplekside, pindaktiivsete ainete ega eluendiga reageerivate ainete puhul. Nende ainete korral tuleks esitada arvutuslikult leitud väärtus või hinnanguline väärtus, mis on leitud üksikute lahustuvuste põhjal oktanoolis ja vees).

HPLC meetod on katseühendis olevate lisandite suhtes vähem tundlik kui loksutamismeetod. Sellele vaatamata võivad lisandid tulemuste tõlgendamise keeruliseks muuta, kuna piike ei saa enam kindlalt identifitseerida. Eristamatute piikidega segude puhul tuleks esitada log P ülemine ja alumine piir.

#### 1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Jaotustegur (P) on määratletud lahustunud aine tasakaalukontsentratsioonide (c) suhtena kahest praktiliselt segunematust lahustist koosnevas kahefaasilises süsteemis. Oktanooli ja vee puhul:

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{Oktanool}}}{C_{\text{vesi}}}$$

Jaotustegur (P) on seega kahe kontsentratsiooni suhe ja seda väljendatakse harilikult kümnendlogaritmina (log P).

#### 1.3. VÕRDCLUSAINED

##### *Loksutamismeetod*

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

##### *HPLC meetod*

Ühendi HPLC mõõtmistulemuste ja tema P väärtuse vastavuse leidmiseks tuleb koostada vähemalt 6 punktiga kalibribrimiskõver telgedes log P vs HPLC mõõtmistulemused. Sobivad võrdlusained peab valima analüüsi sooritaja. Võimalusel peaks üks võrdlusühend olema testainest kõrgema ja üks madalama  $P_{ow}$  väärtusega. Log P väärtustel alla 4 piisab kalibribrimiseks loksutamismeetodil saadud andmetest. Log P väärtustel üle 4 võib kalibribrimiseks kasutada kirjanduses esitatud andmeid, kui need on kooskõlas arvutuslikult leitud väärtustega. Suurema täpsuse huvides on eelistatav kasutada testainele struktuurilisel lähedasi võrdlusühendeid.

Kirjandusest on paljude ainerühmade kohta võimalik leida ulatuslikke andmekogumeid log  $P_{ow}$  väärtustega (2), (3). Kui sarnase struktuuriga ühendite jaotustegurite kohta andmed puuduvad, võib kasutada vähem spetsiifilist kaliibrimist muude võrdlusühenditega.

Liites 2 esitatakse soovitatavate võrdlusainete ja nende  $P_{ow}$  väärtuste nimekiri.

#### 1.4. PÕHIMÕTE

##### 1.4.1. Loksutamismeetod

Jaotusteguri määramiseks tuleb saavutada kõigi süsteemi vastastiktoimes olevate komponentide tasakaal ja määrata siis kummaski faasis lahustunud ainete kontsentratsioonid. Selleteemalise kirjanduse põhjal on selleks võimalik kasutada mitmeid erinevaid meetodeid; nt kaks faasi segatakse põhjalikult ja eraldatakse seejärel uuritava aine tasakaalukontsentratsiooni määramiseks.

##### 1.4.2. HPLC meetod

HPLC jaoks kasutatakse müügilolevaid analüütilisi kolonne, mille täidiseks on pikkade (nt  $C_8$ ,  $C_{18}$ ) silikageeliga seotud süsivesinikahelatega tahke faas. Seesugusesse kolonni süstitud kemikaalid liiguvad selles erinevate kiirustega, kuna jaotuvad liikuva faasi ja statsionaarse süsivesinikfaasi vahel erinevalt. Kemikaalide segud elueeruvad oma hüdfoobsuse järjekorras – vees lahustuvad kemikaalid elueeruvad esimesena ja rasvlahustuvad viimasena, olenevalt oma süsivesinik-vesi jaotustegurist. Nii on retentsiooniaega sellises (pöördfaasilises) kolonnis võimalik seostada oktaanol/vesi jaotusteguriga. Jaotustegur leitakse mahtuvustegurist  $k$ , mille valem on järgmine:

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

kus  $t_R$  = testaine retentsiooniaeg ja  $t_0$  = keskmine aeg, mille jooksul lahustimolekul läbib kolonni (surnud aeg).

Kvantitatiivne analüüs pole vajalik, määrata tuleb ainult retentsiooniajad.

#### 1.5. KVALITEEDINÕUDED

##### 1.5.1. Korratavus

###### *Loksutamismeetod*

Leitava jaotusteguri täpsuse tagamiseks tehakse kordusmõõtmised kolmel erinevatel katsetingimustel, erineva ainekoguse ja erineva lahustite mahu suhtega. Korduskatsetel määratud jaotusteguri väärtused peaksid logaritmina väljendatuna  $\pm 0,3$  ühiku täpsusega kokku langema.

###### *HPLC meetod*

Mõõtmistulemuste usaldusväärsuse tõstmiseks tuleks teha kordusmõõtmised. Üksikutel mõõtmistel määratud log  $P$  väärtused peaksid  $\pm 0,1$  ühiku täpsusega kokku langema.

**1.5.2. Tundlikkus***Loksutamismeetod*

Meetodi mõõtepiirkonna määrab kasutatava analüüsimeetodi avastamispiir. See peaks võimaldama määrata  $\log P_{ow}$  väärtused vahemikus 2–4 (mõningatel tingimustel võib ülemist piiri nihutada kuni  $\log P_{ow}$  väärtuseni 5) eeldusel, et lahustunud aine kontsentratsioon kummaski faasis ei ületa 0,01 mooli liitris.

*HPLC meetod*

HPLC meetod võimaldab määrata jaotusteguri  $\log P_{ow}$  vahemikus 0–6.

Üldjuhul langeb selle meetodi abil määratud jaotusteguri logaritmiline väärtus  $\pm 1$  ühiku täpsusega kokku loksutamismeetodi abil leitud väärtusega. Tüüpilisi vastavusi võib leida kirjandusest (4), (5), (6), (7), (8). Suurem täpsus on tavaliselt saavutatav sarnase struktuuriga võrdlusühendite kasutamisel (9).

**1.5.3. Spetsiifilisus***Loksutamismeetod*

Nernsti jaotusseadus kehtib ainult konstantsel temperatuuril, rõhul ja pH-l ning ainult lahjendatud lahustes. See kehtib ainult puhta, kahe puhta lahusti vahel disperseeritud aine puhul. Kui ühes või mõlemas faasis on samal ajal mitu lahustunud ainet, võib see tulemusi mõjutada.

Lahustunud molekulide dissotsieerumise või assotsieerumisega kaasnevad samuti kõrvalekalded Nernsti jaotusseadusest. Kõrvalekalded väljenduvad sõltuvuse tekkes jaotusteguri ja lahuse kontsentratsiooni vahel.

Paljude tulemust mõjutavate tasakaalude tõttu ei tohiks seda katsemeetodit dissotsieeruvatel ühenditel vastava paranduseta kasutada. Selliste ühendite puhul tuleks kaaluda puhverlahuse kasutamist vee asemel; puhvri pH peaks vähemalt 1 ühiku võrra erinema aine  $pK_a$  väärtusest ja arvesse tuleks võtta selle pH mõju antud keskkonnale.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Jaotusteguri esialgne hindamine**

Jaotustegurit on eelistatav hinnata arvutuslikult (vt liidet 1) või testaine lahustuvuse suhte põhjal puhastes lahustites (10).

**1.6.2. Loksutamismeetod****1.6.2.1. Lahustite ettevalmistamine**

Oktanool: jaotusteguri määramisel tuleks kasutada analüüsipuhast lahustit.

Vesi: kasutada tuleks vett, mis on bidestilleeritud klaas- või kvartsseadmes. Dissotsieeruvate ühendite puhul tuleks vee asemel kasutada puhverlahuseid, juhul kui see on õigustatud.

Märkus:

Otse ioonvahetist pärinevat vett kasutada ei tohi.

## 1.6.2.1.1. Lahustite eelküllastamine

Enne jaotusteguri määramist tuleks lahustitesüsteemi faasid katsetemperatuuril loksutades üksteise suhtes küllastada. Praktiline lahendus selleks on panna analüüsipuhas oktanool ja vesi kumbki suures pudelis piisava koguse teise lahustiga 24 tunniks mehaanilisele loksutile ja lasta neil seejärel seista faaside eraldumise ja küllastumiseni.

## 1.6.2.1.2. Katseks valmistumine

Kahefaasilise süsteemi kogumaht peaks katseanuma peaaegu täielikult täitma. See aitab vältida kadusid lendumise kaudu. Kasutatavate mahtude suhe ja ainekogused sõltuvad järgmistest asjaoludest:

- esialgselt hinnangulisest jaotusteguri väärtusest (vt eespool),
- analüüsiks vajalikuks minimaalsest testaine kogusest ning
- kontsentratsioonipiirangust 0,01 mol/l kummaski faasis.

Sooritatakse kolm katset. Esimeses kasutatakse arvutatud oktanooli-vee suhet, teises jagatakse see suhe kahega ja kolmandas korrutatakse see suhe kahega (nt 1:1, 1:2, 2:1).

## 1.6.2.1.3. Testaine

Valmistatakse põhilahus veega eelküllastatud oktanoolis. Põhilahuse kontsentratsioon tuleks enne selle jaotusteguri mõõtmisel kasutamist täpselt kindlaks määrata. Lahust tuleks säilitada tingimustes, mis tagavad selle stabiilsuse.

## 1.6.2.2. Katsetingimused

Katsetemperatuuri tuleks hoida konstantsena ( $\pm 1$  °C) ja see peaks jääma vahemikku 20–25 °C.

## 1.6.2.3. Mõõtmisprotseduur

## 1.6.2.3.1. Jaotustasakaalu saavutamine

Kõigi katsetingimuste jaoks tuleks kahes eksemplaris ette valmistada vajalikud mõlema lahusti kaalutised koos vajaliku koguse põhilahusega.

Oktaanoolifaase tuleks mõõta mahu järgi. Katseanumaid tuleks loksutada kas sobival loksutil või käsitsi. Tsentrifuugiklaasi kasutamisel on seda soovitatav kiiresti 180° ümber oma risttelje pöörata, nii et sissejäänud õhk tõuseb läbi mõlema faasi. Kogemused on näidanud, et tavaliselt piisab jaotustasakaalu saavutamiseks 50 sellisest pöördest. Kindluse mõttes on soovitatav rakendada 100 pööret viie minuti jooksul.

## 1.6.2.3.2. Faaside eraldamine

Vajadusel tuleks segu faaside eraldamiseks tsentrifuugida. Seda tuleks teha toatemperatuuril hoitavas laboritsentrifuugis; mittetermostateeritava tsentrifuugi kasutamisel tuleks tsentrifuugiküvette enne analüüsi vähemalt tund aega tasakaalustada.

## 1.6.2.4. Analüüs

Jaotusteguri määramiseks tuleb määrata testaine kontsentratsioonid mõlemas faasis. Selleks võib võtta kindla koguse lahust iga katsenõu mõlemast faasist ja analüüsida neid vastavalt valitud meetodile. Arvutada tuleks mõlemas faasis oleva aine koguhulka võrrelda seda alguses süsteemi viidud kogusega.

Proovide võtmisel veefaasist tuleks kasutada meetodit, mille puhul oktanoolifaasi jälgede proovi sattumise oht on minimaalne, näiteks klaassüstalt eemaldatava nõelaga. Süstal peaks alul olema osaliselt õhuga täidetud. Nõela viimisel läbi oktanoolikihi tuleks õhk õrnalt välja suruda. Küllaldane kogus veefaasi tõmmatakse süstlasse. Süstal tõmmatakse kiirelt lahusest välja ja nõel eemaldatakse. Süstla sisu võib seejärel veefaasi proovina kasutada. Kontsentratsioonid eraldatud faasides tuleks eelistatavalt määrata spetsiifiliste määramismeetodite abil. Sobida võivad näiteks järgmised analüüsimeetodid:

- fotomeetrilised meetodid,
- gaaskromatograafia,
- kõrge eraldusvõimega vedelikkromatograafia.

### 1.6.3. HPLC meetod

#### 1.6.3.1. Ettevalmistused

##### *Seade*

Vajalik on pulseerimisvaba pumba ja sobiva detektoriga vedelikkromatograaf. Soovitav on kasutada silmusega sisestamisklappi. Polaarse rühmade esinemine statsionaarses faasis võib HPLC kolonni efektiivsust oluliselt vähendada. Seetõttu peaks polaarsete rühmade sisaldus statsionaarses faasis olema minimaalne (11). Kasutada võib müügilolevaid mikrogranulaarseid pöördfaasilisi täidiseid või valmiskolonne. Sisestamissüsteemi ja analüüsikolonne vahel võib olla kaitsekolonn.

##### *Liikuv faas*

Elueerimislahusti valmistatakse HPLC-puhtast metanoolist ja HPLC-puhtast veest ning see degaseeritakse enne kasutamist. Kasutada tuleks isokraatilist elueerimist. Veesisaldus metanool-vesi liikuvfaasides peaks olema vähemalt 25 %. Tavaliselt piisab ühendite, mille  $\log P = 6$ , elueerimiseks ühe tunni jooksul 1 ml/min voolukiiruse juures metanooli-vee suhtest 3:1 (mahu järgi). Kõrge  $\log P$ -ga ühendite (ja võrdlusühendite) puhul võib olla vaja retentsiooniga lühendada, vähendades selleks liikuva faasi polaarsust või kolonni pikkust.

Oktanoolis väga madala lahustuvusega ühenditel kaldub HPLC meetodi kohaselt leitud  $\log P_{ow}$  väärtus olema ebaharilikult madal; selliste ühendite piigid elueeruvad vahel koos lahusti frondiga. See on tõenäoliselt tingitud asjaolust, et jaotumisprotsess on liiga aeglane, saavutamaks normaalse kestusega HPLC eraldamise jooksul tasakaalu. Usaldusväärse väärtuse saamiseks võib sellisel juhul abi olla voolukiiruse vähendamisest ja/või metanooli-vee suhte alandamisest.

Katse- ja võrdlusühendite lahustuvus liikuv faasis peab olema küllaldane nende tuvastamiseks. Metanooli-vee segus võib lisandeid kasutada ainult erandjuhtudel, kuna lisandid muudavad kolonni omadusi. Lisanditega kromatogrammide tegemisel on nõutav kasutada teist sama tüüpi kolonni. Kui metanool-vesi eluent ei sobi, võib kasutada muid orgaanilise lahusti - vee segusid, nt etanooli-vee või atsetonitrili-vee segu.

Dissotsieeruvate ühendite puhul on eluendi pH kriitilise tähtsusega. See peaks jääma kolonni töövahemikku, mis on tavaliselt 2–8. Soovitav on kasutada puhverlahust. Hoolikalt tuleks vältida soolade sadestumist ja kolonni omaduste halvenemist, mida tuleb ette mõningate orgaanilise faasi – puhverlahuse segude puhul. HPLC määramisi ei ole silikageelil põhinevate statsionaarsete faasidega pH väärtustel üle 8 soovitatav teostada, kuna aluseline liikuv faas võib kolonni omadusi järsult halvendada.

##### *Lahustunud ained*

Võrdlusühendid peaksid olema võimalikult kõrge puhtusastmega. Uuritavad ja kaliibrimisel kasutatavad ühendid lahustatakse võimalusel liikuv faasis.

##### *Katsetingimused*

Temperatuur ei tohiks mõõtmiste käigus kõikuda rohkem kui  $\pm 2$  K.

## 1.6.3.2. Mõõtmine

Surnud aja  $t_0$  arvutamine

Surnud aega  $t_0$  võib määrata kas homoloogilise rea (nt alküülmetüülketoonid) või kolonnis mittepeetuvate orgaaniliste ühendite (nt tiourea, formamiid) abil. Surnud aja arvutamiseks homoloogilise rea abil süstitakse kolonni vähemalt seitse homoloogilise rea liiget ja määratakse vastavad retentsiooniajad. Töötlemata retentsioonaja väärtused  $t_{r(nc+1)}$  esitatakse  $t_{r(nc)}$  funktsioonina ja leitakse järgmise regressioonivõrrandi lõikepunkt a ja tõus b:

$$t_{r(nc+1)} = a + b t_{r(nc)}$$

( $n_c$  = süsinikuaatomite arv). Surnud aeg  $t_0$  leitakse seejärel valemist:

$$t_0 = a/(1b)$$

Kaliibrimisgraafik

Järgmise etapina koostatakse sobivate võrdlusühendite log k versus log P korrelatsioonikõver. Praktikas süstitakse ühel ajal 5–10 võrdlusühendit, mille log P jääb eeldatavasse log P vahemikku, ja määratakse retentsiooniajad, eelistatavalt detektorsüsteemiga ühendatud meerikuga integraatori abil. Arvutatakse vastavad logaritmilised mahtuvustegurite väärtused log k ja esitatakse graafiliselt nende sõltuvus loksutamismetodil leitud log P väärtustest. Kaliibrimine viiakse läbi regulaarsete ajavahemike tagant, vähemalt kord päevas, et võtta arvesse võimalikke kolonni efektiivsuse muutusi.

Testaine mahtuvusteguri määramine

Testaine süstitakse võimalikult väikese liikuvfaasi kogusega. Määratakse retentsiooniaeg (soovitavalt kahe paralleelmääramisena), võimaldades nii arvutada mahtuvustegurit k. Seejärel saab võrdlusühendite korrelatsioonigraafiku põhjal interpoleerida testaine jaotusteguri. Väga kõrgete ja väga madalate jaotustegurite korral tuleb väärtus ekstrapoleerida. Sellisel juhul tuleb hoolikalt silmas pidada regressioonisirge usalduspiiri.

## 2. ANDMED

Loksutamismetod

Määratud log P väärtuste usaldatavust saab kontrollida topeltmääramiste tulemuste keskmise võrdlemisel üldise keskmisega.

## 3. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid),
- kui kumbki meetod ei ole kohaldatav (nt pindaktiivsete ainete puhul), tuleks esitada arvutuslikult leitud väärtus või hinnanguline väärtus, mis on leitud üksikute lahustuvuste põhjal oktaanolis ja vees),
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmeid ja märkusi.

Loksutamismetodi puhul:

- esialgse hinnangulise määramise tulemust, kui see leiti,
- määramistemperatuuri,
- kontsentratsioonide määramisel kasutatud analüüsiprotseduuride andmeid,
- tsentrifuugimise kestust ja kiirust, kui seda kasutati,
- mõlemas faasis igal määramisel leitud kontsentratsioonid (st kokku 12 kontsentratsiooni väärtust),

- testaine massi, mõlema faasi mahtu igas katseanumas ja pärast tasakaalustamist kummaski faasis oleva testaine summaarset arvutuslikku kogust,
- iga katsetingimuste kogumi kohta tuleks esitada jaotusteguri (P) arvutuslikult leitud väärtused ning nende keskmine, samuti kõigi määramiste keskmine. Kui on märke jaotusteguri kontsentratsioonisõltuvusest, tuleks see aruandes ära märkida,
- esitada tuleks üksikute P väärtuste standardhälve nende keskvaartusest,
- kõigi määramiste keskmine P väärtus tuleks esitada ka kümnendlogaritmina,
- arvutuslikku teoreetilist  $P_{ow}$  väärtust, kui selline väärtus määrati või kui mõõdetud väärtus on suurem kui  $10^4$ ,
- katses kasutatud vee ja veefaasi pH-d,
- puhvrite kasutamisel nende vee asemel kasutamise põhjendust, nende koostist, kontsentratsiooni ja pH väärtust ning veefaasi pH väärtust enne ja pärast katset.

*HPLC meetodi puhul:*

- esialgse hinnangulise määramise tulemust, kui see leiti,
- test- ja võrdlusaineid ja nende puhtust,
- määramiste temperatuurivahemikku,
- pH-d, mille juures määramised tehti,
- andmeid analüüsi- ja kaitsekolonni, liikuva faasi ja kasutatud detektori kohta,
- kaliibrimisel kasutatud võrdlusühendite retentsiooniandmeid ja kirjanduses esitatud log P väärtusi,
- sobitatud regressioonisirge (log k versus log P) andmeid,
- katseühendi keskmisi retentsiooniandmeid ja interpoleeritud log P väärtust,
- seadmete ja töötingimuste kirjeldust,
- elueerimisprofiile,
- kolonni viidud test- ja võrdlusainete koguseid,
- surnud aega ja selle määramismeetodit.

4. VIITED

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.
3. Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) – Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.
4. L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygård, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.
5. H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219 (1981).
6. B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.
7. W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.
8. J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.
9. S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.
10. O. Jubermaun, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumspraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223–339.
11. R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.
12. A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

13. R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.
14. NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use – Determination of partition coefficient – Flask shaking method.
15. C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.
16. A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
17. C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.
18. W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.
19. D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.
20. J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.
21. R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984,
22. Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel 1978.
23. N.S. Nirreles, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

### 1. liide

## Arvutus-/hindamismeetodid

### SISSEJUHATUS

Üldise arvutusmeetodite tutvustuse, vastavaid andmeid ja näiteid võib leida raamatust "Handbook of Chemical Property Estimation Methods" (a).

Arvutuslikke  $P_{ow}$  väärtusi saab kasutada:

- sobiva katsemeetodi valikul (loksutamismeetod  $\log P_{ow}$  vahemikus  $-2-4$ , HPLC meetod  $\log P_{ow}$  vahemikus  $0-6$ ),
- sobivate katsetingimuste valikul (näiteks võrdlusainete valikul HPLC protseduurideks, oktanooli/vee suhte valikul loksutamismeetodi puhul),
- labori sisekontrollimeetodina võimalike katsevigade avastamiseks,
- hinnangulise  $P_{ow}$  väärtuse saamiseks juhtudel, mille puhul katsemeetodeid tehnilistel põhjustel rakendada ei saa.

### HINDAMISMEETOD

Jaotusteguri esialgne hindamine

Jaotusteguri hinnangulist väärtuse võib leida testaine lahustuvuse põhjal puhastes lahustites.

Selleks:

$$P_{\text{Hinnanguline}} = \frac{\text{Küllastuskontsentratsioon}_{\text{oktanoolis}}}{\text{Küllastuskontsentratsioon}_{\text{vees}}}$$

### ARVUTUSMEETODID

#### Arvutusmeetodite põhimõte

Kõigi arvutusmeetodite kohaselt jagatakse molekul sobivateks alamstruktuurideks, mille kohta on olemas usaldusväärsed  $\log P_{ow}$  osaväärtused. Seejärel arvutatakse terve molekuli  $\log P_{ow}$  liites kokku funktsionaalrühmadele vastavad osaväärtused ja sisemolekulaarseid vastasmõjusid arvestavad parandusliikmed.

Rühmakonstantide ja parandusliikmete väärtusi võib leida toodud allikatest (b), (c), (d), (e). Mõnda allikat ajakohastatakse regulaarselt (b).

### Kvaliteedinõuded

Üldjuhul arvutusmeetodi usaldusväärsus väheneb uuritava ühendi keerukuse kasvades. Madala molaarmassiga lihtsate, ühe või kahe funktsionaalrühmaga molekulide puhul on eeldatav vahe erinevate, funktsionaalrühmade osaväärtusi arvestavate meetodite abil leitud ning mõõdetavate  $\log P_{ow}$  väärtuste vahel 0,1–0,3 ühikut. Keerukamate molekulide puhul võib veapiir olla suurem. See sõltub nii saadaval olevate rühmakonstantide usaldusväärsusest kui ka oskusest hinnata sisemolekulaarseid vastasmõjusid (nt vesiniksidemeid) ja kasutada vastavaid parandusliikmeid (viimane probleem ei ole arvutitarkvara CLOGP-3 kasutamisel eriti oluline) (b). Dissotsieeruvate ühendite puhul on oluline arvestada õieti dissotsiatsiooniastet ja vastava iooni laengut.

### Arvutuskäik

#### Hansch $\pi$ -meetod

Algne hüdfoobse asendaja konstant  $\pi$ , mille võtsid kasutusele Fujita jt (f), määratletakse järgmiselt:

$$\pi_x = \log P_{ow}(\text{PhX}) - \log P_{ow}(\text{PhH})$$

kus  $P_{ow}(\text{PhX})$  on aromaatsede derivaadi jaotustegur ja  $P_{ow}(\text{PhH})$  lähteaine jaotustegur.

$$\begin{aligned} (\pi_{Cl} &= \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_6)) \\ &= 2,84 - 2,13 = 0,71). \end{aligned}$$

Vastavalt määratlusele on  $\pi$ -meetod kohaldatav peamiselt aromaatsetele asendussaadustele. Paljude asendajate  $\pi$ -väärtused on esitatud koondtabelitena (b), (c), (d). Neid kasutatakse aromaatsete molekulide või alamsstruktuuride  $\log P_{ow}$  arvutamisel.

#### Rekkeri meetod

Rekkeri (g) järgi arvutatakse  $\log P_{ow}$  väärtus järgmiselt:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j \text{Vastasmõju} \text{ u arvestavad liikmed}$$

kus  $f_i$  tähistab erinevaid rühmakonstante ja  $a_i$  nende esinemissagedust uuritavas molekulis. Parandusliikmed võib väljendada summaarselt konstandi  $C_m$  (nn "maagilise konstandi") korrutisena. Rühmakonstandid  $f_i$  ja  $C_m$  leiti mitme muutujaga regressioonianalüüsi abil 825 ühendi 1 054 eksperimentaalse  $P_{ow}$  väärtuse põhjal (c), (h). Vastasmõju arvestavad liikmed määratakse vastavalt kirjanduses toodud eeskirjadele (e), (h), (i).

#### Hansch-Leo meetod

Hansch ja Leo (c) järgi arvutatakse  $\log P_{ow}$  väärtus järgmiselt:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

kus  $f_i$  tähistab erinevaid rühmakonstante,  $F_j$  parandusliikmeid ja  $a_i$ ,  $b_j$  vastavaid esinemissagedusi. Paljude eksperimentaalsete  $P_{ow}$  väärtuste põhjal koostati katse-eksituse meetodil aatomite ja funktsionaalrühmade osaväärtuste ning parandusliikmete  $F_j$  (nn "faktorite") nimekirj. Parandusliikmed on jagatud mitmesse eri klassi (a), (c). Kõigi reeglite ja parandusliikmete arvestamine on suhteliselt keerukas ja aeganõudev. Selleks otstarbeks on välja töötatud vastavad tarkvarapaketid (b).

*Kombineeritud meetod*

Keerukate molekulide  $\log P_{ow}$  arvutamise täpsust on oluliselt võimalik suurendada, kui jagada molekul suuremateks alamstruktuurideks, mille kohta on olemas usaldusväärsed  $\log P_{ow}$  väärtused kas tabelites (b), (c) või on need saadud isiklikel mõõtmistel. Selliseid fragmente (nt heterotsükleid, antrakinooni, asobenseeni) võib seejärel kombineerida Hanschi  $\pi$ -väärtuste või Rekkeri või Leo rühmakonstantidega.

**Märkused**

- i) Osaliselt või täielikult dissotsieerunud ühenditele saab arvutusmeetodeid kohaldada ainult juhul, kui on võimalik arvestada vajalikke parandustegureid.
- ii) Kui eeldada võib sisemolekulaarsete vesiniksidemete olemasolu, tuleb vastavad parandusliikmed liita (ligikaudu  $+ 0,6$  kuni  $+ 1,0 \log P_{ow}$  ühikut) (a). Viiteid selliste sidemete olemasolu kohta võib leida molekuli ruumilistest mudelitest või spektroskoopilistest andmetest.
- iii) Kui võimalikud on mitu tautomeerset vormi, kasutatakse arvutustes kõige suurema tõenäosusega vormi.
- iv) Hoolikalt tuleks jälgida muudatusi rühmakonstantide tabelites.

**Aruanne**

Arvutus-/hindamismeetodite kasutamisel peaks katsearuanne võimalusel sisaldama järgmisi andmeid:

- aine kirjeldust (segu, lisandid jne),
- märkeid võimalike sisemolekulaarsete vesiniksidemete, dissotsiatsiooni, laengu ja mis tahes muude ebaharilike nähtuste kohta (nt tautomeeria),
- arvutusmeetodi kirjeldust,
- märget kasutatud andmebaasi kohta või andmebaasi ennast,
- lahknevusi tavapärasest fragmentide valikust,
- põhjalikku arvutusdokumentatsiooni.

**KIRJANDUS**

- a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.
- b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.
- d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
- e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther. 1979, vol. 14, 479.
- f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175.
- g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochimistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.
- h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.
- i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

## 2. liide

## Soovitavad võrdlusained HPLC meetodi puhul

| Nr                                                      | Võrdlusaine                    | log P <sub>ow</sub> | pKa                       |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------------|
| 1                                                       | 2-butanoon                     | 0,3                 |                           |
| 2                                                       | 4-atsetüülpüridiin             | 0,5                 |                           |
| 3                                                       | Aniliin                        | 0,9                 |                           |
| 4                                                       | Atseetaniliid                  | 1,0                 |                           |
| 5                                                       | Bensüülalkohol                 | 1,1                 |                           |
| 6                                                       | p-metoksüfenool                | 1,3                 | pKa = 10,26               |
| 7                                                       | Fenoksüäädikhape               | 1,4                 | pKa = 3,12                |
| 8                                                       | Fenool                         | 1,5                 | pKa = 9,92                |
| 9                                                       | 2,4-dinitrofenool              | 1,5                 | pKa = 3,96                |
| 10                                                      | Bensonitriil                   | 1,6                 |                           |
| 11                                                      | Fenüülatsetonitriil            | 1,6                 |                           |
| 12                                                      | 4-metüülbensüülalkohol         | 1,6                 |                           |
| 13                                                      | Atsetofenoon                   | 1,7                 |                           |
| 14                                                      | 2-nitrofenool                  | 1,8                 | pKa = 7,17                |
| 15                                                      | 3-nitrobensoehape              | 1,8                 | pKa = 3,47                |
| 16                                                      | 4-kloroaniliin                 | 1,8                 | pKa = 4,15                |
| 17                                                      | Nitrobenseen                   | 1,9                 |                           |
| 18                                                      | Kaneelalkohol                  | 1,9                 |                           |
| 19                                                      | Bensoehape                     | 1,9                 | pKa = 4,19                |
| 20                                                      | p-kresool                      | 1,9                 | pKa = 10,17               |
| 21                                                      | Kaneelhape                     | 2,1                 | pKa = 3,89 cis 4,44 trans |
| 22                                                      | Anisool                        | 2,1                 |                           |
| 23                                                      | Metüülbensoaat                 | 2,1                 |                           |
| 24                                                      | Benseen                        | 2,1                 |                           |
| 25                                                      | 3-metüülbensoehape             | 2,4                 | pKa = 4,27                |
| 26                                                      | 4-klorofenool                  | 2,4                 | pKa = 9,1                 |
| 27                                                      | Trikloroetüleen                | 2,4                 |                           |
| 28                                                      | Atrasiin                       | 2,6                 |                           |
| 29                                                      | Etüülbensoaat                  | 2,6                 |                           |
| 30                                                      | 2,6-diklorobensonitriil        | 2,6                 |                           |
| 31                                                      | 3-klorobensoehape              | 2,7                 | pKa = 3,82                |
| 32                                                      | Tolueen                        | 2,7                 |                           |
| 33                                                      | 1-naftool                      | 2,7                 | pKa = 9,34                |
| 34                                                      | 2,3-dikloroaniliin             | 2,8                 |                           |
| 35                                                      | Klorobenseen                   | 2,8                 |                           |
| 36                                                      | Allüülfenüüleeter              | 2,9                 |                           |
| 37                                                      | Bromobenseen                   | 3,0                 |                           |
| 38                                                      | Etüülbenseen                   | 3,2                 |                           |
| 39                                                      | Bensofenoon                    | 3,2                 |                           |
| 40                                                      | 4-fenüülfenool                 | 3,2                 | pKa = 9,54                |
| 41                                                      | Tümmool                        | 3,3                 |                           |
| 42                                                      | 1,4-diklorobenseen             | 3,4                 |                           |
| 43                                                      | Difenüülamiin                  | 3,4                 | pKa = 0,79                |
| 44                                                      | Naftaleen                      | 3,6                 |                           |
| 45                                                      | Fenüülbensoaat                 | 3,6                 |                           |
| 46                                                      | Isopropüülbenseen              | 3,7                 |                           |
| 47                                                      | 2,4,6-triklorofenool           | 3,7                 | pKa = 6                   |
| 48                                                      | Bifenüül                       | 4,0                 |                           |
| 49                                                      | Bensüülbensoaat                | 4,0                 |                           |
| 50                                                      | 2,4-dinitro-6-sec-bütüülfenool | 4,1                 |                           |
| 51                                                      | 1,2,4-triklorobenseen          | 4,2                 |                           |
| 52                                                      | Dodekaanhape                   | 4,2                 |                           |
| 53                                                      | Difenüüleeter                  | 4,2                 |                           |
| 54                                                      | Butüülbenseen                  | 4,5                 |                           |
| 55                                                      | Fenantreen                     | 4,5                 |                           |
| 56                                                      | Fluoranteen                    | 4,7                 |                           |
| 57                                                      | Dibensüül                      | 4,8                 |                           |
| 58                                                      | 2,6-difenüülpüridiin           | 4,9                 |                           |
| 59                                                      | Trifenüülamiin                 | 5,7                 |                           |
| 60                                                      | DDT                            | 6,2                 |                           |
| Muud madala log P <sub>ow</sub> väärtusega võrdlusained |                                |                     |                           |
| 1                                                       | Nikotiinhape                   | -0,07               |                           |

**A.9. LEEKPUNKT****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine süttivust. Katsemeetod sobib vedelikele, mille aurud võivad süüteallika abil süttida. Siintoodud katsemeetodid annavad usaldusväärseid tulemusi ainult iga meetodi puhul märgitud leekpunkti vahemikus.

Kasutatava meetodi valikul tuleks arvestada keemiliste reaktsioonide võimalusega aine ja proovianuma vahel.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Leekpunkt on madalaim, normaalrõhule 101,325 kPa normaliseeritud temperatuur, mille juures eraldub vedelikust katsemeetodis määratletud tingimustel aine sellises koguses, et katseanumas tekib süttiv auru/õhu segu.

Ühikud: °C

$$t = T - 273,15$$

(t (°C) ja T (K))

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

**1.4. PÕHIMÕTE**

Aine viiakse katseanumasse ja soojendatakse või jahutatakse iga meetodi puhul kirjeldatud protseduuri kohasel katsetemperatuurini. Veendumaks, kas proov katsetemperatuuril süttib või mitte, tehakse süütamiskatsed.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED****1.5.1. Korratavus**

Korratavus varieerub vastavalt leekpunkti vahemikule ja kasutatavale katsemeetodile; maksimum on 2 °C.

**1.5.2. Tundlikkus**

Tundlikkus sõltub kasutatavast katsemeetodist.

**1.5.3. Spetsiifilisus**

Osade katsemeetodite spetsiifilisus piirub kindlate leekpunkti vahemikega ja sõltub ainespetsiifilistest omadustest (nt kõrge viskoossus).

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Ettevalmistused**

Testaine proov viiakse punktidele 1.6.3.1 ja/või 1.6.3.2 vastavasse katseseadmesse.

Ohutuse huvides on kõrge siseenergiaga või mürgiste ainete puhul soovitatav kasutada väikest proovikogust, ca 2 cm<sup>3</sup>, kasutavaid meetodeid.

**1.6.2. Katsetingimused**

Kui see ei ole vastuolus ohutusnõuetega, tuleks katseseade paigaldada tõmbevabasse asukohta.

**1.6.3. Katse tegemine****1.6.3.1. Tasakaaluline meetod**

Vt ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

**1.6.3.2. Mittetasakaaluline meetod**

*Abeli seade:*

vt BS 2000, 170. osa, NF M07-011, NF T66-009.

*Abel-Pensky seade:*

vt EN 57, DIN 51755, 1. osa (temperatuuridele 5–65 °C), DIN 51755, 2. osa (temperatuuridele alla 5 °C), NF M07-036.

*Tagi seade:*

vt ASTM D 56.

*Pensky-Martensi seade:*

vt ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

*Märkused:*

kui mittetasakaalulise meetodiga (1.6.3.2) määratud leekpunkt on  $0 \pm 2$  °C,  $21 \pm 2$  °C või  $55 \pm 2$  °C, tuleb saadud tulemust kinnitada sama seadmega ja tasakaalulise meetodi abil.

Teavitamiseks võib kasutada ainult meetodeid, mille abil saab määrata leekpunkti temperatuuri.

Viskoosete, lahusteid sisaldavate vedelike (värvid, kummid jms) leekpunkti määramiseks võib kasutada ainult viskoosete vedelike leekpunkti määramiseks ette nähtud seadmeid ja katsemeetodeid.

Vt ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213, 1. osa.

**2. ANDMED****3. ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid),
- ära tuleb märkida kasutatud meetod ja võimalikud kõrvalekaldeid sellest,
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid andmeid ja lisamärkusi.

**4. VIITED**

Puuduvad.

**A.10. SÜTTIVUS (TAHKED AINED)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine võimalikku plahvatusohtlikkust.

Käesolevat katset tuleks kasutada ainult pulbriliste, teraliste või pastataoliste ainete puhul.

Et mitte hõlmata kõiki süttivaid aineid, vaid ainult kiiresti põlevaid või eriti ohtlike põlemisomadustega aineid, loetakse väga tuleohtlikuks ainult neid aineid, mille põlemiskiirus ületab teatava piirväärtuse.

Eriti ohtlik võib olla hõõgumise levik läbi metallipuru, kuna see raskendab tule kustutamist. Metallipulbrid tuleks lugeda väga tuleohtlikuks, kui hõõgumisprotsess levib teatava aja jooksul läbi kogu pulbri massi.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Põlemisaeg sekundites.

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Nimetamata.

**1.4. PÕHIMÕTE**

Ainest moodustatakse umbes 250 mm pikkune katkestusteta pulbririba ja tehakse esialgne sõelkatse kontrollimaks, kas gaasileegiga süütamisel levib põlemisprotsess leegi või hõõgumisena edasi. Kui põlemisprotsess levib kindlaksmääratud aja jooksul läbi 200 mm riba, viiakse põlemiskiiruse määramiseks läbi täiemahuline katseprogramm.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Täpsustamata.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Esialgne sõelkatse**

Ainest moodustatakse mittesüttivale, mittepoorsele ja madala soojujuhtivusega alusplaadile umbes 250 mm pikkune, 20 mm laiune ja 10 mm kõrgune katkestusteta pulbririba.

Pulbririba ühele otsale suunatakse pulbri süttimiseni või kuni 2 minutiks (metallide või metallisulamite pulbrite puhul 5 minutiks) vähemalt 5 mm läbimõõduga gaasipõleti leek. Tehakse kindlaks, kas põlemisprotsess läbib 4minutilise (metallipulbrite puhul 40minutilise) katseaja jooksul 200 mm ribaosa. Kui pulber ei sütti või põlemisprotsess (leek või hõõgumine) ei läbi 4minutilise (või 40minutilise) katseaja jooksul 200 mm pulbririba, ei loeta ainet väga tuleohtlikuks ja rohkem katseid sellega ei tehta. Kui põlemisprotsess läbib 200 mm pulbririba vähem kui 4 minutiga või metallipulbrite puhul vähem kui 40 minutiga, viiakse läbi allpool kirjeldatud protseduur (punkt 1.6.2 ja järgmised punktid).

## 1.6.2. Põlemiskiiruse katse

### 1.6.2.1. Ettevalmistused

250 mm pikk, kolmnurkse läbilõikega, 10 mm sisemise kõrguse ja 20 mm sisemise laiusega vorm täidetakse tihendamata pulbrilise või teralise ainega. Vormi kummalegi küljele paigaldatakse pikisuunas külgpiiranguteks kaks metallplaati, mis ulatuvad 2 mm üle kolmnurkse vao üläääre (vt joonist). Vorm kukutatakse seejärel kolm korda 2 cm kõrguselt kõvale aluspinnale. Vajadusel täidetakse vorm seejärel uuesti. Külgmised piirangud eemaldatakse ja liigne aine kaabitakse ära. Vormi peale paigaldatakse seejärel mittesüttiv, mittepoorne ja madala soojusjuhtivusega alusplaat, keeratakse vorm koos plaadiga ümber ja eemaldatakse vorm.

Pastataolistest ainetest moodustatakse mittesüttivale, mittepoorsele ja madala soojusjuhtivusega alusplaadile 250 mm pikkune, umbes 1 cm<sup>2</sup> läbilõikepindalaga riba.

### 1.6.2.2. Katsetingimused

Niiskustundlike ainete puhul viiakse katse läbi võimalikult kiiresti pärast aine hoiunõust eemaldamist.

### 1.6.2.3. Katse tegemine

Riba paigutatakse tõmbekapi alla õhu liikumise suunaga risti.

Õhu liikumise kiirus peab olema piisav, takistamaks suitsu levikut laborisse ning seda tuleb katse jooksul konstantsena hoida. Seadme ümber tuleks paigaldada tõmbevari.

Riba üks ots süüdatakse vähemalt 5 mm läbimõõduga gaasipõleti leegi abil. Kui riba on 80 mm ulatuses põlenud, mõõdetakse järgneva 100 mm kestel põlemiskiirus. Katset korratakse kuus korda, iga kord puhta jaheda alusplaadiga, välja arvatud juhul, kui ühel katsel on juba saadud positiivne tulemus.

## 2. ANDMED

Hindamisel on vajalikud esialgse sõelkatse (1.6.1) põlemisaeg ja kuni kuuel põhikatsel (1.6.2.3) leitud lühim põlemisaeg.

## 3. ARUANDLUS

### 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid),
- katseaine kirjeldust, füüsikalist olekut ja niiskusesisaldust,
- esialgse sõelkatse ja põlemiskiiruse katse tulemusi (kui see läbi viidi),
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärke.

### 3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Pulbrilised, teralsed või pastataolised ained loetakse väga tuleohtlikuks, kui nende põlemisaeg punktis 1.6.2 kirjeldatud mis tahes katseprotseduuris on alla 45 sekundi. Metallide või metallisulamite pulbrid loetakse väga tuleohtlikuks juhul, kui need süttivad ja leek või reaktsioonivöönd levib 10 minutiga või kiiremini üle kogu proovi.

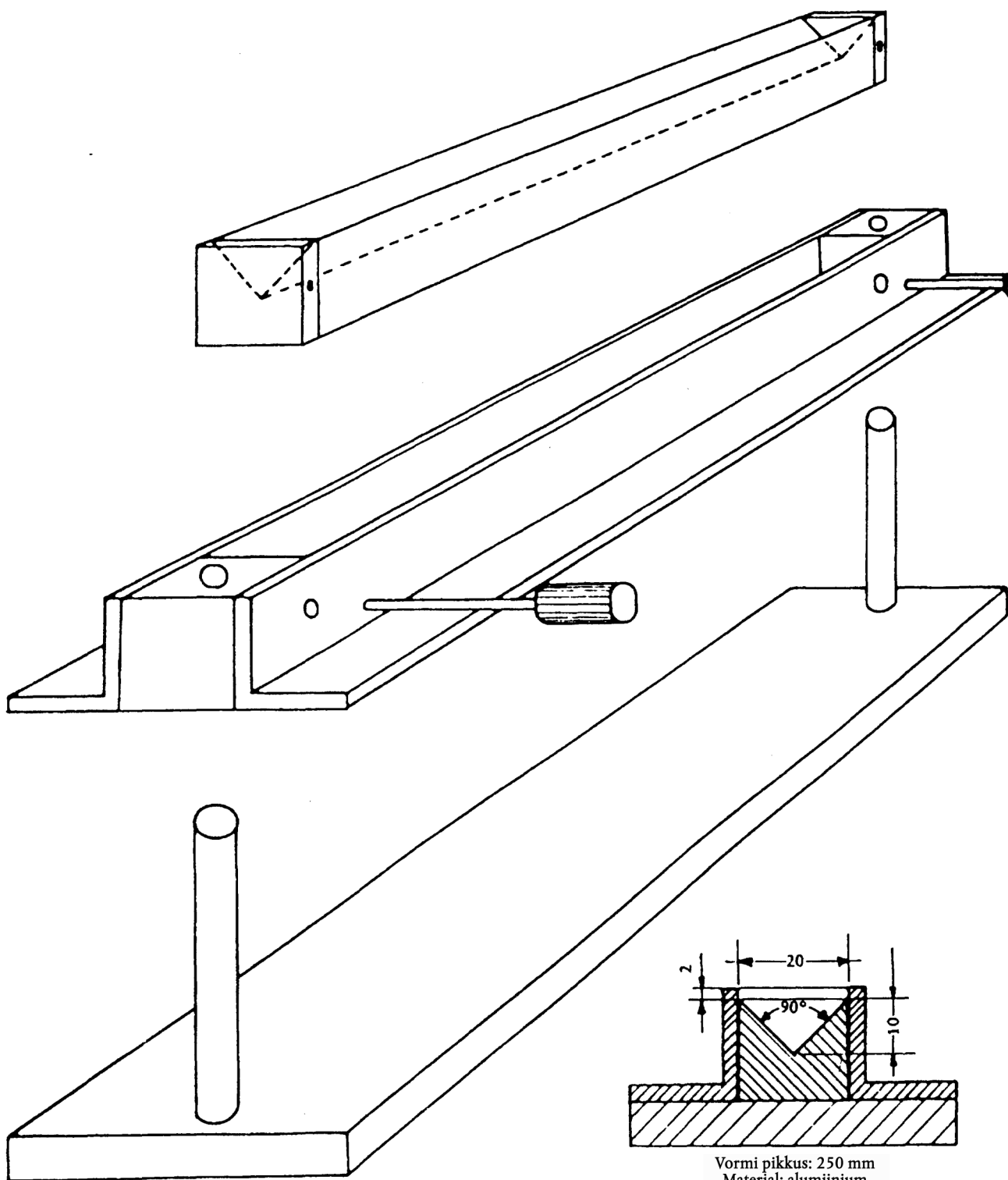
## 4. VIITED

1. NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

Liide

## Joonis

Põlemisriba valmistamise vorm ja abivahendid  
(Kõik mõõdud millimeetrites)



**A.11. SÜTTIVUS (GAASID)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

See meetod võimaldab määrata õhuga segunenud gaaside süttivust toatemperatuuril (ca 20 °C) ja atmosfäärirõhul ning süttivate gaaside puhul kontsentratsioonivahemikku, milles nad süttivad. Järjest suurenevate kontsentratsioonidega katsegaasi-õhu segudes tekitatakse elektrisäde ja jälgitakse, kas gaas süttib.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Süttimispiirkond on kontsentratsioonivahemik alumise ja ülemise plahvatuspiiri vahel. Alumine ja ülemine plahvatuspiir on piirkontsentratsioonid, mille puhul leek õhuga segatud gaasis ei levi.

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Nimetamata.

**1.4. PÕHIMÕTE**

Gaasi kontsentratsiooni õhus suurendatakse järk-järgult ja igas etapis tekitatakse segus elektrisäde.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Täpsustamata.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Seade**

Katseanumaks on kummuli klaassilinder sisediameetriga vähemalt 50 mm ja kõrgusega vähemalt 300 mm. 3–5 mm vahekaugusega süüteelektroodid paigutatakse 60 mm kõrgusele silindri põhjast. Silindril on survepääsuklapiga ava. Plahvatuskahjustuste vältimiseks tuleb seade varjestada.

Süüteallikana kasutatakse püsivat 0,5 s kestusega induktsoonsädet, mis tekitatakse 10–15 kV väljundpingega kõrgepingetrafo (maksimaalne sisendvõimsus 300 W) abil. Sobivat seadet on näiteks kirjeldatud viites (2).

**1.6.2. Katsetingimused**

Katse viiakse läbi toatemperatuuril (ca 20 °C).

**1.6.3. Katse tegemine**

Doseerpumpade abil viiakse klaassilindrisse kindla kontsentratsiooniga gaasi-õhu segu. Segus tekitatakse säde ja jälgitakse, kas süüteallikast eraldub leek ja levib gaasis iseseisvalt. Gaasikontsentratsiooni muudetakse 1 % kaupa kuni eespool kirjeldatud süttimise toimumiseni.

Kui gaasi keemiline struktuur viitab mittesüttivusele ja on võimalik välja arvutada stõhhiomeetrilise gaasi-õhu segu koostis, siis kontrollitakse selliste 1 % astmetega ainult segusid kontsentratsioonivahemikus 10 % alla ja 10 % üle stõhhiomeetrilise kontsentratsiooni.

2. **ANDMED**

Ainus selle omaduse määramisel oluline teave on leegi levimine.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid),
- kasutatud seadme kirjeldust koos mõõtmatega,
- katsetemperatuuri,
- katsekontsentratsioone ja saadud tulemusi,
- katse tulemust: mittesüttiv gaas või väga tuleohtlik gaas,
- kui järeldatakse, et gaas on mittesüttiv, tuleks ära märkida kontsentratsioonivahemik, milles seda 1 % sammude kaupa testiti,
- registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist puutuvad andmed ja märkused.

4. **VIITED**

1. NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.
2. W. Berthold, D. Conrad, T. Grever, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. "Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen." Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol 56, 2, 126–127.

**A.12. SÜTTIVUS (KOKKUPUUTEL VEEGA)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Meetodi abil saab kontrollida, kas aine reaktsioonil vee või niiske õhuga tekib ohtlikus koguses gaasi või gaase, mis võivad olla väga tuleohtlikud.

Katsemeetod on kohaldatav nii tahketele kui ka vedelatele ainetele. Meetod ei ole kohaldatav ainetele, mis kokkupuutel õhuga iseeneslikult süttivad.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Väga tuleohtlik: ained, mis kokkupuutel vee või niiske õhuga eraldavad ohtlikus koguses väga tuleohtlikke gaase kiirusega vähemalt 1 liiter/kg kohta tunnis.

**1.3. PÕHIMÕTE**

Ainet kontrollitakse vastavalt allpool esitatud etapiviisilisele eeskirjale; kui mis tahes etapis leiab aset süttimine, pole edasine kontrollimine vajalik. Kui on teada, et aine veega ägedalt ei reageeri, jätkatakse 4. etapiga (1.3.4).

**1.3.1. 1. etapp**

Testaine viiakse 20-kraadist destilleeritud vett sisaldavasse süvendisse ja kontrollitakse, kas tekkiv gaas süttib.

**1.3.2. 2. etapp**

Testaine kantakse 20-kraadist destilleeritud vett sisaldavas tassis ujuvale filterpaberile ja kontrollitakse, kas tekkiv gaas süttib. Filterpaberi ainus ülesanne on ainet koos hoida ja süttimise tõenäosust suurendada.

**1.3.3. 3. etapp**

Testainest moodustatakse ligikaudu 2 cm kõrgune ja 3 cm läbimõõduga kuhi. Kuhjale lisatakse mõned tilgad vett ja kontrollitakse, kas tekkiv gaas süttib.

**1.3.4. 4. etapp**

Testaine segatakse 20-kraadise destilleeritud veega ja mõõdetakse 7 tunni jooksul ühetunniste vahedega gaasi eraldumise kiirust. Kui gaas eraldub ebaühtlase kiirusega või kiirus kasvab veel seitsme tunni möödudes, pikendatakse mõõtmisaega kuni viie päevani. Kui kiirus ületab mis tahes ajahetkel 1 liitri/kg kohta tunnis, võib katse peatada.

**1.4. VÕRDLUSAINED**

Nimetamata.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Täpsustamata.

## 1.6. MEETODITE KIRJELDUS

## 1.6.1. 1. etapp

## 1.6.1.1. Katsetingimused

Katse viiakse läbi toatemperatuuril (ca 20 °C).

## 1.6.1.2. Katse tegemine

Väike (ligikaudu 2 mm läbimõõduga) kogus testainet viiakse destilleeritud vett sisaldavasse süvendisse. Kontrollitakse, kas i) eraldub gaasi ja ii) kas gaas süttib. Kui gaas süttib, pole edasine uurimine vajalik, kuna aine loetakse ohtlikuks.

## 1.6.2. 2. etapp

## 1.6.2.1. Seade

Mis tahes sobivas nõus, näiteks 100 mm läbimõõduga aurustuskaasis, asetatakse destilleeritud vee pinnale filterpaber.

## 1.6.2.2. Katsetingimused

Katse viiakse läbi toatemperatuuril (ca 20 °C).

## 1.6.2.3. Katse tegemine

Väike (ligikaudu 2 mm läbimõõduga) kogus testainet kantakse filterpaberi keskkoha. Kontrollitakse, kas i) eraldub gaasi ja ii) kas gaas süttib. Kui gaas süttib, pole edasine uurimine vajalik, kuna aine loetakse ohtlikuks.

## 1.6.3. 3. etapp

## 1.6.3.1. Katsetingimused

Katse viiakse läbi toatemperatuuril (ca 20 °C).

## 1.6.3.2. Katse tegemine

Testainest moodustatakse ligikaudu 2 cm kõrgune ja 3 cm läbimõõduga kuhi süvendiga tipus. Auku lisatakse mõned tilgad vett ja kontrollitakse, kas i) eraldub gaasi ja ii) kas gaas süttib. Kui gaas süttib, pole edasine uurimine vajalik, kuna aine loetakse ohtlikuks.

## 1.6.4. 4. etapp

## 1.6.4.1. Seade

Katseseade valmistatakse vastavalt joonisele.

## 1.6.4.2. Katsetingimused

Kontrollida, kas testaine hoiuanumas leidub < 500 µm suuruseid osakesi sisaldavat pulbrit. Kui sellise pulbri sisaldus koguhulgas on üle 1 % mahu järgi või kui materjal on pude, tuleks kogu aine enne katsetusi pulbriks jahvatada, et arvestada osakeste suuruse vähenemisega ladustamisel ja käitlemisel; vastasel juhul uuritakse ainet töötlemata kujul. Katse tuleks läbi viia toatemperatuuril (ca 20 °C) ja atmosfäärirõhul.

1.6.4.3. *Katse tegemine*

Seadme tilklehtrisse viiakse 10–20 ml vett ja seadme koonilisse kolbi viiakse 10 g ainet. Eralduva gaasi ruumala mõõdetakse mis tahes sobiva meetodiga. Tilklehtri kraan avatakse, nii et vesi pääseb koonilisse kolbi, ja käivitatakse stopper. Gaasi eraldumise kiirust mõõdetakse 7 tunni jooksul ühetunniste vahedega. Kui gaasi eraldumise kiirus on selle aja kestel ebaühtlane või kasvab veel selle ajavahemiku lõpus, pikendatakse mõõtmisaega kuni viie päevani. Kui gaasi eraldumise kiirus ületab mis tahes ajahetkel 1 liitri/kg kohta tunnis, võib katse peatada. Katses tuleks teha kolm paralleelkatset.

Kui ei ole teada, mis gaasiga on tegemist, tuleks seda analüüsida. Kui gaas sisaldab väga tuleohtlikke komponente ja ei ole teada, kas summaarne segu on väga tuleohtlik, tuleb valmistada sama koostisega segu ja kontrollida seda vastavalt meetodile A.11.

2. **ANDMED**

Aine loetakse ohtlikuks kui:

- mis tahes katseetapis leiab aset iseeneslik süttimine või
- eraldub tuleohtlikke gaase kiirusega vähemalt 1 liiter/kg aine kohta tunnis.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

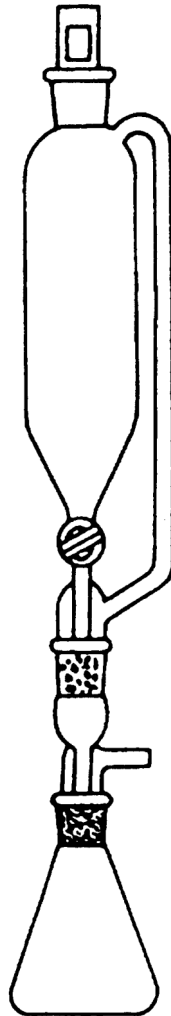
- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid),
- testaine ettevalmistamise andmeid,
- katsete tulemusi (1., 2., 3. ja 4. etapp),
- eralduva gaasi keemilise koostist,
- 4. etapi (1.6.4) teostamisel gaasi eraldumise kiirust,
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärkusi.

4. **VIITED**

1. Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.
2. NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

*Liide***Joonis**

Seade



**A.13. TAHKETE AINETE JA VEDELIKE ISESÜTTIVUS****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katsemeetod on kohaldatav tahketele ja vedelatele ainetele, mis väikestes kogustes toatemperatuuril (ca 20 °C) õhuga kokku puutudes lühikese aja jooksul iseeneslikult süttivad.

Katsemeetod ei hõlma aineid, mis peavad iseeneslikuks süttimiseks toatemperatuuril või kõrgemal temperatuuril õhuga kokku puutuma mitu tundi või päeva.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Ained loetakse isesüttivateks, kui need süttivad või söestuvad punktis 1.6 kirjeldatud tingimustel.

Vedlike isesüttivust võib vaja olla kontrollida ka meetodi A.15 "Isesüttimistemperatuur (vedelikud ja gaasid)" kohaselt.

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Nimetamata.

**1.4. PÕHIMÕTE**

Tahke aine või vedelik kantakse inertsele tugiainele ja viiakse toatemperatuuril viieks minutiks kokkupuutesse õhuga. Kui vedelik sellistes tingimustes ei sütti, imetakse see filterpaberisse ja viiakse toatemperatuuril (ca 20 °C) viieks minutiks kokkupuutesse õhuga. Kui tahke aine või vedelik süttib või kui vedelik süütab või söestab filterpaberi, loetakse aine isesüttivaks.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Korratavus: kuna ohutus on oluline, loetakse aine isesüttivaks juba siis, kui üks tulemus on positiivne.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Seade**

Ca 10 cm läbimõõduga portselantass täidetakse toatemperatuuril (ca 20 °C) umbes 5 mm kõrguselt diatomiitmullaga.

Märkus:

Diatomiitmulla või mis tahes muu saadaval oleva võrreldava inertse ainega simuleeritakse mulda, millesse testaine õnnetusjuhtumi korral võib voolata.

Inertsel kandjal õhuga kokku puutudes mittesüttivate vedelike testimiseks on vaja filterpaberit.

**1.6.2. Katse tegemine****a) Pulbrilised tahked ained**

1–2 cm<sup>3</sup> uuritavat pulbrit valatakse ca 1 m kõrguselt mittesüttivale pinnale ja jälgitakse, kas aine süttib kukkumisel või mahalangemisest viie minuti jooksul.

Katset korratakse kuus korda, kui aine enne ei sütti.

**b) Vedelikud**

Ca 5 cm<sup>3</sup> uuritavat vedelikku valatakse ette valmistatud portselantassi ja jälgitakse, kas aine süttib viie minuti jooksul.

Kui aine kuue katse jooksul ei sütti, viia läbi järgmised katsed:

0,5 ml testaine proov viiakse süstla abil sälgustatud filterpaberile ja jälgitakse, kas filterpaber süttib või söestub viie minuti jooksul vedeliku lisamisest. Katset korratakse kolm korda, kui paber enne ei sütti või söestu.

**2. ANDMED****2.1. TULEMUSTE KÄSITLEMINE**

Katsed võib peatada kohe peale positiivse tulemuse saamist mis tahes katses.

**2.2. HINDAMINE**

Kui aine süttib viie minuti jooksul pärast inertsele tugiainele kandmist ja õhu kätte viimist või kui vedelik süütab või söestab filterpaberi viie minuti jooksul pärast lisamist ja õhu kätte viimist, loetakse aine isesüttivaks.

**3. ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (koostist ja lisandeid),
- katsete tulemusi,
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärke.

**4. VIITED**

1. NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.
2. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

**A.14. PLAHVATUSOHTLIKKUS****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Meetod näeb ette katseskeemi, mille abil kontrollitakse, kas tahke või pastataoline aine on plahvatusohtlik kokkupuutel leegiga (termiline tundlikkus), löögi või hõõrdumise mõjul (mehaaniline tundlikkus) ja kas vedelik on leegi või löögi mõjul plahvatusohtlik.

Meetod koosneb kolmest osast:

- a) termilise tundlikkuse katse (1);
- b) mehaanilise tundlikkuse katse löögi suhtes (1);
- c) mehaanilise tundlikkuse katse hõõrdumise suhtes (1).

Meetodi abil saadakse andmeid teatavate tavapäraste mõjuritega seotud plahvatusohu hindamiseks. Meetod ei ole mõeldud aine plahvatusohtlikkuse kontrollimiseks mis tahes tingimustes.

Meetod sobib ainega seotud plahvatusohu (termilise ja mehaanilise tundlikkuse) määramiseks konkreetsetel direktiivis täpsustatud tingimustel. Meetodi puhul kasutatakse mitut tüüpi katseseadmeid, mis on laias rahvusvahelises kasutuses (1) ja mis annavad tavaliselt usaldusväärseid tulemusi. On selge, et meetod ei ole ammendav. Kirjeldatud seadmete asemel võib kasutada muid seadmeid eeldusel, et need on rahvusvaheliselt tunnustatud ja tulemused on piisavalt sarnased kirjeldatud seadmetel saadavate tulemustega.

Katseid ei ole vaja teha juhul, kui saadavalolevad termodünaamilised andmed (nt tekkesoojus, lagunemissoojus) ja/või teatavate funktsionaalrühmade (2) puudumine struktuurivalemis tõestavad põhjendatud kahtlusega, et toimeaine ei lagune kiirelt gaaside või soojuse eraldumisega (st materjal ei ole plahvatusohtlik). Mehaanilise tundlikkuse katse hõõrdumise suhtes ei ole vedelike puhul nõutav.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Lõhkeaine:

Ained, mis võivad leegi mõjul plahvatada või on kirjeldatud seadmes löögi- või hõõrdetundlikud (või on muus seadmes suurema mehaanilise tundlikkusega kui 1,3-dinitrobenseen).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

1,3-dinitrobenseen, tehniline kristalne saadus, läbib 0,5 mm sõela, hõõrdumis- ja löögimeetoditele.

Perhüdrol-1,3,5-trinitro-1,3,5-triasiin (RDX, heksogeen, tsükloniit, CAS-i nr 121-82-4), kristallitud tsükloheksanooni vesilahusest, märgsõelutud läbi 250 µm sõela ja kinni peetud 150 µm sõelal, kuivatatud 4 tundi 103 ± 2 °C juures, hõõrdumis- ja löögikatsete teise seeria jaoks.

**1.4. PÕHIMÕTE**

Eelkatsed on vajalikud kolme tundlikkuskatse tarvis ohutute tingimuste määramiseks.

**1.4.1. Käsitlemisohutuse katsed (3)**

Ohutuse huvides rakendatakse väga väikestele proovidele (ca 10 mg) enne põhikatsete tegemist kuumutamist gaasileegis vabas õhus, lööke mis tahes tavapärastes seadmetes ja hõõrdumist vasara ja alasi vahel või mis tahes muus hõõrdumisseadmes. Selle eesmärk on kontrollida, kas aine on nii tundlik ja plahvatusohtlik, et ettenähtud tundlikkuskatsetel, eriti termilise tundlikkuse katsetel, tuleb katse läbiviija vigastamise vältimiseks kasutada erilisi ettevaatusabinõusid.

**1.4.2. Termiline tundlikkus**

Meetodi puhul kuumutatakse ainet erinevas läbimõõdus düüsidega plaatidega suletud terashülsis, et kontrollida, kas aine võib tugeva kuumuse ja piiratud ruumala tingimustes plahvatada.

**1.4.3. Mehaaniline tundlikkus (löögitundlikkus)**

Meetodi puhul antakse ainele kindlalt kõrguselt kukutatud kindla massiga löök.

**1.4.4. Mehaaniline tundlikkus (hõõrdetundlikkus)**

Meetodi puhul mõjutatakse tahkeid ja pastataolisi aineid standardsel pinnal määratud koormuse ja suhtelise liikumise abil tekitatud hõõrdumisega.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Täpsustamata.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Termiline tundlikkus (leegi mõju)****1.6.1.1. Seade**

Seade koosneb ühekordselt kasutatavast terashülsist korduvkasutatava sulguriga (joonis 1), mis on paigutatud kaitsvasse kuumutusseadmesse. Kõik hülsid on valmistatud sügavtõmbamisel lehtterasest (vt liidet) ja on 24 mm sisediameetriga, 75 mm pikad ja 0,5 mm paksuse seinaga. Hülsidel on avatud otsas ääriskülje hülsi sulgemiseks düüsigi plaadiga sulguriseadme abil. Sulgur koosneb keskel asuva düüsigi survekindlast plaadist, mis kaheosalise keermega liitmiku (mutter ja keermega võru) abil kindlalt hülsi külge kinnitatakse. Mutter ja keermega võru on valmistatud kroom-mangaanterasest (vt liidet), mis on sädemevaba kuni temperatuurini 800 °C. Düüsigi plaadid on 6 mm paksud, valmistatud kuumuskindlast terasest (vt liidet) ja neid on mitmesuguse avasuurusega.

**1.6.1.2. Katsetingimused**

Tavaliselt uuritakse ainet töötlemata kujul, kuid mõningatel juhtudel, nt kui see on kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud, võib olla vaja see enne katsetusi purustada.

Tahkete ainete puhul määratakse katsetes kasutatav ainekogus kahe-etapilisel proovitäitmisel. Kaalutud hülss täidetakse 9 cm<sup>3</sup> ainega ja tambitakse kogu hülsi ristlõike ulatuses avaldatava 80 N jõuga kokku. Ohutuse huvides või juhtudel, kus proovi füüsikaline olek võib surve mõjul muutuda, võib kasutada muid täitmismeetodeid; nt väga hõõrdetundliku aine puhul ei saa tampimist kasutada. Kui ainet on võimalik kokku suruda, lisatakse veel ainet ja jätkatakse tampimist, kuni hülss on täidetud 55 mm kauguseni üläärest. Määratakse hülsi 55 mm tasemeni täitmiseks vajalik ainekogus ja lisatakse veel kaks lisakogust, mis kumbki 80 N jõuga tampimisel tihendatakse. Seejärel ainet vastavalt vajadusele kas lisatakse ja tambitakse või eemaldatakse, nii et hülss täitub 15 mm kõrguseni üläärest. Järgmiseks tehakse teine proovitäitmine, alustades tambitud ainekogusega, mis moodustab kolmandiku esimesel proovitäitmisel leitud kogumassist. Lisatakse veel kaks lisakogust, mis 80 N jõuga tampimisel tihendatakse ja ainekogus reguleeritakse lisamisel või eemaldamisel 15 mm kõrguseni üläärest. Teisel proovitäitmisel leitud ainekogust kasutatakse edasistes katsetes, täites hülsi kolmes võrdses osas, mis surutakse kokku ruumalani 9 cm<sup>3</sup> mis tahes selleks vajaliku jõuga. (Selleks võib abivahendina kasutada vaherõngaid).

Vedelikud ja geelid viiakse hülsi 60 mm kõrguseni, vältides geelide puhul hoolikalt õhuvahede teket. Keermega võru libistatakse altpoolt hülsi peale, paigaldatakse sobiv düüsiga plaat ja keeratakse mutter peale molübdeendisulfiidmäärde lisamist kinni. Väga oluline on kontrollida, et ainet ei jääks ääriku ja plaadi või keermete vahele.

Kuumutamisel kasutatakse propaani rõhuregulaatori (60–70 mbar) ja voolumõõturiga tööstuslikust balloonnist, millest gaas jagatakse jaotustoru kaudu ühtlaselt (kontrollitakse visuaalselt põletite leekide järgi) nelja põleti vahel. Põletid asetsevad ringikujuliselt ümber katsekambri, nagu on näidatud joonisel 1. Kolme põleti kogukulu on umbes 3,2 liitrit propaani minutis. Kasutada võib muid küttegaase ja põleteid, kuid kuumutamise kiirus peab vastama joonisel 3 täpsustatule. Kõigi seadmete puhul tuleb kuumutamise kiirust regulaarselt kontrollida, kasutades selleks dibutüülfalaadiga täidetud hülsse, nagu on näidatud joonisel 3.

#### 1.6.1.3. Katsete tegemine

Iga katset sooritatakse hülsi purunemiseni või viie minuti möödumiseni kuumutamise algusest. Plahvatusega lõppenuks loetakse katse, mille tulemusel hülss puruneb kolmeks või enamaks tükiks, mis võivad omavahel olla kitsaste metalliribadega ühendatud, nagu on näha joonisel 2. Väiksema arvu tükkidega või purunemiseta lõppenud katset plahvatusega lõppenuks ei loeta.

Alguses tehakse kolm katset 6,0 mm düüsiga plaadiga ja kui plahvatust ei toimu, tehakse teine kolmene katseseeria 2,0 mm düüsiga plaadiga. Kui kummaski katseseerias plahvatust ei toimu, pole edasised katsed vajalikud.

#### 1.6.1.4. Hindamine

Katse loetakse positiivseks, kui kummaski eespool nimetatud katseseerias toimub plahvatus.

### 1.6.2. Mehaaniline tundlikkus (löögitundlikkus)

#### 1.6.2.1. Seade (joonis 4)

Tüüpilise kukkuvate vasaraga seadme põhiosad on valuterasest plokk aluse, alasi, posti, juhttrööbaste, kukkuvate raskuste, päästiku ja proovianumaga. 100 mm (läbimõõt) × 70 mm (kõrgus) terasalasi on kruvitud 230 mm (pikkus) × 250 mm (laius) × 200 mm (kõrgus) terasplokile valatud 450 mm (pikkus) × 450 mm (laius) × 60 mm (kõrgus) alusele. Tõmmatud terastorust liitekohtadeta post on kinnitatud terasploki tagaküljel olevasse fiksaatorisse. Seade on nelja kruviga ankurdatud monoliitsele 60 × 60 × 60 cm betoonplokile nii, et juhttrööpad on täiesti püstsuunalised ja kukkuv raskus langeb vabalt. Kasutada saab nii 5 kg kui 10 kg monoliitset terasest raskusi. Iga raskuse löökpea on valmistatud karastatud terasest, HRC 60–63, ja selle miinimumläbimõõt on 25 mm.

Uuritav proov on suletud löögiseadmesse, mis koosneb kahest koaksiaalsest, üksteise kohal paiknevast monoliitselt terassilindrist õõnsas silindrilises terasjuhtvõrus. Monoliitsed terassilindrid peaksid olema läbimõõduga 10 (– 0,003, – 0,005) mm ja kõrgusega 10 mm ning poleeritud pinna, ümarate nurkadega (kõverusraadius 0,5 mm) ja kõvadusega HRC 58–65. Õõnessilindril peab olema 16 mm välisdiameeter, poleeritud 10 (+ 0,005, + 0,010) mm sisediameeter ja 13 mm kõrgus. Vahealasile (läbimõõt 26 mm ja kõrgus 26 mm) on paigaldatud terasest löögiseade, mille keskosas on tekkivaid gaase läbilaskva perforatsiooniga rõngas.

#### 1.6.2.2. Katsetingimused

Proov peaks olema mahuga 40 mm<sup>3</sup> või muule seadmele sobiva mahuga. Tahkeid aineid tuleks uurida kuivana ja need ette valmistada järgmiselt:

- a) pulbrilised ained sõelutakse (sõela ava 0,5 mm) ja katses kasutatakse kogu sõela läbinud osa;
- b) kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud materjalid purustatakse väiksemateks tükkideks ja sõelutakse; katses kasutatakse sõelumisel saadud fraktsiooni osakeste läbimõõduga 0,5–1 mm ja see fraktsioon peab esindama töötlemata algainet.

Tavaliselt pastadena tarnitavaid materjale tuleks võimalusel uurida kuivana või vähemalt eemaldada eelnevalt võimalikult suur osa lahjendist. Vedelikke testitakse 1 mm vahega alumise ja ülemise terassilindri vahel.

#### 1.6.2.3. Katsete tegemine

Tehakse kuuest katsest koosnev katseseeria, kukutades 10-kilogrammist raskust 0,40 m kõrguselt (40 J). Kui kuue katse jooksul 40 J juures toimub plahvatus, tuleb teha järgmine 6 katsega katseseeria, kukutades 5-kilogrammist raskust 0,15 m kõrguselt (7,5 J). Muudes seadmetes võrreldakse proovi tunnustatud meetodi (nt üles-alla tehnika jne) abil valitud võrdlusainega.

#### 1.6.2.4. Hindamine

Katse tulemus loetakse positiivseks, kui vähemalt ühel korral toimub kirjeldatud katseseadmetega mis tahes katses plahvatus (põlema lahvatamine ja/või paugatused on plahvatusega samaväärsed) või kui proov osutub muus löögikatses tundlikumaks kui 1,3-dinitrobenseen või RDX.

### 1.6.3. Mehaaniline tundlikkus (hõõrdetundlikkus)

#### 1.6.3.1. Seade (joonis 5)

Hõõrdeaparatuur koosneb valatud terasest alusplaadist, millele on paigaldatud hõõrdease. Viimane koosneb fikseeritud portselanpulgast ja liikuvast portselanplaadist. Portselanplaat asub kahel juhttrööpal jooksva kelgul. Kelk on ühendusvarda, ekstsentrilise nuki ja sobiva ülekande abil ühendatud elektrimootoriga nii, et portselanplaati liigutatakse portselanpulga all ainult üks kord 10 mm ulatuses edasi-tagasi. Portselanpulgale rakendatav jõud võib olla 120–360 N.

Tasased portselanplaadid on valmistatud valgest tehnilisest portselanist (jämedusega 9–32 µm) ja nende mõõtmed on 25 mm (pikkus) × 25 mm (laius) × 5 mm (kõrgus). Silindriline portselanpulk on samuti valmistatud valgest tehnilisest portselanist ja on 15 mm pikk, 10 mm läbimõõduga ja karestatud ümarate otsapindadega, mille kõverusraadius on 10 mm.

#### 1.6.3.2. Katsetingimused

Proov peaks olema mahuga 10 mm<sup>3</sup> või muule seadmele sobiva mahuga.

Tahkeid aineid uuritakse kuivana ja nad valmistatakse ette järgmiselt:

- a) pulbrilised ained sõelutakse (sõela ava 0,5 mm) ja katses kasutatakse kogu sõela läbinud osa;
- b) kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud materjalid purustatakse väiksemateks tükkideks ja sõelutakse; katses kasutatakse sõelumisel saadud fraktsiooni osakeste läbimõõduga < 0,5 mm.

Tavaliselt pastadena tarnitavaid materjale tuleks võimalusel uurida kuivana. Kui pastast ei ole kuiva ainet võimalik valmistada, testitakse pastat (eemaldades eelnevalt võimalikult suur osa lahjendist) 0,5 mm paksuse, 2 mm laiuse ja 10 mm pikkuse, šablooni abil tekitatud kihina.

#### 1.6.3.3. Katsete tegemine

Portselanpulk viiakse uuritava proovi kohale ja rakendatakse koormus. Katse ajal peavad karedad jooned portselanplaadil olema liikumissuunaga risti. Tuleb jälgida, et pulk toetuks proovile, et pulga all oleks küllaldane kogus testainet ja et plaat pulga all õigesti liiguks. Pastataolised ained kantakse plaadile 0,5 mm paksuse, 2 × 10 mm avaga šablooni abil. Portselanplaat peab portselanpulga all 0,44 sekundi jooksul 10 mm edasi ja tagasi liikuma. Iga plaadi ja pulga pinna osa võib kasutada ainult ühe korra; pulga mõlemat otsa võib kasutada kaheks katseks ja plaadi kumbagi külge kolmeks katseks.

360 N koormusega tehakse kuuest katsest koosnev katseseeria. Kui nende kuue katse käigus saadakse positiivne tulemus, tehakse 120 N koormusega veel üks kuuest katsest koosnev katseseeria. Muudes seadmetes võrreldakse proovi tunnustatud meetodi (nt üles-alla tehnika jne) abil valitud võrdlusainega.

#### 1.6.3.4. Hindamine

Katse tulemus loetakse positiivseks, kui vähemalt ühel korral toimub kirjeldatud katseseadmetega mis tahes katses plahvatus (pragin ja/või paugatused või põlema lahvamine on plahvatusega samaväärsed) või kui proov vastab muus hõrdekatses võrdväärtsetele tingimustele.

### 2. ANDMED

Aine loetakse direktiivi mõistes plahvatusohtlikuks juhul, kui termilise, löögi- või hõõrdetundlikkuse katses saadakse positiivne tulemus.

### 3. ARUANDLUS

#### 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- testaine tunnusandmeid, koostist, puhtusastet, niiskusesisaldust jne,
- proovi füüsilist olekut ja seda, kas seda on purustatud ja/või sõelutud,
- termilise tundlikkuse katsetes tehtud tähelepanekuid (nt proovi massi, kildude arvu jne),
- mehaanilise tundlikkuse katsetes tehtud tähelepanekuid (nt suure suitsukoguse teke või täielik lagunemine ilma paugatuseta, leekide, sädemete, pragina jne esinemiseta),
- igat tüüpi katsete tulemusi,
- kui kasutatud on muid seadmeid, tuleb esitada teaduslik põhjendus ning tõendid tulemuste vastavuse kohta kirjeldatud seadmetel saadud tulemustega,
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid kommentaare, nagu viiteid katsetele analoogsete ainetega,
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärkusi.

#### 3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE JA HINDAMINE

Katsearuandes tuleb ära märkida kõik tulemused, mis loeti valeks, anomaalseks või mitterepresentatiivseks. Kui mõnda tulemust ei arvestata, tuleb selle kohta lisada selgitus ja muude või täiendavate katsete tulemused. Kui anomaalsele tulemusele ei leidu seletust, tuleb seda arvestada täisväärtusliku tulemusena ja kasutada aine vastaval liigitamisel.

4.

**VIITED**

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.
2. Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.
3. Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, 6-13 and 30-42.
4. NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of explosion risk.

Liide

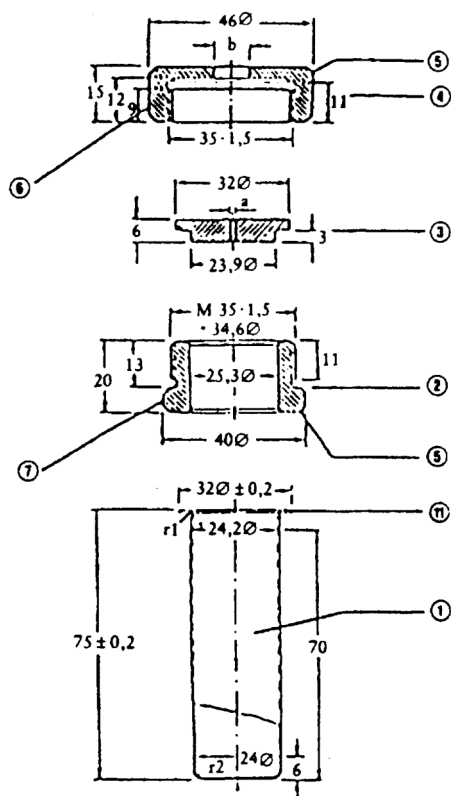
**Näitlik materjalide spetsifikatsioon termilise tundlikkuse katseks (vt DIN 1623)**

- 1) Hülss: materjalispetsifikatsioon nr 1.0336 505 g
- 2) Düüsiga plaat: materjalispetsifikatsioon nr 1.4873
- 3) Keermega võru ja mutter: materjalispetsifikatsioon nr 1.3817

**Joonis 1**

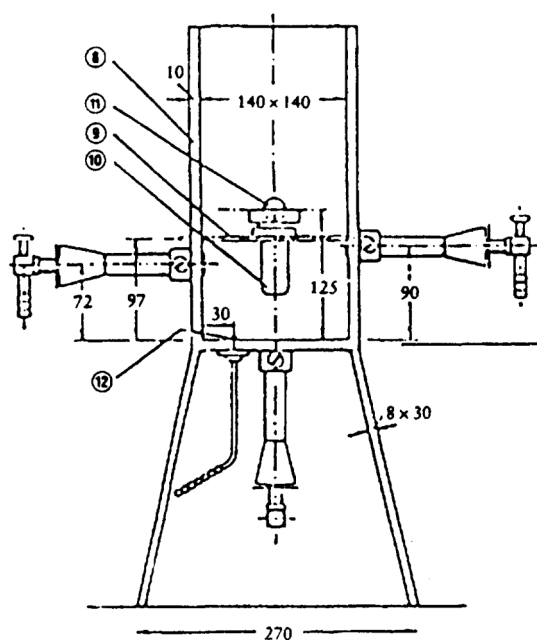
Termilise tundlikkuse katseseade

(Kõik mõõdud millimeetrites)



Joonis 1a. Terashülss ja abivahendid

- (1) hülss
- (1a) välisäärik
- (2) keermega võru, madala hõõrduvusega keere
- (3) düüsiga plaat, läbimõõt  $a = 2,0$  või  $6,0$  mm
- (4) mutter, läbimõõt  $b = 10$  mm
- (5) ümardatud pind
- (6) 2 lamedat osa mutrivõtmele nr 41



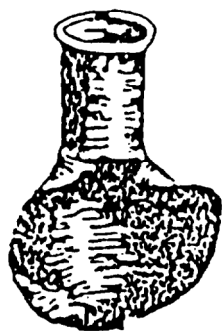
Joonis 1b. Kaitsev kuumutusseade

- (7) 2 lamedat osa mutrivõtmele nr 36
- (8) killunemiskindel kest
- (9) 2 tugivarrast hülssile
- (10) komplekteeritud hülss
- (11) tagumise põleti asukoht; ülejäänud põletid on nähtaval
- (12) süüteelek

## Joonis 2

Termilise tundlikkuse katse

Purunemise näited



Plahvatuseta purunemine



Plahvatuseta purunemine



Plahvatusega purunemine



Plahvatusega purunemine



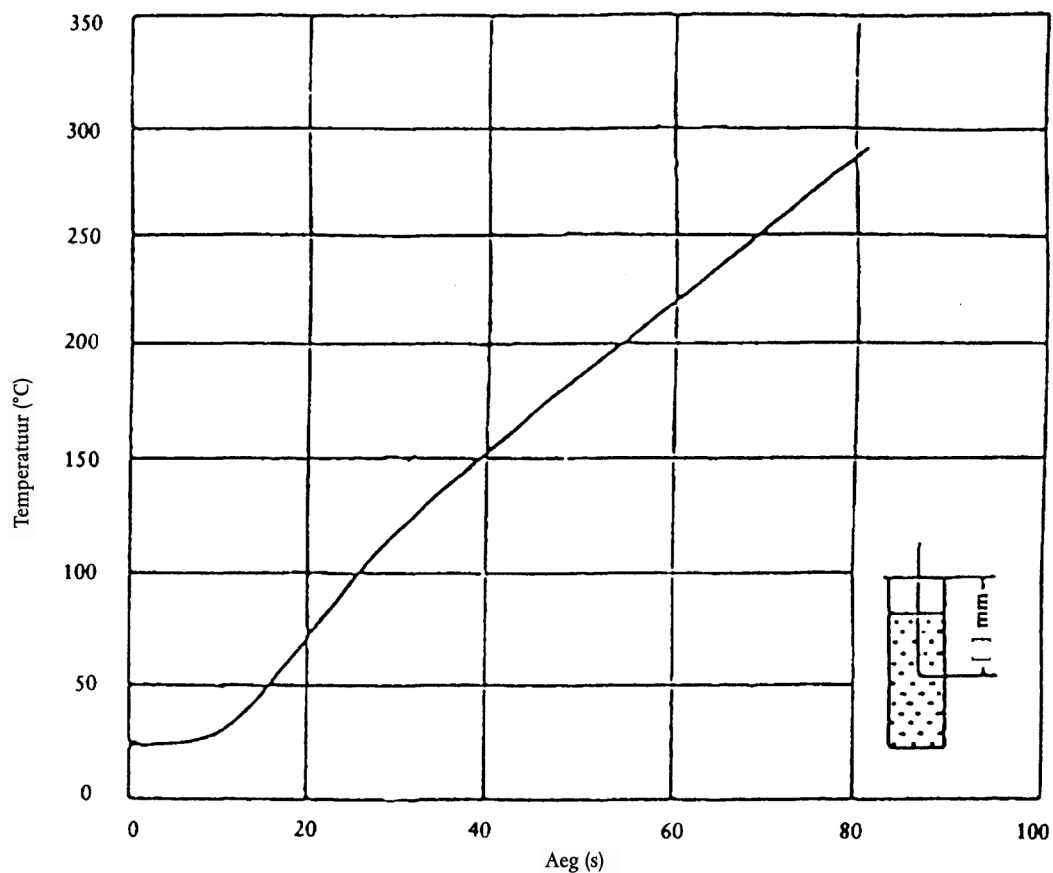
Plahvatusega purunemine



Plahvatusega purunemine

Joonis 3

Kuumutamiskiiruse kaliibrimine termilise tundlikkuse katseks

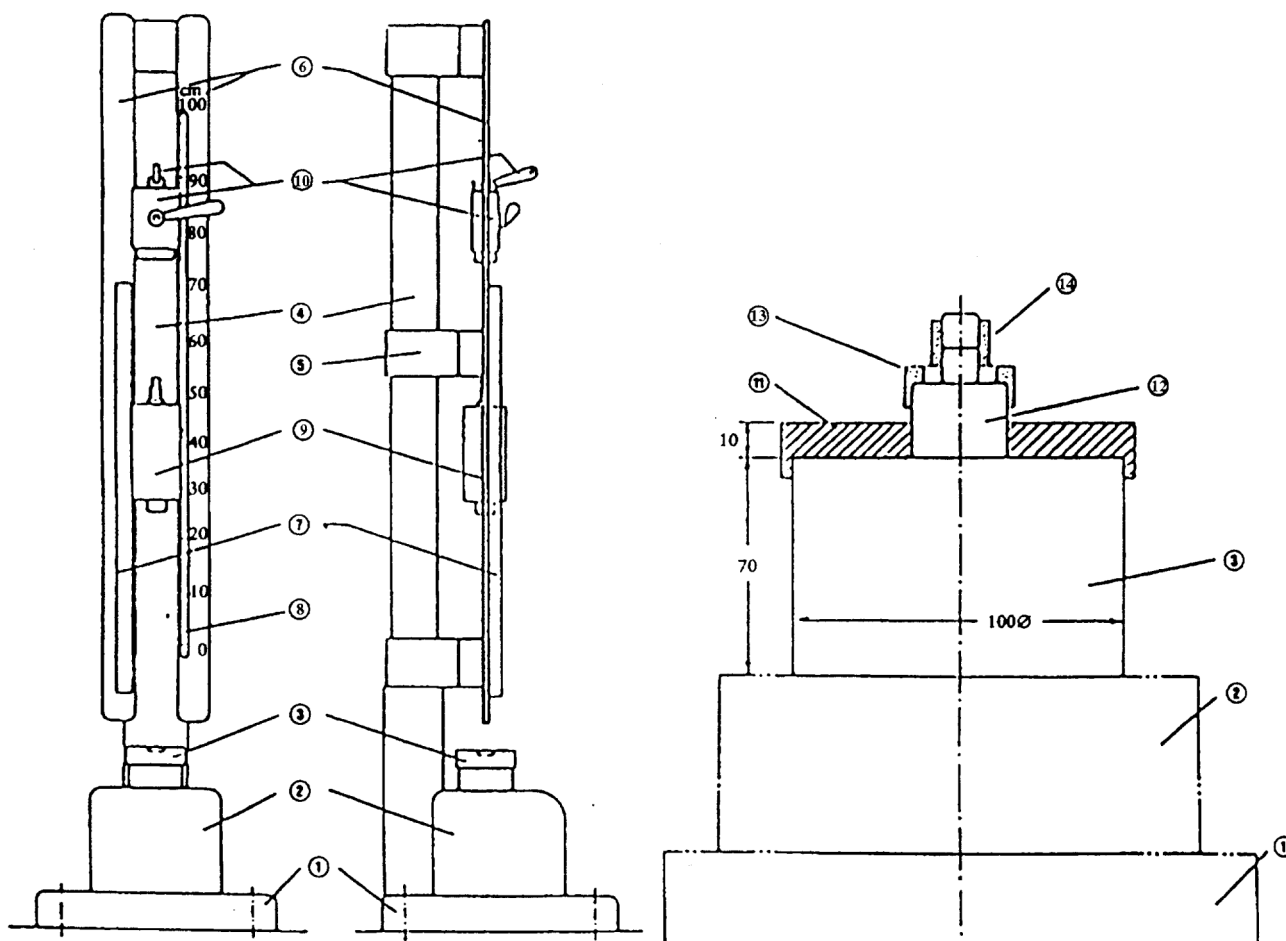


Temperatuuri/aja graafik 27 cm<sup>3</sup> dibutüülftalaadi kuumutamisel suletud (1,5 mm düüsiga plaadiga) hülsis propaani voolukiirusel 3,2 l/min. Temperatuur määratakse 1 mm läbimõõduga roostevabast terasest kattega kromellist/alumellist termopaariga, mis on paigutatud mõõteseadme keskele 43 mm allapoole hülsi serva. Kuumutamise kiirus temperatuurivahemikus 135–285 °C peaks olema 185–215 K/min.

## Joonis 4

Löögikatseseade

(Kõik mõõdud millimeetrites)



Joonis 4a. Langev vasar eest ja küljelt, üldvaade

- (1) alus, 450 × 450 × 60
- (2) terasplokk, 230 × 250 × 200
- (3) alasi, 100 (diameeter) × 70
- (4) post
- (5) keskmine põiktala
- (6) 2 juhtrööbast
- (7) hammaslatt

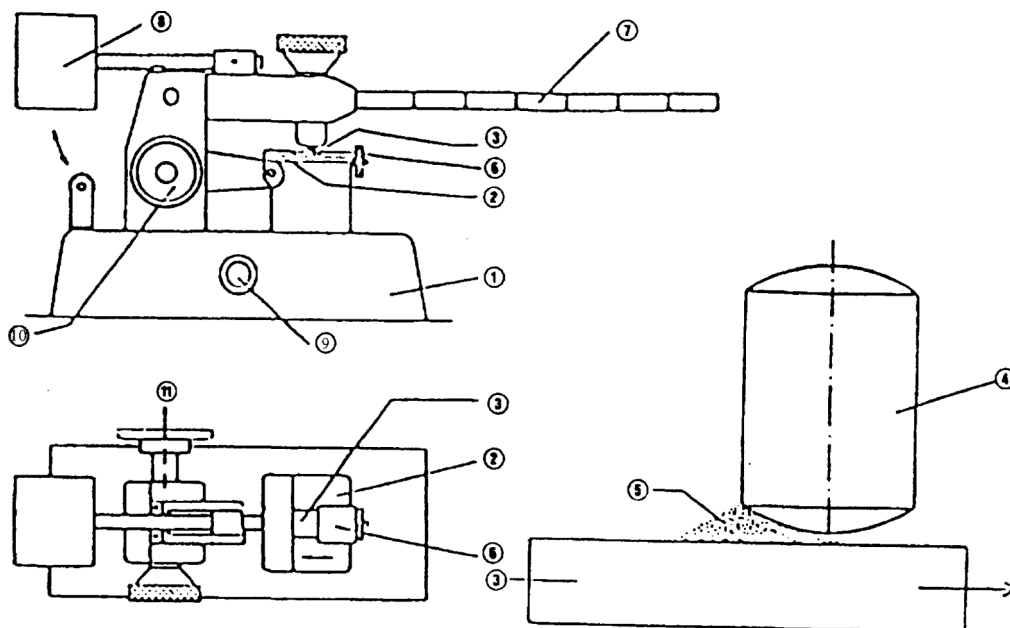
Joonis 4b. Langev vasar, alumine osa

- (8) jaotistega skaala
- (9) langev vasar (langev raskus)
- (10) fiksaator/päästikseade
- (11) juhtplaat
- (12) vahetatav vahealasi, 26 (diameeter) × 26
- (13) düüsidega juhtrõngas
- (14) löögiseade



Joonis 5

Hõõrdetundlikkuse katseseade



Joonis 5a Hõõrdeseade, eestvaade ja pealtvaade

- (1) terasalus
- (2) liikuv kelk
- (3) portselanplaat,  $25 \times 25 \times 5$  mm, kelgul
- (4) fikseeritud portselanpulk,  $10$  (diameeter)  $\times 15$  mm
- (5) uuritav proov, ligikaudu  $10 \text{ mm}^3$

Joonis 5b Pulga algspositsioon proovil

- (6) pulgahoidja
- (7) koormusõlg
- (8) vastukaal
- (9) lüliti
- (10) ratas kelgu algasendisse viimiseks
- (11) elektrimootori suund

**A.15. ISESÜTTIMISTEMPERATUUR (VEDELIKUD JA GAASID)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Lõhkeaineid ja tavalisel temperatuuril õhuga kokkupuutel süttivaid aineid ei tohiks selles katses uurida. Katsemeetod on kohaldatav gaasidele, vedelikele ja aurudele, mis õhu juuresolekul kuuma pinnaga kokku puutudes süttivad.

Katalüütilised lisandid, pinnamaterjal või katseanuma suurem maht võivad isesüttimistemperatuuri oluliselt alandada.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Isesüttivuse määra väljendatakse isesüttimistemperatuurina. Isesüttimistemperatuur on madalaim temperatuur, mille juures testaine katsemeetodis määratletud tingimustel õhuga segatuna süttib.

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Võrdlusained on loetletud standardites (vt 1.6.3). Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

**1.4. PÕHIMÕTE**

Meetodi kohaselt määratakse kambri siseseina minimaalne temperatuur, mis põhjustab kambrisse süstitud gaasi, auru või vedeliku süttimise.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Korratavus varieerub vastavalt isesüttimistemperatuuri vahemikule ja kasutatavale katsemeetodile.

Tundlikkus ja spetsiifilisus sõltuvad kasutatavast katsemeetodist.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Seade**

Katseseadet kirjeldatakse punktis 1.6.3 viidatud meetodis.

**1.6.2. Katsetingimused**

Testaine proovi uuritakse punktis 1.6.3 viidatud meetodi kohaselt.

**1.6.3. Katse tegemine**

Vt IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

**2. ANDMED**

Registreerige katsetemperatuur, atmosfäärirõhk, kasutatud proovikogus ja ajavahemik süttimiseni.

### 3. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid),
- kasutatud proovikogust ja atmosfäärirõhku,
- kasutatud katseseadet,
- mõõtmistulemusi (katsetemperatuure, süttimistulemusi ja süttimiseni kulunud ajavahemikke),
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärke.

### 4. VIITED

Puuduvad.

## A.16. TAHKETE AINETE SUHTELINE ISESÜTTIMISTEMPERatuur

### 1. MEETOD

#### 1.1. SISSEJUHATUS

Lõhkeaineid ja tavalisel temperatuuril õhuga kokkupuutel süttivad aineid ei tohiks selles katses uurida.

Katse annab eelteavet tahkete ainete isesüttivuse kohta kõrgematel temperatuuridel.

Kui aine reaktsioonil hapnikuga või eksotermilisel lagunemisel tekkiv soojus ei haju küllalt kiiresti keskkonda, leiab aset isesüttimiseni viiv isekuumenemine. Seega leiab isesüttimine aset siis, kui soojuse tekkekiirus ületab soojuskao kiiruse.

Katse on kasutatav tahkete ainete esialgse sõelkatsena. Arvestades tahkete ainete süttimis- ja põlemisprotsesside keerukust, tuleks selle katsemeetodi abil leitud isesüttimistemperatuuri kasutada ainult võrdlemiseks.

#### 1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Selle meetodi abil leitud isesüttimistemperatuur on madalaim temperatuur (°C), mille juures kindel ainekogus määratletud tingimustel süttib.

#### 1.3. VÕRDLUSAINE

Puudub.

#### 1.4. PÕHIMÕTE

Uuritava aine kindlaksmääratud kogus viiakse toatemperatuuril ahju ja registreeritakse temperatuuri/aja kõver proovi keskosas ahju temperatuuri tõstmisel kiirusega 0,5 °C/min temperatuurini 400 °C või aine sulamistemperatuurini, kui viimane on madalam. Käesoleva katse kohaselt loetakse isesüttimistemperatuuriks ahju temperatuur, mille juures proovi temperatuur isekuumenemise tulemusel 400 °Cni jõuab.

## 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Puuduvad.

## 1.6. MEETODI KIRJELDUS

## 1.6.1. Seade

## 1.6.1.1. Ahi

Juhitava temperatuuriga laboriahi (mahuga umbes 2 liitrit), millel on loomulik õhuvahetus ja plahvatuskaitseklapp. Vältimaks võimalikku plahvatusohtu, ei tohi eralduvaid lagunemisgaase lasta elektrikütteseadmetega kokku puutuda.

## 1.6.1.2. Traatvõrgust kuubik

Tükk roostevabast terasest traatvõrku 0,045 mm võrgusilmaga lõigatakse välja vastavalt joonisel 1 toodud skeemile. Võrk volditakse kokku ja kinnitatakse traadiga nii, et tekib avatud ülaosaga kuubik.

## 1.6.1.3. Termopaarid

Kasutatakse sobivaid termopaare.

## 1.6.1.4. Meerik

Sobib mis tahes kahe kanaliga meerik, mis on kalibreeritud temperatuurivahemikus 0–600 °C või vastavas pingevahemikus.

## 1.6.2. Katsetingimused

Aineid uuritakse töötlemata kujul.

## 1.6.3. Katse tegemine

Kuubik täidetakse uuritava ainega ja koputatakse õrnalt, misjärel lisatakse veel ainet, kuni kuubik on täielikult täidetud. Kuubik riputatakse seejärel toatemperatuuril oleva ahju keskele. Temperatuuri registreerimiseks paigutatakse üks termopaar kuubiku keskele ning teine kuubiku ja ahjuseina vahele.

Ahju ja proovi temperatuur registreeritakse pidevalt ahju temperatuuri tõstmisel kiirusega 0,5 °C/min temperatuurini 400 °C või aine sulamistemperatuurini, kui viimane on madalam.

Aine süttimisel näitab proovis olev termopaar temperatuuri järsku tõusu üle ahju temperatuuri.

## 2. ANDMED

Hindamisel on oluline ahju temperatuur, mille juures jõuab proovi temperatuur isekuumenemise tulemusena 400 °Cni (vt joonist 2).

## 3. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- uuritava aine kirjeldust,
- mõõtmistulemusi, sh temperatuuri/aja kõverat,
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärke.

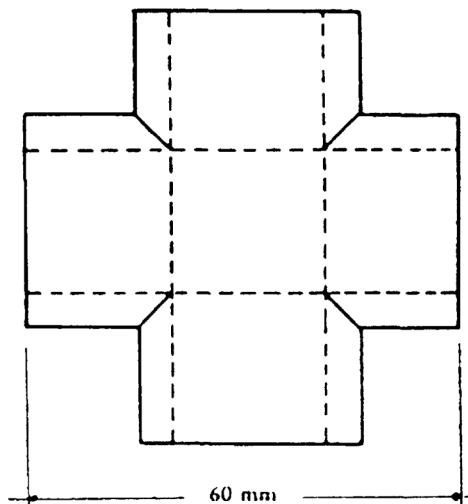
4.

**VIITED**

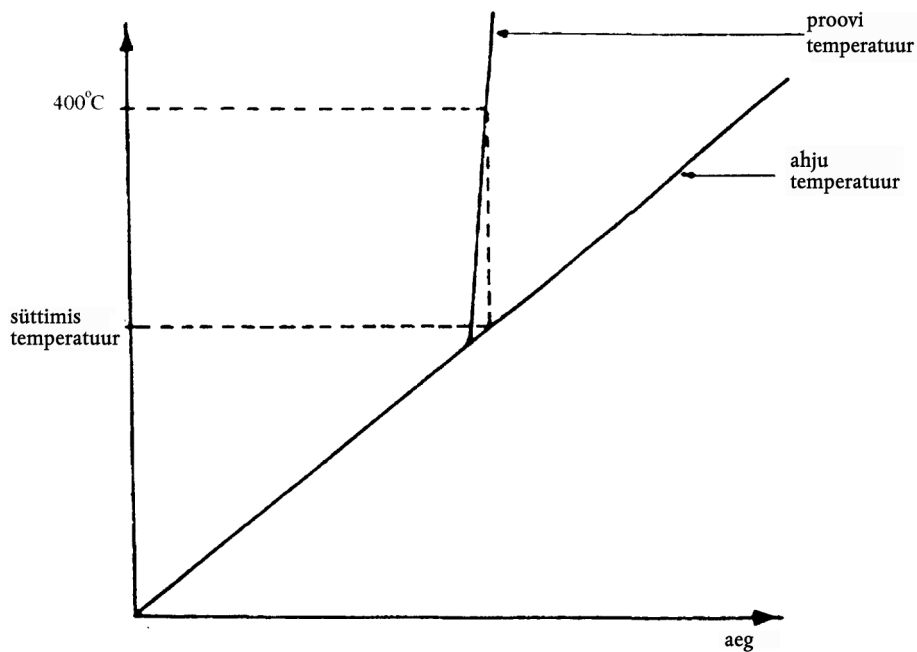
1. NF T 20-036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

**Joonis 1**

20 mm katsekuubiku skeem

**Joonis 2**

Tüüpiline temperatuuri/aja kõver



**A.17. OKSÜDEERIVAD OMADUSED (TAHKED AINED)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine võimalikku plahvatusohtlikkust.

Katset ei saa kasutada vedelike, gaaside, plahvatusohtlike või väga tuleohtlike ainete ega orgaaniliste peroksiidide puhul.

Katset ei ole vaja teha juhul, kui toimeaine struktuurivalemi kontrollimisel ei jää põhjendatud kahtlust, et toimeaine reageerib põleva materjaliga eksotermiliselt.

Kontrollimaks, kas katse tegemisel tuleks kasutada erilisi ettevaatusabinõusid, tuleks teha eelkatse.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Põlemisaeg: reaktsiooniaeg (sekundites), mis kulub reaktsioonivööndi levikuks piki kuhilat vastavalt punktis 1.6 kirjeldatud protseduurile.

Põlemiskiirus: väljendatakse millimeetrites sekundi kohta.

Suurim põlemiskiirus: suurim põlemiskiiruse väärtus, mis on mõõdetud 10–90 % oksüdeerijasisaldusega (massi järgi) segudes.

**1.3. VÕRDLUSAINE**

Võrdlusainena kasutatakse nii katses kui ka eelkatses analüüsipuhast baariumnitraati.

Võrdlussegu on selline punkti 1.6 kohaselt valmistatud baariumnitraadi ja pulbertselluloosi segu, millega saavutatakse suurim põlemiskiirus (tavaliselt 60 % baariumnitraadi sisaldusega (massi järgi) segu).

**1.4. PÕHIMÕTE**

Ohutuse huvides tehakse eelkatse. Kui eelkatse näitab selgelt, et testainel on oksüdeerivad omadused, pole edasine kontrollimine vajalik. Vastupidisel juhul viiakse aine kohta läbi täiemahuline katseprogramm.

Täiemahulises katseprogrammis segatakse uuritavast ainest ja kindlaksmääratud põlevast ainest mitmesugustes vahekordades segusid. Igast segust tehakse seejärel kuhi ja süüdatakse see ühest otsast. Leitud suurimat põlemiskiirust võrreldakse võrdlussegu suurima põlemiskiirusega.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Vajadusel võib kasutada mis tahes peenestamis- ja segamismeetodeid eeldusel, et kuues eraldi katses määratud suurimad põlemiskiirused ei erine aritmeetilisest keskmisest rohkem kui 10 %.

## 1.6. MEETODI KIRJELDUS

## 1.6.1. Ettevalmistused

## 1.6.1.1. Testaine

Uuritava proovi osakeste suurust vähendatakse järgmisel meetodil alla 0,125 mm: testaine sõelutakse, seejärel peenestatakse sõelale jäänud osa ja korratakse protseduuri senikaua, kuni kogu proov on sõela läbinud.

Kasutada võib kvaliteedinõuetele vastavaid mis tahes peenestamis- ja sõelumismeetodeid.

Enne segu valmistamist kuivatatakse ainet 105 °C juures konstantse massi saavutamiseni. Kui uuritava aine lagunemistemperatuur on alla 105 °C, kuivatatakse aine sobival madalamal temperatuuril.

## 1.6.1.2. Põlevaine

Põlevainena kasutatakse pulbertselluloosi. Tselluloos peaks olema õhukese kihi kromatograafias või kolonn-kromatograafias kasutatavat tüüpi. Sobivaks on osutunud tselluloositiüp, mille kiupikkused jäävad 85 % ulatuses vahemikku 0,020–0,075 mm. Tselluloosipulber sõelutakse läbi 0,125 mm avasuurusega sõela. Kogu katse kestel tuleb kasutada samast partiist pärit tselluloosi.

Enne segu valmistamist kuivatatakse pulbertselluloosi 105 °C juures konstantse massi saavutamiseni.

Kui eelkatses kasutatakse puidutolmu, valmistatakse okaspuu puidutolm ette järgmiselt: kogutakse fraktsioon, mis läbib 1,6 mm avasuurusega sõela, segatakse tolmu põhjalikult ja kuivatatakse seda neli tundi 105 °C juures kõige rohkem 25 mm paksuses kihis. Tolm jahutatakse ja suletakse kuni kasutamiseni õhukindlalt võimalikult täis mahutisse; soovitatav on tolmu kasutada 24 tunni jooksul kuivatamisest.

## 1.6.1.3. Süüteallikas

Süüteallikana tuleks kasutada vähemalt 5 mm läbimõõduga gaasipõleti kuuma leeki. Muu süüteallika kasutamisel (nt katse läbiviimisel inertses atmosfääris) tuleks esitada selle kirjeldus ja kasutamise põhjendus.

## 1.6.2. Katse tegemine

Märkus:

Oksüdeerijate segusid tselluloosi või puidutolmuga tuleb vaadelda potentsiaalselt plahvatusohtlikuna ja käsitleda nõutava ettevaatusega.

## 1.6.2.1. Eelkatse

Kuivatatud aine segatakse hoolikalt kuivatatud tselluloosi või puidutolmuga vahekorras 2 osa testainet 1 osa tselluloosi või puidutolmu kohta ja tehakse segust väike koonusekujuline kuhi mõõtudega 3,5 cm (aluse läbimõõt) × 2,5 cm (kõrgus), täites selleks ilma tampimata koonusekujulise vormi (nt suletud põhjaga laborilehtri).

Kuhi asetatakse mittesüttivale, mittepoorsele ja madala soojusjuhtivusega alusplaadile. Katse viiakse läbi tõmbekapis vastavalt kirjeldusele punktis 1.6.2.2.

Süüteallikas viiakse vastu kuhilat. Jälgitakse järgneva reaktsiooni tugevust ja kestust ning see registreeritakse.

Kui reaktsioon on tugev, loetakse aine oksüdeerivaks.

Kui tulemused on kaheldavad, tehakse allpool kirjeldatud täiemahuline katseprogramm põlemisribaga.

1.6.2.2. *Põlemisribakatse*

Valmistada 10 % kaupa kasvava oksüdeerijasisaldusega oksüdeerija/tselluloosi segud vahemikus 10–90 % oksüdeerijat (massi järgi). Piiripealsetel juhtudel tuleks suurima põlemiskiiruse täpsemaks mõõtmiseks kasutada vahepealsete kontsentratsioonidega oksüdeerija/tselluloosi segusid.

Kuhi tekitatakse vormi abil. Vorm on metallist, 250 mm pikk ja kolmnurkse läbilõikega, 10 mm sisemise kõrguse ja 20 mm sisemise laiusega. Vormi kummalegi küljele paigaldatakse pikisuunas külgiireteks kaks metallplaati, mis ulatuvad 2 mm üle kolmnurkse vao ülemise ääre (vt joonist). Seade täidetakse mõningases liias seguga, ilma seda tihendamata. Vorm kukutatakse seejärel 2 cm kõrguselt tugevale aluspinnale ja allesjäänud üleliigne aine tõmmatakse viltuse paberilehega pealt ära. Külgmised piirded eemaldatakse ja allesjäänud pulbrit silutakse rulliga. Vormi peale paigaldatakse seejärel mittesüttiv, mittepoorne ja madala soojusjuhtivusega alusplaat, keeratakse vorm koos plaadiga ümber ja vorm eemaldatakse.

Riba paigutatakse tõmbekapi alla õhu liikumise suunaga risti.

Õhu liikumiskiirus peab olema piisav, takistamaks suitsu levikut laborisse ning seda tuleb katse jooksul konstantsena hoida. Seadme ümber tuleks paigaldada tõmbevõrk.

Tselluloosi ja mõnede uuritavate ainete hügroskoopsuse tõttu tuleb katse teha võimalikult kiiresti.

Riba üks ots süüdatakse leegi abil.

Peale seda, kui reaktsioonivöönd on levinud esimesed 30 mm, mõõta järgneva 200 mm ulatuses reaktsiooni leviku aeg.

Katse tehakse võrdlusainega ja vähemalt korra kõigi testaine/tselluloosi segudega.

Kui leitav suurim põlemiskiirus ületab oluliselt võrdlussegu põlemiskiirust, võib katse peatada; muul juhul korratakse katset viis korda, kasutades kolme suurima põlemiskiirusega segu.

Kui arvatakse, et positiivne tulemus on ekslik, korratakse katset sama suurte osakestega inertse ainega, näiteks diatomiidiga tselluloosi asemel. Katset võib korrata ka kõrgeima põlemiskiirusega testaine/tselluloosi seguga inertses atmosfääris (hapnikusisaldus < 2 % mahu järgi).

2. **ANDMED**

Ohutuse huvides loetakse uuritava aine oksüdeerivaid omadusi iseloomustavaks suuruseks suurim põlemiskiirus, mitte selle keskmine väärtus.

Hindamise seisukohast on oluline antud seguga kuuest katsest koosnevas seerias saadud suurim põlemiskiiruse väärtus.

Koostada graafik, mis näitab iga segu põlemiskiiruse suurima väärtuse sõltuvust oksüdeerija kontsentratsioonist. Graafikult loetakse suurim põlemiskiirus.

Kuus ühes katses suurima põlemiskiirusega segu mõõtmisel saadud põlemiskiiruse väärtust ei tohi aritmeetilisest keskmisest erineda rohkem kui 10 %, vastasel korral tuleb peenestamis- ja segamismeetodeid täiustada.

Leitud suurimat põlemiskiirust võrrelda võrdlussegu suurima põlemiskiirusega (vt 1.3).

Kui katse tehakse inertses atmosfääris, võrreldakse suurimat reaktsioonikiirust võrdlussegu vastava näitajaga inertses atmosfääris.

**3. ARUANNE****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- testaine tunnusandmeid, koostist, puhtusastet, niiskusesisaldust jne,
- proovi mis tahes käitlemist (nt peenestamist, kuivatamist jne),
- katsetes kasutatud süüteallikat,
- mõõtmiste tulemusi,
- reaktsiooni tüüpi (nt kiire põlemine pinnal, põlemine kogu massis, mis tahes andmeid põlemissaaduste kohta,...),
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid märkusi, sh eelkatses test- ja võrdlusainega tekkinud reaktsiooni tugevuse kohta (leegiga, sädemetega, suitsuga, hõõgumisega reaktsioon jne) ning nii test- kui ka võrdlusaine puhul eelkatses/sõelkatses kulunud aega,
- inertse ainega tehtud katsete tulemusi, kui neid tehti,
- inertses atmosfääris tehtud katsete tulemusi, kui neid tehti.

**3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE**

Aine loetakse oksüdeerivaks, kui:

- a) eelkatses ilmneb tugev reaktsioon;
- b) uuritavate segude suurim täiemahulises katseprogrammis leitud põlemiskiirus on suurem tselluloosist ja baariumnitraadist valmistatud võrdlussegu suurimast põlemiskiirusest või sellega võrdne.

Ekslike positiivsete tulemuste vältimiseks tuleks tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta ka aine inertse materjaliga segamisel ja/või inertses atmosfääris tehtud katsete tulemusi.

**4. VIITED**

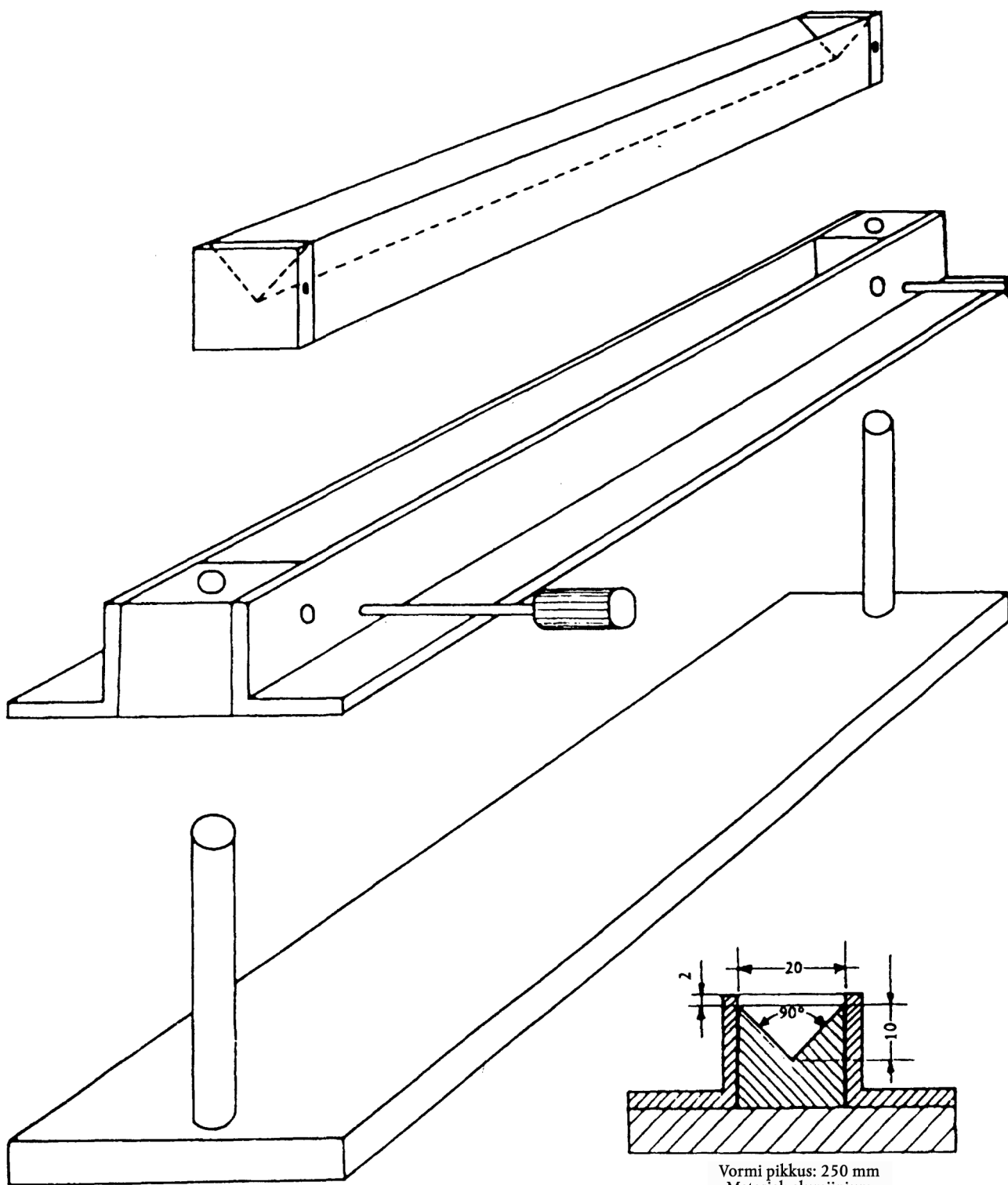
1. NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Liide

**Joonis**

Vorm ja abivahendid põlemisriba valmistamiseks

(Kõik mõõdud millimeetrites)

Vormi pikkus: 250 mm  
Materjal: alumiinium

**B OSA: MÜRGISUSE MÄÄRAMISE MEETODID****ÜLDINE SISSEJUHATUS: B OSA****A. SISSEJUHATUS**

Vt üldist sissejuhatust.

**B. MÕISTED**

- i) Ägeda mürgisusena käsitatakse kahjulikku mõju, mis avaldub kindla aja (tavaliselt 14 päeva) jooksul pärast aine ühekordse annuse manustamist
- ii)  $LD_{50}$  (keskmine surmav annus) on aine statistiliselt leitud ühekordne annus, mis eeldatavalt põhjustab 50 % annustatud loomade surma.  $LD_{50}$  väärtust väljendatakse testaine kaaluna katselooma kaaluühiku kohta (milligrammides kilogrammi kohta)
- iii)  $LC_{50}$  (keskmine surmav kontsentratsioon) on aine statistiliselt leitud kontsentratsioon, mis eeldatavalt põhjustab 50 % sellega kokkupuutes olevate või kindla kestusega kokkupuutes olnud loomade surma kindlaksmääratud aja jooksul pärast kokkupuudet.  $LC_{50}$  väärtust väljendatakse testaine kaaluna standardses ruumalas õhus (milligrammides liitri kohta)
- iv) Kahjuliku toimeteta annus on katses kasutatud suurim annus või kokkupuute ulatus, mille puhul ei ilmne märgatavaid mürgisuse märke
- v) Alaägeda/subkroonilise mürgisusena käsitatakse kahjulikku mõju, mis avaldub katseloomadel korduva igapäevase annustamise tagajärjel või kokkupuutel kemikaaliga lühikese osa jooksul nende eeldatavast elukestusest
- vi) Kõrgeim talutav annus (MTD) on kõrgeim annus, mille juures loomadel ilmnevad mürgisuse märgid, kuid ei ilmne olulist toimet elumusele võrreldes katsega, kus seda kasutatakse
- vii) Naha ärritus on pöörduvate põletikuliste muutuste teke nahas pärast testaine manustamist
- viii) Silma ärritus on pöörduvate muutuste teke silmas pärast testaine manustamist silma esipinnale
- ix) Naha sensibiliseerimine (allergiline kontaktdermatiit) on naha immunoloogiline reaktsioon ainele

*Spetsiifilised mõisted mürgisuse kohta sissehingamisel*

- aerosooliks nimetatakse õhus homogeenselt dispergeeritud osakesi (tahkeid ja/või vedelaid),
- aerodünaamiline diameeter on kõnealuse osakese omaga võrdse lõpliku sadenemiskiirusega, ühikulise tihedusega ( $1 \text{ g cm}^{-3}$ ) kerakujulise osakese diameeter,
- masskeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on arvutuslik aerodünaamiline diameeter, mis jagab massi järgi arvestatava osakeste suurusjaotuse pooleks,
- geomeetriline standardhälve (GSD) on hinnangulise 84-protsentiili ja 50-protsentiili suhe ja näitab kumulatiivse osakeste suuruse jaotuskõvera tõusu, eeldusel et suurusjaotus on logaritmnormaalne.

*Spetsiifilised mõisted ägeda suukaudse mürgisuse määramisel kindla annuse meetodi kohaselt*

- ilmne mürgisus viitab testaine manustamisele järgnenud mürgitusnähtudele, mis on nii tõsised, et kõrgema annuse manustamine võib olla surmav,
- kriitiline annus on kõrgeim neljast kindlast annusemäärast, mida võib manustada, põhjustamata seejuures ühendiga seotud suremust (sh humaanne surmamine).

### C. MUTAGEENSUS (sh algne kantserogeensuse sõelkatse)

Aine mutageensuse algeks hindamiseks on vaja koguda andmeid kahe mõjutusobjektikategooria, nimelt geenmutatsioonide ja kromosoomaberratsioonide kohta.

Järgmistes katsetes hinnatakse kaht mõjutusobjekti:

- i) geenide (punkt)mutatsioonide tekke katsed prokariootsetes rakkudes, näiteks *Salmonella typhimurium*'i rakkudes; kasutada võib ka *Escherichia coli* rakke. Emma-kumma katseorganismi võib valida vastavalt uuritava kemikaali iseloomule;
- ii) kromosoomaberratsioonide tekke katsed *in vitro* kasvatatud imetajarakkudes; kasutada võib ka *in vivo* meetodit (mikrotuuma katset või metafaasi analüüsi luuüdi rakkudes). Vastunäidustuste puudumisel tuleb siiski eelistada *in vitro* meetodeid.

### D. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Loomkatsete ja *in vitro* katsete tulemused on inimesele kohaldatavad ainult piiratud määral ja seda tuleb silmas pidada ka katsetulemuste hindamisel ja tõlgendamisel.

Keemiliste ainete võimaliku mõju hindamisel inimpopulatsioonile võivad osutada asjakohaseks andmed kahjuliku mõju kohta inimestele.

### E. KIRJANDUSVIITED

Toksikoloogia on arenev eksperimentaalteadus ja iga teema kohta on olemas küllaldaselt kirjandust. Asjakohast teavet võib leida OECD katsesuunistest.

### Lisamärkused

#### *Loomade hooldamine*

Keskkonnatingimuste range kontroll ja loomade korralik hooldamine on mürgisusuuringutes väga olulised.

- i) Pidaistingimused

Keskkonnatingimused katseloomade kambrites ja tarandikes peavad olema vastavale katseliigile sobivad. Rottidele, hiirtele ja merisigadele sobiv õhutemperatuur on  $22 \pm 3$  °C suhtelise õhuniiskusega 30–70 %, küülikutele sobib õhutemperatuur  $20 \pm 3$  °C suhtelise õhuniiskusega 30–70 %.

Mõned katsemeetodid on temperatuuri mõju suhtes eriti tundlikud, sellistel juhtudel on sobivate tingimuste üksikasjalik kirjeldus lisatud katsemeetodi kirjelduse juurde. Kõigis mürgisusuuringutes tuleb jälgida ja registreerida temperatuuri ja õhuniiskust ning lisada vastavad andmed ka uuringu lõpparuandesse.

Kunstvalguse kasutamisel peaks valguse ja pimeduse tsükkel üldjuhul hõlmama 12 tundi valget ja 12 tundi pimedat aega. Valguse-pimedusetsükli üksikasjad tuleb registreerida ja lisada vastavad andmed uuringu lõpparuandesse.

Loomkatsete aruannetes on oluline ära märkida kasutatav puuritüüp ja igas puuris peetavate loomade arv nii kemikaaliga kokkupuute ajal kui ka mis tahes sellele järgneval vaatlusperioodil.

ii) Söötministimused

Toidusedel peaks vastama katseliigi kõigile toitainevajadustele. Testainete manustamisel loomadele sööda kaudu võib viimase toiteväärtus testaine ja toidukomponentide vahelise vastasmõju tõttu väheneda.

Katsete tulemuste tõlgendamisel tuleks sellise reaktsiooni võimalust arvesse võtta.

Sööt ei tohiks segavates kontsentratsioonides sisaldada teadaolevaid mürgisust mõjutavaid saasteaineid.

*Loomade heaolu*

Katsemeetodite väljatöötamisel võeti igati arvesse katseloomade heaolu. Allpool esitatakse lühidalt mõned näited, loetelu ei ole ammendav. Täpset sõnastust ja/või tingimusi tuleks lugeda katsemeetodite tekstist:

- ägeda suukaudse mürgisuse määramisel võetakse kasutusele alternatiivne "kindla annuse meetod". See meetod ei lõpe katseloomade surmaga. Selles kasutatakse vähem katseloomi ning see põhjustab vähem valu ja kannatusi kui klassikaline ägeda suukaudse mürgisuse määramise meetod,
- kasutatavate loomade arvu on vähendatud teaduslikult vastuvõetava miinimumini: meetodite B.1 ja B.3 puhul kasutatakse ühe annusemäära kohta ainult 5 samast soost katselooma; naha sensibiliseerimise uurimisel merisigadega läbiviidava maksimeerimiskatse abil (meetod B.6) ainult 10 looma (ja 5 negatiivses kontrollrühmas); positiivse kontrollrühma jaoks vajalike loomade arvu mutageensuse *in vivo* uurimisel on samuti vähendatud (meetodid B.11 ja B.12),
- loomade valu ja kannatused on katse käigus samuti viidud miinimumini: tõsistele ja kestvatele kannatustele ja valule viitavate märkidega loomad võib vaja olla humaanselt surmata; testaineid pole vaja annustada moel, mis teadaolevalt tekitab märgatavat söövitavatest või ärritavatest omadustest tingitud valu ja kannatusi (meetodid B.1, B.2 ja B.3),
- katseid liiga kõrgete annustega välditakse piirsalduskatsete kasutuselevõttuga, seda lisaks ägeda mürgisuse katsetele (meetodid B.1, B.2 ja B.3) ka *in vivo* mutageensuse katsete puhul (meetodid B.11 ja B.12),
- praegune ärritavuse uurimise strateegia võimaldab küllaldase teadusliku tõendusmaterjali olemasolul katse ära jätta või piirduda katsega ühel loomal.

Selliseks tõendusmaterjaliks sobivad aine füüsikalised-keemilised omadused, muude juba läbi viidud katsete tulemused või põhjalikult kontrollitud *in vitro* katsete tulemused. Näiteks kui ainega on piirsalduskatse annusemääral tehtud nahakaudse ägeda mürgisuse uuring (meetod B.3) ja naha ärritust ei täheldatud, võib edasine naha ärrituse uuring (meetod B.4) olla tarbetu; materjalidega, mille juures on naha ärrituse uuringul (meetod B.4) täheldatud ilmselt söövitavust või tõsist nahka ärritavat mõju, ei tohiks enam teha järgnevaid silmi ärritava toime uuringuid (meetod B.5).

**B.1 ÄGE MÜRGISUS (SUUKAUDNE)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÕISTED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Testaine manustatakse suukaudselt sondi kaudu astmeliste annustena mitmele katseloomade rühmale nii, et üks rühm saab ühesuguse annuse. Annuste valik võib põhineda annustamisvahemiku määramise katsel. Järgnevalt jälgitakse mõju ja surmajuhtumite esinemist. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad. Meetod on peamiselt mõeldud näriliste uurimiseks.

Tõsistele ja kestvatele kannatustele ja valule viitavate märkidega loomad võib vaja olla humaanselt surmata. Testaineid pole vaja annustada moel, mis teadaolevalt tekitab märgatavat söövitavatest või ärritavatest omadustest tingitud valu ja kannatusi.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Ettevalmistused**

Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsele vastavatel pidamis- ja söötmistingimustel. Täiskasvanud noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse katserühmadesse. Vajadusel lahustatakse või suspendeeritakse testaine sobivas kandjas. Soovitav on võimalusel kõigepealt kaaluda vesilahuse, seejärel taimeõlilahuse ning seejärel mis tahes muus kandjas valmistatud lahuse või suspensiooni kasutamist. Mittevesilahuste kasutamisel peaks vastava kandja mürgisusomadused enne katset teada olema või tuleks need enne katset või katse käigus kindlaks määrata. Manustatava katseaine kogus ei tohiks näriliste puhul üldjuhul ületada 10 ml/kg kehakaalu kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, kus manustatav kogus võib olla 20 ml/kg kehakaalu kohta. Manustatavate ainete mahuerinevused tuleks viia miinimumini, reguleerides kontsentratsiooni nii, et kõikidel annusemääradel manustatakse konstantne kogus.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Katseloomad**

Vastunäidustuste puudumisel on eelistatavaks liigiks rott.

Kasutada tuleks tavapäraseid laboritöös kasutatavaid liine. Kasutatavate katseloomade masside erinevus katse alguses kummagi soo puhul eraldi ei tohiks ületada  $\pm 20\%$  vastavast keskmisest.

#### 1.6.2.2. *Katseloomade arv ja sugu*

Iga annusemäära kohta tuleb kasutada vähemalt viit närilist. Nad peaksid olema samast soost. Emasloomade kasutamisel ei tohiks nad olla poeginud ega tiined. Kui on andmeid selle kohta, et ühe soo esindajad on märgatavalt tundlikumad, tuleks kasutada sellest soost loomi.

Märkus: ägeda mürgisuse katsetes närilistest kõrgemate loomadega tuleks kaaluda väiksema arvu loomade kasutamist.

Annused tuleks valida hoolikalt ja mõõdukalt mürgiste annuste ületamist tuleks vältida. Testaine surmavate annuste manustamist tuleks sellistes katsetes vältida.

#### 1.6.2.3. *Annusemäärad*

Erinevaid annusemäärasid peaks olema küllaldaselt, vähemalt kolm, ja nende vahed peaksid olema sellised, et saadakse erinevate mürgistusnähtude ja suremusega katserühmad. Andmeid peaks olema küllaldaselt annuse/reaktsiooni kõvera koostamiseks ja võimalusel  $LD_{50}$  nõuetekohaseks määramiseks.

#### 1.6.2.4. *Piirsalduskatse*

Näriliste kasutamisel võib eespool kirjeldatud meetodi kohaselt teha piirkatse viiest isas- ja viiest emasloomast koosnevas rühmas annusega vähemalt 2 000 mg/kg kehakaalu kohta. Kui katses esineb ühendiga seotud suremust, võib kaaluda täiemahulise uuringu tegemist.

#### 1.6.2.5. *Vaatlusperiood*

Vaatlusperioodi kestus peaks olema vähemalt 14 päeva. Vaatlemise kestust ei tohiks siiski jäigalt fikseerida. See peaks sõltuma mürgistusnähtudest, nende ilmnemise kiirusest ja paranemisperioodi pikkusest; seega võib seda vajadusel pikendada. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise ning surma aeg on väga olulised, eriti kui surm saabub sageli hiljem.

#### 1.6.3 **Katse käik**

Enne aine manustamist ei tohiks loomi sööta. Rotte ei toideta üleöö; kiirema ainevahetusega loomade puhul on kohane lühem näljutamisperiood; vee tarbimist ei piirata. Järgmisel päeval loomad kaalutakse ja seejärel manustatakse sondi kaudu ühe annusena testaine. Kui ühe annusena manustamine ei ole võimalik, võib annuse manustada väiksemate osadena kuni 24 tunni jooksul. Pärast aine manustamist võib veel kolm kuni neli tundi süüa mitte anda. Annuse manustamisel väiksemate osadena teatava aja jooksul võib olenevalt selle aja pikkusest olla vaja loomi sööta ja joota.

Pärast manustamist loomi jälgitakse ja vaatlustulemused registreeritakse süstemaatilisel, iga looma kohta tuleb pidada eraldi arvestust. Esimesel päeval tuleks loomi vaadelda tavapärasest sagedamini.

Vähemalt kord tööpäevas tuleks läbi viia põhjalik kliiniline uuring; muid vaatlusi tuleks teha iga päev, rakendades sobivaid abinõusid loomade kao piiramiseks uuringus (surnuna leitud loomad lahata või külmutada ja nõrgad või surevad loomad eraldada või surmata). Vaadelda tuleks muutusi nii nahas ja karvkattes, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vereringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Erilist tähelepanu tuleks pöörata värinatele, krampidele, suljeeritusele, kõhulahtisusele, letargiale, unele ja koomale. Surmahetk tuleks registreerida võimalikult täpselt.

Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad. Registreerida tuleks kõik makropatoloogilised muutused. Vastaval näidustusel tuleks võtta koeproove histopatoloogilisteks uuringuteks.

*Mürgisuse hindamine teisel sool*

Uuringute lõpetamisel ühest soost katseloomadega annustatakse vähemalt viiest vastassoost loomast koosnevat rühma, et kontrollida, ega selle soo esindajad testaine suhtes märgatavalt tundlikumad pole. Üksikjuhtudel võib olla õigustatud väiksema arvu loomade kasutamine. Kui on küllalt andmeid selle kohta, et uuritavast soost loomad on märgatavalt tundlikumad, võib katsetest vastassoost loomadega loobuda.

**2. ANDMED**

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis iga katserühma puhul näitab katseloomade arvu selle katse algul, iga looma surma aega, muude mürgistusnähtudega loomade arvu, mürgistusnähtude kirjeldust ja lahkamistulemusi. Kõik loomad kaalutakse ja mass registreeritakse vahetult enne testaine manustamist, seejärel igal nädalal ning surmahetkel. Kui looma elumus katses ületab ühe päeva, tuleks arvutada ja registreerida tema massimuutused. Ühendiga seotud kannatuste ja valu tõttu humaanselt surmatud loomad registreeritakse ühendiga seotud suremusena. Tunnustatud meetodi kohaselt võib määrata  $LD_{50}$ . Andmete hinnangu andmisel tuleks arvesse võtta kõigi kõrvalekallete, sealhulgas käitumuslike ja kliiniliste kõrvalekallete, makropatoloogiliste kahjustuste, kehamassi muutuste, suremuse ja mis tahes muude mürgistusnähtude mis tahes võimalikku sõltuvust kokkupuutest testainega ning nende esinemissagedust ja tõsidust.

**3. ARUANDE****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne,
- katsetingimusi,
- annuseid (kandja kasutamisel koos kandjaga ja kontsentratsiooni),
- katseloomade sugu,
- tabelit reaktsiooni andmetega soo ja annuse määra järgi (st katse käigus surnud või surmatud loomade arvu, mürgistusnähtudega loomade arvu, kokkupuutes olnud loomade arvu),
- surma aega, arvestatuna annuse saamise ajast, loomade humaanse surmamise põhjusi ja seejuures rakendatud kriteeriume,
- kõiki vaatlusandmeid,
- täiemahulises uuringus kasutatud soo 14 päeva kestel määratud  $LD_{50}$  väärtust (märkega määramismeetodi kohta),
- leitud  $LD_{50}$  väärtuse 95 % usaldusvahemikku (kui seda on võimalik esitada),
- annuse/suremuse kõverat ja selle tõusu (kui määramismeetod seda võimaldab),
- lahkamistulemusi,
- kõiki histopatoloogilisi leide,
- kõiki katsetulemusi teisest soost loomade puhul,
- tulemuste analüüsi (erilist tähelepanu tuleks pöörata katse ajal läbi viidud humaanse surmamise võimalikule mõjule arvutatud  $LD_{50}$  väärtusele),
- tulemuste tõlgendust.

**3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE**

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

**4. VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.1 bis ÄGE MÜRGISUS (SUUKAUDNE) – KINDLA ANNUSE MEETOD****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÕISTED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Ägeda suukaudse mürgisuse katse annab teavet kahjuliku mõju kohta, mis võib lühikese aja jooksul järgneda testaine ühekordse annuse neelamisele.

Kindla annuse meetodit kasutatakse kahes etapis.

Algses annustamisvahemiku määramise uuringus uuritakse järjestikku sondi abil suu kaudu manustatud erinevate annuste mõju üksikutele ühest soost loomadele. Annustamisvahemiku määramise uuring annab teavet mürgisuse sõltuvuse kohta annusest, sealhulgas minimaalse surmava annuse hinnangulise väärtuse. Üldjuhul ei kasutata esimeses etapis üle viie looma.

Põhiuuringus manustatakse aine suu kaudu sondi abil varem kindlaks määratud annustena (5, 50, 500 või 2 000 mg/kg) viiest isas- ja viiest emasloomast koosnevale katseloomade rühmale. Kasutatav annus valitakse annustamisvahemiku määramise uuringu põhjal selline, mis tõenäoliselt põhjustab "ilmset mürgistust" (vt määratlused punktis 1.2), kuid ei põhjusta surmajuhtumeid.

Pärast manustamist jälgitakse mõju avaldumist.

Kui valitud algannus põhjustab ilmset mürgistust, ei põhjusta aga ühendiga seotud suremust, pole edasine uuring vajalik.

Kui valitud algannus ilmset mürgistust ei põhjusta, jätkatakse katset järgmise, kõrgema annusega. Kui loomi sureb või kui loomi tuleb tõsiste mürgistusnähtude tõttu humaanselt surmata, jätkatakse katset järgmise, madalama annusega.

Meetod võimaldab määrata "kriitilise annuse" (vt määratlused punktis 1.2), viimane on kõrgeim varem kindlaksmääratud annus, mida võib manustada suremust (sh humaanne surmamine) põhjustamata.

Tõsistele ja kestvatele kannatustele ja valule viitavate märkidega loomad võib vaja olla humaanselt surmata. Testaineid pole vaja annustada moel, mis teadaolevalt tekitab märgatavat söövitavatest või ärritavatest omadustest tingitud valu ja kannatusi.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Ettevalmistused****1.6.1.1. Katseloomad**

Vastunäidustuste puudumisel on eelistatavaks liigiks rott.

Kasutada tuleks tavapäraseid laboritöös kasutatavaid liine. Kasutatavate katseloomade masside erinevus katse alguses kummagi soo puhul eraldi ei tohiks ületada  $\pm 20\%$  vastavast keskmisest.

Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsele vastavatel pidamis- ja söötmingimustel. Täiskasvanud noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse annustamisvahemiku määramise uuringu ja põhikatses rühma. Praktikas võib põhikatses vajalik olla ainult ühe kummastki soost rühma kasutamine.

#### 1.6.1.2. *Annuste ettevalmistamine ja manustamine*

Vajadusel lahustatakse või suspendeeritakse testaine sobivas kandjas. Soovitav on võimalusel kõigepealt kaaluda vesilahuse, seejärel taimeõilahuse ning seejärel mis tahes muus kandjas valmistatud lahuse või suspensiooni kasutamist. Mittevesilahuste kasutamisel peaks vastava kandja mürgisusomadused enne katset teada olema või tuleks need enne katset või katse käigus kindlaks määrata. Manustatava katseaine kogus ei tohiks näriliste puhul üldjuhul ületada 10 ml/kg kehakaalu kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, kus manustatav kogus võib olla 20 ml/kg kehakaalu kohta. Manustatavate ainete mahuerinevused tuleks viia miinimumini, reguleerides kontsentratsiooni nii, et kõikidel annusemääradel manustatakse konstantne kogus.

Enne aine manustamist ei tohiks loomi süüa. Rotte ei toideta üleöö; vee tarbimist ei piirata. Järgmisel päeval loomad kaalutakse ja seejärel manustatakse sondi kaudu ühe annusena testaine. Kui ühe annusena manustamine ei ole võimalik, võib annuse manustada väiksemate osadena kuni 24 tunni jooksul. Peale aine manustamist võib veel kolm kuni neli tundi süüa mitte anda. Annuse manustamisel väiksemate osadena teatava aja jooksul võib olenevalt selle aja pikkusest olla vaja loomi süüa ja joota.

#### 1.6.2. **Katse käik**

##### 1.6.2.1. *Annustamisvahemiku määramise katse*

Uuritakse erinevate annuste mõju üksikutele loomadele. Üldjuhul kasutatakse emasloomi, kui pole andmeid selle kohta, et isasloomad on tundlikumad. Annused manustatakse astmeliselt, jättes järgmise looma annustamiseni vähemalt 24 tundi. Kõigil loomadel jälgitakse vähemalt seitsme päeva jooksul mürgistusnähtude esinemist; kui mõõdukad mürgistusnähud seitsme päeva möödudes püsivad, jälgitakse loomi veel seitse päeva. Järgmiseks algannuseks valitakse kas 5, 50, 500 või 2 000 mg/kg. Kui valitud algannus tõsisemaid mürgistusnähte ei põhjusta ja järgmine, suurem annus põhjustab surma, tuleb uurida ühe või mitme vahepealse suurusega annuse mõju. Sellisel moel peaks olema võimalik koguda andmeid nii mõningaid mürgistusnähte põhjustavate annuste kohta kui ka madalaima suremust põhjustava annuse kohta.

Algannus tuleks võimalusel valida sarnaste kemikaalide kohta käivate andmete põhjal. Selliste andmete puudumisel on esimese annusena soovitatav kasutada 500 mg/kg annust. Kui algannus mürgistusnähte ei põhjusta, jätkatakse katset järgmise, kõrgema annusega. Kui 2 000 mg/kg juures suremust ei esine, võib annustamisvahemiku määramise katse lõpetatuks lugeda ja põhikatses tehakse selle annusega. Kui algannuse puhul (nt 500 mg/kg) täheldatakse tõsisemaid, humaanset surmamist nõudvaid mürgistusnähte, antakse järgmisele loomale järgmine madalam annus (nt 50 mg/kg). Kui see loom ellu jääb, võib seejärel järgmistele loomadele manustada sobivaid kindlaksmääratud annuste vahelisi annuseid. Üldjuhul selles protseduuris ei kasutata üle viie looma.

##### 1.6.2.2. *Põhikatses*

Iga uuritavat annust katsetakse vähemalt 10 loomal (viiel emas- ja viiel isasloomal). Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined.

Kindla annuse meetodi põhimõte on, et põhikatses kasutatakse ainult mõõdukaid annuseid. Testaine surmavate annuste manustamist tuleks vältida.

Katses kasutatav annus tuleks valida nelja kindlaksmääratud annusemäära (5, 50, 500 või 2 000 mg/kg kehakaalu kohta) seast. Algannus tuleks valida selline, mis põhjustab ilmset mürgistust, põhjustamata seejuures ühendiga seotud suremust (sh humaanne surmamine; juhuslikke surmasid ei arvestata, aga need tuleks registreerida). Kui see annus põhjustab ilmset mürgistust, ei põhjusta aga ühendiga seotud suremust, pole edasine uuring vajalik.

Kui valitud annuse manustamine ilmset mürgistust ei põhjusta, jätkatakse katset järgmise, kõrgema annusega. Loomi tuleks siiski edasi jälgida kuni vaatlusperioodi lõpuni. Kui loomi tuleb tõsise mürgistusreaktsiooni tõttu humaanselt surmata või kui esineb ühendiga seotud suremust, jätkatakse katset järgmise, madalama annusega. Loomi, keda pole vaja humaanselt surmata, tuleks edasi jälgida kuni vaatlusperioodi lõpuni.

Pärast manustamist loomi jälgitakse ja registreeritakse süstemaatiliselt vaatlustulemused. Iga looma kohta tuleb pidada eraldi arvestust.

Vaatlusperioodi kestus peaks olema vähemalt 14 päeva. Vaatlemise kestust ei tohiks siiski jäigalt fikseerida. See peaks sõltuma mürgistusnähtudest, nende ilmnemise kiirusest ja paranemisperioodi pikkusest; seega võib seda vajadusel pikendada. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise ning surma aeg on väga olulised, eriti kui mürgistusnähud ilmnevad sageli hiljem.

Annustamispäeval tuleks läbi viia vähemalt kaks põhjalikku kliinilist uuringut; järgnevatel päevadel tuleks neid teha vähemalt kord päevas. Ilmsetes valudes või tõsistele kannatustele viitavate märkidega loomad tuleks humaanselt surmata. Esimestel päevadel pärast annustamist on mürgistusnähtude püsimisel loomi vaja täiendavalt jälgida. Katse võib lõpetada, kui on selge, et valitud algannus oli liiga kõrge.

Vaadelda tuleks muutusi nii nahas ja karvkattes, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vere- ringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Erilist tähelepanu tuleks pöörata värinatele, krampidele, süljeeritusele, kõhulahtisusele, letargiale, unele ja koomale.

Kõik loomad kaalutakse vahetult enne testaine manustamist, seejärel järgneval kolmel päeval iga päev ja seejärel igal nädalal. Katse jooksul surnud loomad kaalutakse ja lahatakse, katse lõpus kaalutakse, surmataakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad. Registreerida tuleks kõik makropatoloogilised muutused. Vastaval näidustusel tuleks võtta koeproove histopatoloogilisteks uuringuteks.

Vajalik võib olla katse kordamine teise või erandjuhtumitel ka kolmanda annusemääraga, olenevalt eelmise annusemääraga saadud tulemustest.

Kui aine põhjustab suremust annusel 5 mg/kg kehakaalu kohta (või kui annustamisvahemiku määramise uuringul esineb selle annuse puhul suremust), võib olla vaja aine mürgisust edasi uurida.

## 2. ANDMED

Nii annustamisvahemiku määramise uuringu kui ka põhikatse andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis iga annusemäära puhul näitab katseloomade arvu katse algul, mürgistusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnuna leitud või humaansetel kaalutlustel surmatud loomade arvu, mürgistusnähtude kirjeldust; põhikatse kohta seda, kas täheldati ühendiga seotud ilmset mürgistust, mis tahes mürgistusnähtude ajalist kulgu ja lahkamistulemusi. Kui looma elumus katses ületab ühe päeva, tuleks arvutada ja registreerida tema massimuutused.

Ühendiga seotud kannatuste ja valu tõttu humaanselt surmatud loomad registreeritakse ühendiga seotud suremusena.

## 3. ARUANDLUS

### 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid (vajadusel nii annustamisvahemiku määramise uuringu kui ka põhikatse kohta):

— liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne,

— katsetingimusi,

- annuseid (kandja kasutamisel koos kandjaga ja kontsentratsiooni),
- kõigi uuritud annustamismäärade täielikke tulemusi,
- tabelit reaktsiooni andmetega soo ja annuse määra järgi (st katses kasutatud loomade arvu, vajadusel muutusi kehamassis, katse käigus surnud või surmatud loomade arvu, mürgistusnähtudega loomade arvu, mürgistusnähtude iseloomu, tõsidust ja kestust),
- mürgistusnähtude ilmnemise ajalist kulgu ja nende pöördumist,
- loomade suremisel või surmamisel surma aega arvestatuna annuse saamise ajast, loomade humaanse surmamise põhjusi ja seejuures rakendatud kriteeriume,
- lahkamistulemusi,
- kõiki histopatoloogilisi leide,
- tulemuste analüüsi,
- tulemuste, sealhulgas ilmsete mürgistusnähtude ja katses leitud kriitilise annuse tõlgendust.

### 3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

| ANNUS                        | TULEMUSED                                                                                                      | TÕLGENDAMINE                                                                                                                                                    |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 mg/kg kehamassi kohta      | Elumus alla 100 %<br>Elumus 100 %, kuid ilmsete mürgistusnähtudega<br>Elumus 100 %, ilmsete mürgistusnähtudeta | VÄGA MÜRGISED ühendid<br>MÜRGISED ühendid.<br>Vt 50 mg/kg tulemusi                                                                                              |
| 50 mg/kg kehamassi kohta.    | Elumus alla 100 %<br>Elumus 100 %, kuid ilmsete mürgistusnähtudega<br>Elumus 100 %, ilmsete mürgistusnähtudeta | Ühendid, mis võivad olla MÜRGISED või VÄGA MÜRGISED. Vt 5 mg/kg tulemusi.<br>KAHJULIKUD ühendid.<br>Vt 500 mg/kg tulemusi.                                      |
| 500 mg/kg kehamassi kohta.   | Elumus alla 100 %<br>Elumus 100 %, kuid ilmsete mürgistusnähtudega<br>Elumus 100 %, ilmsete mürgistusnähtudeta | Ühendid, mis võivad olla MÜRGISED või KAHJULIKUD. Vt 50 mg/kg tulemusi.<br>Arvestatava ägeda mürgisuseta ühenditeks loetud ühendid.<br>Vt 2 000 mg/kg tulemusi. |
| 2 000 mg/kg kehakaalu kohta. | Elumus alla 100 %<br>Elumus 100 %, ilmsete mürgistusnähtudega või ilma nendeta                                 | Vt 500 mg/kg tulemusi.<br>Arvestatava ägeda mürgisuseta ühendid.                                                                                                |

Vt ka B osa üldist sissejuhatust (D).

### 4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.2. ÄGE MÜRGISUS (SISSEHINGAMISEL)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine osakeste suurusjaotust, aururõhku, sulamistemperatuuri, keemistemperatuuri, leekpunkti ja (vajadusel) plahvatusohtlikkust.

Vt ka B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÕISTED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Mitu katseloomade rühma viiakse kindlaks ajaks kokkupuutesse testaine astmeliste kontsentratsioonidega nii, et üks rühm puutub kokku ühesuguse kontsentratsiooniga. Seejärel jälgitakse mõju ja surmajuhtumite esinemist. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

Tõsistele ja kestvatele kannatustele ja valule viitavate märkidega loomad võib vaja olla humaanselt surmata. Testainet pole vaja annustada moel, mis teadaolevalt tekitab märgatavat söövitavatest või ärritavatest omadustest tingitud valu ja kannatusi.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Ettevalmistused**

Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsele vastavatel pidamis- ja söötmingimustel. Noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse vajalikku arvu katserühmadesse. Kokkupuute simulatsiooni pole vaja kasutada, kui katseseadme iseloom seda ei eelda.

Tahked testained võivad vajaliku osakeste suuruse saavutamiseks vajada mikropeenestamist.

Sobiva kontsentratsiooni saavutamiseks atmosfääris võib testainele lisada vajadusel sobivat kandjat; sellisel juhul tuleb kasutada kandja kontrollrühma. Kui annustamise lihtsustamiseks kasutatakse kandjat või muid lisandeid, peab olema kindel, et need ei põhjusta mürgistusnähte. Vajadusel võib kasutada varasemaid andmeid.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Katseloomad**

Vastunäidustuste puudumisel on eelistatavaks liigiks rott. Kasutada tuleks tavapäraseid laboritöös kasutatavaid liine. Kasutatavate katseloomade masside erinevus katse alguses kummagi soo puhul eraldi ei tohiks ületada  $\pm 20$  % vastavast keskmisest.

1.6.2.2. *Katseloomade arv ja sugu*

Iga uuritavat kontsentratsiooni katsetakse vähemalt 10 närilisel (viiel emas- ja viiel isasloomal). Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined.

Märkus: ägeda mürgisuse katsetes närilistest kõrgemate loomadega tuleks kaaluda väiksema arvu loomade kasutamist.

Annused tuleks valida hoolikalt ja vältida tuleks mõõdukalt mürgiste annuste ületamist. Testaine surmavate annuste manustamist tuleks sellistes katsetes vältida.

1.6.2.3. *Kokkupuutekontsentratsioonid*

Erinevaid annusemäärasid peaks olema küllaldaselt, vähemalt kolm, ja nende vahed peaksid olema sellised, et saadakse erinevate mürgistusnähtude ja suremusega katserühmad. Andmeid peaks olema küllaldaselt kontsentratsiooni/reaktsioonikõvera koostamiseks ja võimalusel  $LC_{50}$  nõuetekohaseks määramiseks.

1.6.2.4. *Piirisalduskatse*

Kui viiest isas- ja viiest emasloomast koosneval rühmal ei esine 4-tunnise kokkupuute järel gaasi või vedeliku või tahke aine aerosooliga kontsentratsioonil 5 mg/l (või kui see ei ole testaine füüsikaliste või keemiliste omaduste, sealhulgas plahvatusohtlikkuse tõttu võimalik, kõrgeimal võimalikul kontsentratsioonil) 14 päeva jooksul ilmnenu ühendiga seotud suremust, võib edasise kontrollimise lugeda tarbetuks.

1.6.2.5. *Vaatlusperiood*

Kokkupuute peaks kestma neli tundi.

1.6.2.6. *Seadmed*

Loomkatsetes tuleks kasutada hingamisseadet, mis suudab tagada dünaamilise õhuvoo vähemalt 12 täieliku õhuvahetusega tunnis ning tagab küllaldase hapnikusisalduse ja homogeense kokkupuutekeskkonna. Kambri kasutamisel peaks selle ehitus piirama katseloomade ühte kohta kogunemist ja tagama võimalikult hea inhalatoorse kokkupuute testainega. Stabiilse kambriatmosfääri tagamiseks ei tohiks katseloomade "maht" üldjuhul ületada 5 % kambri üldmahust. Kasutada võib väliseid hingamiselundeid, ainult pead või kogu keha haaravat individuaalset kambrit; esimesed kaks piiravad testaine sattumist organismi muid teid pidi.

1.6.2.7. *Vaatlusperiood*

Vaatlusperioodi kestus peaks olema vähemalt 14 päeva. Vaatlemise kestust ei tohiks siiski jäigalt fikseerida. See peaks sõltuma mürgistusnähtudest, nende ilmnemise kiirusest ja paranemisperioodi pikkusest; seega võib seda vajadusel pikendada. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise ning surma aeg on väga olulised, eriti kui surm saabub sageli hiljem.

1.6.3. **Katse käik**

Kõik loomad kaalutakse vahetult enne kokkupuudet ja viiakse seejärel vastavas seadmes peale kambrikontsentratsiooni tasakaalustumist neljaks tunniks kokkupuutesse katsekontsentratsiooniga. Tasakaalustumisaeg peaks olema lühike. Katsetemperatuuri tuleks hoida  $22 \pm 3$  °C juures. Ideaaljuhul tuleks suhteline õhuniiskus hoida 30 % ja 70 % vahel, kuid mõningatel juhtudel (nt katsetes mõnede aerosoolidega) ei saa seda rakendada. Väikese alarõhu ( $\leq 5$  mm H<sub>2</sub>O) kasutamine kambri välisest testaine lekke ümbritsevasse keskkonda. Süüa ja juua kokkupuute ajal anda ei tohiks. Kasutada tuleks katseatmosfääri tekitamiseks ja jälgimiseks sobivaid seadmeid. Seade peaks võimalikult kiiresti saavutama stabiilsed kokkupuutetingimused. Kambri ehitus ja kasutamine peaksid tagama katseatmosfääri püsiva homogeense jaotuse kambri.

Mõõta või kontrollida tuleb:

- õhu voolukiirust (pidevalt);
- testaine tegelikku kontsentratsiooni hingamistsoonis, seda vähemalt kolm korda kokkupuuteaja jooksul (mõnede keskkondade, nt kõrge kontsentratsiooniga aerosoolkeskkondade puhul võib vajalik olla sagedasem kontroll). Kokkupuute ajal ei tohiks kontsentratsioon keskmise suhtes kõikuda rohkem kui  $\pm 15\%$ . Mõnede aerosoolide puhul ei ole nii täpne reguleerimine siiski võimalik, sellisel juhul on lubatav suurem kõikumisvahemik. Aerosoolide puhul tuleks piisavalt tihti kontrollida osakeste suurust (igas katserühmas vähemalt üks kord);
- temperatuuri ja õhuniiskust, võimalusel pidevalt.

Kokkupuute ajal ja järel loomi jälgitakse ja vaatlustulemused registreeritakse süstemaatiliselt, iga looma kohta tuleb pidada eraldi arvestust. Esimesel päeval tuleks loomi vaadelda tavapärasest sagedamini. Vähemalt kord tööpäevas tuleks läbi viia põhjalik kliiniline uuring; muid vaatlusi tuleks teha iga päev, rakendades sobivaid abinõusid loomade kao piiramiseks uuringus, nt surnuna leitud loomad lahata või külmutada ja nõrgad või surevad loomad eraldada või surmata.

Vaadelda tuleks muutusi nii nahas ja karvkattes, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vere- ringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Erilist tähelepanu tuleks pöörata hingamise iseloomule, värintele, krampidele, süljeeritusele, kõhulahtisusele, letargiale, unele ja koomale. Surmahetk tuleks registreerida võimalikult täpselt. Kõik loomad kaalutakse pärast kokkupuudet igal nädalal ja surmahetkel.

Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad, pöörates erilist tähelepanu muutustele ülemistes ja alumistes hingamisteedes. Registreerida tuleks kõik makropatoloogilised muutused. Vastaval näidustusel tuleks võtta koeproove histopatoloogilisteks uuringuteks.

## 2. ANDMED

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis iga katserühma puhul näitab katseloomade arvu selle katse algul, iga looma surma aega, muude mürgistusnähtudega loomade arvu, mürgistusnähtude kirjeldust ja lahkamistulemusi. Kõik loomad kaalutakse ja mass registreeritakse vahetult enne testaine manustamist, seejärel igal nädalal ning surmahetkel. Kui looma elumus katses ületab ühe päeva, tuleks arvutada ja registreerida tema massimuutused. Ühendiga seotud kannatuste ja valu tõttu humaanselt surmatud loomad registreeritakse ühendiga seotud suremusena. Tunnustatud meetodi kohaselt võib määrata  $LC_{50}$ . Andmetele hinnangu andmisel tuleks arvesse võtta kõigi kõrvalekallete, sealhulgas käitumuslike ja kliiniliste kõrvalekallete, makropatoloogiliste kahjustuste, kehamassi muutuste, suremuse ja mis tahes muude mürgistusnähtude mis tahes võimalikku sõltuvust kokkupuutest testainega ning nende esinemissagedust ja tõsidust.

## 3. ARUANDE

### 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne,
- katsetingimusi: kokkupuuteseadme kirjeldust,

sealhulgas selle ehitust, tüüpi, mõõtmeid, õhuallikat, aerosoolide tekitamise seadet, kliima reguleerimise meetodit ja katsekambri kasutamisel loomade katsekambri pidamise meetodit. Kirjeldada tuleks temperatuuri, õhuniiskuse, aerosooli kontsentratsiooni ja osakeste suurusjaotuse määramise vahendeid.

Andmed kokkupuute kohta

Andmed tuleks esitada koondtabelina koos vastavate keskmiste ja hajuvuse näitajatega (nt standardhälve) ning võimalusel peaksid andmed sisaldama järgmist:

- a) õhu voolukiirust hingamisseadmes;
- b) õhu temperatuuri ja niiskust;

- c) nimikontsentratsioone (hingamisseadmesse viidud testaine summaarne kogus jagatuna õhu ruumalaga);
- d) kandja kasutamisel viimase iseloomu;
- e) tegelikke kontsentratsioone katse hingamistsoonis;
- f) masskeskmist aerodünaamilist diameetrit (MMAD) ja geomeetrilist standardhälvet (GSD);
- g) tasakaalustumise aega;
- h) kokkupuute kestust:
  - tabelit reaktsiooni andmetega soo ja kokkupuute ulatuse järgi (st katse käigus surnud või surmatud loomade arvu, mürgistusnähtudega loomade arvu, kokkupuutes olnud loomade arvu),
  - surma aega, kui loom sureb kokkupuute ajal või pärast seda, loomade humaanse surmamise põhjusi ja seejuures rakendatud kriteeriume,
  - kõiki vaatlusandmeid,
  - vaatlusperioodi lõpul kummagi soo puhul määratud  $LC_{50}$  väärtust (koos märkega kasutatud arvutusmeetodi kohta),
  - leitud  $LD_{50}$  väärtuse 95 % usaldusvahemikku (kui seda on võimalik esitada),
  - annuse/suremuse kõverat ja selle tõusu (kui määramismeetod seda võimaldab),
  - lahkamistulemusi,
  - kõiki histopatoloogilisi leide,
  - tulemuste analüüsi (erilist tähelepanu tuleks pöörata katse ajal läbi viidud humaanse surmamise võimalikule mõjule arvutatud  $LC_{50}$  väärtusele),
  - tulemuste tõlgendust.

### 3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

### 4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.3. ÄGE MÜRGISUS (NAHAKAUDNE)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÄÄRATLUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Testaine kantakse astmeliste annustena mitme rühma katseloomade nahale nii, et üks rühm saab ühesuguse annuse. Järgnevalt jälgitakse mõju ja surmajuhtumite esinemist. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

Tõsistele ja kestvatele kannatustele ja valule viitavate märkidega loomad võib vaja olla humaanselt surmata. Testaineid pole vaja annustada moel, mis teadaolevalt tekitab märgatavat söövitavatest või ärritavatest omadustest tingitud valu ja kannatusi.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Ettevalmistused**

Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsepuurides katsele vastavatel pidamis- ja söötmingimustel. Täiskasvanud noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse katserühmadesse. Ligikaudu 24 tundi enne katset eemaldatakse pügamise või raseerimise teel katseloomade keha seljaosalt karvkate. Karvkatte pügamisel või raseerimisel tuleb vältida naha marrastamist, kuna see võib mõjutada naha läbilaskvust. Testaine nahale kandmiseks tuleb vabastada vähemalt 10 % kehapiinast. Tahkete, vajadusel peenestatud ainete puhul tuleks testainet nahaga hea kokkupuute saavutamiseks niisutada piisava koguse vee või sobiva kandjaga. Kandja kasutamisel tuleb arvestada selle mõjuga testaine nahaläbimisevõimele. Vedelaid testaineid kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Katseloomad**

Kasutada võib täiskasvanud rotte või küülikuid. Kasutada võib ka muid liike, kuid seda tuleb põhjendada. Kasutada tuleks tavapärasteid laboritöös kasutatavaid liine. Kasutatavate katseloomade masside erinevus katse alguses kummagi soo puhul eraldi ei tohiks ületada  $\pm 20$  % vastavast keskmisest.

1.6.2.2. *Katseloomade arv ja sugu*

Iga annuse taseme kohta tuleb kasutada vähemalt viit katselooma. Nad peaksid olema samast soost. Emasloomade kasutamisel ei tohiks nad olla poeginud ega tiined. Kui on andmeid selle kohta, et ühe soo esindajad on märgatavalt tundlikumad, tuleks kasutada sellest soost loomi.

**Märkus:** ägeda mürgisuse katsetes närilistest kõrgemate loomadega tuleks kaaluda väiksema arvu loomade kasutamist. Annused tuleks valida hoolikalt ja vältida tuleks mõõdukalt mürgiste annuste ületamist. Testaine surmavate annuste manustamist tuleks sellistes katsetes vältida.

1.6.2.3. *Annusemäärad*

Erinevaid annusemäärasid peaks olema küllaldaselt, vähemalt kolm, ja nende vahed peaksid olema sellised, et saadakse erinevate mürgistusnähtude ja suremusega katserühmad. Annusemäärade valikul tuleks arvesse võtta mis tahes võimalikku ärritavat või söövitavat mõju. Andmeid peaks olema küllaldaselt annuse/reaktsioonikõvera koostamiseks ja võimalusel LD<sub>50</sub> nõuetekohaseks määramiseks.

1.6.2.4. *Piirsalduskatse*

Eespool kirjeldatud meetodi kohaselt võib teha piirsalduskatse viiest isas- ja viiest emasloomast koosnevas rühmas annusega vähemalt 2 000 mg/kg kehakaalu kohta. Kui katses esineb ühendiga seotud suremust, võib kaaluda täiemahulise uuringu tegemist.

1.6.2.5. *Vaatlusperiood*

Vaatlusperioodi kestus peaks olema vähemalt 14 päeva. Vaatlemise kestust ei tohiks siiski järgalt fikseerida. See peaks sõltuma mürgistusnähtudest, nende ilmnemise kiirusest ja paranemisperioodi pikkusest; seega võib seda vajadusel pikendada. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise aeg, nende kestus ja surma aeg on väga olulised, eriti kui surm saabub sageli hiljem.

1.6.3. **Katse käik**

Loomi tuleks puurides pidada ühekaupa. Testaine tuleks kanda ühtlaselt alale, mis moodustab ligikaudu 10 % kogu kehapiinnast. Väga mürgiste ainete puhul võib katta väiksema osa kehapiinnast, kuid võimalikult suur osa piinnast tuleks katta võimalikult õhukese ja ühtlase kihiga.

Testainet tuleks 24-tunnise kokkupuuteperioodi jooksul poorse marlisideme ja mitteärritava kleeplindi abil naha vastas hoida. Manustamiskoht tuleks veel lisaks sobival moel kinni katta, et hoida marlisidet ja testainet paigal ja vältida testaine allaneelamist katselooma poolt. Et vältida testaine allaneelamist, võib kasutada looma liikuvust piiravaid vahendeid, kuid looma täielikku fikseerimist ei soovitata.

Kokkupuuteperioodi lõpus tuleks testaine jääk nahalt võimalusel veega või muu sobiva puhastusmeetodi abil eemaldada.

Vaatlustulemused tuleks vaatluse käigus süstemaatiliselt registreerida. Iga looma kohta tuleb pidada eraldi arvestust. Esimesel päeval tuleks loomi vaadelda tavapärasest sagedamini. Vähemalt kord tööpäevas tuleks läbi viia põhjalik kliiniline uuring; muid vaatlusi tuleks teha iga päev, rakendades sobivaid abinõusid loomade kao piiramiseks uuringus, nt surnuna leitud loomad lahata või külmutada ja nõrgad või surevad loomad eraldada või surmata.

Vaadelda tuleks muutusi nii karvkattes, testainega töödeldud nahas, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vereringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Erilist tähelepanu tuleks pöörata värinatele, krampidele, süljeeritusele, kõhulahtisusele, letargiale, unele ja koomale. Surmahetk tuleb registreerida võimalikult täpselt. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad. Registreerida tuleks kõik makropatoloogilised muutused. Vastaval näidustusel tuleks võtta koeproove histopatoloogilisteks uuringuteks.

*Mürgisuse hindamine teisel sool*

Uuringute lõpetamisel ühest soost katseloomadega annustatakse vähemalt viiest vastassoost loomast koosnevat rühma, et kontrollida, ega selle soo esindajad testaine suhtes märgatavalt tundlikumad pole. Üksikjuhtudel võib olla õigustatud väiksema arvu loomade kasutamine. Kui on küllalt andmeid selle kohta, et uuritavast soost loomad on märgatavalt tundlikumad, võib katsetest vastassoost loomadega loobuda.

**2. ANDMED**

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis iga katserühma puhul näitab katseloomade arvu selle katse algul, iga looma surma aega, muude mürgistusnähtudega loomade arvu, mürgistusnähtude kirjeldust ja lahkamistulemusi. Kõik loomad kaalutakse ja mass registreeritakse vahetult enne testaine manustamist, seejärel igal nädalal ning surmahetkel; kui looma elumus katses ületab ühe päeva, tuleks arvutada ja registreerida tema massimuutused. Ühendiga seotud kannatuste ja valu tõttu humaanselt surmatud loomad registreeritakse ühendiga seotud suremusena. Tunnustatud meetodi kohaselt määratakse LD<sub>50</sub>.

Andmetele hinnangu andmisel tuleks arvesse võtta kõigi kõrvalekallete, sealhulgas käitumuslike ja kliiniliste kõrvalekallete, makropatoloogiliste kahjustuste, kehamassi muutuste, suremuse ja mis tahes muude mürgistusnähtude mis tahes võimalikku sõltuvust kokkupuutest testainega ning nende esinemissagedust ja tõsidust.

**3. ARUANDLUS****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne,
- katsetingimusi (sealhulgas naha puhastamise meetodit ja sideme tüüpi: oklusiivside või tavaline side),
- annuseid (kandja kasutamisel koos kandjaga ja kontsentratsioone),
- katseloomade sugu,
- tabelit reaktsiooni andmetega soo ja annuse määra järgi (st katse käigus surnud või surmatud loomade arvu, mürgistusnähtudega loomade arvu, kokkupuutes olnud loomade arvu),
- surma aega, arvestatuna annuse saamise ajast, loomade humaanse surmamise põhjusi ja seejuures rakendatud kriteeriume,
- kõiki vaatlusandmeid,
- täiemahulises uuringus kasutatud soo 14 päeva kestel määratud LD<sub>50</sub> väärtust (märkega määramismeetodi kohta),
- leitud LD<sub>50</sub> väärtuse 95 % usaldusvahemikku (kui seda on võimalik esitada),
- annuse/suremuse kõverat ja selle tõusu (kui määramismeetod seda võimaldab),
- lahkamistulemusi,
- kõiki histopatoloogilisi leide,
- kõiki katsetulemusi teisest soost loomade puhul,
- tulemuste analüüsi (erilist tähelepanu tuleks pöörata katse ajal läbi viidud humaanse surmamise võimalikule mõjule arvutatud LD<sub>50</sub> väärtusele),
- tulemuste tõlgendust.

**3.2. HINDAMINE JA TÖLGENDAMINE**

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

**4. VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.4. ÄGE MÜRGISUS (NAHKA ÄRRITAV)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÄÄRATLUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

*Eelhindangu andmine*

Eeldatavalt tugevaid reaktsioone põhjustavates tingimustes tehtavate katsete mahu piiramiseks tuleb hoolikalt arvesse võtta kõiki uuritava aine kohta olemasolevaid andmeid. Otsustamaks, kas on kohane teha täiemahuline katse, ühe loomaga katse või järgnevad katsed ära jätta, võivad kasulikud olla järgmised andmed.

- i) Füüsikalise-keemilised omadused ja keemiline reaktsioonivõime. Tugevalt happeliste või aluselistest ainetest (näiteks näidatud pH 2 või vähem või 11,5 või suurem) puhul ei pruugi esmase nahaärrituse katseid vaja minna, kui võib eeldada söövitavaid omadusi. Arvesse tuleks võtta ka aine leelis- või happearvu.
- ii) Veenvate andmete olemasolul tugeva mõju kohta põhjalikult kontrollitud *in vitro* katsetes võib täiskatse olla tarbetu.
- iii) Ägeda mürgisuse katsete tulemused. Kui ainega on piirsalduskatse annusemääral (2 000 mg/kg kehakaalu kohta) tehtud nahakaudne ägeda mürgisuse uuring ja naha ärritust ei täheldatud, võib edasine naha ärrituse uuring olla tarbetu. Lisaks pole vaja uurida materjale, mis on osutunud nahakaudselt tugevalt mürgiseks.

Uuritav aine kantakse ühe annusena mitme katselooma nahale, kusjuures iga loom on ka iseenda kontrollloom. Kindla ajavahemiku järel vaadeldakse ja hinnatakse ärrituse määra ja kirjeldatakse seda toimele täieliku hinnangu andmiseks. Vaatluste kestus peaks olema küllaldane, et täheldatud toime pöördumist täielikult hinnata.

Tõsistele ja kestvatele kannatustele ja valule viitavate märkidega loomad võib vaja olla humaanselt surmata.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Ettevalmistused**

Ligikaudu 24 tundi enne katset eemaldatakse pügamise või raseerimise teel katselooma keha seljaosalt karvkate.

Karvkatte pügamisel või raseerimisel tuleks vältida naha marrastamist. Kasutada tuleks ainult terve nahaga loomi.

Mõnedel küülikuliinidel on tihedad karvkattelaigud, mis on silmatorkavamad teatud kindlatel aastaegadel. Neile tiheda karvakasvuga piirkondadele testainet kanda ei tohiks.

Tahkete (vajadusel peenestatud) ainete puhul tuleks testainet nahaga hea kokkupuute saavutamiseks niisutada piisava koguse vee või sobiva kandjaga. Kandjate kasutamisel tuleb arvestada nende mõjuga testaine nahka ärritavatele omadustele. Vedelaid testaineid kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul.

#### 1.6.2. Katsetingimused

##### 1.6.2.1. Katseloomad

Ehkki kasutada võib erinevaid imetajaliike, on eelistatavaks liigiks albiinoküülik.

##### 1.6.2.2. Loomade arv

Kui *in vitro* sõelkatsete või muu eelinfo põhjal on alust oletada, et aine võib põhjustada kudede kärbumist (st olla söövitav), tuleks kaaluda katse tegemist ainult ühe katseloomaga. Kui selle katse tulemused söövitavusele ei viita, tuleks katse teha veel vähemalt kahe loomaga.

Täiskatses kasutatakse vähemalt kolme tervet täiskasvanud looma. Eraldi loomadest ainega mitte kokku puutuvat kontrollrühma moodustada pole vaja. Ebaselgete tulemuste kontrollimiseks võib vaja olla täiendavaid katseloomi.

##### 1.6.2.3. Annusemäär

Vastunäidustuste puudumisel kantakse töödeldavale kohale 0,5 ml vedelikku või 0,5 g tahket või pooltahket ainet. Kontrollina kasutatakse iga katselooma katsealaga külgnevat töötlemata nahapinda.

##### 1.6.2.4. Vaatlusperiood

Vaatlusperioodi kestust ei tohiks jäigalt fikseerida. See peaks olema küllaldane, et täielikult hinnata täheldatud toime pöörduvust või pöördumatust, kuid ei pea manustamisest alates üldjuhul ületama 14 päeva.

#### 1.6.3. Katse käik

Loomi tuleks puurides pidada ühekaupa. Testaine tuleks kanda väikesele nahapinnale (ligikaudu 6 cm<sup>2</sup>) ja katta marlilapiga, mida hoiab paigal mitteärritav kleeplint. Mõningate vedelike ja pastade puhul võib olla vaja kanda testaine marlilapile ja siis see nahale asetada. Marlilappi tuleks kokkupuuteperioodi jooksul sobiva oklusiivsideme või poolläbilaskva sideme abil lõdvalt naha vastas hoida. Looma ligipääsu lapile ja testaine allaneelamist/sissehingamist tuleks vältida.

Kokkupuuteperioodi lõpus tuleks testaine jääk nahalt võimalusel vee või muu sobiva lahusti abil eemaldada, seejuures nahal tekkinud reaktsiooni mõjutamata ja nahka kahjustamata.

Kokkupuuteaeg on üldjuhul neli tundi.

Kui oletatakse, et aine võib põhjustada kudede kärbumist (st olla söövitav), tuleks kokkupuuteaega lühendada (nt ühele tunnile või kolmele minutile). Seesugustes katsetes võib esimesel korral kasutada ka ainult üht looma ja kui katseühendi äge nahakaudne mürgisus seda ei takista, panna loomale korraga kolm lappi. Esimene lapp eemaldatakse kolme minuti möödumisel. Kui tugevat nahareaktsiooni ei täheldata, eemaldatakse teine lapp ühe tunni möödumisel. Kui vaatlustulemused näitavad vajadust neljatunnise kokkupuuteperioodi järele ja kui see on humaanne, eemaldatakse kolmas lapp nelja tunni möödumisel ning hinnatakse naha reaktsioone.

Sellisel juhul (st kui neljatunnine kokkupuuteperiood osutus võimalikuks), tuleks katse teha veel vähemalt kahe loomaga, välja arvatud juhul, kui seda ei saa humanseks lugeda (nt kui pärast neljatunnist kokkupuuteperioodi täheldati kudede kärbumist).

Kui kolme minuti või ühe tunni möödudes täheldatakse tõsist nahareaktsiooni (nt kärbumist), katkestatakse katse viivitamata.

Teatavatel tingimustel võivad näidustatud olla pikemad kokkupuuteajad, nt kui see vastab eeldatavale inimkasutusele ja kokkupuutele.

#### 1.6.3.1. Vaatlused ja hindamine

Loomadel tuleks jälgida nahapunetuse ja turse esinemist ning hinnata vastavaid reaktsioone 60 minuti ning 24, 48 ja 72 tunni möödumisel lapi eemaldamisest. Naha ärritust hinnatakse ja hinne registreeritakse vastavalt tabelis 1 esitatud süsteemile. Kui reaktsiooni pöördumus ei ole 72 tunni jooksul täiesti selge, võib vajalik olla edasine jälgimine. Lisaks ärritusnähtude kirjeldusele tuleks põhjalikult kirjeldada kõiki tõsiseid kahjustusi, nagu söövitust (nahakoe pöördumatut hävinemist) ja muid mürgistusnähte.

Kahtlaste reaktsioonide või testainest värvunud naha tõttu varjatud reaktsioonide selgitamiseks võib kasutada selliseid meetodeid, nagu histopatoloogilist vaatlust või nahavoldi paksuse mõõtmist.

### 2. ANDMED

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis näitab iga katselooma kohta nahapunetuse ja turse hindeid kogu vaatlusperioodil. Registreerida tuleks kõik tõsised kahjustused, ärritusnähtude raskusastme ja iseloomu kirjeldus ning söövituse ja mis tahes muude mürgistusnähtude pöördumus.

### 3. ARUANDLUS

#### 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne,
- katsetingimusi (sealhulgas kemikaali asjaomaseid füüsikalise-keemilisi omadusi, naha ettevalmistamise ja puhastamise meetodit ning sideme tüüpi: oklusiivside või poolläbilaskev side),
- kokkuvõtlikku ärritusreaktsioonide tabelit iga katselooma ja iga vaatlusperioodi kestuse (nt 1, 24, 48 ja 72 tundi) kohta,
- kõigi täheldatud tõsiste kahjustuste, sh söövituste kirjeldust,
- ärritusnähtude raskusastme ja iseloomu kirjeldust ning kõiki histopatoloogilisi leide,
- lisaks naha ärritusele esinenud mürgistusnähtude kirjeldust,
- tulemuste analüüsi,
- tulemuste tõlgendust.

#### 3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

### 4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

## Liide

## TABEL: NAHA REAKTSIOONI HINDAMINE

## Nahapunetus ja koekärbus-kooriku teke

|                                                                                                                                    | Hinne |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Nahapunetus puudub .....                                                                                                           | 0     |
| Väga kerge nahapunetus (vaevumärgatav) .....                                                                                       | 1     |
| Selgelt eristuv nahapunetus .....                                                                                                  | 2     |
| Keskmine kuni tugev nahapunetus .....                                                                                              | 3     |
| Tugev nahapunetus (peetpunane) või koekärbus-kooriku teke (sügavuti ulatuvad kahjustused), mis takistavad punetuse hindamist ..... | 4     |

## Turse

|                                                                      |   |
|----------------------------------------------------------------------|---|
| Turse puudub .....                                                   | 0 |
| Väga kerge turse (vaevumärgatav) .....                               | 1 |
| Kerge turse (selgelt eristuv kõrgema servaga piirkond) .....         | 2 |
| Keskmine turse (serva kõrgus muust nahapinnast ligikaudu 1 mm) ..... | 3 |

## B.5. ÄGE MÜRGISUS (SILMI ÄRRITAV)

## 1. MEETOD

## 1.1. SISSEJUHATUS

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

## 1.2. MÄÄRATLUS

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

## 1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

## 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

*Eelhindangu andmine*

Eeldatavalt tugevaid reaktsioone põhjustavates tingimustes tehtavate katsete mahu piiramiseks tuleb hoolikalt arvesse võtta kõiki uuritava aine kohta olemasolevaid andmeid. Selleks võivad kasulikud olla järgmised andmed:

- i) Füüsikalised-keemilised omadused ja keemiline reaktsioonivõime. Tugevalt happeliste või aluselistest ainetest (näiteks selliste, mis võivad silmas põhjustada pH väärtuse 2 või alla selle või 11,5 või üle selle) puhul ei pruugi katse vajalik olla, kui võib eeldada söövitavaid omadusi. Arvesse tuleks võtta ka aine leelis- või happesust.

- ii) Muude põhjalikult kontrollitud katsete tulemused; potentsiaalselt söövitavate või tõsiselt nahka ärritavate materjalidega ei tohiks järgnevaid silmi ärritava toime uuringuid enam teha, eeldades, et seesugused ained tekitavad sellist meetodit kasutavas katses tõsiseid silmakahjustusi.
- iii) Nahaärrituse katsete tulemused. Ilmselt söövitavate või tõsiselt nahka ärritavate materjalidega ei tohiks järgnevaid silmi ärritava toime uuringuid enam teha, eeldades, et seesugused ained tekitavad sellist meetodit kasutavas katses tõsiseid silmakahjustusi.

Uuritav aine kantakse ühe annusena mitme katselooma ühele silmale, teist, puutumata silma kasutatakse kontrollina. Kindla ajavahemiku järel vaadeldakse ja hinnatakse ärrituse määra ning kirjeldatakse seda toimele täieliku hinnangu andmiseks. Vaatluste kestus peaks olema küllaldane, et täheldatud toime pöördumist või pöördumatust täielikult hinnata.

Tõsistele ja kestvatele kannatustele ja valule viitavate märkidega loomad võib vaja olla humaanselt surmata.

#### 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Puuduvad.

#### 1.6. MEETODI KIRJELDUS

##### 1.6.1. Ettevalmistused

Katselooma kandidaatideks valitud loomade mõlemat silma kontrollitakse 24 tunni jooksul enne katse algust. Silma ärrituse, nägemishäirete või eelneva sarvkestakahjustusega loomi ei tohiks katses kasutada.

##### 1.6.2. Katsetingimused

###### 1.6.2.1. Katseloomad

Ehkki kasutatud on erinevaid katseloomi, on katses soovitatav kasutada terveid täiskasvanud albiinoküülikuid.

###### 1.6.2.2. Loomade arv

Kui eeldada võib tugevat mõju, tuleks kaaluda katse tegemist ainult ühe katseloomaga. Kui selle katse tulemused ühel küülikul viitavad aine tugevalt ärritavatele (pöörduv mõju) või söövitavatele (pöördumatu mõju) omadustele kirjeldatud katsemeetodil, võib edasine silmade ärrituvuse uuring järgmistel loomadel olla tarbetu. Vahel võib toime spetsiifiliste aspektide uurimiseks vaja olla edasisi uuringuid täiendavate loomadega.

Kõigis katsetes peale ühe loomaga katse tuleks kasutada vähemalt 3 looma. Ebaselgete tulemuste kontrollimiseks võib vaja olla täiendavaid katseloomi.

###### 1.6.2.3. Annusemäär

Vedelike katsetamisel kasutatav annus on 0,1 ml. Tahkete ainete, pastade ja tahketest osakestest koosnevate ainete katsetamisel kasutatava koguse maht peaks olema 0,1 ml või peaks selle mass olema ligikaudu 0,1 g (mass tuleb alati registreerida). Kui katsematerjal on tahke või teraline, tuleks see tolmpreeneks jahvatada. Enne osakeste mahu määramist tuleks need kergelt tihendada, nt mõõtenõu koputamise.

Pump-pihustites või survestatud aerosoolnõudes olevate ainete puhul tuleks vedelik välja lasta, võtta sellest 0,1 ml ja viia silma vastavalt vedelikele ettenähtud meetodile.

###### 1.6.2.4. Vaatlusperiood

Vaatlemise kestust ei tohiks jäigalt fikseerida. See peaks olema küllaldane, et täielikult hinnata täheldatud toime pöördumist või pöördumatust, kuid ei pea manustamisest alates üldjuhul ületama 21 päeva.

### 1.6.3. Katse käik

Loomi tuleks puurides pidada ühekaupa. Testaine tuleks viia iga looma ühe silma konjunktiviikotti, tõmmates alalau ettevaatlikult silmamunast eemale. Lauge hoitakse seejärel testaine kao vältimiseks ettevaatlikult umbes ühe sekundi jooksul koos. Teist, puutumata silma kasutatakse kontrollina.

Kui arvatakse, et testaine võib põhjustada ülemäärast valu, võib enne selle silma viimist kasutada paikset tuimastust. Tuimasti tüüp, kontsentratsioon ja manustamisaeg tuleks valida hoolikalt, et vältida selle kasutamisest tingitud erinevusi testainele reageerimisel. Kontrollsilmi tuleks samamoodi tuimastada.

Testaine sisseviimise järel ei tohiks katseloomade silmi 24 tundi loputada. 24 tunni järel võib silmi vajadusel loputada.

Mõnede käesolevas katses ärritavaks osutunud ainete puhul võivad olla näidustatud lisakatsed küülikutega, kellel silmi varsti pärast katseaine sisseviimist loputatakse. Sellistel puhkudel on soovitatav kasutada kolme küülikut. Pool minutit pärast aine silma viimist loputatakse küülikute silmi pool minutit sellise voolukiiruse ja mahuga, mis silmi ei vigasta.

#### 1.6.3.1. Vaatlused ja hindamine

Silmi tuleks uurida 1, 24, 48 ja 72 tunni möödumisel. Kui 72 tunni möödumisel silmakahjustustele viitavaid märke ei ilmne, võib uuringu lõpetada.

Püsiva sarvkestapõletiku või muu silmärrituse puhul võib vaja olla pikemat vaatlusperioodi, et kontrollida kahjustuste kulgu ja nende pöörduvust või pöördumatust. Lisaks silma sarvkesta, sidekesta ja vikerkesta käsitlevatele vaatlustulemustele tuleks registreerida ja esitada kõik muud täheldatud kahjustused. Silma reaktsiooni hinded (tabel) tuleks registreerida iga läbivaatuse ajal. Silma reaktsiooni hindamine on tõlgendamise küsimus. Uuringulaborid ning vaatlustulemused koguvad ja hindavad isikud võivad abivahendina kasutada silmärrituste illustreeritud hindamisjuhendit.

Reaktsiooni uurimisel võib abi olla binokulaarsest luubist, käsi-pilulambist, biomikroskoobist või muust sobivast abivahendist. Peale 24-tunnist vaatlustulemuste registreerimist võib kõigi küülikute silmi veel fluorestseini abil uurida.

## 2. ANDMED

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis iga katselooma puhul näitab ärrituse astme määratud vaatlushetkel. Protokollitakse ärritusnähtude raskusastme ja iseloomu kirjeldus, tõsiste kahjustuste esinemine ja muude nähtude esinemine, lisaks silmadega seotutele.

## 3. ARUANDLUS

### 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- katseloomade kohta käivaid andmeid (liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne),
- katsetingimusi (sealhulgas testaine asjaomaseid füüsikalisi-keemilisi omadusi),
- kokkuvõtlikku ärritus-/söövitusreaktsioonide tabelit iga katselooma kohta igal vaatlushetkel (näiteks 1., 24., 48. ja 72. tunnil),
- kõigi tõsiste kahjustuste kirjeldust,
- vaadeldud ärritus- või söövitusnähtude raskusastme ja iseloomu jutustavas vormis kirjeldust, kus on märgitud ka nähu poolt haaratud sarvkesta piirkond ning nähu pöörduvus,

- ärrituse hindamisel 1, 24, 48 ja 72 tunni möödudes kasutatud meetodi kirjeldust (näiteks käsi-pilulamp, biomikroskoop, fluorestseini),
  - kõiki paiksed nähte lisaks silmadega seotutele,
  - tulemuste analüüsi,
  - tulemuste tõlgendust.
- 3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE
- Vt B osa üldist sissejuhatust (D).
4. **VIITED**
- Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

#### Liide

### SILMAKAHJUSTUSTE HINDAMINE

#### Sarvkest

*Läbipaistmatus: tiheduse aste (määratakse kõige tihedamas piirkonnas)*

|                                                                                                                           |   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Haavandumine ja läbipaistmatus puuduvad .....                                                                             | 0 |
| Hajusalt paiknevad läbipaistmatud piirkonnad (lisaks normaalse läike kergele tuhmumisele), vikerkest selgelt nähtav ..... | 1 |
| Kergesti eristatav poolläbipaistev ala, vikerkesta detailne nähtavus kergelt takistatud .....                             | 2 |
| Pärlmutrine piirkond, vikerkesta detailid mittenähtavad, pupilli suurus vaevu eristatav .....                             | 3 |
| Sarvkest läbipaistmatu, vikerkest läbipaistmatu sarvkesta all eristamatu .....                                            | 4 |

#### Vikerkest

|                                                                                                                                                                                                                            |   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Normaalne .....                                                                                                                                                                                                            | 0 |
| Märgatavalt süvenenud kurrud, kongestsioon, turse, sarvkesta ümbruse mõõdukas hüperemia/injektsioon või nende nähtude mis tahes kombinatsioon; vikerkest reageerib veel valgusele (aeglane reaktsioon on positiivne) ..... | 1 |
| Reaktsioon valgusele puudub, hemorraagia, ulatuslikud kahjustused (üks või mitu neist sümptomitest) .....                                                                                                                  | 2 |

#### Sidekestad

*Punetus (lau ja silmamuna sidekestade kõige kõrgem tulemus kontrollsilmaaga võrrelduna)*

|                                                                         |   |
|-------------------------------------------------------------------------|---|
| Normaalsed veresooned .....                                             | 0 |
| Mõned veresooned selgelt hüperemilised (injekteerunud) .....            | 1 |
| Hajus karmiinpunane värvus, üksikud veresooned halvasti eristuvad ..... | 2 |
| Hajus lihakarva punane värvus .....                                     | 3 |
| <i>Sidekestaturse: laud ja/või poolkuukurrud</i>                        |   |
| Turse puudub .....                                                      | 0 |
| Mis tahes ebanormaalne turse (sealhulgas poolkuukurdudel) .....         | 1 |
| Ilmne turse laugude osalise väljapoolepöördumisega .....                | 2 |
| Turse umbes poolkinniste laugudega .....                                | 3 |
| Turse rohkem kui poolkinniste laugudega .....                           | 4 |

**B.6. NAHA SENSIBILISEERIMINE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

*Märkused:*

Katsete tundlikkust ja tulemuslikkust inimese naha võimalike sensibilisaatorite tuvastamisel peetakse tähtsaks avaliku tervise seisukohalt olulise mürgisusklassifikatsiooni puhul.

Ühtki kaitsemeetodit ei saa kohaldada kõigile ainetele, tuvastamaks kõiki võimalikke inimese naha sensibilisaatoreid.

Katse valikul tuleb arvesse võtta aine füüsikalisi omadusi, sealhulgas selle võimet tungida läbi naha.

Katsed merisigadega võib jagada kahte alamklassi: katseteks adjuvandiga, kus allergeensust tugevdatakse katseaine lahustamise või suspendeerimisega Freundi täisadjuvandis (FCA), ja adjuvandita katseteks.

Adjuvandiga katsed on aine tõenäolise inimese nahka sensibiliseeriva mõju prognoosimisel täpsemad kui Freundi täisadjuvanti mitte kasutavad meetodid ja seetõttu tuleks eelistada neid meetodeid.

Merisigadega läbiviidav maksimeerimiskatse (GPMT) on laialdaselt kasutatav adjuvandiga katse. Ehkki toimeaine võimet põhjustada naha sensibiliseerumist on võimalik määrata paljude muude meetoditega, loetakse GPMT eelistatavaks adjuvandiga meetodiks.

Paljude kemikaaliklasside puhul loetakse adjuvandita katseid (viimaste seast on eelistatav Buehleri katse) vähem tundlikuks.

Mõningatel juhtudel võib olla mõjuvaid põhjusi eelistada paikse manustamisega Buehleri katset merisigadega läbiviidavas maksimeerimiskatses kasutatavatele nahasisestele süstetele. Buehleri katse kasutamisel tuleb selle kohta esitada teaduslik põhjendus.

Selles meetodis kirjeldatakse merisigadega läbiviidavat maksimeerimiskatset (GPMT) ja Buehleri katset. Kasutada võib ka muid meetodeid eeldusel, et need on põhjalikult kontrollitud ja et esitatakse teaduslik põhjendus.

Olenemata kasutatavatest meetoditest, tuleb kasutatava merisealiini tundlikkust regulaarsete ajavahemike (kuue kuu) järel kerge kuni keskmise sensibilisaatori abil kontrollida ning saadud positiivsete reaktsioonide arv peab olema küllaldane.

Vt ka B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÄÄRATLUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Soovitav on kasutada järgmisi võrdlusaineid, vajadusel lahjendatuna; sobivad ka kõik muud kirjanduses esitatud või uuritava ainega samasse ühendiklassi kuuluvad sensibilisaatorid.

|                           |                   |
|---------------------------|-------------------|
| – p-fenüleendiamiin       | CASi nr 106-50-3  |
| – 2,4-dinitroklorobenseen | CASi nr 97-00-7   |
| – kaaliumdikromaat        | CASi nr 7778-50-9 |
| – neomütsiinsulfaat       | CASi nr 1405-10-3 |
| – nikkelsulfaat           | CASi nr 7786-81-4 |

## 1.4. KATSEMEETODITE PÕHIMÕTE

Pärast algset kokkupuudet testainega ("induktsiooniperioodi") viiakse katseloomad ligikaudu kaks nädalat peale induktsiooniperioodi lõppu testainega "mõjutuskokkupuutesse", et kontrollida, kas loomal on tekkinud ülitundlik seisund. Sensibiliseerumise astme määramiseks uuritakse naha reaktsiooni mõjutuskokkupuutele.

## 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Puuduvad.

## 1.6. MEETODITE KIRJELDUS

## 1.6.1. Merisigadega läbiviidav maksimeerimiskatse (GPMT)

## 1.6.1.1. Ettevalmistused

Noored terved albiinomerisead randomiseeritakse ning jagatakse katse- ja kontrollrühmadesse. Enne manustamist eemaldatakse pügamise või raseerimise teel karvkate katseloomade turjapiirkonnast. Vältida tuleks naha vigastamist.

## 1.6.1.2. Katsetingimused

## 1.6.1.2.1. Katseloomad

Kasutatakse tavapäraseid laboritöös kasutatavaid merisealiine, looma kaaluga alla 500 g.

## 1.6.1.2.2. Katseloomade arv ja sugu

Kasutada võib nii isas- kui ka emasloomi. Emasloomade kasutamisel ei tohiks nad olla poeginud ega tiined. Katseloomade minimaalne arv katserühmas on 10 ja kontrollrühmas 5. Väiksema arvu loomade kasutamist tuleb põhjendada. Ebaselgete tulemuste puhul võib kasutada histopatoloogilist vaatlust, et otsustada, kas katset tuleks uute katseloomadega korrata.

Kui ei ole võimalik üheselt järeldada, kas testaine on sensibilisaator või mitte, on soovitatav teha uuringuid täiendavate loomadega, kasutades katsetes kokku 20 katse- ja 10 kontroll-looma.

## 1.6.1.2.3. Annusemäärad

Testaine kontsentratsioon viiakse tasemele, mis kutsub esile mõningaid naha ärritusnähte, kuid mida loomad igas induktsioonietapis hästi taluvad.

Mõjutuskontsentratsioonina tuleks kasutada kõrgeimat kontsentratsiooni, mis sensibiliseerimata loomadel naha ärritust esile ei kutsu.

Vastavad kontsentratsioonid võib määrata väikesemahulises (2–3 loomaga) prooviuuringus.

## 1.6.1.2.4. Vaatlusperiood

Induktsiooniperioodil vaadeldakse loomi võimalike ärritusnähtude avastamiseks. Peale mõjutuskokkupuudet registreeritakse naha reaktsioon 24 ja 48 tunni möödumisel plaastri eemaldamisest.

## 1.6.1.3. Katse käik

Kõik loomad kaalutakse enne katse algust ja katse lõpus. Turjapiirkond vabastatakse karvkattest. Katse koosneb kahest etapist.

## 1.6.1.3.1. Induktsiooniperiood

0-päev – katserühm

Katseloomade turjapiirkonna nahka süstitakse järgmised süstelahuste paarid, kumbki 0,1 ml, üks süst katselooma kummalegi küljele:

- |          |                                                                                                  |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. süst: | 0,1 ml Freundi täisadjuvanti (FCA) segatuna vee või füsioloogilise soolalahusega vahekorras 1:1, |
| 2. süst: | 0,1 ml testainet, vajadusel sobivas kandjas,                                                     |
| 3. süst: | 0,1 ml testainet FCA-s.                                                                          |

3. süsti puhul lahustatakse vees lahustuvad ained 0,05 ml vees ja 0,05 ml lahjendamata FCA-s. Rasvlahustuvad ja lahustumatud testained segatakse lahjendamata FCA-ga.

Testaine lõppkontsentratsioon peab 3. süstis olema võrdne 2. süsti omaga.

1. ja 2. süst tehakse lähestikku ja peale kõige lähemale, 3. tehakse katsepiirkonna tagumisse ossa.

0-päev – kontrollrühm

Eespool nimetatud piirkonna nahka süstitakse järgmised süstelahuste paarid:

- |          |                                                                                                  |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. süst: | 0,1 ml Freundi täisadjuvanti (FCA) segatuna vee või füsioloogilise soolalahusega vahekorras 1:1, |
| 2. süst: | 0,1 ml puhast kandjat,                                                                           |
| 3. süst: | 0,1 ml kandjat FCA-s.                                                                            |

6. päev – kontroll- ja katserühm

Kui testaine ei ole nahka ärritav, kantakse katsepiirkonnale peale karvkatte pügamist ja/või raseerimist paikse ärrituse tekitamiseks 0,5 ml naatriumlaauriülsulfaadi-vaseliini 10 % segu.

7. päev – katserühm

Katsepiirkond vabastatakse jälle karvkattest. Sobivas kandjas testaine (kandja valikut tuleks põhjendada; tahked ained peenestatakse ja segatakse sobiva kandjaga, vedelikke võib sobivusel otse kasutada) kantakse filterpaberile (2 × 4 cm), asetatakse katsepiirkonnale ja hoitakse 48 tundi oklusiivsidemega paigal.

7. päev – kontrollrühm

Katsepiirkond vabastatakse jälle karvkattest. Puhas kandja viiakse sama moodi katsepiirkonnale ja hoitakse 48 tundi oklusiivsidemega paigal.

## 1.6.1.3.2. Mõjutamine

21. päev

Katse- ja kontrollloomade küljed vabastatakse karvkattest. Katserühma loomade ühele küljele paigutatakse plaaster või kamber testainega ja teisele küljele plaaster või kamber puhta kandjaga.

Plaastreid hoitakse 24 tundi oklusiivsidemega paigal.

Kontrollrühma loomad läbivad samasuguse kokkupuuteprogrammi.

23. ja 24. päev

- 21 tundi pärast plaastri eemaldamist puhastatakse mõjutatud ala ja eemaldatakse vajadusel karvad,
- kolm tundi hiljem (48 tundi mõjutuskokkupuute algusest arvates) kontrollitakse naha reaktsiooni ja registreeritakse tulemus,
- 24 tundi pärast vaatlust (72. tunnil) kontrollitakse loomi uuesti ja registreeritakse vaatlustulemused.

Esimese mõjutuskatse käigus saadud tulemusi tuleks ligikaudu nädal hiljem kontrollida teise mõjutuskatse abil, vajadusel uue (kandjaga mõjutatava) kontrollrühmaga.

#### 1.6.1.3.3. Vaatlused ja hindamine

Registreerida ja esitada tuleks kõik nahareaktsioonid ja muud ebatavalised leiud nii induksiooniperioodil kui ka mõjutusperioodil.

Kahtlaste reaktsioonide või testainest värvunud naha tõttu varjatud reaktsioonide selgitamiseks võib kasutada selliseid meetodeid, nagu histopatoloogilist vaatlust või nahavoldi paksuse mõõtmist.

#### 1.6.2. Buehleri katse

##### 1.6.2.1. Ettevalmistused

Noored terved albiinomerisead randomiseeritakse ning jagatakse katse- ja kontrollrühmadesse. Enne manustamist eemaldatakse pügamise ja/või raseerimise teel karvkate katseloomade ühelt küljelt. Vältida tuleks naha vigastamist.

##### 1.6.2.2. Katsetingimused

###### 1.6.2.2.1. Katseloomad

Kasutatakse tavapäraseid laboritöös kasutatavaid merisealiine, looma kaaluga alla 500 g.

###### 1.6.2.2.2. Katseloomade arv ja sugu

Kasutada võib nii isas- kui ka emasloomi. Emasloomade kasutamisel ei tohiks nad olla poeginud ega tiined. Katseloomade minimaalne arv katserühmas on 20 ja kontrollrühmas 10. Väiksema arvu loomade kasutamist tuleb põhjendada. Ebaselgete tulemuste puhul võib kasutada histopatoloogilist vaatlust, et otsustada, kas katset tuleks uute katseloomadega korrata.

###### 1.6.2.2.3. Annusemäärad

Igas induksioonietapis viiakse testaine kontsentratsioon kõrgeimale tasemele, mida loomad süsteemselt hästi taluvad ja mis ärritavate ainete puhul kutsub enamikul loomadel esile kergeid kuni mõõdukaid ärritusnähte. Mõjutuskontsentratsioonina tuleks kasutada kõrgeimat kontsentratsiooni, mis sensibiliseerimata loomadel naha ärritust esile ei kutsu. Vastavad kontsentratsioonid võib määrata väikesemahulises (2–3 loomaga) uuringus.

###### 1.6.2.2.4. Vaatlusperiood

Induksiooniperioodil vaadeldakse loomade nahka ärritusnähtude avastamiseks. Pärast mõjutuskokkupuudet registreeritakse naha reaktsioon 24 ja 48 tunni möödumisel plaastri eemaldamisest, st 30 ja 54 tundi peale nahale kandmise algust.

##### 1.6.2.3. Katse käik

Kõik loomad kaalutakse enne katse algust ja katse lõpus.

Katse koosneb kahest etapist.

#### 1.6.2.3.1. Induktsiooniperiood

0-päev – katserühm

Üks külg vabastatakse karvkattest. 0,5 ml sobivas kandjas testainet (kandja valikut tuleks põhjendada; vedelikke võib sobivusel otse kasutada) kantakse vatipadjale. Viimane asetatakse katsepiirkonnale ning hoitakse oklusiivplaastri või kambriga ja sobiva sidemega 6 tundi naha vastas.

0-päev – kontrollrühm

Üks külg vabastatakse karvkattest. Puhas kandja viiakse sama moodi katsepiirkonnale. Seda hoitakse oklusiivplaastri või kambriga ja sobiva sidemega 6 tundi naha vastas.

7. ja 14. päev

Nii 7. kui ka 14. päeval viiakse samal katsepiirkonnal läbi sama pealekandmisprotseduur (eemaldades vajadusel karvad), mis 0-päeval.

#### 1.6.2.3.2. Mõjutamine

28. päev

Katse- ja kontrollloomade teine külg vabastatakse karvkattest. Katserühma loomade külje tagumisele osale paigutatakse oklusiivplaaster või kamber 0,5 ml testainega kõrgeimal mitteärritaval kontsentratsioonil. Sama külje esiosale paigutatakse oklusiivplaaster või kamber puhta kandjaga.

Plaastreid hoitakse 6 tundi sobiva oklusiivsidemega naha vastas.

Kontrollrühma loomad läbivad samasuguse kokkupuuteprogrammi.

29. ja 30. päev

- 21 tundi pärast plaastri eemaldamist puhastatakse mõjutatud ala ja eemaldatakse vajadusel karvad,
- kolm tundi hiljem (30 tundi mõjutuskokkupuute algusest arvates) kontrollitakse naha reaktsiooni ja registreeritakse tulemus,
- 24 tundi pärast eelmist vaatlust (54. tunnil) kontrollitakse loomi uuesti ja registreeritakse vaatlustulemused.

#### 1.6.2.3.3. Vaatlused ja hindamine

Registreerida ja esitada tuleks kõik nahareaktsioonid ja muud ebatavalised leiud nii induktsiooniperioodil kui ka mõjutusperioodil.

Kahtlaste reaktsioonide või testainest värvunud naha tõttu varjatud reaktsioonide selgitamiseks võib kasutada selliseid meetodeid, nagu histopatoloogilist vaatlust või nahavoldi paksuse mõõtmist.

#### 2. ANDMED (GPMT ja Buehleri katse)

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis iga katselooma puhul näitab naha reaktsiooni igal vaatlushetkel.

#### 3. ARUANDE (GPMT ja Buehleri katse)

##### 3.1. KATSEARUANNE (GPMT ja Buehleri katse)

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- kasutatud merisealiini,
- katsetingimusi, kandjat ning induktsiooni- ja mõjutusperioodil kasutatud testaine kontsentratsioone,

- loomade arvu, vanust ja sugu,
- kõigi loomade massi katse alguses ja lõpus,
- kõiki vaatlustulemusi kõigi loomade kohta koos kasutatud hindamissüsteemiga,
- tulemuste analüüsi,
- tulemuste tõlgendust.

3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE (GPMT ja Buehleri katse)

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.7. KORDUSDOOSI MÜRGISUS (28 PÄEVA, SUUKAUDNE)**

1. MEETOD

1.1. SISSEJUHATUS

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Testainet manustatakse 28 päeva jooksul iga päev suukaudselt astmeliste annustena mitmele katseloomade rühmale nii, et üks rühm saab ühesuguse annuse. Manustamisperioodil jälgitakse loomi iga päev, et kontrollida mürgistusnähtude ilmnemist. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Puuduvad.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. Ettevalmistused

Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsele vastavatel pidamis- ja söötmingimustel. Noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse katserühmadesse. Testitav aine manustatakse koos söödaga, sondi kaudu, kapslites või joogivees. Kõiki loomi tuleks kogu katseperioodi vältel annustada sama meetodi kohaselt. Kui annustamise lihtsustamiseks kasutatakse kandjat või muid lisandeid, peab olema kindel, et need ei põhjusta mürgistusnähte. Vajadusel võib kasutada varasemaid andmeid.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Katseloomad**

Vastunäidustuste puudumisel on eelistatavaks liigiks rott. Kasutada tuleks noori terveid loomi tavapärastest laboritöös kasutatavatest liinidest ja annustamist tuleks ideaaljuhul alustada enne, kui rott saab kuuenädalaseks, ning igal juhul enne, kui rott saab kaheksanädalaseks.

Kasutatavate loomade masside erinevus uuringu alguses ei tohiks ületada  $\pm 20\%$  vastavast keskmisest.

**1.6.2.2. Katseloomade arv ja sugu**

Iga uuritavat kontsentratsiooni tuleks katsetada vähemalt 10 loomal (viiel emas- ja viiel isasloomal). Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kui uuringu jooksul plaanitakse loomi surmata, tuleks loomade arvu enne uuringu lõppu surmamisele määratud loomade arvu võrra suurendada. Lisaks võib testaine kõrgeima annusega mõjutada 28 päeva jooksul üht 10 loomaga (viis looma kummastki soost) satelliitühikut ja jälgida sellel 14 päeva jooksul pärast kokkupuudet mürgistusnähtude pöördumist, püsivust või hilist avaldumist. Kasutatakse ka üht 10 kontroll-loomaga (viis looma kummastki soost) satelliitühikut.

**1.6.2.3. Annusemäärad**

Kasutatakse vähemalt kolme annusemäära ja kontrollannust. Testainega töötlemine välja arvatud, tuleks kontrollühiku loomi kohelda samamoodi nagu katserühma loomi. Kui annustamise lihtsustamiseks kasutatakse kandjat, tuleks kontroll-loomadele manustada kandjat analoogselt katserühmaga ja nad peaksid saama sama koguse kandjat nagu kõrgeima annusemääraga rühm. Kõrgeim annus peaks põhjustama mürgistusnähte, kuid ei tohiks põhjustada suremust või siis peaks suremus olema väike. Minimaalne annus ei tohiks esile kutsuda ühtegi mürgistusnähtu. Kasutuskõlbuliku hinnangulise inimkokkupuute annuse olemasolul peaks madalaim annus sellest kõrgem olema. Ideaaljuhul peaks keskmine annusemäär põhjustama minimaalseid täheldatavaid mürgistusnähte. Rohkem kui ühe vahepealse annuse kasutamisel peaks annusemäärad jaotuma nii, et tekkivad mürgistusnähud jaotuvad astmeliselt. Tulemuste usaldusväärse hindamise võimaldamiseks peaks suremus madala ja vahepealsete annusemäärade ning kontrollühikutes, kui seda esineb, olema madal.

Testaine manustamisel söödaga võib kasutada nii konstantset kontsentratsiooni söödas (ppm või mg/kg söödas) kui ka looma kehakaalu suhtes konstantset annust; kasutatud variant tuleb ära märkida. Testaine manustamisel sondi kaudu tuleks annus anda iga päev sarnastel kellaaegadel ja annuseid järk-järgult (üks või kaks korda nädalas) reguleerida, et annus jääks looma kehakaalu suhtes konstantseks.

**1.6.2.4. Piirisalduskatse**

Kui allpool kirjeldatud meetodile vastav 28-päevane uuring ühe annusemääraga 1 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas või kõrgema, võimaliku teadaoleva inimkokkupuute kontsentratsiooniga seotud annusemääraga ei kutsu esile mürgistusnähte, võib edasise kontrollimise lugeda tarbetuks. Vähemürgiste ainete puhul on oluline tagada, et testaine söödaga manustamisel ei takistaks aine kogused ja omadused normaalsete toitainevajaduste katmist.

**1.6.2.5. Vaatlusperiood**

Kõiki loomi tuleb iga päev jälgida ja registreerida kõik mürgistusnähud ning nende ilmnemise aeg, raskusaste ja kestus. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise ning surma aeg on väga olulised ja need tuleks registreerida.

**1.6.3. Katse käik**

Ideaaljuhul tuleks loomadele anda testainet 28 päeva jooksul seitsmel päeval nädalas. Mis tahes satelliitrühma loomadele, kellega planeeritakse hilisemaid vaatlusi, ei tohiks järgneva 14 päeva jooksul ainet manustada, et kontrollida mürgistusnähtudest paranemist või nende püsivust.

Vaadelda tuleks muutusi nii nahas ja karvkattes, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vere- ringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Iga nädal tuleks kontrollida tarbitava sööda kogust (ja testaine joogiveega manustamisel tarbitava joogivee kogust) ning loomi kord nädalas kaaluda.

Loomi tuleb regulaarselt vaadelda, et võimaluse piires vältida loomade kadu põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade kaotsimine nende ümberpaigutamisel. Uuringuperioodi lõpus surmataks ja lahatakse kõik ellujäänud loomad, v.a satelliitrühma loomad. Surevad ja tõsistes kannatustes või valudes loomad tuleks avastamisel kõrvaldada, humaanselt surmata ja lahata.

Kõigile loomadele, sh kontrollrühma loomadele, tehakse katseperioodi lõpus järgmine uuring:

1. hematoloogia, sealhulgas vähemalt hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide üld- ja suhtarv ja hüübimisvõime;
2. kliiniline verebiokeemia, sh vähemalt üks maksa ja neerude funktsiooni parameeter:alaniini aminotransferaas (varem tuntud glutamaat-püruvaadi transaminaasina), seerumi aspartaadi aminotransferaas (varem tuntud glutamaat-oksaloatsetaadi transaminaasina, kusiainelämmastik, albumiin, kreatiniin, üldbilirubiin ja seerumi üldvalk.

Muud analüüsinäidud, mida võib pädeva toksikoloogilise hinnangu andmiseks vaja minna, on: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, veresuhkur (tühja kõhuga), lipiidianalüüs, hormoonid, happe/aluse tasakaal, methemoglobiin, koliini esteraasi aktiivsus.

Vajadusel võib vaadeldava toime põhjalikumaks uurimiseks kasutada täiendavaid kliinilisi biokeemilisi näitajaid.

**1.6.3.1. Üldlahang**

Kõik katseloomad tuleks üleni lahata. Vähemalt maks, neerud, neerupealised ja munandid tuleks kohe pärast lahti lõikamist kuivamise vältimiseks märjalt kaaluda. Elundid ja koed (maks, neerud, põrn, munandid, neerupealised, süda ja mis tahes muud makropatoloogiliste kahjustustega või muutunud suurusega elundid) tuleks säilitada sobivas keskkonnas võimaliku hilisema histopatoloogilise uuringu jaoks.

**1.6.3.2. Histopatoloogiline uuring**

Kõrgeima annusega rühma ja kontrollrühma loomade säilitatud elundeid ja kudesid tuleks histoloogiliselt uurida. Kõrgeima annusega rühmal testainega seostatavate kahjustustega elundeid ja kudesid tuleks kontrollida ka kõigi madalama annusega rühmade puhul. Võimaliku satelliitrühma loomi tuleks samuti histoloogiliselt uurida, pöörates eriti tähelepanu nendele elunditele ja kudedele, milles muudes katserühmades esines muutusi.

**2. ANDMED**

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis iga katserühma puhul näitab katseloomade arvu selles katse algul ja igat tüüpi kahjustustega loomade arvu.

Kõiki vaatlustulemusi tuleks hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib kõiki tunnustatud statistilisi meetodeid.

**3. ARUANDLUS****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne,
- katsetingimusi,
- annuseid (kandja kasutamisel koos kandjaga) ja kontsentratsioone,
- mürgistusnähtude andmeid soo ja annuse järgi,
- võimalusel toimetada annust,
- surmahetke uuringu ajal või seda, kas loomad jäid kuni surmamiseni ellu,
- mürgistus- või muid nähte,
- iga kõrvalekalde täheldamise aega ja kõrvalekalde hilisemat kulgu,
- sööda ja kehamassi andmeid,
- kasutatud hematoloogilisi analüüse ja kõiki nende tulemusi,
- kasutatud kliinilise biokeemia analüüse ja kõiki nende tulemusi,
- lahkamistulemusi,
- kõigi histopatoloogiliste leidude üksikasjalikku kirjeldust,
- vajadusel tulemuste statistilist analüüsi,
- tulemuste analüüsi,
- tulemuste tõlgendust.

**3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE**

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

**4. VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.8. KORDUSDOOSI MÜRGISUS (28 PÄEVA, SISSEHINGAMISEL)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine osakeste suurusjaotust, aururõhku, sulamistemperatuuri, keemistemperatuuri, leekpunkti ja (vajadusel) plahvatusohtlikkust.

Vt ka B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÄÄRATLUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Mitu katseloomade rühma viiakse 28 päeva jooksul iga päev kindlaks ajaks kokkupuutesse testaine astmeliste kontsentratsioonidega nii, et üks rühm puutub kokku ühesuguse kontsentratsiooniga. Kui testainele lisatakse atmosfääris sobiva kontsentratsiooni saavutamiseks kandjat, tuleks kasutada kandja kontrollrühma. Manustamisperioodil jälgitakse loomi iga päev, et kontrollida mürgistusnähtude ilmnemist. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Ettevalmistused**

Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsele vastavatel pidamis- ja söötmingimustel. Noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse vajalikku arvu katserühmadesse. Sobiva kontsentratsiooni saavutamiseks atmosfääris võib testainele lisada vajadusel sobivat kandjat. Kui annustamise lihtsustamiseks kasutatakse kandjat või muid lisandeid, peab olema kindel, et need ei põhjusta mürgistusnähte. Vajadusel võib kasutada varasemaid andmeid.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Katseloomad**

Vastunäidustuste puudumisel on eelistatavaks liigiks rott. Kasutada tuleks tavapäraseid laboritöös kasutatavaid liine ja noori terveid loomi.

Kasutatavate katseloomade masside erinevus katse alguses ei tohiks ületada  $\pm 20\%$  vastavast keskmisest.

#### 1.6.2.2. Katseloomade arv ja sugu

Igas katserühmas peaks olema vähemalt 10 looma (viis emas- ja viis isaslooma). Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kui uuringu jooksul plaanitakse loomi surmata, tuleks loomade arvu enne uuringu lõppu surmamisele määratud loomade arvu võrra suurendada. Lisaks võib testaine kõrgeima kontsentratsiooniga mõjutada 28 päeva jooksul üht 10 loomaga (viis looma kummastki soost) satelliitrühma ja jälgida sellel 14 päeva jooksul pärast kokkupuudet mürgistusnähtude pöörduvust, püsivust või hilist avaldumist. Kasutatakse ka üht 10 kontroll-loomaga (viis looma kummastki soost) satelliitrühma.

#### 1.6.2.3. Kokkupuutekontsentratsioon

Kasutatakse vähemalt kolme kontsentratsiooni ja kontrolli või kandja kasutamisel kandja kontrolli (mis vastab kandja kontsentratsioonile testaine kõrgeimal kontsentratsioonitasemel). Testainega töötlemine välja arvatud, tuleks kontrollrühma loomi kohelda samamoodi nagu katserühma loomi. Kõrgeim kontsentratsioon peaks põhjustama mürgistusnähte, kuid ei tohiks põhjustada suremust või siis peaks suremus olema väike. Väikseima kontsentratsiooni puhul ei tohiks mürgisust ilmned. Kasutuskõlbliku hinnangulise inimkokkupuute kontsentratsiooni olemasolul peaks madalaim kontsentratsioon olema sellest kõrgem. Ideaaljuhul peaks keskmine kontsentratsioon põhjustama minimaalseid täheldatavaid mürgistusnähte. Rohkem kui ühe vahepealse kontsentratsiooni kasutamisel peaksid kontsentratsioonitasemed jaotuma nii, et tekkivad mürgistusnähud jaotuvad astmeliselt. Tulemuste usaldusväärse hindamise võimaldamiseks peaks suremus madala ja vahepealsete annusemäärade ja ning kontrollrühmades, kui seda esineb, olema madal.

#### 1.6.2.4. Kokkupuute kestus

Igapäevase kokkupuuteaja kestus peaks olema kuus tundi, kuid spetsiifiliste vajaduste puhul võib vajalik olla teistsugune kestus.

#### 1.6.2.5. Seadmed

Loomkatsetes tuleks kasutada hingamisseadet, mis suudab tagada dünaamilise õhuvoo vähemalt 12 täieliku õhuvahetusega tunnis ning tagab küllaldase hapnikusalduse ja homogeense kokkupuutekeskkonna. Kambri kasutamisel peaks selle ehitus piirama katseloomade ühte kohta kogunemist ja tagama võimalikult hea inhalatoorse kokkupuute testainega. Stabiilse kambriatmosfääri tagamiseks ei tohiks katseloomade "maht" üldjuhul ületada 5 % kambri üldmahust. Kasutada võib väliseid hingamiselundeid, ainult pead või kogu keha haaravat individuaalset kambrit; esimesed kaks piiravad testaine sattumist organismi muid teid pidi.

#### 1.6.2.6. Vaatlusperiood

Kõigil katseloomadel tuleb nii kokkupuuteperioodil kui ka taastumisperioodil iga päev jälgida mürgistusnähtude ilmnemist. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise ning surma aeg on väga olulised ning tuleks registreerida.

#### 1.6.3. Katse käik

Loomad viiakse testainega kokkupuutesse 28-päevase perioodi jooksul kord päevas, 5–7 päeval nädalas. Mis tahes satelliitrühma loomadele, kellele planeeritakse hilisemaid vaatlusi, ei tohiks järgneva 14 päeva jooksul ainet manustada, et kontrollida mürgistusnähtudest paranemist või nende püsivust. Katsetemperatuuri tuleks hoida  $22 \pm 3$  °C juures.

Ideaaljuhul tuleks suhteline õhuniiskus hoida 30 % ja 70 % vahel, kuid mõningatel juhtudel (nt katsetes mõnede aerosoolidega) ei saa seda rakendada. Väikese alarõhu ( $\leq 5$  mm H<sub>2</sub>O) kasutamine kambri välisest testaine lekke ümbritsevasse keskkonda. Süüa ja juua kokkupuute ajal anda ei tohiks.

Kasutada tuleks analüütilise kontsentratsioonijuhtimissüsteemiga dünaamilist hingamisseadet. Sobivate kokkupuutekontsentratsioonide leidmiseks on soovitatav teha eelkatse. Õhu voolukiirust tuleks reguleerida nii, et tingimused on kogu kokkupuutekambri ulatuses homogeensed. Seade peaks võimalikult kiiresti saavutama stabiilsed kokkupuutetingimused.

Mõõta või kontrollida tuleb:

- a) õhu voolukiirust (pidevalt);
- b) testaine tegelikku kontsentratsiooni hingamistsoonis. Igapäevase kokkupuute ajal ei tohiks kontsentratsioon keskmise suhtes kõikuda rohkem kui  $\pm 15\%$ . Mõnede aerosoolide puhul ei ole nii täpne reguleerimine siiski võimalik, sellisel juhul on lubatav suurem kõikumisvahemik. Kogu katse kestel tuleks kontsentratsioone päevast päeva võimalikult konstantsena hoida. Aerosoolide puhul tuleks igas katserühmas vähemalt üks kord nädalas kontrollida osakeste suurusi;
- c) temperatuuri ja õhuniiskust, võimalusel pidevalt.

Kokkupuute ajal ja järel loomi jälgitakse ja vaatlustulemused registreeritakse süstemaatiliselt, iga looma kohta tuleb pidada eraldi arvestust. Kõiki loomi tuleb iga päev jälgida ja registreerida kõik mürgistusnähud ja nende ilmnemise aeg, raskusaste ja kestus. Vaadelda tuleks muutusi nii nahas ja karvkattes, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vereringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Loomi tuleks iga nädal kaaluda. Soovitatakse iga nädal mõõta ka toidu tarbimist. Loomi tuleb regulaarselt vaadelda, et võimaluse piires vältida loomade kadu põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade kaotsimine nende ümberpaigutamisel. Uuringuperioodi lõpus surmatakse ja lahatakse kõik ellujäänud loomad, v.a satelliitrühma loomad. Surevad ja tõsistes kannatustes või valudes loomad tuleks avastamisel kõrvaldada, humaanselt surmata ja lahata.

Kõigile loomadele, sh kontrollrühma loomadele, tehakse katseperioodi lõpus järgmine uuring:

- i) hematoloogia, sealhulgas vähemalt hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide üld- ja suhtarv ja hüübimisvõime;
- ii) kliiniline verebiokeemia, sh vähemalt üks maksa ja neerude funktsiooni parameeter:alaniini aminotransferaas (varem tuntud glutamaat-püruvaadi transaminaasina), seerumi aspartaadi aminotransferaas (varem tuntud glutamaat-oksaloatsetaadi transaminaasina), kusiainelämmastik, albumiin, kreatiniin, üldbilirubiin ja seerumi üldvalk.

Muud analüüsinäidud, mida võib pädeva toksikoloogilise hinnangu andmiseks vaja minna, on: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, veresuhkur (tühja kõhuga), lipiidianalüüs, hormoonid, happe/aluse tasakaal, methemoglobiin ja koliini esteraasi aktiivsus.

Vajadusel võib vaadeldavate mürgistusnähtude põhjalikumaks uurimiseks kasutada täiendavaid kliinilisi biokeemilisi näitajaid.

#### 1.6.3.1. Üldlahang

Kõik katseloomad tuleks üleni lahata. Vähemalt maks, neerud, neerupealised, kopsud ja munandid tuleks kohe peale lahti lõikamist kuivamise vältimiseks märjalt kaaluda. Elundid ja koed (hingamisteed, maks, neerud, põrn, munandid, neerupealised, süda ja mis tahes muud makropatoloogiliste kahjustustega või muutunud suurusega elundid) tuleks säilitada sobivas keskkonnas võimaliku satelliitrühma histopatoloogilise uuringu jaoks. Kopsud tuleks eemaldada tervelt, kaaluda ja töödelda kostruktuuri säilitamiseks sobiva fiksaatoriga.

#### 1.6.3.2. Histopatoloogiline uuring

Kõrgeima kontsentratsiooniga rühma ja kontrollrühma(de) loomade säilitatud elundeid ja kudesid tuleks histoloogiliselt uurida. Kõrgeima annusega rühmal testainega seostatavate kahjustustega elundeid ja kudesid tuleks kontrollida ka kõigil madalama annusega rühmadel. Võimaliku satelliitrühma loomi tuleks samuti histoloogiliselt uurida, pöörates eriti tähelepanu nende elunditele ja kudedele, milles muudes katserühmades esines muutusi.

### 2. ANDMED

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis iga katserühma puhul näitab katseloomade arvu selles katse algul ja igat tüüpi kahjustustega loomade arvu.

Kõiki vaatlustulemusi tuleks hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib kõiki tunnustatud statistilisi meetodeid.

### 3. ARUANDLUS

#### 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

— liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne,

— katsetingimusi:

Katseseadme kirjeldust, sealhulgas selle ehitust, tüüpi, mõõtmeid, õhuallikat, aerosoolide tekitamise seadet, kliima reguleerimise meetodit, väljuva õhu töötlemismeetodit ja katsekambri kasutamisel loomade katsekambris pidamise meetodit. Kirjeldada tuleks temperatuuri, õhuniiskuse ja vajadusel aerosooli kontsentratsiooni ja osakeste suurusjaotuse määramise seadmeid.

Andmed kokkupuute kohta:

Andmed tuleks esitada koondtabelina koos vastavate keskmiste ja hajuvuse näitajatega (nt standardhälve) ning võimalusel peaksid andmed sisaldama järgmist:

- a) õhu voolukiirusi hingamisseadmes;
- b) temperatuuri ja õhuniiskust;
- c) nimikontsentratsioone (hingamisseadmesse viidud testaine summaarne kogus jagatuna õhu ruumalaga);
- d) kandja kasutamisel viimase iseloomu;
- e) tegelikke kontsentratsioone katse hingamistsoonis;
- f) masskeskmist aerodünaamilist diameetrit (MMAD) ja geomeetrilist standardhälvet (GSD):

— mürgistusnähtude andmeid soo ja kontsentratsiooni järgi,

— surmahetke uuringu ajal või seda, kas loomad jäid kuni surmamiseni ellu,

— mürgistus- või muid nähte; toimetat annust,

— iga kõrvalekalde täheldamise aega ja kõrvalekalde hilisemat kulgu,

— sööda ja kehamassi andmeid,

— kasutatud hematoloogilisi analüüse ja nende tulemusi,

— kasutatud kliinilise biokeemia analüüse ja nende tulemusi,

— lahkamistulemusi,

— kõigi histopatoloogiliste leidude üksikasjalikku kirjeldust,

— võimalusel tulemuste statistilist analüüsi,

— tulemuste analüüsi,

— tulemuste tõlgendust.

#### 3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

### 4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.9. KORDUSDOOSI MÜRGISUS (28 PÄEVA, NAHAKAUDNE)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÕISTED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Testainet kantakse 28 päeva jooksul iga päev astmeliste annustena mitme rühma katseloomade nahale nii, et üks rühm saab ühesuguse annuse. Manustamisperioodil jälgitakse loomi iga päev, et kontrollida mürgistusnähtude ilmnemist. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Ettevalmistused**

Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsele vastavatel pidamis- ja söötmingimustel. Noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse katse- ja kontrollrühmadesse. Vahetult enne katset eemaldatakse pügamise teel katselooma keha seljaosalt karvkate. Kasutada võib ka raseerimist, seda tuleks teha 24 tundi enne katset. Korduspügamist või -raseerimist on tavaliselt vaja ligikaudu nädalaste vahedega. Karvkatte pügamisel või raseerimisel tuleb vältida naha marrastamist. Testaine nahale kandmiseks tuleb vabastada vähemalt 10 % kehapiinnast. Vabastatava ala ja katte mõõtmete valikul tuleks arvesse võtta looma massi. Tahkete, vajadusel peenestatud ainete puhul tuleks testainet nahaga hea kokkupuute saavutamiseks niisutada piisava koguse vee või sobiva kandjaga. Vedelaid testaineid kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul. Testainet kantakse nahale kord päevas, 5–7 päeval nädalas.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Katseloomad**

Kasutada võib täiskasvanud rott, küülikut või merisiga. Kasutada võib ka muid liike, kuid seda tuleb põhjendada.

Kasutatavate katseloomade masside erinevus katse alguses ei tohiks ületada  $\pm 20$  % vastavast keskmisest.

#### 1.6.2.2. Katseloomade arv ja sugu

Iga uuritavat annusemäära katsetakse vähemalt 10 terve nahaga loomal (viiel emas- ja viiel isasloomal). Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kui uuringu jooksul plaanitakse loomi surmata, tuleks loomade arvu enne uuringu lõppu surmamisele määratud loomade arvu võrra suurendada. Lisaks võib testaine kõrgeima annusega mõjutada 28 päeva jooksul üht 10 loomaga (viis looma kummastki soost) satelliitrühma ja jälgida sellel 14 päeva jooksul pärast kokkupuudet mürgistusnähtude pöördumist, püsivust või hilist avaldumist. Kasutatakse ka üht 10 kontroll-loomaga (viis looma kummastki soost) satelliitrühma.

#### 1.6.2.3. Annusemäärad

Kasutatakse vähemalt kolme annusemäära ja kontrolli või kandja kasutamisel kandja kontrolli. Kokkupuuteperioodi kestus peaks olema vähemalt kuus tundi päevas. Testainet tuleks peale kanda iga päev sarnastel kellaaegadel ja annuseid järk-järgult (üks või kaks korda nädalas) reguleerida, et annus jääks looma kehmassi suhtes konstantseks. Testainega töötlemine välja arvatud, tuleks kontrollrühma loomi kohelda samamoodi nagu katserühma loomi. Kui annustamise lihtsustamiseks kasutatakse kandjat, tuleks kandja kontrollrühmale manustada kandjat analoogselt katserühmaga ja nad peaksid saama sama koguse kandjat nagu kõrgeima annusemääraga rühm. Kõrgeim annus peaks põhjustama mürgistusnähte, kuid ei tohiks põhjustada suremust või siis peaks suremus olema väike. Väikseima doosi puhul ei tohiks mürgisust ilmned. Kasutuskõlbliku hinnangulise inimkokkupuute annuse olemasolul peaks madalaim annus olema sellest kõrgem. Ideaaljuhul peaks keskmine annusemäär põhjustama minimaalseid täheldatavaid mürgistusnähte. Rõhkem kui ühe vahepealse annuse kasutamisel peaks annusemäärad jaotuma nii, et tekkivad mürgistusnähud jaotuvad astmeliselt. Tulemuste usaldusväärse hindamise võimaldamiseks peaks suremus madala ja vahepealsete annusemääradega ning kontrollrühmades olema madal.

Kui testaine nahale kandmine toob kaasa tugeva nahaärrituse, tuleks kontsentratsioone vähendada; selle tulemuseks võib olla muude mürgistusnähtude vähenemine või puudumine kõrgeima annusemäära kasutamisel. Lisaks võib tõsiste nahakahjustuste ilmnemisel olla vaja uuring lõpetada ja teha madalamatel kontsentratsioonidel uus uuring.

#### 1.6.2.4. Piirsalduskatse

Kui eelkatse annusemääraga 1 000 mg/kg või kõrgema, võimaliku teadaoleva inimkokkupuute kontsentratsiooniga seotud annusemääraga ei kutsu esile mürgistusnähte, võib edasise kontrollimise lugeda tarbetuks.

#### 1.6.2.5. Vaatlusperiood

Kõigil katseloomadel tuleb iga päev jälgida mürgistusnähtude ilmnemist. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise ning surma aeg on väga olulised ning tuleks registreerida.

#### 1.6.3. Katse käik

Loomi tuleks puurides pidada ühekaupa. Testainet kantakse loomade nahale 28 päeva jooksul, ideaaljuhul 7 päeval nädalas. Mis tahes satelliitrühma loomadele, kellega planeeritakse hilisemaid vaatlusi, ei tohiks järgneva 14 päeva jooksul ainet manustada, et kontrollida mürgistusnähtudest paranemist või nende püsivust. Kokkupuute kestus peaks olema vähemalt kuus tundi päevas.

Testaine tuleks kanda ühtlaselt alale, mis moodustab ligikaudu 10 % kogu kehapiinnast. Väga mürgiste ainete puhul võib katta väiksema osa kehapiinnast, kuid võimalikult suur osa pinnast tuleks katta võimalikult õhukese ja ühtlase kihiga.

Testainet tuleks kokkupuuteperioodi jooksul hoida poorse marlisideme ja mitteärritava kleplindi abil naha vastas. Manustamiskoht tuleks veel lisaks sobival moel kinni katta, et hoida marlisidet ja testainet paigal ja vältida testaine allaneelamist katselooma poolt. Et vältida testaine allaneelamist, võib kasutada looma liikuvust piiravaid vahendeid, kuid looma täielikku fikseerimist ei soovitata. Kasutada võib ka kaitsekraed.

Kokkupuuteperioodi lõpus tuleks testaine jääk nahalt võimalusel veega või muu sobiva puhastusmeetodi abil eemaldada.

Kõiki loomi tuleb iga päev jälgida ja registreerida kõik mürgistusnähud ja nende ilmnemise aeg, raskusaste ja kestus. Vaadelda tuleks muutusi nii nahas ja karvkattes, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vereringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Loomi tuleks iga nädal kaaluda. Soovitav on iga iga nädal mõõta ka toidu tarbimist. Loomi tuleb regulaarselt vaadelda, et võimaluse piires vältida loomade kadu põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade kaotamine nende ümberpaigutamisel. Uuringuperioodi lõpus surmatakse ja lahatakse kõik ellujäänud loomad, v.a satelliitrühma loomad. Surevad ja tõsistes kannatustes või valudes loomad tuleks avastamisel kõrvaldada, humaanselt surmata ja lahata.

Kõigile loomadele, sh kontrollrühma loomadele, tehakse katseperioodi lõpus järgmine uuring:

- 1) hematoloogia, sealhulgas vähemalt hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide üld- ja suhtarv ja hüübimisvõime;
- 2) kliiniline verebiokeemia, sh vähemalt üks maksa ja neerude funktsiooni parameeter:alaniini aminotransferaas (varem tuntud glutamaat-püruvaadi transaminaasina), seerumi aspartaadi aminotransferaas (varem tuntud glutamaat-oksaloatsetaadi transaminaasina, kusiainelämmastik, albumiin, kreatiniin, üldbilirubiin ja seerumi üldvalk.

Muud analüüsinäidud, mida võib pädeva toksikoloogilise hinnangu andmiseks vaja minna, on: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, veresuhkur (tühja kõhuga), lipiidianalüüs, hormoonid, happe/aluse tasakaal, methemoglobiin ja koliini esteraasi aktiivsus.

Vajadusel võib vaadeldava toime põhjalikumaks uurimiseks kasutada täiendavaid kliinilisi biokeemilisi näitajaid.

#### 1.6.4. Üldlahang

Kõik katseloomad tuleks üleni lahata. Vähemalt maks, neerud, neerupealised ja munandid tuleks kohe peale lahti lõikamist kuivamise vältimiseks märjalt kaaluda. Elundid ja koed, st normaalne ja töödeldud nahk, maks, neerud, põrn, munandid, neerupealised, süda ja muud sihtelundid (see tähendab makropatoloogiliste kahjustustega või muutunud suurusega elundid) tuleks säilitada sobivas keskkonnas võimaliku hilisema histopatoloogilise uuringu jaoks.

#### 1.6.5. Histopatoloogiline uuring

Kõrgeima annusega rühma ja kontrollrühma loomade säilitatud elundeid ja kudesid tuleks histoloogiliselt uurida. Kõrgeima annusega rühmal testainega seostatavaid kahjustusi sisaldavaid elundeid ja kudesid tuleks kontrollida ka kõigil madalama annusega rühmadel. Võimaliku satelliitrühma loomi tuleks samuti histoloogiliselt uurida, pöörates eriti tähelepanu nendele elunditele ja kudedele, milles muudes katserühmades esines muutusi.

#### 2. ANDMED

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis iga katserühma puhul näitab katseloomade arvu selles katse algul ja igat tüüpi kahjustustega loomade arvu.

Kõiki vaatlustulemusi tuleks hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib kõiki tunnustatud statistilisi meetodeid.

**3. ARUANDLUS****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- katseloomade kohta käivaid andmeid (liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne),
- katsetingimusi (sealhulgas sideme tüüpi: oklusiivside või tavaline side),
- annuseid (kandja kasutamisel koos kandjaga) ja kontsentratsioone,
- võimalusel toimetada annust,
- mürgistusnähtude andmeid soo ja annuse järgi,
- surmahetke katse ajal või seda, kas loomad jäid kuni surmamiseni ellu,
- mürgistus- või muid nähte,
- iga kõrvalekalde täheldamise aega ja kõrvalekalde hilisemat kulgu,
- sööda ja kehakaalu andmeid,
- kasutatud hematoloogilisi analüüse ja nende tulemusi,
- kasutatud kliinilise biokeemia analüüse ja nende tulemusi,
- lahkamistulemusi,
- kõigi histopatoloogiliste leidude üksikasjalikku kirjeldust,
- võimalusel tulemuste statistilist käsitlust,
- tulemuste analüüsi,
- tulemuste tõlgendust.

**3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE**

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

**4. VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.10. MUTAGEENSUS (IN VITRO TSÜTOGENEETILINE KATSE IMETAJATE RAKKUDEGA)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÄÄRATLUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (C).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

See *in vitro* tsütogeneetiline katse on lühiajaline mutageensuse katse struktuuriliste kromosoomaberratsioonide avastamiseks kultiveeritud imetajarakkudes. Kasutada võib nii püsirakuliinide kui ka algrakkude kultuure. Pärast kokkupuudet uuritavate kemikaalidega koos sobiva metaboolse aktivaatoriga või ilma selleta töödeldakse rakukultuure käävi inhibiitoritega, nt kolhitsiiniga, et koguda rakud metafaasilaadsesse mitoosi-faasi (c-metafaasi). Rakud kogutakse sobival ajal ja valmistatakse kromosoomipreparaadid. Preparaadid värvitakse ja uuritakse metafaasis rakkudes kromosoomaberratsioonide esinemist.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Preparaadid****1.6.1.1. Rakud**

Kasutada võib nii püsirakuliine kui ka algrakkude kultuure, nt hiina hamstri rakke ja inimese lümfotsüüte. Uuritavad kemikaalid valmistatakse ette söötmes või lahustatakse enne rakkude töötlemist sobivas kandjas.

**1.6.1.2. Metaboolne aktivaator**

Rakud tuleks uuritava ainega kokkupuutesse viia nii sobiva metaboolse aktivaatori juuresolekul kui ka ilma selleta. Levinuim aktivaator on ensüümiindutseerijatega mõjutatud näriliste maksadest valmistatud, kaasmõjuriga täiendatud postmitokondriaalne fraktsioon.

**1.6.2. Katsetingimused**

*Kultuuride arv:*

Iga katsepunkti kohta kasutatakse vähemalt kahte kultuuri.

*Negatiivse ja positiivse kontrolli kasutamine:*

Negatiivsete kontrollidena kasutatakse lahustit (kui lahusti ei ole sööde või vesi), maksaensüüm-aktivaator-segu, maksaensüüm-aktivaatorsegu koos lahustiga ja töötlemata kontrolle.

Igas katses kasutatakse ka positiivset kontrolli; maksaensüüm-aktivaatorsegu kasutamisel uuritava kemikaali aktiveerimiseks tuleb ka positiivse kontrollina kasutada teadaolevalt metaboolset aktiveerimist vajavat ühendit.

*Annusemäär:*

Kasutatakse vähemalt kolme katseühendi annusemäära vähemalt ühelogaritmiliste vahedega. Kõrgeim annus peaks inhibeerima mitootilist aktiivsust umbes 50 % võrra või kutsuma esile muid tsütotoksilisuse nähte. Kui testaine ei ole mürgine, tuleks seda uurida lahustuvuse piirini või kõrgeima kontsentratsioonini 5 mg/ml.

*Kultiveerimistingimused:*

Kasutatakse sobivat söödet ja inkubeerimistingimusi (nt temperatuuri, kultiveerimisnõusid, CO<sub>2</sub> kontsentratsioone ja niiskust).

1.6.3. **Katse käik**

1.6.3.1. *Kultuuride valmistamine*

Püsirakuliinid: rakud võetakse tüvikultuuridest (nt trüpsiiniga töötlemisel või loksutamisel), külvatakse sobiva tihedusega kultiveerimisnõudesse ja inkubeeritakse 37 °C juures.

Inimese lümfotsüüdid: fütohemaglutiniini, vasika looteserumit ja antibiootikume sisaldavale söötmele lisatakse hepariniseeritud täisveri ja inkubeeritakse 37 °C juures.

1.6.3.2. *Kultuuride töötlemine katseühendiga*

i) Töötlemine ilma maksaensüüm-aktivaatorseguta

Kõik töötlemised peaksid kestma vähemalt ühe täieliku rakutsükli ning fikseerimismeetodid peavad tagama tsükli eri faasides töödeldud rakkude analüüsimise esimeses töötlemisjärgses mitoosis.

Kui töötlemise kestus on lühem kui üks täielik rakutsükkel, valitakse sellised fikseerimisajad, et saadakse töötlemise ajal rakutsükli eri faasides, st G<sub>1</sub>, S ja G<sub>2</sub> olnud rakud.

Uuritav kemikaal lisatakse püsirakuliinide kultuuridele eksponentsiaalses kasvufaasis. Inimese lümfotsüütide kultuure töödeldakse poolsünkroonses olekus.

ii) Töötlemine maksaensüüm-aktivaatorseguga

Kokkupuude katseühendi ja aktivaatoriga peaks kestma võimalikult kaua, avaldamata seejuures rakkudele mürgist mõju. Kui töötlemise kestus on mürgise mõju tõttu lühem kui üks täielik rakutsükkel, valitakse sellised fikseerimisajad, et saadakse töötlemise ajal rakutsükli eri faasides, st G<sub>1</sub>, S ja G<sub>2</sub> olnud rakud.

*Rakkude kogumine:*

Rakukultuure töödeldakse enne rakkude kogumist sobiva aja kestel käävi inhibiitoriga. Iga kultuuri puhul kogutakse ja töödeldakse rakke kromosoomide ettevalmistamiseks eraldi. Rakke tuleb koguda vähemalt kaks korda. Soovitav on, et esimene kord leiab aset ligikaudu ühe rakutsükli järel ja teine hiljem. See peab tagama kõigi rakutsükli faaside haaramise ja arvestama rakutsükli võimaliku aeglustumisega.

1.6.3.3. *Kromosoomipreparaat*

Kromosoomipreparaatide valmistamiseks töödeldakse rakke hüpotoonilise lahusega, fikseeritakse need, viiakse materjal objektiklaasile ja värvitakse.

*Analüüs:*

Igas kultuuris uuritakse kromosoomaberratsioonide esinemist vähemalt 100 hästiprepareeritud metafaasil. Objektiklaasid kodeeritakse enne analüüsi. Inimese lümfotsüütides analüüsitakse ainult 46 tsentromeeriga metafaase.

Püsirakuliinides analüüsitakse ainult normaalvu  $\pm 2$  tsentromeeriga metafaase.

Lisaks tuleks iga annusemäära katsetamisel hinnata mitootilist indeksit või mõnda muud tsütotoksilisuse näitajat.

**2. ANDMED**

Andmed esitatakse tabelina. Kõigi töödeldud ja kontrollkultuuride kohta tuuakse eraldi välja kromatiidsed (tühikud, murrud, vahetused) ja kromosoomsed (nt tühikud, murrud, atsentrilised fragmendid, ringid, ditsentrikud, polütsentrikud) aberratsioonid ja aberrantsete metafaaside arv.

Andmeid hinnatakse asjakohaste statistiliste meetodite abil.

Katse tulemusi tuleb võrrelda paralleelsete negatiivsete kontrollidega.

Tehakse vähemalt kaks sõltumatut katset. Kui see on teaduslikult põhjendatav, võib piisata ka ühest katsest. Teist katset ei ole vaja läbi viia esimesega identsel moel. Vastupidi, kasulikumate andmete saamise huvides võib eelistada mõningate katseparameetrite muutmist.

**3. ARUANDE****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- kasutatud rakke,
- katsetingimusi: söötme koostist, CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni, inkubeerimistemperatuuri, inkubeerimisega, annuseid, töötlemisega, käävi inhibiitoriga töötlemise kestust ja kasutatud kontsentratsiooni, kasutatud maksaensüüm-aktivaatorsegu tüüpi, positiivseid ja negatiivseid kontrolle,
- rakukultuuride arvu,
- analüüsitud metafaaside arvu (eraldi andmetega iga kultuuri kohta),
- mitootilist indeksit või mõnda muud tsütotoksilisuse näitajat,
- aberratsioonide tüüpi ja arvu eraldi kõigi töödeldud ja kontrollkultuuride kohta, kromosoomide normaalvu kasutatud püsirakuliinides,
- statistilist hinnangut,
- tulemuste analüüsi,
- tulemuste tõlgendust.

**3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE**

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

**4. VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.11. MUTAGEENSUS (IN VIVO TSÜTOGENEETILINE KATSE IMETAJATE LUUÜDIGA, KROMOSOOMI-ANALÜÜS)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÄÄRATLUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (C).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

See *in vivo* tsütogeneetiline katse on lühiajaline mutageensuse katse struktuuriliste kromosoomaberratsioonide avastamiseks. Kromosoomaberratsioone hinnatakse tavaliselt esimestes töötlemisjärgsetes mitoosides. Keemiliste mutageenide puhul on enamik tekkivatest aberratsioonidest kromatiidsed.

Käesoleva meetodi kohaselt uuritakse sobival moel katsetatavate kemikaalidega kokkupuutesse viidud ja järjestikuste ajavahemike järel surmatud imetajate luuüdi rakke. Enne surmamist mõjutatakse loomi veel käävi inhibiitoritega, nt kolhitsiiniga, et koguda rakud metafaasilaadsesse mitoosifaasi (c-metafaasi). Rakkudest valmistatakse õhu käes kuivatatud kromosoomipreparaadid, need värvitakse ja neis uuritakse mikroskoopiliselt kromosoomaberratsioonide esinemist.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Preparaadid**

Uuritavad kemikaalid lahustatakse füsioloogilises soolalahuses. Kui need selles ei lahustu, lahustatakse või suspendeeritakse need sobivas kandjas.

Kasutatakse katseühendi värskeid lahuseid. Kui annustamise lihtsustamiseks kasutatakse kandjat, ei tohi see avaldada segavat ega mürgist mõju.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Katseloomad**

Kasutatakse närilisi, nagu rotte, hiiri või hiina hamstreid. Täiskasvanud noored terved katseloomad randomiseeritakse ja jagatakse katse- ja kontrollrühmadesse.

**1.6.2.2. Katseloomade arv ja sugu**

Katse- ja kontrollrühmas kasutatakse vähemalt viit emas- ja viit isaslooma. Seega kui katseplaan näeb ette mitut mõjutamisjärgset analüüsi, surmatakse iga kord igas rühmas 10 looma.

Positiivse kontrollrühma puhul piisab ühest proovivõtust.

1.6.2.3. *Manustamistee*

Katseühendeid tuleks üldjuhul manustada ainult ühel korral. Toksikoloogiliste andmete põhjal võib otsustada ka korduvmanustamise kasuks. Korduvmanustamist tuleks siiski kasutada ainult juhul, kui katseühend ei avalda luuüdile tsütotoksilist mõju. Tavalisteks manustamisteedeks on suukaudne manustamine ja kõhukelmesisene injektsioon. Kohased võivad olla ka muud manustamisteed.

1.6.2.4. *Negatiivse ja positiivse kontrolli kasutamine*

Positiivse kontrollina kasutatakse teadaolevat *in vivo* kromosoomaberratsioone põhjustavat ühendit; kõik katsed näevad ette ka negatiivse (lahusti) kontrollrühma.

1.6.2.5. *Annusemäär*

Baastestis kasutatakse ühte katseühendi annust – kõrgeimat talutavat annust või annust, mille puhul ilmnevad mõningased tsütotoksilisuse märgid (nt mitoosi osaline inhibeerumine).

“Mittemürgiste” ühendite puhul uuritakse ühe manustamiskorra järel kõrgeimat (piir-)annust 2 000 mg/kg.

Korduva annustamisega skeemi puhul on piirannuseks 1 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas.

Teaduslikel kaalutlustel võib kasutada veel täiendavaid annusemäärasid.

Kui katset kasutatakse kontrollmeetodina, tuleb kasutada veel vähemalt kahte annusemäära.

1.6.3. **Katse käik**

Katse võib teha kahel viisil:

- i) loomi mõjutatakse ühel korral katseühendi kõrgeima talutava annusega. Esimesel korral võetakse proovid 24 tundi peale mõjutamist. Kui selles etapis on tulemused selgelt positiivsed, võivad edasised proovid olla tarbetud. Kui tulemused on aga negatiivsed või ebaselged, kuna uuritav kemikaal võib mõjutada rakutsükli kineetikat, tuleb kasutada üht varasemat ja üht hilisemat proovivõtmist, asjakohase vahel 6–48 tundi.

Täiendavate annusemäärade kasutamisel võetakse proovid eriti tundlikel ajahetkedel või kui need ei ole teada, siis 24 tundi peale mõjutamist;

- ii) kui farmakokineetiliste ja metabolismi andmete põhjal on näidustatud korduva annustamisega skeem, võib kasutada korduvaid annuseid, proovid tuleks võtta 6 ja 24 tundi peale viimast annust.

*Luuüdi preparaadi:*

Enne surmamist süstitakse loomadele kõhukelmesiseselt sobiv annus käävi inhibiitorit, et saada küllaldane arv c-metafaasis rakke. Luuüdi saadakse äsja surmatud loomade rieluudest isotoonilise lahusega pesemisel. Pärast asjakohast hüpotoonilist töötlust rakud fikseeritakse ja materjal kantakse objektiklaasidele. Pärast õhu käes kuivatamist preparaadiid värvitakse.

*Analüüs:*

Objektiklaasid kodeeritakse enne mikroskoopilist analüüsi. Iga looma kohta uuritakse struktuuriliste kromosoomaberratsioonide esinemist vähemalt 50 hästiprepareeritud metafaasil täisarvu tsentromeeridega. Lisaks võib iga looma kohta määrata mitootilised indeksid.

2. **ANDMED**

Andmed esitatakse tabelina. Kõigi mõjutatud ja kontroll-loomade puhul loetletakse eraldi kromatiidsed ja isokromatiidsed aberratsioonid (tühikud, murrud, vahetused) ja mitootilised indeksid, kui neid määrati. Kõigi mõjutatud ja kontroll-loomade puhul loetletakse eraldi ka keskmised väärtused ja standardhälbed. Andmeid hinnatakse asjakohaste statistiliste meetodite abil.

3. **ARUANDLUS**

3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- kasutatud katseloomade liiki, liini ja vanust,
- kummastki soost loomade arvu katse- ja kontrollrühmades,
- katsetingimusi: annustamis- ja proovivõtuskeemi üksikasjalikku kirjeldust, annuseid, töötlemisaega, käävi inhibiitoriga töötlemise kestust ja kasutatud kontsentratsiooni,
- analüüsitud metafaaside arvu looma kohta,
- mitootilisi indeksid, kui neid määrati,
- aberratsioonide iseloomu ja arvu iga mõjutatud ja kontroll-loomade puhul eraldi,
- uuringu ajal ilmnenu mürgistusnähte,
- statistilist hinnangut,
- tulemuste analüüsi,
- tulemuste tõlgendust.

3.2. **HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE**

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

4. **VIIDE**

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.12. MUTAGEENSUS (MIKROTUUMA KATSE)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÄÄRATLUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (C).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Mikrotuumade katse on lühikese kestusega *in vivo* katse kemikaalidest tingitud struktuuriliste kromosoomikahjustuste või mitootilise mehhanismi kahjustuste avastamiseks imetajatel. Meetodi aluseks on mikrotuumade arvu kasv mõjutatud katseloomade polükromaatsetes erütrotsüütides võrreldes kontrollloomadega.

Mikrotuumad tekivad kromosoomifragmentidest või tervetest kromosoomidest, mis on mitoosis maha jäänud. Kui erütroblastid arenevad erütrotsüütideks, heidetakse põhituum välja, kuid mikrotuum võib jääda tsütoplasmasse. Katses kasutatakse sobival teel testainega kokku puutunud labori-imetajate luuüdist saadud noori polükromaatseid erütrotsüüte. Luuüdi ekstraheeritakse, valmistatakse äigepreparaadid ja värvitakse need. Mikroskoobi all loetakse mikrotuumad polükromaatsetes erütrotsüütides ja määratakse polükromaatsete/normokromaatsete erütrotsüütide suhe.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Preparaadid**

Uuritavad kemikaalid lahustatakse isotoonilises lahuses. Kui need selles ei lahustu, lahustatakse või suspendeeritakse need sobivas kandjas. Kandja kasutamisel ei tohi see avaldada katseühendile segavat ega mürgist mõju. Üldjuhul kasutatakse katseühendi värskeid lahuseid.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Katseloomad**

Soovitav on kasutada hiiri, kuid kasutada võib ka muid imetajaid. Täiskasvanud noored terved katseloomad randomiseeritakse ja jagatakse katse- ja kontrollrühmadesse.

**1.6.2.2. Katseloomade arv ja sugu**

Katse- ja kontrollrühmas kasutatakse vähemalt viit emas- ja viit isaslooma. Seega kui katseplaan näeb ette mitut mõjutamisjärgset analüüsi, surmatakse iga kord igas rühmas 10 looma. Positiivse kontrollrühma puhul piisab ühest proovivõtust.

1.6.2.3. *Manustamistee*

Katseühendeid tuleks üldjuhul manustada ainult ühel korral. Toksikoloogiliste andmete põhjal võib otsustada ka korduvmanustamise kasuks. Korduvmanustamist tuleks siiski kasutada ainult juhul, kui katseühend ei avalda luuüdile tsütotoksilist mõju. Tavalisteks manustamisteedeks on suukaudne manustamine ja kõhukelmesisene injektsioon. Kohased võivad olla ka muud manustamisteed.

1.6.2.4. *Negatiivse ja positiivse kontrolli kasutamine*

Igas katses kasutatakse nii positiivset kui ka negatiivset (lahusti) kontrolli.

1.6.2.5. *Annusemäär*

Baastestis kasutatakse ühte katseühendi annust – kõrgeimat talutavat annust või annust, mille puhul ilmnevad mõningased tsütotoksilisuse märgid, nt muutus polükromaatsete/normokromaatsete erütrotsüütide suhtes.

“Mittemürgiste” ühendite puhul uuritakse ühe manustamiskorra järel kõrgeimat (piir-) annust 2 000 mg/kg.

Korduva annustamisega skeemi puhul on piirannuseks 1 000 mg/kg kehamassi kohta päevas.

Teaduslikel kaalutlustel võib kasutada veel täiendavaid annusemäärasid.

Kui katset kasutatakse kontrollmeetodina, tuleb kasutada veel vähemalt kahte annusemäära.

1.6.3. **Katse käik**

Katse võib teha kahel viisil:

- (i) loomi mõjutatakse katseühendiga ühel korral. Proovide võtmise aeg peaks kokku langema maksimaalse reaktsiooniga katses, mis võib aga katseühendist olenevalt olla erinev. Seetõttu võetakse luuüdi proove vähemalt kahel korral, esimene kord kõige varem 12 tundi pärast kokkupuudet ja viimane kord hiljemalt 48 tundi pärast kokkupuudet.

Täiendavate annusemäärade kasutamisel võetakse proovid kõrgeima tundlikkusega ajal või kui see ei ole teada, 24 tundi pärast mõjutamist;

- (ii) kui farmakokineetiliste ja metabolismi andmete põhjal on näidustatud korduva annustamisega skeem, võib kasutada korduvaid annuseid, proove tuleks võtta ühel korral, kõige varem 12 tundi pärast viimast annust.

*Luuüdi preparaadid*

Luuüdi saadakse äsja surmatud loomade reieluudest vasika looteserumiga pesemisel. Rakud sadestatakse tsentrifuugimisel ja supernatant kõrvaldatakse. Homogeense rakususpensiooni tilgad kantakse objektiklaasidele ja määratakse laiali. Pärast õhu käes kuivatamist preparaadid värvitakse.

*Analüüs:*

Objektiklaasid kodeeritakse enne mikroskoopilist analüüsi. Mikrotuumade esinemist uuritakse vähemalt 1 000 polükromaatsetes erütrotsüütides looma kohta.

Iga looma puhul määratakse normokromaatsete/polükromaatsete erütrotsüütide suhe, loendades kokku 1000 erütrotsüüti.

**2. ANDMED**

Andmed esitatakse tabelina. Iga katse- ja kontroll-looma puhul esitatakse eraldi polükromaatsete erütrotsüütide arv, mikrotuumadega polükromaatsete erütrotsüütide arv ja mikrotuumadega rakkude protsentuaalne osakaal, samuti polükromaatsete/normokromaatsete erütrotsüütide suhe. Kõigi mõjutatud ja kontrollloomade puhul tuuakse eraldi välja ka keskmised väärtused ja standardhälbed. Toodud andmeid hinnatakse asjakohaste statistiliste meetodite abil.

**3. ARUANDE****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- kasutatud katseloomade liiki, liini ja vanust,
- kummaski soost loomade arvu katse- ja kontrollrühmades,
- katsetingimusi: annustamis- ja proovivõtuskeemi täpset kirjeldust, annuseid, mürgisusandmeid ning negatiivseid ja positiivseid kontrole,
- mikrotuumade loendamiskriteeriume,
- võimalusel annuse/toime sõltuvust,
- katsete ajal ilmnenud mürgistusnähte,
- statistilist hinnangut,
- tulemuste analüüsi,
- tulemuste tõlgendust.

**3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE**

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

**4. VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.13. MUTAGEENSUS (ESCHERICHIA COLI – PÕÖRDMUTATSIOONIKATSE)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÄÄRATLUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (C).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

*Escherichia coli* trüptofaani (trp) operoni revertatsioonikatse on mikroobne katse, kus mõõdetakse  $\text{trp}^- \rightarrow \text{trp}^+$  reverteerumist organismi genoomis punktmutatsioone esile kutsuvate kemikaalide mõjul.

Bakterid viiakse uuritavate kemikaalidega kokkupuutesse nii koos sobiva metaboolse aktivaatoriga kui ka ilma selleta. Pärast kohase kestusega inkubatsiooni minimaalsöötmel spontaanselt reverteerunud kolooniad loendatakse ja tulemust võrreldakse nende arvuga töötlemata ja/või lahusti kontrollkultuuris.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS**

Katse läbiviimisel võib kasutada kaht meetodit: 1) eelinkubeerimismeetodit ja 2) vahetu kokkusegamise meetodit, kus bakterid ja uuritav aine segatakse külviagaris ja valatakse selektiivsele agariplaadile.

**1.6.1. Ettevalmistused****1.6.1.1. Bakterid**

Baktereid kasvatatakse 37 °C juures hilise eksponentsiaalse või varase statsionaarse kasvu faasini. Ligikaudne rakutihedus peaks olema  $10^8$ – $10^9$  rakku milliliitris.

**1.6.1.2. Metaboolne aktiveerimine**

Bakterid tuleks uuritava ainega kokkupuutesse viia nii sobiva metaboolse aktivaatori juuresolekul kui ka ilma selleta. Levinuim aktivaator on ensüümiindutseerijatega mõjutatud näriliste maksadest valmistatud, kaasmõjuriga täiendatud postmitokondriaalne fraktsioon.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Kasutatavad tüved**

Kasutada tuleks kolme tüve, WP2, WP2 uvr A ja WP2 uvr A pKM 101. Kasutada tuleb tuntud tüvikultuuri valmistamise ja säilitamise meetodeid. Kontrollida tuleb tüvede nõudeid kasvukeskkonnale ja geneetilisi tunnusandmeid, nende tundlikkust UV-kiirguse ja mitomütsiin C suhtes ning tüve WP2 uvr A pKM 101 vastupidavust ampitsilliini suhtes. Samuti peaks spontaansete revertatsioonide esinemine tüvedel jääma ootuspärasesse vahemikku.

**1.6.2.2. Sööde**

Kasutatakse mutantide ekspressiooniks ja seleksiooniks kohast söödet sobiva külviagariga.

**1.6.2.3. Negatiivse ja positiivse kontrolli kasutamine**

Nõutavad on paralleelsed töötlemata ja lahusega kontrollkatsed. Vajalikud on ka positiivsed kontrollkatsed, seda kahel eesmärgil:

i) bakteritüvede tundlikkuse kontrollimiseks.

Katsetes ilma metaboolse aktivatsioonita võib positiivsete kontrollidena kasutada metüülmetaansulfonaati, 4-nitrokinoliinoksiidi või etüülnitrosouuread;

ii) vastava metaboliseerija aktiivsuse tagamiseks.

Kõigil tüvedel kasutatava metaboliseerija aktiivsuse kontrollimisel kasutatakse positiivse kontrollainena 2-aminoantratseni. Võimalusel tuleks positiivse kontrollainena kasutada uuritava kemikaaliga samast ühendiklassist ainet.

**1.6.2.4. Testaine kogus plaadil**

Kontrollitakse vähemalt viit uuritava kemikaali kogust, poolelogaritmiliste vahedega plaatide vahel. Aineid kontrollitakse lahustuvuse või mürgisuse piirini. Mürgisuse indikaatoriks on spontaansete revertatsioonide arvu vähenemine, lauskultuuri kadumine või töödeldud kultuuride elumuse aste. Mittemürgiseid kemikaale tuleks enne aine negatiivseks lugemist kontrollida koguseni 5 mg plaadi kohta.

**1.6.2.5. Inkubeerimistingimused**

Plaatide inkubeeritakse 37 °C juures 48–72 tundi.

**1.6.3. Katse käik**

Ensüümaktivatsioonita vahetu kokkusegamise meetodi puhul lisatakse 2 ml külviagarile uuritav kemikaal ja 0,1 ml värsket bakterikultuuri. Metaboolse aktivatsiooniga katsetes lisatakse külviagarile pärast uuritava kemikaali ja bakterite lisamist 0,5 ml maksaensüüm-aktivaatorsegu, mis sisaldab küllaldast kogust postmitokondriaalset fraktsiooni. Mõlema katsuti sisu segatakse ja valatakse selektiivsele agariplaadile. Vedelal agaril lastakse tahkestuda ja inkubeeritakse plaate 37 °C juures 48–72 tundi. Inkubatsiooniperioodi lõpus loendatakse igal plaadil reverteerunud kolooniad.

Eelinkubatsiooniga meetodi kohaselt inkubeeritakse uuritavat kemikaalisegu enne 2 ml külviagari lisamist 0,1 ml värske bakterikultuuri ja sobiva koguse maksaensüüm-aktivaatorseguga või samasuguse koguse puhvriga. Ülejäänud katseprotseduur on analoogne otse söötmele kandmise meetodiga.

Kõik külvid tehakse mõlema meetodi kohaselt kolme paralleelina.

**2. ANDMED**

Nii kontroll- kui ka töödeldud seeria kohta esitatakse reverteerunud kolooniate arv plaadi kohta. Nii uuritava kemikaali kui ka kontrollainete kohta tuleks esitada üksikute plaatide tulemused, keskmine reverteerunud kolooniate arv plaadi kohta ja vastav standardhälve.

Toodud andmeid tuleks hinnata asjakohaste statistiliste meetodite abil.

Tehakse vähemalt kaks sõltumatut katset. Teist katset ei ole vaja läbi viia esimesega identselt. Vastupidi, kasulikumate andmete saamiseks võib mõningaid katseparameetreid muuta.

**3. ARUANDLUS****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- kasutatud bakterit ja tüve,
- katsetingimusi: annuseid, mürgisust, söötme koostist, töötlemisprotseduure (eelinkubatsioon, inkubatsioon), metaboolset aktivaatorit, võrdlusaineid, negatiivseid kontrolle,
- üksikute plaatide tulemusi, keskmist reverteerunud kolooniate arvu plaadi kohta ja vastavat standardhälvet, võimalusel annuse/toime sõltuvust,
- tulemuste analüüsi,
- tulemuste tõlgendust.

**3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE**

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

**4. VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**B.14. MUTAGEENSUS (SALMONELLA TYPHIMURIUM – PÖÖRDMUTATSIOONIKATSE)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÄÄRATLUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (C).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

*Salmonella typhimurium*'i histidiini (his) operoni revertatsioonikatse on mikroobne katse, kus mõõdetakse his<sup>+</sup> → his<sup>-</sup> reverteerumist organismi genoomis aluseasendus- või raaminihkemutatsioonide esile kutsuvate kemikaalide mõjul.

Bakterid viiakse uuritavate kemikaalidega kokkupuutesse nii koos sobiva metaboolse aktivaatoriga kui ka ilma selleta ja külvatakse minimaalsöötmel. Pärast kohase kestusega inkubatsiooni spontaanselt reverteerunud kolooniad loendatakse ja tulemust võrreldakse nende arvuga töötlemata ja/või lahusti kontrollkultuuris.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Preparaadid****1.6.1.1. Bakterid**

Värskeid bakterikultuure kasvatatakse 37 °C juures hilise eksponentsiaalse või varase statsionaarse kasvu faasi. Ligikaudne rakutihedus peaks olema 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> rakku milliliitris.

**1.6.1.2. Metaboolne aktiveerimine**

Bakterid tuleks uuritava ainega kokkupuutesse viia nii sobiva metaboolse aktivaatori juuresolekul kui ka ilma selleta. Levinuim aktivaator on ensüümiindutseerijatega mõjutatud näriliste maksadest valmistatud, kaasmõjuriga täiendatud postmitokondriaalne fraktsioon.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Kasutatavad tüved**

Kasutatakse vähemalt nelja tüve TA 1535, TA 1537 või TA 97, TA 98 ja TA 100; lisaks võib kasutada muid tüvesid, nagu TA 1538 ja TA 102. Kasutada tuleb tuntud tüvikultuuri valmistamise ja säilitamise meetodeid. Kontrollida tuleb tüvede nõudeid kasvukeskkonnale ja geneetilisi tunnusandmeid, nende tundlikkust UV-kiirguse ja heksametüülpararosaniliini suhtes ning vastupidavust ampitsilliini suhtes. Samuti peaks spontaansete revertatsioonide esinemine tüvedel jääma ootuspärasesse vahemikku.

## 1.6.2.2. Sööde

Kasutatakse sobivat selektiivset söödet sobiva külviagariga.

## 1.6.2.3. Negatiivse ja positiivse kontrolli kasutamine

Nõutavad on paralleelsed töötlemiseta ja lahusega kontrollkatsed. Vajalikud on ka positiivsed kontrollkatsed, seda kahel eesmärgil:

i) bakteritüvede tundlikkuse kontrollimiseks.

Katsetes ilma metaboolse aktivaatorita võib kasutada järgmisi ühendeid.

| Tüvi                  | Reverteeriv ühend      |
|-----------------------|------------------------|
| TA 1535, TA 100       | Naatriumasiid          |
| TA 1538, TA 98, TA 97 | 2-nitrofluoreen        |
| TA 1537               | 9-aminoakridiin        |
| TA 102                | kumeenvesinikperoksiid |

ii) vastava metaboliseerija aktiivsuse kontrollimiseks.

Kõigil tüvedel kasutatava metaboliseerija aktiivsuse kontrollimisel kasutatakse positiivse kontrollainena 2-aminoantratseni. Võimalusel tuleks positiivse kontrollainena kasutada uuritava kemikaaliga samast ühendiklassist ainet.

## 1.6.2.4. Testaine kogus plaadil

Kontrollitakse vähemalt viit uuritava kemikaali kogust, poolelogaritmiliste vahedega plaatide vahel. Aineid kontrollitakse lahustuvuse või mürgisuse piirini. Mürgisuse indkaatoriks on spontaansete revertatsioonide arvu vähenemine, bakterikihi kadumine või töödeldud kultuuride elumuse aste. Mittemürgiseid kemikaale tuleks enne aine negatiivseks lugemist kontrollida koguseni 5 mg plaadi kohta.

## 1.6.2.5. Inkubeerimistingimused

Plaatide inkubeeritakse 37 °C juures 48–72 tundi.

## 1.6.3. Katse käik

Ensüümaktivatsioonita vahetu kokkusegamise meetodi puhul lisatakse 2 ml külviagarile uuritav kemikaal ja 0,1 ml värsket bakterikultuuri. Metaboolse aktivatsiooniga katsetes lisatakse külviagarile pärast uuritava kemikaali ja bakterite lisamist 0,5 ml maksaensüüm-aktivaatorsegu, mis sisaldab küllaldast kogust postmitokondriaalset fraktsiooni. Mõlema katsuti sisu segatakse ja valatakse selektiivsele agariplaadile. Vedelal agaril lastakse tahkestuda ja inkubeeritakse plaate 37 °C juures 48–72 tundi. Inkubatsiooniperioodi lõpus loendatakse igal plaadil reverteerunud kolooniad. Eelinkubatsiooniga meetodi kohaselt inkubeeritakse uuritavat kemikaalisegu enne 2 ml külviagari lisamist 0,1 ml värsket bakterikultuuri ja sobiva koguse maksaensüüm-aktivaatorseguga või samasuguse koguse puhvriga. Ülejäänud katseprotseduur on analoogne vahetu kokkusegamise meetodiga.

Kõik külvid tehakse mõlema meetodi kohaselt kolme paralleelina.

## 2. ANDMED

Nii kontroll- kui ka töödeldud seeria kohta esitatakse reverteerunud kolooniate arv plaadi kohta.

Nii uuritava kemikaali kui ka kontrollainete kohta tuleks esitada üksikute plaatide tulemused, keskmine reverteerunud kolooniate arv plaadi kohta ja vastav standardhälve.

Toodud andmeid tuleks hinnata asjakohaste statistiliste meetodite abil.

Tehakse vähemalt kaks sõltumatut katset. Teist katset ei ole vaja läbi viia esimesega identselt. Vastupidi, kasulikumate andmete saamise huvides võib eelistada mõningate katseparameetrite muutmist.

3. **ARUANDLUS**

3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- kasutatud bakterit ja tüve,
- katsetingimusi: annuseid, mürgisust, söötme koostist, töötlemisprotseduure (eelinkubatsioon, inkubatsioon), metaboolset aktivaatorit, võrdlusaineid, negatiivseid kontrolle,
- üksikute plaatide tulemusi, keskmist reverteerunud kolooniate arvu plaadi kohta ja vastavat standardhälvet, võimalusel annuse/toime sõltuvust,
- tulemuste analüüsi,
- tulemuste tõlgendust.

3.2. **HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE**

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

4. **VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

**C OSA: KESKKONNAMÜRGISUSE MÄÄRAMISE MEETOD****C.1. ÄGE MÜRGISUS KALADELE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katses määratakse aine äge surmav mürgisus mageveekaladele. Katse kestel testaine piisavalt püsiva kontsentratsiooni tagamiseks parima katsemeetodi (seisva, poolseisva veega või läbivooluga katsesüsteem) valimisel on kasulik teada võimalusel aine lahustuvust vees, aururõhku, keemilist stabiilsust, dissotsiatsioonikonstante ja biolagunduvust.

Katse kavandamisel ja tulemuste tõlgendamisel tuleks arvestada ka muid andmeid (näiteks struktuurivalemit, puhtusastet, peamiste lisandite iseloomu ja protsentuaalset sisaldust, lisainete olemasolu ja koguseid ning oktaanool/vesi jaotustegurit).

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Äge mürgisus on märgatav kahjulik mõju, mis avaldub organismis lühikese aja (päevade) jooksul pärast ainega kokkupuudet. Käesolevas katses väljendatakse ägedat mürgisust keskmise surmava kontsentratsioonina ( $LC_{50}$ ), see tähendab kontsentratsioonina vees, mis surmab kindla katkematu kokkupuuteaja (mis peab olema märgitud) jooksul 50 % katses kasutatud kaladest.

Kõiki testaine kontsentratsioone väljendatakse massiühikutes mahuühiku kohta (milligrammides liitri kohta). Neid võib väljendada ka massiühikutes massiühiku kohta ( $mg/kg^{-1}$ ).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Katses võib kasutada võrdlusainet näitamaks, et katseliigi reaktsioon ei ole laboratoorsetes katsetingimustes oluliselt muutunud.

Käesoleva katse jaoks ei ole võrdlusaineid nimetatud.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Kontsentratsioonil 100 mg/l võib teha piirisalduskatse näitamaks, et  $LC_{50}$  on sellest kontsentratsioonist kõrgem.

Kalad viiakse 96 tunniks kokkupuutesse veele kindlaksmääratud kontsentratsioonides lisatud testainega. Suremus registreeritakse vähemalt iga 24 tunni tagant ja igas vaatluspunktis arvutatakse võimalusel kontsentratsioon, mis surmab 50 % kaladest ( $LC_{50}$ ).

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Kvaliteedinõuded kehtivad nii piirisalduskatse kui ka täiskatseprogrammi suhtes.

Kontrollkatsete suremus ei tohi katse lõpuks ületada 10 % (alla kümne kala kasutamisel võib surra vaid üks kala).

Lahustunud hapniku kontsentratsioon peab kogu katse kestel olema kõrgem kui 60 % küllastusväärtusest.

Testaine kontsentratsioon peab kogu katse kestel olema vähemalt 80 % algkontsentratsioonist.

Katsekeskkonnas hästi lahustuvaid ja püsivaid lahuseid, st arvestataval määral mitte lenduvaid, lagunevaid, hüdroliüüsuvaid ega adsorbeeruvaid lahuseid andvate ainete puhul võib algkontsentratsiooni lugeda võrdseks nimikontsentratsiooniga. Kontsentratsiooni püsimist kogu katse kestel ja kvaliteedinõuete täitmist tuleb tõendada.

Ainete puhul, mis:

- i) on katsekeskkonnas vähelahustuvad või
- ii) moodustavad stabiilseid emulsioone või dispersioone või
- iii) ei ole vesilahuses stabiilsed,

loetakse algkontsentratsiooniks lahuses mõõdetud kontsentratsioon (või veesambas mõõdetud kontsentratsioon, kui lahuses mõõtmine ei ole tehniliselt võimalik). Kontsentratsioon mõõdetakse peale mõningast tasakaalustumist, kuid enne kalade lahusesse viimist.

Kõigil neil juhtudel tuleb katse kestel teha täiendavaid mõõtmisi, mis kinnitaksid tegelikku kokkupuutekontsentratsiooni ja kvaliteedinõuete täitmist.

pH ei tohiks kõikuda rohkem kui ühe ühiku võrra.

#### 1.6. MEETODI KIRJELDUS

Kasutada võib kolme tüüpi katseskeemi:

*Seisva veega katsesüsteem:*

mürgisuse katse ilma katselahuse läbivooluta. (Lahus ei vahetu katse kestel).

*Poolseisva veega katse:*

katse ilma katselahuse läbivooluta, kuid regulaarse katselahuse osakaupa vahetamisega pikemate perioodide (nt 24 tunni) järel.

*Läbivooluga katse:*

mürgisuse katse, mille puhul vesi katsekambrites pidevalt vahetub, kusjuures koos vahetusveega viiakse katsekambritesse ka uuritav kemikaal.

##### 1.6.1. Reaktiivid

###### 1.6.1.1. Testainete lahused

Vajaliku kontsentratsiooniga põhilahused valmistatakse aine lahustamisel deioniseeritud vees või punktile 1.6.1.2 vastavas vees.

Vajaliku kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamisel. Kõrgete kontsentratsioonide uurimisel võib aine lahustada otse lahendusvees.

Aineid kontrollitakse üldjuhul lahustuvuse piirini. Mõnede ainete puhul (nt vees vähelahustuvate, kõrge  $P_{ow}$ -ga või vees pigem stabiilse dispersiooni kui tõelise lahuse moodustavate ainete puhul) võib katse läbi viia aine lahustuvuspiirist kõrgemal kontsentratsioonil, et tagada kõrgeima lahustuva/stabiilse kontsentratsiooni saavutamine. Samas on oluline, et see kontsentratsioon ei häiriks katsesüsteemi muul moel (nt nii, et aine kile vee pinnal takistab hapniku lahustumist vees jne).

Vees vähelahustuvate ainete põhilahuste valmistamisel või nende dispergeerimisel katsekeskkonnas võib abivahendina kasutada ultraheli-dispergeerimist, orgaanilisi lahuseid, emulgaatoreid või dispergaatoreid. Selliste abiainet kasutamisel peavad kõik katsekontsentratsioonid sisaldama sama koguse abiainet ja täiendavad kontrollkalad tuleks viia kokkupuutesse katseseeriaga võrdväärse abiaine kontsentratsiooniga. Seesuguste abiainet kontsentratsioon katsekeskkonnas peaks olema minimaalne ega tohiks mingil juhul ületada 100 mg/l.

Katse tuleks läbi viia ilma pH-d reguleerimata. Märgatavate pH muutuste ilmnemisel on soovitatav katset reguleeritava pH-ga korrata ja esitada korduskatse tulemused. Eriliste vastunäidustuste puudumisel tuleks sellisel juhul põhilahuse pH reguleerida võrdseks lahjendusvee omaga. Eelistatav on selleks kasutada HCl-i ja NaOH-d. pH-d tuleb reguleerida nii, et testaine kontsentratsioon põhilahuses märgatavalt ei muutu. Ära tuleks märkida pH reguleerimisest tingitud võimalikud keemilised reaktsioonid või sademe teke.

1.6.1.2. *Pidamis- ja lahjendusvesi*

Kasutada võib kraanivett (milles ei leidu ohtlikus kontsentratsioonis kloori, raskmetalle ega muid aineid), kvaliteetset looduslikku vett või taastatud vett. Eelistada tuleks vett üldkaredusega 10–250 mg/l (arvestatud  $\text{CaCO}_3$ -na) ja pH-ga 6,0–8,5.

1.6.2. **Seade**

Kõik seadme osad peavad olema valmistatud keemiliselt inertsest materjalist:

- automaatne lahjendussüsteem (läbivooluga katses),
- hapnikumõõtur,
- vee kareduse määramise seade,
- asjakohane termoregulaator,
- pH-meeter.

1.6.3. **Katses kasutatavad kalad**

Kalad peaksid olema terved ja nähtavate väärarenguteta.

Kasutatav liik tuleks valida praktiliste kaalutluste põhjal, näiteks aastaringse kättesaadavuse, vähese hooldusvajaduse ja hõlpsa katses kasutatavuse põhjal, tundlikkuse põhjal kemikaalide suhtes ja mis tahes asjaomaste majanduslike, bioloogiliste või ökoloogiliste tegurite põhjal. Kalaliigi valikul tuleks silmas pidada andmete võrreldavust ja olemasolevaid rahvusvahelisi kooskõlastusi (viide (1)).

Soovitatavate katses kasutatavate liikide nimekiri on esitatud 2. liites; eelistatavad liigid on sebrakala ja vikerforell.

1.6.3.1. *Pidamine*

Katses kasutatavad kalad peaksid olema pärit ühest allikast ja olema sarnase pikkuse ja vanusega. Kalu tuleb vähemalt 12 päeva pidada järgmistel tingimustel:

*katseaine sisaldus:*

vastavalt süsteemile (tsirkulatsiooni või läbivooluga) ja kalaliigile,

*vesi:*

vt 1.6.1.2,

*valgus:*

12–16 tundi päevas,

*lahustunud hapniku kontsentratsioon:*

vähemalt 80 % küllastusväärtusest,

*söötmine:*

kolm korda nädalas või iga päev, söötmine lõpetatakse 24 tundi enne katset.

#### 1.6.3.2. Suremus

Peale 48-tunnist stabiliseerumisperioodi registreeritakse suremus ja rakendatakse järgmiseid kriteeriume:

— üle 10 % populatsioonist seitsme päeva jooksul:

kalad loetakse sobimatuks,

— 5–10 % populatsioonist:

kalu jälgitakse veel seitse päeva. Kui suremust rohkem ei esine, on kalad sobivad, vastasel juhul loetakse need sobimatuks,

— alla 5 % populatsioonist:

kalad loetakse sobivaks.

#### 1.6.4. Kohandumisperiood

Kõiki kalu tuleb enne katset pidada vähemalt seitse päeva katsetingimustele vastavas vees katsetingimustele vastaval temperatuuril.

#### 1.6.5. Katse käik

Lõplikule katsele võib eelneda annusevahemiku leidmise katse, kus kogutakse andmeid katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku kohta.

Lisaks katseseeriale tehakse üks kontrollkatse ilma testaineta ja vajadusel ka üks kontrollkatse abiainet sisaldava lahusega.

Vastavalt katseühendi füüsikalis-keemilistele omadustele valitakse kvaliteedinõuete täitmiseks seisva veega, poolseisva veega või läbivooluga katsesüsteem.

Kalad viiakse testainega kokkupuutesse allpool kirjeldatud moel:

— kestus: 96 tundi,

— isendite arv: iga kontsentratsiooni kohta vähemalt 7,

— mahutid: küllaldase mahuga soovitatava koguse jaoks,

— katseaine sisaldus: seisva veega ja poolseisva veega katsesüsteemis on kõrgeim soovitatav sisaldus 1 g/l, läbivooluga süsteemides võib see olla kõrgem,

— katsekonsentratsioon: kasutatakse vähemalt viit kontsentratsiooni, mis erinevad üksteisest konstantse teguri (kuni 2,2) võrra ja mis võimalusel hõlmavad kogu suremusvahemikku 0–100 %,

— vesi: vt 1.6.1.2,

— valgus: 12–16 tundi päevas,

— temperatuur: vastavalt liigile (2. liide), kuid ei tohi ühegi katse kestel kõikuda rohkem kui  $\pm 1$  °C,

— lahustunud hapniku kontsentratsioon: vähemalt 60 % küllastusväärtusest antud temperatuuril,

— söötmine: ei söödeta.

Kalu vaadeldakse esimese 2–4 tunni möödumisel ja seejärel vähemalt iga 24 tunni järel. Kalad loetakse surnuks, kui sabavarre puudutamine ei kutsu esile reaktsiooni ja puuduvad nähtavad hingamisliigutused. Surnud kalade avastamisel need kõrvaldatakse ja suremus registreeritakse.

Registreeritakse ka nähtavad kõrvalekalded (nt tasakaalu puudumine, muutused ujumiskäitumises, hingamisfunktsioonis või pigmentatsioonis jne).

Iga päev tuleb mõõta pH-d, lahustunud hapniku kontsentratsiooni ja temperatuuri.

#### *Piirsalduskatse*

Käesoleva katsemeetodi protseduuri järgides võib kontsentratsioonil 100 mg/l teha piirsalduskatse näitamaks, et  $LC_{50}$  on sellest kontsentratsioonist kõrgem.

Kui aine iseloom välistab kontsentratsiooni 100 mg/l saavutamise katses kasutatavas vees, tuleks piirsalduskatse teha kontsentratsioonil, mis on võrdne aine lahustuvusega kasutatavas keskkonnas (või kõrgeimal kontsentratsioonil, kus moodustub stabiilne dispersioon) (vt ka punkti 1.6.1.1).

Piirsalduskatses tuleks kasutada 7–10 kala ja samapalju kontrollkalu. (Binomiaalteooria kohaselt võib 99,9 % tõenäosusega väita, et kui 10 kalaga katses on suremus null, siis on  $LC_{50}$  piirsalduskatses kasutatud kontsentratsioonist kõrgem. 7, 8 või 9 kala puhul näitab suremuse puudumine vähemalt 99 % tõenäosusega seda, et  $LC_{50}$  on kasutatud kontsentratsioonist kõrgem.)

Suremuse esinemisel tuleb läbi viia täiemahuline uuring. Subletaalse toime avaldumisel tuleks see registreerida.

## 2. ANDMED JA HINDAMINE

Iga vaatlustulemuste registreerimise ajavahemiku puhul (24, 48, 72 ja 96 tundi) näidata iga soovitatava kokkupuuteperioodi kohta logaritmilisel diagrammil graafiliselt suremusprotsendi sõltuvus kontsentratsioonist.

Võimalusel tuleks iga vaatlushetke kohta leida standardmeetodeid kasutades hinnanguline  $LC_{50}$  väärtus ja usalduspiirid ( $p = 0,05$ ); need väärtused tuleks ümardada ühe või maksimaalselt kahe tüvenumbrini (kahe tüvenumbrini ümardamise näited: 173,5 → 170; 0,127 → 0,13; 1,21 → 1,2).

Juhtudel, kus kontsentratsiooni/protsentuaalse reaktsiooni kõvera tõus on  $LC_{50}$  arvutamiseks liiga suur, piisab selle väärtuse graafilisest hindamisest.

Kui kahe järjestikuse, 2,2-kordse vahega kontsentratsiooni suremus on vastavalt 0 ja 100 %, piisab  $LC_{50}$  vahemiku näitamiseks neist kahest väärtusest.

Kui täheldatakse, et testaine stabiilsust või homogeensust ei ole võimalik säilitada, tuleks see ära märkida ja olla tulemuste tõlgendamisel ettevaatlik.

## 3. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- andmeid katses kasutatavate kalade kohta (teaduslikku nimetust, liini, päritolu, mis tahes eelnevat mõjutamist ning igal katsekonsentratsioonil kasutatud kalade suurust ja arvu),
- lahjendusvee päritolu ja peamisi keemilisi näitajaid (pH, karedus, temperatuur),
- vees vahelahustuva aine puhul põhi- ja katselahuste valmistamise meetodit,
- kõigi abiainetes kontsentratsiooni,

- kasutatud kontsentratsioone ja kõiki olemasolevaid andmeid uuritava kemikaali kontsentratsioonide stabiilsuse kohta katselahuses,
- keemiliste analüüside tegemisel kasutatud meetodeid ja saadud tulemusi,
- piirsalduskatse tulemusi, kui see tehti,
- kasutatud katsemeetodi valiku põhjusi ja meetodi üksikasju (nt seisva veega, poolseisva veega katsetesüsteem, annustamiskiirus, läbivoolu kiirus, aeratsioon, kalade hulk jne),
- katseadmete kirjeldust,
- valgusrežiimi,
- katselahuste hapnikusisaldust, pH väärtusi ja temperatuuri iga 24 tunni järel,
- tõendeid kvaliteedinõuete täitmise kohta,
- tabelit kumulatiivse suremuse kohta igal kontsentratsioonil ja kontrollkatses (ja vajadusel abiainega kontrollkatses) kõigil soovitatud vaatlushetkedel,
- kontsentratsiooni/protsentuaalse reaktsioonikõvera graafikut katse lõpus,
- võimalusel  $LC_{50}$  väärtusi kõigil soovitatud vaatlushetkedel (95 % usalduspiiridega),
- $LC_{50}$  määramisel kasutatud statistilisi meetodeid,
- võrdlusainete kasutamisel nendega saadud tulemusi,
- kõrgeimat katsekontsentratsiooni, mille puhul katse kestel suremust ei esinenud,
- madalaimat katsekontsentratsiooni, mille puhul suremus katse kestel oli 100 %.

#### 4. VIITED

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.
2. AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.
3. AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow Through methods – NFT 90-305 June 1985.
4. ISO 7346/1,2 and/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – *Teleostei, Cyprinidae*). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.
5. Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.
6. DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).
7. JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.
8. NEN 6506 – Water – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.
9. Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.
10. Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.
11. Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
12. Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

13. Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.
14. Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
15. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.
16. Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
17. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793–821.
18. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3–32.
19. Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65–84.
20. Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

#### 1. liide

#### Taastatud vesi

*Sobiva lahjendusvee näited*

Kõik kemikaalid peavad olema analüüsipuhtad.

Vesi peaks olema kvaliteetne destilleeritud vesi või deioniseeritud vesi juhtivusega alla 5 µS/cm<sup>-1</sup>.

Vee destilleerimise seade ei tohi sisaldada vaskosi.

*Põhilahused*

|                                                                        |         |
|------------------------------------------------------------------------|---------|
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (kaltsiumkloriidihüdraat):       | 11,76 g |
| Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.                    |         |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (magneesiumsulfaatheptahüdraat): | 4,93 g  |
| Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.                    |         |
| NaHCO <sub>3</sub> (naatriumvesinikkarbonaat):                         | 2,59 g  |
| Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.                    |         |
| KCl (kaaliumkloriid):                                                  | 0,23 g  |
| Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.                    |         |

*Taastatud lahjendusvesi*

25 ml kõigist neljast põhilahusest segatakse kokku ja täiendatakse veega 1 liitrini.

Aereeritakse, kuni hapnikusisaldus jõuab küllastuskontsentratsioonini.

pH peaks olema 7,8 ± 0,2.

Vajadusel reguleeritakse pH-d NaOH (naatriumhüdroksiidi) või HCl-ga (vesinikkloriidhappega).

Sel viisil valmistatud lahjendust vett lastakse 12 tundi seista ja seda ei tohi enam aereerida.

Ca ja Mg ionide summaarne kogus selles lahuses on 2,5 mmol/l. Ca:Mg ionide suhe on 4:1 ja Na:K ionide suhe 10:1. Lahuse üldleelisus on 0,8 mmol/l.

Ükski kõrvalekalle lahjendusvee valmistamisprotseduurist ei tohi muuta vee koostist või omadusi.

## 2. liide

### Katseks soovitatavad kalaliigid

| Soovitav liik                                                                                | Soovitav katsetemperatuuride vahemik (°C) | Soovitav katseisendi täispikkus (cm) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Sebrakala               | 20–24                                     | 3,0 ± 0,5                            |
| <i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)                              | 20–24                                     | 5,0 ± 2,0                            |
| <i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Sasaan                        | 20–24                                     | 6,0 ± 2,0                            |
| <i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlegel 1850) | 20–24                                     | 3,0 ± 1,0                            |
| <i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Gupi                       | 20–24                                     | 3,0 ± 1,0                            |
| <i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758)             | 20–24                                     | 5,0 ± 2,0                            |
| <i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum-1988) Vikerforell               | 12–17                                     | 6,0 ± 2,0                            |
| <i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Harilik säinas                 | 20–24                                     | 6,0 ± 2,0                            |

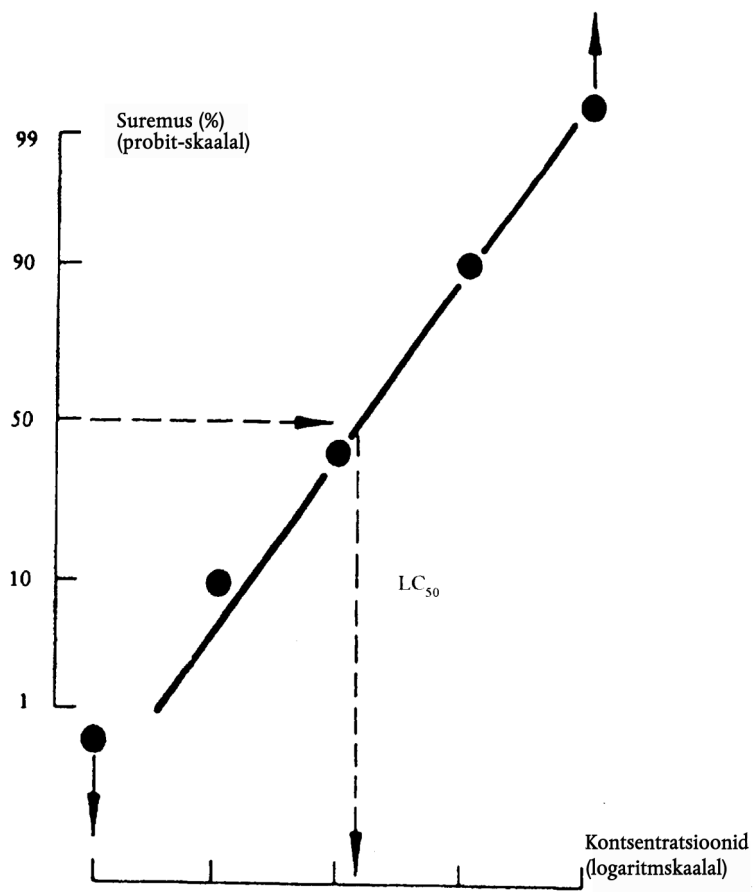
### Kogumine

Eespool loetletud kalu on lihtne kasvatada ja/või neid on võimalik aasta ringi hankida. Neid on võimalik aretada ja kasvatada kalakasvandustes või laboris, tingimustes, kus haigused ja parasiidid on kontrolli all, nii et katses kasutatav isend on terve ja tema põlvnemine teada. Need kalad on saadaval mitmel pool maailmas.

## 3. liide

**Kontsentratsiooni: suremusprotsendi sõltuvuse näide**

Näide  $LC_{50}$  määramise kohta logaritmilise probit-diagrammi abil



**C.2. ÄGE MÜRGISUS VESIKIRPUDELE (DAPHNIA)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katses määratakse aine keskmine immobiliseerivalt mõjuv kontsentratsioon ( $EC_{50}$ ) vesikirpudele (*Daphnia*) magevees. Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine lahustuvust vees, aururõhku, keemilist stabiilsust, dissotsiatsioonikonstante ja biolagunduvust.

Katse kavandamisel ja tulemuste tõlgendamisel tuleks arvestada ka muid andmeid (näiteks struktuurivalemit, puhtusastet, peamiste lisandite iseloomu ja protsentuaalset sisaldust, lisaainete olemasolu ja koguseid ning oktaanol/vesi jaotustegurit).

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Direktiivi nõue  $LC_{50}$  järele vesikirpudel loetakse täidetuks  $EC_{50}$  määramisega käesoleva katsemeetodi kohaselt.

Käesolevas katses väljendatakse ägedat mürgisust keskmise immobiliseerivalt mõjuva kontsentratsioonina ( $EC_{50}$ ). See on kontsentratsioon (algväärtusena), mis immobiliseerib kindla katkematu kokkupuuteaja (mis peab olema märgitud) jooksul 50 % katses kasutatud vesikirpudest.

*Liikumisvõimeetus:*

Isendid, mis ei suuda 15 sekundi jooksul pärast katseanuma kerget loksutamist ujuda, loetakse liikumatuks.

Kõiki testaine kontsentratsioone väljendatakse massiühikutes mahuühiku kohta (milligrammides liitri kohta). Neid võib väljendada ka massiühikutes massiühiku kohta ( $mg/kg^{-1}$ ).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Katses võib kasutada võrdlusainet näitamaks, et katseliigi tundlikkus ei ole laboratoorsetes katsetingimustes oluliselt muutunud.

2. liites on esitatud EMÜ laboritevahelise võrdluse kokkuvõtlikud tulemused nelja ainega.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Kontsentratsioonil 100 mg/l võib teha piirsisalduskatse näitamaks, et  $EC_{50}$  on sellest kontsentratsioonist kõrgem.

Vesikirbud viiakse 48 tunniks kokkupuutesse teatavates kontsentratsioonides veele lisatud testainega. Lühema katse kasutamisel tuleb seda katsearuandes põhjendada.

Muul viisil samasugustes katsetingimustes ja katseaine küllaldases kontsentratsioonivahemikus avaldavad katseaine erinevad kontsentratsioonid vesikirpude ujumisvõimele erinevat keskmist mõju. Erinevatel kontsentratsioonidel on katse lõpus ujumisvõimeetu erinev protsent vesikirpe. 0 % ja 100 % liikumisvõimeetust põhjustavad kontsentratsioonid leitakse otse katsevaatlustest, ent 48 tunni  $EC_{50}$  leitakse samas võimalusel arvutuslikult.

Selles meetodis kasutatakse seisva veega katsesüsteemi, seega katselahuseid kokkupuuteperioodi kestel ei uuendata.

#### 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Kvaliteedinõuded kehtivad nii piirsalduskatse kui ka täiskatseprogrammi suhtes.

Liikumisvõimetuse protsent kontrollkatsetes ei tohi katse lõpuks ületada 10.

Kontrollrühma vesikirbud ei tohi olla veepinnale kinni jäänud.

Soovitav on, et lahustunud hapniku kontsentratsioon katseanumates ületaks kogu katse kestel 3 mg/l<sup>-1</sup>. Mingil juhul ei tohiks lahustunud hapniku kontsentratsioon langeda alla 2 mg/l<sup>-1</sup>.

Testaine kontsentratsioon peab kogu katse kestel olema vähemalt 80 % algkontsentratsioonist.

Katsekeskkonnas hästi lahustuvaid ja püsivaid lahuseid, st arvestataval määral mitte lenduvaid, lagunevaid, hüdrolüüsuvaid ega adsorbeeruvaid lahuseid andvate ainete puhul võib algkontsentratsiooni lugeda võrdseks nimikontsentratsiooniga. Kontsentratsiooni püsimist kogu katse kestel ja kvaliteedinõuete täitmist tuleb tõendada.

Ainete puhul, mis:

- i) on katsekeskkonnas vähelahustuvad või
- ii) moodustavad stabiilseid emulsioone või dispersioone või
- iii) ei ole vesilahuses stabiilsed,

loetakse algkontsentratsiooniks lahuses mõõdetud kontsentratsioon (või veesambas mõõdetud kontsentratsioon, kui lahuses mõõtmine ei ole tehniliselt võimalik). Kontsentratsioon mõõdetakse peale mõningast tasakaalustumist, kuid enne katseorganismide lahusesse viimist.

Kõigil neil juhtudel tuleb katse kestel teha täiendavaid mõõtmisi, mis kinnitaksid tegelikku kokkupuutekontsentratsiooni ja kvaliteedinõuete täitmist.

pH ei tohiks kõikuda rohkem kui ühe ühiku võrra.

#### 1.6. MEETODI KIRJELDUS

##### 1.6.1. Reaktiivid

##### 1.6.1.1. Testainete lahused

Vajaliku kontsentratsiooniga põhilahused valmistatakse aine lahustamisel deioniseeritud vees või punktile 1.6.1.2 vastavas vees.

Vajaliku kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahendamisel. Kõrgete kontsentratsioonide uurimisel võib aine lahustada otse lahendusvees.

Aineid kontrollitakse üldjuhul lahustuvuse piirini. Mõnede ainete puhul (nt vees vähelahustuvate, kõrge  $P_{ow}$ -ga või vees pigem stabiilse dispersiooni kui tõelise lahuse moodustavate ainete puhul) võib katse läbi viia aine lahustuvuspiirist kõrgemal kontsentratsioonil, et tagada kõrgeima lahustuva/stabiilse kontsentratsiooni saavutamine. Samas on oluline, et see kontsentratsioon ei häiriks katsesüsteemi muul moel (nt nii, et aine kile vee pinnal takistab hapniku lahustumist vees jne).

Vees vähelahustuvate ainete põhilahuste valmistamisel või nende disperseerimisel katsekeskkonnas võib abivahendina kasutada ultraheli-dispergeerimist, orgaanilisi lahuseid, emulgaatoreid või dispergaatoreid. Selliste abiainet kasutamisel peavad kõik katsekontsentratsioonid sisaldama sama koguse abiainet ja täiendavad kontrollvesikirbud tuleks kokkupuutesse viia katseseeriaga võrdväärse abiaine kontsentratsiooniga. Seesuguste abiainet kontsentratsioon katsekeskkonnas peaks olema minimaalne ega tohiks mingil juhul ületada 100 mg/l.

Katse tuleks läbi viia ilma pH-d reguleerimata. Märgatavate pH muutuste ilmnemisel on soovitatav katset reguleeritava pH-ga korrata ja esitada korduskatse tulemused. Eriliste vastunäidustuste puudumisel tuleks sellisel juhul põhilahuse pH reguleerida võrdseks lahjendusvee omaga. Eelistatav on selleks kasutada HCl-i ja NaOH-d. pH-d tuleb reguleerida nii, et testaine kontsentratsioon põhilahuses märgatavalt ei muutu. Ära tuleks märkida pH reguleerimisest tingitud võimalikud keemilised reaktsioonid või sademe teke.

#### 1.6.1.2. Katses kasutatav vesi

Katses kasutatakse taastatud vett (vt 1. liidet ja viidet (2): ISO 6341). Katse-eelse aklimatiseerimisvajaduse vältimiseks on soovitatav, et kasvatamisel kasutatav vesi oleks sarnaste omadustega (pH, karedus) katses kasutatava veega.

#### 1.6.2. Seade

Kasutatakse tavapäraseid laboriseadmeid ja -varustust. Katselahustega kokku puutuvad seadmed peaksid eelistatavalt olema üleni klaasist:

- hapnikumõõtur (mikroelektroodi või muude sobivate vahenditega lahustunud hapniku mõõtmiseks väikesemahulistes proovides),
- asjakohane termoregulaator,
- pH-meeter,
- vee kareduse määramise seade.

#### 1.6.3. Katseorganism

Eelistatav katseliik on *Daphnia magna*, kuid lubatud on kasutada ka *Daphnia pulex*'it. Katseisend peab olema katse algul alla 24 tunni vana, laboris kasvatatud, nähtavate haigustunnusteta ja teadaoleva minevikuga (nt põlvnemine, mis tahes eelnev mõjutamine jne).

#### 1.6.4. Katse käik

Lõplikule katsele võib eelneeda annusevahemiku leidmise katse, kus kogutakse andmeid katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku kohta.

Lisaks katseseeriale tehakse üks kontrollkatse ilma testaineta ja vajadusel ka üks kontrollkatse abiainet sisaldava lahusega.

Vesikirbud viiakse testainega kokkupuutesse allpool kirjeldatud moel:

- *kestus*: eelistatavalt 48 tundi,
- *isendite arv*: vähemalt 20 isendit iga uuritava kontsentratsiooni kohta, eelistatavalt jagatuna nelja viiesesse või kahte kümnesesse rühma,
- *kogus*: iga katseisendi kohta tuleks ette näha vähemalt 2 ml katselahust,
- *katsekontsentratsioon*: katselahus tuleks valmistada vahetult enne vesikirpude lahusesse viimist, kasutades eelistatavalt lahustina ainult vett. Kontsentratsioonid valmistatakse geomeetrilise jadana, kontsentratsioonide suhtega mitte üle 2,2. 48 tunni järel 0 % ja 100 % liikumisvõimetust ja  $EC_{50}$  arvutamist võimaldavaid vahepealseid liikumisvõimetuseprotsente põhjustavaid kontsentratsioone tuleks katsetada koos kontroll-lahustega,
- *vesi*: vt 1.6.1.2,
- *valgus*: valguse-pimeduse tsüklil ei ole kohustuslik,
- *temperatuur*: katsetemperatuuri peaks jääma vahemikku 18–22 °C ja iga katse kestel tuleks seda hoida konstantsena, lubatava kõikumisega  $\pm 1$  °C,

— aeratsioon: katselahuseid ei tohi aereerida mullide läbipuhumisega,

— söötmine: ei söödeta.

Katse lõpus tuleks mõõta kõigi kontroll- ja katselahuste pH-d ja hapnikukontsentratsiooni; katselahuste pH-d ei tohiks muuta.

Lenduvaid ühendeid tuleks uurida täielikult täidetud suletud nõudes, mis on hapnikupuuduse välistamiseks küllalt suured.

Vesikirpe kontrollitakse pärast vähemalt 24-tunnist kokkupuudet ja uuesti 48 tunni möödumisel.

#### Piirsalduskatse

Käesoleva katsemeetodi protseduuri järgides võib kontsentratsioonil 100 mg/l teha piirsalduskatse näitamaks, et  $EC_{50}$  on sellest kontsentratsioonist kõrgem.

Kui aine iseloom välistab kontsentratsiooni 100 mg/l saavutamise katses kasutatavas vees, tuleks piirsalduskatse teha kontsentratsioonil, mis on võrdne aine lahustuvusega kasutatavas keskkonnas (või kõrgeimal kontsentratsioonil, kus moodustub stabiilne dispersioon) (vt ka punkti 1.6.1.1).

Piirkatses tuleks kasutada kahte või nelja rühma jagatud 20 vesikirpu ja samapalju kontroll-iseendeid. Liikumisvõimetuse esinemisel tuleb läbi viia täiemahuline uuring.

## 2. ANDMED JA HINDAMINE

Iga vaatlustulemuste registreerimise ajavahemiku puhul (24 ja 48 tundi) näidatakse logaritmilisel diagrammil graafiliselt suremusprotsendi sõltuvus kontsentratsioonist.

Võimalusel tuleks iga vaatlushetke kohta leida standardmeetodeid kasutades hinnanguline  $EC_{50}$  väärtus ja usalduspiirid ( $p = 0,05$ ); need väärtused tuleks ümardada ühe või maksimaalselt kahe tüvenumbrini (kahe tüvenumbrini ümardamise näited:  $173,5 \rightarrow 170$ ;  $0,127 \rightarrow 0,13$ ;  $1,21 \rightarrow 1,2$ ).

Juhtudel, kus kontsentratsiooni/protsentuaalse reaktsiooni kõvera tõus on  $EC_{50}$  arvutamiseks liiga suur, piisab selle väärtuse graafilisest hindamisest.

Kui kahe järjestikuse, 2,2-kordse vahelise kontsentratsiooni suremus on vastavalt 0 ja 100 %, piisab  $LC_{50}$  vahemiku näitamiseks neist kahest väärtusest.

Kui täheldatakse, et testaine stabiilsust või homogeensust ei ole võimalik hoida, tuleks see ära märkida ja olla tulemuste tõlgendamisel ettevaatlik.

## 3. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- andmeid katseisendite kohta (teaduslikku nimetust, liini, tarnijat või päritolu, mis tahes eelnevat mõjutamist, kasvatamismeetodit – sh päritolu, sööda tüüpi ja kogust, söötmissagedust),
- lahjendusvee päritolu ja peamisi keemilisi näitajaid (st pH, temperatuur, karedus),
- vees vähelahustuva aine puhul põhi- ja katselahuste valmistamise meetodit,
- kõigi abiainete kontsentratsiooni,
- kasutatud kontsentratsioone ja kõiki olemasolevaid andmeid uuritava kemikaali kontsentratsioonide stabiilsuse kohta katselahuses,

- keemiliste analüüside tegemisel kasutatud meetodeid ja saadud tulemusi,
- piirsalduskatse tulemusi, kui see tehti,
- katseseadmete kirjeldust,
- valgusrežiimi,
- katselahuste hapnikusaldust, pH väärtusi ja temperatuuri,
- tõendeid kvaliteedinõuete täitmise kohta,
- tabelit kumulatiivse immobiliseerumise kohta igal kontsentratsioonil ja kontrollkatses (ja vajadusel abiainega kontrollkatses) kõigil soovitatud vaatlusaegadel (24 ja 48 h),
- kontsentratsiooni/protsentuaalse reaktsioonikõvera graafikut katse lõpus,
- võimalusel  $EC_{50}$  väärtusi kõigil soovitatud vaatlushetkedel (95 % usalduspiiridega),
- $EC_{50}$  määramisel kasutatud statistilisi meetodeid,
- võrdlusainete kasutamisel nendega saadud tulemusi,
- kõrgeimat katsekontsentratsiooni, mille puhul katse kestel liikumisvõimetust ei esinenud,
- madalaimat katsekontsentratsiooni, mille puhul liikumisvõimeetus katse kestel oli 100 %.

#### 4. VIITED

1. OECD, Paris, 1981, Test Guidelines 202, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.
2. International Standard ISO, Water Quality – Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341-1989
3. AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera – crustacea) NFT 90 301 (January 1983).
4. Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
5. DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).
6. Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
7. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. and Exper. Ther., 1949, vol. 96, 99–113.
8. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793–821.
9. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3–32.
10. Stephan, C.E. Methods for calculating an  $LC_{50}$ . In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM, 1977, STP 634, 65–84.
11. Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an  $LC_{50}$ . US EPA.

#### 1. liide

#### Taastatud vesi

Sobiva lahjendusvee näide (ISO 6341 järgi)

Kõik kemikaalid peavad olema analüüsipuhtad.

Vesi peaks olema kvaliteetne destilleeritud vesi või deioniseeritud vesi juhtivusega alla 5  $\mu S\ cm^{-1}$ .

Vee destilleerimise seade ei tohi sisaldada vaskosi.

*Põhilahused*

|                                                                        |         |
|------------------------------------------------------------------------|---------|
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (kaltsiumkloriidihüdraat):       | 11,76 g |
| lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini                     |         |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (magneesiumsulfaatheptahüdraat): | 4,93 g  |
| lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini                     |         |
| NaHCO <sub>3</sub> (naatriumvesinikkarbonaat):                         | 2,59 g  |
| lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini                     |         |
| KCl (kaaliumkloriid):                                                  | 0,23 g  |
| lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini                     |         |

*Taastatud lahendusvesi*

25 ml kõigist neljast põhilahusest segatakse kokku ja täiendatakse veega 1 liitrini.

Aereeritakse, kuni hapnikusisaldus jõuab küllastuskontsentratsioonini.

pH peaks olema 7,8 ± 0,2.

Vajadusel reguleeritakse pH-d NaOH (naatriumhüdroksiidi) või HCl-ga (vesinikkloriidhappega).

Sel viisil valmistatud lahendusvett lastakse 12 tundi seista ja seda ei ole enam vaja aereerida.

Ca ja Mg ionide summaarne kogus selles lahuses on 2,5 mmol/l. Ca:Mg ionide suhe on 4:1 ja Na:K ionide suhe 10:1. Lahuse üldleelisus on 0,8 mmol/l.

Ükski kõrvalekalle lahendusvee valmistamisprotseduurist ei tohi muuta vee koostist või omadusi.

*2. liide*

1978. a tehtud EMÜ laboritevahelise võrdluse kokkuvõtlikud tulemused (näidatud ka viites (2)).

*Tähelepanu:* selles laboritevahelises võrdluses määrati 24 tunni EC<sub>50</sub>.

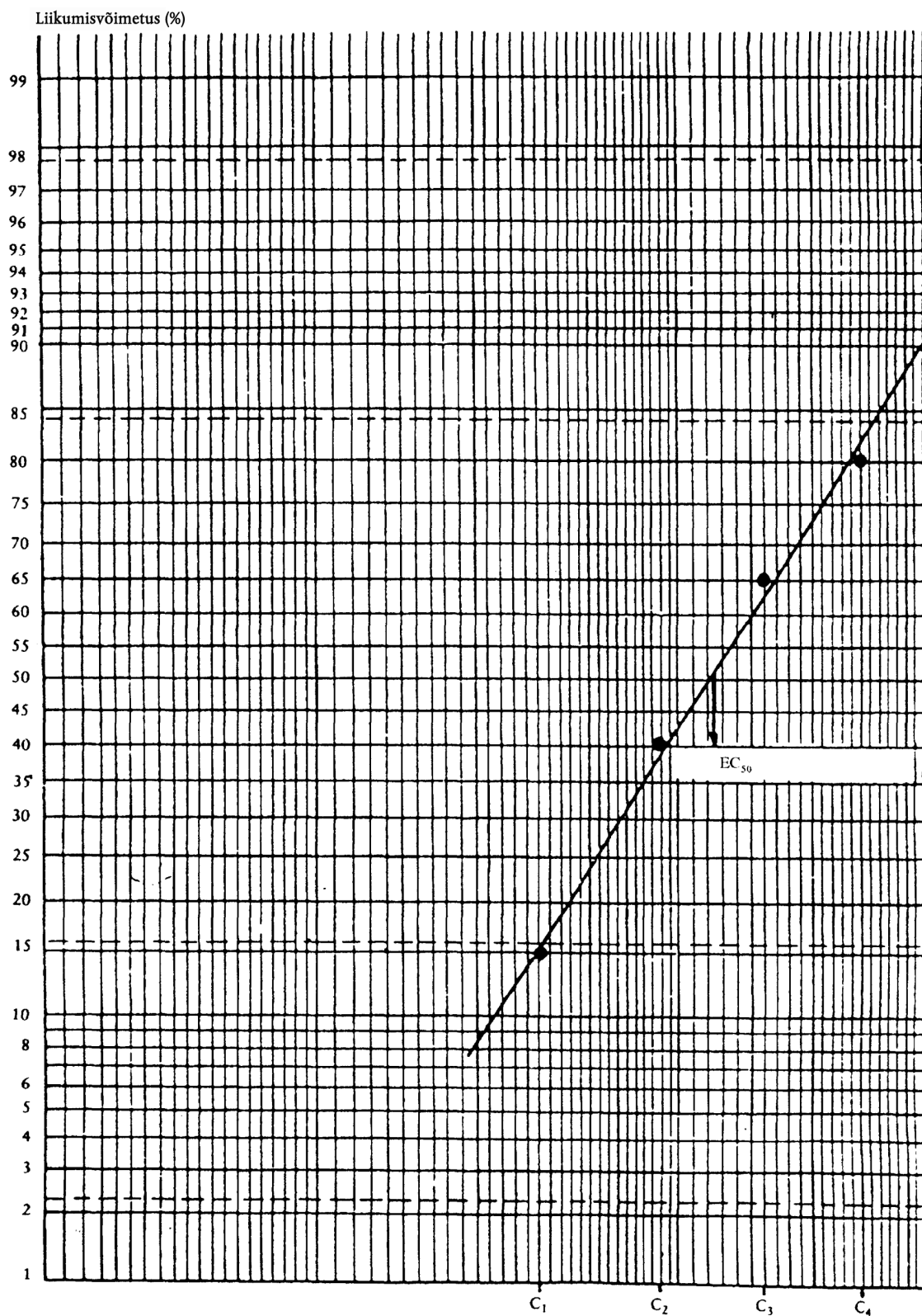
Kasutatud ained:

- 1) kaaliumdikromaat
- 2) tetrapropüülbenseenisulfoonhape
- 3) tetrapropüülbenseenisulfoonhape naatriumsool
- 4) trikloro-2,4,5-fenoksüädikhappe kaaliumsool

| Aine | Osalenud laborite arv | Arvutustes kasutatud tule-<br>muste arv | Keskmine 24 h EC <sub>50</sub> mg/l |
|------|-----------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|
| 1    | 46                    | 129                                     | 1,5                                 |
| 2    | 36                    | 108                                     | 27                                  |
| 3    | 31                    | 84                                      | 27                                  |
| 4    | 32                    | 72                                      | 770                                 |

## 3. liide

## Kontsentratsioon: immobilisatsiooniprotsendi sõltuvuse näide

Näide  $EC_{50}$  määramise kohta logaritmilise probit-diagrammi abil

### C.3. VETIKATE KASVU PIDURDAMISE KATSE

#### 1. MEETOD

##### 1.1. SISSEJUHATUS

Katses määratakse aine mõju ainuraksete rohevetikaliikide kasvukiirusele. Suhteliselt lühikeses (72-tunnistes) katsetes on võimalik hinnata aine mõju mitme põlvkonna kestel. Meetodit võib kohandada mitmele ainuraksele vetikaliigile, sellisel juhul tuleb katsearuandele lisada kasutatud meetodi kirjeldus.

Meetod sobib kõige paremini vees lahustuvatele ainetele, mis jäävad katse tingimustes tõenäoliselt veefaasi.

Meetodit saab kasutada ainete puhul, mis ei takista otseselt vetikate kasvu mõõtmist.

Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine lahustuvust vees, aururõhku, keemilist stabiilsust, dissotsiatsiooni-konstante ja biolagunduvust.

Katse kavandamisel ja tulemuste tõlgendamisel tuleks arvestada ka muid andmeid (näiteks struktuurivalemit, puhtusastet, peamiste lisandite iseloomu ja protsentuaalset sisaldust, lisaainete olemasolu ja koguseid ning oktaanool/vesi jaotustegurit).

##### 1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Rakkude kontsentratsioon: rakkude arv milliliitris;

kasv: rakkude kontsentratsiooni kasv katse kestel;

kasvukiirus: rakkude kontsentratsiooni kasv ajaühikus;

$EC_{50}$ : käesolevas meetodis on see testaine kontsentratsioon, mis vähendab kasvu ( $E_b C_{50}$ ) või kasvukiirust ( $E_r C_{50}$ ) kontrollkatsega võrreldes 50 % võrra;

NOEC (tähteldatava toimeta kontsentratsioon): käesolevas meetodis on see kõrgeim uuritud kontsentratsioon, mille puhul ei tähteldata kontrollkatsega võrreldes kasvu pidurdumist.

Kõiki testaine kontsentratsioone väljendatakse massiühikutes mahuühiku kohta (milligrammides liitri kohta). Neid võib väljendada ka massiühikutes massiühiku kohta ( $mg/kg^{-1}$ ).

##### 1.3. VÕRDLUSAINED

Katses võib kasutada võrdlusainet, näitamaks, et katseliigi tundlikkus ei ole laboratoorsetes katsetingimustes oluliselt muutunud.

Võrdlusaine kasutamisel tuleks sellega saadud tulemused esitada katsearuandes. Võrdlusainena võib kasutada kaaliumdikromaati, kuid selle värv võib mõjutada nii rakkudeni jõudva valguse omadusi ja tugevust kui ka spektrofotomeetrilisi mõõtmisi, kui neid kasutatakse. Kaaliumdikromaati on kasutatud rahvusvahelises laboritevahelises katses (vt viidet (3) ja 2. liidet).

## 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kontsentratsioonil 100 mg/l võib teha piirsalduskatse näitamaks, et  $EC_{50}$  on sellest kontsentratsioonist kõrgem.

Valitud rohevetika eksponentsiaalselt kasvavad kultuurid viiakse kindlatel tingimustel mitme põlvkonna kestel kokkupuutesse testaine erinevate kontsentratsioonidega.

Katselahuseid inkubeeritakse 72 tundi, mõõtes rakkude kontsentratsiooni lahuses vähemalt iga 24 tunni tagant. Määratakse kasvu pidurdumine võrreldes kontrollkultuuriga.

## 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Kvaliteedinõuded kehtivad nii piirsalduskatse kui ka täiskatseprogrammi suhtes.

Rakkude kontsentratsioon kontrollkultuurides peaks olema kolme päeva jooksul kasvanud vähemalt 16 korda.

Testaine kontsentratsioon peab katse kestusele vastava aja jooksul säilitama vähemalt 80 % algkontsentratsioonist.

Katsekeskkonnas hästi lahustuvaid ja püsivaid lahuseid, st arvestataval määral mitte lenduvaid, lagunevaid, hüdroliisuvaid ega adsorbeeruvaid lahuseid andvate ainete puhul võib algkontsentratsiooni lugeda võrdseks nimikontsentratsiooniga. Kontsentratsiooni püsimist kogu katse kestel ja kvaliteedinõuete täitmist tuleb tõendada.

Ainete puhul, mis:

- i) on katsekeskkonnas vähelahustuvad või
- ii) moodustavad stabiilseid emulsioone või dispersioone või
- iii) ei ole vesilahuses stabiilsed,

loetakse algkontsentratsiooniks katse algul mõõdetud kontsentratsioon. Kontsentratsioon mõõdetakse peale mõningast tasakaalustumist.

Kõigil neil juhtudel tuleb katse kestel teha täiendavaid mõõtmisi, mis kinnitaksid tegelikku kokkupuutekontsentratsiooni ja kvaliteedinõuete täitmist.

On teada, et oluline osa testainest võidakse katse kestel vetikate biomassi haarata. Seetõttu tuleb eespool esitatud kvaliteedinõuete täitmise kinnitamiseks arvesse võtta nii vetikate biomassi haaratav kui ka lahuses mõõdetud ainekogus (või veesambas mõõdetud ainekogus, kui lahuses mõõtmine ei ole tehniliselt võimalik). Kuna aine kontsentratsiooni mõõtmine vetikate biomassis võib aga tehniliselt üsnagi keerukas olla, võib kvaliteedinõuete täitmist kinnitada katse läbiviimisel aine kõrgeima kontsentratsiooniga, kuid ilma vetikateta ja mõõtes kontsentratsioonid lahuses (või veesambas, kui lahuses mõõtmine ei ole tehniliselt võimalik) nii katse alguses kui ka lõpus.

## 1.6. MEETODI KIRJELDUS

## 1.6.1. Reaktiivid

## 1.6.1.1. Testainete lahused

Vajaliku kontsentratsiooniga põhilahused valmistatakse aine lahustamisel deioniseeritud vees või punktile 1.6.1.2 vastavas vees.

Vajaliku kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse sobivate koguste lisamisel vetikate eelkultuuridele (vt 1. liidet). Aineid kontrollitakse üldjuhul lahustuvuse piirini. Mõnede ainete puhul (nt vees madala lahustuvusega, kõrge  $P_{ow}$ -ga või vees pigem stabiilse dispersiooni kui tõelise lahuse moodustavate ainete puhul) võib katse läbi viia aine lahustuvuspiirist kõrgemal kontsentratsioonil, et tagada kõrgeima lahustuva/stabiilse kontsentratsiooni saavutamine. Samas on oluline, et see kontsentratsioon ei häiriks katsesüsteemi muul moel (nt nii, et aine kile vee pinnal takistab hapniku lahustumist vees jne).

Vees vähelahustuvate ainete põhilahuste valmistamisel või nende dispergeerimisel katsekeskkonnas võib abivahendina kasutada ultraheli-dispergeerimist, orgaanilisi lahusteid, emulgaatoreid või dispergaatoreid. Selliste abiainet kasutamisel peavad kõik katsekonsentratsioonid sisaldama sama koguse abiainet ja täiendavad kontrollkultuurid tuleks viia kokkupuutesse katseseeriaga võrdväärse abiaine kontsentratsiooniga. Seesuguste abiainet kontsentratsioon katsekeskkonnas peaks olema minimaalne ega tohiks mingil juhul ületada 100 mg/l.

Katse tuleks läbi viia ilma pH-d reguleerimata. Märgatavate pH muutuste ilmnemisel on soovitatav katset reguleeritava pH-ga korrata ja esitada korduskatse tulemused. Eriliste vastunäidustuste puudumisel tuleks sellisel juhul põhilahuse pH reguleerida võrdseks lahjendusvee omaga. Eelistatav on selleks kasutada HCl-i ja NaOH-d. pH-d tuleb reguleerida nii, et testaine kontsentratsioon põhilahuses märgatavalt ei muutu. Ära tuleks märkida pH reguleerimisest tingitud võimalikud keemilised reaktsioonid või sademe teke.

#### 1.6.1.2. Katses kasutatav toitelahus

Vesi peaks olema kvaliteetne destilleeritud vesi või deioniseeritud vesi juhtivusega alla 5  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ . Vee destilleerimise seade ei tohi sisaldada vaskosi.

Soovitatav on kasutada järgmist toitelahust.

Järgmise tabeli põhjal valmistatakse neli põhilahust. Põhilahused steriliseeritakse membraanfiltratsioonil või autoklaavimisel ja säilitatakse seejärel pimedas 4 °C juures. Põhilahust nr 4 tuleks steriliseerida ainult membraanfiltratsioonil. Need põhilahused lahjendatakse nii, et saadakse lõplikud toitainete kontsentratsioonid katselahuses.

| Toitaine                                            | Konsentratsioon põhilahuses |      | Lõplik konsentratsioon katselahuses |      |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------|------|-------------------------------------|------|
| Põhilahus 1: makrotoitained                         |                             |      |                                     |      |
| NH <sub>4</sub> Cl                                  | 1,5                         | g/l  | 15                                  | mg/l |
| MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 1,2                         | g/l  | 12                                  | mg/l |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 1,8                         | g/l  | 18                                  | mg/l |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 1,5                         | g/l  | 15                                  | mg/l |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 0,16                        | g/l  | 1,6                                 | mg/l |
| Põhilahus 2: Fe-EDTA                                |                             |      |                                     |      |
| FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub>                  | 80                          | mg/l | 0,08                                | mg/l |
| Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O              | 100                         | mg/l | 0,1                                 | mg/l |
| Põhilahus 3: mikroelemendid                         |                             |      |                                     |      |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 185                         | mg/l | 0,185                               | mg/l |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 415                         | mg/l | 0,415                               | mg/l |
| ZnCl <sub>2</sub>                                   | 3                           | mg/l | 3 × 10 <sup>-3</sup>                | mg/l |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 1,5                         | mg/l | 1,5 × 10 <sup>-3</sup>              | mg/l |
| CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 0,01                        | mg/l | 10 <sup>-5</sup>                    | mg/l |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 7                           | mg/l | 7 × 10 <sup>-3</sup>                | mg/l |
| Põhilahus 4: NaHCO <sub>3</sub>                     |                             |      |                                     |      |
| NaHCO <sub>3</sub>                                  | 50                          | g/l  | 50                                  | mg/l |

Toitelahuse pH on peale õhuga tasakaalustamist ligikaudu 8.

## 1.6.2. Seade

- Harilikud laboriseadmed,
- sobiva mahuga kolvid (näiteks 100 ml katselahuse mahu puhul sobivad 250 ml koonilised kolvid). Kõik katses kasutatavad kolvid peaksid olema ühesugusest materjalist ja ühesuguste mõõtmetega,
- kultiveerimisese: kapp või kamber, mida saab hoida temperatuuril 21–25 °C täpsusega  $\pm 2$  °C ja ühtlaselt valgustada spektrivahemikus 400–700 nm. Kui kontrollkultuuride vetikad on saavutanud soovitatava kasvukiiruse, võib selle põhjal järeldada, et kasvutingimused, sh valgustugevus, on olnud sobivad.

Keskliste katselahusekontsentratsioonide puhul on soovitatavaks valgustugevuseks 60–120  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $35\text{--}70 \times 10^{18}$  footonit·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), mõõdetuna sobiva detektori abil vahemikus 400–700 nm. Luksides kaliibritud fotomeetrite puhul on sobivaks vahemikuks 6 000–10 000 lx.

Vajalik valgustugevus on saavutatav nelja kuni seitsme 30 W universaalvalge luminofoorlambi abil (värvustemperatuuriga ligikaudu 4 300 K), mis on paigutatud 0,35 m kaugusele vetikakultuurist.

- rakkude kontsentratsiooni tuleks mõõta elusrakkude otsese loendamise teel, nt loenduskambritega mikroskoobi abil. Kasutada võib aga ka muid meetodeid (fotomeetria, turbidimeetria,...), kui need on küllalt tundlikud ja näidatakse, et tulemused vastavad piisavalt hästi rakkude kontsentratsioonile.

## 1.6.3. Katseorganismid

Soovitatav on kasutada kiire kasvuga rohevetika liiki, mis sobib hästi kultiveerimiseks ja katseteks. Eelistatavad on järgmised liigid:

- *Selenastrum capricornutum*, nt ATCC 22662 või CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, nt 86.81 SAG.

Märkus:

ATCC = American Type Culture Collection (U.S.A.)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (U.K.)

SAG = Sammlung Algenkulturen (Göttingen, Saksamaa)

Muu liigi kasutamisel tuleks vastav tüvi ära märkida.

## 1.6.4. Katse käik

Eeldatav mõjupiirkond leitakse annusevahemiku leidmise katsete põhjal.

Kahe eri kasvukriteeriumi (biomassi ja kasvukiiruse) põhjal võib saada väga erinevaid kasvu pidurdumise tulemusi; annusevahemiku leidmise katses tuleks kasutada mõlemat, tagamaks, et kontsentratsioonide geomeetriline kasv võimaldab määrata nii  $E_b C_{50}$  kui ka  $E_r C_{50}$ .

*Rakkude algkontsentratsioon*

*Selenastrum capricornutum*'i ja *Scenedesmus subspicatus*'e puhul on rakkude soovitatavaks algkontsentratsiooniks kultuuris 10<sup>4</sup> rakku/ml. Muude liikide kasutamisel peaks kasutatav biomass olema võrreldavas suurusjärgus.

*Testainete kontsentratsioonid*

Katseks valmistatakse geomeetrilise jadana ette vähemalt viis kontsentratsiooni, kontsentratsioonide suhtega mitte üle 2,2. Madalaimal uuritaval kontsentratsioonil ei tohiks ilmned a täheldatavat mõju vetikate kasvule. Kõrgeim uuritav kontsentratsioon peaks pidurdama vetikate kasvu kontrollkultuuriga võrreldes vähemalt 50 % ja eelistatavalt peatama kasvu täielikult.

*Kordus- ja kontrollkatsed*

Igal uuritaval kontsentratsioonil tuleb teha vähemalt kolm korduskatset. Ilma testaineta tehakse kolm kontrollkatset, vajadusel tehakse ka kolm kontrollkatset abiainet sisaldava lahusega. Kui see on õigustatud, võib katseskeemi muuta, suurendades kontsentratsioonide arvu ja vähendades korduskatsete arvu kontsentratsiooni kohta.

*Katse tegemine*

Vajaliku testaine ja vetikainokulaadi sisaldusega katsekultuurid valmistatakse nõutavate põhilahusekoguste lisamisel sobivatele vetikate eelkultuuride kogustele (vt 1. liidet).

Kultiveerimiskolbe loksutatakse ja need asetatakse kultiveerimisseadmesse. Vetikarakke hoitakse loksutamise, segamise või õhuga läbipuhumise teel suspendeerituna, parandades nii gaasivahetust ja vähendades pH kõikumisi katselahustes. Kultuure tuleks hoida temperatuurivahemikus 21–25 °C täpsusega  $\pm 2$  °C.

Igas kolvis määratakse rakkude kontsentratsioon vähemalt 24, 48 ja 72 tunni möödumisel katse algusest. Kui rakkude kontsentratsiooni mõõdetakse muude meetodite abil, mitte otsese loendamise teel, kasutatakse võrdlusproovina filtritud vetikate toitelahust, mis sisaldab vastavas kontsentratsioonis uuritavat kemikaali.

pH-d mõõdetakse katse algul ja 72 tunni möödumisel.

Kontrollkultuuride pH ei tohiks katse kestel üldjuhul erineda rohkem kui 1,5 ühiku võrra.

*Lenduvate ainete uurimine*

Kuni praeguseni puudub üldtunnustatud meetod lenduvate ainete uurimiseks. Kui on teada, et aine kaldub aurustuma, võib kasutada suurema tühja ülaosaga suletud kolbi. Kolvi vajaliku tühja ülaosa mahu arvutamisel tuleb arvestada CO<sub>2</sub> puudujäägi võimalust. Välja on pakutud meetodi mõningaid eri variante (vt viidet (4)).

Tuleks püüda määrata lahusesse jäävat ainekogust ning lenduvate kemikaalidega suletud süsteemides saadud tulemusi tuleks tõlgendada väga ettevaatlikult.

*Piirsalduskatse*

Käesoleva katsemeetodi protseduuri järgides võib kontsentratsioonil 100 mg/l teha piirsalduskatse näitamaks, et LC<sub>50</sub> on sellest kontsentratsioonist kõrgem.

Kui aine iseloom välistab kontsentratsiooni 100 mg/l saavutamise katses kasutatavas vees, tuleks piirsalduskatse teha kontsentratsioonil, mis on võrdne aine lahustuvusega kasutatavas keskkonnas (või kõrgeimal kontsentratsioonil, kus moodustub stabiilne dispersioon) (vt ka punkti 1.6.1.1).

Piirsalduskatse tuleks teha vähemalt kolme paralleelkatsetena, sama arvu kontrollkatsetega. Piirsalduskatses tuleks rakendada kaht eri kasvukriteeriumi (biomassi ja kasvukiirust).

Kui biomassi või kasvukiiruse järgi tehtud katses on keskmine pidurdumine 25 % või suurem, tuleb läbi viia täiemahuline uuring.

**2. ANDMED JA HINDAMINE**

Mõõdetud rakukontsentratsioonid katse- ja kontrollkultuurides esitatakse tabelis koos testaine kontsentratsioonide ja mõõtmisaegadega. Kasvukõverate saamiseks esitatakse graafiliselt rakkude keskmise kontsentratsiooni muutus ajas (0–72 h) iga testaine kontsentratsiooni puhul.

Kontsentratsiooni/mõju sõltuvuse määramisel võib kasutada järgmisi meetodeid. Madalatel kontsentratsioonidel mõned ained stimuleerivad kasvu. Arvestada tuleks ainult kasvu 0–100 % pidurdumisele viitavaid andmepunkte.

## 2.1. KASVUKÕVERATE ALUSE PINDALA VÕRDLEMINE

Pindala kasvukõvera ja horisontaaljoone  $N = N_0$  vahel võib arvutada järgmise valemi järgi:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

kus

$A$  = pindala,

$N_0$  = rakkude arv/ml ajahetkel  $t_0$  (katse algul),

$N_1$  = mõõdetud rakkude arv/ml ajahetkel  $t_1$ ,

$N_n$  = mõõdetud rakkude arv/ml ajahetkel  $t_n$ ,

$t_1$  = esimese mõõtmise aeg katse algusest,

$t_n$  = n-nda mõõtmise aeg katse algusest,

$n$  = mõõtmiste arv katse algusest alates.

Rakkude kasvu protsentuaalne pidurdumine testaine igal kontsentratsioonil ( $I_A$ ) arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

kus

$A_c$  = pindala kasvukõvera ja horisontaaljoone  $N = N_0$  vahel kontrollkultuuris,

$A_t$  = pindala kasvukõvera ja horisontaaljoone  $N = N_0$  vahel kontsentratsioonil  $t$

$I_A$  väärtuste sõltuvus vastavatest kontsentratsioonidest esitatakse graafiliselt poollogaritmilisel diagrammil või poollogaritmilisel probit-diagrammil. Probit-diagrammi kasutamisel tõmmatakse läbi punktide sirge kas silma järgi või arvutatud regressiooni põhjal.

$EC_{50}$  leitakse hinnanguliselt regressioonisirgelt, määrates 50 % pidurdumisele ( $I_A = 50\%$ ) vastava kontsentratsiooni. Väärtuse üheseks esitamiseks seostatuna kasutatud arvutusmeetodiga on soovitatav kasutada sümbolit  $E_b C_{50}$ . On oluline, et  $E_b C_{50}$  esitatakse koos vastava kokkupuuteperioodi kestusega, nt  $E_b C_{50}(0-72 \text{ h})$ .

## 2.2. KASVUKIIIRUSTE VÕRDLEMINE

Kasvu keskmise erikiiruse ( $\mu$ ) võib eksponentsiaalselt kasvava kultuuri puhul arvutada järgmiselt

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

kus  $t_0$  on aeg katse alguses.

Kasvu keskmise erikiiruse ( $\mu$ ) võib leida ka graafiku  $\ln N$  versus aeg regressioonisirge tõusust.

Kasvu erikiiruse protsentuaalne pidurdumine testaine igal kontsentratsioonil ( $I_{\mu t}$ ) arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

kus

$\mu_c$  = kontrollkultuuri kasvu keskmine erikiirus

$\mu_t$  = kasvu keskmine erikiirus katsekontsentratsioonil  $t$

Kasvu keskmise erikiiruse protsentuaalne vähenemine testaine igal kontsentratsioonil võrreldes kontrollkultuuri vastava väärtusega esitatakse graafiliselt kontsentratsiooni logaritmi funktsioonina.  $EC_{50}$  saab määrata saadud graafikult. Selle meetodi abil leitud  $EC_{50}$  väärtuse üheseks esitamiseks on soovitatav kasutada sümbolit  $E_{C_{50}}$ . Näidata tuleb mõõtmise aeg, nt kui väärtus kehtib ajavahemiku 0–72 tundi kohta, on vastav sümbol  $E_{C_{50}}(0-72\text{ h})$ .

Märkus: Kasvu erikiirus on logaritmiline suurus ja selle väikesed muutused võivad tähendada suuri muutusi biomassis.  $E_bC$  ja  $E_rC$  arväärtused ei ole seega võrreldavad.

### 2.3. TÄHELDATAVA TOIMETA KONTSENTRATSIOONI (NOEC) ARVUTAMINE

Täheledatava toimeta kontsentratsioon määratakse statistiliselt sobiva mitmese võrdlemise meetodi (nt dispersioonanalüüsi ja Dunnetti testi) abil, kasutades individuaalsete korduskatsete kasvukõvera aluse pindala A (vt punkti 2.1) väärtusi või kasvu erikiiruse (vt punkti 2.2) väärtusi.

## 3. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- testainet: keemilisi tunnusandmeid,
- katseorganisme: päritolu, laborikultuuri, tüve numbrit, kultiveerimismeetodit,
- katsetingimusi:
  - katse algus- ja lõppkuupäeva ning kestust,
  - temperatuuri,
  - toitelahuse koostist,
  - kultiveerimisseadet,
  - lahuste pH väärtusi katse alguses ja lõpus (pH kõikumisel rohkem kui 1,5 ühiku võrra tuleks sellele anda seletus),
  - testaine lahustamisel kasutatud kandjat ja meetodit ning kandja kontsentratsiooni katselahustes,
  - valguse tugevust ja omadusi,
  - uuritud kontsentratsioone (mõõdetud või nimiväärtusi),
- tulemusi:
  - rakkude kontsentratsiooni igas kolvis igas mõõtepunktis ja rakkude kontsentratsiooni määramise meetodit,
  - rakkude kontsentratsiooni keskmisi väärtusi,
  - kasvukõveraid,
  - kontsentratsiooni/mõju graafilist väljendust,
  - EC väärtusi ja vastavaid arvutusmeetodeid,
  - täheledatava toimeta kontsentratsiooni (NOEC),
  - muid täheledataud toimeid.

## 4. VIITED

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag "Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*", in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.
3. ISO 8692 – Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
4. S. Galassi and M. Vigli – Chemosphere, 1981, vol.10, 1123–1126.

## 1. liide

**Vetikate kultiveerimise meetodi näide****Üldised märkused**

Järgmises meetodis kultiveeritakse vetikaid mürgisuskatsete jaoks.

Vetikakultuuride bakteritega nakatumise vältimiseks tuleb kasutada kohaseid meetodeid (ISO 4833). Eelistatav võib olla puhaskultuuride kasutamine, üheliigiliste kultuuride kasutamine on aga nõutav.

Bakterite või teiste vetikaliikidega saastumise vältimiseks tuleb kõik toimingud teha steriilsetes tingimustes. Saastunud kultuurid tuleks välja praakida.

**Vetikakultuuride saamise meetodid***Toitelahuste (söötmete) valmistamine:*

Toitelahused võib valmistada toitaine kontsentreeritud põhilahuste lahjendamisel. Tahke söötme saamiseks lisatakse 0,8 % agarit. Kasutatavad toitelahused peavad olema steriilsed. Steriliseerimine autoklaavimisel võib põhjustada  $\text{NH}_3$  kadu.

*Tüvikultuur:*

Tüvikultuurid on väikesed vetikakultuurid, mida viiakse regulaarselt värske söötmesse uue katsematerjali saamiseks. Kui kultuure regulaarselt ei kasutata, kantakse need viirgudena lüügiagarile. Vähemalt kord kahe kuu jooksul kantakse need üle uuele söötmele.

Tüvikultuure kasvatatakse sobiva söötmega koonilistes kolbides (mahuga umbes 100 ml). Vetikate inkubeerimisel 20 °C ja pideva valgustuse tingimustes tuleb neid iga nädal üle kanda.

Ülekandmise käigus viiakse teatav kogus "vana" kultuuri steriilsete pipettidega värske söötmega kolbi nii, et kiirelt kasvava liigi puhul on algkontsentratsioon umbes 100 korda väiksem kui vanas kultuuris.

Liigi kasvukiiruse võib määrata kasvukõveralt. Kui see on teada, on võimalik hinnanguliselt määrata kultuuri uude söötmesse viimisel vajalik kontsentratsioon. Seda on vaja teha enne, kui kultuur jõuab suremisfaasi.

*Eelkultuur:*

Eelkultuurid on mõeldud katsekultuuride inokuleerimiseks sobiva vetikakoguse saamiseks. Eelkultuuri inkubeeritakse katse tingimustes ja kasutatakse siis, kui see veel eksponentsiaalselt kasvab, üldjuhul umbes pärast kolmepäevast inkubatsiooniperioodi. Kui vetikakultuur sisaldab moondunud või kõrvalekalletega rakke, tuleb kultuur kõrvaldada.

## 2. liide

ISO 8692 – Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum* is esitatakse 16 labori vahel kaaliumdikromaadiga tehtud uuringu kohta järgmised tulemused:

|                       | Keskmsed (mg/l) | Vahemik (mg/l) |
|-----------------------|-----------------|----------------|
| $E_r C_{50}$ (0–72 h) | 0,84            | 0,60–1,03      |
| $E_b C_{50}$ (0–72 h) | 0,53            | 0,20–0,75      |

## C.4. KOHESE BIOLAGUNDUVUSE MÄÄRAMINE

## I OSA. ÜLDPÕHIMÕTTED

## I.1. SISSEJUHATUS

Kirjeldatakse kuut katsemeetodit, mis sobivad kemikaalide kohese biolagunduvuse sõelkatseteks aeroobses veekeskkonnas:

- a) Lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) kõrvaldamine (meetod C.4-A)
- b) Muudetud OECD sõelkatse – DOC kõrvaldamine (meetod C.4-B)
- c) Süsinikdioksiidi (CO<sub>2</sub>) eraldumine (muudetud Sturm katse) (meetod C.4-C)
- d) Manomeetiline respiromeetria (meetod C.4-D)
- e) Kinnise pudeli katse (meetod C.4-E)
- f) MITI (Jaapani Väliskaubandus- ja Tööstusministeeriumi) katse (meetod C.4-F)

Kõigi kuue katse üldpõhimõtted on esitatud meetodi I osas. Üksikute meetodite spetsiifilised osad on esitatud II–VII osas. Lisades on toodud määratlused, valemid ja suunismaterjalid.

1988. a tehtud OECD laboritevaheline võrdluskatse näitas, et nende meetoditega saadakse ühtseid tulemusi. Siiski võib mõni meetod olenevalt aine füüsikalistest omadustest olla eelistatav.

## I.2. SOBIVA MEETODI VALIMINE

Sobivaima meetodi valikul on olulised andmed kemikaali lahustuvuse, aururõhu ja adsorptsiooniomaduste kohta. Teoreetiliste väärtuste arvutamisel ja/või mõõdetud väärtuste, nt ThOD, ThCO<sub>2</sub>, DOC, TOC, COD (vt I ja II lisa) kontrollimisel on vaja teada aine keemilist struktuuri või valemit.

Aineid, mille lahustuvus vees on vähemalt 100 mg/ml, võib analüüsida kõigi meetoditega eeldusel, et ained ei ole lenduvad ega adsorbeeruvad. Tabelis 1 on märgitud meetodid, mis sobivad vees vähelahustuvate, lenduvate või adsorbeeruvate kemikaalide puhul. Vees vähelahustuvate ja lenduvate kemikaalide käsitsemisviise on kirjeldatud III lisas. Mõõdukalt lenduvaid kemikaale võib uurida DOC kõrvaldamise katse eeldusel, et katseanumates (mis peaksid olema sobival moel suletud) on küllaldaselt vaba ruumi gaasifaasile. Sellisel juhul tuleb füüsikaliste kadude arvessevõtmiseks teha ka abiootiline kontrollkatse.

Tabel 1. Katsemeetodite kohaldatavus

| Katse                        | Analüüsimeetod                                  | Sobivus ainetele, mis on: |          |               |
|------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|----------|---------------|
|                              |                                                 | vähelahustu-<br>vad       | lenduvad | adsorbeeruvad |
| DOC kõrvaldamine             | Lahustunud orgaaniline süsinik                  | —                         | —        | +/-           |
| Muudetud OECD sõelkatse      | Lahustunud orgaaniline süsinik                  | —                         | —        | +/-           |
| CO <sub>2</sub> eraldumine   | Respiromeetria: CO <sub>2</sub> eraldumine      | +                         | —        | +             |
| Manomeetiline respiromeetria | Manomeetiline respiromeetria: hapniku tarbimine | +                         | +/-      | +             |
| Kinnise pudeli katse         | Respiromeetria: lahustunud hapnik               | +/-                       | +        | +             |
| MITI katse                   | Respiromeetria: hapniku tarbimine               | +                         | +/-      | +             |

Saadud tulemuste tõlgendamisel on vaja andmeid katsematerjali puhtusastme või põhikomponentide osakaalu kohta, eriti kui tulemused on väikesed või piiripealsed.

Andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta bakteritele (IV lisa) võivad olla sobivate katsekonsentratsioonide valikul väga kasulikud ja madalate biolagunduvuse väärtuste õigel tõlgendamisel hädavajalikud.

### I.3. VÕRDLUSAINED

Töövõtete kontrollimiseks tehakse koos tavaliste katsetega sobivas kolvis paralleelkatse kohese biolagunduvuse kriteeriumidele vastavate võrdlusainetega.

Sobivad võrdlusained on aniliin (värskelt destilleeritud), naatriumatsetaat ja naatriumbensoaat. Võrdlusained lagunevad nende meetodite puhul isegi ilma otseselt inokulaati lisamata.

On tehtud ettepanekuid bioloogiliselt kergesti laguneva, kuid inokulaadi lisamist nõudva võrdlusaine otsimiseks. Välja on pakutud kaaliumvesinikftalaati, kuid enne selle aine võrdlusainena tunnustamist tuleb selle kohta rohkem andmeid koguda.

Respiromeetrites katsetes võivad lämmastikku sisaldavad ühendid nitrifikatsiooni kaudu mõjutada hapniku tarbimist (vt II ja V lisa).

### I.4. KATSEMEETODITE PÕHIMÕTE

Testaine lahuse või suspensiooni mineraalses toitelahuses inokuleeritakse ja seda inkubeeritakse aeroobsetes tingimustes pimedas või hajutatud valguse käes. Inokulaadist pärit DOC kogus katselahuses tuleks testainest pärit DOC kogusega võrreldes hoida võimalikult madal. Et arvestada endogeenset aktiivsust inokulaadis, tehakse paralleelne pimekatse inokulaadiga ja ilma testaineta, ehkki endogeenne aktiivsus rakkudes testaine juuresolekul ei ole täpselt identne endogeense kontrollproovi omaga. Töövõtete toimimise kontrolliks tehakse paralleelkatse võrdlusainega.

Üldjuhul jälgitakse lagundamisprotsessi mitmesuguste parameetrite, nagu DOC, CO<sub>2</sub> eraldumise ja hapniku tarbimise põhjal ja mõõtmisi tehakse nii sageli, et see võimaldab määrata biolagundamise algust ja lõppu. Automaatsete respiromeetrite kasutamisel toimub mõõtmine pidevalt. Lisaks mingile muule parameetrile mõõdetakse vahel DOC-d, kuid tavaliselt tehakse seda ainult katse alguses ja lõpus. Kasutada võib ka spetsiifilist keemilist analüüsi testaine esmase lagunemise ja mis tahes tekkinud vaheühendite kontsentratsiooni määramiseks (nõutav MITI katses).

Üldjuhul on katse pikkus 28 päeva. Katsed võib siiski lõpetada enne 28 päeva möödumist, st kohe, kui biolagundamise graafik on jõudnud platooni ja jäänud sinna vähemalt 3 mõõtmiseks. Katseid võib pikendada ka pikemaks kui 28 päeva, kui graafik näitab, et biolagundumine on alanud, kuid platooni ei ole 28 päeva jooksul jõutud.

### I.5. KVALITEEDINÕUDED

#### I.5.1. Reprodutseeritavus

Biodegradatsiooni ja inokulaadina kasutatud bakteripopulatsioonide iseloomu tõttu tuleks kõiki määramisi teha vähemalt kahe paralleelina.

Kogemus näitab, et mida suurem on katsekeskkonda lisatud mikroorganismide kontsentratsioon, seda väiksemad on korduskatsete vahelised erinevused. Laboritevahelised võrdlused on näidanud ka seda, et eri laborites saadud tulemused võivad erineda üsna palju, kuid tavaliselt saadakse hea biolagunduvusega ühendite puhul üsna sarnased tulemused.



### I.6.1. Lahjendusvesi

Kasutatakse deioniseeritud või destilleeritud vett, mis ei sisalda inhibeerivates kontsentratsioonides mürgiseid aineid (nt  $\text{Cu}^{++}$  ioone). Orgaanilise süsiniku sisaldus ei tohi olla suurem kui 10 % testainest tulenevast orgaanilise süsiniku sisaldusest. Vee kõrge puhtusaste aitab välistada kõrgete tulemuste saamise nullproovidega. Saastus võib tuleneda nii testaines olevatest lisanditest kui ka ioonvahetusvaikudest ja lüüsunud bakteri- või vetikamaterjalist. Igas katseseerias tuleb kasutada ainult samast partiist pärit vett, millele on eelnevalt tehtud DOC analüüs. Kinnise pudeli katses selline analüüs vajalik ei ole, kuid vee hapnikutarve peab olema madal.

### I.6.2. Mineraalainete põhilahused

Katselahuste jaoks valmistatakse sobivate mineraalainete kontsentratsioonidega põhilahused. Järgmised põhilahused sobivad (erinevaid lahjendusastmeid kasutades) DOC kõrvaldamise katse, muudetud OECD sõelkatse,  $\text{CO}_2$  eraldumise katse, manomeetrilise respiromeetria katse ja kinnise pudeli katse jaoks. Lahjendusastmed ja MITI katse mineraalse toitelahuse valmistamisjuhend on esitatud vastavate katsete alapunktides.

*Põhilahused: Analüüsipuhastest reaktiividest valmistatakse järgmised põhilahused.*

- |    |                                                                                         |         |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| a) | Kaaliumdivesinikfosfaat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                       | 8,50 g  |
|    | Dikaaliumvesinikfosfaat, $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                       | 21,75 g |
|    | Dinaatriumvesinikfosfaatdihüdraat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 33,40 g |
|    | Ammooniumkloriid, $\text{NH}_4\text{Cl}$                                                | 0,50 g  |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini. Lahuse pH peaks olema 7,4.          |         |
| b) | Kaltsiumkloriid, veevaba, $\text{CaCl}_2$                                               | 27,50 g |
|    | või kaltsiumkloriididihüdraat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$               | 36,40 g |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini                                      |         |
| c) | Magneesiumsulfaatheptahüdraat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$               | 22,50 g |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini                                      |         |
| d) | Raud(III)kloriidheksahüdraat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$                | 0,25 g  |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.                                     |         |

*Märkus:* vältimaks vajadust valmistada lahus vahetult enne kasutamist, tuleb neile 1 liitri kohta lisada üks tilk konts. vesinikkloriidhapet või 0,4 g etüleendiamiintetraäädikhappe dinaatriumsoola.

### I.6.3. Kemikaalide põhilahused

Juhul kui aine lahustuvus ületab 1 g/l, lahustada vastavalt vajadusele 1–10 g test- või võrdlusainet deioniseeritud vees ja täiendada veega 1 liitrini. Teise võimalusena võib valmistada põhilahuse mineraalses toitelahuses või lisada kemikaali otse mineraalsele toitelahusele. Halvemini lahustuvate kemikaalide käsitlemist vt III lisast, kuid MITI katses (meetod C.4-F) ei tohi kasutada ei lahusteid ega emulgaatoreid.

### I.6.4. Inokulaadid

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, (klooritamata) reovett, pinnavett või mulda või nende segu. DOC kõrvaldamise,  $\text{CO}_2$  eraldumise või manomeetrilise respiromeetria katses aktiivmuda kasutamisel peaks see olema pärit valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimöödus seadmest. Teistest allikatest pärit inokulaatide puhul on ilmnunud tulemuste suurem hajuvus. Muudetud OECD sõelkatse ja kinnise pudeli katse jaoks on vaja lahjemat, mudahelvesteta inokulaati, eelistatav allikas on valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimöödus seadmest väljuv töödeldud reovesi. MITI katse inokulaat valmistatakse mitmete lähtematerjalide segust ja vastav kirjeldus on esitatud konkreetse katse alapunktis.

#### I.6.4.1. *Aktiivmudast saadud inokulaat*

Proov võetakse valdavalt olmereovett töötleva puhastusjaama või laborimõõdus seadme aeratsioonibasseini värskest aktiivmudast. Vajadusel eemaldatakse peene sõelaga filtrimisel jämedad osakesed ja hoitakse muda seejärel aeroobsena.

Teine võimalus on muda pärast jämedate osakeste eemaldamist seotada või tsentrifuugida (näiteks 1 100 g 10 min). Kõrvaldatakse supernatant. Muda võib pesta mineraalse toitelahusega. Kontsentreeritud muda suspendeeritakse mineraalses toitelahuses kontsentratsioonil 3–5 g hõljumit/l ja aereeritakse tarvitamiseni.

Muda tuleks võtta tavapärasest, töökorras puhastusjaamast. Suure koormusega puhastusjaamast pärinevat või inhibiitoreid sisaldada võivat muda tuleks pesta. Pärast põhjalikku segamist resuspendeeritud muda seotatakse või tsentrifuugitakse, kõrvaldatakse supernatant ja resuspendeeritakse muda järgmises koguses mineraalses toitelahuses. Protseduuri korratakse, kuni muda loetakse substraadi liiast või inhibiitorist vabaks.

Täielikult resuspendeeritud või töötlemata mudast võetakse vahetult enne kasutamist proov hõljumi kuivmassi määramiseks.

Veel üks võimalus on aktiivmuda homogeniseerida (3–5 g hõljumit/l). Muda töödeldakse keskmisel kiirusel 2 min mehaanilises segistis. Homogeniseeritud muda seotatakse 30 min või vajadusel kauem ja dekanteeritakse vedelik, mida kasutatakse inokulaadina kontsentratsioonil 10 ml/l mineraalse toitelahuse kohta.

#### I.6.4.2. *Muud inokulaadi allikad*

Inokulaadi võib valmistada valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadme väljuvast töödeldud reoveest. Selleks võetakse värske proov, mida hoitakse transportimisel aeroobsena. Mudal lastakse 1 h seista või filtritakse see läbi jämeda filterpaberi ja hoitakse dekanteeritud vedelik või filtraat kuni tarvitamiseni aeroobsena. Sellist inokulaati võib kasutada kuni 100 ml toitelahuse liitri kohta.

Veel üks võimalik inokulaadi allikas on pinnavesi. Sobivast pinnaveekogust, nt jõest või järvest võetakse proov ja hoitakse seda tarvitamiseni aeroobsena. Vajadusel kontsentreeritakse inokulaati filtrimise või tsentrifuugimise teel.

#### I.6.5. **Inokulaatide kohandamine**

Inokulaate võib lasta kohanduda katsetingimustega, kuid mitte adpteeruda uuritava kemikaaliga. Kohandamine seisneb aktiivmuda aeratsioonis mineraalses toitelahuses või töödeldud reovees katsetemperatuuril 5–7 päeva jooksul. Mõnikord parandab kohandamine katsemeetodite täpsust, vähendades nullproovidega saadavaid tulemusi. MITI inokulaadi kohandamist ei peeta vajalikuks.

#### I.6.6. **Abiootilised kontrollproovid**

Vajadusel kontrollitakse testaine võimalikku abiootilist lagunemist, uurides DOC kõrvaldamist, hapniku tarbimist või süsinikdioksiidi eraldumist steriilsetes inokulaadita kontrollproovides. Proov steriliseeritakse filtrimisel läbi membraani (0,2–0,45 µm) või sobiva mürkaine lisamisel vajalikus kontsentratsioonis. Membraanfiltratsiooni kasutamisel võetakse proovid steriilsuse tagamiseks aseptiliselt. Kui uuritava kemikaali adsorbeerumine ei ole eelnevalt välistatud, tuleb katsetes, kus biolagundumist mõõdetakse DOC kõrvaldamise järgi, eriti aktiivmuda-inokulaatide kasutamisel, kasutada inokuleeritavat ja mürgitatavat abiootilist kontrollproovi.

### 1.6.7. Kolbide arv

Kolbide arv tüüpilises katses on ära toodud iga katse alapunktis.

Kasutada võib järgmisi kombinatsioone:

katsesuspensioon: sisaldab testainet ja inokulaati;

inokulaadi nullproov: sisaldab ainult inokulaati;

protseduuri kontrollproov: sisaldab võrdlusainet ja inokulaati;

abiootiline steriilne kontrollproov: steriilne, sisaldab testainet (vt 1.6.6);

adsorptsiooni kontrollproov: sisaldab testainet, inokulaati ja steriliseerivat ainet;

mürgisuse kontrollproov: sisaldab testainet, võrdlusainet ja inokulaati.

Paralleelmõõtmised katsesuspensiooni ja inokulaadi nullprooviga on kohustuslikud. Soovitav on teha mõõtmised ka ülejäänud paralleelidega.

See ei pruugi aga alati võimalik olla. Tagada tuleb küllaldane proovide või mõõtmiste arv protsentuaalse kõrvaldamise leidmiseks 10-päevase akna kestel.

### 1.7. ANDMED JA HINDAMINE

Protsentuaalse lagunemise ( $D_t$ ) arvutamisel kasutatakse nii katseanuma kui ka inokulaadi nullproovi kordusmõõtmiste keskmisi. Vastavad valemid on sätestatud allpool, konkreetsetele katsetele vastavates alapunktides. Lagunemise käik esitatakse graafiliselt ja näidatakse ära 10-päevane aken. Arvutada ja esitada kõrvaldamisprotsent 10-päevase akna lõpus ja väärtus platool või katse lõpus, vastavalt vajadusele.

Respiromeetrites katsetes võivad lämmastikku sisaldavad ühendid nitrifikatsiooni kaudu mõjutada hapniku tarbimist (vt II ja V lisa).

#### 1.7.1. DOC määramise põhjal mõõdetud lagunemine

Katse kehtivuse hindamiseks tuleks testainet sisaldavate kolbide kohta eraldi arvutada protsentuaalne lagunemine ( $D_t$ ) igal proovi võtmise hetkel, kasutades DOC topelmõõtmiste keskmisi väärtusi (vt 1.5.2). See arvutatakse järgmise võrrandi abil:

$$D_t = \left( 1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

kus:

$D_t$  = lagunemisprotsent ajahetkel  $t$ ,

$C_o$  = DOC keskmine algkontsentratsioon testainet sisaldavas inokuleeritud toitelahuses (mg DOC/l),

$C_t$  = DOC keskmine kontsentratsioon testainet sisaldavas inokuleeritud toitelahuses ajahetkel  $t$  (mg DOC/l),

$C_{bo}$  = DOC keskmine algkontsentratsioon substraadivabas inokuleeritud mineraalses toitelahuses (mg DOC/l),

$C_{bt}$  = DOC keskmine kontsentratsioon substraadivabas inokuleeritud mineraalses toitelahuses ajahetkel  $t$  (mg DOC/l).

Kõik kontsentratsioonid määratakse katseliselt.

### I.7.2. Spetsiifilise analüüsi põhjal mõõdetud lagunemine

Kui on olemas spetsiifilise analüüsi andmed, arvutatakse esmane biolagunemine valemist:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kus:

$D_t$  = lagunemisprotsent ajahetkel  $t$ , üldjuhul 28 päeva möödumisel,

$S_a$  = testaine jääk inokuleeritud toitelahuses katse lõpul (mg),

$S_b$  = testaine jääk pimekatse vee/toitelahusega, kuhu on lisatud ainult testaine (mg)

### I.7.3. Abiootiline lagunemine

Abiootilise steriilse kontrollproovi kasutamisel arvutatakse protsentuaalne abiootiline lagunemine valemist:

$$\text{protsentuaalne abiootiline lagunemine} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kus

$C_{s(o)}$  = DOC kontsentratsioon steriilses kontrollproovis 0-päeval,

$C_{s(t)}$  = DOC kontsentratsioon steriilses kontrollproovis päeval  $t$ .

### I.8. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- test- ja võrdlusaineid ning nende puhtusastet,
- katsetingimusi,
- inokulaadi kohta: tüüpi ja päritolu, kontsentratsiooni ja kohandamist, kui seda kasutati,
- tööstuslike heitmete osakaalu ja iseloomu reovees, kui see on teada,
- katse kestust ja temperatuuri,
- vahelahustuvate testainete puhul nende käsitlemise meetodeid,
- kasutatud katsemeetodit; meetodi mis tahes muudatusi tuleb teaduslikult põhjendada ja seletada,
- andmeid,
- kõiki täheldatud inhibitsiooninähte,
- abiootilist lagunemist, kui seda täheldati,
- spetsiifilise keemilise analüüsi andmeid, kui neid on,
- vaheühendite analüüsiandmeid, kui neid analüüsiti,
- test- ja võrdlusainete protsentuaalse lagunemise graafikut ajas; selgelt tuleks näidata ootefaas, lagunemisfaas, 10-päevane aken ja tõus (I lisa). Kui katse vastab kvaliteedinõuetele, võib graafikul kasutada testainet sisaldavate kolbide lagunemisprotsentide keskmist väärtust,
- lagunemisprotsenti 10-päevase akna lõpus ja platool või katse lõpus.

**II OSA. DOC KÕRVALDAMISE KATSE** (Meetod C.4-A)**II.1. PÕHIMÕTE**

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–40 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, aereeritakse pimedas või hajutatud valguse käes  $22 \pm 2$  °C juures.

Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul sagedaste DOC analüüsidega. Arvutatakse biolagundumise määr, väljendades kõrvaldatud DOC kontsentratsiooni (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) protsendina algkontsentratsioonist. Esmase biolagundumise määra võib arvutada ka inokuleerimise algul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal.

**II.2. MEETODI KIRJELDUS****II.2.1. Seade**

- a) koonilised kolvid, mahuga nt 250 ml – 2 l, olenevalt DOC analüüsiks vajalikust mahust;
- b) kooniliste kolbide loksutusseade, mis on termostateeritud või asub püsiva temperatuuriga ruumis ja on piisava võimsusega aeroobsete tingimuste tagamiseks kõigis kolbides;
- c) sobivate membraanidega filtrimiseseade;
- d) DOC analüsaator;
- e) lahustunud hapniku määramise seade;
- f) tsentrifuug.

**II.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahjendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitrini.

**II.2.3. Inokulaadi valmistamine ja kohandamine**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda; reovett; pinnavett või mulda või nende segu.

Vaata punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

**II.2.4. Kolbide ettevalmistamine**

Näiteks viiakse 800 ml kogused mineraalset toitelahust 2 l koonilistesse kolbidesse ning lisatakse eri kolbidesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid, nii et saadakse kemikaalikesksentratsioon, mis vastab 10–40 mg DOC-ile liitris. Kontrollitakse pH väärtusi ja viiakse need vajadusel 7,4-ni. Kolvid inokuleeritakse aktiivmuda või muud päritolu inokulaadiga (vt I.6.4), lõpliku hõljumi kontsentratsiooniga kuni 30 mg/l. Valmistatakse ka inokulaadi kontrollproovid mineraalse toitelahusega, kuid ilma test- või võrdlusaineta.

Vajadusel kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, inokuleerides võrreldavate kontsentratsioonidega test- ja võrdlusaine lahuse mineraalses toitelahuses.

Vajadusel kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6).

Kui arvatakse, et testaine võib olulisel määral adsorbeeruda klaasil, mudal jne, tehakse eelkatse, kus hinnatakse adsorptsiooni tõenäolist ulatust ja seega ka katse sobivust antud ainele (vaata tabelit 1). Selleks valmistatakse ette kolb testaine, inokulaadi ja steriliseeriva ainega.

Lahused kõigis kolbides täiendatakse mineraalse toitelahusega 1 liitrini ja võetakse pärast segamist igast kolvist DOC algkontsentratsiooni määramiseks proov (vaata lisa II.4). Kolbide avad kaetakse nt alumiinium-fooliumiga nii, et see ei takista õhu vaba liikumist kolvi ja ümbritseva atmosfääri vahel. Seejärel asetatakse kolvid katse alustamiseks loksutisse.

#### II.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov

Kolb 5: protseduuri kontrollproov

Eelistatavalt ja vajadusel:

Kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov

Kolb 7: adsorptsiooni kontrollproov

Kolb 8: mürgisuse kontrollproov

Vaata ka punkti I.6.7.

#### II.2.6. **Katse tegemine**

Kogu katse kestel määratakse igas kolvis kindlate ajavahemike järel DOC kontsentratsioon, piisava sagedusega 10-päevase akna alguse määramiseks ja protsentuaalse kõrvaldamise määramiseks 10-päevase akna lõpus. Igaks määramiseks võetakse ainult minimaalne vajalik kogus katsesuspensiooni.

Enne proovide võtmist korvatakse vajadusel aurustumiskaod kolbides vajaliku koguse lahjendusvee lisamisega (I.6.1). Segu segatakse enne proovi võtmist hoolikalt ja veendudakse, et nõu seintele sadestunud materjal enne proovi võtmist lahustub või suspendeerub. Kohe pärast võtmist proovid membraan-filtreeritakse või tsentrifuugitakse (vaata lisa II.4). Filtritud või tsentrifuugitud proovid analüüsitakse samal päeval või säilitatakse 2–4 °C juures kuni 48 tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

#### II.3. **ANDMED JA ARUANDLUS**

##### II.3.1. **Tulemuste käsitlemine**

Protsentuaalne lagunemine ajahetkel t arvutatakse punktis I.7.1 (DOC määramine) ja vajadusel ka punktis I.7.2 (spetsiifiline analüüs) kirjeldatud moel.

Kõik tulemused esitatakse etteantud andmetabelis.

##### II.3.2. **Tulemuste kehtivus**

Vaata punkti I.5.2.

##### II.3.3. **Aruandlus**

Vaata punkti I.8.

## II.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

**DOC KÕRVALDAMISE KATSE**1. **LABOR**2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV**3. **TESTAINE**

Nimi:

põhilahuse kontsentratsioon:... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses,  $t_0$ ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

4. **INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus:... mg/l

5. **SÜSINIKU MÄÄRAMINE**

Süsinikuanalüsaator:

|                                   | Kolvi nr                                    |                        | DOC n päeva möödumisel (mg/l) |       |       |       |       |
|-----------------------------------|---------------------------------------------|------------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                                   |                                             |                        | 0                             | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Testaine koos inokulaadiga        | 1                                           | $a_1$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | $a_2$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | a, keskmine $C_{a(t)}$ |                               |       |       |       |       |
|                                   | 2                                           | $b_1$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | $b_2$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | b, keskmine $C_{b(t)}$ |                               |       |       |       |       |
| Inokulaadi nullproovid testaineta | 3                                           | $c_1$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | $c_2$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | c, keskmine $C_{c(t)}$ |                               |       |       |       |       |
|                                   | 4                                           | $d_1$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | $d_2$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | d, keskmine $C_{d(t)}$ |                               |       |       |       |       |
|                                   | $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ |                        |                               |       |       |       |       |

## 6. TÖÖTLEMATA ANDMETE HINDAMINE

| Kolvi nr                  |                                                                                       | Lagunemisprotsent n päeva möödumisel |                |                |                |                |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                           |                                                                                       | 0                                    | n <sub>1</sub> | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> | n <sub>x</sub> |
| 1                         | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0                                    |                |                |                |                |
| 2                         | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0                                    |                |                |                |                |
| Keskmine ( <sup>1</sup> ) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$                                                             | 0                                    |                |                |                |                |

(<sup>1</sup>) D<sub>1</sub> ja D<sub>2</sub> ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

Märkus: võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

## 7. ABIOTILINE KONTROLLPROOV (pole kohustuslik)

|                                              | Aeg (päevades)    |                   |
|----------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                              | 0                 | t                 |
| DOC konts. steriilses kontrollproovis (mg/l) | C <sub>s(o)</sub> | C <sub>s(t)</sub> |

$$\text{Protsentuaalne abiotiline lagunemine} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

## 8. SPETSIFIILINE KEEMILINE ANALÜÜS (pole kohustuslik)

|                          | Testaine jääk katse lõpus (mg/l) | Esmase lagunemise %                |
|--------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Steriilne kontrollproov  | S <sub>b</sub>                   |                                    |
| Inokuleeritud toitelahus | S <sub>a</sub>                   | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

## III OSA. MUUDETUD OECD SÕELKATSE (Meetod C.4-B)

## III.1. PÕHIMÖTE

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–40 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, inokuleeritakse 0,5 ml reoveega liitri lahuse kohta. Seejärel aereeritakse segu pimedas või hajutatud valguse käes 22 ± 2 °C juures.

Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul sagedaste DOC analüüsides. Arvutatakse biolagundumise määr, väljendades kõrvaldatud DOC kontsentratsiooni (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) protsendina algkontsentratsioonist. Esmase biolagundumise määra võib arvutada ka inkubeerimise algul ja lõpul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal.

## III.2. MEETODI KIRJELDUS

## III.2.1. Seade

- a) koonilised kolvid, mahuga nt 250 ml – 2 l, olenevalt DOC analüüsiks vajalikust mahust;
- b) kooniliste kolvide loksutusseade, mis on termostateeritud või asub püsiva temperatuuriga ruumis ja on piisava võimsusega aeroobsete tingimuste tagamiseks kõigis kolvides;
- c) sobivate membraanidega filtrimisseade;
- d) DOC analüsaator;
- e) lahustunud hapniku määramise seade;
- f) tsentrifuug.

## III.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust (a) segatakse 80 ml lahendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b) kuni d) ja täiendatakse veega 1 liitrini.

Selles meetodis kasutatakse ainult 0,5 ml inokulaati liitri kohta, mistõttu võib olla vaja lisada toitelahusele mikroelemente ja kasvutegureid. Selleks lisatakse liitri lõpliku toitelahuse kohta 1 ml igast järgmisest lahusest:

Mikroelementide lahus:

|                                                                        |          |
|------------------------------------------------------------------------|----------|
| Mangaansulfaattetraahüdraat, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 39,9 mg  |
| Boorhape, $\text{H}_3\text{BO}_3$                                      | 57,2 mg  |
| Tsinksulfaatheptahüdraat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$    | 42,8 mg  |
| Ammooniumheptamolüüdaat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$     | 34,7 mg  |
| Fe-kelaat ( $\text{FeCl}_3$ -etüleendiamiintetraäädikhape)             | 100,0 mg |
| Lahustatakse vees ja täiendatakse lahendusveega 1 liitrini             |          |

Vitamiinilahus:

|               |         |
|---------------|---------|
| Pärmiekstrakt | 15,0 mg |
|---------------|---------|

Pärmiekstrakt lahustatakse 100 ml vees. Lahus steriliseeritakse filtrimisel läbi 0,2 µm membraani või valmistatakse vahetult enne kasutamist.

## III.2.3. Inokulaadi valmistamine ja kohandamine

Inokulaadi võib valmistada valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest väljuvast töödeldud reoveest. Vaata punkte I.6.4.2 ja I.6.5.

Kasutatav kogus on 0,5 ml ühe liitri mineraalse toitelahuse kohta.

## III.2.4. Kolvide ettevalmistamine

Näiteks viiakse 800 ml kogused mineraalset toitelahust 2 l koonilistesse kolvidesse ning lisatakse eri kolvidesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid, nii et saadakse kemikaalikontsentratsioon, mis vastab 10–40 mg DOC-ile liitris. Kontrollitakse pH väärtust ja viiakse see vajadusel 7,4-ni. Kolvid inokuleeritakse 0,5 ml reovee lisamisega liitri kohta (vt I.6.4.2). Valmistatakse ka inokulaadi kontrollproovid mineraalse toitelahusega, kuid ilma test- või võrdlusaineta.

Vajadusel kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, inokuleerides võrreldavate kontsentratsioonidega test- ja võrdlusaine lahuse mineraalses toitelahuses. Vajadusel kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6).

Kui arvatakse, et testaine võib olulisel määral adsorbeeruda klaasil, mudal jne, tehakse eelkatse, kus hinnatakse adsorptsiooni tõenäolist ulatust ja seega ka katse sobivust antud ainele (vaata tabelit 1). Selleks valmistatakse ette kolb testaine, inokulaadi ja steriliseeriva ainega.

Lahused kõigis kolbides täiendatakse mineraalse toitelahusega 1 liitrini ja võetakse pärast segamist igast kolvist DOC algkontsentratsiooni määramiseks proov (vaata lisa II.4). Kolbide avad kaetakse näiteks alumiiniumfooliumiga nii, et see ei takista õhu vaba liikumist kolvi ja ümbritseva atmosfääri vahel. Seejärel asetatakse kolvid katse alustamiseks loksutisse.

### III.2.5. Kolbide arv tüüpilises katses

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov

Kolb 5: protseduuri kontrollproov

Eelistatavalt ja vajadusel:

Kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov

Kolb 7: adsorptsiooni kontrollproov

Kolb 8: mürgisuse kontrollproov

Vaata ka punkti I.6.7.

### III.2.6. Katse tegemine

Kogu katse kestel määratakse igas kolvis kindlate ajavahemike järel DOC kontsentratsioon, piisava sagedusega 10-päevase akna alguse määramiseks ja protsentuaalse kõrvaldamise määramiseks 10-päevase akna lõpus. Igaks määramiseks võetakse ainult minimaalne vajalik kogus katsesuspensiooni.

Enne proovide võtmist korvatakse vajadusel aurustumiskaod kolbides vajaliku koguse lahjendusvee lisamisega (I.6.1). Segu segatakse enne proovi võtmist hoolikalt ja veendutakse, et nõu seintele sadestunud materjal enne proovi võtmist lahustub või suspendeerub. Kohe pärast võtmist proovid membraan-filtreeritakse või tsentrifuugitakse (vaata lisa II.4). Filtritud või tsentrifuugitud proovid analüüsitakse samal päeval või säilitatakse 2–4 °C juures kuni 48 tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

### III.3. ANDMED JA ARUANDLUS

#### III.3.1. Tulemuste käsitlemine

Protsentuaalne lagunemine ajahetkel  $t$  arvutatakse punktis I.7.1 (DOC määramine) ja vajadusel ka punktis I.7.2 (spetsiifiline analüüs) kirjeldatud moel.

Kõik tulemused esitatakse etteantud andmetabelis.

#### III.3.2. Tulemuste kehtivus

Vaata punkti I.5.2.

#### III.3.3. Aruandlus

Vaata punkti I.8.

## III.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

**MUDETUD OECD SÕELKATSE****1. LABOR****2. KATSE ALGUSKUUPÄEV****3. TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon:... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses,  $t_0$ ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

**4. INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus:... mg/l

**5. SÜSINIKU MÄÄRAMINE**

Süsinikuanalüsaator:

|                                   | Kolvi nr                                    |                        | DOC n päeva möödumisel (mg/l) |       |       |       |       |
|-----------------------------------|---------------------------------------------|------------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                                   |                                             |                        | 0                             | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Testaine koos inokulaadiga        | 1                                           | $a_1$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | $a_2$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | a, keskmine $C_{a(t)}$ |                               |       |       |       |       |
|                                   | 2                                           | $b_1$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | $b_2$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | b, keskmine $C_{b(t)}$ |                               |       |       |       |       |
| Inokulaadi nullproovid testaineta | 3                                           | $c_1$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | $c_2$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | c, keskmine $C_{c(t)}$ |                               |       |       |       |       |
|                                   | 4                                           | $d_1$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | $d_2$                  |                               |       |       |       |       |
|                                   |                                             | d, keskmine $C_{d(t)}$ |                               |       |       |       |       |
|                                   | $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ |                        |                               |       |       |       |       |

## 6. TÖÖTLEMATA ANDMETE HINDAMINE

| Kolvi nr                  |                                                                                       | Lagunemisprotsent n päeva möödumisel |                |                |                |                |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                           |                                                                                       | 0                                    | n <sub>1</sub> | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> | n <sub>x</sub> |
| 1                         | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0                                    |                |                |                |                |
| 2                         | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0                                    |                |                |                |                |
| Keskmine ( <sup>1</sup> ) | $D = \frac{D_1 + D_2}{2}$                                                             | 0                                    |                |                |                |                |

(<sup>1</sup>) D<sub>1</sub> ja D<sub>2</sub> ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

Märkus: võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

## 7. ABIOTILINE KONTROLLPROOV (pole kohustuslik)

|                                              | Aeg (päevades)    |                   |
|----------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                              | 0                 | t                 |
| DOC konts. steriilses kontrollproovis (mg/l) | C <sub>s(o)</sub> | C <sub>s(t)</sub> |

$$\text{Protsentuaalne abiotiline lagunemine} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

## 8. SPETSIIFILINE KEEMILINE ANALÜÜS (pole kohustuslik)

|                          | Testaine jääk katse lõpus | Esmase lagunemise %                |
|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| Steriilne kontrollproov  | S <sub>b</sub>            |                                    |
| Inokuleeritud toitelahus | S <sub>a</sub>            | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

IV OSA. **CO<sub>2</sub> ERALDUMISE KATSE** (Meetod C.4-C)

## IV.1. PÕHIMÕTE

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–20 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, aereeritakse süsinikdioksiidivaba õhu läbipuhumisega kindlal kiirusel pimedas või hajutatud valguse käes. Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul eralduva CO<sub>2</sub> määramise abil, viimane püütakse baarium- või naatriumhüdroksiidi ja mõõdetakse hüdroksiidi jäägi tiitrimise või anorgaanilise süsiniku määramise teel. Testainest tekkiv süsinikdioksiidi kogus (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina ThCO<sub>2</sub>-st. Biolagundumise määra võib arvutada ka inkubeerimise algul tehtud täiendava DOC analüüsi põhjal.

## IV.2. MEETODI KIRJELDUS

IV.2.1. **Seadmed**

- a) 2–5-liitrised kolvid peaaegu põhjani ulatuva aeratsioonitoru ja väljaviiguga;
- b) vahelahustuvate ainete uurimisel magnetsegajad;
- c) gaasipüüdurpudelid;
- d) õhuvoolu reguleerimis- ja mõõteseade;
- e) seade süsinikdioksiidi väljapesemiseks süsinikdioksiidivaba õhu valmistamiseks; teise võimalusena võib kasutada õiges vahekorras segu (20 % O<sub>2</sub>; 80 % N<sub>2</sub>) CO<sub>2</sub>-vabast balloonihapnikust ja CO<sub>2</sub>-vabast ballooniämmastikust;
- f) seade süsinikdioksiidi määramiseks kas tiitrimetriliselt või mis tahes põhimõttel töötava anorgaanilise süsiniku analüsaatori abil;
- g) membraanfiltratsiooniseade (ei ole kohustuslik);
- h) DOC analüsaator (ei ole kohustuslik).

IV.2.2. **Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahjendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitrini.

IV.2.3. **Inokulaadi valmistamine ja kohandamine**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, reovett, pinnavett või mulda või nende segu.

Vaata punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

IV.2.4. **Kolbide ettevalmistamine**

Järgmises näites on esitatud mahulised kogused ja kaalutised 5-liitriste kolbide jaoks 3 l suspensiooniga. Väiksemate koguste kasutamisel võib koguseid vastavalt muuta, kuid tagada tuleb täpseks mõõtmiseks piisav süsinikdioksiidi eraldumine.

Igasse 5-liitrisesse kolbi lisatakse 2 400 ml mineraalset toitelahust. Seejärel lisatakse sobiv kogus ettevalmistatud aktiivmuda (vt I.6.4.1 ja I.6.5) nii, et hõljumi kontsentratsioon lõplikus 3 liitris inokuleeritud segus ei ületa 30 mg/l.

Teise võimalusena võib ettevalmistatud muda kõigepealt lahjendada mineraalse toitelahusega nii, et saadakse suspensioon kontsentratsiooniga 500–1 000 mg/l, misjärel lisatakse sellest kindel kogus 5-liitrisesse kolbi nii, et saadakse lõppkontsentratsioon 30 mg/l; nõnda tagatakse suurem täpsus. Kasutada võib muid inokulaadi allikaid (vt I.6.4.2).

Inokuleeritud segusid aereeritakse üleöö CO<sub>2</sub>-vaba õhuga, et puhastada süsteem süsinikdioksiidist.

Eraldi paralleelkolbidele lisatakse kindla koguse põhilahuse näol test- ja võrdlusaine nii, et neist tulenev DOC või TOC kontsentratsioon on 10–20 mg/l; mõned kolvid jäetakse kemikaalita inokulaadi kontrollproovideks. Vahelahustuvad testained lisatakse massi või mahu järgi otse kolbi või neid käsitsetakse III lisas kirjeldatud moel.

Vajadusel kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, lisades kolbi ülejäänud kolbidega võrdses kontsentratsioonis nii test- kui ka võrdlusainet.

Vajadusel kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6). Proov steriliseeritakse sobivas kontsentratsioonis mürkaine lisamisega.

Enne seda täiendatakse suspensioonid kõigis kolmes kolvis CO<sub>2</sub>-vaba õhuga aereeritud mineraalse toitelahusega 3 liitrini. Lisaks võib võtta proove DOC analüüsiks (vt lisa II.4) ja/või spetsiifiliseks analüüsiks. Pesupudelid ühendatakse kolbide väljaviiguga.

Baariumhüdroksiidi kasutamisel ühendatakse iga 5-liitrise kolviga järjestikku kolm pesupudelit, millest igaüks on 100 ml 0,0125 M baariumhüdroksiidilahust. Lahus ei tohi sisaldada sulfaadi ja karbonaadi sadet ja selle kontsentratsioon tuleb määrata vahetult enne kasutamist. Naatriumhüdroksiidi kasutamisel ühendatakse järjestikku kaks püüdurit, kusjuures teine on kontrollpüüdur, mis peab näitama, kas esimene absorbeeris kogu süsinikdioksiidi. Sobivad ka seerumipudeli sulguriga pesupudelid. Igasse pudelisse lisatakse 200 ml 0,05 M naatriumhüdroksiidi, mis on küllaldane kogu testaine täielikul lagunemisel tekkiva süsinikdioksiidi absorbeerimiseks. Isegi vahetult enne kasutamist valmistatud naatriumhüdroksiidi lahus sisaldab väikestes kogustes karbonaate, vastav viga korrigeeritakse nullproovi karbonaadikoguse lahutamise-ga.

#### IV.2.5. Kolbide arv tüüpilises katses

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov

Kolb 5: protseduuri kontrollproov

ning eelistatavalt ja vajadusel:

kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov

Kolb 7: mürgisuse kontrollproov

Kolb 8: mürgisuse kontrollproov

Vt ka punkti I.6.7.

#### IV.2.6. Katse tegemine

Katset alustatakse CO<sub>2</sub>-vaba õhu juhtimisega läbi suspensioonide kiirusega 30–100 ml/min. Süsinikdioksiidi absorbendist võetakse CO<sub>2</sub> sisalduse määramiseks regulaarselt proove. Esimese kümne päeva jooksul on soovitatav teha analüüse iga kahe või kolme päeva tagant, seejärel iga viie päeva tagant kuni 28. päevani, nii et saab määrata 10-päevase aknaperioodi.

28. päeval võetakse proovid DOC ja spetsiifilise analüüsi jaoks (kui neid tehakse), mõõdetakse suspensioonide pH ja lisatakse igasse kolbi 1 ml kontsentreeritud vesinikkloriidhapet; kolbe aereeritakse üleöö, et kõrvaldada suspensioonides olev süsinikdioksiid. 29. päeval tehakse viimane eralduva süsinikdioksiidi analüüs.

CO<sub>2</sub> mõõtmise päevadel eemaldatakse kõige kolvipoolsem baariumhüdroksiidiga pesupudel ja tiitritakse hüdroksiidilahust 0,05 M HCl-ga, kasutades indikaatorina fenoolftaleiini. Ülejäänud pesupudelid nihutatakse ühe koha võrra kolvile lähemale ja paigutatakse kaugemasse otsa uus pesupudel 100 ml värske 0,0125 M baariumhüdroksiidiga. Tiitrimisi tehakse kas vastavalt vajadusele, näiteks siis, kui esimeses püüduris täheldatakse märgatavat sadet ja enne sademe teket teises pudelis või vähemalt kord nädalas. NaOH kasutamisel absorbendina võetakse süstlaga väike proov (mille suurus sõltub kasutatavast süsinikuanalüsaatorist) kolvipoolses pesupudelis olevast naatriumhüdroksiidilahusest. Proov süstitakse eraldunud süsinikdioksiidi otseseks määramiseks süsinikuanalüsaatori anorgaanilise süsiniku määrajasse.

Teise püüduri sisu analüüsitakse alles katse lõpus, et vajadusel lisada arvutustesse läbikandunud süsinikdioksiidi arvestav parandus.

#### IV.3. ANDMED JA ARUANDLUS

##### IV.3.1. Tulemuste käsitlemine

Püüdurisse kogutud CO<sub>2</sub> kogus leitakse tiitrimisel järgmise valemi järgi:

$$\text{mgCO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

kus:

V = 100 ml absorbeerimislahuse tiitrimiseks kulunud HCl maht (ml),

C<sub>B</sub> = baariumhüdroksiidilahuse kontsentratsioon (M),

C<sub>A</sub> = vesinikkloriidhappelahuse kontsentratsioon (M),

kui C<sub>B</sub> on 0,0125 M ja C<sub>A</sub> on 0,05 M, kulub 100 ml baariumhüdroksiidi tiitrimiseks 50 ml lahust ja CO<sub>2</sub> mass leitakse järgmisest valemist:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{tiitrimiseks kulunud HCl (ml)} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Seega on teisendustegur tekkinud CO<sub>2</sub> massi (mg) arvutamisel tiitrimisel kulunud HCl mahust (ml) 1,1.

Vastavate tiitrimisandmete põhjal arvutatakse ainult inokulaadist tekkiva CO<sub>2</sub> ning inokulaadi ja testaine segust tekkiva CO<sub>2</sub> massid, nende vahe ongi ainult testainest tekkiva CO<sub>2</sub> mass.

Näiteks kui inokulaadiga kulub tiitrimisele 48 ml ning inokulaadi ja testaine seguga 45 ml,

$$\text{CO}_2 \text{ inokulaadist} = 1,1 \times (50 - 48) = 2,2 \text{ mg}$$

$$\text{CO}_2 \text{ inokulaadi ja testaine segust} = 1,1 \times (50 - 45) = 5,5 \text{ mg}$$

on testainest tekkiva CO<sub>2</sub> mass 3,3 mg.

Biolagundumise protsent arvutatakse valemist:

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{eralduva CO}_2 \text{ mass (mg)} \times 100}{\text{ThCO}_2 \times \text{lisatud testainemass (mg)}}$$

või

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{eralduva CO}_2 \text{ mass (mg)} \times 100}{\text{katses lisatud TOC (mg)} \times 3,67}$$

kus 3,67 on teisendustegur (44/12) üleminekul süsiniku massilt süsinikdioksiidi massile.

Lagunemisprotsent mis tahes ajavahemiku järel leitakse kõigi mõõtmispäevale eelnevate päevade kohta arvatud protsentuaalsete  $\text{ThCO}_2$  väärtuste liitmisel.

Naatriumhüdroksiidiga absorbeerimisel arvutatakse tekkinud süsinikdioksiidi kogus, väljendatuna anorgaanilise süsinikuna (IC) milligrammides, korrutades IC kontsentratsiooni absorbendis absorbendi mahuga.

Lagunemisprotsent arvutatakse valemist:

$$\% \text{ThCO}_2 = \frac{\text{IC katsekolvi st (mg)} - \text{ICnullproovi st (mg)}}{\text{Katseainet a lisatud TOC(mg)}} \times 100$$

DOC kõrvaldamise võib arvutada vastavalt punktile I.7. Need ja kõik ülejäänud tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

#### IV.3.2. Tulemuste kehtivus

Katseaine – mineraalse toitelahuse suspensiooni anorgaanilise süsiniku sisaldus katse algul peab olema vähem kui 5 % süsiniku üldsisaldusest (TC) ja eraldunud  $\text{CO}_2$  summaarne kogus inokulaadiga nullproovi puhul ei tohiks katse lõpul üldjuhul ületada 40 mg/l lahuse kohta. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 70 mg  $\text{CO}_2$ /l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata.

Vt ka punkti I.5.2.

#### IV.3.3. Aruandlus

Vt punkti I.8.

#### IV.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

### SÜSINIKDIOKSIIDI ERALDUMISE KATSE

#### 1. LABOR

#### 2. KATSE ALGUSKUUPÄEV

#### 3. TESTAINE

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon:... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkonts. toitelahuses:... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Kolbi lisatud süsiniku koguhulk:...mg C

$\text{ThCO}_2$ :...mg  $\text{CO}_2$

#### 4. INOKULAAT

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus:... mg/l

## 5. SÜSINIKDIOKSIIDI ERALDUMINE JA LAGUNDUVUS

Meetod: Ba(OH)<sub>2</sub>/NaOH/muu

| Aeg<br>(päevades) | Tekkinud CO <sub>2</sub><br>katselahus (mg) |          | Tekkinud CO <sub>2</sub><br>nullproov (mg) |          | Tekkinud CO <sub>2</sub><br>kumulatiivne<br>(mg) (katselahuse<br>ja nullproovi<br>vahe keskmine) |   | ThCO <sub>2</sub><br>$\frac{\text{kumulatiivne CO}_2}{\text{ThCO}_2} \times 100$ |   |          |
|-------------------|---------------------------------------------|----------|--------------------------------------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------|---|----------|
|                   | 1                                           | keskmine | 3                                          | keskmine | 1                                                                                                | 2 | 1                                                                                | 2 | keskmine |
|                   | 2                                           |          | 4                                          |          |                                                                                                  |   |                                                                                  |   |          |
| 0                 |                                             |          |                                            |          |                                                                                                  |   |                                                                                  |   |          |
| n <sub>1</sub>    |                                             |          |                                            |          |                                                                                                  |   |                                                                                  |   |          |
| n <sub>2</sub>    |                                             |          |                                            |          |                                                                                                  |   |                                                                                  |   |          |
| n <sub>3</sub>    |                                             |          |                                            |          |                                                                                                  |   |                                                                                  |   |          |
|                   |                                             |          |                                            |          |                                                                                                  |   |                                                                                  |   |          |
|                   |                                             |          |                                            |          |                                                                                                  |   |                                                                                  |   |          |
| 28                |                                             |          |                                            |          |                                                                                                  |   |                                                                                  |   |          |

Märkus: võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabelleid.

## 6. SÜSINIKU ANALÜÜS (pole kohustuslik)

Süsinikuanalüsaator:

| Aeg (päevades)                      | Nullproov (mg/l)  | Testaine (mg/l) |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------|
| 0                                   | C <sub>b(o)</sub> | C <sub>o</sub>  |
| 28 (l)                              | C <sub>b(t)</sub> | C <sub>t</sub>  |
| (l) või inkubatsiooniperioodi lõpus |                   |                 |

$$\text{DOC kõrvaldamisprotsent} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

## 7. ABIOTILISE LAGUNEMISE KATSE (pole kohustuslik)

$$\text{abiotilise lagunemise \%} = \frac{\text{CO}_2 - \text{CO}_2 \text{ teke steriilses kolvis 28 päeva jarel (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

**V OSA. MANOMEETRILISE RESPIROMEETRIA KATSE** (Meetod C.4-D)**V.1. PÕHIMÕTE**

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (100 mg/l testainet, ThOD-ga vähemalt 50–100 mg/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, segatakse kuni 28 päeva kinnises kolvis konstantsel temperatuuril (kõikumisega  $\pm 1$  °C või alla selle). Hapniku tarbimine määratakse kas konstantse gaasiruumala hoidmiseks vajaliku (elektrolüüsil saadud) hapniku koguse mõõtmisel või ruumala või rõhu (või mõlema) muutuse järgi seadmes. Tekkiv süsinikdioksiid absorbeeritakse kaaliumhüdrosiidi või muu sobiva absorbendi lahuses. Testaine hapnikutarve (mida on parandatud paralleelse inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina ThOD-st või KHT-st. Lisaks võib inkubeerimise algul ja lõpul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal arvutada ka esmase biolagundumise määra ja DOC analüüsi põhjal lõpliku biolagundumise määra.

**V.2. MEETODI KIRJELDUS****V.2.1. Seadmed**

- a) sobiv respiromeeter;
- b) termostaat täpsusega  $\pm 1$  °C või täpsem;
- c) membraanfiltratsiooni seade (pole kohustuslik);
- d) süsinikuanalüsaator (pole kohustuslik).

**V.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahjendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitriini.

**V.2.3. Inokulaadi valmistamine ja kohandamine**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, reovett, pinnavett ja mulda või nende segu.

Vt punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

**V.2.4. Kolbide ettevalmistamine**

Põhilahustest valmistatakse eraldi test- ja võrdlusainete lahused mineraalses toitelahuses, üldjuhul kontsentratsiooniga 100 mg kemikaali/liitris (ThOD-ga vähemalt 50–100 mg/l).

ThOD arvutatakse ammooniumisoolade moodustumise põhjal, välja arvatud juhul, kui eeldatakse nitrifikatsiooni toimumist, sel juhul eeldatakse arvutustes nitraadi moodustumist (vt lisa II.2).

Kontrollitakse pH väärtusi ja viiakse need vajadusel  $7,4 \pm 0,2$ -ni.

Vähelahustuvad ained tuleks lisada hilisemas faasis (vt allpool).

Testaine mürgisuse kontrollimisel valmistatakse ette veel üks lahus, mis sisaldab üksikute lahustega võrdses kontsentratsioonis nii test- kui ka võrdlusainet.

Kui on vaja määrata füüsikalise-keemiline hapnikutarve, valmistatakse testaine lahus ThOD-ga üldjuhul 100 mg/l, mis steriliseeritakse sobiva mürkaine lisamisega (vt I.6.6).

Vähemalt kahtedesse paralleelkolbidesse lisatakse vajalikud kogused test- ja võrdlusainete lahuseid. Täiendavad kolvid valmistatakse ette ainult mineraalse toitelahusega (inokulaadi kontrollproovid) ning vajadusel test- ja võrdlusaine seguga ja steriilse lahusega.

Väheahustuvad testained lisatakse selles faasis massi või mahu järgi otse kolbi või neid käsitsetakse III lisas kirjeldatud moel. CO<sub>2</sub> püüduuri kambritesse lisatakse kaaliumhüdroksiidi, naatronlubja graanuleid või muud absorbenti.

#### V.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov

Kolb 5: protseduuri kontrollproov

Eelistatavalt ja vajadusel:

kolb 6: steriilne kontrollproov

Kolb 7: mürgisuse kontrollproov

Kolb 8: mürgisuse kontrollproov

Vt ka punkti I.6.7.

#### V.2.6. **Katse tegemine**

Kolbidel lastakse jõuda soovitud temperatuurini ning asjaomased kolvid inokuleeritakse ettevalmistatud aktiivmuda või muud päritolu inokulaadiga lõpliku hõljumi kontsentratsiooniga kuni 30 mg/l. Katseaparatuur pannakse kokku, käivitatakse segaja ning kontrollitakse seadme hermeetilisust ja alustatakse hapnikutarbe mõõtmist. Üldjuhul ei ole vaja katseaparatuuri rohkem jälgida, välja arvatud vajalike tulemuste registreerimine ja igapäevase temperatuuri- ja segamisrežiimi kontrollimine.

Hapnikutarve arvutatakse regulaarselt ja sageli loetavate näitude põhjal, seadme tootja ette nähtud meetodite abil. Inkubatsiooniperioodi lõpus, tavaliselt 28 päeva möödumisel, mõõdetakse kolbide pH, eriti kui hapnikutarve on madal või kõrgem kui ThOD<sub>NH4</sub> (lämmastikku sisaldavate ühendite puhul).

Vajadusel võetakse respirometri kolbidest katse alguses ja lõpus proove DOC analüüsiks või spetsiifilise aine analüüsiks (vaata lisa II.4). Peale proovi võtmist katse alguses peab teada olema kolbi jääva katsesuspensiooni maht. Kui hapniku tarbimine on tingitud lämmastikku sisaldavast testainest, mõõdetakse nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni tõus 28 päeva jooksul ja arvutatakse välja nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus (V lisa).

#### V.3. **ANDMED JA ARUANDLUS**

##### V.3.1. **Tulemuste käsitlemine**

Testaine hapnikutarve (mg) kindlaksmääratud aja möödumisel (millest on lahutatud inokulaadiga nullproovi vastav näitaja sama aja kohta) jagatakse kasutatud testaine massiga. Nii saadakse BHT väärtus, mis on väljendatud hapniku massina (mg) testaine massi (mg) suhtes, st

$$\text{BHT} = \frac{\text{Testaine hapnikutarve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutarve (mg)}}{\text{Testaine kogus kolvis (mg)}}$$

$$= \text{hapnikutarve (mg) testaine massiühiku (mg) kohta.}$$

Biolagundumise protsent arvutatakse kas valemist:

$$\text{biolagundumise protsent} = \% \text{ThOD} = \frac{\text{BHT} ((\text{O}_2 \text{ (mg)}/\text{testaine (mg)}))}{\text{ThOD} ((\text{O}_2 \text{ (mg)}/\text{testaine (mg)}))} \times 100$$

või valemist

$$\text{KHT\%} = \frac{\text{BHT} ((\text{O}_2 \text{ (mg)}/\text{testaine (mg)}))}{\text{KHT} ((\text{O}_2 \text{ (mg)}/\text{testaine (mg)}))} \times 100$$

Tuleb märkida, et kui need kaks meetodit ei anna alati samasugust tulemust, on eelistatav kasutada esimest meetodit.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb kasutada asjakohast ThOD-d ( $\text{NH}_4$  või  $\text{NO}_3$ ) vastavalt nitrifikatsiooni teadaolevale või eeldatavale toimumisele. Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, arvutatakse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V lisa).

Valikulistel orgaanilise süsiniku ja/või spetsiifilise aine määramistel arvutatakse lagunemisprotsent punktis 1.7 kirjeldatud moel.

Kõik tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

#### V.3.2. Tulemuste kehtivus

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul on üldjuhul 20–30 mg  $\text{O}_2$ /l ega tohiks ületada 60 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 60 mg/l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata. Kui pH jääb väljapoole vahemikku 6–8,5 ja testaine hapnikutarve on alla 60 %, tuleks katset testaine madalama kontsentratsiooniga korrata.

Vt ka punkti 1.5.2.

#### V.3.3. Aruandlus

Vt punkti 1.8.

#### V.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

### MANOMEETRILISE RESPIROMEETRIA KATSE

#### 1. LABOR

#### 2. KATSE ALGUSKUUPÄEV

#### 3. TESTAINE

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon:... mg/l

Algkontsentratsioon toitelahuses,  $C_0$ :... mg/l

Lahuse maht katsekolvis (V):... ml

ThOD või KHT:...  $\text{O}_2$  (mg)/testaine (mg) ( $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$ )

#### 4. INOKULAAT

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus:... mg/l

## 5. HAPNIKUTARVE: BIOLAGUNDUVUS

|                                                                    |                           | Aeg (päevades) |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------|--|---|--|----|--|--|----|--|--|----|--|
|                                                                    |                           | 0              |  | 7 |  | 14 |  |  | 21 |  |  | 28 |  |
| Hapnikutarve (mg) testaine                                         | 1                         |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|                                                                    | 2                         |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|                                                                    | a, keskmine               |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
| Hapnikutarve (mg) nullproov                                        | 3                         |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|                                                                    | 4                         |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|                                                                    | b, keskmine               |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
| Parandatud BHT (mg)                                                | $(a_1 - b_m)$             |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|                                                                    | $(a_2 - b_m)$             |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
| BHT mg testaine kohta                                              | $\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$ |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|                                                                    | $\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$ |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
| Lagunemis-prot-sent<br>$\frac{\text{BHT}}{\text{ThOD}} \times 100$ | $D_1 (a_1)$               |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|                                                                    | $D_2 (a_2)$               |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
|                                                                    | Keskmine <sup>(1)</sup>   |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |
| V = lahuse maht katsekolvis                                        |                           |                |  |   |  |    |  |  |    |  |  |    |  |

<sup>(1)</sup>  $D_1$  ja  $D_2$  ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

NB: võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

## 6. NITRIFIKATSIOONI ARVESTAV PARANDUS (vt V lisa)

| Päev                                                  | 0 | 28 | Erinevus |
|-------------------------------------------------------|---|----|----------|
| i) Nitraadi kontsentratsioon (mg N/liitris),          |   |    | (N)      |
| ii) Hapnikuekvivalent $(4,57 \times N \times V)$ (mg) | — | —  |          |
| iii) Nitriti kontsentratsioon (mg N/liitris)          |   |    | (N)      |
| iv) Hapnikuekvivalent $(3,43 \times N \times V)$ (mg) | — | —  |          |
| ii + iv) Summaarne hapnikuekvivalent                  | — | —  |          |

## 7. SÜSINIKU ANALÜÜS (pole kohustuslik)

Süsinikuanalüsaator:

| Aeg (päevades)                                 | Nullproov (mg/l) | Testaine (mg/l) |
|------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| 0                                              | $(C_{blo})$      | $(C_o)$         |
| 28 <sup>(1)</sup>                              | $(C_{blt})$      | $(C_t)$         |
| <sup>(1)</sup> või inkubatsiooniperioodi lõpus |                  |                 |

$$\% \text{DOC kõrvaldamisprotsent} = \left( 1 - \frac{C_t - C_{\text{blt}}}{C_o - C_{\text{blo}}} \right) \times 100$$

#### 8. SPETSIIFILINE AINE (pole kohustuslik)

$S_b$  = kontsentratsioon füüsikalises-keemilises (steriilses) kontrollproovis 28 päeva möödumisel

$S_a$  = kontsentratsioon inokuleeritud kolvis 28 päeva möödumisel.

$$\text{biolagundumise protsent} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

#### 9. ABIOOTILISE LAGUNEMISE KATSE (pole kohustuslik)

$a$  = hapnikutarve steriilsetes kolbides 28 päeva möödumisel (mg)

$$\text{hapnikutarve testaine mg kohta} = \frac{a}{C_o V}$$

(vt jaotiseid 1 ja 3)

$$\text{abiootilise lagunemise protsent} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

### VI OSA. KINNISE PUDELI KATSE (Meetod C.4-E)

#### VI.1. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Testaine lahustatakse mineraalses toitelahuses, üldjuhul kontsentratsiooniga 2–5 mg/l, inokuleeritakse suhteliselt väikese arvu segapopulatsiooni mikroorganismidega ja seda hoitakse täiesti tihedalt suletud pudelites konstantsel temperatuuril. Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul lahustunud hapniku analüüsimisega. Testaine hapnikutarve (mida on parandatud paralleelse inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina ThOD-st või KHT-st.

#### VI.2. MEETODI KIRJELDUS

##### VI.2.1. Seadmed

- Klaaskorkidega BHT pudelid mahuga näiteks 250–300 ml;
- vesivann või inkubaator pudelite termostateerimiseks konstantsel temperatuuril ( $\pm 1$  °C või täpsem) pimedas;
- suured klaaspudelid (2–5 l) lahuste valmistamiseks ja BHT pudelite täitmiseks;
- hapnikuelektrood ja -mõõtur või seadmed ja reaktiivid Winkleri tiitrimiseks.

##### VI.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

1 (üks) ml lahuseid a kuni d segatakse kokku ja täiendatakse lahjendusveega 1 liitrini.

**VI.2.3. Inokulaadi valmistamine**

Inokulaat valmistatakse üldjuhul valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimöödu sead-  
mest väljuvast töödeldud reoveest. Veel üks võimalik inokulaadi allikas on pinnavesi. Üldjuhul lisatakse liitri  
lahuse kohta üks tilk (0,05 ml) kuni 5 ml filtraati; antud reoveele vastava optimaalse koguse määramiseks  
võib vaja olla eelkatseid (vt I.6.4.2 ja I.6.5).

**VI.2.4. Kolbide ettevalmistamine**

Mineraalset toitelahust aereeritakse tugevalt vähemalt 20 minutit. Igas katseseerias tuleb kasutada ainult  
samast partiist pärinevat mineraalset toitelahust. Üldjuhul on lahus kasutusvalmis peale 20-tunnist katse-  
temperatuuril seismist. Kontrollimiseks määratakse lahustunud hapniku kontsentratsioon, mis peaks 20 °C  
juures olema umbes 9 mg/l. Kõik ülekande- ja täitmisoperatsioonid õhuga küllastatud toitelahusega tuleb  
teha mullivabalt, näiteks sifooni abil.

Test- ja võrdlusainete uurimiseks üheaegsetes katseseeriates valmistatakse ette paralleelsed BHT pudelite  
rühmad. Katses kasutatakse küllaldast arvu BHT pudelid, sealhulgas inokulaadiga nullproove, nii et  
soovitavate ajavahemike, näiteks 0, 7, 14, 21 ja 28 päeva järel, saab hapnikutarvet mõõta vähemalt kahes  
paralleelis. 10-päevase akna määramiseks võib vaja olla täiendavaid pudelid.

Suured pudelid täidetakse põhjalikult aereeritud mineraalse toitelahusega umbes ühe kolmandiku ulatuses.  
Seejärel lisatakse eraldi suurtesse pudelitesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid nii, et  
kemikaalide lõplik kontsentratsioon ei ületa üldjuhul 10 mg/l. Täiendavas suures pudelis olevale kemikaa-  
livabale kontrolltoitelahusele kemikaale ei lisata.

Et mitte piirata inokulaadi aktiivsust, ei tohi lahustunud hapniku kontsentratsioon BHT pudelites langeda  
alla 0,5 mg/l. Seega on testaine kontsentratsioon piiratud umbes 2 mg/l. Raskestilagunevate ja madala  
ThOD-ga ühendite puhul võib siiski kasutada kontsentratsiooni 5–10 mg/l. Mõningatel juhtudel võib  
soovitada teha paralleelseid katseseeriaid kahe erineva testaine kontsentratsiooniga, näiteks 2 ja 5 mg/l.  
ThOD arvutatakse üldjuhul ammoniumisoolade moodustumise põhjal, kuid kui eeldatakse nitrifikatsiooni  
toimumist või selle toimumine on teada, arvutatakse see nitraadi moodustumise põhjal (ThOD<sub>NO<sub>3</sub></sub>: vt lisa  
II.2). Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, parandatakse tulemust, arvestades analüütiliselt leitud  
nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutusi (vt V lisa).

Testaine mürgisuse uurimisel (näiteks madala biolagunduvuse tulemuse puhul) on vaja veel üht pudelisee-  
riat.

Valmistatakse ette veel üks suur pudel, mis sisaldab aereeritud mineraalset toitelahust (umbes 1/3 pudeli  
mahust) ja ülejäänud suurte pudelitega võrdses kontsentratsioonis nii test- kui ka võrdlusainet.

Lahused suurtes pudelites inokuleeritakse töödeldud reoveega (1 tilk ehk umbes 0,05 ml kuni 5 ml/l) või  
muu inokulaadi, nagu jõeveega (vt I.6.4.2). Seejärel täiendatakse lahused aereeritud mineraalse toitelahusega  
vajaliku mahuni, kasutades piisava segunemise saavutamiseks pudeli põhjani ulatuvat voolikut.

**VI.2.5. Kolbide arv tüüpilises katses**

Tüüpilises katses kasutatakse järgmisi pudelid:

vähemalt 10 pudelit testaine ja inokulaadiga (katsesuspensioon),

vähemalt 10 pudelit ainult inokulaadiga (inokulaadiga nullproov),

vähemalt 10 pudelit võrdlusaine ja inokulaadiga (protseduuri kontrollproov),

ning vajadusel 6 pudelit nii testaine, võrdlusaine kui ka inokulaadiga (mürgisuse kontrollproov). 10-päevase  
akna määramiseks võib aga vaja olla umbes kahekordset arvu pudelid.

### VI.2.6. Katse tegemine

Kõik valmis lahused viiakse kohe vastavasse BHT pudelite rühma, kasutades voolikut, mille ots on BHT pudelite täielikuks täitmiseks vastava suure pudeli alumises veerandis (mitte põhjas). Õrnalt koputades eemaldatakse õhumullid. Nullhetkel määratakse kõigis pudelites Winkleri meetodi või hapnikuelektroodi abil kohe lahustunud hapnik. Proovid võib mangaan(II)sulfaadi ja naatriumhüdroksiidi (esimese Winkleri reaktiivi) abil konserveerida hilisemaks analüüsiks, kasutades Winkleri meetodit. Hoolikalt suletud pudeleid, milles hapnik on fikseeritud pruuni mangaan(III)oksiidi hüdraadina, hoitakse enne Winkleri meetodi järgmiste etappidega jätkamist pimedas 10–20 °C juures kõige rohkem 24 tundi. Ülejäänud paralleelpudelid suletakse õhumullide pudelitesse jäämise vältimiseks korgiga ja inkubeeritakse 20 °C juures pimedas. Iga katseseeriaga peab kaasnema täielik paralleelseeria inokuleeritud, testaineta toitelahuse uurimiseks. Igast seeriast võetakse 28 päeva jooksul kindlate ajavahemike järel (vähemalt kord nädalas) korraga vähemalt kaks pudelit lahustunud hapniku määramiseks.

Nädalaste vahedega võetud proovid võimaldavad määrata kõrvaldamisprotsendi 14-päevases aknas, 3–4 päevaste vahedega võetud proovid võimaldavad määrata 10-päevase akna, selleks on vaja umbes kaks korda rohkem pudeleid.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb tulemusesse teha nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus. Selleks määratakse hapnikuelektroodi abil lahustunud hapniku kontsentratsioon ja võetakse BHT pudelist nitriti ja nitraadi analüüsiks proov. Nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni tõusu järgi arvutatakse välja vastav hapnikutarve (vt V lisa).

### VI.3. ANDMED JA ARUANDLUS

#### VI.3.1. Tulemuste käsitlemine

Kõigepealt arvutatakse iga ajavahemiku BHT, lahutades testaine hapnikutarbest inokulaadiga nullproovi hapnikutarbe (mg/l). Suhtelise BHT (hapniku ja testaine masside (mg) suhte) saamiseks jagatakse parandatud hapnikutarve testaine kontsentratsiooniga (mg/l). Protsentuaalne biolagunduvus arvutatakse suhtelise BHT jagamisel suhtelise (lisa II.2 kirjeldatud moel arvutatud) ThOD-ga või KHT-ga (mis on määratud analüütiliselt, vt lisa II.3), seega:

$$\text{BHT} = \frac{\text{Testaine hapnikutarve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutarve (mg)}}{\text{Testaine kogus kolvis (mg)}}$$

$$= \text{hapnikutarve (mg) testaine massiühiku (mg) kohta}$$

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{BHT} ((\text{O}_2 \text{ (mg)}/\text{testain e (mg)}))}{\text{ThOD} ((\text{O}_2 \text{ (mg)}/\text{testain e (mg)}))} \times 100$$

või

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{BHT} ((\text{O}_2 \text{ (mg)}/\text{testain e (mg)}))}{\text{KHT} ((\text{O}_2 \text{ (mg)}/\text{testain e (mg)}))} \times 100$$

Tuleb märkida, et kui need kaks meetodit ei anna alati samasugust tulemust, on eelistatav kasutada viimast meetodit.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb kasutada asjakohast ThOD-d ( $\text{NH}_4$  või  $\text{NO}_3$ ) vastavalt nitrifikatsiooni teadaolevale või eeldatavale toimumisele. Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, arvutatakse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V lisa).

#### VI.3.2. Tulemuste kehtivus

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul ei tohiks olla suurem kui 1,5 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad, tuleks katsetehnika üle vaadata. Lahustunud hapniku kontsentratsioon katsepudelites ei tohiks millalgi langeda alla 0,5 mg/l. Sellised madalad hapnikusisaldused saab kehtivaks lugeda ainult juhul, kui kasutatav lahustunud hapniku määramise meetod võimaldab selliseid sisaldusi täpselt määrata.

Vaata ka punkti I.5.2.

### VI.3.3. Aruandlus

Vt punkti I.8.

### VI.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

#### KINNISE PUDELI KATSE

##### 1. LABOR

##### 2. KATSE ALGUSKUUPÄEV

##### 3. TESTAINE

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon:... mg/l

Algkontsentratsioon pudelis:... mg/l

ThOD või KHT:... O<sub>2</sub> (mg)/testaine (mg)

##### 4. INOKULAAT

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Kontsentratsioon katsesegus:... mg/l

##### 5. LAHUSTUNUD HAPNIKU MÄÄRAMINE

Meetod: Winkler/elektrood

#### Kolbide analüüsitulemused

| Inkubatsiooniaeg (d)         |                             |                | Lahustunud hapnik (mg/l) |                |                |  |
|------------------------------|-----------------------------|----------------|--------------------------|----------------|----------------|--|
|                              |                             |                | 0                        | n <sub>1</sub> | n <sub>2</sub> |  |
| Nullproov (kemi-<br>kaalita) | 1                           | C <sub>1</sub> |                          |                |                |  |
|                              | 2                           | C <sub>2</sub> |                          |                |                |  |
| Keskmine                     | $m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$ |                |                          |                |                |  |
| Testaine                     | 1                           | a <sub>1</sub> |                          |                |                |  |
|                              | 2                           | a <sub>2</sub> |                          |                |                |  |
| Keskmine                     | $m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$ |                |                          |                |                |  |

Märkus: võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabelleid.

## 6. NITRIFIKATSIOONI ARVESTAV PARANDUS (vt V lisa)

| Inkubatsiooniaeg (d)                                 | 0 | n <sub>1</sub> | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> |
|------------------------------------------------------|---|----------------|----------------|----------------|
| i) Nitraadi kontsentratsioon (mg N/liitris)          |   |                |                |                |
| ii) Nitraadi kontsentratsiooni muutus (mg N/liitris) | — |                |                |                |
| iii) Hapnikuekvivalent (mg/l)                        | — |                |                |                |
| iv) Nitriti kontsentratsioon (mg N/liitris)          |   |                |                |                |
| v) Nitriti kontsentratsiooni muutus (mg N/liitris)   | — |                |                |                |
| vi) Hapnikuekvivalent (mg/l)                         | — |                |                |                |
| iii + vi) Summaarne hapnikuekvivalent (mg/l)         | — |                |                |                |

## 7. LAHUSTUNUD HAPNIKU TARBIMINE: LAGUNEMISPROTSENT

|                                                                                                                                                | Tarbimine n päeva möödumisel (mg/l) |                |                |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------|----------------|--|
|                                                                                                                                                | n <sub>1</sub>                      | n <sub>2</sub> | n <sub>3</sub> |  |
| 1. KOLB: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$                                                                                               |                                     |                |                |  |
| 2. KOLB: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$                                                                                               |                                     |                |                |  |
| 1. KOLB:<br>$\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{katsekonts} \times \text{kemikaali} \times \text{ThOD}}$ |                                     |                |                |  |
| 2. KOLB:<br>$\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{katsekonts} \times \text{kemikaali} \times \text{ThOD}}$ |                                     |                |                |  |
| keskmine $\%D^{(1)} = \frac{D_1 + D_2}{2}$                                                                                                     |                                     |                |                |  |

(<sup>1</sup>) Kordustulemuste olulise erinevuse puhul mitte keskmistada.

$m_{to}$  = väärtus katsekolvis ajahetkel 0

$m_{tx}$  = väärtus katsekolvis ajahetkel x

$m_{bo}$  = nullproovi keskmine väärtus ajahetkel 0

$m_{bx}$  = nullproovi keskmine väärtus ajahetkel x

Sisse tuleb viia ka nitrifikatsiooni arvestav parandus jaotis 6 punktist iii + vi.

## 8. LAHUSTUNUD HAPNIKU TARBIMINE NULLPROOVIDES

Nullproovi hapnikutarve:  $(m_{b0} - m_{b28})$  mg/l. Nullproovi hapnikutarve on oluline katse kehtivuse seisukohalt. See peaks olema alla 1,5 mg/l.

VII OSA. **MITI KATSE** (Meetod C.4-F)

## VII.1. PÕHIMÕTE

28 päeva kestel mõõdetakse automaatselt pimedas, suletud respiromeetris  $25 \pm 1$  °C juures oleva, pidevalt segatava, testainest ja mineraalsest toitelahusest koosneva, spetsiaalselt kasvatatud, adapteerimata mikroorganismidega inokuleeritud lahuse või suspensiooni hapnikutarvet. Tekkinud süsinikdioksiid absorbeeritakse naatronlubjaga. Biolagunduvust väljendatakse nullproovi hapnikutarbe võrra parandatud hapnikutarbe protsendina teoreetilisest hapnikutarbest (ThOD). Lisaks arvutatakse inkubeerimise algul ja lõpul tehtava täiendava keemilise analüüsi ja soovi korral ka DOC analüüsi põhjal esmase biolagundumise määr.

## VII.2. MEETODI KIRJELDUS

VII.2.1. **Seadmed**

- a) Automaatne elektrofütiline BHT mõõtur või respiromeeter, tavaliselt kuue 300 ml pudeliga ja topsidega CO<sub>2</sub> absorbendi jaoks;
- b) püsiva temperatuuriga ruum ja/või veevann temperatuuriga 25 °C, lubatava kõikumisega  $\pm 1$  °C või alla selle;
- c) membraanfiltratsiooni seade (pole kohustuslik);
- d) süsinikuanalüsaator (pole kohustuslik).

VII.2.2. **Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Analüüsipuhastest reaktiividest ja veest (I.6.1) valmistatakse järgmised põhilahused:

- |    |                                                                                              |         |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| a) | Kaaliumdivesinikfosfaat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                     | 8,50 g  |
|    | Dikaaliumvesinikfosfaat, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                     | 21,75 g |
|    | Dinaatriumvesinikfosfaatdodekahüdraat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 44,60 g |
|    | Ammooniumkloriid, NH <sub>4</sub> Cl                                                         | 1,70 g  |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini                                           |         |
|    | Lahuse pH peaks olema 7,2                                                                    |         |
| b) | Magneesiumsulfaatheptahüdraat, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                         | 22,50 g |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini                                           |         |
| c) | Veevaba kaltsiumkloriid, CaCl <sub>2</sub>                                                   | 27,50 g |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini                                           |         |
| d) | Raud(III)kloriidheksahüdraat, FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O                         | 0,25 g  |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini                                           |         |

3 ml igast lahusest a kuni d segatakse kokku ja täiendatakse 1 liitrini.

VII.2.3. **Inokulaadi valmistamine**

Võetakse värsked proovid vähemalt kümnest kohast, peamiselt piirkondadest, kus kasutatakse ja kuhu suunatakse mitmesuguseid kemikaale. 1-liitrised muda, pindmise mullakihi, vee jms proovid võetakse näiteks olme- ja tööstusliku heitvee puhastitest, jõgedest, järvedest ja meredest ning segatakse need hoolikalt kokku. Peale hõljumi kõrvaldamist ja mõningast seismist viiakse supernatandi pH naatriumhüdroksiidi või fosforhappe abil väärtuseni  $7 \pm 1$ .

Sobiva koguse filtritud supernatandiga täidetakse edaspidi regulaarselt täidetav ja osaliselt tühjendatav aktiivmuda anum ja vedelikku aereeritakse umbes 23,5 tundi. 30 minutit pärast aereerimise lõppu kõrvaldatakse umbes kolmandik supernatandist ja lisatakse settinud materjalile samas mahus lahust (pH 7), mis sisaldab 0,1 % glükoosi, 0,1 % peptooni ja kaaliumdivesinikfosfaati, ning jätkatakse aereerimist. Protseduuri korratakse iga päev. Mudareservuaari tuleb käidelda hea tava kohaselt: väljavool peab olema selge, temperatuur peaks olema  $25 \pm 2$  °C, pH peaks olema  $7 \pm 1$ , muda peaks hästi settima, aeratsioon peaks segu pideva aeroobsuse tagamiseks olema küllaldane, segu peaks sisaldama algloomi ning muda aktiivsust võrdlusaine suhtes tuleks kontrollida vähemalt iga kolme kuu tagant. Muda võib inokulaadina kasutada pärast vähemalt ühekuulist töötlemist, aga hiljemalt nelja kuu möödudes. Seejärel võetakse regulaarsete vaheaegade järel vähemalt kord kolme kuu jooksul jälle vähemalt 10 paigast eespool kirjeldatud proovid.

Et tagada värske ja vana muda ühesugune aktiivsus, segatakse kasutuses oleva aktiivmuda filtritud supernatant võrdses koguses vahetult enne kogutud kümne allika segu filtritud supernatandiga ja aktiveeritakse saadud segu eespool kirjeldatud moel. Inokulaadiks võetakse muda 18–24 t pärast selle söötmist.

#### VII.2.4. Kolbide ettevalmistamine

Valmistatakse ette järgmised kuus kolbi:

nr 1: testaine lahjendusvees, kontsentratsioonis 100 mg/l

nr 2, 3 ja 4: testaine mineraalses toitelahuses, kontsentratsioonis 100 mg/l

nr 5: võrdlusaine (nt aniliin) mineraalses toitelahuses, kontsentratsioonis 100 mg/l

nr 6: ainult mineraalne toitelahus

Vähelahustuvad testained lisatakse massi või mahu järgi otse katsesegusse või käsitsetakse neid III lisas kirjeldatud moel, kuid lahusteid ega emulgaatoreid kasutada ei tohiks. Kõikidele kolbidele lisatakse vastavasse tropsi CO<sub>2</sub> absorbent. pH kolbides nr 2, 3 ja 4 viiakse väärtuseni 7,0.

#### VII.2.5. Katse tegemine

Kolvid nr 2, 3 ja 4 (katsesuspensioonid), nr 5 (inokulaadi aktiivsuse kontrollproov) ja nr 6 (inokulaadiga nullproov) inokuleeritakse sellise väikese koguse inokulaadiga, et hõljumi kontsentratsioon segus oleks 30 mg/l. Abiootilist kontrollproovi kolvis nr 1 ei inokuleerita. Katseaparatuur pannakse kokku, kontrollitakse seadme hermeetilisust, käivitatakse segajad ja alustatakse pimeduses hapnikutarbe mõtmist. Iga päev kontrollitakse temperatuuri, segajaid ja kulonomeetrist hapnikutarbe mearikut ning märgitakse üles kõik kolbide sisu värvuse muutused. Sobival moel, näiteks 6 kanaliga meeriku abil jälgitakse vahetult kõigi kolbide BHT-d. Inkubatsiooniperioodi lõpus, tavaliselt 28 päeva möödumisel, mõõdetakse kolbide pH ja määratakse testaine jääkkontsentratsioon, kõigi vaheühendite kontsentratsioonid ja vees lahustuva ühendi puhul DOC kontsentratsioon (lisa II.4). Lenduvate kemikaalide puhul tuleb olla eriti hoolikas. Kui eeldatakse nitrifikatsiooni toimumist, mõõdetakse võimalusel nitriti ja nitraadi kontsentratsioon.

#### VII.3. ANDMED JA ARUANDLUS

##### VII.3.1. Tulemuste käsitlemine

Testaine hapnikutarve (mg) kindla aja möödumisel (millest on lahutatud inokulaadiga nullproovi vastav näitaja sama aja kohta) jagatakse kasutatud testaine massiga. Nii saadakse BHT väärtus, mis on väljendatud hapniku massina (mg) testaine massi (mg) suhtes, st:

$$\text{BHT} = \frac{\text{Testaine hapnikutarve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutarve (mg)}}{\text{Testaine kogus kolvis (mg)}}$$

$$= \text{hapnikutarve (mg)/testaine (mg)}.$$

Biologundumise protsent arvutatakse seejärel valemist:

$$\text{biolagundumise protsent} = \text{ThOD} \% = \frac{\text{BHT} ((\text{O}_2 \text{ (mg)}/\text{testain e (mg)}))}{\text{ThOD} ((\text{O}_2 \text{ (mg)}/\text{testain e (mg)}))} \times 100$$

Segude puhul arvutatakse ThOD elementanalüüsi tulemuste põhjal, käsitledes segu ühendina. Kasutada tuleb asjakohast ThOD-d ( $\text{ThOD}_{\text{NH}_4}$  või  $\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$ ) vastavalt nitrifikatsiooni toimumisele või mittetoimumisele (lisa II.2). Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, viiakse sisse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus, mis arvutatakse välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V lisa).

Spetsiifilise (lähte-)aine kao järgi arvutatakse esmase biolagundumise protsent (vt I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

Kui testaine sisaldus füüsikalis-keemilist kadu mõõtvast kolvis nr 1 on vähenenud, registreeritakse see ja selles kolvis ( $S_b$ ) oleva testaine kontsentratsiooni kasutatakse 28 päeva möödumisel biolagundumise protsendi arvutamisel.

DOC analüüside (pole kohustuslik) tegemisel arvutatakse biolagundumise protsent valemist:

$$D_t = \left( 1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100 \%$$

vastavalt kirjeldusele punktis I.7.1. Kui DOC sisaldus füüsikalis-keemilist kadu mõõtvast kolvis nr 1 on vähenenud, kasutatakse DOC kontsentratsiooni selles kolvis biolagundumise protsendi arvutamisel.

Kõik tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

#### VII.3.2. Tulemuste kehtivus

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul on üldjuhul 20–30 mg  $\text{O}_2$ /l ega tohiks ületada 60 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 60 mg/l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata. Kui pH jääb väljapoole vahemikku 6–8,5 ja testaine hapnikutarve on alla 60 %, tuleks katset testaine madalama kontsentratsiooniga korrata.

Vt ka punkti I.5.2.

Kui hapnikutarbe põhjal arvutatud aniliini lagunemisprotsent ei ole 7 päeva jooksul suurem kui 40 % ja 14 päeva jooksul suurem kui 65 %, loetakse katse tühiseks.

#### VII.3.3. Aruandlus

Vt punkti I.8.

#### VII.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

#### MITI (I) KATSE

##### 1. LABOR

##### 2. KATSE ALGUSKUUPÄEV

## 3. TESTAINE

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon:... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses,  $C_0$ :... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Katsesegu maht, V: ml

ThOD:... mg  $O_2$ /l

## 4. INOKULAAT

Mudavõtukohad:

- |        |         |
|--------|---------|
| 1) ... | 6) ...  |
| 2) ... | 7) ...  |
| 3) ... | 8) ...  |
| 4) ... | 9) ...  |
| 5) ... | 10) ... |

Hõljumi kontsentratsioon aktiivmudas peale sünteetilise reoveega aklimatiseerimist =... mg/l

Aktiivmuda maht liitri lõpliku lahuse kohta =... ml

Muda kontsentratsioon lõplikus lahuses =... mg/l

## 5. HAPNIKUTARVE: BIOLAGUNDUVUS

Kasutatava respiromeetri tüüp:

|                                                    |                                           |              | Aeg (päevades) |   |    |    |    |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------|----------------|---|----|----|----|
|                                                    |                                           |              | 0              | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Hapnikutarve (mg),<br>testaine                     | $a_1$                                     |              |                |   |    |    |    |
|                                                    | $a_2$                                     |              |                |   |    |    |    |
|                                                    | $a_3$                                     |              |                |   |    |    |    |
| Hapnikutarve (mg),<br>nullproov                    | b                                         |              |                |   |    |    |    |
| Parandatud hapnikutarve (mg)                       | $(a_1 - b)$<br>$(a_2 - b)$<br>$(a_3 - b)$ |              |                |   |    |    |    |
| BHT mg testaine kohta                              | $\frac{(a - b)}{C_0 V}$                   | 1. kolb      |                |   |    |    |    |
|                                                    |                                           | 2. kolb      |                |   |    |    |    |
|                                                    |                                           | 3. kolb      |                |   |    |    |    |
| Lagunemisprotsent<br>$\frac{BHT}{ThOD} \times 100$ |                                           | 1            |                |   |    |    |    |
|                                                    |                                           | 2            |                |   |    |    |    |
|                                                    |                                           | 3            |                |   |    |    |    |
|                                                    |                                           | Keskmine (!) |                |   |    |    |    |

Märkus: võrdlusaine jaoks võib kasutada analoogseid tabelleid.

(!) Kordustulemuste olulise erinevuse puhul mitte keskmistada.

6. **SÜSINIKU ANALÜÜS** (pole kohustuslik):

Süsinikuanalüsaator:

| Kolb                     | DOC      |  |            |  | DOC kõrvaldamisprotsent | Keskmine |
|--------------------------|----------|--|------------|--|-------------------------|----------|
|                          | Mõõdetud |  | Parandatud |  |                         |          |
| Vesi + testaine          | a        |  |            |  | —                       | —        |
| Muda + testaine          | b1       |  | b1-c       |  |                         |          |
| Muda + testaine          | b2       |  | b2-c       |  |                         |          |
| Muda + testaine          | b3       |  | b3-c       |  |                         |          |
| Testaineta kontrollproov | c        |  | —          |  | —                       | —        |

$$\text{DOC kõrvaldamisprotsent} : \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **SPETSIIFILISE KEEMILISE ANALÜÜSI ANDMED**

|                          | Testaine jääk katse lõpus | Lagunemisprotsent |
|--------------------------|---------------------------|-------------------|
| Nullproov veega          | S <sub>b</sub>            |                   |
| Inokuleeritud toitelahus | S <sub>a1</sub>           |                   |
|                          | S <sub>a2</sub>           |                   |
|                          | S <sub>a3</sub>           |                   |

$$\text{Lagunemisprotsent} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Lagunemisprotsent arvutatakse kolbide a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> ja a<sub>3</sub> puhul.8. **MÄRKUSED**

Lisada tuleks BHT kõver ajas, kui see koostati.

## I LISA

## LÜHENDID JA MÕISTED

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DO:                 | lahustunud hapnik (mg/l) on vesikeskkonnaga proovis lahustunud hapniku kontsentratsioon.                                                                                                                                                                              |
| BHT:                | bioloogiline hapnikutarve (g) on mikroorganismide poolt testaine metaboliseerimisel tarvitatud hapniku kogus, väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena. (Vt meetodit C.5)                                                                   |
| KHT:                | keemiline hapnikutarve (g) on testaine oksüdeerimisel kuuma happelise dikromaadiga tarvitatud hapniku kogus, näitab oksüdeeritava materjali sisaldust; väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena. (Vt meetodit C.6).                         |
| DOC:                | lahustunud orgaaniline süsinik on lahuses olev süsinik, mis läbib 0,45 µm filtri või jääb supernatanti 15-minutilise tsentrifuugimisel 40 000 m s <sup>2</sup> (± 4 000 g) juures.                                                                                    |
| ThOD:               | teoreetiline hapnikutarve (mg) on aine täielikuks oksüdeerimiseks vajalik hapnikukogus; arvutatakse brutovalemi järgi (vt lisa II.2) ning väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena.                                                         |
| ThCO <sub>2</sub> : | teoreetiline süsinikdioksiid (mg) on arvutuslik süsinikdioksiidi kogus, mis tekib katseühendi teadaolevast või määratud süsinikusisaldusest katseühendi täielikul mineraliseerumisel; väljendatakse ka mg katseühendi kohta eraldunud süsinikdioksiidi kogusena (mg). |
| TOC:                | proovi kogu orgaaniline süsinik on lahuses ja suspensioonis oleva orgaanilise süsiniku sisalduse summa.                                                                                                                                                               |
| IC:                 | anorgaaniline süsinik                                                                                                                                                                                                                                                 |
| TC:                 | üldsüsinik on proovis oleva orgaanilise ja anorgaanilise süsiniku summa.                                                                                                                                                                                              |

*Esmane biolagundumine:*

bioloogilisest toimest tingitud muutus aine keemilises struktuuris, mille tulemusel see aine kaotab mingi spetsiifilise omaduse.

*Lõplik biolagundumine (aeroobne):*

lagunemise määr, mille puhul mikroorganismid on katseühendi täielikult ära tarvitanud ja muutnud selle süsinikdioksiidiks, veeks, mineraalsooladeks ja uute mikroobsete rakkude osaks (biomassiks).

*Bioloogiliselt kergesti lagunduv:*

teatavad kindlaksmääratud lõpliku biolagunduvuse sõelkatsed läbinud kemikaalide rangelt määratlemata klassifikatsioon; need katsed on niivõrd ranged, et võib eeldada, et veekeskkonnas aeroobsetes tingimustes biolagunduvad need ühendid kiiresti ja täielikult.

*Potentsiaalselt biolagunduv:*

klassifikatsioon kemikaalide puhul, mille (esmise või lõpliku) biolagunduvuse kohta mis tahes tunnustatud biolagunduvuse katses on kindlaid tõendeid.

*Biotöödeldavus:*

ühendite kõrvaldatavus biopuhastusjaamades, rikkumata puhastusprotsesside normaalset käiku. Üldjuhul on bioloogiliselt kergesti lagunduvad ühendid biotöödeldavad, samas kui kõik potentsiaalselt biolagunduvad ühendid ei ole biotöödeldavad. Toimida võivad ka abiootilised protsessid.

*Ooteaeg*

on kõrvaldamiskatses ajavahemik inokulatsioonist kuni hetkeni, kus lagunemine on jõudnud vähemalt 10 %-ni. Ooteaja pikkus võib olla väga erinev ja halvasti reprodutseeritav.

*Lagunemisaeg*

on aeg ooteaja lõpust hetkeni, mil on saavutatud 90 % maksimaalsest lagunemisest.

*10-päevane aken*

on 10 % lagunemise saavutamisele vahetult järgnevad 10 päeva.

## II LISA

## SOBIVATE SUMMAARSETE PARAMEETRITE ARVUTAMINE JA MÄÄRAMINE

Olenevalt valitud meetodist on vajalikud teatavad summaarsed parameetrid. Järgmine jaotis kirjeldab nende väärtuste leidmist. Nende parameetrite kasutamist on kirjeldatud üksikute meetodite juures.

## 1. Süsinikusisaldus

Süsinikusisaldus arvutatakse testaine teadaoleva elemendilise koostise põhjal või määratakse elementanalüüsil.

## 2. Teoreetiline hapnikutarve (ThOD)

Teoreetilise hapnikutarbe (ThOD) saab arvutada siis, kui elemendiline koostis on teada või määratakse elementanalüüsil. Järgmise ühendi puhul:



on see nitrifikatsiooni mitteesinemisel

$$\text{ThOD}_{\text{NH}_4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{\text{MW}} \text{mg/mg}$$

ja nitrifikatsiooni esinemisel

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{\text{MW}} \text{mg/mg}$$

## 3. Keemiline hapnikutarve (KHT)

Keemiline hapnikutarve (KHT) määratakse meetodi C.6 kohaselt.

## 4. Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC)

Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC) on määratletud kui mis tahes vees oleva, 0,45 µm filtrit läbiva aine või segu koostises olev orgaaniline süsinik.

Katseanumatest võetakse proovid ja filtritakse kohe sobiva membraanfiltriga filtrimisseadmes. Esimesed 20 ml filtraati (väikeste filtrite kasutamisel võib kogust vähendada) jäetakse kõrvale. 10–20 ml või süstimisel väiksemad kogused (maht sõltub süsinikuanalüsaatori jaoks vajalikust kogusest) jäetakse süsiniku analüüsimiseks alles. DOC kontsentratsioon määratakse orgaanilise süsiniku analüsaatori abil, mis suudab täpselt mõõta süsiniku kontsentratsiooni, mis on 10 % DOC kontsentratsioonist katse alguses või sellest madalam.

Filtritud proove, mida ei saa analüüsida samal tööpäeval, võib säilitada külmikus 2–4 °C juures kuni 4 tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

#### Märkused:

*Membranfiltrid* on sageli hüdrofiilsuse suurendamiseks immutatud pindaktiivsete ainetega. Seega võib filter sisaldada mitu mg lahustuvat orgaanilist süsinikku, mis segaks biolagunduvuse määramist. Pindaktiivsed ained ja muud lahustuvad orgaanilised ühendid kõrvaldatakse filtritest kolme tunniajase keetmisega deioniseeritud vees. Filtreid võib seejärel nädal aega vees hoida. Ühekordsete filterpadrunite kasutamisel tuleb iga partii puhul kontrollida, et see ei eralda lahustuvat orgaanilist süsinikku.

Olenevalt membraanfiltrit tüübist võib testaine sellel adsorbeeruda. Seetõttu on soovitatav veenduda, et testainet filtrisse ei jää.

DOC eristamisel TOC-st võib filtrimise asemel kasutada 15-minutist *tseentrifuugimist*  $40\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$  (4 000 g) juures. Kui DOC algkontsentratsioon on alla 10 mg/l, ei ole see meetod usaldusväärne, kuna kõiki baktereid ei kõrvaldata või lahustatakse osa süsinikust bakteriplasmas.

#### KIRJANDUS

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.
- Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.
- DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfes (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

### III LISA

#### VÄHELAHUSTUVATE AINETE BIOLAGUNDUVUSE HINDAMINE

Biolagunduvuse katsetes vähelahustuvate ainetega tuleks erilist tähelepanu pöörata järgmistele asjaoludele.

Sellal kui homogeensed vedelikud tekitavad proovi võtmisel harva probleeme, on soovitatav tahked ained sobival moel homogeniseerida, et vältida mittehomoogeensusest tingitud vigu. Eriti hoolikas tuleb olla siis, kui on vaja mõnemilligrammiseid proove suure lisandite sisaldusega segudest või ainetest.

Katsete käigus võib kasutada mitmesuguseid loksutamisi. Loksutada tuleks ainult aine dispergeerituna hoidmiseks vajalikul määral, vältides hoolikalt ülekuumutamist, liigset vahutamist ja liigseid nihkejõude.

Kasutada võib emulgaatorit, mille abil saadakse aine stabiilne dispersioon. Emulgaator ei tohiks olla bakteritele mürgine ega olla katse tingimustel biolagunduv või vahtu tekitav.

Lahustitele kehtivad samad nõuded nagu emulgaatoritele.

Tahkete testainete puhul ei ole tahkeid kandjaid soovitatav kasutada, küll aga võivad need olla sobivad õlitaoliste ainete puhul.

Abiainete, nagu emulgaatorite, lahustite ja kandjate kasutamisel tuleks teha nullproov abiainega.

Vähelahustuvate ühendite biolagunduvuse uurimiseks sobivad respiromeetrilistest katsetest nii CO<sub>2</sub>, BHT kui ka MITI katse.

#### KIRJANDUS

- de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.
- Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

#### IV LISA

##### INOKULAADI SUHTES OLETATAVAALT MÜRGISTE AINETE BIOLAGUNDUVUSE HINDAMINE

Kui aine osutub kohese biolagunduvuse katses näiliselt mittelagunevaks, on inhibeerivuse ja inertsuse eristamise vajaduse korral soovitatav kasutada järgmist meetodit (Reynolds jt, 1987).

Mürgisuse ja biolagunduvuse katsetes tuleks kasutada samasuguseid või identseid inokulaate.

Kohese biolagunduvuse katsetes uuritud ainete mürgisuse hindamiseks peaks sobima muda hapnikutarbe inhibeerimise (aktiivmuda hapnikutarbe inhibeerimiskatse – direktiiv 88/302/EMÜ), BHT ja/või kasvu pidurdumise meetodid või nende kombinatsioon.

Kui mürgisusest tulenevat inhibeerumist soovitakse vältida, on kohese biolagunduvuse katsetes soovitatav kasutada testaine kontsentratsioone, mis on väiksemad kui 1/10 mürgisuse katsetes leitud EC<sub>50</sub> väärtustest (ehk väiksemad kui EC<sub>20</sub> väärtused). Ühendite puhul, mille EC<sub>50</sub> on kõrgem kui 300 mg/l, kohese biolagunduvuse katsetes tõenäoliselt mürgist mõju ei ilmne.

EC<sub>50</sub> väärtused alla 20 mg/l tekitavad järgnevates katsetes eeldatavalt tõsiseid probleeme. Kasutada tuleks madalaid katsekontsentratsioone, mistõttu tuleb kasutada ranget ja tundlikku kinnise pudeli katset või <sup>14</sup>C-märgistatud materjali. Aklimatiseerunud inokulaat võib võimaldada kasutada testaine kõrgemaid kontsentratsioone. Viimasel juhul ei ole aga täidetud kohese biolagunduvuse katse konkreetne kriteerium.

#### KIRJANDUS

- Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

#### V LISA

##### NITRIFIKATSIOONI HAPNIKUTARVET ARVESTAV PARANDUS

Lämmastikku mittesisaldavate testainete puhul on nitrifikatsiooni arvestamatajätmisest tingitud viga testainete biolagundumise hapnikutarbe hindamisel tühine (ei ületa 5 %), isegi kui toitelahuse ammoniakaalse lämmastiku oksüdatsioon toimub ebaühtlaselt, näiteks erinevustega testainega pudelite ja nullproovidega anumate vahel. Lämmastikku sisaldavate testainete puhul võivad aga ilmned tõsised vead.

Kui nitrifikatsioon on toimunud, kuid ei ole täielik, võib nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutuste määramisel parandada segu mõõdetud hapnikutarvet järgmiste valemite põhjal ammooniumiooni nitritiks ja nitraadiks oksüdeerimisel kuluva hapnikukoguse võrra:



Summaarselt:



Valemi 1 põhjal kulub ammooniumkloriidi ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) koosseisus oleva 28 g lämmastiku oksüdeerimisel nitritiks 96 g hapnikku, st vastav teisendustegur on 3,43 (96/28). Samamoodi kulub valemi 3 põhjal 28 g lämmastiku oksüdeerimisel nitraadiks 128 g hapnikku, st vastav teisendustegur on 4,57 (128/28).

Kuna need reaktsioonid on järjestikused ja neid viivad läbi erinevad bakteriliigid, võib nitriti kontsentratsioon nii väheneda kui ka suureneda; viimasel juhul tekib vastav kogus nitraati. Seega on nitraadi tekkel kuluv hapnikukogus 4,57-kordne nitraadi kontsentratsiooni tõusuga võrreldes, sellal kui nitriti tekkel kuluv hapnikukogus on 3,43-kordne nitriti kontsentratsiooni tõusuga võrreldes ning nitriti kontsentratsiooni vähenemisega seotud hapnikukadu –3,43-kordne nitriti kontsentratsiooni vähenemisega võrreldes.

Seega:

$$\text{O}_2 \text{ kulu nitraadi tekkel} = 4,57 \times \text{nitraadi kontsentratsiooni tõus} \quad (4)$$

ja

$$\text{O}_2 \text{ kulu nitriti tekkel} = 3,43 \times \text{nitriti kontsentratsiooni tõus} \quad (5)$$

ja

$$\text{O}_2 \text{ kadu nitriti kadumisel} = -3,43 \times \text{nitriti kontsentratsiooni vähenemine} \quad (6)$$

Seega

$$\text{O}_2 \text{ kulu nitrifikatsioonil} = \pm 3,43 \times \text{nitriti kontsentratsiooni muutus} + 4,57 \times \text{nitraadi kontsentratsiooni tõus} \quad (7)$$

ja seega

$$\text{O}_2 \text{ kulu süsiniku oksüdeerimisel} = \text{vaadeldud kogutarve} - \text{nitrifikatsioonist tingitud tarve} \quad (8)$$

Ainult summaarse oksüdeeritud lämmastiku hulga määramisel võib nitrifikatsioonist tingitud hapnikutarbe lugeda esimeses lähenduses oksüdeeritud lämmastiku hulgaga võrreldes 4,57-kordseks.

Süsiniku oksüdeerimise hapnikutarbe parandatud väärtust võrreldakse seejärel II lisa kohaselt arvutatud  $\text{ThOD}_{\text{NH}_3}$  väärtusega.

**C.5. LAGUNEMINE – BIOKEEMILINE HAPNIKUTARVE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Käesoleva meetodi abil mõõdetakse tahkete või vedelate orgaaniliste ainete bioloogilist hapnikutarvet (BHT).

Katses leitud andmed kehtivad vees lahustuvate ühendite puhul; siiski võib vähemalt põhimõtteliselt uurida ka lenduvaid ja vees vähelahustuvaid ühendeid.

Meetod on kohaldatav ainult sellistele uuritavatele orgaanilistele katsematerjalidele, mis ei mõju katses kasutatavatel kontsentratsioonidel bakteritele inhibeerivalt. Kui uuritav materjal katsekontsentratsioonil ei lahustu, võib selle hea disperseerituse saavutamiseks vaja olla erimeetmeid, näiteks ultraheli-disperseerimist.

Madalate biolagunduvuse väärtuste tõlgendamisel ja sobivate katsekontsentratsioonide valikul võivad kasulikud olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

BHT määratletakse kindla koguse aine lahuse ettenähtud tingimustel biokeemiliseks oksüdeerimiseks vajaliku lahustunud hapniku massina.

Tulemused väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Soovitav on kontrollida inokulaadi aktiivsust sobiva võrdlusaine abil.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Kindel kogus sobivas hästi aereeritud lahuses lahustatud või disperseeritud ainet inokuleeritakse mikroorganismidega ja inkubeeritakse pimedas kindlaksmääratud konstantse temperatuuriga ruumis.

BHT määratakse lahustunud hapniku sisalduse vahe järgi katse algul ja lõpul. Katse kestus peab olema vähemalt viis ja mitte rohkem kui 28 päeva.

Paralleelselt tuleb teha testaineta nullproov.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

BHT määramist ei saa lugeda aine usaldusväärseks biolagunduvuse määramise meetodiks. Meetod sobib kasutamiseks ainult sõelkatsena.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS**

Ainest valmistatakse lähtelahus või dispersioon, mille BHT sobiks kasutatava meetodiga. Seejärel määratakse mis tahes siseriikliku või rahvusvahelise standardmeetodi abil BHT.

**2. ANDMED JA HINDAMINE**

Lähtelahuse BHT arvutatakse vastavalt valitud standarditud meetodile ja väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

**3. ARUANDLUS**

Ära tuleb märkida kasutatud meetod.

Bioloogilise hapnikutarbena esitatakse vähemalt kolme nõuetekohase mõõtmise keskmine tulemus.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti aine lisandeid, füüsilist olekut, mürgisust ja koostist käsitlevad andmed ja märkused.

Kui bioloogilise nitrifikatsiooni pidurdamiseks kasutatakse lisaainet, tuleb see ära märkida.

**4. VIITED**

Näitlike standardmeetodite nimekiri:

NF T90 - 103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van her biochemcch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

**C.6. LAGUNEMINE – KEEMILINE HAPNIKUTARVE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Käesoleva meetodi abil mõõdetakse valitud standarditud, kindlaksmääratud laboritingimustel tahkete või vedelate orgaaniliste ainete keemilist hapnikutarvet (KHT).

Katse läbiviimisel ja saadud tulemuste tõlgendamisel on kasulik teada aine struktuuri (nt orgaaniline halogeniidsool, orgaaniline  $\text{Fe}^{++}$  sool, kloororgaaniline ühend).

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Keemiline hapnikutarve iseloomustab aine oksüdeeritavust ja seda väljendatakse kindlaksmääratud laboritingimustel aine oksüdeerimiseks kulunud oksüdeerija kogusele vastava hapniku kogusena.

Tulemused väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

## 1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi kaliibrimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

## 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kindlaksmääratud kogust vees lahustatud või disperseeritud ainet oksüdeeritakse kahe tunni jooksul tagasisjooksuga kuumutamisel kaaliumdikromaadiga kontsentreeritud väävelhappes, hõbesulfaatkatalüsaatori juuresolekul. Dikromaadi jääk määratakse raud(II)ammooniumsulfaadi standardlahusega tiitrimisel.

Kloori sisaldavate ühendite puhul lisatakse kloori segava mõju vähendamiseks elavhõbesulfaati (\*).

## 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Rangelt määratlemata määramismeetodi tõttu on KHT "oksüdeeritavuse näitaja" ja on sellisena praktiline meetod orgaanilise aine sisalduse määramiseks.

Katset võib segada kloorisisaldus; KHT määramist võivad segada ka anorgaanilised redutseerijad ja oksüdeerijad.

Mõned tsüklilised ühendid ja paljud lenduvad ained (nt madalamad rasvhapped) ei oksüdeeru selles katses täielikult.

## 1.6. MEETODI KIRJELDUS

Ainest valmistatakse lähtelahus või -dispersioon, mille KHT jääb vahemikku 250–600 mg/l.

Märkused:

Vähelahustuvate või mittedisperseeruvate ainete puhul võib kaaluda 5 mg KHT-le vastava koguse peenestatud ainet või vedelikku ja viia selle koos veega katseseadmesse.

Sageli ja eriti vähelahustuvate ainete puhul määratakse KHT meetodi ühe variatsiooni kohaselt, st suletud rõhuühthlustajaga süsteemis (H. Kelkenberg, 1975). Selle modifitseeritud meetodi abil saab edukalt uurida ka tavameetodi abil raskesti uuritavaid aineid, nt äädikhapet. Püridiiniga see meetod aga ei toimi. Kui kaaliumdikromaadi kontsentratsioon viiakse viite (1) kohaselt väärtuseni 0,0416 M (0,25 N), võimaldab see 5–10 mg ainet otse sisse kaaluda, mis on vees vähelahustuvate ainete KHT määramisel väga oluline (viide (2)).

Muul juhul määratakse KHT seejärel mis tahes siseriikliku või rahvusvahelise standarditud meetodi abil.

## 2. ANDMED JA HINDAMINE

Kolvi sisu KHT arvutatakse valitud standarditud meetodi abil ja väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

(\*) Pärast kasutamist tuleb elavhõbedasooli sisaldavad lahused ümber töödelda, et vältida elavhõbeda sattumist looduskeskkonda.

**3. ARUANDLUS**

Ära tuleks märkida kasutatud standardmeetod.

Keemilise hapnikutarbena esitatakse vähemalt kolme mõõtmise keskmine tulemus. Registreerida tuleb kõik teadaolevad tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti tulemusi aine lisandeid, füüsikalist olekut ja omadusi käsitlevad andmed ja märkused.

Ära tuleb märkida elavhõbesulfaadi lisamine kloori segava mõju vähendamiseks.

**4. VIITED**

1. Kelkenberg, H., Z. Von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

2. Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Standardmeetodite näidisloend:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

**C.7. LAGUNEMINE – ABIOOTILINE LAGUNEMINE – HÜDROLÜÜSI SÕLTUVUS pH-st****1. MEETOD**

Meetod põhineb OECD katsesuunis (1).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Hüdrolüüs on oluline abiootilist lagunemist mõjutav reaktsioon. Reaktsiooni roll on eriti oluline madala biolagunduvusega ainete puhul ja võib mõjutada aine püsivust keskkonnas.

Hüdrolüüsireaktsioonid on enamasti näiliselt esimest järku reaktsioonid, mistõttu poolestusajad ei sõltu kontsentratsioonist. See võimaldab ekstrapoleerida laboratoorsetel kontsentratsioonidel saadud tulemusi ka looduskeskkonna tingimustele.

Lisaks on kirjeldatud mitut näidet (2), kust mitut tüüpi kemikaalide puhul ilmneb rahuldav kokkulangevus puhtas vees ja looduslikus vees saadud tulemuste vahel.

Katse läbiviimiseks on kasulik teada aine aururõhku.

Meetod sobib ainult vees lahustuvate ainete puhul. Lisandid võivad tulemusi mõjutada.

Ainete hüdrolüüsuvust tuleks uurida looduskeskkonnas enamlevinud pH väärtustel (pH 4–9).

## 1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Hüdrolüüs on aine RX reaktsioon veega. Seda võib summaarselt väljendada rühma X vahetumisena OH-rühmaga:



RX kontsentratsiooni vähenemise kiirus väljendub järgmiselt:

$$\text{kiirus} = k [\text{H}_2\text{O}] \cdot [\text{RX}] \quad [2]$$

Kuna vesi on aine suhtes suures liias, kirjeldatakse sellist tüüpi reaktsiooni tavaliselt näiliselt esimest järku reaktsioonina, mille näiv kiiruskonstant avaldub järgmiselt:

$$k_{\text{obs}} = k \times [\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

Ühe pH väärtuse ja temperatuuri T kohta saab selle konstandi leida järgmise valemiga:

$$k_{\text{obs}} = \frac{2,303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

kus:

$t$  = aeg,

$C_0$  = aine kontsentratsioon ajahetkel 0,

$C_t$  = aine kontsentratsioon ajahetkel  $t$ , ja

2,303 = teisendustegur naturaallogaritmi ja kümnendlogaritmi vahel.

Kontsentratsioonid väljendatakse grammides või moolides liitri kohta.

Konstandi  $k_{\text{abs}}$  ühik on  $(\text{aeg})^{-1}$ .

Poolestusaeg  $t_{1/2}$  on määratletud ajana, mis kulub testaine kontsentratsiooni vähenemiseks 50 % võrra, st:

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

Valemite 4 ja 5 põhjal saab näidata, et:

$$t_{1/2} = 0,693/k_{\text{obs}} \quad [6]$$

## 1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teise meetodi abil saadud tulemustega.

Võrdlusainetena on kasutatud järgmisi aineid (1):

atsetüülsalitsüülhape (aspiriin)

0,0-dietüül-0-(6-metüül-2-(1-metüületüül)-4-pürimidinüül)fosfortioaat. (Dimpylate, Diazinon)

## 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Aine lahustatakse vees madalal kontsentratsioonil, kindlal pH-l ja temperatuuril.

Aine kontsentratsiooni vähenemist ajas jälgitakse mis tahes sobiva analüüsimeetodi abil.

Kontsentratsiooni logaritmi muutus ajas esitatakse graafiliselt ja kui see on sirgjoon, saab selle tõusust leida esimest järku reaktsiooni kiiruskonstandi (vt punkti 2).

Kui kiiruskonstandi otsene määramine kindlal temperatuuril ei ole praktiline, võib tavaliselt leida konstandi hinnangulise väärtuse Arrheniuse võrrandist, mis näitab kiiruskonstandi temperatuurisõltuvust. Kiiruskonstandi väärtuse, mida otse ei saa leida, saab ekstrapoleerida asjakohasel temperatuuril määratud lineaarselt kiiruskonstandi logaritmi vs. absoluutse temperatuuri K graafikult.

## 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Viites 2 on ära toodud, et 13 orgaaniliste ühendite klassi hüdrolüüsi kiiruskonstante saab määrata suure täpsusega.

Korratavus sõltub eelkõige pH ja temperatuurirežiimi täpsusest ning seda võib mõjutada mikroorganismide olemasolu ja erijuhtudel lahustunud hapniku kontsentratsioon.

## 1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Reaktiivid**1.6.1.1. *Puhverlahused*

Katse tehakse kolmel pH väärtusel: 4,0, 7,0 ja 9,0.

Selleks tuleks valmistada reaktiivi puhtusastmega kemikaalidest ja destilleeritud või deioniseeritud steriilsest veest puhverlahused. Mõned puhversüsteemide näited on toodud liites.

Kasutatav puhversüsteem võib mõjutada hüdrolüüsi kiirust; kui on sellele viitavaid märke, tuleks kasutada teist puhversüsteemi. Viites (2) soovitatakse fosfaatpuhverlahuse asemel kasutada boraat- või atsetaatpuhverid.

Kui puhverlahuse pH katsetemperatuuril ei ole teada, võib selle valitud temperatuuril määrata kalibreeritud pH-meetri abil, täpsusega  $\pm 0,1$  pH ühikut.

1.6.1.2. *Katselahused*

Testaine tuleks lahustada valitud puhverlahuses ja selle kontsentratsioon ei tohiks ületada 0,01 M või poolt küllastuskontsentratsiooni olenevalt sellest, kumb on madalam.

Veega segunevaid orgaanilisi lahusteid on soovitatav kasutada ainult vees vähelahustuvate ainete puhul.

Lahusti kogus peaks olema alla 1 % ja see ei tohiks segada hüdrolüüsiprotsessi.

#### 1.6.2. **Seadmed**

Kasutada tuleks korgiga klaaskolbe, vältida tuleb määride kasutamist lihvihendusel.

Kui aine või puhversüsteem on lenduv või kui katset tehakse kõrgematel temperatuuridel, on eelistatav kasutada hermeetilisi või metallsulguriga kummikorgiga katseklaase ja vältida tuleks tühja ruumi nõu ülasosas.

#### 1.6.3. **Analüüsimeetod**

Meetod peab olema piisavalt spetsiifiline, võimaldama testaine määramist katselahuse kontsentratsioonidel ja võib koosneda mitme sobiva analüüsimeetodi kombinatsioonist.

Analüüsimeetodi valik sõltub aine iseloomust, meetod peab olema küllalt täpne ja tundlik, võimaldamaks avastada algkontsentratsiooni 10 % vähenemise.

#### 1.6.4. **Katsetingimused**

Katsed viiakse läbi termostateeritud kambris või vannis, mis on  $\pm 0,5$  °C täpsusega reguleeritud valitud temperatuurile. Temperatuuri hoitakse ja mõõdetakse  $\pm 0,1$  °C täpsusega. Fotolüüsi segavat mõju tuleks sobivate vahenditega vältida.

Kergesti oksüdeeruvate ainete puhul tuleb tagada lahustunud hapniku puudumine lahuses (nt 5-minutilise lämmastiku või argooni läbijuhtimisega enne lahuse valmistamist).

#### 1.6.5. **Katse käik**

##### 1.6.5.1. *Eelkatse*

Kõigi ainetega tuleks  $50 \pm 0,5$  °C juures teha eelkatse kolmel pH tasemel: 4,0, 7,0 ja 9,0. Tehakse küllaldane arv mõõtmisi, et iga pH ja 50 °C puhul hinnata, kas poolestusaeg on alla 2,4 tunni või kas hüdrolüüsumine toimub 5 päeva jooksul vähem kui 10 % ulatuses. (On arusaadav, et need väärtused vastavad looduseskkonnale iseloomulikumatel tingimustel (25 °C) vastavalt vähem kui päevasele ja rohkem kui aastasele poolestusajale).

Kui eelkatse näitab, et 50 °C juures hüdrolüüsib kõigil kolmel pH väärtusel (4, 7 ja 9) 2,4 tunni jooksul rohkem kui 50 % testainest või hüdrolüüsib 5 päeva jooksul vähem kui 10 % testainest, pole edasine uurimine vajalik.

Muudel juhtudel või üksikutel pH väärtustel, mille puhul see tingimus ei ole täidetud, tehakse katse nr 1.

##### 1.6.5.2. *Katse nr 1*

Katse nr 1 tehakse ühel temperatuuril, eelistatavalt  $50 \pm 0,5$  °C ja võimalusel steriilsetes tingimustes pH-l, mille kohta eelkatse näitas edasise uurimise vajadust.

Valida tuleks küllaldane proovide arv (vähemalt neli), mis haaraks hüdrolüüsisivahemiku 20–70 %, et uurida näiliselt esimest järku reaktsiooni määratud pH väärtustel.

Igal pH väärtusel, millel katse nr 1 tehakse, määratakse reaktsiooni järk.

*25 °C-le vastava kiiruskonstandi hinnanguline määramine*

Katse jätkamise viis sõltub sellest, kas katsest nr 1 võib järeldada, et reaktsioon on näiliselt esimest järku või mitte.

Kui katsest nr 1 ei saa kindlalt järeldada, et reaktsioon on näiliselt esimest järku, tuleb katseid jätkata katse nr 2 kirjeldatud moel.

Kui katsest nr 1 saab kindlalt järeldada, et reaktsioon on näiliselt esimest järku, tuleks katseid jätkata katse nr 3 kirjeldatud moel. (Samuti võib eritingimustel olla võimalik arvutada kiiruskonstandid 25 °C juures kiiruskonstantidest 50 °C juures, kasutades katse nr 1 saadud tulemusi (vt 3.2)).

**1.6.5.3. Katse nr 2**

Katse tehakse kõigil pH väärtustel, mille kohta katse nr 1 tulemused on näidanud vastavat vajadust:

— kas ühel temperatuuril alla 40 °C,

— või kahel temperatuuril üle 50 °C ja vahega vähemalt 10 °C.

Igal pH väärtusel ja temperatuuril, millel katse nr 2 tehakse, tuleks kasutada vähemalt kuut sobivate vahedega andmepunkti, mis jääks hüdroliüsiastme vahemikku 20–70 %.

Ühe pH ja ühe temperatuuri puhul tehakse korraga kaks määramist. Kui katse nr 2 on tehtud kahel üle 50 °C temperatuuril, tuleks korduskatse teha sellel temperatuuril, mis on madalam.

Igal pH väärtusel ja temperatuuril, millel katse nr 2 tehakse, tuleks võimalusel esitada poolestusaja ( $t_{1/2}$ ) graafiline määramine.

**1.6.5.4. Katse nr 3**

Katse tehakse kõigil pH väärtustel, mille kohta katse nr 1 tulemused on näidanud vastavat vajadust:

— kas ühel temperatuuril alla 40 °C,

— või kahel temperatuuril üle 50 °C ja vahega vähemalt 10 °C.

Igal pH väärtusel ja temperatuuril, millel katse nr 3 tehakse, tuleb valida kolm andmepunkti, esimene ajahetkel 0, teine ja kolmas hüdroliüsiastmel üle 30 %; arvutada tuleks konstant  $k_{\text{abs}}$  ja  $t_{1/2}$ .

**2. ANDMED**

Näiliselt esimest järku reaktsiooni  $k_{\text{obs}}$  igal katses kasutatud pH väärtusel ja temperatuuril võib leida logaritmilise kontsentratsiooni graafikult ajas, kasutades valemit:

$$k_{\text{obs}} = -\text{tõus} \times 2,303 \quad [7]$$

Lisaks võib valemi 6 järgi arvutada  $t_{1/2}$ .

Leitakse hinnanguline  $k_{25\text{ °C}}$ , kasutades sobivas kohas Arrheniuse võrrandit.

Mittenäilist esimest järku reaktsiooni puhul vt 3.1.

3. **ARUANNE**

## 3.1. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimalusel järgmisi andmeid:

- aine kirjeldust,
- võrdlusainega tehtud katsete tulemusi, kui neid tehti,
- kasutatud analüüsimeetodi põhimõtet ja üksikasju,
- iga katse kohta: temperatuuri, pH väärtust, puhverlahuse koostist ja tabelit kõigi kontsentratsioon-aeg andmepunktidega,
- näiliselt esimest järku reaktsiooni puhul  $k_{\text{abs}}$  ja  $t_{1/2}$  väärtusi ja nende arvutuskäiku,
- mittenäilist esimest järku reaktsiooni puhul logaritmilise kontsentratsiooni graafikut ajas,
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid andmeid ja märkusi.

## 3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

On võimalik, et 25 °C juures saab testainete küllalt usaldusväärsed kiiruskonstandid leida arvutuslikult tingimisel, et on olemas katselised aktivatsioonienergia väärtused testaine homoloogide kohta ja tingimisel, et võib mõistlikult eeldada, et testaine aktivatsioonienergia on nendega samas suurusjärgus.

4. **VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. W. Mabey and T. Mill, "Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions," J. Phys. Chem. Ref. Data, 1978, vol. 7 (2), 383–415.

*Liide***PUHVERSEGUD**A. **CLARK JA LUBS**

Siin tabelites toodud pH väärtused on arvutatud potentsiaali mõõtmistest, kasutades Sørenseni standardvõrrandeid. Tegelikud pH väärtused on tabeliväärtustest 0,04 ühikut kõrgemad.

| Koostis                                                        | pH  |
|----------------------------------------------------------------|-----|
| 0,1 M kaaliumvesinikftalaati + 0,1 M HCl temperatuuril 20 °C   |     |
| 2,63 ml 0,1 M HCl + 50 ml ftalaati ruumalale 100 ml            | 3,8 |
| 0,1 M kaaliumvesinikftalaati + 0,1 M NaOH temperatuuril 20 °C  |     |
| 0,40 ml 0,1 M NaOH + 50 ml ftalaati ruumalale 100 ml           | 4,0 |
| 3,70 ml 0,1 M NaOH + 50 ml ftalaati ruumalale 100 ml           | 4,2 |
| 0,1 M kaalimdivesinikfosfaati + 0,1 M NaOH temperatuuril 20 °C |     |
| 23,45 ml 0,1 M NaOH + 50 ml fosfaati ruumalale 100 ml          | 6,8 |
| 29,63 ml 0,1 M NaOH + 50 ml fosfaati ruumalale 100 ml          | 7,0 |
| 35,00 ml 0,1 M NaOH + 50 ml fosfaati ruumalale 100 ml          | 7,2 |

|                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| 0,1 M $\text{H}_3\text{BO}_3$ 0,1 M KCl-s + 0,1 M NaOH temperatuuril 20 °C |     |
| 16,30 ml 0,1 M NaOH + 50 ml boorhapet ruumalale 100 ml                     | 8,8 |
| 21,30 ml 0,1 M NaOH + 50 ml boorhapet ruumalale 100 ml                     | 9,0 |
| 26,70 mn 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet ruumalale 100 ml                     | 9,2 |

B. **KOLTHOFF JA VLEESHOUWER**

|                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Koostis                                                                                                           | pH  |
| 0,1 M kaaliumtsitraati ja 0,1 M NaOH temperatuuril 18 °C (hallituse tekke vastu lisatakse väike kristall tümooli) |     |
| 2,0 ml 0,1 M NaOH + 50 ml tsitraati ruumalale 100 ml                                                              | 3,8 |
| 9,0 ml 0,1 M NaOH + 50 ml tsitraati ruumalale 100 ml                                                              | 4,0 |
| 16,3 ml 0,1 M NaOH + 50 ml tsitraati ruumalale 100 ml                                                             | 4,2 |

C. **SÖRENSEN**

0,05 M booraksit + 0,1 M HCl

| Koostis      |          | pH             |        |       |       |
|--------------|----------|----------------|--------|-------|-------|
| booraks (ml) | HCl (ml) | Sörensen 18 °C | Walbum |       |       |
|              |          |                | 10 °C  | 40 °C | 70 °C |
| 8,0          | 2,0      | 8,91           | 8,96   | 8,77  | 8,59  |
| 8,5          | 1,5      | 9,01           | 9,06   | 8,86  | 8,67  |
| 9,0          | 1,0      | 9,09           | 9,14   | 8,94  | 8,74  |
| 9,5          | 0,5      | 9,17           | 9,22   | 9,01  | 8,80  |
| 10,0         | 0,0      | 9,24           | 9,30   | 9,08  | 8,86  |

0,05 M booraksit + 0,1 M NaOH

| Koostis      |           | pH             |        |       |       |
|--------------|-----------|----------------|--------|-------|-------|
| booraks (ml) | NaOH (ml) | Sörensen 18 °C | Walbum |       |       |
|              |           |                | 10 °C  | 40 °C | 70 °C |
| 10,0         | 0,0       | 9,24           | 9,30   | 9,08  | 8,86  |
| 9,0          | 1,0       | 9,36           | 9,42   | 9,18  | 8,94  |
| 8,0          | 2,0       | 9,50           | 9,57   | 9,30  | 9,02  |
| 7,0          | 3,0       | 9,68           | 9,76   | 9,44  | 9,12  |