

384L0449

19.9.84

EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI

Nr L 251/1

KOMISSION DIREKTIIVI,

annettu 25 päivänä huhtikuuta 1984,

vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen kuudennen kerran

(84/449/ETY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 27 päivänä kesäkuuta 1967 annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY⁽¹⁾, sellaisena kuin se on muutettuna kuudennen kerran neuvoston direktiivillä 79/831/ETY⁽²⁾, ja erityisesti sen 19, 20 ja 21 artiklan,

sekä katsoo, että

direktiivin 79/831/ETY 3 artiklan 1 kohdassa säädetään, että aineiden ja valmisteiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, myrkyllisyys ja ympäristömyrkyllisyys on määritettävä liitteessä V määrätyillä menetelmillä,

18 päivänä syyskuuta 1979 annetun direktiivin 79/831/ETY 19 artiklassa säädetään, että liite V ja siinä mainittu tekniikan kehitykseen mukauttamista käsittelevä komitea otetaan käytäntöön ja toimivaltaisten kansainvälisten järjestäjien hyväksymiin menetelmiin olisi erityisesti kiinnitettävä huomiota, ja

tämän direktiivin säännökset ovat vaarallisten aineiden ja valmisteiden kaupan teknisten esteiden poistamiseksi

annettujen direktiivien mukauttamista tekniikan kehitykseen käsittelevän komitean lausunnon mukaisia,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Direktiivin 67/548/ETY liite V korvataan tämän direktiivin liitteellä.

2 artikla

Jäsenvaltioiden on annettava ja julkaistava 1 päivään heinäkuuta 1985 mennessä tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät toimenpiteet ja ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä. Niiden on täytännönpantava nämä toimenpiteet viimeistään 1 päivään heinäkuuta 1986 mennessä.

3 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 25 päivänä huhtikuuta 1984.

Komission puolesta

Karl-Heinz NARJES

Komission jäsen

(¹) EYVL N:o L 196, 16.8.1967, s. 1

(²) EYVL N:o L 259, 15.10.1979, s. 10

LIITE

Tämä liite sisältää direktiivin 79/831/ETY liitteissä VII ja VIII lueteltujen fysikaalis-kemiallisten, myrkyllisten ja ympäristömyrkyllisten ominaisuuksien määrittämiseen käytetyt testausmenetelmät.

Menetelmät perustuvat toimivaltaisten kansainvälisten järjestöjen [erityisesti Taloudellisen yhteistyön- ja kehitysjärjestön (OECD:n)] hyväksymiin ja suosittelemiin menetelmiin.

Milloin tällaisia menetelmiä ei ole ollut käytettävissä, on käytetty kansallisia standardeja tai yhteisesti sovittuja tieteellisiä menetelmiä. Testit olisi yleensä tehtävä kaupan pidettävällä aineella. Epäpuhtauksien mahdollinen vaikutus testituloksiin on otettava huomioon.

Milloin tämän liitteen menetelmät eivät sovellu tietyn ominaisuuden tutkimiseen, ilmoittajan on perusteltava vaihtoehtoisen menetelmän käyttö.

Eläinkokeet ja -tutkimukset on tehtävä kansallisten määräysten ja humanien periaatteiden mukaisesti sekä ottaen huomioon eläinten suojelua koskeva viimeinen kansainvälinen kehitys.

Samanarvoisista testausmenetelmistä valitaan se, johon tarvitaan vähiten eläimiä.

SISÄLLYSLUETTELO

	Sivu
OSA A: FYSIKAALIS-KEMIAALLISTEN OMINAISUUKSIEN MÄÄRITYSMENETELMÄT ..	6
A. 1. Sulamispiste/sulamisväli	6
A. 2. Kiehumispiste/kiehumisväli	15
A. 3. Suhteellinen tiheys	22
A. 4. Höyrynpaine	27
A. 5. Pintajännitys	39
A. 6. Vesiliukoisuus	46
A. 7. Rasvaliukoisuus	55
A. 8. Jakautumiskerroin	59
A. 9. Leimahduspiste	63
A. 10. Tulenarkuus (kiinteät aineet)	65
A. 11. Tulenarkuus (kaasut)	68
A. 12. Tulenarkuus (aineet ja valmisteet, jotka ollessaan kosketuksissa veden tai kostean ilman kanssa kehittävät vaarallisia määriä herkästi syttyviä kaasuja)	70
A. 13. Tulenarkuus (kiinteät aineet ja nesteet)	74
A. 14. Räjähdysominaisuudet	76
A. 15. Itsestään syttyminen (haihtuvien nesteiden ja kaasujen itsesyttymisen lämpötilan määrittäminen)	86
A. 16. Itsestään syttyminen (kiinteät aineet – suhteellisen itsesyttymisen lämpötilan määrittäminen)	88
A. 17. Hapettumisominaisuudet	91
OSA B: MYRKYLLISYYDEN MÄÄRITYSMENETELMÄT	96
Yleisjohtanto:	96
B. 1. Akuutti myrkyllisyys (oraalinen)	98
B. 2. Akuutti myrkyllisyys (inhalaatio)	101
B. 3. Akuutti myrkyllisyys (ihon kautta)	105
B. 4. Akuutti myrkyllisyys (ihon ärsytys)	108
B. 5. Akuutti myrkyllisyys (silmän ärsytys)	111
B. 6. Akuutti myrkyllisyys (ihon herkistyminen)	115
B. 7. Subakuutti myrkyllisyys (oraalinen)	120
B. 8. Subakuutti myrkyllisyys (inhalaatio)	124
B. 9. Subakuutti myrkyllisyys (ihon kautta)	129
B. 10. Muut vaikutukset — mutageenisuus (nisäkässoluviljelmällä suoritettava sytogeneisuustesti <i>in vitro</i>)	133
B. 11. Muut vaikutukset — mutageenisuus (nisäkkään luuydinsytogeneisuustesti <i>in vivo</i> , kromosomianalyysi)	136
B. 12. Muut vaikutukset — mutageenisuus (mikrotumatesti)	139
B. 13. Muut vaikutukset — mutageenisuus (<i>Escherichia coli</i> -takaisinmutaatiotesti)	142
B. 14. Muut vaikutukset — mutageenisuus (<i>Salmonella typhimurium</i> -takaisinmutaatiotesti)	145
OSA C: YMPÄRISTÖMYRKYLLISYYDEN MÄÄRITYSMENETELMÄT	148
C. 1. Akuutti myrkyllisyys kaloilla	148
C. 2. Akuutti myrkyllisyys <i>Daphnialla</i>	157
C. 3. Hajoaminen — biologinen hajoaminen: modifioitu OECD:n seulontatesti	162
C. 4. Hajoaminen — biologinen hajoaminen: modifioitu AFNOR-testi NF T 90/302	172
C. 5. Hajoaminen — biologinen hajoaminen: modifioitu Sturm-testi	181
C. 6. Hajoaminen — biologinen hajoaminen: suljettu pullotesti	190
C. 7. Hajoaminen — biologinen hajoaminen: modifioitu MITI-testi	201
C. 8. Hajoaminen — biokemiallinen hapen tarve	214
C. 9. Hajoaminen — kemiallinen hapen tarve	216
C. 10. Hajoaminen — abioottinen hajoaminen: hydrolyysi pH:n funktiona	218

OSA A: FYSIKAALIS-KEMIAALLISTEN OMINAISUUKSIEN MÄÄRITYSMENETELMÄT**A. 1. SULAMISPISTE/SULAMISVÄLI****1 MENETELMÄ**

Selostetut menetelmät perustuvat OECD:n testausohjeisiin (1).

1.1 Johdanto

Jäljempänä selostettuja menetelmiä ja laitteita voidaan käyttää kemiallisten aineiden sulamispisteen määrittäisiin niiden puhtausasteesta riippumatta.

Menetelmän valinta riippuu testattavan aineen laadusta.

Tästä johtuen rajoittavana tekijänä on, onko aine helposti, vaikeasti tai ei lainkaan jauhettavissa.

Tiettyjen aineiden osalta jäätymis- tai jähmettymispisteen määrittäminen on tarkoituksenmukaisempaa. Sen vuoksi on myös näitä määrittämiä koskevat standardit.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Sulamispisteeksi määritetään lämpötila, jossa faasimuutos kiinteästä nestemäiseksi tapahtuu normaalissa ilmanpaineessa.

Tämä lämpötila vastaa parhaassa tapauksessa jähmettymispisteen tai jäätymispisteen lämpötilaa.

Koska useiden aineiden faasimuutos tapahtuu laajalla lämpötilavälillä, sitä kutsutaan usein sulamisväliksi.

Yksiköiden muuntaminen (kelvinasteet celsiusasteiksi)

$$t = T - 273,15,$$

jossa t merkitsee celsiusasteita, T kelvinasteita.

1.3 Vertailuaineet

Aina ei tarvitse käyttää vertailuaineita tutkittaessa uutta ainetta. Niitä käytetään etupäässä menetelmän kalibrointiin ja tulosten vertailuun jotakin muuta menetelmää käytettäessä.

Lähdeluettelossa (2) luetellaan joitakin kalibrointiaineita.

1.4 Testausmenetelmän periaatteet

Kiinteästä olomuodosta nestemäiseen olomuotoon tapahtuvan faasimuutoksen lämpötila (lämpötilaväli) määritetään. Käytännössä määritetään sulamisen alkamislämpötila ja sulamisen loppuvaiheen lämpötila, kun testattavan aineen näytettä kuumennetaan ilmanpaineessa. Kolme menetelmää selostetaan: kapillaarimenetelmä, kuumatasot-menetelmä sekä jäätymispisteen määrittäykset.

1.4.1 *Kapillaarimenetelmä*

1.4.1.1 Nestehaudetta käyttävät sulamispistelaitteet

Kapillaariputki täytetään tiiviisti pienellä määrällä hienoksi jauhettua ainetta. Putkea ja lämpömittaria lämmitetään yhdessä, ja lämpötilan nousuksi säädetään alle 1 K/min varsinaisen sulamisvaiheen aikana. Sulamisen alku- ja loppulämpötila määritetään.

1.4.1.2 Metallikappale

Käytetään 1.4.1.1 kohdassa selostettua tapaa, paitsi että kapillaariputki ja lämpömittari sijaitsevat kuumennetussa metallikappaleessa ja niitä tarkkaillaan kappaleessa olevista rei'istä.

1.4.1.3 Valokennomittaus

Kapillaariputkessa olevaa näytettä kuumennetaan automaattisesti metallisynterissä. Synterissä olevasta reiästä suunnataan valonsäde aineen läpi tarkkaan kalibroituun valokennoon. Sulamisvaiheessa useimpien aineiden optiset ominaisuudet muuttuvat valoa läpäisemättömästä läpinäkyviksi. Valokennoon osuvan valon intensiteetti kasvaa ja lähettää pysähtymissignaalin kuumakammiossa olevan platinavastuslämpömittarin digitaali-ilmaisimeen. Tämä menetelmä ei sovellu hyvin värikkäiden aineiden mittauksiin.

1.4.2 *Kuumatasot*

1.4.2.1 Koflerin kuumasauva

Koflerin kuumasauvamenetelmässä kuumennetaan sähköllä tankoa, joka on tehty kahdesta metallikappaleesta, joilla on erilainen lämmönjohtavuus. Tanko on suunniteltu niin, että lämpötilan muutosnopeus on miltei lineaarinen pituussuunnassa. Kuumasauvan lämpötilan vaihtelu voi olla 283—543 K, ja sauvassa on siihen erityisesti suunniteltu lämpötilan lukulaite piirtureineen, osoittimineen ja pysäyttäjineen. Sulamispistettä määritettäessä ohut kerros ainetta laitetaan suoraan kuumasauvan pinnalle. Muutamassa sekunnissa syntyy terävä jakoviiva nesteen ja kiinteän faasin väliin. Jakoviivan lämpötila saadaan asettamalla osoitin koskettamaan viivaa.

1.4.2.2 Sulamispistemikroskooppi

Hyvin pienien ainemäärien ollessa kyseessä voidaan suorittaa sulamispistemittaus mikroskooppia käyttäen. Useimmissa kuumatasoissa lämpötila mitataan herkällä termoparilla, mutta joskus käytetään myös elohopealämpömittaria. Tyypillisessä kuumatasoa käyttävässä sulamispistemikroskoopissa on kuumennuskammio, jossa olevalle metallilevylle näyte asetetaan ohuella lasilevyllä. Metallilevyn keskellä olevasta reiästä tulee mikroskoopin peilin valo. Käytön ajaksi kammio suljetaan lasilevyllä, jotta ilmaa ei pääse työtilasta kammioon.

Näytteen kuumennusta säädellään reostaatilla. Optisesti anisotrooppisia aineita voidaan mitata erittäin tarkasti polaroivan valon avulla.

1.4.2.3 Meniskimenetelmä

Tämä menetelmä soveltuu erityisen hyvin polyamideille.

Lämpötila, jossa kuumatason ja polyamidinäytteen päällä olevan peitelasin väliin asetettu silikoniöljymeniski siirtyy, määritetään silmämääräisesti.

1.4.3 Jäätymispisteen määrittäminen

Näyte asetetaan koeputkessa kiteytymispisteen määrittäslaitteeseen. Näytettä sekoitetaan varovaisesti koko ajan jäähtymisvaiheen aikana ja lämpötila mitataan ja kirjataan 30 sekunnin välein. Kun lämpötila pysyy samana muutamien mittausten aikana, tämä lämpötila (jossa lämpömittarivirhe on korjattu) kirjataan kiteytymispisteeksi.

1.5 Laatuksiteerit

Sulamisasteen/sulamisvälin määrittämiseen käytettyjen menetelmien soveltavuus ja tarkkuus on esitetty alla olevassa taulukossa:

TAULUKKO: MENETELMIEN SOVELTUVUUS

A. Kapillaarimenetelmät

Mittausmenetelmä	Aineet, jotka voidaan jauhaa	Aineet, joita ei helposti voida jauhaa	Lämpötilaväli	Maksimitarkkuusarvio ⁽¹⁾	Huom.
Nestehaudetta käyttävä sulamispistelaite	Kyllä	Vain muutamat	273—573 K	± 0,3 K	Voimassa oleva standardi JIS K 0064
Metallikappaletta käyttävä sulamispistelaite	Kyllä	Vain muutamat	293—573 K	± 0,5 K	Voimassa oleva standardi ISO 1218 (E)
Valokenno-mittausapulaitteet	Kyllä	Useat käytettäessä	253—573 K	± 0,1 K	

⁽¹⁾ Arvo riippuu laitetypistä ja aineen puhtausasteesta.

B. Kuumatasot ja jäätymismenetelmät

Mittausmenetelmä	Aineet, jotka voidaan jauhaa	Aineet, joita ei helposti voida jauhaa	Lämpötilaväli	Maksimitarkkuusarvio ⁽¹⁾	Huom.
Koflerinkuömasauva	Kyllä	Ei	283—543 K	± 1,0 K	Voimassa oleva standardi ANSI/ASTM D 3451-76
Sulatusmikrooskooppi	Kyllä	Vain muutamat	273—573 K (1773 K asti)	± 0,5 K	Voimassa oleva standardi DIN 53736
Meniskimenetelmä	Ei	Erityisesti polyamidit	293—573 K	± 0,5 K	Voimassa oleva standardi ISO 1218 (E)
Jäätymismenetelmä	Nestemäiset	Nestemäiset aineet	223—573 K	± 0,5 K	Voimassa oleva standardi, esim. BS 4699

⁽¹⁾ Arvo riippuu laitetypistä ja aineen puhtausasteesta.

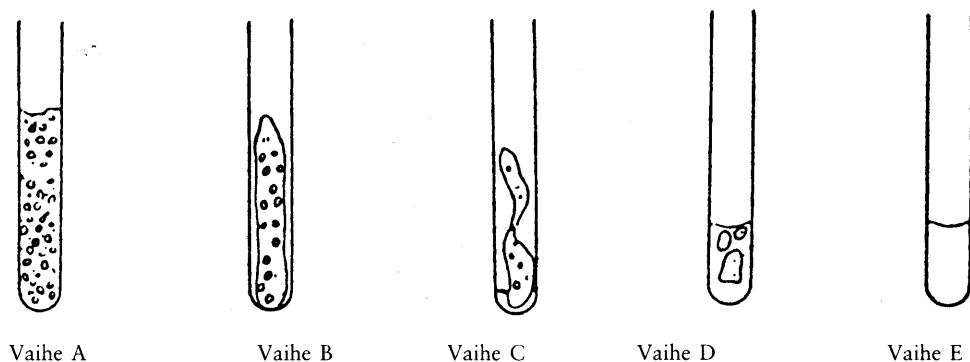
1.6 Menetelmien selostus

Miltei kaikkien testausmenetelmien toimintaperiaatteet on selostettu kansainvälisissä ja kansallisissa standardeissa (ks. lisäys).

1.6.1 Kapillaariputkimenetelmät

Hienoksi jauhettuja aineita testattaessa voidaan yleensä erottaa kuvassa 1 esitetyt sulamisvaiheet lämpötilan hitaan kohoamisen aikana.

Kuva 1



Vaihe A (Sulamisen alku, märkäpiste): pieniä pisaroita kiinnittyy tasaisesti kapillaariputken sisäseinään.

Vaihe B (Kutistumispiste): näytteen ja putken sisäpinnan väliin muodostuu tilaa sulavan aineen kutistuessa.

Vaihe C (Luhistumispiste): kutistunut näyte alkaa luhistua alaspäin ja nesteytyä.

Vaihe D (Nesteytymispiste): pintaan muodostuu täydellinen meniski, mutta suurehko osa näytteestä on vielä kiinteää.

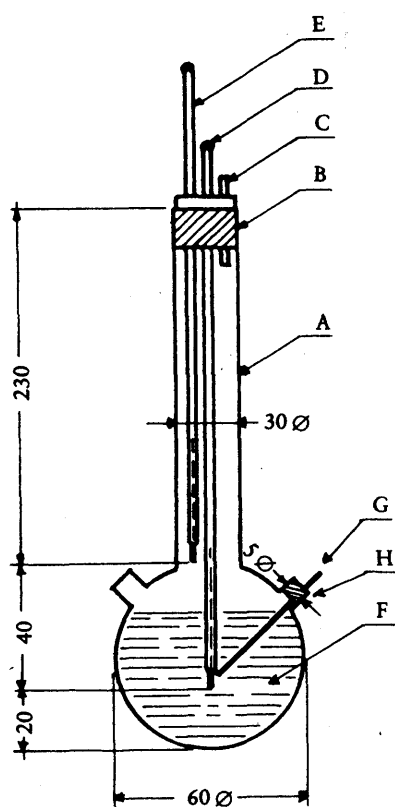
Vaihe E (Lopullinen sulamisvaihe): kiinteitä aineosia ei ole.

Sulamispistettä määritettäessä lämpötila kirjataan sulamisen alkaessa ja sen viimeisessä vaiheessa.

1.6.1.1 Sulamispistelaitteet, joissa on nestehaudelaitteisto

Kuva 2 esittää standardoitua sulamispistelaitetta (JIS K 0064). Kaikki mitat on ilmaistu millimeetreinä. Laitte on lasia.

Kuva 2



- A: Mittausastia
 B: Korkkitulppa
 C: Poistoaukko
 D: Lämpömittari
 E: Apulämpömittari
 F: Haudeneste
 G: Lasinen kapillaariputki, pituus 80—100 mm, sisäläpimitta $1,0 \pm 0,2$ mm, seinämän paksuus 0,2—0,3 mm
 H: Sivuputki

Haudeneste:

Sulamispisteen perusteella valitaan alla olevista sopiva neste. Nestemäinen parafiini sopii mittauksiin, joissa sulamispiste on korkeintaan 473 K, väkevöity rikkihappo tai silikoniöljy sulamispisteen ollessa korkeintaan 573 K.

Mitattaessa 523 kelvinasteen ylittäviä sulamispisteitä voidaan käyttää seosta, jossa on kolme osaa rikkihappoa ja kaksi osaa kaliumsulfaattia (painon suhteessa).

Lämpömittari:

Ainoastaan seuraavien tai niitä vastaavien standardien vaatimukset täyttäviä lämpömittareita voidaan käyttää: ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Testin suorittaminen:

Kuiva aine jauhetaan hienoksi huhmaressa. Toisesta päästä umpinainen kapillaariputki täytetään tiiviisti noin 3 mm:n korkeudelle. Jotta näytteet olisivat yhdenmukaisia, kapillaariputki pudotetaan pystysuoraan noin 700 mm:n korkeudelta lasiputken läpi kellonlasille.

Täytetyt kapillaariputket asetetaan hauteeseen siten, että lämpömittarin elohopeapallon keskiosa koskettaa kapillaariputken näytteellä täytettyä osaa. Tavallisesti kapillaariputki asetetaan laitteeseen lämpötilan ollessa noin 10 K sulamispisteen alapuolella.

Haudetta kuumennetaan siten, että lämpötila nousee noin 3 K/min. Nestettä on hämmennettävä. Lämpötilan ollessa noin 10 K arvioidun sulamislämpötilan alapuolella lämmön nousuksi säädetään korkeintaan 1 K/min.

Laskeminen:

Sulamispiste lasketaan seuraavasti:

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

jossa:

T = korjattu sulamislämpötila Kelvin-asteina

T_D = lämpömittari D:n lukema Kelvin-asteina

T_E = lämpömittari E:n lukema Kelvin-asteina

n = lämpömittari D:n elohopea-asteiden lukumäärä mittarin mitattavan aineen ulkopuolella olevassa osassa.

1.6.1.2 Metallikappale

Laite:

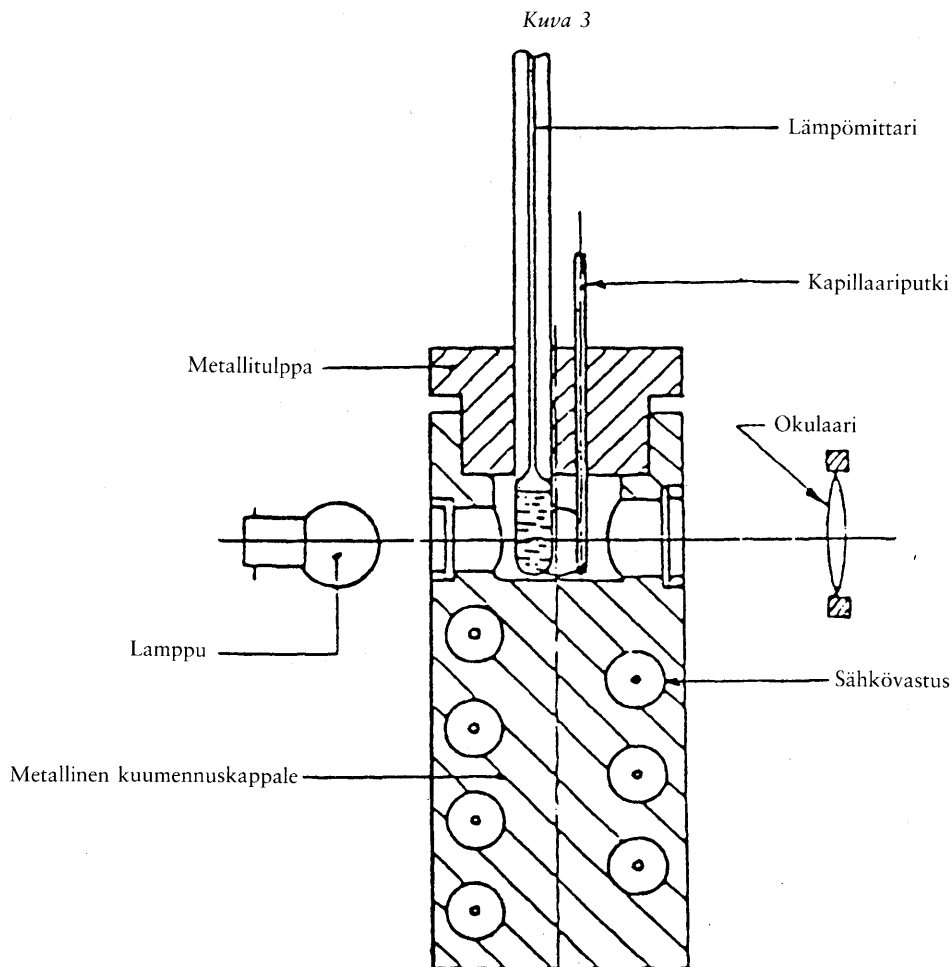
Laitteessa on seuraavat osat:

- lieriömäinen metallikappale, joka on yläosastaan ontto ja muodostaa kammion (ks. kuva 3),
- metallitulppa, jossa on vähintään kaksi reikää, joiden läpi putket asetetaan metallikappaleeseen,
- metallikappaleen kuumennusjärjestelmä, esimerkiksi kappaleeseen asennettu sähkövastus,
- reostaatti virransäätelyyn sähkökuumennusta käytettäessä,
- neljä lämmönkestävää lasi-ikkunaa kammion sivuilla suorassa kulmassa toisiinsa nähden; yhden ikkunan edessä on okulaari kapillaariputken tarkkailua varten; kolmea muuta ikkunaa käytetään kammion valaisemiseen lampuilla,
- toisesta päästä umpinainen lämmönkestävää lasia oleva kapillaariputki (ks. 1.6.1.1. kohta).

Lämpömittari

Ks. standardit 1.6.1.1 kohdassa.

Muita sähkölämpölaitteita voidaan käyttää, mikäli niillä saadaan yhtä tarkat tulokset.



Testin suorittaminen:

Ks. 1.6.1.1 kohta. Tässä tapauksessa ei tehdä lämpömittarin lukeman korjausta. Sulamamispisteen kirjattu lämpötila katsotaan sulamispisteeksi.

1.6.1.3 Valokennomittaus

Laite ja testin suorittaminen:

Laitteessa on automaattisesti kuumeneva metallikammio. Kolme kapillaariputkea täytetään kuten 1.6.1.1 kohdassa on määrätty ja asetetaan kammioon.

Viisi lineaarista lämpötilan lisäystä on käytettävissä laitteen kalibroimiseksi, ja sopiva lämpötilan nousu säädetään sähköisesti ennalta valitun vakion ja lineaarinopeuden mukaan. Rekisteröintilaitte ilmoittaa uunin todellisen lämpötilan ja kapillaariputkissa olevan aineen sulamispisteen.

1.6.2 Kuumatasot

1.6.2.1 Koflerin kuumatanko

Ks. lisäys.

1.6.2.2 Sulamismikroskooppi

Ks. lisäys.

1.6.2.3 Meniskimenetelmä (polyamidit)

Ks. lisäys.

Kuumennusnopeuden sulamispisteen ohitukseen saakka on oltava alle 1 K/min.

1.6.3 Jäätymispisteen määrittämenetelmät

Ks. lisäys.

2 TULOKSET

Lämpömittarin lukeman korjaus on tehtävä joissakin tapauksissa.

3 RAPORTOINTI

Käytetty menetelmä on ilmoitettava.

Raportoitu sulamispiste on vähintään kahden tarkkuusarvion rajoissa olevan mittauksen keskiarvo (katso taulukko). Tarkkuusarvio on esitettävä. Jos sulamisen alkua- ja loppulämpötilojen ero pysyy menetelmän tarkkuusrajoissa, sulamisen viimeisen vaiheen lämpötila katsotaan sulamispisteeksi; muussa tapauksessa ilmoitetaan molemmat lämpötilat.

Eräät aineet hajoavat tai sublimoituvat ennen sulamispistettä. Tämä on raportoitava.

Käikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomautukset on raportoitava, erityisesti aineen fysikaalista tilaa ja epäpuhtauksia koskevat.

4 LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102 — Decision of the Council C (81) 30 Final.
- (2) IUPAC, Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 48, 1976, s. 505—515.

Lisäys

Teknisiä lisätietoja on saatavissa esimerkiksi seuraavista standardeista:

1 **Kapillaarimenetelmät**

1.1 *Nestehaudetta käyttävät sulamispistelaitteet*

ASTM E 324-69	Standard Test Method for Relative Initial and Final Melting Points and the Melting Range of Organic Chemicals
BS 4643	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 *Metallikappale-sulamispistelaitteet*

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics—Polyamides—Determination of "Melting Point"

2 **Kuumatasot**

2.1 *Koflerin kuumasauva*

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard Recommended Practices for Testing Polymeric Powder Coatings
---------------------	--

2.2 *Sulamismikroskooppi*

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

2.3 *Meniskimenetelmä (polyamidit)*

ISO 1218 (E)	Plastics — Polyamides — Determination of "Melting Point"
ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NFT 51-050	Résines du polyamides. Détermination du "point de fusion". Méthode du ménisque

3 **Jäätymispisteen määritysmenetelmät**

BS 4633	Method for the Determination of Crystallizing Point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (Cooling Curve)
DIN 10319	Bestimmung des Gefrierpunktes von Milch

DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
DIN 51556	Bestimmung des Erstarrungspunktes am rotierenden Thermometer
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines

A. 2. KIEHUMISPISTE/KIEHUMISVÄLI**1 MENETELMÄ**

Selostetut menetelmät perustuvat OECD:n testausohjeisiin (1).

1.1 Johdanto

Jäljempänä selostettujen menetelmien ja laitteiden avulla voidaan testata nestemäisiä aineita, jolleivät ne reagoi kemiallisesti kiehumispisteen alapuolella (esimerkiksi autoksidaatio, toisiintuminen, hajoaminen jne.). Menetelmät soveltuvat sekä puhtaiden että epäpuhtaiden nestemäisten aineiden testauksiin.

Valokennoilmaisinta käyttävä menetelmä on suositeltava, koska tämän menetelmän avulla voidaan määrittää myös sulamispiste kiehumispisteen ohella. Mittaukset voidaan lisäksi suorittaa automaattisesti.

"Dynaamisella menetelmällä" on se etu, että sen avulla voidaan määrittää myös höyrynpaine, eikä kiehumislämpötilaa tarvitse korjata normaalipaineeseen (101,325 kPa), koska standardipainetta voidaan säätää mittauksen aikana. Tätä menetelmää ei tosin vielä ole automatisoitu.

Huomautuksia

Epäpuhtauksien vaikutus kiehumispisteen määrittämiseen riippuu suuresti epäpuhtauden laadusta. Vaikutus voi olla huomattava, jos näyte sisältää erittäin helposti haihtuvaa liuotinta.

Tutkittavan näytteen koostumus muuttuu mittauksesta toiseen alhaisessa lämpötilassa kiehuvien aineosien haihtumisen takia. Tällaisissa olosuhteissa saadaan jatkuvasti nousevia arvoja.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Normaali kiehumislämpötila on lämpötila, jossa nesteen kyllästetyn höyryn paine on sama kuin standardipaine.

Mitattu kiehumispiste riippuu ilmanpaineesta. Tätä riippuvuutta voidaan kuvata kvantitatiivisesti Clapeyron-Clausiusin yhtälöllä seuraavasti:

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

jossa

p = aineen höyrynpaine Pascaleina

ΔH_v = höyrystymislämpö J mol⁻¹

R = yleinen kaasuvakio = 8,31 J mol⁻¹ K⁻¹

T = lämpötila ilmoitettuna kelvinasteina.

Kiehumispisteen lämpötilaa (kiehumislämpötilaa) ilmoitettaessa huomioidaan mittauspaiikassa vallinnut paine.

Muuntamiset:

Paine (yksikkö: kPa)

100 kPa = 1 baari = 0,1 MPa (baari-yksikkö on edelleen sallittu, mutta ei suositeltava).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 torri (yksiköt "mm Hg" ja "torri" eivät ole sallittuja).

Lämpötila (yksikkö: K)

$t = T - 273,15$

(t celsiusaste, T kelvinaste)

1.3 Vertailuaineet

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Niitä käytetään aika ajoin etupäässä menetelmän kalibrointiin ja tulosten vertailuun.

Lisäyksessä luetelluissa menetelmissä mainitaan eräitä kalibrointiaineita.

1.4 Testausmenetelmän periaatteet

Kaikki kiehumispisteen (kiehumisvälin) määrittämiseen käytetyt menetelmät perustuvat kiehumislämpötilan mittaamiseen. Jäljempänä selostetaan viisi menetelmää.

1.4.1 Määrittäminen ebulliometrin avulla

Ebulliometri kehitettiin alun perin määrittämään molekyylipaino nostamalla kiehumispistettä, mutta se soveltuu myös tarkkoihin kiehumispistemittauksiin. Tämä hyvin yksinkertainen laite on kuvattu ASTM D 1120-72:ssa (ks. lisäys). Nestettä kuumennetaan laitteessa tasapainotilassa vallitsevassa ilmanpaineessa, kunnes se kiehuu.

1.4.2 Dynaaminen menetelmä

Tätä menetelmää käytettäessä höyryn jälkilauhdutuslämpötila mitataan termoparilla palautusjäähdytymässä aineen kiehuessa. Paineenvaihtelut ovat sallittuja tässä menetelmässä.

1.4.3 Kiehumispisteen ja kiehumisvälin tislusmenetelmä

Tätä menetelmää käytettäessä neste tislataan, höyryn jälkilauhdutuslämpötila mitataan ja tisleen määrä määritetään.

1.4.4 Siwoloboffin menetelmä

Näyte kuumennetaan koeputkessa, joka upotetaan kuumaan nestehauteeseen. Kapillaari, jonka alaosassa on ilmakupla, asetetaan näytteen sisältävään putkeen.

Määritetään lämpötila, jossa säännöllinen kuplajono poistuu kapillaarista, tai lämpötila, jolloin hetkellisen jäähdytyksen vuoksi kuplajono pysähtyy ja neste alkaa nousta kapillaarissa (Siwoloboff).

1.4.5 Valokennomittaus

Käytetään Siwoloboffin menetelmää ja suoritetaan automaattinen valokennomittaus käyttämällä kohoavia kuplia.

1.5 Laatukriteerit

Kiehumispisteen/kiehumisvälin määrittämiseen käytettyjen menetelmien soveltuvuus ja tarkkuus esitetään taulukossa 1.

1.6 Menetelmien selostus

Eräiden testausmenetelmien toimintaperiaatteita selostetaan kansainvälisissä ja kansallisissa standardeissa (ks. lisäys).

1.6.1 Ebulliometri

Ks. lisäys.

1.6.2 *Dynaaminen menetelmä*

Ks. testausmenetelmä A. 4:ssä höyrynpaineen määrittämiseksi.

Kiehumislämpötilan määrittäminen tehdään 101,325 kPa:n paineessa.

1.6.3 *Tislausmenettely (kiehumisväli)*

Ks. lisäys.

TAULUKKO 1: MENETELMIEN VERTAILU

Mittaustapa	Tarkkuusarvio	Huomautuksia
Ebulliometri	$\pm 1,4 \text{ K}$ (373 K:seen asti) ⁽¹⁾⁽²⁾ $\pm 2,5 \text{ K}$ (yli 373 K) ⁽¹⁾⁽²⁾	Voimassa oleva standardi ASTM D 1120-72 ⁽¹⁾
Dynaaminen menetelmä	$\pm 0,5 \text{ K}$ ⁽²⁾	
Tislausmenettely (kiehumisväli)	$\pm 0,5 \text{ K}$	Voimassa oleva standardi esim. ISO/R 918 DIN 53171 BS 4591/71
Siwoloboffin menetelmä	$\pm 1 \text{ K} \pm 2 \text{ K}$ ⁽²⁾	
Valokennomittaus	$\pm 0,3 \text{ K}$ (373 K:ssa) ⁽²⁾	

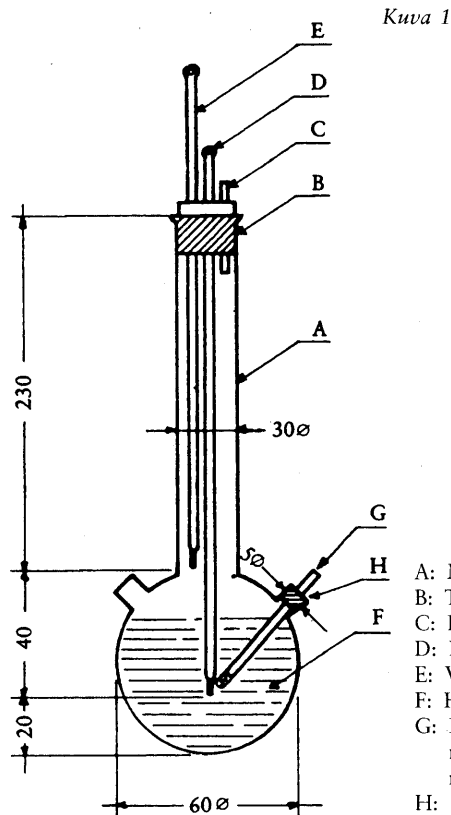
⁽¹⁾ Tämä tarkkuus on voimassa vain yksinkertaisen, esimerkiksi ASTM D 1120—72:ssa kuvatun laitteen ollessa kyseessä. Tarkkuus paranee käytettäessä kehittyneempiä molekyylipainon mittauslaitteita.

⁽²⁾ Koskee ainoastaan puhtaita aineita.

1.6.4 *Siwoloboffin menetelmä*

Näyte kuumennetaan sulamispistelaiteessa noin 5 mm:n läpimittaisessa koeputkessa (kuva 1).

Kuva 1 esittää erästä standardoitua sulamis- ja kiehumispistelaitea (JIS K 0064). Mitat on annettu millimetreinä. Laite on lasia.

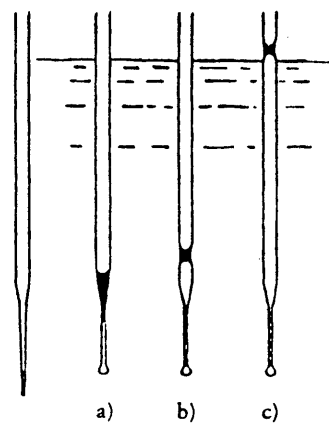


Kapillaariputki (kiehumiskapillaari), joka on ummessa noin 1 cm alapäästä, asetetaan näyteputkeen. Testattavaa näytettä on oltava niin paljon, että kapillaarin umpinainen osa on nesteen pinnan alapuolella. Kapillaariputken sisältämä näyteputki liitetään lämpömittariin kuminauhalla tai kiinnitetään sivutuen avulla (ks. kuva 2).

Kuva 2
Siwoloboffin menetelmä



Kuva 3
Menetelmän muunnos



Haudeneste valitaan kiehumislämpötilan perusteella. Rikkihappoa ja silikoniöljyä voidaan käyttää 573 K:n lämpötilaan saakka. Nestemäistä parafiinia voidaan käyttää vain alle 473 K:n olevissa lämpötiloissa. Hauteen lämpötilan nousuksi säädetään aluksi 3 K/min. Haudenestettä on lämmitettävä. Lämpötilan ollessa noin 10 K arvioidun kiehumispisteen alapuolella lämmitystä vähennetään ja nousuksi säädetään korkeintaan 1 K/min. Kiehumislämpötilaa lähestyttäessä kiehumiskapillaarista alkaa nousta kuplia.

Kiehumispiste on saavutettu, kun herkeksen jäähdytyksen aikana kuplajono pysähtyy ja neste alkaa äkkiä nousta kapillaarissa. Sen hetkinen lämpömittarin lukema on aineen kiehumislämpötila.

Menetelmän muunnoksessa (ks. kuva 3) kiehumispiste määritetään sulamispistekapillaarissa. Siinä on kapea, noin 2 mm:n mittainen kärki (a), ja pieni määrä näytettä imetään kapillaariin. Avoin kapea pää sulatetaan umpeen niin, että päähän syntyy pieni ilmakupla. Kun kapillaaria kuumennetaan sulamispistelaitteessa (b), ilmakupla laajenee. Kiehumispisteeksi merkitään lämpötila, jossa nestetulppa on noussut haudenesteen pinnan tasalle (c).

1.6.5 Valokennomenetelmä

Näyte kuumennetaan kapillaariputkessa metallikuumentimessa.

Metallikappaleessa olevista rei'istä suunnataan valonsäde näytteen läpi tarkoin kalibroituun valokennoon.

Näytteen lämpötilan kohotessa kiehumiskapillaarista nousee yksittäisiä kuplia. Kun kiehumislämpötila on saavutettu, kuplien määrä lisääntyy huomattavasti. Tämä muuttaa valokennon rekisteröimää valon voimakkuutta ja antaa pysähtymissignaalin metallikappaleessa olevan platinavastuslämpömittarin lämpötilan osoittimeen.

Tämä menetelmä on erityisen käyttökelpoinen, koska sen avulla voidaan suorittaa määrittämiä huoneenlämpötilan alapuolella aina 253,15 K:iin (–20 °C:seen) saakka tekemättä mitään muutoksia laitteeseen. Laite on vain sijoitettava kylmään tilaan tai jäähdytyslauteeseen. Kiehumispisteen tarkka määrittäminen selviää laitteen käsikirjasta.

2 TULOKSET

Normaalipaineesta vähän poikkeavat (enintään ± 5 kPa) kiehumispistelämpötilat normalisoidaan T_n :ksi Sidney-Youngin numeroarvoyhtälön avulla:

$$T_n = T + f_T \times p$$

jossa

$$\Delta p = (101,325 - p) \text{ (huomaa merkki)}$$

$$p = \text{paineen mittausta kPa:nä}$$

$$f_T = \text{kiehumispisteen muuttumisaste paineessa K/kPa}$$

$$T = \text{mitattu kiehumislämpötila kelvinasteina}$$

$$T_n = \text{kiehumislämpötila kelvinasteina korjattuna normaalipaineeseen}$$

Yllämainituissa kansainvälisissä ja kansallisissa standardeissa esitetään lämpötilan korjauskertoimet (f_T) ja yhtälöt niiden laskemiseksi monien aineiden osalta.

Esimerkiksi DIN 53171 -menetelmä mainitsee seuraavat maaleissa käytettävien liuottimien likimääräiset korjaukset:

TAULUKKO 2: LÄMPÖTILAN KORJAUSKERTOIMET f_T

Lämpötila T (K)	Korjauskertoimen 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 RAPORTOINTI

On ilmoitettava, mitä menetelmää on käytetty. Määritetty kiehumispiste on vähintään kahden taulukossa 1 esitetyn tarkkuusarvion rajoissa olevan mittauksen keskiarvo. Jos määrittämiä ei voida toistaa, muiden menetelmien käyttöä on harkittava.

Mitatut kiehumispisteet ja niiden keskiarvo ilmoitetaan ja paine (tai paineet), jossa mittaus (mittaukset) tehtiin, ilmoitetaan kPa:na.

Paineen tulisi olla lähellä normaalipainetta. Mikäli testattava näyte kiehuu lämpötilavälillä, tämä väli on ilmoitettava. Kaikille tuloksille on annettava tarkkuusarvio.

Kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomautukset on raportoitava. Tämä koskee erityisesti aineen fysikaalista tilaa ja epäpuhtauksia.

4 LÄHDELUETTELO

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103 — Decision of the Council C (81), 30 Final.

Lisäys

Teknisiä lisätietoja on saatavissa muun muassa seuraavista standardeista:

- | | | |
|---|--|--|
| 1 | Ebulliometri | |
| | ASTM D 1120-72 | Standard test method for boiling point of engine anti-freezes |
| 2 | Tislausmenetelmä (kiehumisväli) | |
| | ISO/R 918 | Test Method for Distillation (Distillation Field 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 |
-

A. 3. SUHTEELLINEN TIHEYS

1 MENETELMÄ

Selostetut menetelmät perustuvat OECD:n testausohjeisiin (1).

1.1 Johdanto

Suhteellisen tiheyden määrittämiseen käytetyt menetelmät soveltuvat sekä kiinteisiin että nestemäisiin aineisiin niiden puhtausasteesta riippumatta. Sovellettavat eri menetelmät on lueteltu taulukossa.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Kiinteiden ja nestemäisten aineiden suhteellinen tiheys (D_4^{20}) on tutkittavan aine-erän massan 20 °C:ssa määritetyn tilavuuden suhde samansuuruisen vesimäärän 4 °C:ssa määritettyyn tilavuuteen. Suhteellisella tiheydellä ei ole dimensiota.

Aineen tiheys (ρ) on massan m ja sen tilavuuden V osamäärä.

Tiheys ilmoitetaan SI-yksikköinä kg/m^3 .

1.3 Vertailuaineet (1) (2)

Aina ei tarvitse käyttää vertailuaineita tutkittaessa uutta ainetta.

Niitä käytetään erupäässä menetelmän ajoittaiseen kalibrointiin ja tulosten vertailuun.

1.4 Menetelmien periaatteet

Käytössä on neljä menetelmää.

1.4.1 Nostemenetelmät

1.4.1.1 Hydrometri (nesteet)

Kelluvalla hydrometrilla voidaan suorittaa riittävän tarkat ja nopeat määritykset. Nesteiden tiheys saadaan siitä, kuinka syväälle hydrometri uppoaa ja tulos on luettavissa asteikolta.

1.4.1.2 Hydrostaattinen tasapaino (nesteet ja kiinteät aineet)

Ilmassa ja vedessä punnitun näytteen painoeron avulla voidaan määrittää näytteen tiheys.

Kiinteiden aineiden ollessa kyseessä tulos ilmoittaa vain kyseessä olevan näytteen tiheyden. Nesteiden tiheyttä määritettäessä punnitaan tietty tilavuus V ensin ilmassa ja sitten nesteessä.

1.4.1.3 Uppokuulamenetelmä (nesteet) (3)

Tätä menetelmää käytettäessä neste punnitaan. Sitten nesteeseen upotetaan kuula, jonka tilavuus tiedetään ja punnitus tehdään uudelleen. Tiheys lasketaan tulosten erosta.

1.4.2 Pyknometrimenetelmät

Tilavuudeltaan tunnettuja erilaisia pyknometrejä voidaan käyttää kiinteiden ja nestemäisten aineiden tiheyden määrittämiseen. Tiheys lasketaan täyden ja tyhjän pyknometrin painoerosta ja sen tilavuudesta.

1.4.3 Ilmavertailupyknometri (kiinteät aineet)

Kaikkien kiinteiden aineiden tiheys voidaan mitata huoneenlämmössä kaasuvertailupyknometrillä. Aineen tilavuus mitataan ilmassa tai inertil kaasulla täytetyssä sylinterissä, jonka voi kalibroida. Tiheyden laskemista varten massa mitataan, kun tilavuus on mitattu.

1.4.4 Oskilloiva tiheysmittari (4) (5) (6)

Oskilloivan tiheysmittarin avulla voidaan mitata nesteen tiheys. U-putken muotoista mekaanista oskillaattoria oskilloidaan tietyllä sen massasta riippuvalla taajuudella. Oskillaattorin resonanssitaajuus muuttuu, kun siihen asetetaan näyte. Laite pitää kalibroida käyttämällä kahta nestettä, joiden tiheys tunnetaan.

Nämä nesteet on valittava siten, että niiden tiheys kattaa mittausvälin.

1.5 Laatuksiteerit

Taulukossa esitetään suhteellisen tiheyden määrittämiseen käytettävien menetelmien soveltuvuus.

ISO-standardissa mainittu tarkkuus koskee vain puhtaita aineita.

1.6 Menetelmien selostus

Lisäyksessä on lueteltu standardeja, jotka sisältävät teknisiä lisätietoja.

Testit on suoritettava 20 °C:n lämpötilassa, ja mittauksia on tehtävä vähintään kaksi.

2 TULOKSET

Ks. standardit.

3 RAPORTOINTI

Käytetty menetelmä tai standardi on ilmoitettava.

Suhteellinen tiheys (D_4^{20}) ilmoitetaan kohdassa 1.2 esitetyllä tavalla, ja mitatun aineen fysikaalinen tila mainitaan.

Kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat seikat on raportoitava; erityisesti tämä koskee epäpuhtauksia ja aineen fysikaalista tilaa.

TAULUKKO: MENETELMIEN SOVELTUVUUS

Mittausmenetelmä	Tiheys		Suurin mahdollinen dynaaminen viskositeetti	Huomautuksia
	Kiinteä	Neste		
1.4.1.1 Hydrometri		×	5 Pa s	ISO 387
1.4.1.2 Hydrostaattinen tasapaino				ISO/R 1185 (A)
a) kiinteät	×		5 Pa s	ISO/R 91 ja R 758
b) nesteet		×		
1.4.1.3 Uppokuulamenetelmä		×	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2 Pyknometri				ISO/R 3507
a) kiinteät	×		500 Pa s	ISO/R 1183 (B)
b) nesteet		×		ISO/R 758
1.4.3 Ilmavertailupyknometri	×			DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
1.4.4 Oskilloiva tiheysmittari		×	5 Pa s	

4

LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Pariisi, 1981, Test Guideline 109 — Decision of the Council C (81) 30 Final.
- (2) IUPAC, Recommended reference materials for realization of Physico-chemical Properties. — Pure and applied chemistry, Vol. 48, 1976, s. 508.
- (3) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, Vol. 11, 1979, s. 427—430.
- (4) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, Vol. 19, 1970, s. 297—302.
- (5) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung. Die Pharmazeutische Industrie, Vol. 37, 1975, s. 717—726.
- (6) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauerlaboratorium, Brauwissenschaft, Vol. 9, 1976, s. 253—255.

Lisäys

Teknisiä lisätietoja on saatavissa muun muassa seuraavista standardeista:

1 Nostemenetelmät

1.1 *Hydrometri*

- DIN 12790 Hydrometer; general instructions
- ISO 387
- DIN 12791 Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use
Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation
- ISO/R 649
- DIN 12793 Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 *Hydrostaattinen tasapaino*

Kiinteät aineet:

- ISO R 1183 Method A. Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
- ASTM-D-792 Specific Gravity and Density of Plastics by Displacement
- DIN 53479 Testing of plastics and elastomers; determination of density

Nestemäiset aineet:

- ISO R 91 ISO R 758
- DIN 51757 Testing of mineral oils and related materials; determination of density
- ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 ja 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 *Uppokuulamenetelmä*

- DIN 53217 Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer (enlargement for immersed ball method to be published in 1981)

2 Pyknometrimenetelmät

2.1 *Nesteet*

- ISO 3507 Pycnometers
- ISO/R 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 a too high 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.
2.2	<i>Kiinteät aineet</i>
ISO/R 1183	Method B: Methods for Determining the Density and Relative Density of Plastics excluding Cellular Plastics
DIN 19683	Determination of the Density of Soils
3	<i>Ilmavertailupykometri</i>
DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere: Prüfung

A. 4. HÖYRYNPAININE

1 MENETELMÄ

Selostetut menetelmät perustuvat OECD:n testausohjeisiin (1).

1.1 Johdanto

Ennen tämän testin suorittamista on tunnettava aineen rakenne sekä sulamis- ja kiehumispiste.

Ei ole olemassa yksittäistä mittaamenetelmää, jota voitaisiin käyttää kaikkiin höyrynpainemittauksiin. Sen vuoksi suositellaan useita menetelmiä höyrynpainemittauksiin alueella $>10^{-3}$ – 10^5 Pa.

Epäpuhtauksilla on yleensä vaikutusta höyrynpaineeseen. Epäpuhtauksien vaikutus höyrynpaineen määrittämiseen riippuu suuresti niiden laadusta. Vaikutus voi olla huomattava, jos näyte sisältää hyvin herkästi haihtuvaa liuotinta.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Aineen höyrynpaine on sen kylläisen höyryn paine kiinteän tai nestemäisen aineen yläpuolella. Termodynaamisessa tasapainotilassa puhtaan aineen höyrynpaine on ainoastaan lämpötilan funktio.

Paineen SI-yksikkönä tulisi käyttää Pascalia (Newton/m^2).

Aikaisemmin käytetyt yksiköt ja niiden konversiot ovat:

1 torri (mm Hg) = $1,333 \times 10^2$ Pa

1 ilmakehä (fysikaalinen atm) = $1,013 \times 10^5$ Pa

1 ilmakehä (tekninen atm) = $9,81 \times 10^4$ Pa

1 baari = 10^5 Pa

Lämpötilan SI-yksikkö on kelvinaste (K).

1.3 Vertailuaineet

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Niitä käytetään aika ajoin etupäässä menetelmän toimivuuden tarkastamiseen ja jollakin muulla menetelmällä saatujen tulosten vertailuun.

1.4 Testausmenetelmien periaatteet

Höyrynpaineen mittaamiseksi on käytettävissä viisi menetelmää, joita voidaan käyttää erisuuruisten höyrynpaineiden määrittämiseen. Kaikilla menetelmillä höyrynpaine mitataan useissa lämpötiloissa. Rajoitetulla lämpötilavälillä puhtaan aineen höyrynpaineen logaritmi on lämpötilan käänteisluvun lineaarinen funktio.

1.4.1 Dynaaminen menetelmä

Dynaamista menetelmää käytettäessä mitataan määrätyn paineen kiehumislämpötila.

Suosittelava väli:

10^3 – 10^5 Pa, 20–100 °C.

Tämä menetelmä sopii myös kiehumispisteen määrittämiseen, kun lämpötila on korkeintaan 350 °C.

1.4.2 Staattinen menetelmä

Staattista menetelmää käytettäessä suljetussa systeemissä aikaansaatu höyrynpaine mitataan määrättyssä lämpötilassa termodynaamisessa tasapainotilassa.

Menetelmä sopii kiinteisiin aineisiin ja nesteisiin, joissa on yksi tai useampia aineosia.

Suosittelava väli:

10^{-10} – 10^5 Pa, 0–100 °C.

1.4.3 Isoteniskooppi

Tämä standardoitu menetelmä on myös staattinen, mutta se ei yleensä sovellu moniainesysteemin testauksiin. Lisätietoja on standardissa ASTM D-2879-75.

Suosittelava väli:

10^{-10} – 10^5 Pa, 0–100 °C.

1.4.4 Höyrynpainevaaka

Kennosta tietyn suuruisesta aukosta lähtevän aineen määrä aikayksikköä kohden määritetään tyhössä siten, että kennoon palautuvan aineen määrä on merkityksetön (esimerkiksi mittaamalla höyrystyksen aiheuttamat sykäykset herkkään vaakaan tai määrittämällä painon muutos).

Suosittelava väli:

10^{-3} –1 Pa, 0–100 °C.

1.4.5 Kaasukyllästysmenetelmä

Inertti kaasuvirta ohjataan aineeseen siten, että se kyllästyy aineen höyryllä. Kaasu kerätään talteen. Tiedetyn kaasumäärän kuljettaman aineen määrän avulla lasketaan höyrynpaine määrättyssä lämpötilassa.

Suosittelava väli:

korkeintaan 1 Pa.

1.5 Laatuksiteerit

Eri höyrynpaineen mittausten menetelmiä verrataan niiden käytön, kokeen toistettavuuden ja uusittavuuden, mittausvälin ja olemassa olevan standardin osalta. Tämä on tehty seuraavassa taulukossa.

TAULUKKO: LAATUKRITEERIT

Mittausmenetelmä	Aineet		Arvioitu toistettavuus ⁽¹⁾	Arvioitu uusittavuus ⁽¹⁾	Suositeltu väli	Olemassa oleva standardi
	Kiinteä	Neste				
1.4.1 Dynaaminen menetelmä		×	25 %:iin asti 1-5 %	25 %:iin asti 1-5 %	10 ³ Pa – 2 × 10 ³ Pa 2 × 10 ³ Pa – 10 ⁵ Pa	– –
1.4.2 Staattinen menetelmä	×	×	5-10 %	5-10 %	10 Pa – 10 ⁵ Pa	–
1.4.3 Isoteniskooppi-menetelmä	×	×	5-10 %	5-10 %	10 ² Pa – 10 ⁵ Pa	ASTM-D 2879-75
1.4.4 Höyrynpainevaaka	×	×	5-20 %	50 %:iin asti	10 ⁻³ Pa – 1 Pa	–
1.4.5 Kaasukyllästys-menetelmä	×	×	10-30 %	50 %:iin asti	< 10 ⁻³ Pa – 1 Pa	–

⁽¹⁾ Riippuu puhtausasteesta.

1.6 Menetelmien selostus

1.6.1 Dynaaminen mittaus

1.6.1.1 Laitteisto

Laitteistoon kuuluu yleensä kiehumisastia, johon on kiinnitetty lasi- tai metallijäähdytin (ks. kuva 1), lämmönsäätö- ja mittauslaitteet sekä paineensäätely- ja mittauslaitteet. Kuvassa on esitetty tyypillinen laitteisto. Se on valmistettu lämpöä kestävästä lasista ja siinä on viisi osaa:

Suuri, osittain kaksinkertainen putki, jossa on maadoitettu liitos, jäähdytin, jäähdytinastia ja tuloaukko.

Putken kiehuntaosassa on Cottrellin pumpulla varustettu lasisylinteri, jonka pinta on karheaa murskattua lasia estääkseen ryöpsähtelyä kiehuntavaiheessa.

Lämpötila mitataan pieneen öljymäärään upotetulla termoparilla tai vastuslämpömittarilla. Se asetetaan täyttöputkeen, jonka pohja on suljettu ja jossa on ulkokierteinen maadoitettu liitos.

Paineen säätely- ja mittauslaitteiden yhdistäjänä on ristikappale.

Puskurina toimiva kupu on yhteydessä mittauslaitteistoon kapillaariputken välityksellä.

Kiehunta-astia kuumennetaan kuumennuspatruunalla, joka asetetaan lasilaitteeseen alapuolelta. Haluttu kuumennusvirta säädetään jännitteen muuntajalla, ja sitä valvotaan ampeerimittarin avulla.

Tarvittava 10² Pa:n ja noin 10⁵ Pa:n välinen tyhjö säädetään öljypumpulla.

Haluttu paine säädetään typpisylinterillä, joka on yhdistetty laitteeseen venttiilillä, jota käytetään myös laitteen tuulettamiseen.

Paineen mittaus suoritetaan ristikappaleeseen yhdistetyllä painemittarilla.

1.6.1.2 Mittauksen suoritus

Höyrinpaine mitataan määrittämällä näytteen kiehumispiste tietyssä, noin 10^3 – 10^5 Pa:n paineissa. Kun lämpötila säilyy muuttumattomana tietyssä paineessa, kiehumispiste (kiehumistasapaino seoksen ollessa kyseessä) on saavutettu. Tällä menetelmällä ei voida mitata vaahtoavia aineita.

Ennen mittauksen suorittamista kaikki lasiosat on puhdistettava ja kuivattava huolellisesti ja ilma poistettava kaasunpaineella. Sitten aine asetetaan laitteeseen. Täyttövaiheessa kiinteät aineet voivat aiheuttaa ongelmia, jollei niitä ole jauhettu, mutta tämä voidaan välttää kuumentamalla jäähdytysvesivaippa. Täytön jälkeen laite yhdistetään ja aineesta poistetaan kaasu. Sitten säädetään alin paine ja lämmityslaitte käynnistetään. Termopari tai vastuslämpömittari kytketään rekisteröimislaitteeseen. Tasapaino on saavutettu, kun säädettyssä vakiopaineessa kiehumislämpötila pysyy muuttumattomana. Kun tämä lämpötila on kirjattu, säädetään korkeampi paine, ja menettelyä jatketaan, kunnes 10^5 Pa on saavutettu (kaikkiaan 5–10 mittauspistettä). Tulosten tarkistamiseksi tasapainopisteet mitataan toistamiseen painetta vähennettäessä.

1.6.2 Staattinen mittaus

1.6.2.1 Laitteet

Tyypillinen laitteisto (ks. kuva 2) koostuu lasisesta ja metallisesta lämmitys- ja jäähdytyslaitteesta, jossa aine saatetaan säädeltyyn lämpötilaan, sekä paineen ja lämpötilan säätö- ja mittauslaitteista.

Näytekammion toisella puolella on ruostumatonta terästä oleva vakuuminventtiili ja toisella puolella painemittarinestettä sisältävä U-putki. U-putken toinen pää on liitetty ristikkapaleeseen, jonka yksi haara menee vakuumpumppuun, toinen typpisylinteriin ja kolmas painemittariin.

Aine saatetaan säädeltyyn lämpötilaan asettamalla koko näytekammio laskuventtiileineen sekä tarpeeksi suuri osa U-putkesta (käytännössä venttiilin korkeudelle saakka) vakiolämpöiseen hauteeseen. Lämpötila mitataan termoparilla tai vastuslämpömittarilla näytekammion ulkopuolelta niin läheltä kammiota kuin mahdollista.

Nestemäinen tyyppi tai kuivajää-alkoholisekoitus sopii näytteen alijäähdyttämiseen. Alhaisissa lämpötiloissa mittaus suoritetaan ultrakryostaatilla.

Laitteistoon säädetään haluttu paine pumpun avulla.

Aineen höyrinpaine mitataan yleensä epäsuorasti nollaindikaattorilla. Se voi olla nestettä sisältävä alla kuvattu U-putki tai esimerkiksi kalvomanometri. Hauteessa, jonka lämpötila on säädelty, höyrinpaine siirtää U-putkessa olevaa nestettä pois tasapainosta. Tyyppiä päästetään laitteeseen siihen yhdistetystä typpisylinteristä venttiilin kautta korvaamaan höyrinpaineen vaikutus ja nollamaan painemittari. Paineen tarkkuusmittari, joka on ympäröivässä lämpötilassa ja vastaa aineen höyrinpainetta vastaavassa muuttumattomassa lämpötilassa, ilmoittaa tähän tarvittavan tyyppipaineen. Sopivia U-putkessa käytettäviä nesteitä nollatasapainon säätämiseksi ovat elohopea, silikoniöljyt ja ftalaatit riippuen painevälistä ja aineen kemiallisesta käyttäytymisestä.

Elohopeaa voidaan käyttää normaali-ilmanpainen ja 10^2 Pa:n välillä, silikoniöljyjä ja ftalaatteja myös 10^2 Pa:n ja 10 Pa:n välillä ja kalvomanometriä myös alle 10^{-1} Pa:ssa.

1.6.2.2 Mittauksen suoritus

Ennen mittausta kaikki kuvassa 2 esitetyn laitteen osat puhdistetaan huolellisesti liuottimilla ja kuivataan tyhjiössä.

U-putki täytetään valitulla aineella, josta kaasu on poistettu korkeassa lämpötilassa ennen täyttöä. Kun aine asetettu laitteeseen, sen osat liitetään yhteen ja näytekammio alijäähdytetään riittävästi. Sen jälkeen pumpataan usean minuutin ajan näytekammion yläpuolella olevan avatun venttiilin kautta ilmaa pois laitteesta. Sitten näytteen yläpuolella oleva venttiili suljetaan, näyte saatetaan valittuun lämpötilaan, ja tämän toimenpiteen aikana siitä aiheutuvaa pylväiden siirtymistä tarkkaillaan ja tarvittaessa korjataan tyellä nolla-asentoon, kunnes vakaa lämpötila on saavutettu. Sitten näytekammio alijäähdytetään uudelleen. Jos painetta on jäljellä alijäähdytetyssä tilassa, se johtuu joko näytteen sisältämästä, kuumentamisvaiheen aikana vapautuneesta ilmasta, joka voidaan poistaa, tai jäähdytyslämpötilasta, joka ei ole ollut kyllin alhainen. Nestemäistä tyypeä on tällöin käytettävä jäähdytysaineena.

Kun näytteestä on poistettu riittävästi kaasuja, lämpötilan riippuvuus höyrynpaineesta määritetään riittävän pienin lämpötilavälein.

1.6.3 *Isoteniskooppi*

Täydellinen kuvaus tästä menetelmästä esitetään lähdeluettelon kohdassa 2. Mittauslaitteen periaatteet esitetään kuvassa 3. Kohdassa 1.6.2 kuvatun staattisen menetelmän tapaan isoteniskooppia voidaan käyttää sekä kiinteiden aineiden että nesteiden tutkimiseen.

Nesteiden ollessa kyseessä aine toimii itse apumanometrin nesteenä. Kiinteiden aineiden ollessa kyseessä käytetään jotakin kohdassa 1.6.2 luetelluista manometrinesteistä. Valinta riippuu paineesta ja lämpötilavälistä. Testattaessa nesteitä isoteniskoopin pallo täytetään tutkittavalla aineella, josta poistetaan kaasut korkeassa lämpötilassa kiehumisen aikana.

Samaan aikaan osa nesteestä tislautuu pallosta, tiivistyy ylempään jäähdytettyyn osaan ja palaa U-putkeen. Kun tämä on kyllin täynnä nestettä, josta kaasut on poistettu, U-putken lämpösäätimellä varustetussa hauteessa oleva alaosa lämmitetään haluttuun lämpötilaan ja näin aiheutettu höyrynpaine mitataan epäsuorasti kohdassa 1.6.2 kuvatulla tavalla.

Kiinteiden aineiden ollessa kyseessä täytetään isoteniskoopin pitkässä päässä oleva pullistuma manometrinesteellä, josta kaasut on poistettu. Sen jälkeen tutkittava aine asetetaan alaosaan, ja siitä poistetaan kaasut korkeassa lämpötilassa. Sitten isoteniskooppia kallistetaan niin, että manometrineste pääsee valumaan U-putkeen. Höyrynpaineen määrittäminen lämpötilan funktiona tehdään kohdassa 1.6.2 kuvatulla tavalla.

1.6.4 *Höyrynpainevaaka*

1.6.4.1 *Laitteet*

Lähdeluettelossa (1) esitetään useita eri laitteiden malleja. Tässä kuvatussa tyyppistä ilmenevät menetelmän periaatteet. Laitteen osia esitetään kuvassa 4. Niitä ovat aluslaatta ja lasikupu, vakuumimittauslaitteella varustettu pumppu sekä laite höyrynpaineen mittaamiseksi osoittimen poikkeamalla. Seuraava yhdysrakenteinen laitteisto on asennettu aluslaatalle:

- Haihdutuskattila, jossa on laippa ja pyörivä läpisyöttö. Haihdutuskattila on litteä kuparisylinteri. (Kattila voi myös olla kupariseinän ympäröimä lasiastia.) Se on kiinnitetty kuparipitimeen, joka on ulkonevasta alaosaan ruuvattu ruostumattomaan teräskappaleeseen. Teräskappale vuorostaan on kiinnitetty aluslaattaan laipalla, jotta sitä voidaan pyörittää kattilan akselin ympäri. Lämmityksestä huolehtii teräskappaleessa oleva lämmityskierukka, joka ei siis ole yhteydessä vakuumikammioon.
- Kattilan kansi on kuparia ja siinä on kolme poikkileikkaukseltaan erilaista haihtumisaukkoa, jotka sijaitsevat 90°:n kulmassa toisiinsa nähden. Kattilaa pyörittämällä tarvittava aukko tai aukkojen väli voidaan asettaa epäkeskeisesti kattilan suhteen sijaitsevan jäähdyttimen raon alle suuntaamaan molekyyliisuihku vaakakuppiin tai sen ohi. Kattilan seinässä on termoelementti tai vastuslämpömittari lämpötilan mittausta varten.
- Vaakana on kiertokelamittari. Osoittimen korvaa pieni putki, johon on kiinnitetty vaa'an selkä ja vastapaino. Vaa'an selässä on vaihdettava vaakakuppi, joka on tehty ohuesta kullatusta alumiinista. Vaa'an selän keskikohtaan on kiinnitetty 0,1 mm:n vahvuinen konstantaanilanka, johon kalibrointipunnukset voidaan kiinnittää. Höyrynpaine määritetään käyttämällä valosähköistä nollapistemittaria.

- Messinkisylinteri ympäröi vaakakuppia joka puolelta lukuunottamatta vaa'an selän liikkumiseen tarvittavaa kahta rakoa ja kapeaa molekyylisuihkuaukkoa. Messinkiasian päällä oleva kupari-tanko, joka kulkee lämpöeristettynä ruostumattomassa teräsputkessa aluslaatan läpi, johtaa lämmön ulkopuolelle. Tanko on upotettu aluslaatan alla olevaan nestemäistä tyypeä sisältävään Dewarin astiaan.

1.6.4.2 Mittauksen suoritus

Kuparikattila täytetään aineella, kansi suljetaan ja kuristuslaippa, suojus ja jäähdytin asetetaan kattilan päälle. Lasikupu asetetaan paikoilleen ja tyhjiöpumput käynnistetään. Viimeinen paine ennen mittauksen alkua on noin 10^{-4} Pa. Kun paine on alle 10^{-2} Pa, aloitetaan jäähdytyskotelon jäähdytys.

Jonkin ajan kuluttua vaa'an lämpötila on niin alhainen, että vapautunut höyrysuihku voi tiivistyä vaakakuppiin. Tämä tiivistyminen lähettää signaalin vaakakuppiin yhdistettyyn rekisteröintilaitteeseen. Signaalia voi käyttää kahdella tavalla: tässä kuvatussa laitteessa höyrynpaine määritetään suoraan vaakakuppiin tulevasta paineesta (molekyyli-massaa ei tarvita). Samanaikaisesti määritetään tiivistynyt massa ja haihtumisnopeus voidaan siten laskea tiivistymisen kuluneesta ajasta. Jälkimmäinen koskee yleisluontoisempia laitteita. Höyrynpaine voidaan silloin myös laskea haihtumisnopeudesta ja molekyylimassasta käyttämällä Herzin suhdetta:

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

jossa:

G = haihtumisnopeus ($\text{kg/s} \cdot \text{m}^2$)

M = moolimassa (g/mol)

T = lämpötila (K)

R = yleinen kaasuvakio ($\text{J/mol} \cdot \text{K}$)

p = höyrynpaine (Pa)

Kun tarvittava tyhjiö on saatu aikaan, mittausten sarja voidaan aloittaa alimmasta halutusta mittaustilasta. Tarvittava aukko avataan, ja höyrysuihku ohittaa suoraan kannen yläpuolelle asennetun suojuksen ja osuu sitten jäähdytettynä vaakakuppiin. Vaakakupin mittasuhteet ovat sellaiset, että koko suihku kerääntyy siihen. Höyrysuihkon vauhti aiheuttaa voiman vaakakuppiin, jossa tiivistyminen sen viileään pintaan tapahtuu. Höyrysuihkon voimasta vaa'an selkä siirtyy tasapainotilasta. Vaa'an selän päässä on pieni liuska, joka rekisteröidään optisesti prisman ja valodiodin avulla. Vaakaan yhdistetty ohjausvirtapiiri säätelee vaakaa hetkellisesti ja säätää vaa'an selän uudelleen tasapainoon. Tarvittava vääntömomentti kirjataan, ja vastapainotuksen jälkeen se vastaa aineen höyrynpainetta.

Mittauksia jatkettaessa lämpötilaa nostetaan pienin välein kunnes suurin haluttu lämpötila-arvo on saavutettu. Sitten näyte jälleen jäähdytetään ja toinen höyrynpainekäyrä voidaan kirjata. Nämä kaksi sarjaa voidaan toistaa ainoastaan siinä tapauksessa, että mitattava näyte on kyllin puhdas. Mikäli kolmas mittaus ei vahvista edellistä, aine on mahdollisesti alkanut hajota mittaukseen käytettävässä lämpötilavälissä.

1.6.5 Kaasukyllästysmenetelmä

1.6.5.1 Laitteet

Tämän testin suorittamiseen käytetty tyypillinen laitteisto koostuu useista komponenteista, jotka esitetään kuvassa 5 ja jotka selostetaan alla (1).

Inertti kaasu:

Kantajakaasu ei saa reagoida kemiallisesti testattavan aineen kanssa. Typpi on yleensä sopiva tähän tarkoitukseen, mutta joskus voi olla tarpeen käyttää muita kaasuja. Käytettävän kaasun tulee olla kuivaa (ks. kuva 5, kohta 4: suhteellisen kosteuden ilmaisin).

Virtauksen säätely:

Sopiva kaasunsäätelyjärjestelmä on tarpeen, jotta kyllästyskolonniin saadaan vakaa ja halutun voimakas virtaus.

Höyryrakeräysloukut:

Näiden laatu riippuu kyseessä olevan näytteen ominaisuuksista ja valitusta analyysimenetelmästä. Höyryä on kerättävä määrätty määrä ja sellaisessa muodossa, että analyysi voidaan tehdä. Eräille näyteaineille sopii nesteloukku, jossa on heksaania tai etyleeniglykolia, toisille taas sopivat kiinteät absorboimisaineet.

Lämmönvaihdin:

Eri lämpötiloissa tehtäviä mittauksia varten voi olla tarpeen sisällyttää laitteeseen lämmönvaihdin.

Kyllästämiskolonne:

Näyteaine on nestettä, jolla päällystetään inertti tukiaine. Päällystetty tukiaine pannaan kyllästämiskolonnein, jonka mitat ja virtausnopeus ovat sellaiset, että kantajakaasun täydellinen kyllästyminen on varmaa. Kolonnissa tulee olla lämmönsäädin. Kun mittauksia suoritetaan yli 20 °C:n lämpötilassa, kyllästämiskolonnin ja loukkujen välisen alueen on oltava lämmitetty testattavan aineen tiivistymisen estämiseksi.

1.6.5.2 Mittauksen suoritus

Kyllästämiskolonnin valmistaminen:

Testattavasta aineesta ja herkästi haihtuvasta liuottimesta valmistettu liuos lisätään sopivaan määrään tukiainetta. Testattavaa ainetta on oltava tarpeeksi, jotta kyllästyminen pysyy koko testin ajan. Liuotin haihdutetaan täydellisesti ilmaan tai pyörivällä haihduttimella, ja perusteellisesti sekoitettu aine pannaan kyllästämiskolonnein. Kun näytteen lämpö on säädetty, laitteen läpi johdetaan kuivaa tyyppiä.

Mittaus:

Loukut kiinnitetään kolonnin ulosvirtausputkeen ja aika kirjataan. Virtausnopeus tarkastetaan kokeen alussa ja säännöllisin väliajoin kokeen kestäessä kuplalaskurilla (tai jatkuvasti massavirtausmetrillä).

Kyllästimen poistoaukon paine täytyy mitata. Tämä voidaan tehdä joko

- asettamalla painemittari kyllästimen ja loukkujen väliin (koska kuollut tila ja adsorptiopinta on lisääntynyt) tai
- määrittämällä eri kokeessa paineen aleneminen loukkujen kohdalla virtausnopeuden funktiona (ei sovellu erityisen hyvin nesteloukkuihin).

Eri analyysimenetelmissä tarvittavan näyteainemäärän kokoamiseen menevä aika määritetään esitutkimuksissa tai arvioiden perusteella. Ennenkuin määrätyn lämpötilan höyrynpaine lasketaan, esitesteillä määritetään suurin virtausnopeus, joka kyllästää kantajakaasun aineen höyryllä. Tämä varmistuu, jos kantajakaasu kuljetetaan kyllästimen läpi niin hitaasti, että pienemmällä nopeudella ei saada laskettua suurempaa höyrynpainetta.

Testattavan aineen luonteesta riippuu analyysimenetelmän valinta (esimerkiksi kaasukromatografia tai gravimetria).

Kantajakaasun tunnetun tilavuuden kuljettama ainemäärä määritetään.

1.6.5.3 Höyrynpaineen laskeminen

Höyrynpaine lasketaan höyryn tiheydestä (m/V) seuraavalla yhtälöllä:

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

jossa

p = höyrynpaine (Pa)

m = adsorboidun testiaineen massa (g)

V = kyllästetyn kaasun tilavuus (m³)

R = yleinen kaasuvakio (J/mol · K)

T = lämpötila (K)

M = moolimassa (g/mol)

Mitatut tilavuudet täytyy korjata virtausmetrin ja lämpösäädetyin kyllästyksen välisen paineen ja lämpötilaerojen osalta. Jos virtausmetri sijaitsee virtaussuunnassa höyryloukun jälkeen, korjaukset voivat olla tarpeen, jotta höyrystyneet loukun aineosat tulevat huomioituiksi (1).

2 TULOKSET

Kaikilla edellä selostetuilla menetelmillä aikaansaatu höyrynpaine määritetään vähintään kahdessa lämpötilassa. Vähintään kolme mittausta suositellaan tehtäväksi 0 °C:n ja 50 °C:n välillä, jotta höyrynpainekäyrän lineaarisuus voidaan tarkistaa.

3 RAPORTOINTI

Mikäli mahdollista, raporttiin tulee sisällyttää seuraavat tiedot:

- Aineen tarkka määrittely (koostumus ja epäpuhtaudet).
- Vähintään kaksi höyrynpaine- ja lämpötila-arvoa mieluiten 0 °C:n ja 50 °C:n välillä. Alkutiedot ja log p verrattuna 1/T käyrään ilmoitetaan niinkään. Lisäksi arvioidaan höyrynpaine 20 °C:n tai 25 °C:n lämpötilassa.

Mikäli havaitaan siirtymä (olomuodon muutos tai hajoaminen), seuraavat tiedot on ilmoitettava:

- muutoksen luonne,
- lämpötila, jossa muutos tapahtuu normaalissa ilmanpaineessa,
- höyrynpaine 10 °C ja 20 °C alle ja 10 °C ja 20 °C yli siirtymälämpötilan (ellei siirtymä ole kiinteästä kaasuksi).

Kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomautukset on raportoitava.

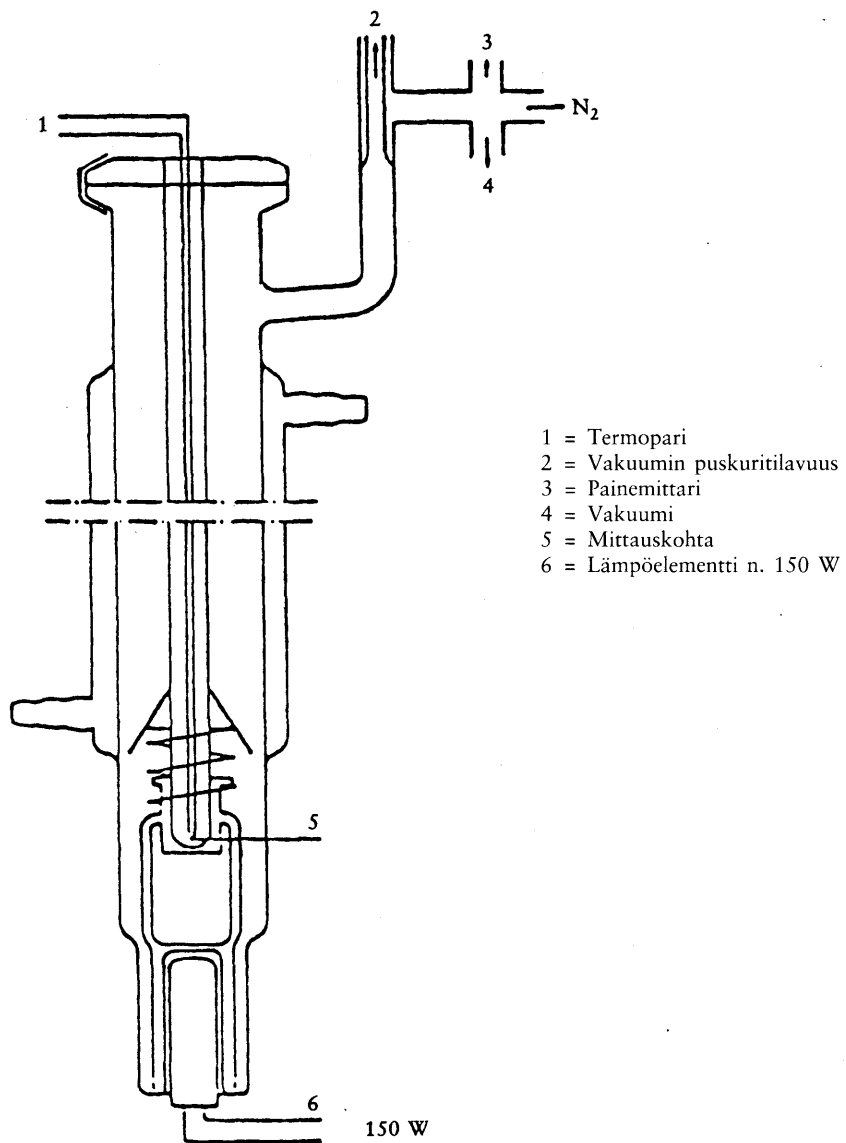
On mainittava, mitä menetelmää on käytetty.

4 LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 104. Decision of the Council C (81) 30 Final.
- (2) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 104, reference 4. Decision of the Council C (81) 30 Final.

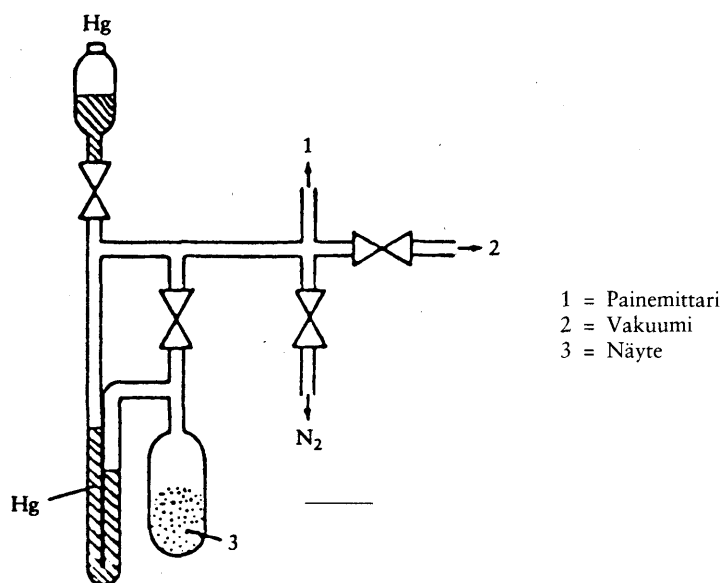
*Lisäys**Kuva 1*

Laite, jolla määritetään höyrynpainekäyrä dynaamista menetelmää käyttäen



Kuva 2

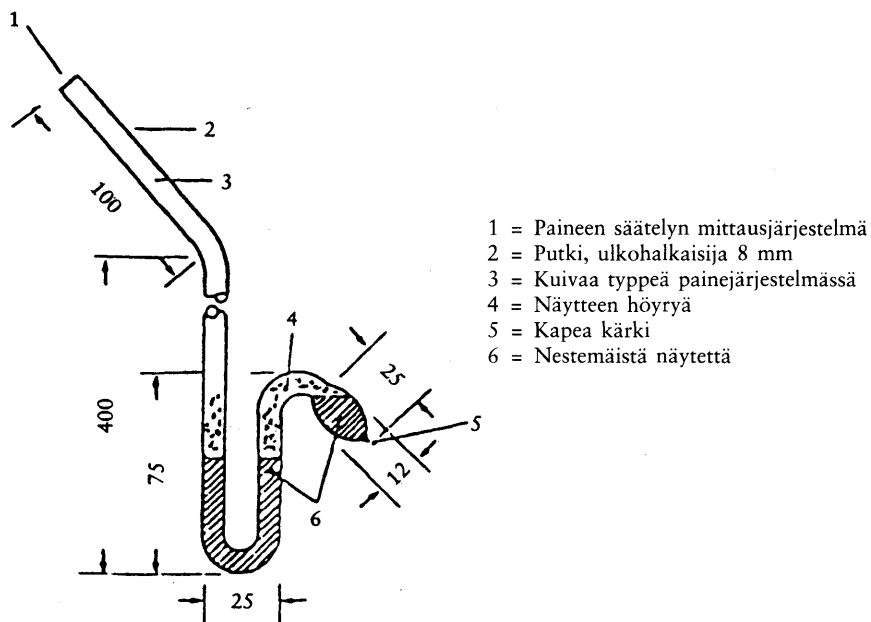
Laite, jolla määritetään höyrystyneen painekäyrä staattista menetelmää käyttäen



Kuva 3

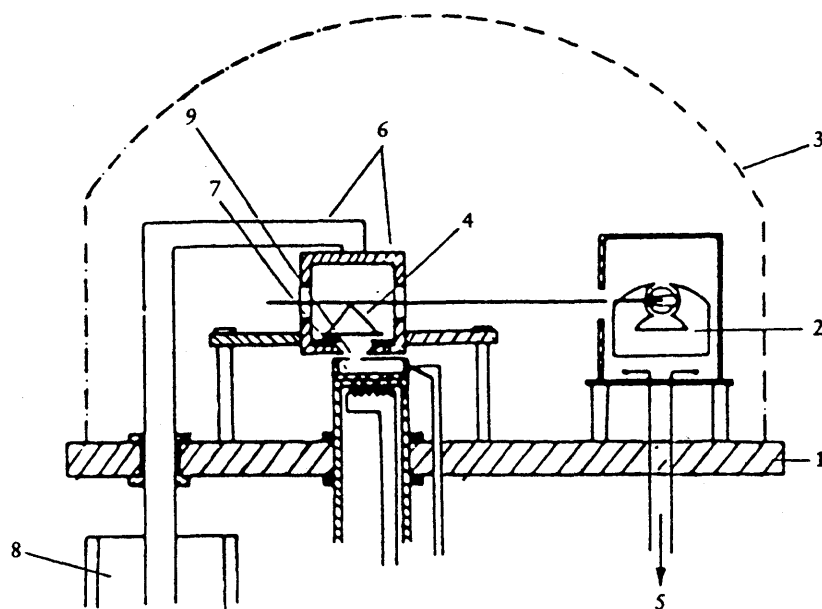
Isoteniskooppi

(Ks. lähdeluettelo kohta 2).



Kuva 4

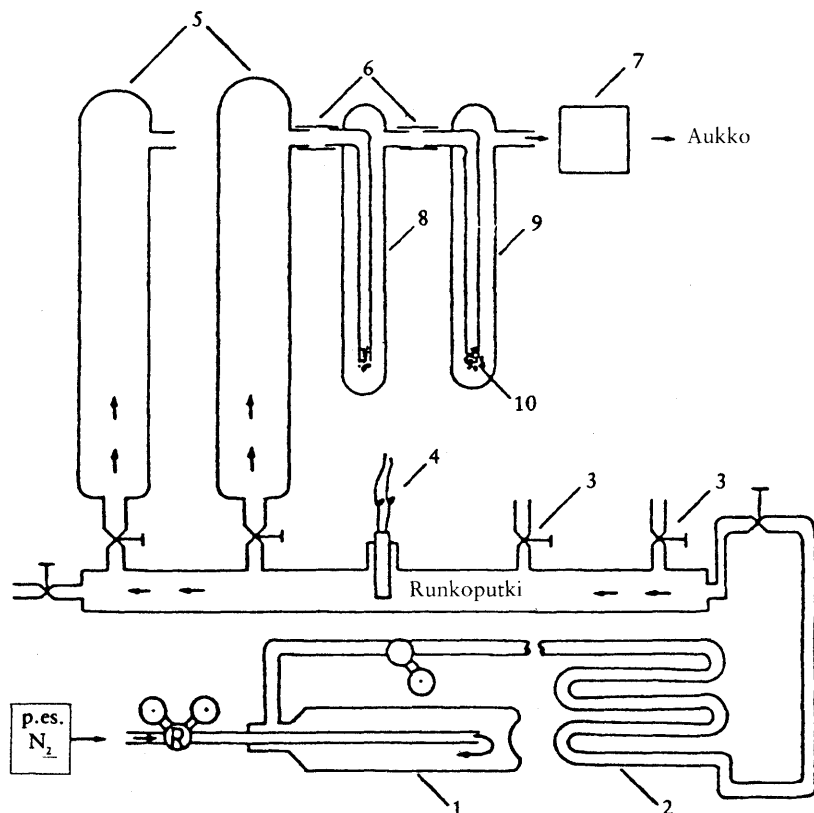
Laite, jolla määritetään höyrynpainekäyrä höyrynpainevaakaa käyttäen



- 1 = Aluslaatta
- 2 = Kiertokelamittari
- 3 = Lasikupu
- 4 = Vaaka ja vaakakuppi
- 5 = Vakuumin mittauslaite
- 6 = Jäädystyskotelo ja jäähdytystanko
- 7 = Haihdutuskattila
- 8 = Dewarin astia, jossa nestemäistä typpeä
- 9 = Suojus

Kuva 5

Esimerkki virtaussysteemistä kun höyrynpaine mitataan kaasunkyllästysmenetelmää käyttäen



- 1 = Virtauksen säädin
- 2 = Lämmönvaihdin
- 3 = Neulaventtiilit
- 4 = Suhteellisen kosteuden ilmaisin
- 5 = Kyllästämiskolonnit
- 6 = PTFE-liittymät
- 7 = Virtausmetri
- 8 = Loukku (imeytin)
- 9 = Öljyloukku
- 10 = Lasinen kuplimislaite

A. 5. PINTAJÄNNITYS

1 MENETELMÄ

Selostetut menetelmät perustuvat OECD:n testausohjeisiin (1).

1.1 Johdanto

Tässä kuvattuja menetelmiä käytetään vesipitoisten liuosten pintajännityksen mittaamiseen.

Ennen testien suorittamista aineen vesiliukoisuus, rakenne, hydrolyysiominaisuudet sekä misellien muodostumisen rajapitoisuus on tiedettävä.

Seuraavat menetelmät soveltuvat useimpien kemiallisten aineiden tutkimiseen. Niiden puhtausaste ei aseta rajoituksia.

Ainoastaan sellaisten vesipitoisten liuosten pintajännitys voidaan mitata rengastensiometrillä, joiden dynaaminen viskositeetti on alle 200 mPa S.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Pintajännitys on vapaa pintaentalpia pinta-alayksikköä kohden. Pintajännitys ilmoitetaan seuraavasti:

N/m (SI-yksikkö) tai

mN/m (SI-alayksikkö)

1 N/m = 10^3 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm vanhentuneessa CGS-järjestelmässä

1.3 Vertailuaineet

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Niitä käytetään aika ajoin etupäässä menetelmän toimivuuden tarkastamiseen ja jollakin muulla menetelmällä saatujen tulosten vertailuun.

Lähdeluettelon kohdissa 1 ja 2 luetellaan useisiin pintajännitysmittauksiin sopivia vertailuaineita.

1.4 Testausmenetelmien periaatteet

Testausmenetelmillä mitataan suurin pystysuora voima, joka on tarpeen irrottamaan mittalasissa olevan tutkittavan nesteen pintaan kosketuksissa oleva silmukka tai rengas nesteen pinnasta tai, nesteen ollessa vadilla reuna kosketuksessa pintaan, nostamaan ylös muodostunut kalvo.

1.5 Laatuksiteerit

Näillä menetelmillä saavutetaan suurempi tarkkuus kuin ympäristömääritykset yleensä edellyttävät.

1.6 Menetelmien selostus

1.6.1 Vatimenetelmä

Ks. ISO304 (Pinta-aktiiviset aineet — pintajännityksen määrittäminen nostamalla nestekalvoja).

1.6.2 *Silmukkamenetelmä*

Ks. ISO 304 (Pinta-aktiiviset aineet — pintajännityksen määrittäminen nostamalla nestekalvoja).

1.6.3 *Rengasmenetelmä*

Ks. ISO 304 (Pinta-aktiiviset aineet — pintajännityksen määrittäminen nostamalla nestekalvoja).

1.6.4 *OECD:n harmonisoitu rengasmenetelmä*

1.6.4.1 Laitteet

Kaupan olevat tensiometrit ovat riittävän tarkkoja mittauksen suorittamiseen. Niissä on seuraavat osat:

- liikkuva näytepöytä,
- jännityksen mittaamislaitte,
- mittausväline (rengas),
- mittausastia.

1.6.4.1 Liikkuva näytepöytä

Näytepöytä toimii alustana, jolle testattavaa ainetta sisältävä lämpösäädely mittausastia asetetaan. Pöytä ja mittauslaite on kiinnitetty jalustaan.

1.6.4.1.2 Jännityksen mittauslaite

Jännityksen mittauslaite (ks. kuva) on sijoitettu näytepöydän yläpuolelle. Jännityksen mittausvirhe saa olla korkeintaan $\pm 10^6$ N, joka vastaa $\pm 0,1$ mg:n virherajaa massan mittauksessa. Kaupan olevissa tensiometreissä mittausasteikossa käytetään useimmiten mN/m-kalibrointia, joten pintajännitys saadaan suoraan 0,1 mN/m:n tarkkuudella.

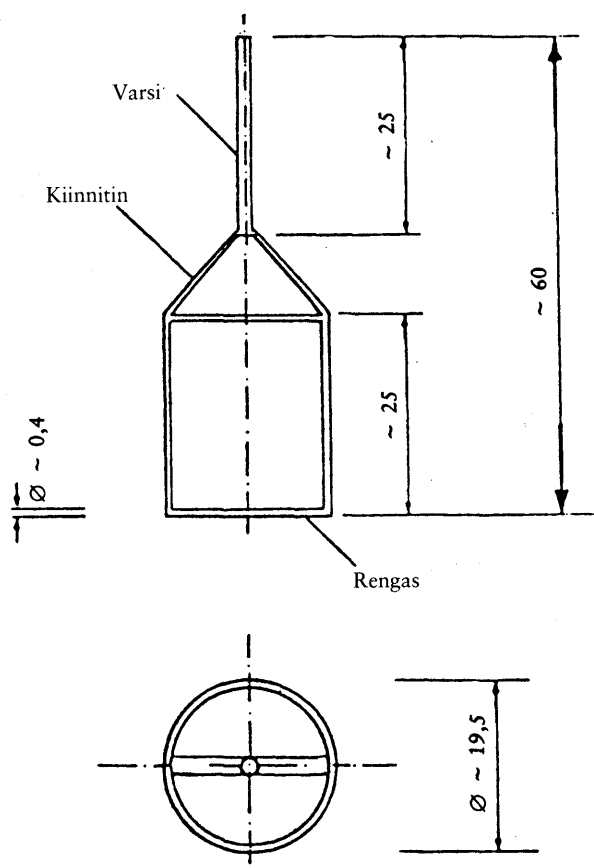
1.6.4.1.3 Mittausväline (rengas)

Rengas on yleensä tehty noin 0,4 mm:n paksuisesta platina-iridiumlangasta, ja sen ympärysmitta on 60 mm. Rengas riippuu vaakasuorassa metallivarteen kiinnitetystä metallilankakiinnitimestä, joka on yhteydessä jännityksen mittauslaitteeseen (ks. kuva).

Kuva

Mittausväline

(Kaikki mitat millimetreinä)



1.6.4.1.4 Mittausastia

Mittausastian, jossa testattava liuos mitataan, on oltava lämpösäädelyä lasia. Sen on oltava sellainen, että testattavan liuoksen ja sen pinnan yläpuolella olevan kaasufaasin lämpötila pysyy vakiona eikä näyte pääse haihtumaan mittauksen aikana. Lasisylinterit, joiden sisäläpimitta on vähintään 45 mm, ovat sopivia.

1.6.4.2 Laitteen esivalmistelu

1.6.4.2.1 Puhdistus

Lasiastiat on puhdistettava huolellisesti. Ne on tarvittaessa pestävä kromirikkihapolla ja sitten siirappimaisella fosforihapolla (83—98 % painosta H_3PO_4), huuhdottava läpikotaisin vesijohtovedellä ja lopuksi pestävä kahdesti tislatusella vedellä, kunnes saadaan neutraali reaktio, ja sitten kuivattava tai huuhdottava määritettävänä olevalla nesteellä.

Rengas on ensin huuhdottava huolellisesti vedellä vesiliukoisten aineiden poistamiseksi, upotettava hetkeksi kromirikkihappoon, pestävä kahdesti tislatusella vedellä, kunnes neutraali reaktio saadaan, ja lopuksi kuumennettava hetken aikaa metanoliliikkeen yläpuolella.

Huomautus

Kromirikkihapolla tai fosforihapolla tuhoutumattomien tai niihin liukenemattomien aineiden, esim. silikonien, aiheuttama kontaminaatio on poistettava jollakin orgaanisella liuottimella.

1.6.4.2.2 Laitteen kalibrointi

Laitteen tarkistuksessa nollapiste tarkistetaan ja säädetään, että laitteella voidaan luotettavasti määrittää mN/m.

Asennus:

Laite asennetaan vaakatasoon esimerkiksi vesivaa'an avulla tensiometrin alustalle säätämällä alustan tasausruuveja.

Nollapisteen säätö:

Kun rengas on kiinnitetty laitteeseen ja ennenkuin se upotetaan nesteeseen, tensiometrin osoitin säädetään nolnaan ja tarkistetaan, että rengas on samassa tasossa kuin nesteen pinta. Tätä tarkistettaessa nesteen pintaa voidaan käyttää peilinä.

Kalibrointi:

Varsinainen koekalibrointi voidaan suorittaa käyttäen jompaakumpaa kahdesta menettelytavasta:

- a) Käyttämällä Massaa: menettelytapa, jossa renkaaseen asetetaan 0,1—1,0 g:n painoja, joiden massa tunnetaan. Kalibrointitekijä Φ_a , jolla kaikki laitteen antamat lukemat on kerrottava, määritetään yhtälöllä (1):

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

jossa:

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

m = renkaaseen asetetun painon massa (g)

g = painovoiman kiihtyvyys (981 cm s⁻² merenpinnan korkeudella)

b = renkaan keskiympärysmitta (cm)

σ_a = tensiometrin lukema kun paino on asetettu renkaaseen (mN/m).

- b) Käyttämällä vettä: Menettelytapa, jossa käytetään puhdasta vettä, jonka pintajännitys esimerkiksi 23 °C:ssä on yhtä kuin 72,3 mN/m. Tämä menettelytapa on nopeampi kuin painokalibrointi, mutta siinä on aina se vaara, että veden pintajännitys on vääristynyt pinta-aktiivisten aineiden jäämien vuoksi.

Kalibrointitekijä Φ_b , jolla kaikki laitteen lukemat on kerrottava, määritetään yhtälöllä (2):

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

jossa:

σ_o = kirjallisuudessa annettu veden pintajännitysarvo (mN/m)

σ_g = mitattu veden pintajännitysarvo (mN/m), molemmat samassa lämpötilassa.

1.6.4.3 Näytteiden valmistaminen

Testattavista aineista valmistetaan vesiliuos käyttämällä tarvittavaa pitoisuutta vedessä. Se ei saa sisältää liukenemattomia aineita.

Liuos on pidettävä vakio­lämpötilassa ($\pm 0,5$ °C). Koska mittausastiassa olevan liuoksen pintajännitys muuttuu ajan kuluessa, useita mittauksia tehdään eri aikoina, ja laaditaan pintajännitystä ajan funktiona kuvaava käyrä. Kun muutosta ei enää tapahdu, tasapainotila on saavutettu.

Pöly ja muiden aineiden aiheuttama kontaminaatio häiritsevät mittauksia. Työ on sen vuoksi tehtävä suojakannen alla.

1.6.5 Koeolosuhteet

Koe on suoritettava noin 20 °C:n lämpötilassa, ja on tarkistettava, ettei se muutu enempää kuin $\pm 0,5$ °C.

1.6.6 Kokeen suoritus

Mitattavat liuokset asetetaan huolellisesti puhdistettuun mittausastiaan välttämällä vaahtoamista, minkä jälkeen mittausastia asetetaan mittalaitteen pöydälle. Pöytää, jolla mittausastia on, nostetaan, kunnes rengas on uponnut mitattavan liuoksen pinnan alle. Sen jälkeen pöytää lasketaan asteittain tasaisesti (noin 0,5 cm/min) renkaan irrottamiseksi pinnasta, kunnes suurin voima on saavutettu. Renkaaseen kiinnittynyt nestekerros ei saa irrota siitä. Kun mittaus on suoritettu, rengas upotetaan jälleen pinnan alle ja mittaus toistetaan, kunnes pysyvä pintajännitysarvo on saavutettu. Nesteen mittausastian asettamisesta kulunut aika kirjataan kussakin mittauksessa. Renkaan irrottamiseen nesteen pinnasta tarvittava suurin voima kirjataan.

2

TULOKSET

Pintajännityksen laskemiseksi laitteen mN/m-lukema kerrotaan ensin kalibrointitekijällä Φ_a tai Φ_b (riippuen käytetystä kalibrointimenetelmästä). Tämä antaa vain likimääräisen arvon, joka on siis korjattava.

Harkins ja Jordan (3) ovat empiirisesti määrittäneet rengasmenetelmällä mitattujen pintajännitysarvojen korjaustekijät, jotka riippuvat renkaan mitoista, nesteen tiheydestä ja sen pintajännityksestä.

Koska on vaivalloista määrittää korjaustekijä kunkin yksittäisen mittauksen osalta Harkinsin ja Jordanin taulukosta, yksinkertaisempaa menettelyä eli korjattujen pintajännitysarvojen ottamista suoraan taulukosta voidaan käyttää laskettaessa vesiliuosten pintajännitystä. (Taulukon arvojen väliin osuvien lukemien osalta käytetään interpolaatiota.)

TAULUKKO: MITATUN PINTAJÄNNITYKSEN KORJAUS

Vain vesiliuoksille, $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$

R = 9,55 mm (keskimääräinen renkaan säde)

r = 0,185 mm (renkaan metallilangan säde)

Koearvo (mN/m) (mN/m)	Korjattu arvo (mN/m)	
	Painon kalibrointi (katso 1.6.4.2.2 a)	Veden kalibrointi (katso 1.6.4.2.2 b)
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	71,1	—
78	73,2	—

Tämä Harkinsin ja Jordanin korjauksen perusteella tehty taulukko on samanlainen kuin DIN-standardissa (DIN 53914) oleva, joka koskee vettä ja vesiliuoksia (tiheys $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$) sekä kaupallisesti saatavissa olevaa rengasta, jonka mitat ovat R = 9,55 mm (keskimääräinen renkaan säde) ja r = 0,185 mm (renkaan metallilangan säde). Taulukko antaa korjatut pintajännitysarvot, kun mittaus on suoritettu painoilla tai vedellä tehdyn kalibroinnin jälkeen.

Pintajännitys voidaan vaihtoehtoisesti laskea seuraavan kaavan avulla ilman sitä edeltävää kalibrointia:

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

jossa

F = dynamometrillä mitattu voima kalvon irtoamishetkellä

R = renkaan säde

f = korjaustekijä (1).

3

RAPORTOINTI

Raportin tulee mikäli mahdollista sisältää seuraavat tiedot:

- käytetty menetelmä: ISO:n tai OECD:n harmonisoitu rengastensiometrimenetelmä,
- käytetyn veden tai liuoksen tyyppi,
- aineen tarkka määrittäminen (koostumus ja epäpuhtaudet),
- mittaustulokset: pintajännitys (lukema), jossa ilmoitetaan yksittäiset lukemat ja niiden aritmeettinen keskiarvo, sekä korjattu keskiarvo (laitetekijä ja korjaustaulukko huomioon ottaen),
- liuoksen pitoisuus,
- koelämpötila,
- käytetyn liuoksen ikä, erityisesti liuoksen valmistamisen ja mittauksen suorittamisen välinen aika,
- kuvaus ajan vaikutuksesta pintajännitykseen liuoksen mittaustulokseen siirtämisen jälkeen,
- kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomautukset on ilmoitettava, erityisesti epäpuhtaudet ja aineen fysikaalinen tila.

4

LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115 — Decision of the Council C (81) — 30 Final.
 - (2) Pure and Applied Chemistry, Vol. 48, 1976, s. 511.
 - (3) Harkins, W.D., Jordan H.F.J., Amer. Chem. Soc., Vol. 52, 1930, s. 1751.
-

A. 6. VESILIUKOISUUS

1 MENETELMÄ

Selostetut menetelmät perustuvat OECD:n testausohjeisiin (1).

1.1 Johdanto

Ennen kokeen suorittamista on tiedettävä aineen rakennekaava, höyrynpaine, dissosiaatiovakio ja hydrolyysi (pH:n funktiona).

Ei ole olemassa yksittäistä menetelmää, joka kattaa kaikki vesiliukoisuusasteet.

Menetelmä ei sovellu haihtuvien aineiden testauksiin.

Alla kuvatut kaksi menetelmää kattavat kaikki liukoisuusvälit:

- menetelmä, joka sopii erityisesti puhtaiden, huonosti liukenevien ($> 10^{-2}$ g/l) ja vedessä muuttumattomina pysyvien aineiden testaukseen ja jota kutsutaan "kolonnieluutiomenetelmäksi".
- toinen menetelmä, joka sopii erityisesti puhtaiden, paremmin liukenevien ($< 10^{-2}$ g/l) ja vedessä muuttumattomina pysyvien aineiden testaukseen ja jota kutsutaan "pullomenetelmäksi".

Epäpuhtauksilla voi olla suuri vaikutus testattavan aineen vesiliukoisuuteen.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Aineen vesiliukoisuudella tarkoitetaan aineen massapitoisuutta kylläisessä vesiliuoksessa määrättyssä lämpötilassa. Vesiliukoisuus ilmoitetaan massan yksikköinä liuoksen tilavuutta kohti.

SI-yksikkö on kg/m^3 (g/l voidaan myös käyttää).

1.3 Vertailuaineet

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Niitä käytetään aika ajoin etupäässä menetelmän toimivuuden tarkastamiseen ja jollakin muulla menetelmällä saatujen tulosten vertailuun.

1.4 Testausmenetelmän periaatteet

Yksinkertaisella esitutkimuksella määritetään näytteen arvioitu määrä ja tiivistyneen massan pitoisuuden saavuttamiseen kulunut aika.

1.4.1 Kolonnieluutiomenetelmä

Tämä menetelmä perustuu testattavan aineen eluointiin vedellä mikrokolonnista, joka on täytetty inertillä täyteaineella, kuten lasihelmillä, silikageelillä tai hiekalla, ja liian suurella määrällä testattavaa ainetta. Vesiliukoisuus määritetään kun eluaatin massapitoisuus on vakio. Tämä näkyy tiivistymistasanteena ajan funktiona.

1.4.2 Pullomenetelmä

Tätä menetelmää käytettäessä aine (kiinteät aineet on jauhattava) liuotetaan veteen jonkin verran koelämpötilaa korkeammassa lämpötilassa. Kun kyllästyminen on tapahtunut, seos jäähdytetään ja säilytetään koelämpötilassa sekoittaen, kunnes tasapaino (2) on saavutettu. Sen jälkeen määritetään jollakin sopivalla analyttisellä menetelmällä aineen massapitoisuus vesiliuoksessa, joka ei saa sisältää liukenemattomia aineosia.

1.5. Laatuksiteerit

1.5.1 Toistettavuus

Kolonnieluutiomenetelmällä 30 % on saavutettavissa; pullomenetelmällä 15 %.

1.5.2 Herkkyys

Tämä riippuu käytetystä menetelmästä, mutta massapitoisuusmäärityksiä 10^{-6} g/l voidaan tehdä.

1.6 Menetelmien selostus

1.6.1 Koeolosuhteet

Paras kokeen suoritustilapötilä on $20\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. Jos epäillään lämpötilan vaikutusta liukoisuuteen ($< 3\%$ per °C), tulee lisäksi käyttää kahta muuta lämpötilaa, jotka ovat vähintään 10 °C alle ja yli alun perin valitun lämpötilan. Tässä tapauksessa lämpötilan säädön tulee olla $\pm 0,1\text{ °C}$. Valittu lämpötila on säilytettävä laitteen kaikissa asianmukaisissa osissa.

1.6.2 Esitutkimus

Lasitulpalla varustettuun 10 ml:n mittalasiin, jossa on noin 0,1 g näytettä (kiinteät aineet on jauhettava), lisätään eneneviä määriä tislattua huoneenlämpöistä vettä allaolevan taulukon kuvamallalla tavalla:

0,1 g liuokenevaa "x" ml:ssa vettä	0,1	0,5	1	2	10	100	100
Liuokoisuusarvio (g/l)	> 1000	1000—200	200—100	100—50	50—10	10—1	< 1

Joka kerran, kun taulukossa mainittu vesimäärä on lisätty, seosta ravistellaan voimakkaasti 10 minuutin ajan ja tarkastetaan silmämääräisesti, onko näytteestä jäljellä liukenemattomia aineosia. Jos 10 ml vesimäärän lisäämisen jälkeen näyte tai sen osia on liukenematta, mittalasin sisältö siirretään 100 ml:n mittalasiin, joka täytetään 100 ml:aan asti ja ravistellaan. Alempien liukoisuuksien ollessa kyseessä aineen liukenemiseen tarvittava aika voi olla huomattavasti pitempi (jopa 24 tuntia). Liuokoisuusarvio annetaan taulukossa sen lisätyn vesimäärän alla, jossa täydellinen liukeneminen tapahtuu. Mikäli näyte edelleen vaikuttaa liukenemattomalta, liuotusta on jatkettava, jotta voidaan päättää, käytetäänkö kolonnieluutio- vai pulloliukenemismenetelmää.

1.6.3 Kolonnieluutiomenetelmä

1.6.3.1 Täyteaine, liuote ja eluentti

Kolonnieluutiomenetelmässä käytetyn täyteaineen tulee olla inerttiä. Kysymykseen tulevia aineita ovat lasihelmet ja silika. Testattava aine lisätään täyteaineeseen sopivan, haihtuvan analyysireagenssilaatuisen liuottimen avulla. Lasi- tai kvartsilaitteesta saatua kahdesti tislattua vettä käytetään eluenttina tai liuotteena.

Huomautus

Orgaanisesta ioninvaihtimesta suoraan tulevaa vettä ei saa käyttää.

1.6.3.2 Täyteaineen pakkaaminen

Noin 600 mg täyteainetta punnitaan ja asetetaan 50 ml:n pyöreäpohjaiseen kolviin.

Sopiva, punnittu määrä näyteainetta liuotetaan valittuun liuottimeen. Sopiva määrä testattavaa liuosta lisätään täyteaineeseen. Liuottimen täytyy haihtua kokonaan esim. pyörivässä haihduttimessa; muuten täyteaine ei kyllästy vedellä johtuen täyteaineen pinnalla tapahtuvasta jakaantumisesta.

Täyteaineen pakkaamisessa voi esiintyä ongelmia (virheellisiä tuloksia), jos testattava aine lisätään oljynä tai erilaisena kidefaasina. Tätä ongelmaa on tutkittava kokeellisesti.

Pakatun täyteaineen annetaan liota noin kaksi tuntia 5 ml:ssa vettä, ja sitten seos asetetaan mikrokolonneihin. Vaihtoehtoisesti voidaan vedellä täytettyyn mikrokolonneihin kaataa kuivaa pakattua täyteainetta ja tasapainottaa sen jälkeen noin kahden tunnin ajan.

Kokeen suoritus

Aineen eluutio täyteaineesta voidaan tehdä kahdella tavalla:

- kierrätyspumppu (ks. kuva 1),
- tasausastia (ks. kuva 4).

1.6.3.3 Kierrätyspumppulla varustettu kolonnieluutiomenetelmä

Laitte:

Kuvassa 1 esitetään kaavakuva tyypillisestä laitteesta. Kuvassa 2 esitetään sopiva mikrokolonne, vaikkakin kaikenkokoiset ovat sopivia, mikäli ne täyttävät toistettavuutta ja herkkyyttä koskevat vaatimukset. Kolonnissa tulee olla ylätilaa niin paljon, että siihen mahtuu ainakin viisi pakattua kolonnin vettä ja vähintään viisi näytettä. Vaihtoehtoisesti kokoa voidaan pienentää, jos lisäliuotinta käytetään korvaamaan ensimmäiset viisi pakattua kolonnin, jotka poistettiin epäpuhtauksien vuoksi.

Kolonne yhdistetään kierrätyspumppuun, jolla voidaan säädellä noin 25 ml/h virtausta. Pumpun liitännät ovat polytetrafluorietyleneä ja/tai lasia. Kun kolonne ja pumppu on liitetty toisiinsa, laitteella tulee voida ottaa näytteitä ulosvirtaavasta nesteestä ja tasapainottaa ylätila normaalissa ilmanpaineessa. Kolonnissa olevan aineen tukena on pieni (5 mm) lasivillatulppa, joka toimii myös aineosien suodattimena. Kierrätyspumppu voi olla esimerkiksi peristalttinen pumppu (on huolehdittava siitä, että putkimateriaali ei aiheuta kontaminaatiota ja/tai adsorboitumista) tai kalvopumppu.

Mittauksen suorittaminen:

Kolonnin läpivirtaus aloitetaan. Noin 25 ml/h virtausnopeutta suositellaan käytettäväksi (noin 10 pakatun kolonnin tilavuutta tunnissa kuvatus kolonnin osalta). Ensimmäiset viisi tilavuutta (minimi) heitetään pois, jotta veteen liukenevat epäpuhtaudet poistuvat. Tämän jälkeen kierrätyspumppu saa olla toiminnassa, kunnes päästään tasapainotilaan eli saadaan viisi peräkkäistä näytettä, joiden pitoisuus vaihtelee satunnaisesti korkeintaan $\pm 30\%$. Näytteiden välillä tulee olla aikaväli, joka on yhtä suuri kuin aika, joka kuluu kun eluenttia kulkee vähintään 10 pakatun kolonnin tilavuuden verran.

1.6.3.4 Kolonnieluutiomenetelmä tasausastiassa

Laitte (ks. kuva 4 ja 3):

Tasausastia: Yhteys tasausastiaan tehdään käyttämällä lasihiosta, joka on yhdistetty PTFE-putkeen. Noin 25 ml/h virtausnopeutta suositellaan käytettäväksi. Peräkkäiset eluaatiifraktiot kerätään ja analysoidaan valittua menetelmää käyttäen.

Mittauksen suoritus:

Vesiliukoisuus määritetään vähintään viidestä peräkkäisestä fraktiosta, jotka kuuluvat fraktioiden keskimmaiseen eluaattisarjaan ja joissa pitoisuus on vakaa ($\pm 30\%$).

Toinen koe tehdään virtausnopeudella, joka on puolet ensimmäisestä. Jos kummankin kokeen tulokset ovat sopusoinnussa, testi on tyydyttävä; mikäli alemmalla virtausnopeudella saatu liukoisuus näyttää olevan suurempi, virtausnopeuden pienentämistä puoleen jatketaan, kunnes kaksi peräkkäistä koetta antaa tulokseksi saman liukoisuuden.

Molemmissa tapauksissa (käytettäessä kierrätyspumppua tai tasausastiaa) on tarkastettava, sisältävätkö fraktiot kolloidisia hiukkasia, tutkimalla, syntyykö Tyndallin efekti (valohajontaa). Tällaisten hiukkasten esiintyminen mitätöi koetulokset, jolloin testi on uusittava ja kolonnin suodatustoimintaa parannettava. Kirjataan jokaisen näytteen pH. Toinen koe on suoritettava samassa lämpötilassa.

1.6.4 Pullomenetelmä

1.6.4.1 Laitteet

Pullomenetelmässä käytetään seuraavia laitteita:

- tavallisia laboratoriolasiastioita ja instrumentteja,
- laitetta, jolla voidaan sekoittaa liuoksia säädetyssä vakio­lämpötilassa,
- sentrifugia (mieluiten termostaatilla varustettua), mikäli tarpeen emulsioiden käsittelyssä, sekä
- analyysilaitteita.

1.6.4.2 Mittauksen suoritus

Halutun vesimäärän kyllästämiseen tarvittava ainemäärä arvioidaan esitutkimuksen perusteella. Tarvittavan veden määrä riippuu analyysimenetelmästä ja liukoisuusvälistä. Noin viisi kertaa yllä arvioitu määrä ainetta asetetaan kuhunkin kolmeen lasitulpalla varustettuun lasiastiaan (esim. sentrifugin putket, pullot). Valittu vesimäärä lisätään kuhunkin astiaan, jotka suljetaan tiiviisti. Suljettuja astioita ravistellaan $30\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa. (Ravistus- tai sekoituslaitetta, joka pystyy toimimaan vakio­lämpötilassa, tulisi käyttää, esim. magneettisekoitusta termostaatilla säädelyssä vesihauteessa). Vuorokauden kuluttua yksi astia poistetaan ja tasapainotetaan 24 tunnin ajan koelämpötilassa silloin tällöin ravistellen. Sen jälkeen astian sisältö sentrifugoidaan koelämpötilassa, ja seoksen pitoisuus puhtaassa vesifaasissa määritetään sopivalla analyttisellä menetelmällä. Kahden muun astian kohdalla menetellään samalla tavoin $30\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa tehdyn alustavan, kaksi ja kolme vuorokautta kestävä­n tasapainotuksen jälkeen. Jos vähintään kahdesta astiasta saatu pitoisuustulos vastaa vaadittua toistettavuutta, testi on tyydyttävä. Koko koe on uusittava käyttäen pitempiä tasapainotusaikoja, jos astioista 1, 2 ja 3 saadut tulokset viittaavat nouseviin arvoihin.

Kunkin näytteen pH on kirjattava.

1.6.5 Analyysi

Ainekohtainen analyttinen menetelmä on suositeltavin näitä mää­rityksiä tehtäessä, koska pienet määrät liukoisia epäpuhtauksia voivat aiheuttaa suuria virheitä mitattuun liukoisuuteen. Esimerkkejä tällaisista menetelmistä ovat kaasu- tai nestekromatografia, titrausmenetelmät, fotometri- ja voltame-trimenetelmät.

2 TULOKSET

2.1 Kolonnieluutiomenetelmä

Vähintään viiden peräkkäisen kyllästymisalueelta otetun näytteen keskiarvo ja keskipoikkeama lasketaan kunkin testin osalta.

2.2 Pullomenetelmä

Kunkin kolmen pullon osalta ilmoitetaan tulokset, ja vakaiksi määritettyjen tulosten (toistettavuus alle 15 %) keskiarvot lasketaan ja ilmoitetaan massan yksikköinä liuoksen tilavuutta kohden. Tämä voi edellyttää massan yksiköiden muuntamista tilavuusyksiköiksi käyttämällä tiheyttä liukoisuuden ollessa hyvin korkea (<100 grammaa litraa kohden).

3 RAPORTOINTI

3.1 Kolonnieluutiomenetelmä

Raportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää esitutkimuksen tulokset sekä seuraavat tiedot:

- aineen tarkka määrittäminen (koostumus ja epäpuhtaudet),
- kunkin näytteen yksittäinen pitoisuus, virtausnopeus ja pH,
- vähintään viiden peräkkäisen kyllästymisalueelta otetun näytteen keskiarvo ja keskipoikkeama kunkin testin osalta,
- kahden peräkkäisen hyväksyttävän testin keskiarvo,
- veden lämpötila kyllästämisen prosessin kuluessa,
- käytetty analyysimenetelmä,
- täytemateriaalin laatu,
- täytemateriaalin pakkaaminen,
- käytetty liuotin,
- testauksen ja käytetyn menetelmän aikana havaittu aineen kemiallinen epävakaisuus,
- kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot.

3.2 Pullomenetelmä

Raportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- aineen tarkka määrittäminen (koostumus ja epäpuhtaudet),
- yksittäiset analyttiset määritykset ja niiden keskiarvo, mikäli määrityksiä oli useampi kuin yksi pulloa kohden,
- kunkin näytteen pH,
- keskiarvo niistä pulloista, joiden tulokset vastasivat toisiaan,
- koelämpötila,
- käytetty analyttinen menetelmä,
- testauksen ja käytetyn menetelmän aikana havaittu aineen kemiallinen epävakaisuus,
- kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot.

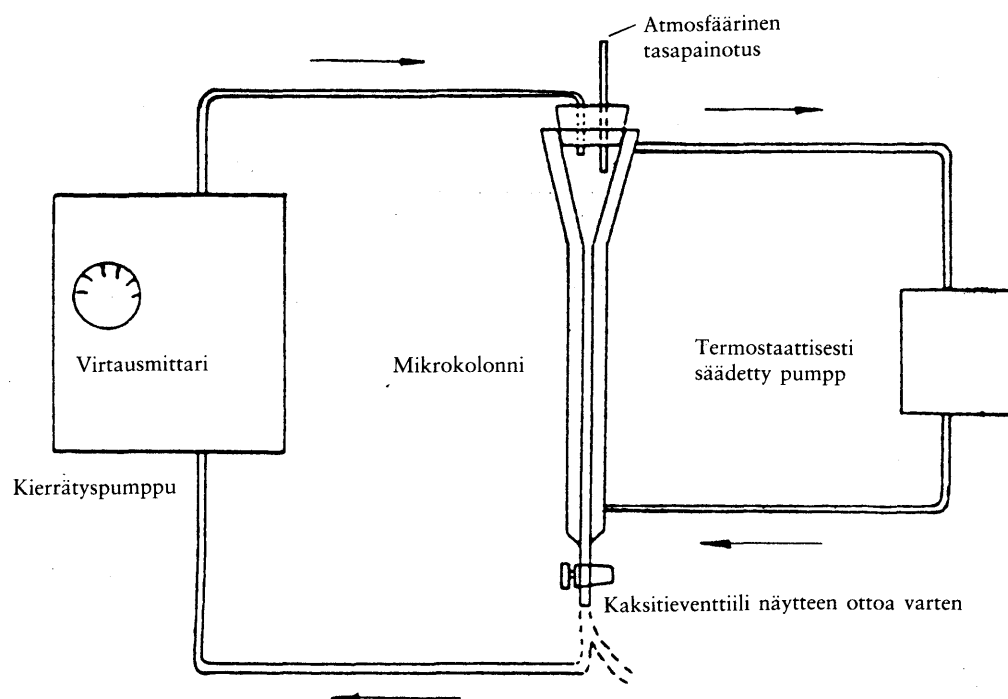
4 LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105. Decision of the Council C (81) 30 Final.
- (2) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 116. Decision of the Council C (81) 30 Final.

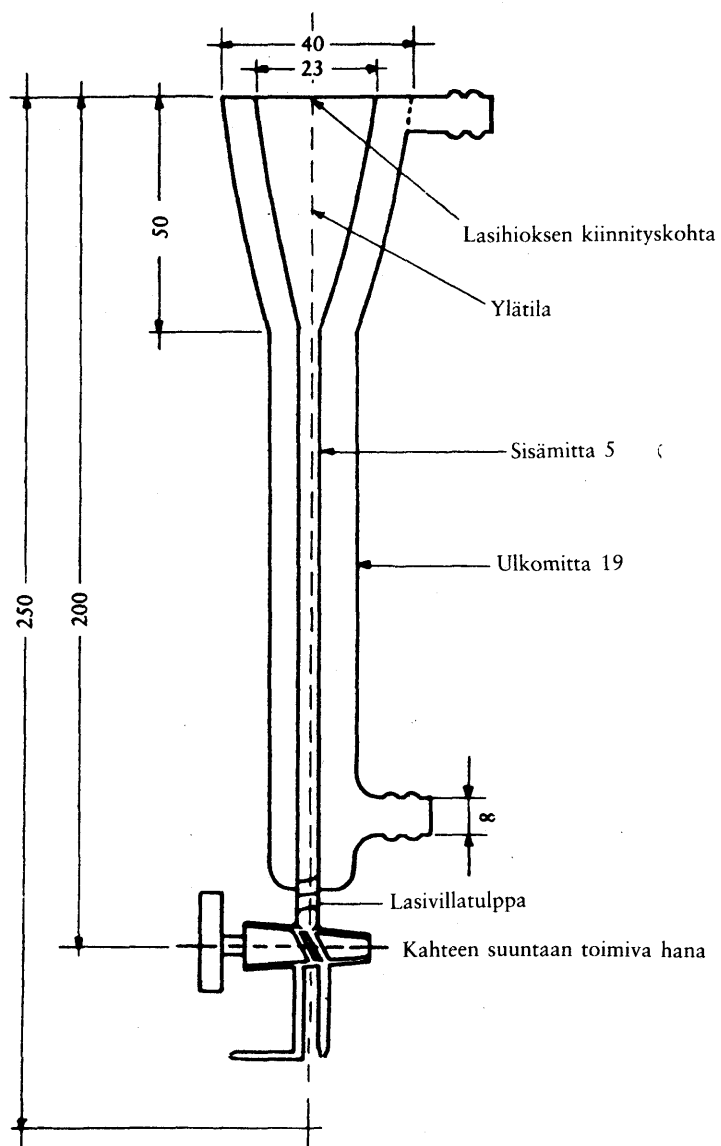
Lisäys

Kuva 1

Kaaviokuva koejärjestelystä



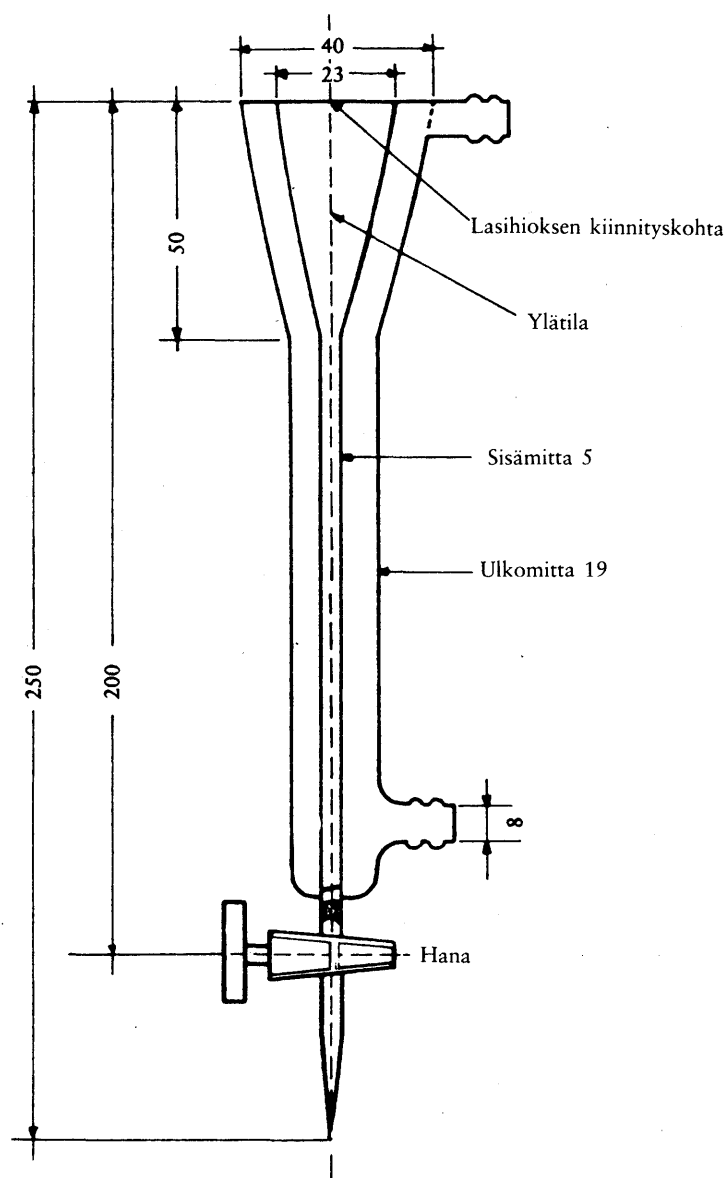
Kuva 2
Tyypillinen mikrokolonne
(Kaikki mitat millimetreinä)



Kuva 3

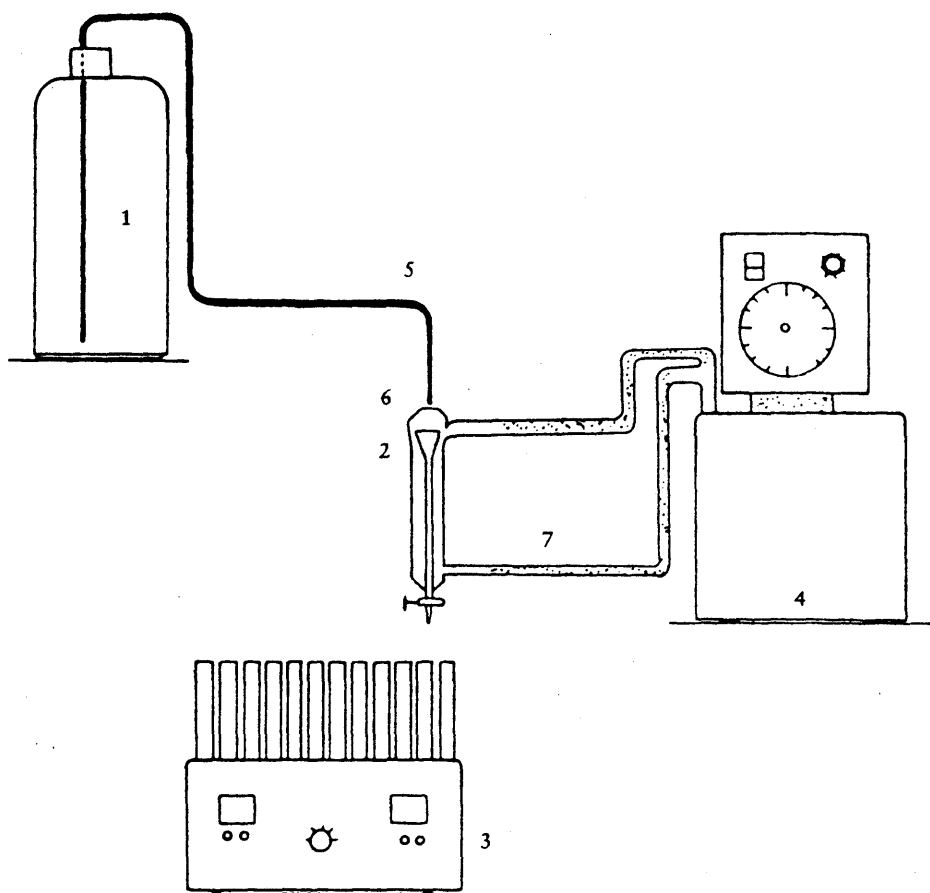
Tyypillinen mikrokolonne

(Kaikki mitat millimetreinä)



Kuva 4

Kokeen suoritustapa määritettäessä vesiliukoisuutta heikosti liukenevilla aineilla, joilla on alhainen haihtuvuus



1 = Tasausastia (esim. 2,5 l:n kemikaalipullo)

2 = Kolonni (katso kuva 3)

3 = Fraktionkerääjä

4 = Termostaatti

5 = Teflonputki

6 = Lasitulppa (lasihios)

7 = Vesilinja termostaatin ja kolonnin välillä, sisäläpimitta noin 8 mm

A. 7. RASVALIUKOISUUS

1 MENETELMÄ

Selostettu menetelmä perustuu OECD:n testausohjeisiin (1).

1.1 Johdanto

Kokeen suorittamiseksi on tarpeen tietää aineen jakaantumiskerroin, vesiliukoisuus, rakennekaava ja stabiilius 50 °C:ssa. Tämä menetelmä soveltuu vain aineisiin, jotka ovat oleellisesti puhtaita, stabiileja 50 °C:ssa eivätkä kovin herkästi haihtuvia näissä olosuhteissa.

Tällä menetelmällä ei voi testata aineita, jotka reagoivat triglyseridien kanssa.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Rasvaliukoisuus on aineen massan fraktio, joka muodostaa homogeenisen faasin nestemäisen rasvan (öljyn) kanssa aiheuttamatta kemiallisia reaktioita. Suurinta tällaista massan fraktiota nimitetään kylläisen massan fraktioksi, ja tämä on lämpötilan funktio.

Aineen kylläisen massan fraktio ilmoitetaan grammoina 100 g standardirasvaa kohden $37 \pm 0,5$ °C:ssa.

Seuraava suhde on olemassa 100 g painavan liuoksen (S') ja 100 g painavan liuottimen (S) grammoina ilmoitetun liukoisuuden välillä:

$$S = \frac{100 \times S'}{100 - S'} \text{ grammaa 100 g standardirasvaa}$$

S-arvon kertominen 1 000:lla ilmoittaa määrän milligrammoina 100 g standardirasvaa kohden.

1.3 Vertailuaineet

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Niitä käytetään aika ajoin etupäässä menetelmän toimivuuden tarkastamiseen ja jollakin muulla menetelmällä saatujen tulosten vertailuun.

1.4 Menetelmän periaatteet

Ainetta lisätään nestemäiseen "standardirasvaan" ja sekoitetaan. Ainetta pannaan niin runsaasti, että syntyy ylimäärä. Aineen liuenut määrä määritetään sopivalla analyttisellä menetelmällä.

1.5 Laatuksiteerit

1.5.1 Spesifisyys

Mittauksen toistettavuutta ei tällä hetkellä tunneta.

Tulokset koskevat standardirasvoja ja ovat luotettavia suhteellisen puhtaiden aineiden ollessa kyseessä. Jo 37 °C:ssa rasvat voivat muodostaa emulsion tai hienojakoisen suspension kiinteistä aineista. Koska tästä on haittaa massan fraktion määrittämiselle, niiden muodostumista tulee välttää.

1.6 Menetelmän selostus**1.6.1 Valmistelevat toimenpiteet****1.6.1.1 Laitteet**

- tavallisia laboratoriolasiastioita,
- vaaka,
- termostaatilla varustettu sentrifugi,
- sekoitin, johon voidaan liittää lämmönsäätö,
- termostaatti.

1.6.1.2 Standardirasvat

On välttämätöntä käyttää standardirasvoja. Niiden määrittely on yksinkertaista, ja lisäyksessä on esimerkki tällaisesta standardirasvasta.

1.6.1.3 Esitutkimus

Yksinkertaisella esitestillä määritetään, kuinka paljon ainetta tarvitaan kyllästyneen massan fraktion aikaansaamiseksi koelämpötilassa (37 °C).

Huomautus

Kyllästymistasapainon saavuttaminen voi olla suuresti riippuvainen hiukkasten koosta kiinteitä aineita testattaessa. Tämän vuoksi tällaiset aineet on jauhettava.

1.6.1.4 Aineen valmistelevat toimenpiteet

Kahdeksan näytettä punnitaan 50 ml pulloihin. Yleensä kunkin näytteen tulee olla kaksi kertaa esitestissä määritettyä kyllästymiseen tarvittavaa määrää suurempi.

Kun pulloihin on lisätty noin 25 g nesteytettyä ja sekoitettua standardirasvaa, sekoittimilla varustetut pulloet suljetaan tiiviisti lasitulpalla. Neljää pulloa (ryhmä 1) sekoitetaan 30 °C:ssa, toisia neljää (ryhmä 2) noin 50 °C:ssa vähintään tunnin ajan.

1.6.2 Koeolosuhteet

Rasvaliukoisuus määritetään $37 \pm 0,5$ °C:n lämpötilassa.

1.6.3 Mittauksen suoritus

Kummankin ryhmän pulloja sekoitetaan $37 \pm 0,5$ °C:n lämpötilassa, kunnes sisältö on täysin sekoittunut.

Tasapainon saavuttamiseen kuluva sekoitusaikaa ei yleensä voi arvioida ennakolta. Nestemäisten aineiden ollessa kyseessä kyllästyminen voi tapahtua muutamassa minuutissa; kiinteiden aineiden osalta siihen voi mennä tunteja. Tavallisesti kolme tuntia riittää. Tämän ajan kuluttua kahta pulloa kummastakin ryhmästä ei enää hämmennetä, ja niiden annetaan seistä 37 °C:ssa, jotta liukenematon osa aineesta erottuu ja homogeeninen faasi muodostuu. Mikäli emulsio- tai suspensiomuodostusta esiintyy (esim. Tyndallin efekti), tämä eliminoidaan jollakin sopivalla tavalla kuten lämpösäädellä sentrifugimisella.

Kummankin ryhmän kolmatta ja neljättä pulloa sekoitetaan vähintään 24 tuntia ennenkuin niiden annetaan seistä $37 \pm 0,5$ °C:n lämpötilassa tunnin ajan.

Huomautus

Ellei pohjasakkaa (kiinteät aineet) ole muodostunut tai faasin erottumista (nestemäiset aineet) ole tapahtunut tämän ajan kuluttua, koe on uusittava käyttämällä suurempaa ainemäärää.

1.6.4 *Analyysi*

Yksi näyte kustakin kyllästyneestä rasvafaasista analysoidaan. Näyte punnitaan ja massan fraktio määritetään.

Mitä hyvänsä analyttistä menetelmää voidaan käyttää joko suoraan tai vedellä tai orgaanisella liuottimella uuttamisen tai jonkin muun erottamismenettelyn jälkeen.

Esimerkkejä näistä menetelmistä ovat:

- spektrofotometria,
- kaas- tai nestekromatografia,
- voltametria.

2 TULOKSET

Mikäli tuloksissa on huomattavia ali- tai ylikyllästämistä tai lyhyestä ja pitkästä aikavälistä johtuvia eroja, koe on uusittava ja on käytettävä pidempiä sekoitusaikoja.

3 RAPORTOINTI

Raportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- aineen tarkka määrittäminen (koostumus ja epäpuhtaudet),
- rasvan tarkka määrittäminen (esim. kuvaus, ominaisuudet, alkuperä, koostumus),
- analyysimenetelmä, poikkeamat ja erityispiirteet.

Tulokset on arvioitava yllä esitetyllä tavalla, ja ne muodostavat osan koeraportista. Ellei todetuissa milligrammaa 100 g kohden -arvoissa ollut merkittäviä eroja, yksittäiset arvot, keskiarvo ja keskipoikkeama ilmoitetaan. Jos merkittäviä eroja on uudelleentestauksen jälkeenkin, ilmoitetaan ainoastaan yksittäiset tulokset.

Kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomautukset on raportoitava.

4 LÄHDELUETTELO

(1) OECD, Paris 1981, Test Guideline 116 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

Lisäys

ESIMERKKI STANDARDIRASVOISTA

Tyypillisen standardirasvan koostumus on esitetty alla olevassa taulukossa.

Rasvahappojen jakauma

C-atomien

määrä rasvanappo- osuudessa	6	8	10	12	14	16	18	muut
GLC-alueet (%)	0,5	7,5	10,3	50,4	13,9	7,6	8,6	1

Glyseridijakauma

C-atomien kokonaismäärä

rasvahappo- osuuksissa	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
GLC-alueet (%)	0,1	0,3	1,0	2,3	4,9	10,9	13,9	21,1	16,1	11,7	9,8	4,4	2,2	1,1	0,2

Puhtaus

Monoglyseridipitoisuus (entsymaattinen) $\leq 0,1$ %

Diglyseridipitoisuus (entsymaattinen) $\leq 0,4$ %

Saippuoitumaton pitoisuus $\leq 0,1$ %

Wijs-numero $\leq 0,5$ %

Happonumero 0,02 %

Vesipitoisuus (K. Fischer) $\leq 0,1$ %

Selvä sulamispiste 28,5 °C

Tyypillinen absorptiospektri (kerroksen paksuus $d = 1$ cm, vertailu: vesi, 35°C)

Aallon pituus (nm)	290	310	330	350	370	390	430	470	510
Läpäisy (%)	2	15	37	64	80	88	95	97	98

Vähintään 10-prosenttinen valon läpäisy 303 nm:ssä.

Tämä rasvasimulantti on tyydytettyjen triglyseridien synteettinen sekoitus, jossa rasvahappo- ja triglyseridijakauma on samanlainen kuin kookosrasvan.

A. 8. JAKAUTUMISKERROIN

1 MENETELMÄ

Selostettu menetelmä perustuu OECD:n testausohjeisiin (1).

1.1 Johdanto

Kokeen suorittamiseksi on tarpeen tietää testattavan aineen dissosiaatiovakio, vesiliukoisuus ja pintajännitys.

Tällä menetelmällä voi testata ainoastaan oleellisesti puhtaita aineita, jotka liukenevat veteen ja n-oktanoliiin. Se ei sovellu pinta-aktiivisten aineiden testauksiin.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Jakautumiskerroin (P) on liuotetun aineen tasapainokonsentraatioiden (c_i) suhde kaksifaasisysteemissä, jossa käytetään kahta suurelta osin sekoittumatonta liuotinta. Kun on kyseessä n-oktanolii ja vesi:

$$P_{ow} = \frac{C_{oktanolii}}{C_{vesi}}$$

Jakautumiskerroin (P) on siis kahden konsentraation osamäärä, ja se ilmoitetaan yleensä kymmenkantaisena logaritmina ($\log P$).

1.3 Vertailuaineet

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Niitä käytetään aika ajoin etupäässä menetelmän toimivuuden tarkastamiseen ja jollakin muulla menetelmällä saatujen tulosten vertailuun.

1.4 Menetelmän periaatteet

Jotta jakautumiskerroin voidaan määrittää, järjestelmän kaikkien komponenttien on saavutettava tasapainotila, ja kahteen faasiin liuotettujen aineiden konsentraatiot on määritettävä. Tätä aihepiiriä käsittelevästä kirjallisuudesta ilmenee, että ongelma voidaan ratkaista monella eri tavalla, esimerkiksi sekoittamalla nämä kaksi faasia ja sitten erottamalla ne, jotta tutkittavana olevan aineen tasapainokonsentraatio voidaan määrittää.

1.5 Laatuksiteerit

1.5.1 Toistettavuus

Jakautumiskertoimen tarkkuuden varmistamiseksi kaksinkertaiset määritykset on tehtävä kolmessa eri kokeessa, jossa aineen määrää ja liuottimen tilavuuden suhdetta voidaan vaihdella. Jakautumiskertoimen määritettyjen kymmenlogaritmiarvojen tulisi olla $\pm 0,3$ logaritmiyksikön välillä.

1.5.2 Herkkyys

Menetelmän mittausväli määräytyy analyttisen menettelyn toteamisrajojen mukaan. Niiden tulisi olla niin väljät, että P_{ow} -arvot 10^5 :een asti voidaan määrittää liuenneen aineen konsentraation ollessa korkeintaan 0,01 mmol/l kummassakin faasissa.

1.5.3 Spesifisyys

Nernstin jakautumislaki on voimassa vain, kun liuenneen aineen lämpötila, paine ja pH ovat vakioita. Se koskee yksinomaan puhdasta ainetta, joka jakautuu kahteen puhtaaseen liuottimeen. Jos toisessa tai molemmissa faaseissa esiintyy samanaikaisesti useita erilaisia liuenneita aineita, tämä voi vaikuttaa tuloksiin.

Liuenneiden molekyylien dissosiaatio tai assosiaatio aiheuttaa poikkeaman Nernstin jakautumislaita. Poikkeamien osoituksena on, että liuoksen konsentraatio vaikuttaa jakautumiskertoimeen.

Koska tämä testausmenetelmä edellyttää moninkertaista tasapainoa, sitä ei tule käyttää ionisoituviin yhdisteisiin ilman korjausta. (Puskuriliuosten käyttöä veden asemesta tulisi harkita tällaisten yhdisteiden ollessa kyseessä.)

1.6 Menetelmän selostus

1.6.1 Jakautumiskertoimen alustava arvio

Jakautumiskerroin voidaan arvioida joko yksinkertaisella laskutoimituksella (2) tai käyttämällä testattavan aineen liukoisuuksia puhtaissa liuottimissa (1),

jolloin

$$P_{\text{arvio}} = \frac{\text{kylläinen } C_{\text{n-oktanoli}}}{\text{kylläinen } C_{\text{vesi}}}$$

Vaihtoehtoisesti se voidaan osapuilleen arvioida tekemällä yksinkertainen esitesti.

1.6.2 Valmistelevat toimenpiteet

n-Oktanoli: jakautumiskertoimen määrittäminen on tehtävä erittäin puhtaalla analyttisellä reagenssilla.

Vesi: lasi- tai kvartsilaitteesta peräisin olevaa tislattua tai kahdesti tislattua vettä tulisi käyttää.

Huomautus

Ioninvaihtimesta suoraan otettua vettä ei tulisi käyttää.

1.6.2.1 Liuotteiden kyllästäminen ennakolta

Ennen jakautumiskertoimen määrittämistä liuotesysteemin faasit kyllästetään keskenään ravistelemalla koelämpötilassa. Käytännössä tämä voidaan tehdä siten, että kahteen isokokoiseen pulloon pantua analyysilaatuista n-oktanolia tai vettä, joihin kumpaankin on pantu riittävä määrä toista liuotinta, ravistellaan 24 tuntia mekaanisella ravistimella ja annetaan sen jälkeen seistä, kunnes faasit ovat eriytyneet ja kyllästymistila saavutettu.

1.6.2.2 Kokeen valmistelevat toimenpiteet

Kaksifaasisysteemin kokonaistilavuuden tulee likimain täyttää koeastia. Tämä estää haihtumisesta aiheutuvaa ainehukkaa. Tilavuuden suhde ja käytettävät ainemäärät määräytyvät seuraavin perustein:

- jakautumiskertoimen alustava arvio (katso yllä),
- analyysimenetelmän vaatima testattavan aineen vähimmäismäärä, sekä
- kummankin faasin 0,01 mmol/l enimmäiskonsentraatioaraja.

Kokeita tehdään kolme. Ensimmäisessä käytetään laskettua tilavuussuhdetta, toisessa lisätään kaksi kertaa n-oktanolin määrä ja kolmannessa lisätään puolet n-oktanolin määrästä.

1.6.2.3 Testattava aine

n-Oktanolista valmistetaan varastoliuos, jonka massan pitoisuus on 1–100 mg/ml. Tämän varastoliuoksen massan pitoisuus on määritettävä tarkoin, ennen kuin sitä käytetään jakautumiskertoimen määrittämiseen. Liuosta säilytetään vakaisissa olosuhteissa.

1.6.3 Koeolosuhteet

Koelämpötila pidetään vakaana ($\pm 1^\circ\text{C}$) 20 ja 25 $^\circ\text{C}$:n välillä.

1.6.4 Määrityksen suoritus

1.6.4.1 Jakautumistasapainon aikaansaaminen

Jokaista testitilannetta varten tarvitaan kaksi samanlaista koeastiaa, joissa on tarvittava, tarkoin mitattu määrä kumpaakin liuotinta sekä tarvittava määrä varastoliuosta.

Oktanolimäärät ovat tilavuusmittoja. Koeastiat asetetaan sopivaan sekoittajaan tai niitä ravistellaan käsin. Suositeltava tapa on pyörittää sentrifugin putkea nopeasti 180° poikittaisakselin ympäri, jotta loukkuun jäänyt ilma nousee kummankin faasin läpi.

1.6.4.2 Faasien erotus

Seos sentrifugoidaan faasien erottamiseksi. Tämä tehdään huoneen lämpötilassa olevalla laboratorio-sentrifugilla tai, mikäli käytetään sentrifugia, jossa ei ole lämmönsäädintä, sentrifugin putkia on tasapainotettava koelämpötilassa ainakin tunnin ajan ennen analyysia.

1.6.5 Analyysi

Jakautumiskertoimen määrittämiseksi testattavan aineen pitoisuus kummassakin faasissa on määritettävä. Tämä voidaan tehdä ottamalla pieni määrä molempien faasien kunkin koetilanteen jokaisesta koeputkesta ja analysoimalla ne valitulla menetelmällä. Kummassakin faasissa esiintyvä aineen kokonaismäärä lasketaan, ja sitä verrataan aineen alkuperäiseen määrään.

Vesifaasista otetaan näyte siten, että oktanolijäämämäärä on mahdollisimman vähäinen: irrotettavalla neulalla varustettua lasiruiskua voidaan käyttää vesifaasinäytteen otossa. Ruiskun tulee alussa olla osaksi täynnä ilmaa. Ilmaa poistetaan varovasti, kun neula viedään oktanolikerroksen läpi. Ruiskuun imetään tarvittava määrä vesifaasia. Ruisku poistetaan nopeasti liuoksesta ja neula irrotetaan. Ruiskun sisältöä voidaan sen jälkeen käyttää vesifaasinäytteenä. Kahden eriytyneen faasin pitoisuudet tulisi määrittää ainekohtaisella menetelmällä. Sopivia fysikaalis-kemiallisia määritystapoja ovat:

- fotometriset menetelmät,
- kaasukromatografia,
- korkeapainenestekromatografia.

2 TULOKSET

Jos mitattu P_{ow} on suurempi kuin 10^4 , suositellaan tulosten vertailua laskennalliseen P_{ow} -arvoon, kuten esimerkiksi lähdeluettelon kohdassa 3 esitetyllä menetelmällä saatua arvoon.

P:n määritettyjen arvojen luotettavuus voidaan tarkistaa vertaamalla kaksoismääritysten keskiarvoja kokonaieskiarvoon.

3

RAPORTOINTI

Raportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- Aineen tarkka määrittäminen (koostumus ja epäpuhtaudet).
- Määrittäislämpötila.
- Selostus pitoisuuksien määrittämisessä käytetyistä analyyttisistä menetelmistä,
- Molempien faasien kunkin määrittäksen mitatut pitoisuudet. (Tämä tarkoittaa sitä, että 12 pitoisuutta on raportoitava.)
- Testattavan aineen paino, kunkin koeastian jokaisen faasin tilavuus ja testattavan aineen laskettu kokonaismäärä kussakin faasissa tasapainotuksen jälkeen.
- Jakautumiskertoimen (P) lasketut arvot ja jokaisen testitilannesarjan keskiarvo sekä kaikkien määrittästen keskiarvo on ilmoitettava. Jos jakautumiskerroin ja pitoisuus näyttävät riippuvan toisistaan, tämä on mainittava raportissa.
- Yksittäisten P-arvojen keskihajonta keskiarvosta on mainittava.
- Kaikkien määrittästen keskiarvo-P ilmoitetaan myös kymmenkantaisena logaritmina.
- Laskettu teoreettinen P_{ow} , kun tämä arvo on määritetty tai kun mitattu arvo on $<10^4$.
- Kokeessa käytetyn veden ja vesifaasin pH.
- Kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomautukset.

4

LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C (81) 30 Final.
- (2) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C (81) 30 Final.
- (3) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C (81) 30 Final.

A. 9. LEIMAHDUSPISTE**1 MENETELMÄ****1.1 Johdanto**

Ennen kokeen suorittamista on tarpeen hankkia ennakkotietoja testattavan aineen tulenarkuudesta. Menetelmä soveltuu kaupan olevien nestemäisten aineiden testaamiseen, joiden höyryt voivat syttyä. Tekstissä mainitut menetelmät ovat luotettavia vain kunkin menetelmän kohdalla mainittujen leimahdusvälien mittauksiin.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Leimahduspiste on alin 101,325 kPa:n paineeseen korjattu lämpötila, jossa suljetussa koeastiassa oleva testattava neste testausmenetelmän määrittämissä olosuhteissa kehittää kaasuja siinä määrin, että koeastiaan syntyy tulenarka kaasu-ilmaseos.

Yksiköt: °C

$$t = T - 273,15$$

(t on °C, T on K)

1.3 Vertailuaineet

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Niitä käytetään aika ajoin etupäässä menetelmän toimivuuden tarkastamiseen ja jollakin muulla menetelmällä saatujen tulosten vertailuun.

1.4 Menetelmän periaatteet

Aine asetetaan koeastiaan, jota kuumennetaan asteittain, kunnes höyryn pitoisuus ilmassa on niin suuri, että siitä muodostuu tulenarka seos, joka voidaan sytyttää.

1.5 Laatuksiteerit**1.5.1 Toistettavuus**

Toistettavuus vaihtelee leimahdusvälin ja käytetyn menetelmän mukaan; enintään ± 2 °C.

1.5.2 Herkkyys

Herkkyys riippuu käytetystä testausmenetelmästä.

1.5.3 Spesifisyys

Eräiden testausmenetelmien spesifisyys rajoittuu tiettyihin leimahdusväleihin ja riippuu aineeseen liittyvistä ominaisuuksista (esim. korkea viskositeetti).

1.6 Menetelmän selostus**1.6.1 Valmistelevat toimenpiteet**

Näyte asetetaan kohdassa 1.6.3.1 ja/tai kohdassa 1.6.3.2 mainittuun testauslaitteeseen.

1.6.2 Koeolosuhteet

Laite asetetaan vedottomaan paikkaan, mikäli mahdollista.

1.6.3 Kokeen suoritus**1.6.3.1 Tasapainomenetelmä**

Ks. ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2 Ei-tasapainomenetelmä

Abelin laite:

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

Abel-Penskyn laite:

Ks. (EN 57), DIN 51755 osa 1 (5—65 °C:n lämpötilassa), DIN 51755 osa 2 (alle 5 °C:n lämpötilassa), NF M07-036.

Tagin laite:

Ks. ASTM D 56, ISO 2719.

Pensky-Martensin laite:

Ks. ISO 2719, (EN 11), DIN 51758, ASTM 8013, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Huomautuksia

Kun kohdan 1.6.3.2 ei-tasapainolaitteella määritetyn leimahduspisteen todetaan olevan: 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C, 55 ± 2 °C, se tulisi vahvistaa samalla laitteella tasapainomenetelmää käyttäen.

Vain sellaisia menetelmiä, jotka antavat leimahduspisteen lämpötilan, voidaan käyttää asiasta tiedotettaessa.

Viskoosisten liuottimien sisältävien nesteiden (maalit, liimat yms.) leimahduspisteen määrittämiseen on käytettävä ainoastaan viskoosisten nesteiden leimahduspisteen määrittämiseen soveltuvia laitteita ja menetelmiä. Ks. ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 osa 1.

2 TULOKSET**3 RAPORTOINTI**

Raportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- Aineen tarkka määrittäminen (koostumus ja epäpuhtaudet).
- Käytetty menetelmä ja siitä mahdollisesti tehdyt poikkeukset on ilmoitettava.
- Tulokset ja kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomautukset on raportoitava.

4 LÄHDELUETTELO

Ei ole.

A. 10. TULENARKUUS (KIINTEÄT AINEET)

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Ennen kokeen suorittamista on tarpeen hankkia ennakkotietoja aineen mahdollisesta räjähdysherkyydestä.

Menetelmä soveltuu ainoastaan jauhetuilla, rakeisilla ja tahnamaisilla aineilla suoritettaviin kokeisiin.

Jotta kaikkien syttyvien aineiden asemesta ainoastaan ne otettaisiin mukaan, jotka palavat nopeasti tai joiden palamiskäyttäytyminen on jollakin tavalla erityisen vaarallinen, vain sellaisia aineita on pidettävä hyvin tulenarkoina, joiden palamisnopeus ylittää tietyn raja-arvon. Niin ikään hyvin tulenarokiksi aineiksi luetaan metallipölyt, jotka saattavat hehkuuntua, mikäli hehkuuntuminen leviää koko näytteeseen. Tällainen hehkuuntuminen ja siihen liittyvät palonsammutusvaikeudet ovat pääasiallinen syy metallipölyjen erityiseen vaarallisuuteen. Tavanomaiset palonsammutusaineet kuten hiilidioksidi ja/tai vesi saattavat lisätä vaaraa huomattavasti.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Paloaika ilmoitetaan sekunneissa.

1.3 Vertailuyhdisteet

Ei ole määritelty.

1.4 Menetelmän periaatteet

Kaupallisessa muodossaan olevasta aineesta muodostetaan 250 mm pitkä tanko. Sen jälkeen näyte yritetään sytyttää kohdassa 1.6.3 kuvatulla tavalla, ja palamisaika mitataan.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole ilmailtu.

1.6 Menetelmän selostus

1.6.1 Valmistelevat toimenpiteet

Jauhettuja ja rakeisia aineita testattaessa muotti täytetään löysästi kaupallisessa muodossa olevalla tuotteella. Muotti on metallia, sen pituus on 250 mm ja siinä on kolmikulmainen poikkipinta, jonka sisäkorkeus on 10 mm ja sisäleveys 20 mm. Muotin kumpaankin pitkään sivuun kiinnitetään sivusuojiksi metallilevyt, jotka ulottuvat 2 mm kolmikulmaisen poikkipinnan yläpuolelle (kuva). Sen jälkeen muotti pudotetaan kolmasti 2 cm:n korkeudelta kovalle alustalle. Tarvittaessa muottiin lisätään testattavaa ainetta. Sivusuojat poistetaan ja ylimääräinen aine poistetaan. Palamatonta ja ei-huokoista ainetta oleva levy asetetaan muotin päälle, laite käännetään ylösalaisin ja muotti poistetaan.

Tahnamaiset aineet levitetään palamattomalle alustalle 250 mm:n mittaiseksi pötköksi, jonka poikkileikkaus on noin 1 cm².

Tanko sytytetään toisesta päästä jollakin sopivalla tavalla, kuten esimerkiksi pienellä liekillä tai kuumalla metallilangalla, jonka lämpötila on vähintään 1 000 °C.

1.6.2 Koeolosuhteet

Kosteudelle herkkää ainetta testattaessa koe on suoritettava mahdollisimman pian sen jälkeen, kuin aine on otettu astiasta.

1.6.3 Kokeen suoritus

Tangon toinen pää sytytetään. Kun tanko on palanut 80 mm:n matkan, seuraavan 100 mm:n palamisaika mitataan. Koe suoritetaan kuudesti, ja kullakin kerralla käytetään viileätä, puhdasta alustaa.

2 TULOKSET

Tulosten arvioimiseksi tarvitaan kuudessa kokeessa määritetyt palamisajat.

3 RAPORTOINTI**3.1 Koeraportti**

Raportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- aineen tarkka määrittäminen (koostumus ja epäpuhtaudet),
- kuvaus testattavasta aineesta, sen fysikaalinen tila ja kosteuspitoisuus,
- määrittäytulokset,
- kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat huomautukset.

3.2 Tulosten tulkinta

Jauheet, rakeiset tai tahnamaiset aineet katsotaan herkästi syttyviksi, jos palamisaika yhdessä kohdan 1.6 mukaisesti suoritetuista kuudesta kokeesta on alle 45 sekuntia. Metalli- tai seosmetallipölyjen katsotaan olevan herkästi syttyviä, mikäli ne voidaan sytyttää ja liekki tai reaktioalue leviää koko näytteeseen.

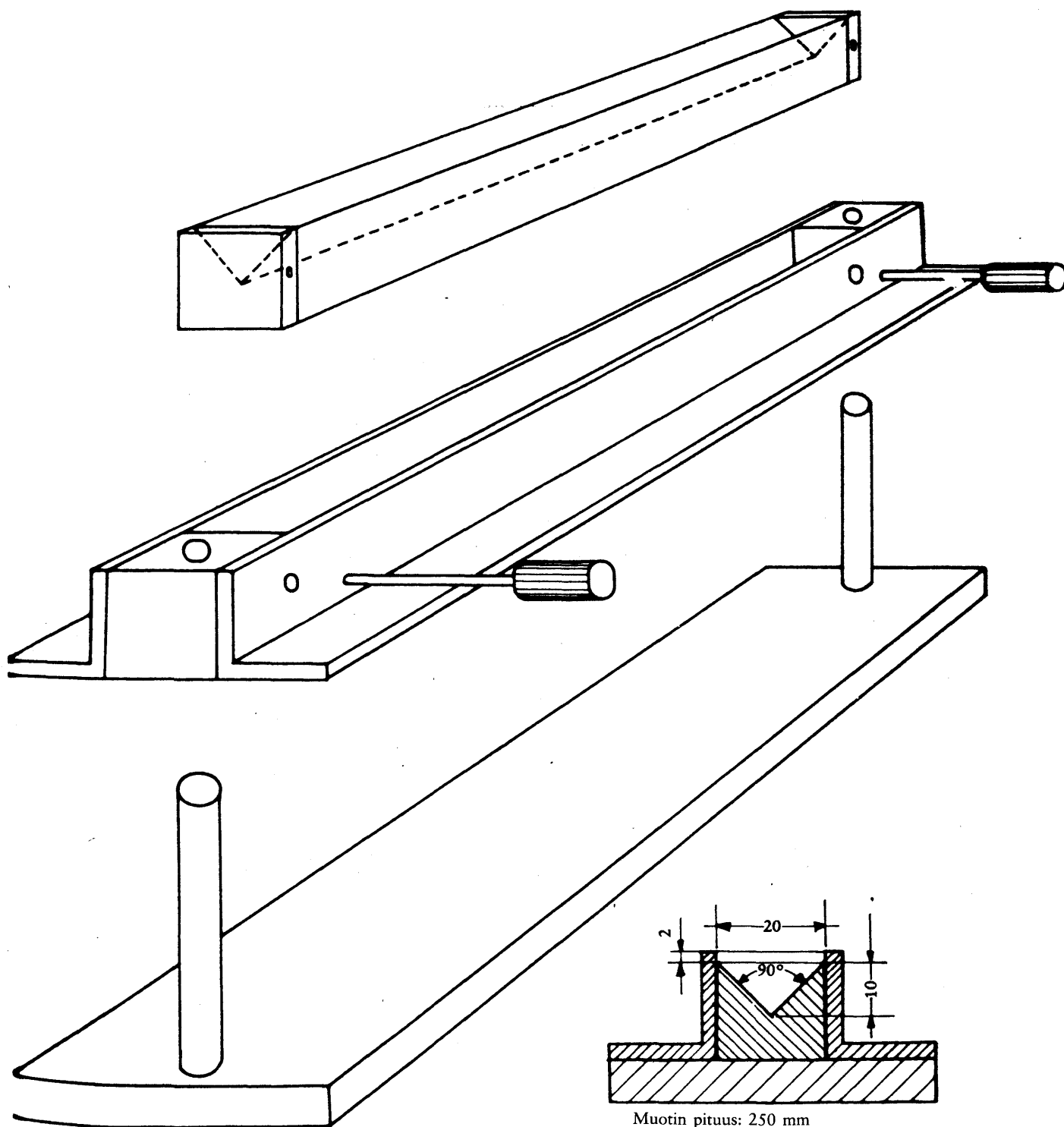
4 LÄHDELUETTELO

Ei ole.

Lisäys

Kuva

Muotti ja muut tangon valmistamiseen tarvittavat osat
(Kaikki mitat millimetreinä)



Muotin pituus: 250 mm
Materiaali: alumiini

A. 11. TULENARKUUS (KAASUT)**1 MENETELMÄ****1.1 Johdanto**

Tällä menetelmällä voidaan määritellä, onko huoneenlämmössä ja normaalipaineessa ilmaan sekoite-tuilla kaasuilla tulenarkuusväli. Kaasu-ilmaseoksiin, joissa testattavan kaasun pitoisuus asteittain suurenee, johdetaan sähkökipinä ja tarkkaillaan, syttyykö seos.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Tulenarkuusväli on alimman ja ylimmän räjähdysrajan pitoisuusväli. Alin ja ylin räjähdysraja tarkoittavat ilmaseoksessa olevan tulenaran kaasun pitoisuusrajoja, joissa ei tapahdu liekin levi-ämistä.

1.3 Vertailuaineet

Ei ole määritelty.

1.4 Menetelmän periaatteet

Kaasun pitoisuutta ilmassa lisätään asteittain ja seoksen jokaisen pitoisuuden tulenarkuus testataan sähkökipinällä.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole määritelty.

1.6 Menetelmän selostus**1.6.1 Laitteet**

Koeastian käytetään lasista pystysylinteriä, jonka sisäläpimitta on vähintään 50 mm ja korkeus vähintään 300 mm. Sytytys elektrodit ovat 3—5 mm:n päässä toisistaan, ja ne sijaitsevat 60 mm:n korkeudella sylinterin pohjasta. Sylinterissä on paineenpäästöaukko. Laite on suojattava räjähdysva-hinkojen varalta.

Induktiokipinää, jonka kesto on 0,5 sekuntia ja joka tuotetaan korkeajännitemuuntajalla, jonka jännite on 10—15 kV (korkein syöttöteho 300 W), käytetään sytytyslähteenä.

1.6.2 Koeolosuhteet

Koe on suoritettava huoneenlämmössä.

1.6.3 Kokeen suoritus

Lasisylinteriin pumpataan annostuspumpulla tietynpitoinen kaasu-ilmaseos. Seokseen johdetaan kipinä ja todetaan, irtoaako sytytyslähteestä liekki ja leviääkö se itsenäisesti. Kaasun pitoisuutta muutetaan asteittain yksi tilavuusprosentti kerrallaan, kunnes syttyminen tapahtuu yllä kuvatulla tavalla.

2 TULOKSET

Liekin leviäminen on ainoa tulos, jonka perusteella tämä ominaisuus määritetään.

3 RAPORTOINTI

Raportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- Aineen tarkka määrittäminen (koostumus ja epäpuhtaudet).
- Selostus käytetystä laitteesta ja sen mitat.
- Huoneen lämpötila, jossa testi suoritettiin.
- Testatut pitoisuudet ja saadut tulokset.
- Testin tulos: syttymätön kaasu vai herkästi syttyvä kaasu.
- Mikäli tulos on "syttymätön", on mainittava, että testi tehtiin kaikilla pitoisuuksilla nostaen pitoisuuksia 1 % kerrallaan välillä 0 ja 100 %.
- Kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomautukset on raportoitava.

4 LÄHDELUETTELO

Ei ole.

A. 12. TULENARKUUS (AINEET JA VALMISTEET, JOTKA OLLESSAAN KOSKETUKSISSA VEDEN TAI KOSTEAN ILMAN KANSSA KEHITTÄVÄT VAARALLISIA MÄÄRIÄ HERKÄSTI SYTTYVIÄ KAASUJA)

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Tätä testausmenetelmää käytetään määrittämään, syntyykö aineen ja veden reaktiosta vaarallinen määrä kaasua tai kaasuja, jotka voivat olla herkästi syttyviä tai myrkyllisiä.

Testimenetelmällä voidaan tutkia sekä kiinteitä että nestemäisiä aineita. Menetelmä ei sovellu aineisiin, jotka syttyvät itsestään joutuessaan kosketuksiin ilman kanssa.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Herkästi syttyvä:

Aineet ja valmisteet, jotka ollessaan kosketuksissa veden tai kostean ilman kanssa kehittävät vaarallisia määriä herkästi syttyviä kaasuja vähimmäismäärän ollessa 1 litra/kg tunnissa. Tämä raja ei ota huomioon kaasun myrkyllisyyttä.

1.3 Menetelmän periaatteet

Ainetta testataan vaiheittain alla selostetulla tavalla, ja mikäli jossakin vaiheessa tapahtuu syttyminen, testiä ei tarvitse jatkaa.

1.3.1 Vaihe 1

Testattavaa ainetta asetetaan kaukaloon, jossa on 20-asteista tislattua vettä, ja todetaan, syttykö kehittyvä kaasu.

1.3.2 Vaihe 2

Testattavaa ainetta asetetaan suodatinpaperille, joka kelluu 20-asteisella tislatulla vedellä täytetyn astian pinnalla, ja todetaan, syttykö kehittyvä kaasu. Suodatinpaperin tarkoituksena on vain pitää aine kasassa ja lisätä syttymismahdollisuuksia.

1.3.3 Vaihe 3

Testattavasta aineesta muodostetaan noin 2 cm:n korkuinen ja 3 cm:n läpimittainen keko. Kekoon lisätään muutama tippa vettä ja todetaan, syttykö kehittyvä kaasu.

1.3.4 Vaihe 4

Testattavaa ainetta sekoitetaan 20-asteiseen tislattuun veteen, ja kaasun kehitysnopeutta mitataan seitsemän tunnin aikana yhden tunnin välein. Jos kaasunkehitys on säännötöntä tai se lisääntyy seitsemän tunnin kuluttua, mittausaikaa on pidennettävä korkeintaan viiteen vuorokauteen. Koe voidaan lopettaa, jos nopeus jossakin vaiheessa on yli 1 litra/kg tunnissa.

1.4 Vertailuaine

Ei ole määritelty.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole ilmoitettu.

1.6 Menetelmien selostus**1.6.1 Vaihe 1****1.6.1.1 Koeolosuhteet**

Testattavaa ainetta käytetään siinä muodossa, missä sitä markkinoidaan, ja koe suoritetaan huoneenlämmössä (noin 20 °C).

1.6.1.2 Kokeen suoritus

Pieni määrä (läpimitaltaan noin 2 mm) testattavaa ainetta asetetaan tislattua vettä sisältävään kaukaloön. Sitten katsotaan i) kehittykö kaasua ja ii) syttyykö kaasua. Mikäli kaasua syttyy, koetta ei tarvitse jatkaa, koska aine katsotaan vaaralliseksi.

1.6.2 Vaihe 2**1.6.2.1 Laite**

Suodatinpaperi asetetaan kellumaan tislattun veden pinnalle sopivaan astiaan, esimerkiksi 100 mm:n läpimittaiseen haihdutusastiaan.

1.6.2.2 Koeolosuhteet

Testattavaa ainetta käytetään siinä muodossa, missä sitä markkinoidaan, ja koe suoritetaan huoneenlämmössä (noin 20 °C).

1.6.2.3 Kokeen suoritus

Pieni määrä (läpimitaltaan noin 2 mm) testattavaa ainetta asetetaan suodatinpaperin keskelle. Sitten katsotaan i) kehittykö kaasua ja ii) syttyykö kaasua. Mikäli kaasua syttyy, koetta ei tarvitse jatkaa, koska aine katsotaan vaaralliseksi.

1.6.3 Vaihe 3**1.6.3.1 Koeolosuhteet**

Testattavaa ainetta käytetään siinä muodossa, missä sitä markkinoidaan, ja koe suoritetaan huoneenlämmössä (noin 20°C).

1.6.3.2 Kokeen suoritus

Testattavasta aineesta muodostetaan noin 2 cm:n korkuinen ja 3 cm:n läpimittainen keko, jonka huipulla on syvennys. Syvennykseen lisätään muutama tippa vettä ja tarkastetaan i) kehittykö kaasua ja ii) syttykö kaasua. Mikäli kaasua syttyy, koetta ei tarvitse jatkaa, koska aine katsotaan vaaralliseksi.

1.6.4 Vaihe 4**1.6.4.1 Laite**

Laite kootaan kuvan osoittamalla tavalla (katso lisäys).

1.6.4.2 Koeolosuhteet

On tarkistettava, löytykö testattavaa ainetta sisältävästä astiasta hiukkaskooltaan $>500\ \mu\text{m}$ jauhetta. Jos jauhetta on yli 1 % w/w kokonaismäärästä tai jos näyte on murenevaa, koko ainemäärä on jauhettava hienoksi ennen kokeen suorittamista, koska hiukkasten koko saattaa pienentyä säilytyksen ja käsittelyn aikana. Muussa tapauksessa ainetta käytetään sen kaupallisessa muodossa. Koe suoritetaan huoneenlämmössä (20 °C) ja normaalissa ilmanpaineessa.

1.6.4.3 Kokeen suoritus

Laitteen tiputussuppiloon pannaan vettä ja 100–250 cm³ suuruisen kaasumäärän tuottamiseen tarvittava määrä ainetta, korkeintaan kuitenkin 25 g, punnitaan ja pannaan Erlenmeyer-pulloon. Kehittyvän kaasun tilavuus mitataan jollakin sopivalla menetelmällä. Tiputussuppilon hana avataan, jotta vettä pääsee Erlenmeyer-pulloon, ja ajanottolaite käynnistetään. Koko kaasumäärän kehittymiseen kuluva aika kirjataan. Lisäksi kirjataan väliaikalukemia, milloin se on mahdollista. Koe toistetaan kolme kertaa.

Mikäli kaasun kemiallista koostumusta ei tunneta, kaasua on analysoitava. Mikäli kaasua sisältää herkästi syttyviä aineosia eikä ole tiedossa, onko koko seos hyvin tulenarka, valmistetaan samanlainen seos, joka testataan kohdassa A. 11. selostetun testausmenetelmän mukaisesti.

2 TULOKSET

Yksi syttymiskerta tai herkästi syttyvän kaasun kehittyminen vähintään 1 litra/kg tuntivauhdilla kolmen kokeen aikana on riittävä osoitus testattavan aineen vaarallisuudesta (1.6.1, 1.6.2 ja 1.6.3).

3 RAPORTOINTI

Raportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- Tarkka määrittäminen ja kuvaus aineesta sellaisessa muodossa, jossa se on saatu (esim. väri, hiukkaskoko ja fysikaalinen tila).
- Testattavalle aineelle tehdyt valmistelevat toimenpiteet.
- Kokeiden tulokset.
- Kehittyneen kaasun kemiallinen koostumus.
- Kaasun kehityksenopeus (1.6.4).
- Kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat lisähuomautukset.

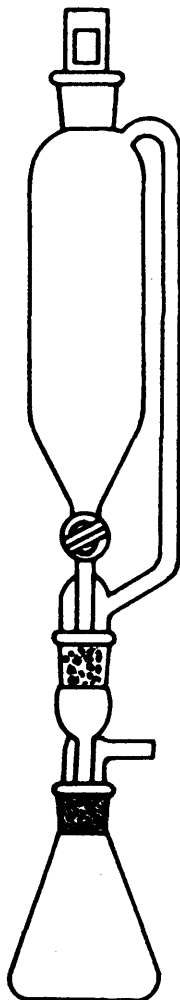
4

LÄHDELUETTELO

- (1) ISO 1773.
- (2) OECD, Paris, Preliminary Test Guideline for the Determination of Substances which give of Highly Inflammable Gases in Dangerous Amounts on Contact with Water, A/80/28. Final report of the OECD chemical testing programme.
- (3) UN Doc. No ST/SG/AC10/1 rev. 1.

Lisäys

Kuva
Laite



A. 13. TULENARKUUS (KIINTEÄT AINEET JA NESTEET)**1 MENETELMÄ****1.1 Johdanto**

On hyvä hankkia ennakkotietoja aineen itsestäänsyttymisominaisuuksista. Menetelmällä voi testata kaupan olevia kiinteitä ja nestemäisiä aineita, jotka syttyvät itsestään pienissä erissä pian sen jälkeen, kun ne ovat joutuneet kosketuksiin ilman kanssa huoneenlämmössä.

Menetelmä ei kata aineita, jotka syttyvät itsestään vasta oltuaan useita tunteja tai päiviä huoneenlämmössä, eikä niitä, joiden itsestään syttymisen edellytys on huomattavasti korkeampi lämpötila.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Nestemäisiä ja kiinteitä aineita pidetään herkästi syttyvinä, mikäli ne syttyvät vähintään kerran kohdassa 1.6 selostetun kuuden kokeen aikana.

Nesteiden itsestäänsyttymistestejä voidaan myös joutua tekemään A. 15:ssä kuvatulla menetelmällä (itsestään syttyminen: haihtuvien nesteiden ja kaasujen itsestäänsyttymislämpötilan määrittäminen).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole määritelty.

1.4 Menetelmän periaatteet

Aine asetetaan ilman kanssa kosketuksiin 25 ± 10 °C:n lämpötilassa viiden minuutin ajaksi. Mikäli aine syttyy, se on herkästi syttyvää.

1.5 Laatuksiteerit

Toistettavuus: turvallisuussyistä johtuen riittää yksi positiivinen tulos kuudesta kokeesta määrittelemään aineen herkästi syttyväksi.

1.6 Koemenetelmän selostus**1.6.1 Laite**

Noin 10 cm:n läpimittaiseen posliiniupokkaaseen asetetaan huoneenlämmössä piimaata noin 5 mm:n korkuinen määrä.

Huomautus

Piimaa tai jokin muu inertti helposti saatavissa oleva aine edustaa maaperää, jolle testattavaa ainetta voi kaatua onnettomuuden sattuessa.

1.6.2 Kokeen suoritus**a) Jauhemaiset kiinteät aineet**

Noin 1 metrin korkeudelta kaadetaan 1—2 cm³ testattavaa jauhemaista ainetta palamattomalle alustalle, ja tarkkaillaan, syttykö aine pudotuksen aikana tai viiden minuutin kuluessa sen jälkeen.

b) Nesteet

Noin 5 cm³ testattavaa nestettä kaadetaan piimaata sisältävään posliiniupokkaaseen ja tarkkailaan, syttyykö aine viiden minuutin kuluessa.

2 TULOKSET

Tulokset arvioidaan kuuden testin perusteella.

3 RAPORTOINTI

Raportin tulee mikäli mahdollista sisältää seuraavat tiedot:

- kuvaus testattavasta aineesta,
- testitulokset.

4 LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, *Preliminary Test Guideline for the Determination of Pyrophoric Behaviour of Solids and Liquids*, A 80/25 — Final report of the OECD chemical testing programme.
-

A. 14. RÄJÄHDYSOMINAISUUDET

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Tämän testausmenetelmän avulla voidaan määritellä, onko kiinteä, nestemäinen tai tahnamainen aine tai valmiste räjähdysherkkä, kun se altistetaan liekille (lämpöherkkyys), iskulle tai hankaukselle (herkkyys mekaanisille ärsykkeille).

Menetelmässä on kolme osaa:

- a) lämpöherkkyyskoe;
- b) mekaaninen herkkyyskoe – iskuherkkyys;
- c) mekaaninen herkkyyskoe – hankausherakkyys.

Menetelmän avulla saadaan tietoja, joiden perusteella voidaan arvioida eräiden yleisten ärsykkeiden aiheuttaman räjähdysen todennäköisyys. Menetelmällä ei ole tarkoitus arvioida, räjähtääkö jokin aine tai valmiste joissakin tietyissä olosuhteissa, eikä myöskään määritellä missä määrin alkanut hajoaminen voi levitä ja aiheuttaa koko näytteen räjähtämisen.

Menetelmä soveltuu määrittämään, aiheuttaako aine tai valmiste räjähdysvaaraa (lämpö- tai mekaaninen herkkyys) direktiivin määrittelemissä tietyissä olosuhteissa. Kokeet ovat tarpeettomia, kun käytettävissä olevat termodynaamiset tiedot (muodostumislämpö, hajoamislämpö, tiettyjen reaktiivisten ryhmien (1) puuttuminen rakennekaavasta) osoittaa kohtuullisen varmasti, että aine tai valmiste ei pysty hajoamaan, kehittämään kaasuja ja purkamaan lämpöä hyvin nopeasti (eli aine ei ole räjähdysaltista). Menetelmästä tiedetään, ettei se ole ehdottoman tarkka. Se sisältää määrätynlaisia laitteita, jotka ovat kansainvälisesti laajalti käytettyjä ja jotka yleensä antavat luotettavia tuloksia.

Kokeen suorittaja voi halutessaan käyttää vaihtoehtoisia laitteita kolmen selostetun menetelmän kokeisiin edellyttäen, että valinta on tieteellisesti perusteltavissa ja laite kansainvälisesti tunnettu. Tällaisessa tapauksessa hänen on suhteutettava saamansa tulokset tässä määritetyillä laitteilla saatuihin tuloksiin.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Räjähdysherkkyys:

Aineet ja valmisteet, jotka saattavat räjähtää liekin vaikutuksesta tai jotka ovat herkempiä iskuille tai hankaukselle kuin dinitrobentseeni.

1.3 Vertailuaine

Metadinitrobentseeni, tekninen kiteinen tuote, hankaus- ja iskumenetelmiä varten.

1.4 Menetelmän periaatteet

Alustavalla seulontatutkimuksella on määritettävä turvalliset olosuhteet kolmen herkkyystestin suorittamiselle.

1.4.1 Alustava seulontatutkimus

Hyvin pieniä määriä (noin 10 mg) ainetta tai valmistetta kuumennetaan irrallaan bunsenliekillä, altistetaan iskulle jossakin sopivassa laitteessa ja hankaukselle käyttämällä puuvasaraa alasinta vasten tai jotakin sopivaa hankauslaitetta. Tarkoituksena on selvittää, onko aine niin herkkää ja räjähdysaltista, että suoritettavat herkkyytestit on tehtävä erityistä varovaisuutta noudattaen testaajan loukkaantumisen välttämiseksi.

1.4.2 Lämpöherkkyys

Tätä menetelmää käytettäessä ainetta tai valmistetta kuumennetaan teräsputkessa, jonka tilavuutta voidaan säädellä vaihtelemalla suuttimien läpimittaa, jotta voidaan määrittää, onko aineen tai valmisteen räjähtäminen mahdollista lämpörasitusolosuhteissa.

1.4.3 Mekaaninen herkkyys (isku)

Tätä menetelmää käytettäessä aine tai valmiste altistetaan vasaraniskulle teräsalasinta vasten.

1.4.4 Mekaaninen herkkyys (hankaus)

Tätä menetelmää käytettäessä aine tai valmiste altistetaan standardipintojen väliselle hankaukselle määrättyissä kuormitusta ja suhteellista liikettä koskeissa olosuhteissa.

1.5 Laatukriteerit

Ei ole ilmoitettu.

1.6 Menetelmän selostus**1.6.1 Laite****1.6.1.1 Lämpöherkkyys (liekin vaikutus)**

Teräsputki on valmistettu vetomenetelmällä syvävetolevystä (katso lisäys). Sen sisäläpimitta on 24 mm, pituus 75 mm ja seinämän paksuus 0,5 mm. Putken avoimessa päässä on laippa, jolla se voidaan sulkea (kuva 1). Putki on varustettu paineenkestävällä pyöreällä suutinlevyllä, jonka keskellä on reikä, ja tämä levy on kiinnitetty putkeen tukevasti kaksiosaisella ruuviliitoksella (mutteri ja umpimutteri). Suutinlevyn (katso kuvaa 1) paksuus on 6 mm ja se on valmistettu lämmönkestävästä kromiteräksestä (katso lisäys).

Saatavilla on suutinlevyjä, jossa aukon läpimitta vaihtelee (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20 mm), joiden avulla testaaja voi määrittää aineen tai valmisteen räjähdysvaaran. Mutteri ja umpimutteri (kuva 1) ovat kromimanganiterästä (katso lisäys), joka on kipinöimätöntä alle 800 °C. Teräsputkia käytetään vain yhteen kokeeseen.

1.6.1.2 Mekaaninen herkkyys

Tyypillisessä laitteessa, jossa on putoava massa, on jalallinen, alasimella varustettu valettu teräsalusta (harmaavalu), pilari, pudotuspaino ja pudotusmekanismi. Teräsalusta, 230 mm (paksuus) × 250 mm (leveys) × 200 mm (korkeus), ja valettu jalka, 450 mm (paksuus) × 450 mm (leveys) × 60 mm (korkeus), kannattavat teräsalasinta, 100 mm (läpimitta) × 70 mm (korkeus), joka on ruuvattu paikoilleen. Teräsalustan takaosaan on ruuvattu pidike, johon on kiinnitetty saumattomasta vetoteräsputkesta tehty pilari, jonka ulkoläpimitta on 90 mm ja sisäläpimitta 70 mm. Pudotusvasara on kiinnitetty neljällä ruuvilla 60 × 60 × 60 cm:n betonikuutioon siten, että kiskot ovat täysin

pystysuorassa ja pudotusvasara on helposti ohjattavissa. Pudotusvasaran massan painon on oltava 10 kg. Vasara on terästä. Törmäyspinnan on oltava karkaistua terästä, HRC 60–63 ja läpimitan vähintään 25 mm. Testi suoritetaan 0,4 m:n pudotuskorkeudelta.

Tutkittava näyte asetetaan vastinlaitteeseen, joka koostuu kahdesta tukevasta, koaksiaalisesta ja päällekkäin olevasta umpinaisesta terässylinteristä sekä ohjausrenkaana toimivasta ontosta terässylinteristä. Umpinaisten terässylinterien läpimitan on oltava 10 (–0,003, –0,005) mm, korkeuden 10 mm, pinnan tulee olla hiottu ja reunojen pyöristetty (kaarevuussäde 0,5 mm) ja kovuuden HRC 58–65. Onton sylinterin tulee olla ulkoläpimitaltaan 16 mm, hiottu reiän sisäläpimitan 10 (+ 0,005 + 0,010) mm ja korkeuden 13 mm. Jos räjähdys tapahtuu, terässylinteriä ja onttoa sylinteriä ei saa käyttää uusiin kokeisiin. Vastinlaite asetetaan välissä olevalle 26 mm (läpimitta) x 26 mm (korkeus) teräsalasimelle ja keskitetään keskitysrenkaalla, jossa on ohjausrenkas räjähdyskaasujen poistoa varten.

1.6.1.3 Mekaaninen herkkyys (hankaus)

Hankauslaite koostuu valetusta teräksestä (harmaavalu) tehdystä aluslaatasta, jonka päälle on asennettu itse hankauslaite, jossa on kiinteä posliinipuikko ja liikkuvat posliinilaatat. Posliinilaatta on kiinnitetty liukutelineeseen, joka liikkuu kahden kiskon välissä. Sähkömoottori liikuttaa telinettä kiertokangen, epäkeskotiljan ja voimansiirtopyörän avulla siten, että posliinilaatta liikkuu posliinipuikon alla 10 mm:n edestakaisliikkein. Posliinipuikon kuorman tulee olla noin 360 newtonia.

Posliinilaatat ovat valkoista teknistä posliinia mitoiltaan 25 mm (pituus) x 25 mm (leveys) x 5 mm (korkeus). Laattojen hankauspinnat on karhennettu (karhennussyvyys 9 μm – 32 μm) ennen polttoa sienellä hieromalla.

Lieriömäinen posliinipuikko on myös teknistä posliinia. Sen pituus on 15 mm, läpimitta 10 mm ja siinä on pyöreä karheapintainen pää, jonka kaarevuussäde on 10 mm.

1.6.2 Koeolosuhteet

1.6.2.1 Lämpöherkkyys (liekin vaikutus)

Kaupan olevassa muodossa olevaa ainetta asetetaan putkeen 60 mm:n korkeudelle kolmessa yhtä suuressa erässä. Kutakin erää tiivistetään pinnalta varovasti 80 newtonin voimalla hiukan putkea pienemmällä puumännällä. Hyytelömäisen aineen ollessa kyseessä on varottava, ettei täyttövaiheessa synny kuplia.

1.6.2.2 Mekaaninen herkkyys (isku)

Aine testataan kuivana. Näytteen tilavuuden tulee olla 40 mm³ tai käytettävään laitteeseen soveltuva. Kuiviin aineisiin tahnoja lukuun ottamatta sovelletaan seuraavaa:

- a) jauhetut aineet seulotaan (seulan koko 0,5 mm); seulan läpäissyt osa käytetään testaukseen;
- b) puristetut, valetut tai muuten tiivistetyt aineet hajotetaan ja seulotaan; 0,5 -1 mm:n läpimittainen seulos käytetään testaukseen.

Testattaessa nesteitä ylempi terässylinteri painetaan alas, kunnes se on 1 mm:n päässä alemmasta sylinteristä, ja jätetään tähän asentoon.

1.6.2.3 Mekaaninen herkkyys (hankaus)

Aine testataan kuivana. Näytteen tilavuuden tulee olla 10 mm³. Kuiviin aineisiin tahnoja lukuunottamatta sovelletaan seuraavaa:

- a) jauhetut aineet seulotaan (seulan koko 0,5 mm); seulan läpäissyt osa käytetään testaukseen;
- b) puristetut, valetut tai muuten tiivistetyt aineet hajotetaan ja seulotaan; > 0,5 mm läpimittainen seulos käytetään testaukseen.

1.6.3 Kokeiden suoritus

1.6.3.1 Lämpöherkkyys (liekin vaikutus)

Kuumuus tuotetaan propaanilla, joka johdetaan painesäätimellä (500 mbar) varustetusta kaasupullostasta jakoputkiston kautta neljään polttimeen. Nämä neljä poltinta kuluttavat 3,2 litraa propaania minuutissa. Mikäli kuumentamiseen käytetään muita kaasuja, polttimet, kaasunkulutus ja ilman sisäänvirtaus on valittava siten, että vertailumäärityksissä inerteillä aineilla (hiekkalla, dibutyylifitalaattilla) saadaan samat lämpötila/aikakäyrät kuin kuumennettaessa täytettyjä putkia propaanilla.

Polttimet sijoitetaan koekammion ympärille kuvan 2 osoittamalla tavalla.

Polttimet säädetään niin, että liekin sinisen sisäosan kärki melkein koskettaa putkea. Koe suoritetaan teräskammiossa, jonka mitat ilmenevät kuvasta 2.

Propaanipolttimien mitat on annettu kuvissa 3 a ja 3 b. Kaksi kolmen testin sarjaa on tehtävä, ensimmäinen sarja käyttäen suutinlevyä, jossa on 2 mm:n läpimittainen reikä, toisessa sarjassa yli 2 mm:n (esim. 6 mm:n) läpimittaista reikää.

Jos ensimmäisen sarjan (2 mm:n reikä) aikana tapahtuu räjähdys, toista sarjaa ei tarvitse tehdä. Mikäli räjähdystä ei tapahdu viiden minuutin kuluttua, koe lopetetaan.

1.6.3.2 Mekaaninen herkkyys (isku)

Tässä selostetulla iskulaitteella tehdään kuusi testiä pudottamalla 10 kg:n paino 0,4 m:n korkeudelta. Muissa laitteissa näytettä verrataan m-dinitrobentseeniin käytössä olevaa menettelytapaa noudattaen (ylös-alas-tekniikka jne.).

1.6.3.3 Mekaaninen herkkyys (hankaus)

Posliinipuikko asetetaan testattavaan näytteeseen ja paino ripustetaan paikoilleen. Testiä suoritettaessa posliinilaatalla olevien karhennusjälkien on oltava poikittain liikkeen suuntaan nähden. On huolehdittava siitä, että puikko pysyy näytteessä, että puikon alla on tarpeeksi näytettä ja että laatta liikkuu oikein puikon alla. Posliinilaatan tulee liikkua posliinipuikon alla edestakaisin 10 mm kumpaankin suuntaan 0,44 sekunnin kuluessa. Pinnan kutakin kohtaa voidaan käyttää vain yhteen testiin.

2 TULOKSET

2.1 Tulosten käsittely

Kokeet voidaan lopettaa niin pian kuin jostakin testistä saadaan positiivinen tulos.

2.2 Arviointi

Direktiivin tarkoittamassa merkityksessä aine tai valmiste voi periaatteessa olla räjähdysaltis, mikäli:

- a) räjähdys tapahtuu (eli putki hajoaa kolmeen tai useampaan osaan) tehtäessä määrättyä määrää lämpöherkkyystestejä, tai
- b) räjähdys (liekkiin leimahtaminen vastaa räjähdystä) tapahtuu vähintään kerran selostetulla iskulaitteella tehdyn kuuden testin aikana, tai näyte on m-dinitrobenseeniä herkempi vaihtoehtoisessa iskukokeessa, tai
- c) räjähdys (rätinä tai liekkiin leimahtaminen vastaa räjähdystä) tapahtuu vähintään kerran selostetulla hankauslaitteella tehdyn kuuden testin aikana, tai näyte on m-dinitrobenseeniä herkempi vaihtoehtoisessa hankauskokeessa.

3 RAPORTOINTI

3.1 Koeraportti

Raportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- testattavan aineen tai valmisteiden nimi, koostumus, puhtaus, kosteuspitoisuus jne.,
- näytteen fysikaalinen olomuoto ja onko se seulottu,
- testin kuluessa tehdyt huomiot (reaktiotyyppi, kipinät, liekki, räjähdys, sirujen määrä jne.),
- tulokset kustakin testistä,
- vaihtoehtoisia laitteita käytettäessä on annettava tieteellinen perustelu laitteen valinnalle ja osoitus vaihtoehtoisella laitteella saatujen tulosten korrelaatiosta suositellulla laitteella saatuihin tuloksiin,
- kaikki asiaan liittyvät huomautukset, kuten viittaukset samankaltaisilla tuotteilla tehtyihin testeihin, joilla voi olla vaikutusta tulosten tulkintaan.

3.2 Tulosten tulkinta ja arviointi

Koeraportissa tulee olla maininta tuloksista, joita pidetään väärinä, tavallisuudesta poikkeavina tai epätyypillisinä. Mikäli jokin tulos jätetään ottamatta huomioon, tämä on perusteltava ja tulokset vaihtoehtoisesta tai lisäkokeesta on annettava.

Joskus tulos voi olla vääristynyt johtuen aineen tai valmisteiden fysikaalisesta olomuodosta tai haihtuvuudesta kokeen aikana; tällaisissa tapauksissa on hyvä tietää, minkälainen tulos saadaan aineen tai valmisteiden markkinoilla olevalla muodolla. Nämä tiedot voidaan mahdollisesti saada vaihtoehtoisella testauksella. Ellei tavallisuudesta poikkeavaa tulosta voida selittää tällä tavoin, se on hyväksyttävä sellaisenaan ja aine tai valmiste luokiteltava sen mukaisesti.

4

LÄHDELUETTELO

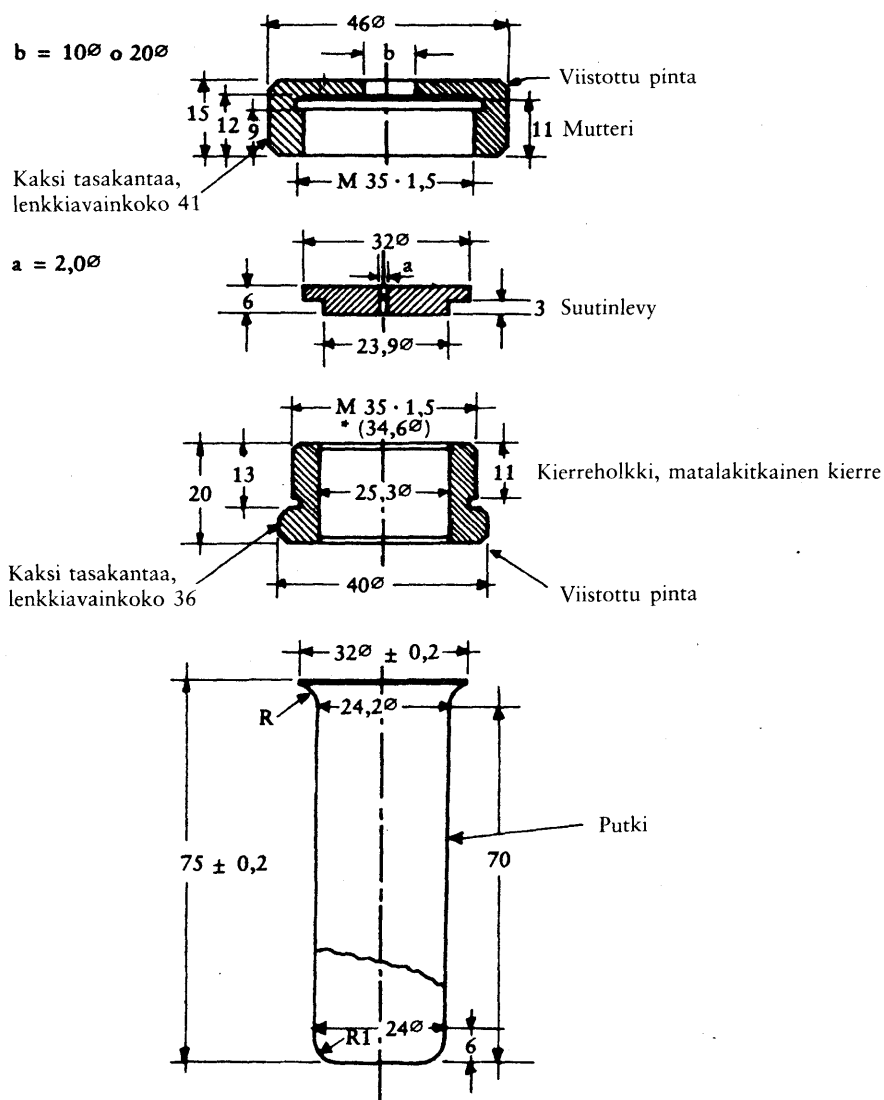
- (1) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, London. Butterworths, 1979, s. 60–63.
- (2) Koenen, H., Ide, K.H., über die Prüfung explosiver Stoffe, I. Ermittlung der Reibempfindlichkeit, Explosive Stoffe, Vol. 3, 1955, s. 57–65 ja 89–93.
- (3) Koenen, H., Ide, K.H., über die Prüfung explosiver Stoffe, III. Ermittlung der Empfindlichkeit explosiver Stoffe gegen thermische Beanspruchung in einer Erhitzungskammer mit verschiedenen definierten Öffnungen (Stahlhusenverfahren), Explosive Stoffe, Vol. 4, 1956, s. 119–125 ja 143–148.
- (4) Koenen, H., Ide, K.H., Haupt, W., über die Prüfung explosiver Stoffe, IV. Ermittlung der Schlagempfindlichkeit explosiver Stoffe von fester, flüssiger und gelatinöser Beschaffenheit, Explosive Stoffe, Vol. 6, 1958, s. 178–189, 202–214 ja 223–235.
- (5) ONU, 1980, December, United Nations Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods (Doc. öST/SG/AC.10/5/Add 3, Table 4.3).

*Lisäys***Esimerkki materiaalispesifikaatiosta**

- (1) Materiaalispesifikaatio N:o 1.0336.505 g, DIN 1623, sivun 1 mukaisesti.
 - (2) Materiaalispesifikaatio N:o 1.4873, "Stahl-Eisen-Werkstoff" 490–52 mukaisesti.
 - (3) Materiaalispesifikaatio N:o 1.3817, "Stahl-Eisen-Werkstoff" 490–52 mukaisesti.
-

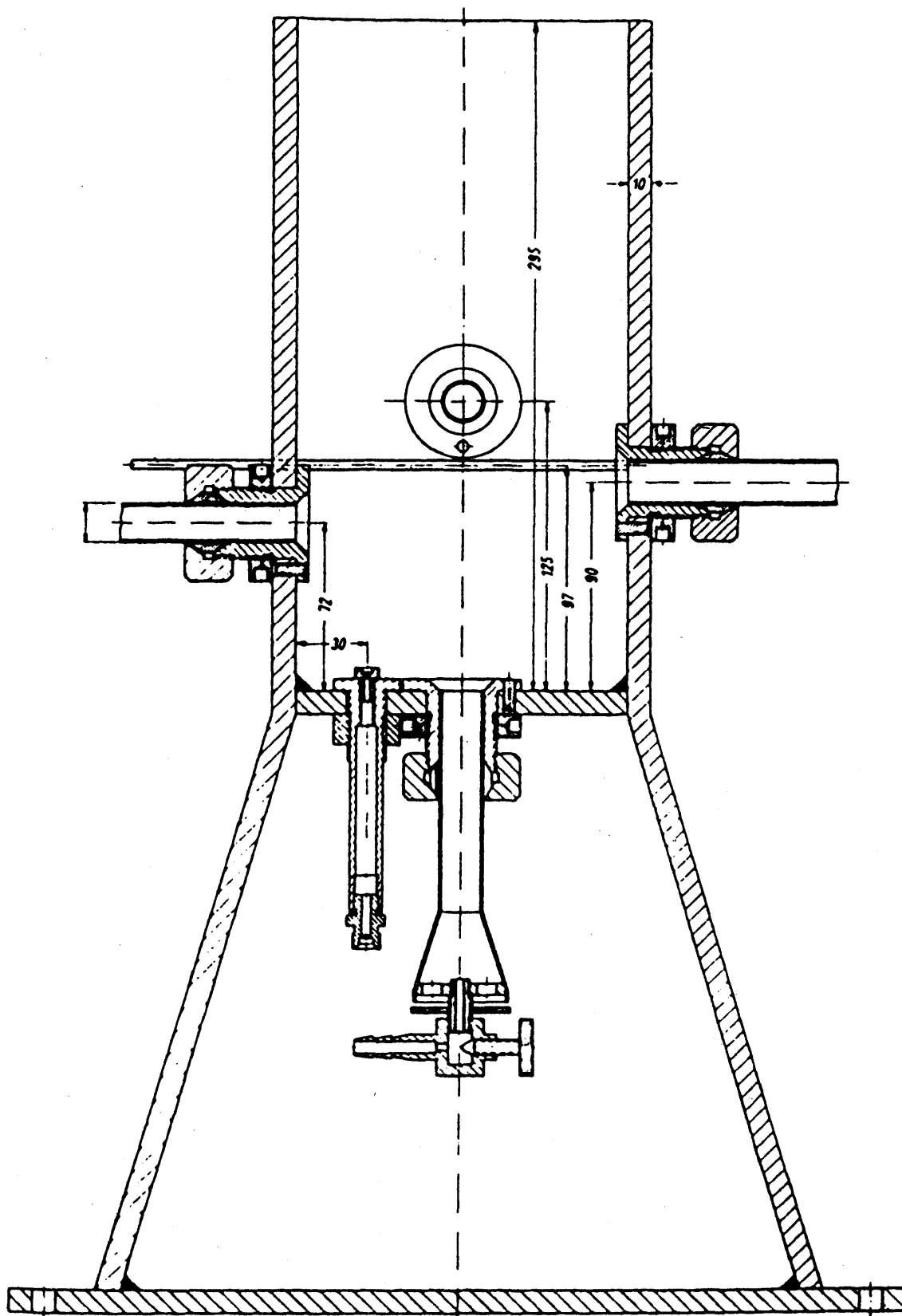
Kuva 1

(Kaikki mitat millimetreinä)



Kuva 2

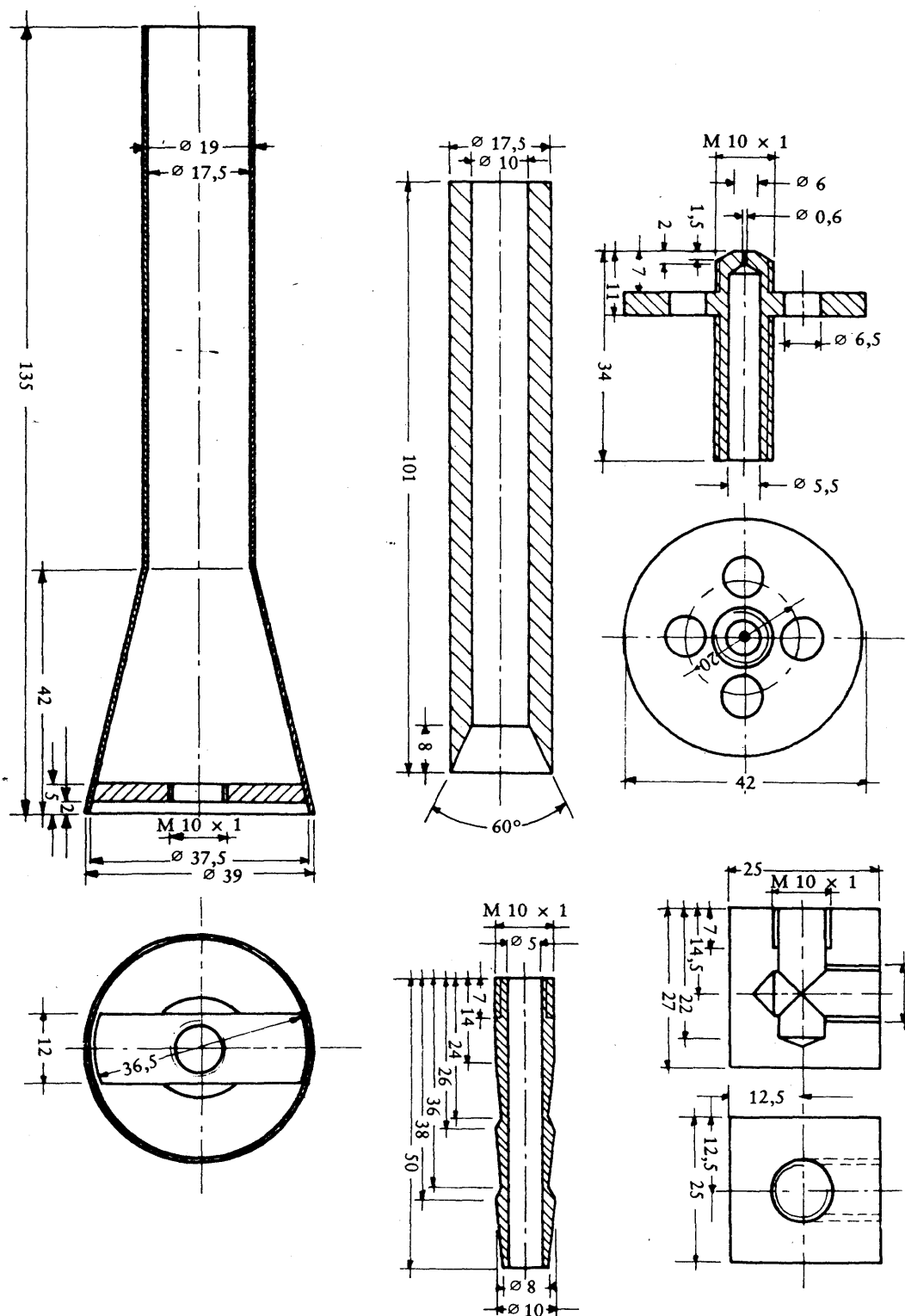
(Kaikki mitat millimetreinä)



Kuva 3 a

Materiaali: messinki

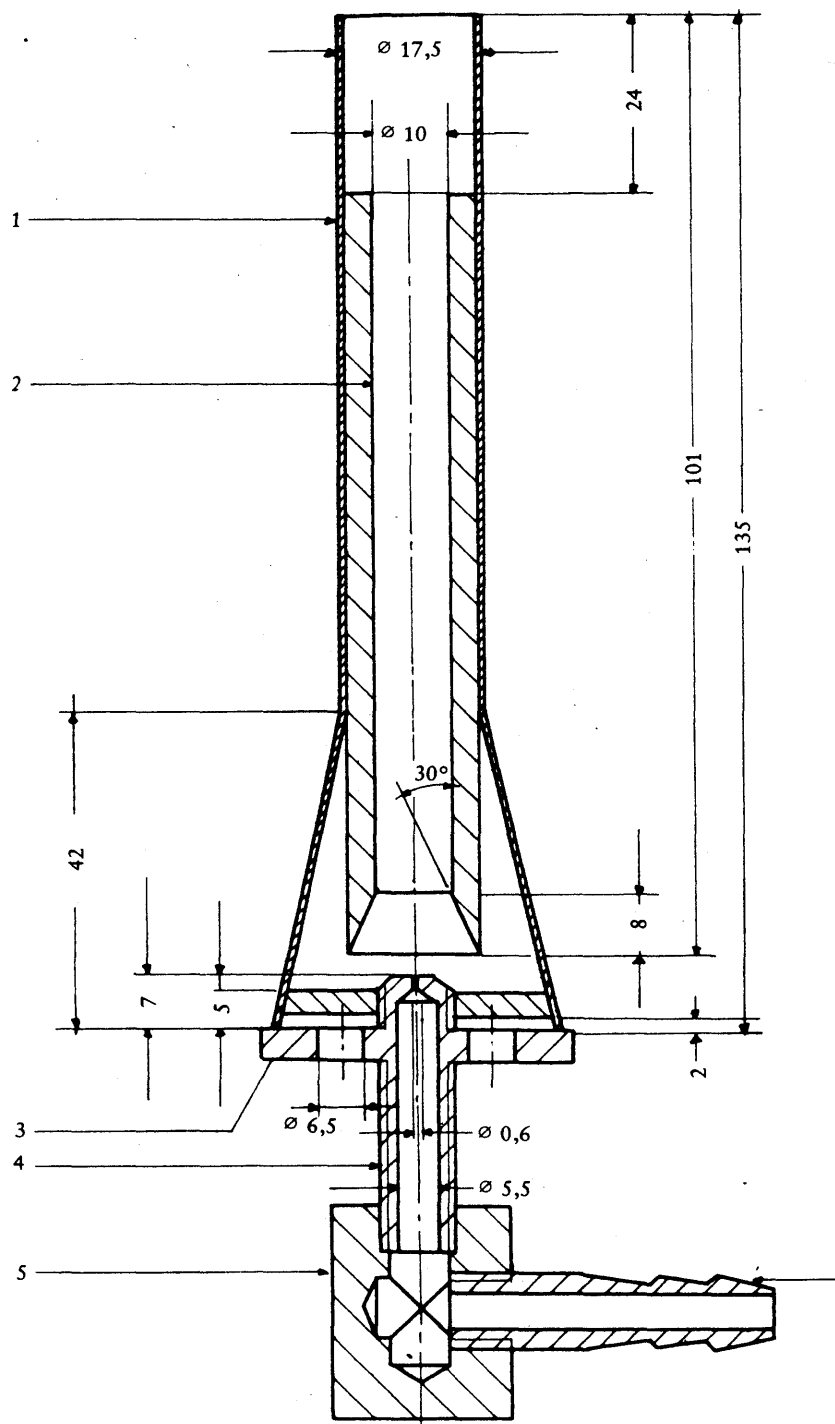
(Kaikki mitat millimetreinä)



Kuva 3 b

Materiaali: messinki

(Kaikki mitat millimetreinä)



A. 15. ITSESTÄÄN SYTTYMINEN (HAIHTUVIEN NESTEIDEN JA KAASUJEN ITSESYTTYMISEN LÄMPÖTILAN MÄÄRITTÄMINEN)

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

On hyvä hankkia ennakkotietoja aineen itsestäänsyttymisominaisuuksista. Menetelmällä voi testata kaupan olevia kaasumaisia ja haihtuvia nestemäisiä aineita, jotka tai joiden kaasut voidaan sytyttää kuumen pinnan avulla niiden ollessa ilman kanssa kosketuksissa. Itsesyttymisen lämpötila voi alentua huomattavasti testattavassa aineessa olevien katalyyttisten epäpuhtauksien ansiosta.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Itsestäänsyttymisaste ilmaistaan itsesyttymisen lämpötilana. Itsesyttymisen lämpötila on alin lämpötila, jossa testattava aine syttyy ilmaan sekoitettuna testausmenetelmän määrittelemissä olosuhteissa.

1.3 Vertailuaineet

Ei ole määritelty.

1.4 Menetelmän periaatteet

Kaasujen ja höyryjen itsestäänsyttymiskäyttäytyminen määritetään IEC 79-4:ssä selostetun laitteen avulla.

1.5 Laatuksiteerit

Toistettavuus vaihtelee riippuen itsesyttymisen lämpötilavälistä ja käytetystä testausmenetelmästä (korkeintaan $\pm 5^{\circ}\text{C}$).

Herkkyys riippuu käytetystä testausmenetelmästä.

Spesifisyys riippuu käytetystä testausmenetelmästä.

1.6 Menetelmän selostus

1.6.1 Laite

Kohdassa 1.6.3 mainittuun testausmenetelmään sisältyy laiteselostus.

1.6.2 Koeolosuhteet

Testattava näyte testataan kohdassa 1.6.3 mainitun menetelmän mukaisesti.

1.6.3 Testin suoritus

Katso IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056.

2 TULOKSET

Koelämpötila, ilmanpaine, näytteen määrä ja syttymiseen kuluva aika kirjataan.

3 RAPORTOINTI

Raportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- aineen tarkka määritys (koostumus ja epäpuhtaudet),
- näytteen määrä ja ilmanpaine,
- määritystulokset (koelämpötila, syttymistulokset, syttymiseen kulunut aika),
- kaikki tulosten tulkintaan vaikuttava muut huomautukset.

4 LÄHDELUETTELO

Ei ole.

A. 16. ITSESTÄÄN SYTTYMINEN (KIINTEÄT AINEET – SUHTEELLISEN ITSESYTTYMISEN LÄMPÖTILAN MÄÄRITTÄMINEN)

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Tämä testi tehdään räjähtäville aineille ja aineille, jotka syttyvät itsestään ollessaan kosketuksissa ilman kanssa ympäristön lämpötilassa.

Testin tarkoituksena on hankkia alustavia tietoja kiinteiden aineiden itsestäänsyttymisestä korkeissa lämpötiloissa.

Jos aineen reaktiosta hapen kanssa tai eksotermisestä hajoamisesta johtuva lämpö ei haihdu kyllin nopeasti ympäristöön, tapahtuu itsestään kuumentumista johtuva itsesytytys. Itsesytytys tapahtuu näin ollen lämmöntuotannon ylittäessä lämmönhukan.

Testimenetelmä sopii kiinteiden aineiden alustavaan seulontatestaukseen. Kiinteiden aineiden syttymisen ja palamisen monimutkaisesta luonteesta johtuen tällä testimenetelmällä määritettyä itsesyttymisen lämpötilaa tulee käyttää vain vertailutarkoituksiin.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Tällä menetelmällä saatu itsesyttymisen lämpötila on C-asteissa ilmaistu alhaisin ympäristön lämpötila, jossa tietty määrä ainetta syttyy määrätyissä olosuhteissa.

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Menetelmän periaatteet

Tietty määrä testattavaa ainetta asetetaan huoneenlämpöiseen uuniin; näytteen keskeltä mitataan lämpötila/aikakäyrä, kun uunia kuumennetaan 400 C-asteeseen 0,5 °C:n minuuttivauhdilla. Uunin lämpötilaa, jossa näyte itsestään kuumentamalla saavuttaa 400 °C, sanotaan tässä testissä itsesyttymisen lämpötilaksi.

1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

1.6 Menetelmän selostus

1.6.1 Laite

1.6.1.1 Uuni

Lämpötilaohjelmoitu laboratoriuuni (tilavuus noin 2 litraa), jossa on luonnollinen ilmankierto ja räjähdysaukko. Räjähdysvaaran välttämiseksi on varmistauduttava siitä, etteivät hajoamisesta syntyvät kaasut pääse kosketuksiin uunin kuumentamiseen käytettävien sähköelementtien kanssa.

1.6.1.2 Metalliverkkokuutio

Ruostumatonta teräsverkkoa, jonka silmukkakoko on 0,045 mm, leikataan kuvassa 1 esitetyn kaavan mukaisesti (katso lisäys). Verkko taivutetaan ja kiinnitetään teräslangalla päältä avoimiksi kuutioiksi.

1.6.1.3 Termoparit

Sopivat termoparit.

1.6.1.4 Rekisteröintilaite

Mikä tahansa kaksikanavainen 0 – 600 °C:seen tai vastaavaan jännitteeseen kalibroitu rekisteröintilaite.

1.6.2 Koeolosuhteet

Aineet testataan niiden kaupallisessa muodossa.

1.6.3 Kokeen suoritus

Kuutio täytetään testattavalla aineella, naputetaan varovasti, ja ainetta lisätään, kunnes kuutio on aivan täynnä. Sen jälkeen näyte ripustetaan huoneen lämpötilassa olevan uunin keskelle. Toinen termopari asetetaan kuution keskelle ja toinen kuution ja uunin seinän väliin rekisteröimään uunin lämpötilaa.

Uunin ja näytteen lämpötilat rekisteröidään jatkuvasti, kun uunin lämpötilaa nostetaan 0,5 C-asteen minuuttivauhdilla 400 C-asteeseen tai kiinteän aineen sulamispisteeseen, mikäli tämä on alempi.

Kun aine syttyy, näytteessä oleva termopari osoittaa hyvin jyrkkää lämpötilan nousua uunin lämpötilaan verrattuna.

2 TULOKSET

Uunin lämpötila hetkellä, jolloin näytteen lämpötila saavuttaa 400 °C itsesytytyksen vuoksi, on tärkeä tulosten arvioimisen kannalta (katso lisäyksen kuvaa 2).

3 RAPORTOINTI

Raportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

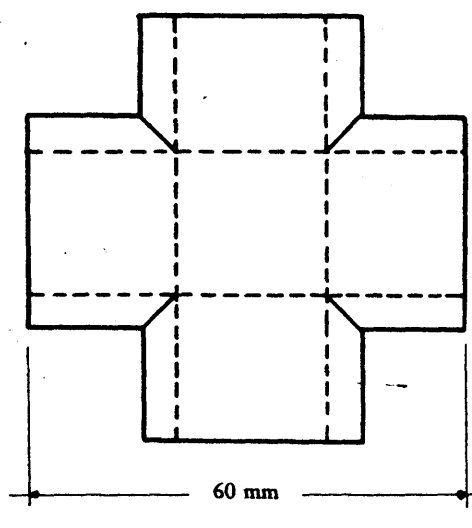
- kuvaus testattavasta aineesta,
- mittaustulokset sekä lämpötila/aikakäyrä,
- kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat muut huomautukset.

4 LÄHDELUETTELO

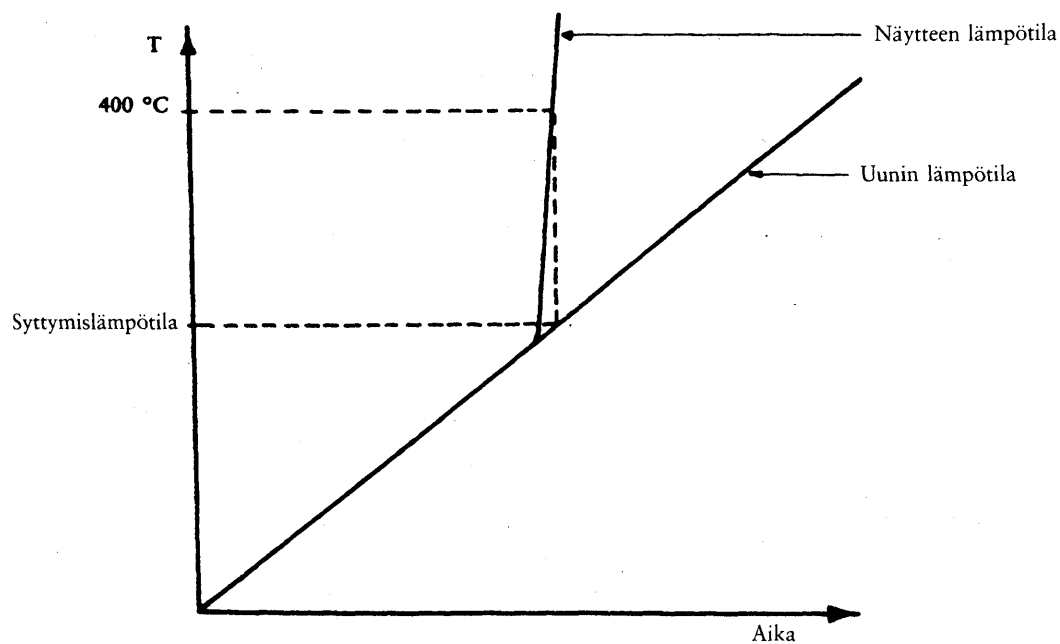
Ei ole.

*Lisäys**Kuva 1*

20 mm:n testikuution kaava

*Kuva 2*

Tyypillinen lämpötila/aikakäyrä



A. 17. HAPETTUMISOMINAISUUDET

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Ennen tämän testin suorittamista on hyvä hankkia alustavia tietoja aineen mahdollisista räjähdysominaisuuksista ja myrkyllisyydestä.

Tällä menetelmällä ei voi testata nesteitä ja kaasuja, räjähtäviä tai herkästi palavia aineita, orgaanisia peroksiedeja eikä palavia kiinteitä aineita, jotka saattavat sulaa koeolosuhteissa.

Testi on tarpeeton, kun aineen rakennekaavasta voi päätellä, että aine tai valmiste ei todennäköisesti reagoi eksotermisesti palavan aineen kanssa.

Esitestillä varmistetaan, onko koe suoritettava erityistä varovaisuutta noudattaen.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Palamisaika: reaktioaika sekunneissa laskettuna reaktiokohdan siirtymisenä aineesta tehdyssä tangossa kohdassa 1.6 selostetulla tavalla.

Palamisnopeus: ilmoitetaan millimetreinä sekunnissa.

Suurin palamisnopeus: suurimmat palamisnopeusarvot, jotka on saatu seoksilla, joiden painosta 10—90 % on hapetinta.

1.3 Vertailuaine

Analyysilaatuista bariumnitraattia käytetään vertailuaineena kokeessa ja esitestissä.

Esitestissä voidaan myös käyttää kaliumdikromaattia.

Kaliumdikromaattia käsiteltäessä on noudatettava erityistä varovaisuutta.

Vertailuaine on se bariumnitraatin ja jauhetun selluloosan kohdan 1.6 mukaisesti valmistettu seos, jolla on suurin palamisnopeus (tavallisesti seos, jossa bariumnitraatin osuus on 60 % painosta).

1.4 Menetelmän periaatteet

Esitesti tehdään turvallisuussyistä. Jos esitesti selvästi osoittaa, että testattavalla aineella tai valmis- teella on hapettumiso-minaisuuksia, tämä koe riittää. Muussa tapauksessa ainetta tai valmistetta testataan edelleen.

Jatkotestissä testattavaa ainetta ja tiettyä palavaa ainetta sekoitetaan eri suhteissa. Kustakin seoksesta muovataan tanko, joka sytytetään toisesta päästä. Määritettyä suurinta palamisnopeutta verrataan vertailuseoksen suurimpaan palamisnopeuteen.

1.5 Laatuksiteerit

Tarvittaessa voidaan käyttää mitä tahansa jauhamis- ja sekoitusmenetelmää edellyttäen, että kuudessa eri testissä määritetyt suurimmat palamisnopeudet eroavat aritmeettisesta keskiarvosta korkeintaan 10 %.

1.6 Menetelmän selostus**1.6.1 Esitesti**

Kaupallisessa muodossa oleva aine kuivataan. Kuivattu aine sekoitetaan kuivattuun selluloosaan tai puujauhoon painosuhteessa 2 osaa testattavaa ainetta ja 1 osa selluloosaa tai puujauhoa. Seoksesta muodostetaan pieni kartiomainen keko, jonka mitat ovat 3,5 cm (pohjan läpimitta) x 2,5 cm (korkeus), täyttämällä löysästi kartionmuotoinen muotti (esim. laboratoriolasisuppilo, jonka varsi on tukittu).

Keko asetetaan viileälle, eristävälle ja johtamattomalle alustalle sytytyslähteen yläpuolelle, jossa on noin 1 mm testauspinnan yläpuolella oleva ja keon pohjan yli ulottuva inertti nikkeli- tai platinalanka (joka voidaan kuumentaa sähköllä noin 1 000 C-asteiseksi). Testi tehdään vetokaapissa kohdan 1.6.3 mukaisesti.

Sytytyslähde käynnistetään ja jätetään käyntiin. Syntyvän reaktion voimakkuutta ja kestoa tarkkailaan, ja huomiot kirjataan.

Aineen tai valmisteiden katsotaan olevan hapettava, jos reaktio on voimakas.

Aina kun tulos on epäilyttävä, on tehtävä koko alla selostettu testisarja.

1.6.2 Valmistelevat toimenpiteet**1.6.2.1 Testattava aine**

Testattavan näytteen hiukkaskoko pienennetään $> 0,125$ mm seuraavalla tavalla. Kaupallisessa muodossa oleva testattava aine seulotaan, jäljelle jäävä osa jauhetaan jamenettely toistetaan, kunnes koko näyte menee seulan läpi.

Mitä tahansa laatukriteerit täyttävää jauhamis- ja seulontamenettelyä voidaan käyttää.

Ennen seoksen valmistamista ainetta kuivataan 105 °C:n lämpötilassa, kunnes vakioaino on saavutettu. Mikäli testattavan aineen hajoamislämpötila on alempi kuin 105 °C, aine täytyy kuivata sopivassa alemmassa lämpötilassa.

1.6.2.2 Palava aine

Jauhettua selluloosaa käytetään palavana aineena. Selluloosan tulee olla laadultaan sellaista, jota käytetään ohutkerros- tai pylväskromatografiassa. Laatu, jossa 85 % kuiduista on 0,020–0,075 mm:n pituisia, on osoittautunut sopivaksi. Selluloosajauhe seulotaan seulalla, jonka raekoko on 0,125 mm.

Ennen seoksen valmistamista jauhettu selluloosa kuivataan 105 °C:n lämpötilassa, kunnes vakioaino on saavutettu.

Mikäli esitestissä käytetään puujauhoa, havupuujauho valmistetaan ottamalla talteen 1 600 μm :n raekokoisen seulan läpi menevä jauho, joka sekoitetaan huolellisesti ja kuivataan 105 °C:n lämmössä enintään 25 mm paksuna kerroksena. Sitten jauho jäähdytetään, ja tarpeellinen määrä säilytetään ilmatiiviissä astiassa, kunnes se käytetään. Se tulisi käyttää vuorokauden kuluessa kuivatuksesta.

1.6.2.3 Seokset

Valmistetaan hapetin-selluloosaseokset, joissa hapettimen määrä on 10–90 % painosta 10 % lisäyksin. Rajatapauksissa käytetään näiden välissä olevia hapetin-selluloosaseoksia, jotta suurin palamisnopeus voidaan määrittää täsmällisemmin.

Huomautus

Hapettimen ja selluloosan seokset voivat olla räjähdysherkkiä, ja niitä on käsiteltävä tarpeellista varovaisuutta noudattaen.

Tanko tehdään muotilla. Muotti on metallia, sen pituus on 250 mm, ja siinä on kolmikulmainen poikkipinta, jonka sisäkorkeus on 10 mm ja sisäleveys 20 mm. Muotin kumpaankin pitkään sivuun kiinnitetään sivusuojiksi metallilevyt, jotka ulottuvat 2 mm kolmikulmaisen poikkipinnan yläpuolelle (kuva). Muotti täytetään testattavalla seoksella löysästi jonkin verran yli reunojen. Sen jälkeen muotti pudotetaan kerran 2 cm:n korkeudelta kovalle alustalle, ja jäljellä oleva liika aine pyyhitään pois viistoasennossa olevalla levyllä. Sivusuojat poistetaan ja jäljellä oleva jauhe tasoitetaan telalla. Palamaton levy asetetaan muotin päälle, laite käännetään ylösalaisin ja muotti poistetaan.

1.6.2.4 Sytytyslähde

Kaasupolttimen liekkiä tai sähköllä noin 1 000 C-asteeseen kuumennettua platinalankaa käytetään sytytyslähteenä.

1.6.3 Kokeen suoritus

Näyte asetetaan vetokaappiin vasten vetoa.

Ilman nopeuden tulee olla niin suuri, ettei laboratorioon pääse kaasuja, eikä se saa vaihdella kokeen aikana. Laitteen ympärille asetetaan vetosuoja.

Selluloosan ja testattavan aineen kosteutta sitovien ominaisuuksien vuoksi koe on suoritettava mahdollisimman nopeasti.

Tangon toinen pää sytytetään koskettamalla sitä liekillä tai hehkuvalla platinalangalla. Kun reaktio-alue on siirtynyt 30 mm, seuraavan 200 mm:n reaktioaika mitataan.

Testi tehdään vertailuaineella. Sen jälkeen testataan kukin testattavasta aineesta ja selluloosasta tehty seos ainakin kerran.

Mikäli suurin palamisnopeus osoittautuu olevan huomattavasti suurempi kuin vertailuaineen palamisnopeus, koe voidaan lopettaa; muussa tapauksessa testi toistetaan kolmella suurimman palamisnopeuden saavuttavalla seoksella viisi kertaa.

2**TULOKSET**

Turvallisuussyistä valitaan testattavan aineen tyypilliseksi hapettumisominaisuudeksi suurin palamisnopeus — ei keskiarvoa.

Arvioinnissa käytetään tietyn seoksen kuuden testin antamaa korkeinta palamisnopeusarvoa.

Kunkin seoksen korkeimmasta palamisnopeusarvosta suhteessa hapettimen määrään piirretään käyrä.

Käyrästä otetaan suurin palamisnopeus.

Kuusi palamisnopeusarvoa, jotka on mitattu seoksesta suurimman palamisnopeusarvon ohella, saavat poiketa korkeintaan 10 % aritmeettisesta keskiarvosta, muussa tapauksessa jauhamis- ja sekoitustapaa on parannettava.

Suurinta palamisnopeutta verrataan vertailuaineen suurimpaan palamisnopeuteen (katso 1.3).

3 RAPORTOINTI

3.1 Koeraportti

Koeraportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- kuvaus testattavasta aineesta,
- testattavan aineen käsittely (esim. jauhatus, kuivatus),
- mittaustulokset,
- reaktiotapa (esim. leimahtava pinnan palaminen, koko massan palaminen, mahdolliset tiedot palavista tuotteista jne.),
- kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat lisähuomautukset, kuten kuvaus turvallisuusesitestissä/seulontatestissä saadun reaktion voimakkuudesta (liekit, kipinät, savu, hidas kyteminen jne.) ja likimääräisestä kestosta sekä testattavan aineen että vertailuaineen osalta.

3.2 Tulosten tulkinta

Ainetta pidetään hapettavana aineena, kun:

- a) esitestissä saadaan voimakas reaktio
- b) kokeen tuloksena testattavien seosten suurin palamisnopeus on suurempi tai yhtä suuri kuin vertailuseoksena käytetyn selluloosan ja bariumnitraatin.

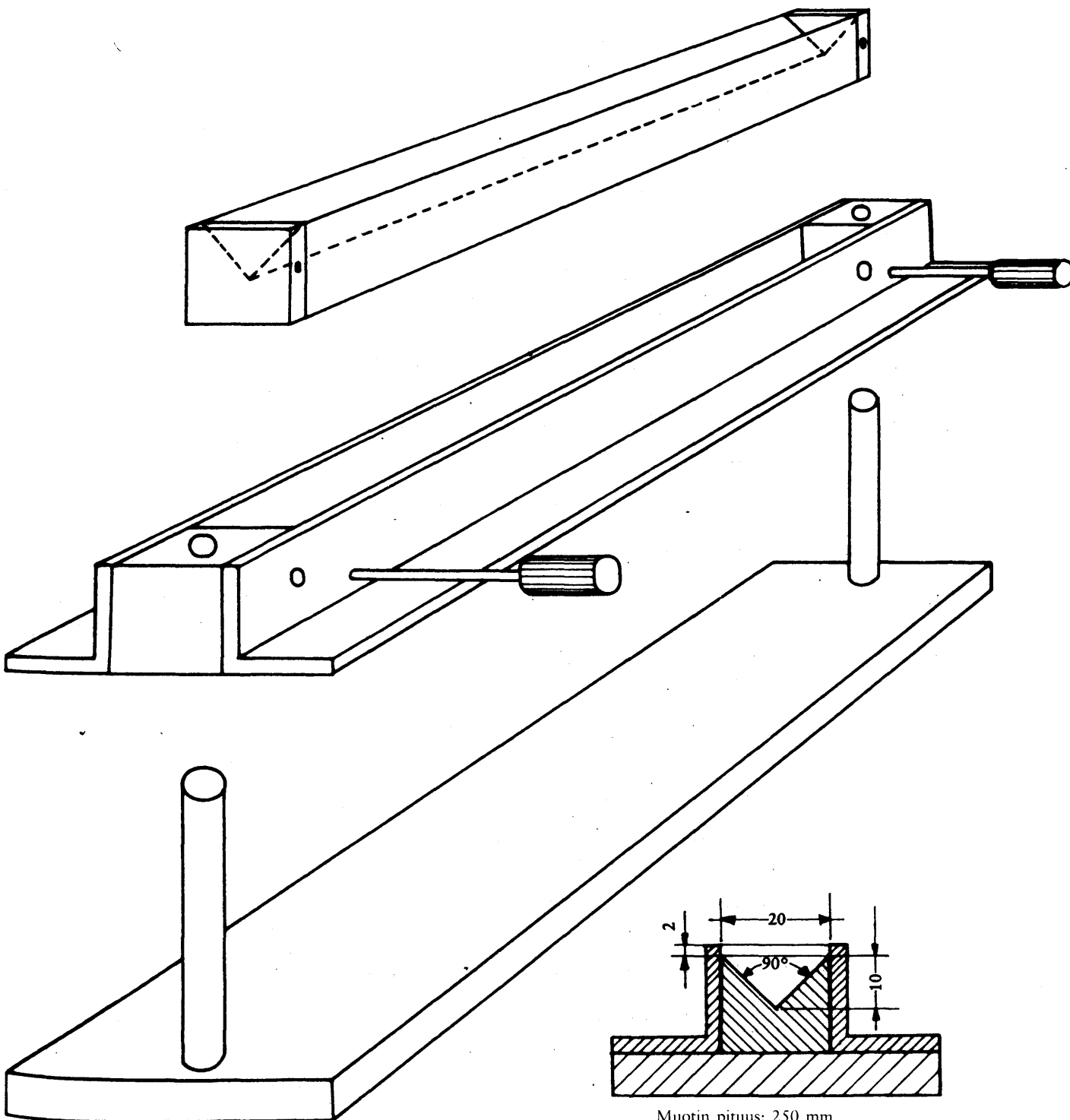
4 LÄHDELUETTELO

Ei ole.

*Lisäys**Kuva*

Muotti ja muut tangon valmistamiseen tarvittavat osat

(Kaikki mitat millimetreinä)



Muotin pituus: 250 mm

Materiaali: alumiini

OSA B: MYRKYLLISYYDEN MÄÄRITYSMENETELMÄT

YLEISJOHDANTO: OSA B

A. JOHDANTO

Ks. yleisjohtanto.

B. MÄÄRITELMÄT

- i) *Akuutti myrkyllisyys* käsittää haittavaikutukset, jotka syntyvät tietyn ajan (yleensä 14 päivän) kuluessa siitä, kun ainetta on annettu yksi annos.
- ii) *LD₅₀* (median lethal dose) on tilastollisesti laskettu aineen yksittäisannos, jonka voidaan odottaa tappavan 50 % annoksen saaneista eläimistä. LD₅₀-arvo ilmoitetaan testattavan aineen painona suhteessa testattavan eläimen yksikköpainoon (milligrammoina kilogrammaa kohden).
- iii) *LC₅₀* (median lethal concentration) on tilastollisesti laskettu aineen pitoisuus, jonka voidaan odottaa tappavan 50 % määrääjäksi altistetuista eläimistä joko altistamisen aikana tai määrääjässä sen jälkeen. LC₅₀-arvo ilmoitetaan testattavan aineen painona ilman standarditilavuutta kohden (milligrammoina litraa kohden).
- iv) *Ei myrkyvaikutusta -taso* on testissä käytetty suurin annos tai altistamistaso, joka ei aiheuta havaittavia haittavaikutuksia.
- v) *Subakuutti/subkrooninen* myrkyllisyys käsittää koe-eläimillä esiintyvät haittavaikutukset, kun niille niiden arvioituun elinikään verrattuna lyhyen ajanjakson kuluessa päivittäin annetaan tietty kemikaaliannos tai kun ne altistetaan tietylle kemikaalille.
- vi) *Suurin siedetty annos* (MTD, maximum tolerated dose) on suurin myrkyvaikutuksia aiheuttava annos, jolla ei ole suoritettujen testien kannalta merkittävää kuolleisuusvaikutusta, esim. karsinogeenitutkimuksissa muut vaikutukset kuin kasvaimet.
- vii) *Ihon ärsytys* on parannettavissa oleva, testattavan aineen käytön seurauksena syntynyt tulehduksellinen ihomuutos.
- viii) *Silmän ärsytys* on silmän parannettavissa oleva muutos, joka aiheutuu testattavan aineen panemisesta silmän ulkopinnalle.
- ix) *Ihon herkistyminen* (allerginen kosketusihottuma) on jostakin aineesta johtuva immunologisesti hoidettava ihoreaktio.

C. ARVIOINTI JA TULKINTA

Eläin- ja in vitro -kokeiden tuloksia ei suoraan voida soveltaa ihmiseen. Tämä on syytä muistaa tuloksia arvioitaessa ja tulkittaessa.

Mikäli ihmisillä tehdyistä kokeista on tietoja saatavilla, niiden painoarvo on suurempi, kun määritetään kemiallisen aineen mahdollisia vaikutuksia väestöön.

MUTAGEENISYYS (mukaan lukien syöpäsairauksien esiseulontatesti)

Tutkittavan aineen mahdollisen mutageenisyyden alustavaksi toteamiseksi on hankittava tietoja kahdesta kategoriasta, geenimuutoksista ja kromosomien poikkeavuudesta.

Näissä määrityksissä käytetään seuraavia testejä:

- i) *Geeni(piste)muutoksen aiheuttaminen* esitumallisissa soluissa, kuten *Salmonella typhimurium*; testi voidaan myös suorittaa käyttäen *Escherichia colia*. Valinta näiden kahden testiorganismien välillä suoritetaan testattavan kemikaalin perusteella.

- ii) Nisäkkäiden soluissa tapahtuvaa kromosomien poikkeavuutta aiheuttava *in vitro* -testi; *in vivo* -menetelmää (mikrotumakoe tai luuytimen solujen metafaasianalyysi) voidaan myös käyttää.

D. KIRJALLISUUSVIITTEET

Toksikologia on kehittyvä kokeellinen tieteenala, ja kirjallisuutta sen eri aihepiireistä on runsaasti saatavilla. Taloudellisen yhteistyö- ja kehitysjärjestön (OECD:n) testausohjeissa on lisätietoja.

Lisähuomautuksia

Eläinten huolto

Elinolosuhteiden tarkka valvonta ja oikea eläintenhoitotekniikka ovat hyvin tärkeitä myrkyllisyystestauksissa.

- i) Asuinolosuhteet

Koe-eläinten asuintiloissa tai aitauksissa vallitsevien olosuhteiden tulee olla lajille sopivat. Jyrsijöille sopiva huoneen lämpötila on 22 ± 3 °C ja suhteellinen kosteus 30–70 %; kaneille ja marsuille lämpötilan tulee olla 20 ± 3 °C ja suhteellisen kosteuden 30–70 %.

Eräät testausmenetelmät ovat erityisen herkkiä lämpötilan vaikutuksille. Tällöin testausmenetelmän selostus sisältää tarvittavat olosuhteiden säätämishjeet. Kaikissa myrkyllisyystutkimuksissa lämpötilaa ja kosteutta on tarkkailtava. Ne kirjataan ja ilmoitetaan tutkimuksen loppuraportissa.

Keinovaloa käytettäessä valorytmin tulisi yleensä olla 12 tuntia valoa ja 12 tuntia pimeää. Valorytmi kirjataan ja ilmoitetaan tutkimuksen loppuraportissa.

Eläimillä suoritettujen kokeiden raportissa on mainittava, minkälaisia happeja on käytetty ja ilmoitettava kussakin häkissä pidettyjen eläinten luku altistamisen ja mahdollisen seurannan aikana.

- ii) Ruokintaolosuhteet

Ruokavalion tulee täyttää kaikki testattavalle lajille asetetut ravintovaatimukset. Kun testattavia aineita annetaan eläimille ravinnon yhteydessä, ravitsemustaso voi muuttua testattavan aineen ja annetun ravinnon vuorovaikutuksen ansiosta.

Tämä mahdollisuus on otettava huomioon testituloksia arvioitaessa.

Ruokavalio ei saa sisältää haitallisia määriä myrkyllisyystestitulokseen vaikuttavia kontaminantteja.

B. 1. AKUUTTI MYRKYLLISYYS (ORAALINEN)

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmät

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Testattava aine annetaan suun kautta ruokintaletkun avulla asteittain suurenevinä annoksina useille koe-eläinryhmille, niin että kukin ryhmä saa erisuuruisen annoksen. Sen jälkeen tarkkaillaan vaikutusta ja todetaan kuolemantapaukset. Kokeen aikana kuolleille eläimille ja sen loputtua elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiinavaus. Tätä menetelmää käytetään pääasiassa jyrksijöillä suorite-
tuissa tutkimuksissa.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 Testin valmistelu

Eläimet siirretään koetiloihin, ja kokeen aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen kokeen alkua. Ennen testiä nuoret, terveet täysikasvuiset eläimet randomisoidaan ja jaetaan koeryhmiin.

Testattavasta aineesta valmistetaan tarvittaessa liuos tai seos sopivaan liuottimeen. Suositellaan veteen liuottamista aina kun mahdollista, sen jälkeen kasviöljyä, sitten jonkin muun liuottimen käyttöä tai suspension valmistamista. Käytettäessä muita liuottimia kuin vettä liuottimen toksiset ominaisuudet on tunnettava, tai ne on määritettävä ennen testiä tai sen kuluessa. Jyrksijöillä annos saa olla korkeintaan 10 ml/kg ruumiinpainosta, mutta vesiliuoksen ollessa kyseessä voidaan antaa 20 ml/kg. Testiliuoksen määrälliset vaihtelut on minimoitava säätämällä liuoksen pitoisuus eri annosta-
soilla, jotta määrä on vakio kaikilla annostasoilla.

1.6.2 Koeolosuhteet

1.6.2.1 Koe-eläimet

Rotta on suositeltavin laji, jollei se ole kontraindikoitu.

On käytettävä yleisesti käytettyjä laboratoriokantoja. Kumpaakin sukupuolta olevien koe-eläinten paino saa vaihdella korkeintaan $\pm 20\%$ tavanomaisesta keskiarvosta.

1.6.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin annostasoa varten tarvitaan vähintään 10 jyrsiää (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraiden on oltava synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineenä.

1.6.2.3 Annostasot

Annastasoja on oltava vähintään kolme, ja niiden tulee erota toisistaan niin paljon, että testiryhmissä saadaan esiin myrkkyyvaikutukset ja kuolleisuusaste. Koetulosten perusteella on voitava laatia annos/vastekäyrä ja, mikäli mahdollista, hyväksyttävä LD₅₀-määritys.

1.6.2.4 Rajatesti

Jos koeryhmässä (viisi eläintä kumpaakin sukupuolta) ei esiinny yhtään testattavaan yhdisteeseen liittyvää kuolemantapausta 14 päivän kuluessa 5 000 mg/kg:n annoksen antamisesta, näin saatu arvio aineen äkillisestä myrkyllisyydestä on yleensä kyllin tarkka.

1.6.2.5 Tarkkailuaika

Tarkkailuajan on oltava vähintään 14 päivää, mutta sen pituus ei ole tarkoin määrätty. Se riippuu myrkytysreaktioista, niiden alkamisnopeudesta ja toipumisajan pituudesta. Tarkkailuaikaa voidaan siis tarpeen mukaan pidentää. Myrkytysoireiden alkamis- ja loppumisaika sekä kuoleman ajankohta ovat tärkeitä, varsinkin jos kuolema näyttää viivästyvän.

1.6.3 Testin suorittaminen

Eläinten on paastottava ennen testattavan aineen antamista. Rotat paastoavat yön, mutta eläimille, joilla on vilkkaampi aineenvaihdunta, riittää lyhyempi paasto. Veden saantia ei rajoiteta. Seuraavana päivänä eläimet on punnittava ja testattava aine annetaan yhtenä annoksena eläimille ryhmittäin ruokintaletkua käyttäen. Jollei aineen antaminen ole mahdollista yhtenä annoksena, se voidaan antaa osina enintään vuorokauden aikana. Testattavan aineen antamisen jälkeen ruokaa ei tarvitse antaa 3–4 tuntiin. Kun annos annetaan pidemmän ajan kuluessa useana osa-annoksena, voi olla tarpeen antaa eläimille ruokaa ja vettä. Annostelun jälkeen eläimiä tarkkaillaan ja huomiot kirjataan järjestelmällisesti. Jokaisesta eläimestä pidetään erikseen kirjaa. Ensimmäisenä päivänä tarkkailu on suoritettava useita kertoja.

Huolellinen kliininen tutkimus on tehtävä arkipäivisin vähintään kerran päivässä. Eläimiä on tarkkailtava päivittäin ja on ryhdyttävä tarpeellisiin toimenpiteisiin, jotta tutkimuksesta menetettäisiin mahdollisimman vähän eläimiä. Kuolleille eläimille suoritetaan ruumiinavaus tai ne pakastetaan, ja heikot tai kuolemaisillaan olevat eläimet eristetään tai lopetetaan. Eläimiä tarkkailtaessa on huomiota kiinnitettävä muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnissa ja käyttäytymistavassa. Erityisesti tarkkaillaan, esiintyykö vapinaa, kouristuksia, syljeneritystä, ripulia, horros- ja unitiloja sekä koomaa. Kuolinaika on kirjattava mahdollisimman tarkasti.

Kokeen aikana kuolleille ja sen loputtua eloon jääneille eläimille suoritetaan ruumiinavaus. Kaikki paljain silmin havaittavat patologiset muutokset on kirjattava. Kudosnäytteitä on otettava tarpeen mukaan histopatologisia tutkimuksia varten.

2**TULOKSET**

Tulokset esitetään taulukon muodossa, josta näkyy kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä kokeen alussa ja lopussa, kunkin eläimen kuolinaika, niiden eläinten lukumäärä, joissa esiintyi muita myrkytysoireita, kuvaus myrkkyyvaikutuksista ja ruumiinavauksen löydöksistä. Kunkin eläimen paino on kirjattava ennen testattavan aineen antamista, viikottain sen jälkeen ja eläimen kuoltua. Painonmuutokset on laskettava ja kirjattava, jos eloonjäämisaika on vuorokautta pitempi. LD₅₀-arvo lasketaan jotakin hyväksyttyä menetelmää käyttäen. Tulosten arvioinnissa on

mainittava mahdollinen suhde eläimen testattavalle aineelle altistamisen ja kaikenlaisten poikkeavuuksien esiintyvyyden ja voimakkuuden välillä, esimerkiksi poikkeava käyttäytyminen, kliiniset poikkeavuudet, paljain silmin havaittavat vammat, painonmuutokset, kuolleisuus ja muut myrkkövaikutukset.

3 RAPORTOINTI

3.1 Tutkimuseloste

Mikäli mahdollista, tutkimuselosteen tulee sisältää seuraavat tiedot:

- eläinlaji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.,
- koeolosuhteet,
- annostasot (käytetty liuotin ja pitoisuus),
- taulukoidut vastetiedot sukupuolen ja annostason perusteella (kuolevien eläinten määrä, myrkytysoireita osoittavien eläinten määrä, altistuneiden eläinten määrä),
- annoksen antamisen jälkeinen kuolinaika,
- eläinten tarkkailu,
- LD₅₀-arvo kummankin sukupuolen osalta määritettynä 14 päivän kuluttua (määritystapa mainittava),
- 95 %:n varmuusväli LD₅₀:lle
- annos/kuolleisuuskäyrä ja jyrkkyys (mikäli käytetty määrittämenetelmä antaa nämä tiedot),
- ruumiinavauslöydökset,
- mahdolliset histopatologiset löydökset,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohdanto, osa B (C).

4 LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohdanto, osa B (D).

B. 2. AKUUTTI MYRKYLLISYYS (INHALAATIO)**1 MENETELMÄ****1.1 Johdanto**

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmät

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Useat koe-eläinryhmät altistetaan määrääjäksi testattavan aineen asteittain suureneville pitoisuuksille, niin että altistumispitoisuus on kussakin ryhmässä erilainen. Sen jälkeen tarkkaillaan aineen vaikutusta ja todetaan kuolemantapaukset. Kokeen aikana kuolleille eläimille ja sen loputtua elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiinavaus.

1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus**1.6.1 Testin valmistelu**

Eläimet siirretään koetiloihin, ja kokeen aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen kokeen alkua. Nuoret, terveet eläimet randomisoidaan ja jaetaan koeryhmiin. Simuloitua altistusta ei tarvitse suorittaa, ellei kokeessa käytetty laitetyyppi sitä edellytä. Testattavaan aineeseen voidaan tarvittaessa lisätä sopivaa liuotinta, jotta vaadittu pitoisuus ilmassa saavutetaan, ja tällöin on käytettävä liuotinkontrolliryhmää. Vain sellaisia liuottimia ja lisäaineita voidaan käyttää, joilla aikaisempien tietojen perusteella ei ole myrkkyyvaikutuksia.

1.6.2 Koeolosuhteet**1.6.2.1 Koe-eläimet**

Rotta on suositeltavin laji, jollei se ole kontraindikoitu. Yleisesti käytettyjä laboratorioskantoja suositellaan käytettäväksi. Kumpaakin sukupuolta olevien koe-eläinten paino saa vaihdella korkeintaan $\pm 20\%$ tavanomaisesta keskiarvosta.

1.6.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin annostasoa varten tarvitaan vähintään 10 jysijää (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraiden on oltava synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineenä.

1.6.2.3 Altistamispiteisyydet

Altistamispiteisyyksiä on oltava vähintään kolme, ja niiden on erottava toisistaan niin paljon, että testiryhmissä saadaan esiin myrkyvaikutukset ja kuolleisuusaste. Koetulosten perusteella on voitava laatia piteisuus/kuolleisuus -käyrä ja mikäli mahdollista hyväksyttävä LC₅₀-määritys.

1.6.2.4 Rajatesti

Jos viisi koe-eläintä kumpaakin sukupuolta altistetaan neljäksi tunniksi 20 mg/l kaasulle tai 5 mg/l aerosolille tai hiukkasille (tai milloin tämä ei ole mahdollista testattavan aineen fysikaalisten tai kemiallisten (mm. räjähdysvaara) ominaisuuksien vuoksi, korkein mahdollinen piteisuus), eikä 14 päivän kuluessa esiinny yhdisteeseen liittyvää kuolleisuutta, jatkotestaus ei yleensä ole tarpeen.

1.6.2.5 Altistamisaika

Altistamisaika on vähintään neljä tuntia.

1.6.2.6 Laitteisto

Eläinten testauksiin käytetään inhalaatiolaitetta, jonka dynaamisessa ilmavirrassa ilma vaihtuu vähintään 12 kertaa tunnissa, jotta hapen ja tasaisesti jakautuneen altistusaineen saanti voidaan varmistaa. Mikäli kammiota käytetään, sen on oltava suunniteltu siten, että koe-eläimet voidaan sijoittaa mahdollisimman väljästi ja että ne joutuvat mahdollisimman tehokkaasti hengittämään testattavaa ainetta. Yleissääntönä kammion ilman pitämiseksi vakiona on, että koe-eläinten viemä tila on korkeintaan 5 % kammion tilavuudesta. Eläimen sieraimet ja suu, yksinomaan pää tai koko ruumis voidaan altistaa kammiossa; kaksi ensin mainittua tapaa vähentävät testattavan aineen imeytymistä muilla tavoin.

1.6.2.7 Tarkkailuaika

Tarkkailuaika on vähintään 14 päivää, mutta sen pituus ei ole tarkoin määrätty. Se riippuu myrkytysreaktioista, niiden alkamisnopeudesta ja toipumisajan pituudesta. Tarkkailuaikaa voidaan siis tarpeen mukaan pidentää. Myrkytysoireiden alkamis- ja loppumisaika sekä kuoleman ajankohta ovat tärkeitä, varsinkin jos kuolema näyttää viivästyvän.

1.6.3 Testin suorittaminen

Eläimet punnitaan ja altistetaan sitten testattavalle aineelle vähintään neljäksi tunniksi, kun kammion ilman piteisuus on tasapainotettu. Tasapainotusajan on oltava lyhyt. Testauslämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suositeltavin suhteellinen kosteus on 30 – 70 %, mutta eräissä tapauksissa (esimerkiksi aerosolitesteissä) tämä ei käytännössä ole mahdollista. Ruokaa ja vettä ei anneta altistamisen aikana. Kokeessa olisi käytettävä dynaamista inhalointimenetelmää, jossa on analyttinen piteisuuden valvontajärjestelmä. Esitestaus on suositeltavaa sopivien altistamispiteisyyksien määrittämiseksi. Vakaat altistamisolosuhteet tulisi saada aikaan mahdollisimman pikaisesti. Ilmavirta säädetään niin, että olosuhteet ovat samat altistamiskammion joka kohdassa.

Seuraavat mittaukset tai tarkkailutoimenpiteet olisi suoritettava:

- a) Ilmavirran nopeus (jatkuva tarkkailu).
- b) Testattavan aineen varsinainen pitoisuus mitattuna hengityskohdassa. Altistamisen aikana pitoisuuden vaihtelu saa olla korkeintaan $\pm 15\%$ keskiarvosta. Testattaessa pölyjä ja eräitä aerosoleja tämän tason saavuttaminen voi olla vaikeaa. Tällöin hyväksytään suurempi poikkeama. Testattaessa hiukkasia ja aerosoleja analyysi tehdään tarvittaessa, kuitenkin vähintään kerran hiukkasten koon jakauman selvittämiseksi.
- c) Lämpötila ja kosteus.
- d) Altistamisen aikana ja sen jälkeen eläimiä tarkkaillaan, ja huomiot kirjataan järjestelmällisesti. Jokaisesta eläimestä pidetään erikseen kirjaa. Ensimmäisenä päivänä tarkkailu suoritetaan useita kertoja. Huolellinen kliininen tutkimus suoritetaan arkipäivisin vähintään kerran päivässä, ja päivittäisen tarkkailun tuloksena ryhdytään tarpeellisiin toimenpiteisiin, jotta tutkimuksesta menetettäisiin mahdollisimman vähän eläimiä. Kuolleille eläimille on suoritettava ruumiinavaus, tai ne on pakastettava ja heikot tai kuolemaisillaan olevat eläimet eristettävä tai lopetettava.

Eläimiä tarkkaillaessa on kiinnitettävä huomiota muutoksiin, joita tapahtuu ihossa ja karvapeitteessä, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa ja käyttäytymistavassa. Erityisesti tarkkaillaan hengitystä, vapinaa, kouristuksia, syljeneritystä, ripulia, horros- ja unitiloja sekä koomaa.

Kuolinaika on kirjattava mahdollisimman tarkasti. Kukin eläin punnitaan viikottain altistamisen jälkeen ja kuolinhetkellä. Kokeen aikana kuolleille ja sen loputtua eloon jääneille eläimille suoritetaan ruumiinavaus, jossa kiinnitetään huomiota erityisesti hengitystiehiin. Kaikki paljain silmin havaittavat patologiset muutokset on kirjattava. Kudosnäytteitä on otettava tarpeen mukaan histopatologisia tutkimuksia varten.

2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukon muodossa, josta näkyy kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä kokeen alussa ja lopussa, kunkin eläimen kuolinaika, niiden eläinten lukumäärä, joissa esiintyi muita myrkytysoireita, kuvaus myrkkyyvaikutuksista ja ruumiinavauslöydökset. Painonmuutokset on laskettava ja kirjattava, jos eloonjäämisaika on vuorokautta pitempi. LC_{50} -arvo on laskettava joskin hyväksyttyä menetelmää käyttäen. Tulosten arvioinnissa on mainittava erityisesti mahdollinen suhde eläimen testattavalle aineelle altistamisen ja kaikkien poikkeavuuksien esiintyvyyden ja voimakkuuden välillä, esimerkiksi poikkeava käyttäytyminen, kliiniset poikkeavuudet, paljain silmin havaittavat vammat, painonmuutokset, kuolleisuus ja muut myrkkyyvaikutukset.

3 RAPORTOINTI

3.1 Tutkimuseloste

Mikäli mahdollista, tutkimuselosteen tulee sisältää seuraavat tiedot:

- eläinlaji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.,
- koeolosuhteet:

Altistamislaitteen kuvaus; merkki, tyyppi, mitat, ilmanlähde, hiukkasten ja aerosolien tuottamistapa, ilmastointitapa ja eläinten sijainti koekammiossa altistamisen aikana.

Lämpötilan, kosteuden, hiukkasten koon ja aerosolin pitoisuuksien mittaustapa on mainittava.

Altistamistiedot

Altistamistiedot laaditaan taulukon muotoon, jossa esitetään keskiarvo ja poikkeamat (esimerkiksi keskihajonta) ja, mikäli mahdollista, seuraavat tiedot:

- a) ilmavirran nopeus inhalaattorilaitteessa,
- b) ilman lämpötila ja kosteus,

- c) nimellispitoisuudet (inhalaattorilaitteeseen asetetun testattavan aineen kokonaismäärä jaettuna ilman tilavuudella),
- d) käytetty liuotin,
- e) varsinaiset pitoisuudet hengitysalueella,
- f) hiukkasten keskikoko,
- g) tasapainotusaika,
- h) altistamisaika,
- taulukoidut vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaisesti (kuolevien eläinten määrä, myrkytysoireita osoittavien eläinten määrä, altistuneiden eläinten määrä),
- altistamisen aikainen tai sen jälkeinen kuolinaika,
- eläinten tarkkailu,
- LC₅₀-arvo kummankin sukupuolen osalta määritettynä 14 päivän kuluttua (määritystapa mainittava),
- 95 %-n varmuusväli LC₅₀:lle,
- annos/kuolleisuuskäyrä ja jyrkkyys (mikäli käytetty määrittämenetelmä antaa nämä tiedot),
- ruumiinavauslöydökset,
- mahdolliset histopatologiset löydökset,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohdanto, osa B (C).

4 KIRJALLISUUS

Ks. yleisjohdanto, osa B (D).

B. 3. AKUUTTI MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA)**1 MENETELMÄ****1.1 Johdanto**

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmä

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Testattavaa ainetta asetetaan useisiin ryhmiin jaettujen koe-eläinten ihoon eri pitoisuuksina, yksi pitoisuus kullekin ryhmälle. Sen jälkeen tarkkaillaan vaikutusta ja todetaan kuolemantapaukset. Kokeen aikana kuolleille eläimille ja sen loputtua elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiinavaus.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus**1.6.1 Testin valmistelu**

Eläimet siirretään koetiloihin, ja kokeen aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen kokeen alkua. Nuoret, terveet täysikasvuiset eläimet randomisoidaan ja jaetaan koeryhmiin. Noin vuorokautta ennen kokeen alkua eläinten selästä poistetaan karvapeite leikkaamalla tai ajelemalla. Karvapeitettä poistettaessa on varottava vahingoittamasta ihoa, jotta sen läpäisevyys ei muuttuisi. Vähintään 10 % ruumiin pinnasta tulee olla ajeltuna, jotta siihen voidaan panna testattavaa ainetta. Kun testataan kiinteitä aineita, jotka voidaan tarvittaessa jauhaa, aine kostutetaan vedellä tai sopivalla liuottimella, jotta ihoon saadaan hyvä kosketus. Mikäli käytetään liuotinta, sen vaikutus testattavan aineen ihon läpäisyyn on huomioitava. Testattavia nesteitä ei yleensä laimenneta.

1.6.2 Koeolosuhteet**1.6.2.1 Koe-eläimet**

Täysikasvuisia rottia tai kaneja voidaan käyttää. Muitakin lajeja voidaan käyttää, mutta niiden käyttö on perusteltava. Yleisesti käytettyjä laboratoriokantoja suositellaan käytettäväksi. Kumpaakin sukupuolta olevien koe-eläinten paino saa vaihdella korkeintaan $\pm 20\%$ asianmukaisesta keskiarvosta.

1.6.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Kullakin annostasolla tarvitaan vähintään 10 tervehoista eläintä (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraiden on oltava synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineenä. Joskus eläinten määrä voi olla pienempikin, varsinkin kun koe-eläimenä on kani.

1.6.2.3 Annostasot

Annostasot on oltava vähintään kolme ja niiden on erottava toisistaan niin paljon, että testiryhmissä saadaan esiin myrkkövaikutukset ja kuolleisuusaste. Koetulosten perusteella on voitava laatia annos/vastekäyrä ja, mikäli mahdollista, hyväksyttävä LD₅₀-määritys.

1.6.2.4 Rajatesti

Jos alustavassa kokeessa ei koeryhmässä (viisi eläintä kumpaakin sukupuolta) esiinny yhtään testattavaan yhdisteeseen liittyvää kuolemantapausta 14 päivän kuluessa vähintään 2 000 mg/kg:n annoksen levittämisestä terveelle iholle, jatkokokeita muilla annostasoilla ei yleensä tarvitse tehdä.

1.6.2.5 Tarkkailuaika

Tarkkailuajan on oltava vähintään 14 päivää, mutta sen pituus ei ole tarkoin määrätty. Se riippuu myrkytysreaktioista, niiden alkamisnopeudesta ja toipumisajan pituudesta. Tarkkailuaikaa voidaan siis tarpeen mukaan pidentää. Myrkytysoireiden alkamis- ja loppumisaika sekä kuoleman ajankohta ovat tärkeitä, varsinkin jos kuolema näyttää viivästyvän.

1.6.3 Testin suorittaminen

Eläimet pidetään yksittäishäkeissä. Testattavaa ainetta levitetään tasaisesti alueelle, joka on noin 10 % ruumiin koko pinta-alasta. Testattaessa erittäin myrkyllisiä aineita levitysala voi olla pienempi, mutta aine on levitettävä alueelle mahdollisimman ohuesti ja tasaisesti.

Testattava aine pidetään kosketuksessa ihoon huokoisen sideharson ja ärsyttämättömän teipin avulla koko vuorokauden pituisen altistusajan. Testialueelle asetetaan sopiva peite pitämään harsosidos ja testattava aine paikoillaan ja estämään eläintä syömästä sitä. Eläimen liikkumista voidaan rajoittaa, mutta täydellisesti liikkumattomaksi saattaminen ei ole suositeltava menettelytapa.

Altistusajan päätyttyä jäljellä oleva aine poistetaan vedellä tai puhdistamalla iho jollakin muulla sopivalla tavalla.

Tehdyt huomiot on kirjattava järjestelmällisesti, ja jokaisesta eläimestä pidetään erikseen kirjaa. Ensimmäisenä päivänä tarkkailu on suoritettava useita kertoja. Huolellinen kliininen tutkimus suoritetaan arkipäivisin vähintään kerran päivässä. Eläimiä tarkkaillaan päivittäin ja ryhdytään tarpeellisiin toimenpiteisiin, jotta tutkimuksesta menetettäisiin mahdollisimman vähän eläimiä. Kuolleille eläimille suoritetaan ruumiinavaus tai ne pakastetaan, ja heikot tai kuolemaisillaan olevat eläimet eristetään tai lopetetaan. Eläimiä tarkkailtaessa on kiinnitettävä huomiota muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja käsitellyssä ihosta, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa ja käyttäytymistavassa. Erityisesti on tarkkailtava, esiintyykö vapinaa, kouristuksia, syljenieritystä, ripulia, horros- ja unitiloja sekä koomaa. Kuolinaika on kirjattava mahdollisimman tarkasti. Kokeen aikana kuolleille ja sen loputtua elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiinavaus. Kaikki paljain silmin havaittavat patologiset muutokset on kirjattava. Kudosnäytteitä on otettava tarpeen mukaan histopatologisia tutkimuksia varten.

2

TULOKSET

Tulokset esitetään taulukon muodossa, josta näkyy kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä kokeen alussa, kunkin eläimen kuolinaika, niiden eläinten lukumäärä, joissa esiintyi muita myrkytysoireita, kuvaus myrkyvaikutuksista ja ruumiinavauslöydöksistä.

Kunkin eläimen paino on kirjattava ennen testattavan aineen antamista, viikottain sen jälkeen ja eläimen kuoltua. Painonmuutokset on laskettava ja kirjattava, jos eloonjäämisaika on vuorokautta pitempi. LD₅₀-arvo on laskettava jotakin hyväksyttyä menetelmää käyttäen.

Tulosten arvioinnissa on mainittava mahdollinen suhde eläimen testattavalle aineelle altistamisen ja kaikkien poikkeavuuksien esiintyvyyden ja voimakkuuden välillä, esim. poikkeava käyttäytyminen, kliiniset poikkeavuudet, paljain silmin havaittavat vammat, painonmuutokset, kuolleisuus ja muut myrkyvaikutukset.

3

RAPORTOINTI

3.1

Tutkimusseloste

Mikäli mahdollista, tutkimusselosteen tulee sisältää seuraavat tiedot:

- eläinlaji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.,
- koeolosuhteet (mm. ihonpuhdistusmenetelmä),
- annostasot (käytetty liuotin ja pitoisuus),
- taulukoidut vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaisesti (kuolevien eläinten määrä, myrkytysoireita osoittavien eläinten määrä, altistuneiden eläinten määrä),
- annoksen antamisen jälkeinen kuolinaika,
- eläinten tarkkailu,
- LD₅₀-arvo kummankin sukupuolen osalta määritettynä 14 päivän kuluttua (määritystapa mainittava),
- 95 %:n varmuusväli LD₅₀:lle (mikäli mahdollista)
- annos/kuolleisuuskäyrä ja jyrkkyys, mikäli käytetty määrittäminen antaa nämä tiedot,
- ruumiinavauslöydökset,
- mahdolliset histopatologiset löydökset,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2

Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohtanto, osa B (C).

4

LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohtanto, osa B (D).

B. 4. AKUUTTI MYRKYLLISYYS**IHON ÄRSYTYS****1 MENETELMÄ****1.1 Johdanto**

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmä

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Testattavaa ainetta levitetään yhtenä annoksena usean koe-eläimen ihoon. Kukin eläin toimii omana kontrollinaan. Tietyn ajan kuluttua ärsytysvaikutus arvioidaan, pisteytetään ja selostetaan, jotta saadaan kattava vaikutusarvio. Tarkkailuajan on oltava riittävän pitkä, että todettujen vaikutusten ohimenevyys voidaan tarkoin arvioida.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus**1.6.1 Testin valmistelu**

Noin vuorokautta ennen kokeen alkua eläinten selästä poistetaan karvapeite leikkaamalla tai ajelemalla.

Karvapeitettä poistettaessa on varottava vahingoittamasta ihoa. Vain terveihöisiä eläimiä käytetään kokeessa.

Kun testataan kiinteitä aineita (jotka voidaan tarvittaessa jauhaa), aine kostutetaan vedellä tai sopivalla liuottimella, jotta ihoon saadaan hyvä kosketus. Mikäli käytetään liuotinta, sen vaikutus testattavan aineen ihoon ärsytykseen on huomioitava. Testattavia nesteitä ei yleensä laimenneta.

Hyvin happamia tai alkaalisia aineita ei tarvitse testata ihoon ärsytysvaikutuksen toteamiseksi aineiden tiedossa olevien syövyttävien vaikutusten vuoksi. On tarpeetonta testata sellaisia aineita, jotka ihoon kautta annettuina ovat osoittautuneet hyvin myrkyllisiksi.

1.6.2 Koeolosuhteet**1.6.2.1 Koe-eläimet**

Useita nisäkäslajeja voidaan käyttää, mutta albiinokani on suositeltavin laji.

1.6.2.2 Eläinten lukumäärä

Kokeeseen käytetään vähintään kolmea tervettä täysikasvuista eläintä. Tulkinvaraisen vasteen selkeyttämiseksi voidaan tarvita lisää eläimiä.

1.6.2.3 Annostaso

Jollei kontraindikaatioita ole, testauskohtaan levitetään 0,5 ml nestettä tai 0,5 g kiinteätä tai puolijähmeää ainetta. Eri eläimistä koostuvaa kontrolliryhmää ei tarvita, koska kunkin eläimen testauskohdan viereinen ihoalue toimii kontrollina.

1.6.2.4 Tarkkailuaika

Tarkkailuajan pituutta ei ole tarkoin määrätty; sen on oltava niin pitkä, että todettujen vaikutusten ohimenevyys tai pysyvyys voidaan tarkoin arvioida, mutta se ei tavallisesti saa olla pidempi kuin 14 päivää.

1.6.3 Suoritustapa

Eläimet on säilytettävä yksittäishäkeissä. Testattavaa ainetta on levitettävä pienelle (noin 6 cm²) alueelle, joka peitetään sideharsolla ja kiinnitetään ärsyttämättömän teipin avulla. Nestettä tai tahdasta testattaessa aine voidaan levittää sideharsolle, joka asetetaan iholle. Harsosidos pidetään paikoillaan sidoksen avulla. Joissakin tapauksissa saattaa olla syytä käyttää sulkusidosta. Eläin ei saa päästä kosketuksiin koealueen kanssa ja syömään tai hengittämään testattavaa ainetta.

Altistamisaika on neljä tuntia. Jos voidaan odottaa aineen aiheuttavan vakavan ihoreaktion (esimerkiksi syöpymistä), altistamisaikaa lyhennetään (esimerkiksi yhteen tuntiin tai kolmeen minuuttiin).

Kun käytetään neljää tuntia lyhyempää altistamisaikaa ja vakava ihoreaktio todetaan, neljän tunnin mittaista altistusta ei tarvitse tehdä. Eräissä tapauksissa pitempi altistamisaika voi olla tarpeen, esimerkiksi aineen oletettu käyttötapa ja sille altistuminen ihmisillä. Altistamisajan päätyttyä jäljellä oleva aine on poistettava vedellä tai sopivalla liuottimella muuttamatta syntynyttä vastetta tai vahingoittamatta ihon pintakerrosta.

1.6.3.1 Tarkkailu ja pisteytys

Eläinten tarkkailussa kiinnitetään huomio ihon punoitukseen ja turvotukseen. Vaste on kirjattava 30–60 minuutin välein ja 24, 48 ja 78 tunnin kuluttua sidoksen poistamisesta. Ihon ärsytys pisteytetään ja kirjataan taulukossa 1 esitetyllä tavalla. Tarkkailua jatketaan tarvittaessa ohimenevyyden määrittämiseksi. Ärsytyksen lisäksi kaikki vakavat vammat kuten syöpyminen (pysyvä ihokudoksen tuhoutuminen) ja muut myrkkyyvaikutukset selostetaan tarkoin.

2 TULOKSET

Tulokset on esitettävä taulukon muodossa, josta näkyy kunkin eläimen ihon punoitus- ja turvotusärsytyspisteytys koko altistamisajalta. Vakavat vammat, selostus ärsytyksen vakavuusasteesta ja luonteesta, ohimenevyydestä tai syövyttävyydestä sekä kaikki muut todetut myrkkyyvaikutukset on kirjattava.

3 RAPORTOINTI

3.1 Tutkimusseloste

Mikäli mahdollista, tutkimusselosteen tulee sisältää seuraavat tiedot:

- eläinlaji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.,
- koeolosuhteet (mm. kemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ja ihon valmistelu- ja puhdistusmenetelmä),
- taulukko, jossa esitetään kunkin eläimen ärsytys-vastetiedot kunakin tarkkailuajankohtana (esim. 1, 24, 48 ja 72 tunnin jne. kuluttua sidoksen poistamisesta),
- selostus todetuista vakavista vammoista ja syövyttävyydestä,
- selostus havaitun ärsytyksen asteesta ja laadusta sekä mahdolliset kudoslöydökset,
- selostus muista kuin ihon ärsytykseen liittyvistä myrkyvaikutuksista,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohtanto, osa B (C).

4 LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohtanto, osa B (D).

Lisäys

TAULUKKO: IHOREAKTIOIDEN PISTEYTYS

Ihon punoitus ja ruven muodostus	
	Arvo
Ei punoitusta	0
Vähäinen punoitus (tuskin havaittava)	1
Selvä punoitus	2
Kohtalainen tai voimakas punoitus	3
Erittäin voimakas punoitus (tulipunainen), myös lievää ruven muodostusta (syviä vammoja)	4

Turvotus

Ei turvotusta	0
Vähäinen turvotus (tuskin havaittava)	1
Lievä turvotus (turvotusrajat selvästi koholla)	2
Kohtalainen turvotus (reunat koholla noin 1 mm)	3
Vaikea turvotus (koholla yli 1 mm ja alue altistettua aluetta suurempi)	4

B. 5. AKUUTTI MYRKYLLISYYS

SILMÄN ÄRSYTYS

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmä

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Testattavaa ainetta pannaan yhtenä annoksena usean koe-eläimen toiseen silmään; toinen silmä toimii kontrollina. Ärsytysvaikutus arvioidaan, pisteytetään ja selostetaan tietyin aikavälein, jotta saadaan kattava vaikutusarvio. Tarkkailuajan on oltava niin pitkä, että todettujen vaikutusten ohimenevyys tai pysyvyys voidaan tarkoin arvioida.

1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 *Testin valmistelu*

Noin vuorokautta ennen kokeen alkua kunkin eläimen silmät on tutkittava. Eläimiä, joilla esiintyy silmän ärsytystä tai sarveiskalvovaurioita, ei käytetä kokeessa.

Hyvin happamilla tai alkaalisilla aineilla sekä aineilla, jotka ihon ärsytys- tai muissa kokeissa ovat osoittautuneet selvästi syövyttäväksi, ei tarvitse tehdä silmän ärsytyskoetta.

1.6.2 *Koeolosuhteet*

1.6.2.1 Koe-eläimet

Vaikka useita koe-eläinlajeja on käytetty, terve täysikasvuinen albiinokani on suositeltavin koe-eläin.

1.6.2.2 Eläinten lukumäärä

Kokeeseen tarvitaan vähintään kolme koe-eläintä. Tulkinnanvaraisen vasteen selkeyttämiseksi eläimiä voidaan tarvita enemmän.

1.6.2.3 Annostaso

Nestettä testattaessa annos on 0,1 ml. Testattaessa kiinteitä aineita, tahtaita tai hiukkasia annoksen tilavuuden tulee olla 0,1 ml tai painon n. 0,1 g (paino on aina kirjattava). Jos testattava aine on kiinteää tai rakeista, se on jauhettava hienoksi pölyksi. Hiukkasia tiivistetään varovasti esim. mittalasia naputtamalla ennen tilavuuden mittaamista.

1.6.2.4 Tarkkailuaika

Tarkkailuajan pituutta ei ole tarkoin määrätty. Sen on oltava riittävän pitkä, että todettujen vaikutusten ohimenevyys tai pysyvyys voidaan tarkoin arvioida. Yleensä riittää 21 päivää annoksen antamisesta.

1.6.3 Testin suorittaminen

Eläimet on pidettävä yksittäishäkeissä. Testattavaa ainetta pannaan toisen silmän sidekalvolle, kun alaluomi on vedetty varovasti irti silmämunasta. Sitten luomet puristetaan hellävaraisesti yhteen noin sekunnin ajaksi, jotta ainetta ei mene hukkaan. Toinen silmä, jota ei testata, toimii kontrollina. Koe-eläinten silmiä ei huuhdella vuorokauden testattavan aineen asettamisen jälkeen. Vuorokauden kuluttua silmä voidaan huuhdella, mikäli se on tarpeen.

Mikäli aine osoittautuu ärsyttäväksi tässä testissä, voidaan harkita silmän huuhtelemista ärsytyksen ja muiden haittavaikutuksien vähentämiseksi. Tällöin on suositeltavaa, että kokeeseen käytetään kuutta kania. Neljä sekuntia testattavan aineen asettamisen jälkeen kolmen kanin silmä huuhdotaan, ja 30 sekunnin päästä aineen asettamisesta huuhtominen suoritetaan toiselle kolmen kanin ryhmälle. Silmiä huuhdotaan molemmissa ryhmissä viiden minuutin ajan. Huuhdottaessa on huolehdittava siitä, että käytetty vesimäärä ja virtausnopeus eivät vaurioita silmää.

1.6.3.1 Tarkkailu ja pisteytys

Silmät on tutkittava 1, 24, 48 ja 72 tunnin jälkeen. Jos ärsytystä ei esiinny 72 tunnin kuluttua, koe voidaan lopettaa.

Tarkkailun jatkaminen voi olla tarpeen vammojen kehittymisen ja niiden ohimenevyyden tai pysyvyyden määrittämiseksi, mikäli sarveiskalvon tai silmän ärsytys jatkuu. Sarveiskalvon, iiriksen ja sidekalvon tarkkailutulosten lisäksi kaikki muut todetut vammat kirjataan ja raportoidaan. Silmän reaktioiden pisteytys (taulukko) tulee tehdä jokaisen tarkastuksen yhteydessä. (Silmän vasteen pisteytyksessä käytetään useita tulkintoja. Apuneuvona testauslaboratoriot ja tarkastuksia suorittava ja tulkitseva henkilökunta voivat käyttää kuvitettua silmän ärsytystä käsittelevää opasta.)

Silmän reaktioiden tutkimisen helpottamiseksi voidaan käyttää binokulaariluppia, rakolamppua, biomikroskooppia ja muita sopivia laitteita. Kun 24 tunnin kuluessa tehdyt tarkastukset on kirjattu, yhden tai kaikkien kanien silmiä voidaan edelleen tutkia fluoreskiiniä käyttäen.

2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukon muodossa, josta näkyy kunkin eläimen ärsytyspisteytys kunakin tarkistajajankohdaksi. Ärsytyksen aste ja luonne, vakavien vammojen esiintyminen ja kaikki muut kuin silmään kohdistuvat myrkkyyvaikutukset on kirjattava.

3 RAPORTOINTI**3.1 Tutkimusseloste**

Mikäli mahdollista, tutkimusselosteen tulee sisältää seuraavat tiedot:

- eläinlaji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.,
- koeolosuhteet (mm. testattavan aineen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet),
- taulukko, jossa esitetään kunkin eläimen ärsytys/syövytystiedot kunakin tarkkailuajankohdaksi (esimerkiksi 1, 24, 48 ja 72 tunnin jälkeen),
- selostus todetuista vakavista vammoista,
- selostus havaitun ärsytyksen tai syövytyksen asteesta ja laadusta sekä ohimenevyydestä,
- selostus menetelmästä, jolla ärsytys on pisteytetty 1, 24, 48 ja 72 tunnin jälkeen (esimerkiksi rakolamppu, biomikroskooppi, fluoreskiini),
- selostus muista kuin silmää koskevista paikallisista vaikutuksista,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohdanto, osa B (C).

4 LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohdanto, osa B (D).

Lisäys

TAULUKKO: SILMÄVAMMOJEN PISTEYTYS

Sarveiskalvo

Samentuma: tiheysaste (pisteitys tiheimmästä kohdasta)

Ei haavautumia tai samentumia	0
Hajanaisia samentuma-alueita (paitsi normaalikirkkauden vähäinen himmeneminen), iiriksen yksityiskohdat selvästi näkyvissä	1
Helposti havaittava läpikuultava alue, iiriksen yksityiskohdat lievästi hämärtyneet	2
Helmiäismäinen alue, iiriksen yksityiskohdat eivät näy, pupillin koko vaivoin havaittavissa	3
Samentunut sarveiskalvo, iiris ei näy samentuman läpi	4

Iiris

Normaali	0
Selvästi syventyneet rypyt, verentungos, turvotus, lievä hyperemia tai verekyys sarveiskalvon ympärillä, jokin tai jotkut edellä mainituista, iiris reagoi vielä valoon (hidas reaktio on positiivinen)	1
Ei reaktiota valoon, verenvuoto, paljain silmin erottuva vaurio (mikä tahansa tai kaikki edellä olevista)	2

Sidekalvot

Punaisuus (koskee silmäluomien ja silmämunan sidekalvoja, sarveiskalvoa ja iiristä)

Verisuonet normaalit	0
Osa verisuonista selvästi hyperemisiä (verekkäitä)	1
Hajanainen kirkas punaisuus, yksittäiset verisuonet erottuvat huonosti	2
Hajanainen tumma punaisuus	3

Sidekalvon turvotus: luomet ja/tai räpytyskalvot

Ei turvotusta	0
Normaalia suurempi turvotus (myös räpytyskalvoissa)	1
Selvä turvotus, luomet osittain ulospäin kääntyneet	2
Turvotus, luomet puoleksi sulkeutuneet	3
Turvotus, luomet enemmän kuin puoleksi sulkeutuneet	4

B. 6. AKUUTTI MYRKYLLISYYS

IHON HERKISTYMINEN

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmä

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate/marsun maksimointitesti

Eläin altistetaan testattavalle aineelle ("induktiovaihe"), ja kaksi viikkoa viimeisestä altistamisesta tehdään "haastealtistus", jotta saadaan selville, onko herkistymistä tapahtunut. Herkistyminen määritetään vertaamalla ihoreaktiota ja haastealtistuskohdtaa.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 Testin valmistelu

Terveet nuoret (alle vuoden vanhat) eläimet jaetaan sattumanvaraisesti altistamis- ja kontrolliryhmiin. Ennen annoksen antamisesta poistetaan karvapeite lapojen alueelta leikkaamalla tai ajelemalla. On varottava vaurioittamasta ihoa.

1.6.2 Koeolosuhteet

1.6.2.1 Koe-eläimet

Albiinomarsua käytetään koe-eläimenä.

1.6.2.2 Eläinten lukumäärä

Uros- ja/tai naaraspuolisia marsuja voidaan käyttää. Mikäli naaraita käytetään, ne eivät saa olla synnyttäneitä tai tiineitä. Altistamisryhmään tarvitaan 20 eläintä ja kontrolliryhmään vähintään 10. Pienemmän eläinmäärän käyttö on perusteltava.

1.6.2.3 Annostasot

Testattavan aineen pitoisuus vahvistetaan kunkin induktioasteen korkeimmalle siedetylle tasolle. Haastetestissä aineen pitoisuuden on oltava sellainen, ettei se aiheuta merkkejä ihon ärsytyksestä herkistämättömillä eläimillä. Pitoisuus voidaan määrittää pienimuotoisella (2—3 eläintä) esitutkimuksella.

1.6.2.4 Tarkkailuaika

Induktioaikana iho tarkastetaan mahdollisten ärsytysvaikutusten toteamiseksi. Haastealtistuksen päätyttyä ihoreaktiot kirjataan 48 ja 72 tunnin kuluttua.

1.6.3 Testin suorittaminen

Eläimet punnitaan ennen kokeen alkua ja sen loputtua. Karvapeite poistetaan lapojen alueelta. Kokeessa on kaksi vaihetta.

1.6.3.1 Induktio

Päivä 0 — testiryhmä

Lapojen alueelle annetaan ihonalaiset ruiskeet pareittain siten, että ruiskeparit ovat keskiviivan molemmin puolin:

1. 0,1 ml FCA:ta (Freunds Complete Adjuvant);
2. 0,1 ml testattavaa ainetta, tarvittaessa liuoksena;
3. 0,1 ml testattavaa ainetta FCA:ssa.

Ruiskeet 1 ja 2 annetaan lähelle toisiaan päänpuoleiseen ja ruiske 3 hännänpuoleiseen osaan.

Päivä 0 — kontrolliryhmä

Alla olevat ruiskeet annetaan pareittain samoihin kohtiin kuin yllä.

1. 0,1 ml FCA:ta;
2. 0,1 ml pelkkää liuotinta;
3. 0,1 ml liuotinta FCA:ssa.

Päivä 7 — testiryhmä

Testialue puhdistetaan jälleen karvoista. Testattavat aineet liuoksena (testattavat nesteet sellaisenaan) levitetään suodatinpaperille, joka pidetään kosketuksessa testikohtaan sopivan siteen avulla kaksi vuorokautta.

Päivä 7 — kontrolliryhmä

Testialue puhdistetaan jälleen karvoista. Pelkkää liuotinta pidetään kosketuksessa testikohtaan yllä kuvatulla tavalla sopivan siteen avulla kaksi vuorokautta.

1.6.3.2 Haaste

Päivä 21

Testiryhmän ja kontrolliryhmän eläinten kyljistä poistetaan karvapeite. Testattavaa ainetta sisältävä lappu tai testikupu kiinnitetään testiryhmän eläinten vasempaan kylkeen ja pelkkää liuotinta sisältävä lappu tai testikupu oikeaan kylkeen. Lappu pidetään paikoillaan sopivan siteen avulla 24 tuntia.

Kontrolliryhmä altistetaan samalla tavoin.

Päivä 23 ja 24

- 21 tuntia lapun poistamisen jälkeen haastealue puhdistetaan ja ajellaan tarvittaessa,
- kolmen tunnin kuluttua (48 tuntia haastealtistamisen alkamisesta) ihoreaktio määritetään ja kirjataan,
- 24 tunnin kuluttua edellisestä määräyksestä (72 tuntia haastealtistamisen alkamisesta) suoritetaan toinen määrittäminen ja sen tulokset kirjataan.

Ensimmäisen haastetestin tulosten selvittämiseksi voidaan tarvittaessa tehdä toinen haastetesti uudella liuotinkontrolliryhmällä viikon kuluttua ensimmäisestä.

1.6.3.3 Tarkkailu ja pisteytys

Kaikki induktiosta ja haastetesteistä johtuneet ihoreaktiot ja havaitut muut poikkeavuudet kirjataan ja raportoidaan.

2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukkona, josta näkyvät kunkin eläimen ihoreaktiot jokaisen tarkkailukerran osalta.

3 RAPORTOINTI

3.1 Tutkimusseloste

Mikäli mahdollista, tutkimusselosteen tulee sisältää seuraavat tiedot:

- marsukanta,
- koeolosuhteet,
- koe-eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,
- kunkin eläimen paino kokeen alussa ja lopussa,
- kustakin eläimestä tehdyt huomiot ja mahdollinen pisteytys,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohdanto, osa B (C).

4 LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohdanto, osa B (D).

Huomautuksia

Marsun maksimointitesti (Guinea-Pig Maximization Test GPMT) on yleisesti käytetty adjuvantti-tyyppinen testi. Vaikka useita muitakin lisäyksessä mainittuja menetelmiä voidaan käyttää määrittämään, aiheuttaako jokin tietty aine ihon herkistymisreaktion, GPMT on suositeltavin menetelmä. Sen herkkyys ja kyky kartoittaa mahdolliset ihoa herkistävät aineet ihmisillä on tärkeä laadittaessa kansanterveydellistä myrkkyluokitusjärjestelmää. Mikäli jotakin vaihtoehtoista testiä käytetään, sen laatuksien tulee olla vastaavan tason. Eräs kriteeri on odotettu vaste yleisiin herkistymistä aiheuttaviin aineisiin, kuten 2,4-dinitroklooribentseeniin tai p-fenyleenidiamiiniin tai johonkin muuhun testattavaan aineluokkaan sopivaan voimakkaaseen herkistajaan.

Ei ole olemassa yksittäistä testausmenetelmää, jolla voitaisiin kartoittaa kaikki ihoa herkistävät aineet ihmisillä, ja joka sopisi kaikkien aineiden testaukseen.

Aineen fysikaaliset ominaisuudet, mm. sen kyky tunkeutua ihon läpi ja tapa, jolla ihmiset joutuvat sen kanssa kosketuksiin, on otettava huomioon testausmenetelmää valittaessa. Testit, joissa käytetään marsuja, voidaan jakaa adjuvanttityyppisiin testeihin, joissa allerginen tila todetaan liuottamalla tai sekoittamalla testattava aine FCA:han (Freunds Complete Adjuvant), sekä muihin kuin adjuvanttitesteihin. Eräissä tapauksissa on syytä valita testaus tapa, jossa aine sivellään testauskohtaan marsun maksimointitestissä käytetyn ihonalaisen ruiskeen asemesta. Testattavan aineen fysikaaliset ominaisuudet sekä väestön oletetut altistumisolosuhteet vaikuttavat valintaan.

Riippumatta siitä, mitä menetelmää käytetään, ihon herkistymiskokeissa käytetyn marsukannan herkkyys on tarkistettava säännöllisin väliajoin (6 kuukautta) käyttämällä tunnettuja voimakkaita ja lieviä herkistäjiä, joilla on saatava riittävä määrä positiivia reaktioita.

Lisäys

Testi	Draize	Freundin täydellinen adjuvantti (FCA)	Maurin optimointi	Buehler	Avoin epiku- taanitesti	Jaettu adjuvantti
<i>Laji</i>	marsu	marsu	marsu	marsu	marsu	marsu
<i>Antotapa</i>	id	id	id	iholle (ec)	iholle (ec)	id ja ec
<i>Eläinten määrä testiryhmässä</i>	20	8-10	10-10	10-20	6-8	10-20
<i>Testiryhmien lukumäärä</i>	1	1	1	1	korkeintaan 6	1
<i>Eläinten määrä kontrolliryhmässä</i>	20	8-10	10-10	10-20	6-8	10-20
<i>Induktioaltistustapa</i>	id	id	id	ihoon	ihoon	ihoon ja id
Altistamiskerrat	10	5	9	3	20-21	4
Altistamisaika	-	-	24 h	6 h kerta	jatkuva	48 h kerta
Sidostyyppi	-	-	-	sulkusidos	avosidos	sulkusidos
Testiryhmä/ryhmät	TA ⁽¹⁾	TA FCA:ssa	TA FCA:ssa	TA	TA	TA
Kontrolliryhmä	-	vain FCA:ta	-	-	vain liuotinta	-
Paikka	vasen kylki	oikea kylki	taka	vasen kylki	oikea kylki	lapa
Altistustiheys	joka 2. päivä	joka 2. päivä	joka 2. päivä	joka 7. päivä	päivittäin	0, 2, 4, 7 päivää
Kesto	0-18 päivää	0-8 päivää	0-21 päivää	0-14 päivää	0-20 päivää	0-7 päivää
Pitoisuus	2-10 kertaa 1. pitoisuus	sama koko ajan	0,1 ml 0,1 pro- senttisesta	sama koko ajan	sama ryhmää kohden, ero ryhmien välillä	sama koko ajan
<i>Haastealtistus</i>						
<i>Antotapa</i>	id	ihoon	id	ihoon	ihoon	ihoon
Altistamiskerrat	1	2	2	1	2	1
Päivä/päivät	35	22 ja 35	14 ja 28	28	21 ja 35	20
Altistamisaika	-	-	24 h	6 h	-	24 h
Sidostyyppi	-	avosidos	-	sulkusidos	avosidos	sulkusidos
Testiryhmä/ryhmät	TA	TA	TA	TA	TA	TA
Kontrolliryhmä	TA	TA	TA	TA	TA	TA
Paikka	oikea kylki	vasen kylki	selkä, toinen kohta	oikea kylki	vasen kylki	lapa
Pitoisuus	kuten alussa	4 erilaista	0,1 ml 0,1 pro- senttista	sama kuin in- duktiossa	4 erilaista	puoli-induktio
Arviointi (tuntia haasteen jälkeen)	24, 48	23, 48, 72	24	24, 48	24, 48 ja/tai 72	24, 48

⁽¹⁾ TA = testattava aine

B. 7. SUBAKUUTTI MYRKYLLISYYS (ORAALINEN)**1 MENETELMÄ****1.1 Johdanto**

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmät

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Testattavaa ainetta annetaan suun kautta ruokintaletkun avulla asteittain suurenevinä annoksina useille koe-eläinryhmille 28 päivän aikana, niin että kukin ryhmä saa erisuuruisen annoksen. Testin aikana eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkyvaikutusten toteamiseksi. Testin kuluessa kuolleille eläimille ja sen päättymisen jälkeen vielä elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiinavaus.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus**1.6.1 Testin valmistelu**

Eläimet siirretään koetiloihin, ja testin aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen testin alkua. Nuoret, terveet eläimet randomisoidaan ja jaetaan koeryhmiin. Testattavia aineita voidaan antaa ruoan mukana, ruokintaletkulla, kapselina tai juomavedessä. Samaa antotapaa tulee käyttää kaikille koe-eläimille koko koeajan. Mikäli liuotinta tai muita lisäaineita käytetään annostelun helpottamiseksi, niiden myrkyttömyys täytyy olla tiedossa esimerkiksi aikaisempien tutkimustulosten perusteella.

1.6.2 Koeolosuhteet**1.6.2.1 Koe-eläimet**

Rotta on suositeltavin laji, jollei se ole kontraindikoitu. Koe-eläimiksi valitaan yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä rottia, ja annostus tulisi aloittaa, ennen kuin rotat ovat kuuden viikon ikäisiä, kuitenkin viimeistään kun ne ovat kahdeksan viikon ikäisinä. Testin alkaessa eläinten paino saa vaihdella korkeintaan $\pm 20\%$ keskiarvosta.

1.6.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin annostasoa varten tarvitaan vähintään 10 eläintä (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraiden tulee olla synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineenä. Mikäli eläimiä lopetetaan tutkimuksen kuluessa, eläinmäärään tulee lisätä lopetetaviksi aiottujen eläinten määrä. Lisäksi voidaan muodostaa 10 eläimen satelliittiryhmä (viisi eläintä kumpaakin sukupuolta), jolle annetaan suurin annos 28 päivän aikana ja jota tarkkaillaan 14 päivän ajan testin loputtua myrkkyyvaikutusten ohimenevyyden, pysyvyyden tai viivästyneen esiintymisen toteamiseksi.

1.6.2.3 Annostasot

Testissä käytetään vähintään kolmea annostasoa ja kontrolliryhmää, jolle ei anneta testattavaa ainetta, mutta jota käsitellään muuten aivan samoin kuin testiryhmän eläimiä. Mikäli liuotinta käytetään annostelun helpottamiseksi, kontrollieläimille annostellaan liuotinta samalla tavoin kuin testiryhmille, ja sen määrä on sama kuin suurimman annoksen saavalle testiryhmälle annettu. Suurimman annoksen tulisi aiheuttaa myrkytysoireita mutta ei lainkaan tai hyvin vähän kuolemantapauksia. Pienimmällä annoksella ei tulisi olla myrkkyyvaikutusta. Mikäli ihmisten altistumisesta on tietoja, pienimmän testiannoksen tulee olla tätä suurempi. Keskimmäisen annoskoon tulisi aiheuttaa pienimmät havaittavissa olevat myrkkyyvaikutukset. Käytettäessä useampia väliannostusasteita annostustasot tulee porrastaa niin, että myrkkyyvaikutukset lisääntyvät asteittain. Pienimmän ja keskisuuren annoksen saavissa ryhmissä sekä kontrolliryhmässä kuolemantapausten luvun tulee olla pieni, jotta tuloksia voidaan arvioida tarkoituksenmukaisesti.

Kun testattava aine annetaan ruoan mukana, voidaan käyttää pysyvää pitoisuutta ruoassa (ppm tai mg/kg ruokaa) tai pysyvää annostasoa suhteessa eläimen ruumiinpainoon. On mainittava, kumpaa tapaa käytetään. Kun aine annetaan letkuruokintana, annos annetaan samaan aikaan joka päivä, ja annosta säädetään määräjain (viikottain tai joka toinen viikko), jotta annostaso pysyy muuttumattomana suhteessa eläimen painoon.

1.6.2.4 Rajatesti

Jos 28 päivää kestävä, alla selostetulla menetelmällä 1000 mg/kg ruumiinpaino/päivä tai ihmisten altistumiseen perustuvalla suuremmalla annoksella tehdyn tutkimuksen tuloksena ei synny myrkkyyvaikutuksia, tutkimusta ei tarvitse jatkaa. Tutkittaessa lievästi myrkyllisiä aineita on syytä varmistua siitä, että ruoan seassa annettuna testattavat ainemäärät ja niiden ominaisuudet eivät vaikuta eläimen ravinnon hyväksikäyttöön.

1.6.2.5 Tarkkailuaika

Eläimiä tarkkaillaan päivittäin ja kaikki myrkytysoireet, niiden alkamisaika, voimakkuus ja kesto kirjataan. Kuolinaika ja myrkkyyvaikutusten alkamis- ja loppumisaika kirjataan.

1.6.3 Testin suorittaminen

Eläimille annetaan testattavaa ainetta viikon jokaisena päivänä 28 päivän ajan. Mikäli tutkimukseen kuuluu seurantatarkkailuun tarkoitettu satelliittiryhmä, sitä tarkkaillaan 14 päivän ajan tutkimuksen jälkeen myrkkyyvaikutusten ohimenevyyden tai pysyvyyden toteamiseksi.

Eläinten tarkkailussa on kiinnitettävä huomiota muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa ja käyttäytymistavassa. Ruoankulutus mitataan viikottain (ja vedenkulutus, kun testattava aine annetaan juomavedessä) ja eläimet punnitaan viikottain.

Tarkkailu on suoritettava säännöllisesti, jotta koe-eläimiä ei menetettäisi kannibalismien, kudosten autolyysin tai virheellisen sijoituksen vuoksi. Tutkimuksen päätyttyä eloonjääneille eläimille satelliittiryhmää lukuun ottamatta suoritetaan ruumiinavaus. Kuolemaisillaan olevat eläimet poistetaan välittömästi, ja niille suoritetaan ruumiinavaus.

Seuraavat tutkimukset tehdään testin päätyttyä kaikille testiryhmien ja kontrolliryhmän eläimille:

1. hematologinen tutkimus, jossa mitataan hematokriitti, hemoglobiini, erytrosyyttien määrä, leukosyyttien määrä ja erittely sekä joitakin hyötymisominaisuuksia;
2. veren kliininen biokemiallinen tutkimus sekä vähintään yksi maksan ja munuaisten toiminnan parametri, alaniiniaminotransferaasi (aikaisemmin glutamiinipyruviinitransaminaasi) ja seerumin aspartaattiaminotransferaasi (aikaisemmin glutamiinioksalosetaattitransaminaasi), virtsan typpi, albumiini, veren kreatiniini, kokonaisbilirubiini ja seerumin kokonaisproteiini.

Muita myrkyllisyysarviointiin mahdollisesti tarvittavia määrittäviä ovat kalsium-, fosfori-, kloridi-, natrium- ja kalium-mittaukset, glukoosin paastoarvo, lipidianalyysi, hormonit, happo/emästasapaino, methemoglobiini ja kolinesteraasi.

Kliinistä biokemiaa voidaan tarpeen mukaan käyttää todettujen vaikutusten laajempaan tutkimiseen.

1.6.3.1 Ruumiinavaus

Kaikille koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus, jossa todetaan paljain silmin havaittavat patologiset muutokset. Maksa, munuaiset, lisämunuaiset ja kivekset punnitaan märkinä mahdollisimman pian irrottamisen jälkeen, jotta ne eivät pääse kuivumaan. Elimet ja kudokset (maksa, munuaiset, haima, lisämunuaiset ja sydän sekä elimet, joissa on näkyviä vammoja tai joiden koko on muuttunut) säilytetään sopivassa aineessa mahdollista myöhempää histopatologista tutkimusta varten.

1.6.3.2 Histopatologinen tutkimus

Suurimman annoksen saaneesta ryhmästä sekä kontrolliryhmästä otetut elin- ja kudokset tutkitaan.

Alemmista ryhmistä tutkitaan ne elimet ja kudokset, joista suurimman annoksen saaneessa ryhmässä löytyi testattavasta aineesta johtuvia vaurioita. Seurantaryhmän, satelliittiryhmän, eläimille tehdään histologinen tutkimus, ja huomiota kiinnitetään erityisesti niihin elimiin ja kudoksiin, joissa muiden ryhmien eläimillä oli muutoksia.

2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukon muodossa, josta näkyy kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa ja eläinten määrä kutakin vammaa kohden.

Kaikki tulokset arvioidaan jotakin tilastollista menetelmää käyttäen. Kaikkia tunnettuja tilastointimenetelmiä voidaan käyttää.

3 RAPORTOINTI**3.1 Tutkimuseloste**

Mikäli mahdollista, tutkimuselosteen tulee sisältää seuraavat tiedot:

- eläinlaji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.,
- koeolosuhteet,
- annostasot (käytetty liuotin) ja pitoisuudet,
- myrkyvaikutukset sukupuolen ja annostason perusteella,
- taso, jolla ei esiinny vaikutuksia,
- eläinten kuolinaika tutkimuksen kuluessa ja eloonjääneet,
- myrky- ja muut vaikutukset,
- kunkin oireen toteamisaika ja sitä seuraavat toimenpiteet,
- ruokintaa ja painoa koskevat tiedot,
- hematologiset testit ja kaikki tulokset,
- kliiniset biokemialliset testit ja kaikki tulokset,
- ruumiinavauslöydökset,
- tarkka kuvaus kaikista histopatologisista löydöksistä,
- tulosten tilastointitapa,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohdanto, osa B (C).

4 LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohdanto, osa B (D).

B. 8. SUBAKUUTTI MYRKYLLISYYS (INHALAATIO)

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmät

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Useita koe-eläinryhmiä altistetaan päivittäin tietyn pituisen ajan testattavalle aineelle asteittain suurenevinä annoksina 28 päivän ajan, niin että kukin ryhmä saa erisuuruisen annoksen. Mikäli liuotinta käytetään sopivan ilmaseospitoisuuden aikaansaamiseksi, on perustettava liuotinkontrolliryhmä. Testin aikana eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkkyyvaikutusten toteamiseksi. Testin aikana kuolleille eläimille ja sen päättymisen jälkeen vielä elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiina-vaus.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 Testin valmistelu

Eläimet siirretään koetiloihin, ja testin aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen testin alkua. Nuoret, terveet eläimet randomisoidaan ja jaetaan koeryhmiin. Testattaviin aineisiin voidaan tarpeen mukaan lisätä liuotinta, jotta saadaan halutun pitoisen ilmaseos. Mikäli liuotinta tai muita lisäaineita käytetään annostelun helpottamiseksi, niiden myrkyttömyys täytyy olla tiedossa esimerkiksi aikaisempien tutkimustulosten perusteella.

1.6.2 Koeolosuhteet

1.6.2.1 Koe-eläimet

Rotta on suositeltavin laji, jollei se ole kontraindikoitu. Koe-eläimiksi valitaan yleisesti käytettyä laboratorioskantaa olevia nuoria terveitä rottia.

Testin alkaessa eläinten paino saa vaihdella korkeintaan $\pm 20\%$ tavanomaisesta keskiarvosta.

1.6.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Kuhunkin ryhmään tarvitaan vähintään 10 eläintä (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraiden tulee olla synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineenä. Mikäli eläimiä lopetetaan tutkimuksen kuluessa, eläinmäärään tulee lisätä lopettaviksi aiottujen eläinten määrä. Lisäksi voidaan muodostaa 10 eläimen satelliittiryhmä (viisi eläintä kumpaakin sukupuolta),

jolle annetaan suurin annos 28 päivän aikana ja jota tarkkaillaan 14 päivän ajan testin loputtua myrkkyyvaikutusten ohimenevyyden, pysyvyyden tai viivästyneen esiintymisen toteamiseksi.

1.6.2.3 Altistamispitoisuudet

Altistamispitoisuuksia tulee olla vähintään kolme sekä kontrolliryhmä tai liuotinkontrolliryhmä (jolle annostellaan liuotinta suurimman annoksen liuotinmäärän verran). Kontrolliryhmän eläimiä käsitellään aivan samoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi että niille ei anneta testattavaa ainetta. Suurimman pitoisuuden tulisi aiheuttaa myrkytysoireita, mutta ei lainkaan tai hyvin vähän kuolemantapauksia. Pienimmällä pitoisuudella ei tulisi olla myrkkyyvaikutusta. Mikäli ihmisten altistumistasosta on tietoja, pienimmän testipitoisuuden tulee olla tätä suurempi. Keskimäinen pitoisuus tulee säätää sellaiseksi, että se aiheuttaa vähäisimmät havaittavissa olevat myrkkyyvaikutukset. Käytettäessä useampia välipitoisuuksia ne tulee porrastaa niin, että myrkkyyvaikutukset lisääntyvät asteittain. Pienimmälle ja keskisuurelle pitoisuudelle altistetuissa ryhmissä sekä kontrolliryhmässä kuolemantausten luvun tulee olla pieni, jotta tuloksista voidaan tehdä luotettava arviointi.

1.6.2.4 Altistusaika

Päivittäinen altistusaika on kuusi tuntia, mutta erikoistapauksissa ajan pituus voi vaihdella.

1.6.2.5 Laitteet

Eläinten testauksiin käytetään inhalaatiolaitetta, jonka dynaamisessa ilmavirrassa ilma vaihtuu vähintään 12 kertaa tunnissa, jotta hapen ja tasaisesti jakautuneen altistusaineen saanti voidaan varmistaa. Mikäli käytetään kammiota, sen tulee olla suunniteltu siten, että koe-eläimet voidaan sijoittaa mahdollisimman väljästi, ja että ne joutuvat hengittämään mahdollisimman tehokkaasti testattavaa ainetta. Yleissääntönä kammion ilman pitämiseksi vakaana on, että koe-eläinten "tilavuus" on korkeintaan 5 % kammion tilavuudesta. Eläimen sieraimet ja suu, yksinomaan pää tai koko ruumis voidaan altistaa kammiossa; kaksi ensinmainittua tapaa vähentävät testattavan aineen imeytymistä muulla tavoin.

1.6.2.6 Tarkkailuaika

Eläimiä tarkkaillaan päivittäin testin ja toipumisen aikana myrkytysoireiden toteamiseksi. Kuolinaika ja myrkyvaikutusten alkamis- ja loppumisaika kirjataan.

1.6.3 Testin suorittaminen

Eläimet altistetaan testattavalle aineelle päivittäin viidestä seitsemään päivänä viikossa 28 päivän ajan. Mikäli tutkimukseen kuuluu seurantatarkkailuun tarkoitettu satelliittiryhmä, sitä tarkkaillaan vielä 14 päivän ajan altistamisen jälkeen myrkyvaikutusten ohimenevyyden tai pysyvyyden toteamiseksi. Testilämpötilan tulee olla 22 ± 3 °C. Suositeltavin suhteellinen kosteus on 30–70 %, mutta tietyissä tapauksissa (esim. aerosolitesteissä) tämä ei ole mahdollista käytännössä. Altistamisen aikana ei anneta ruokaa eikä vettä.

Testissä tulee käyttää dynaamista inhalointimenetelmää, jossa on analyttinen pitoisuuden valvontajärjestelmä. Esitestaus on suositeltavaa tarvittavien altistamispitoisuuksien määrittämiseksi. Ilman virtaus säädetään siten, että olosuhteet ovat samat altistamiskammion joka kohdassa. Vakaisiin altistamisolosuhteisiin on päästävä mahdollisimman lyhyessä ajassa.

Seuraavat mittaukset tai tarkkailutoimenpiteet tulee suorittaa:

- a) Ilmavirran nopeus (jatkuva tarkkailu).
- b) Testattavan aineen todellinen hengityskohdassa mitattu pitoisuus. Päivittäisen altistuksen aikana pitoisuuden vaihtelu saa olla korkeintaan $\pm 15\%$ keskiarvosta. Testattaessa pölyjä ja aerosoleja tämän tason saavuttaminen voi olla vaikeaa, ja tällöin voidaan hyväksyä suurempi poikkeama. Päivittäisten pitoisuuksien tulisi pysyä mahdollisimman vakaina koko tutkimusajan. Hiukkas- ja aerosolitestauksissa hiukkasten koko on mitattava tarvittaessa hiukkasten koon jakautuman selvittämiseksi.
- c) Lämpötila ja kosteus.
- d) Altistamisen aikana ja sen jälkeen eläimiä tarkkaillaan, ja huomiot kirjataan järjestelmällisesti. Jokaisesta eläimestä pidetään erikseen kirjaa. Eläimiä tarkkaillaan päivittäin ja kaikki myrkytysoireet, niiden alkamisaika, voimakkuus ja kesto kirjataan. Eläimiä tarkkaillaessa on kiinnitettävä huomiota muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa ja käyttäytymistavassa. Eläimet punnitaan, viikottain ja on suositeltavaa mitata myös viikottainen ruoankulutus. Tarkkailu on suoritettava säännöllisesti, jotta koe-eläimiä ei menetettäisi kannibalismien, kudosten autolyysin tai virheellisen sijoituksen vuoksi. Tutkimuksen päätyttyä eloonjääneille eläimille satelliittiryhmää lukuun ottamatta suoritetaan ruumiinavaus. Kuolevat eläimet poistetaan, ja niille suoritetaan ruumiinavaus.

Seuraavat tutkimukset tehdään testin päätyttyä kaikille eläimille, mukaan lukien kontrolliryhmän eläimet:

- i) hematologinen tutkimus, jossa mitataan hematokriitti, hemoglobiini, erytrosyyttien määrä, leukosyyttien määrä ja erittely sekä joitakin hyötymisominaisuuksia;
- ii) veren kliininen biokemiallinen tutkimus sekä vähintään yksi maksan ja munuaisten toiminnan parametri, alaniiniaminotransferaasi (aikaisemmin glutamiinipyruviinitransaminaasi) ja seerumin aspartaattiaminotransferaasi (aikaisemmin glutamiinioksalosetaattitransaminaasi), virtsan typpi, albumiini, veren kreatiniini, kokonaisbilirubiini ja seerumin kokonaisproteiini. Muita myrkyllisyysarviointiin mahdollisesti tarvittavia määrittäviä ovat kalsium-, fosfori-, kloridi-, natrium- ja kalium-mittaukset, glukoosin paastoarvo, lipidianalyysi, hormonit, happo/emästasapaino, methe-moglobiini ja kolinesterasi. Kliinistä biokemiaa voidaan tarpeen mukaan käyttää todettujen vaikutusten laajempaan tutkimiseen.

1.6.3.1 Ruumiinavaus

Kaikille koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus, jossa todetaan paljain silmin havaittavat patologiset muutokset. Maksa, munuaiset, lisämunuaiset ja kivekset punnitaan märkinä mahdollisimman pian irrottamisen jälkeen, jotta ne eivät pääse kuivumaan. Elimet ja kudokset (hengitystiehyet, maksa, munuaiset, haima, lisämunuaiset ja sydän sekä elimet, joissa on näkyviä vammoja tai joiden koko on muuttunut) säilötään mahdollista myöhempää histopatologista tutkimusta varten. Nenänielu ja keuhkot poistetaan kokonaisina, punnitaan ja käsitellään fiksatiivilla, jotta keuhkojen rakenne säilyy. Fiksatiiviperfuusio on tehokas menettelytapa.

1.6.3.2 Histopatologinen tutkimus

Suurimman annoksen saaneesta ryhmästä sekä kontrolliryhmästä/ryhmistä otetut elin- ja kudospäytteet tutkitaan. Alemmista ryhmistä tutkitaan ne elimet ja kudokset, joista suurimman annoksen saaneesta ryhmästä löytyi testattavasta aineesta johtuvia vaurioita. Satelliittiryhmän eläimille tehdään histologinen tutkimus, ja huomiota kiinnitetään erityisesti niihin elimiin ja kudoksiin, joissa muiden ryhmien eläimillä oli vaurioita.

2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukon muodossa, josta näkyy kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa ja luettelo erilaisista vammoista sekä eläinten lukumäärä kunkin vamman osalta. Kaikki tulokset on arvioitava jotakin tilastollista menetelmää käyttäen. Kaikkia tunnettuja tilastointimenetelmiä voidaan käyttää.

3 RAPORTOINTI

3.1 Tutkimuseloste

Mikäli mahdollista, tutkimuselosteen tulee sisältää seuraavat tiedot:

— eläinlaji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.,

— koeolosuhteet:

Altistamislaitteen kuvaus; merkki, tyyppi, mitat, ilmanlähte, hiukkasten ja aerosolien tuottamistapa, ilmastointitapa, poistoilman käsittelytapa ja eläinten sijainti koekammiossa altistamisen aikana. Lämpötilan, kosteuden, hiukkasten koon ja aerosolin pitoisuuden mittaustapa on mainittava.

Altistamistiedot:

Altistamistiedot laaditaan taulukon muotoon, jossa esitetään keskiarvo ja, poikkeamat (esim. keskihajonta) ja mikäli mahdollista, seuraavat tiedot:

- a) ilmavirran nopeus inhalaattorilaitteessa,
- b) ilman lämpötila ja kosteus,
- c) nimellispitoisuudet (inhalaattorilaitteeseen asetetun testattavan aineen kokonaismäärä jaettuna ilman tilavuudella),
- d) käytetty liuotin,
- e) todelliset pitoisuudet hengitysalueella,
- f) hiukkasten keskikoko,

— myrkyvaikutukset sukupuolen ja pitoisuustason perusteella,

— eläinten kuoloinaika tutkimuksen kuluessa ja eloonjääneet,

— myrky- ja muut vaikutukset, oireeton taso,

— kunkin oireen toteamisaika ja sitä seuraavat toimenpiteet,

— ruokintaa ja painoa koskevat tiedot,

— hematologiset testit ja niiden tulokset,

- kliiniset biokemialliset testit ja niiden tulokset,
- ruumiinavauslöydökset,
- tarkka kuvaus kaikista histopatologisista löydöksistä,
- tulosten tilastointimenetelmä,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2

Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohdanto, osa B (C).

4

LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohdanto, osa B (D).

B. 9. SUBAKUUTTI MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA)**1 MENETELMÄ****1.1 Johdanto**

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmä

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Testattavaa ainetta pannaan päivittäin 28 päivän ajan useisiin ryhmiin jaettujen koe-eläinten ihoon eri pitoisuuksina, yksi pitoisuus kullekin ryhmälle. Tutkimuksen kuluessa eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkyvaikutusten toteamiseksi. Testin aikana kuolleille eläimille ja sen loputtua elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiinavaus.

1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus**1.6.1 Testin valmistelu**

Eläimet siirretään koetiloihin, ja testin aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen testin alkua. Nuoret, terveet aikuiset eläimet randomisoidaan ja jaetaan koeryhmiin. Juuri ennen testin alkua eläinten selästä poistetaan karvapeite leikkaamalla. Karvapeite voidaan myös ajella, mutta se on tehtävä noin vuorokautta ennen testin alkua. Karvapeitettä poistettaessa on varottava vahingoittamasta ihoa. Vähintään 10 % ruumiin pinnasta tulee olla ajeltuna, jotta siihen voidaan panna testattavaa ainetta. Koalueen suuruus ja peitesiteen mitat riippuvat eläimen painosta. Kun testataan kiinteitä aineita, jotka voidaan tarvittaessa jauhaa, aine kostutetaan vedellä tai sopivalla liuottimella, jotta ihoon saadaan hyvä kosketus. Testattavia nesteitä ei yleensä laimenneta. Päivittäinen altistus tehdään 5—7 kertaa viikossa.

1.6.2 Koeolosuhteet**1.6.2.1 Koe-eläimet**

Täysikasvuisia rottia, kaneja tai marsuja voidaan käyttää. Muitakin lajeja voidaan käyttää, mutta niiden käyttö on perusteltava. Tutkimuksen alkaessa koe-eläinten paino saa vaihdella korkeintaan $\pm 20\%$ keskiarvosta.

1.6.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin annostasoa varten tarvitaan vähintään 10 tervehoista eläintä (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraiden tulee olla synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineenä. Mikäli tutkimussuunnitelma edellyttää eläinten lopettamista tutkimuksen kuluessa, eläinmäärään tulee lisätä lopetettaviksi aiottujen eläinten määrä. Lisäksi voidaan muodostaa 10 eläimen satelliittiryhmä (viisi eläintä kumpaakin sukupuolta), jolle annetaan suurin annos 28 päivän ajan ja jota tarkkaillaan 14 päivän ajan testin loputtua myrkyvaikutusten ohimenevyyden, pysyvyyden tai viivästyneen esiintymisen toteamiseksi.

1.6.2.3 Annostasot

Testissä käytetään vähintään kolmea annostasoa ja kontrolliryhmää tai liuotekontrolliryhmää, mikäli liuotetta käytetään. Päivittäinen altistus aika on vähintään kuusi tuntia. Eläimet altistetaan testattavalle aineelle samaan aikaan joka päivä, ja annosta säädetään määrääjain (viikottain tai joka toinen viikko), jotta annostaso pysy muuttumattomana suhteessa eläimen painoon. Kontrolliryhmän eläimille ei anneta testattavaa ainetta, mutta muuten niitä käsitellään aivan samoin kuin testiryhmän eläimiä. Mikäli käytetään liuotetta annostelun helpottamiseksi, kontrollieläimille annostellaan liuotinta kuten testiryhmille, ja sen määrä on sama kuin suurimman annoksen saavalle testiryhmälle annettu. Suurimman annoksen tulisi aiheuttaa myrkytysoireita, mutta ei lainkaan tai hyvin vähän kuolemantapauksia. Pienimmällä annoksella ei tulisi olla myrkyvaikutusta. Mikäli ihmisten altistustasosta on tietoja, pienimmän testiannoksen tulee olla tätä suurempi. Keskimmäinen annoskoko tulee säätää sellaiseksi, että se aiheuttaa vähäisimmät havaittavissa olevat myrkyvaikutukset. Käytettäessä useampia väliannostasoja ne tulee porrastaa niin, että myrkyvaikutukset lisääntyvät asteittain. Pienimmän ja keskisuuren annoksen saavissa ryhmissä sekä kontrolliryhmässä kuolemantapausten luvun tulee olla pieni, jotta tuloksista voidaan tehdä luotettava arviointi.

Mikäli testattava aine aiheuttaa voimakasta ihon ärsytystä, aineen pitoisuutta pienennetään ja tämä voi aiheuttaa muiden myrkyvaikutusten poisjäämisen tai vähenemisen korkeimmalla annostasolla. Mikäli iho on pahoin vaurioitunut, voi olla tarpeen lopettaa tutkimus ja aloittaa uusi pienemmällä pitoisuuksilla.

1.6.2.4 Rajatesti

Jos esitutkimuksessa ei esiinny testattavaan aineeseen liittyviä myrkyvaikutuksia 1 000 mg/kg:n tai sitä suuremmalla, ihmisten altistumistasoon perusteella valitulla annostasolla, jatkokokeita ei yleensä tarvitse tehdä.

1.6.2.5 Tarkkailu-aika

Eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkytysoireiden toteamiseksi. Kuolinaika sekä myrkytysoireiden alkamis- ja loppumisaika kirjataan.

1.6.3 Testin suorittaminen

Eläimet säilytetään yksittäishäkeissä. Niitä käsitellään testattavalla aineella mieluummin viikon jokaisena päivänä 28 päivän ajan. Mikäli tutkimukseen kuuluu satelliittiryhmä, sitä tarkkaillaan vielä 14 päivän ajan altistamisen loputtua myrkyvaikutusten ohimenevyyden tai pysyvyyden toteamiseksi. Altistamisaika on vähintään kuusi tuntia päivässä. Testattavaa ainetta levitetään tasaisesti alueelle, joka on n. 10 % ruumiin koko pinta-alasta. Testattaessa erittäin myrkyllisiä aineita levitysala voi olla pienempi, mutta aine tulee levittää alueelle mahdollisimman ohuesti ja tasaisesti.

Testattava aine pidetään kosketuksessa ihoon huokoisen sideharson ja ärsyttämättömän teipin avulla. Testialueelle asetetaan jokin sopiva peite pitämään harsosidos ja testattava aine paikoillaan ja estämään eläintä syömästä sitä. Eläimen liikkumista voidaan rajoittaa, mutta täydellisesti liikkumattomaksi saattaminen ei ole suositeltava menettelytapa.

Altistamisajan päätyttyä jäljellä oleva aine poistetaan vedellä tai puhdistamalla iho jollakin muulla sopivalla tavalla.

Eläimiä tarkkaillaan, päivittäin ja myrkytysoireet, niiden alkamis- ja kesto-aika sekä voimakkuus kirjataan. Eläimiä tarkkaillaessa kiinnitetään huomiota muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa ja käyttäytymistavassa. Eläimet punnitaan viikottain. Ruoankulutus on myös syytä mitata viikottain. Tarkkailua on suoritettava säännöllisesti, jotta koe-eläimiä ei menetettäisi kannibalismiin, kudosten autolyysin tai virheellisen sijoituksen vuoksi. Tutkimuksen päätyttyä eloonjääneille eläimille satelliittiryhmää lukuun ottamatta suoritetaan ruumiinavaus. Kuolevat eläimet poistetaan viipymättä ja niille suoritetaan ruumiinavaus.

Seuraavat tutkimukset tehdään testin päätyttyä kaikille eläimille, mukaan lukien kontrolliryhmän eläimet:

- 1 hematologinen tutkimus, jossa mitataan hematokriitti, hemoglobiini, erytrosyyttien määrä, leukosyyttien määrä ja erittely sekä joitakin hyytymisominaisuuksia;
- 2 veren kliininen biokemiallinen tutkimus sekä vähintään yksi maksan ja munuaisten toiminnan parametri, alaniiniaminotransferaasi (aikaisemmin glutamiinipyruviinitransaminaasi) ja seerumin aspartaattiaminotransferaasi (aikaisemmin glutamiinioksalosetaattitransaminaasi), virtsan typpi, albumiini, veren kreatiniini, kokonaisbilirubiini ja seerumin kokonaisproteiini.

Muita myrkyllisyysarviointiin mahdollisesti tarvittavia määrittämiä ovat kalsium-, fosfori-, kloridi-, natrium- ja kalium-mittaukset, glukoosin paastoarvo, lipidianalyysi, hormonit, happo/emäsbalansipaino, methemoglobiini ja kolinesteraasi.

Kliinistä biokemiaa voidaan tarpeen mukaan käyttää todettujen vaikutusten laajempaan tutkimiseen.

1.6.4 *Ruumiinavaus*

Kaikille koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus, jossa todetaan paljain silmin havaittavat patologiset muutokset. Maksa, munuaiset, lisämunuaiset ja kivekset punnitaan märkinä mahdollisimman pian irrottamisen jälkeen, jotta ne eivät pääse kuivumaan. Elimet ja kudokset, kuten normaali ja altistettu iho, maksa, munuaiset, haima sekä kohde-elimet (eli elimet, joissa on näkyviä vammoja tai joiden koko on muuttunut) säilötään sopivassa aineessa mahdollista myöhempää histopatologista tutkimusta varten.

1.6.5 *Histopatologinen tutkimus*

Suurimman annoksen saaneesta ryhmästä sekä kontrolliryhmästä otetut elin- ja kudokset tutkitaan. Alemmista ryhmistä tutkitaan ne elimet ja kudokset, joista suurimman annoksen saaneesta ryhmästä löytyi testattavasta aineesta johtuvia vaurioita. Satelliittiryhmän eläimille tehdään histologinen tutkimus kiinnittäen erityistä huomiota niihin elimiin ja kudoksiin, joissa muiden ryhmien eläimillä oli muutoksia.

2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukon muodossa, josta näkyy kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa ja luettelo erilaisista vammoista sekä eläinten lukumäärä kunkin vamman osalta.

Kaikki tulokset on arvioitava jotakin tilastointimenetelmää käyttäen. Kaikkia tunnettuja tilastointimenetelmiä voidaan käyttää.

3 RAPORTOINTI**3.1 Tutkimuseloste**

Mikäli mahdollista, tutkimuselosteen tulee sisältää seuraavat tiedot:

- tiedot eläimistä (laji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.),
- koeolosuhteet,
- annostasot (käytetty liuotin) ja pitoisuudet,
- oireeton taso,
- myrkkyyvaikutukset sukupuolen ja annostason perusteella,
- eläinten kuolinaika tutkimuksen kuluessa ja eloonjääneet,
- myrkkyy- ja muut vaikutukset,
- kunkin oireen toteamisaika ja sitä seuraavat toimenpiteet,
- ruokintaa ja painoa koskevat tiedot,
- hematologiset testit ja niiden tulokset,
- kliiniset biokemialliset testit ja niiden tulokset,
- ruumiinavauslöydökset,
- tarkka kuvaus kaikista histopatologisista löydöksistä,
- tulosten tilastointitapa,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohdanto, osa B (C).

4 LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohdanto, osa B (D).

B. 10. MUUT VAIKUTUKSET — MUTAGEENISUUS**NISÄKÄSSOLUVILJELMÄLLÄ SUORITETTAVA SYTOGEENISUUSTESTI *IN VITRO*****1 MENETELMÄ****1.1 Johdanto**

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmä

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Nisäkässoluviljelmällä suoritettava sytogeenisuustesti *in vitro* on lyhytaikainen mutageenisuustesti, jolla pyritään löytämään rakenteellisia kromosomimuutoksia viljellyistä nisäkässoluista. Sekä pysyviä solulinjoja että primaarisia soluviljelmiä voidaan käyttää. Kun solut on altistettu testattaville kemikaaleille sekä ilman maksaentsyymiaktivointijärjestelmää että sen läsnäollessa (entsyymejä indusoivilla aineilla käsiteltyjen jyrsijöiden maksoista eristetty postmitokondriaalinen fraktio, johon on lisätty kofaktoreita) soluja käsitellään tumasukkulan muodostumisen inhibiittorilla, esimerkiksi kolkisiinilla, solujen pysäyttämiseksi mitoosin metafaasivaiheeseen (c-metafaasiin). Solut kerätään asianmukaisina aikoina, ja niistä tehdään kromosomipreparaatit. Preparaatit värjätään, ja metafaasivaiheessa olevat solut analysoidaan kromosomimuutosten löytämiseksi.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus**1.6.1 Testin valmistelu**

Tutkittavat aineet voidaan sekoittaa kasvatusalustaan tai liuottaa soveltuviin kantaja-aineisiin ennen solujen altistamista. Testissä käytetään pysyviä solulinjoja tai primaarisia soluviljelmiä, esim. kiinan-hamsterin soluja ja ihmisen lymfositteja.

1.6.2 Koeolosuhteet

Soluviljelmien lukumäärä:

Kutakin parametriyhdistelmää kohti tulee olla vähintään kaksi rinnakkaista viljelyä.

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit:

Liuotinta (kun liuotin ei ole kantaja-ainetta tai vettä), maksaentsyymiaktivointiseosta, maksaentsyymiaktivointiseoksen ja liuottimen seosta sekä käsittelemättömiä kontrolleja käytetään negatiivisina kontrolleina.

Kuhunkin kokeeseen sisältyy positiivinen kontrolli. Kun tutkittavan aineen aktivoimiseen käytetään maksaentsyymiaktivointiseosta, on positiivisena kontrollina käytettävä yhdistettä, jonka tiedetään vaativan metabolista aktivointia.

Annostasot:

Vähintään kolme annosta vähintään yhden logaritmin annosvälillä testattavaa yhdistettä; korkein annos estää noin 50 % mitoitteisesta aktiviteetista.

Viljelyolosuhteet:

Koe suoritetaan asianmukaisella viljelyalustalla ja asianmukaisissa viljelyolosuhteissa (esim. lämpötila, viljelymaljat, CO₂-pitoisuudet ja kosteus).

1.6.3 Testin suorittaminen**1.6.3.1 Viljelmien valmistus**

Pysyvät solulinjat: Solut erotetaan kantaviljelmistä (esim. trypsiinin avulla tai ravistelemalla), kylvetään kasvatusastioihin sopivaan tiheyteen ja inkuboidaan 37 °C:ssa.

Ihmisen lymfosyytit: Heparinisoitua verta lisätään kasvatusalustaan, joka sisältää fytohemagglutiinia, vasikan sikiöseerumia ja antibiootteja, ja inkuboidaan 37 °C:ssa.

1.6.3.2 Viljelmien altistus tutkittavalle yhdisteelle**i) Altistus ilman maksaentsyymiaktivaatiota**

Kaikkien altistusten tulee kestää yhden solusyklin ajan, ja fiksaatiolla tulee varmistaa syklin eri vaiheissa altistettujen solujen analysointi ensimmäisessä altistuksen jälkeisessä mitoosissa. Kun altistusaika ei ole yhden koko solusyklin mittainen, valitaan useita fiksaatioaikoja, jotta voidaan ottaa näytteitä soluista, jotka ovat altistuksen aikana solusyklin eri vaiheissa, esimerkiksi G₁, S ja G₂. Pysyvistä solulinjoista koostuvat viljelmät altistetaan tutkittavalle aineelle niiden ollessa eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa. Ihmisen lymfosyyttiviljelmät altistetaan niiden ollessa puolisykronisessa vaiheessa. Mikäli testattava kemikaali muuttaa solusyklin pituutta, fiksaatioväliä tulee muuttaa vastaavasti.

ii) Altistus maksaentsyymiaktivaation läsnäollessa

Tutkittavan aineen ja aktivaatiosysteemin tulisi vaikuttaa niin kauan kuin mahdollista, ilman että se aiheuttaa soluihin myrkkövaikutusta. Jos tämä käsittely ei myrkkövaikutuksen vuoksi kata koko solusykliä, valitaan useita fiksaatioaikoja, jotta voidaan ottaa näytteitä soluista, jotka ovat altistuksen kuluessa solusyklin eri vaiheissa, esimerkiksi G₁, S ja G₂.

Solujen kerääminen

Soluviljelmät käsitellään tumasukkulan muodostumisen inhibiittorilla 1–2 tuntia ennen solujen keräämistä. Jokaisen viljelmän solut kerätään ja käsitellään erikseen kromosomipreparaattien valmistamiseksi.

1.6.3.3 Kromosomipreparaattien valmistus

Kromosomipreparaattien tekoon kuuluu solujen hypotoniakäsittely, kiinnitys, levitys objektilasille ja värjäys.

Analyysi:

Kustakin viljelmästä analysoidaan ainakin 100 hyvin levinnyttä metafaasia kromosomuutosten löytämiseksi. Objektilasit koodataan ennen analyysiä.

Ihmisen lymfosyyteistä analysoidaan vain 46 sentromeeria sisältävät metafaasit. Pysyvistä solulinjoista analysoidaan vain metafaasit, joiden sentromeerien lukumäärä on moodi ± 2.

2 TULOKSET

Tiedot esitetään taulukon muodossa. Kromatidimuutokset (aukot, murtumat, vaihdot), kromosomi-muutokset (aukot, murtumat, renkaat, kaksikeskuksiset ja monikeskuksiset) sekä poikkeavien metafaasien lukumäärä (aukot mukaan luettuina ja pois luettuina) esitetään erikseen kustakin käsittelystä ja kontrolliviljelmästä. Tulosten merkitsevyys arvioidaan soveltuvin tilastollisin menetel-min.

3 RAPORTOINTI

3.1 Tutkimusseloste

Tutkimusraportin tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- käytetyt solut,
- koeolosuhteet: kasvatusalustojen koostumus, CO₂-pitoisuus, inkubaatioaika, inkubaatiolämpö-tila, annostasot, altistusaika, käytetty tumasukkulan muodostumisen inhibiittori ja sen pitoisuus sekä käyttöaika, käytetty maksaentsyymiaktivaatioseostyyppi, positiiviset ja negatiiviset kontrol-lit,
- soluviljelmien lukumäärä,
- analysoitujen metafaasien lukumäärä (tiedot annetaan erikseen kustakin viljelmästä),
- mitoosi-indeksi,
- kunkin käsittelyn ja kontrolliviljelmän aberraatioiden lukumäärä ja tyyppi, pysyvien solulinjojen kromosomien moodi,
- tulosten tilastollinen käsittely,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohdanto, osa B (C).

4 LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohdanto, osa B (D).

B. 11. MUUT VAIKUTUKSET — MUTAGEENISUUS**NISÄKKÄÄN LUUYDINSYTOGEENISUUSTESTI *IN VIVO*, KROMOSOMIANALYYSI****1 MENETELMÄ****1.1 Johdanto**

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmä

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testausmenetelmän periaatteet

Tämä sytogeenisuustesti *in vivo* on lyhytaikainen mutageenisuustesti, jonka avulla pyritään löytämään rakenteellisia kromosomiaberraatioita. Ne määritetään tavallisesti ensimmäisestä käsittelyn jälkeisestä mitoosivaiheesta. Koska on kyse kemiallisista mutageeneista, suurin osa aiheutetuista aberraatioista on kromatidiaberraatioita.

Menetelmässä käytetään nisäkkäiden luuydinsoluja, jotka altistetaan tavanomaisin keinoin tutkittaville kemikaaleille, jonka jälkeen nisäkkäät lopetetaan määräväliajoin. Eläimille annetaan ennen lopetusta jotakin tumasukkulan muodostumisen inhibiittoria, esimerkiksi kolkisiinia, solujen pysäyttämiseksi mitoosin metafaasivaiheeseen (c-metafaasiin). Soluista tehdään ilmakuivatut preparaattit, jotka värjätään, ja metafaaseista mikroskopoidaan kromosomimuutokset.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus**1.6.1 Testin valmistelu**

Tutkittavat kemikaalit liuotetaan tavalliseen suolaliuokseen. Mikäli ne ovat liukenemattomia, ne liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuotteisiin.

Testattavia yhdisteitä käytetään vastavalmistettuina liuoksina. Mikäli liuotinta käytetään helpottamaan annostelua, se ei saa vaikuttaa yhdisteeseen eikä aiheuttaa myrkkyyvaikutuksia.

1.6.2 Koeolosuhteet**1.6.2.1 Koe-eläimet**

Koe-eläiminä käytetään jrsijöitä, kuten rottia, hiiriä tai kiinanhamstereita. Terveet, nuoret aikuiset eläimet randomisoidaan ja jaetaan koe- ja kontrolliryhmiin.

1.6.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin koe- ja kontrolliryhmää kohden tarvitaan vähintään viisi naarasta ja viisi urosta. Näin ollen tullaan lopettamaan 10 eläintä kutakin ryhmää ja kutakin aikaväliä kohden, mikäli koesuunnitelma edellyttää useita testausaikoja altistuksen jälkeen.

1.6.2.3 Annostustapa

Testattavat yhdisteet tulee yleensä antaa kerta-annoksena. Toksikologisista syistä annoksia voi olla useita. Useita annoksia voidaan kuitenkin käyttää ainoastaan, mikäli testattava yhdiste ei vaikuta luuytimeen sytotoksisesti. Annostelu tapahtuu yleensä suun kautta tai ruiskeena vatsaonteloon. Muutkin annostustavat voivat tulla kysymykseen.

1.6.2.4 Negatiivisten ja positiivisten kontrollien käyttö

Positiivisena kontrollina käytetään yhdistettä, jonka tiedetään aiheuttavan kromosomiberraatioita *in vivo*, ja negatiivista (liuotin)kontrolliryhmää käytetään niin ikään kussakin kokeessa.

1.6.2.5 Annostasot

Perustasolla annetaan testattava yhdiste yhtenä annoksena, joka on joko suurin siedetty tai sellainen annos, joka aiheuttaa jonkinasteisen sytotoksisuusoireen (esimerkiksi mitotoisin osittaisen inhibition).

Annostasojen määrää voidaan lisätä, mikäli se on tieteellisistä syistä perusteltua.

Mikäli testi tehdään varmistustarkoituksessa, on lisäksi käytettävä vähintään kahta muuta annostasoja.

1.6.3 Testin suorittaminen

Koe voidaan tehdä kahdella tavalla:

- i) Eläimille annetaan testattava yhdiste korkeimpana siedettynä kerta-annoksena. Näytteitä otetaan kolmasti käsittelyn jälkeen. Näytteen keskiottoväli on 24 tuntia. Koska testattava kemikaali voi vaikuttaa solusyklin kinetiikkaan, käytetään yhtä aikaisempaa ja yhtä myöhempää näytteenottoväliä, jotka on asianmukaisesti porrastettu kuuden ja 48 tunnin väliin. Useampia annostasoja käytettäessä näytteet tulee ottaa erityisen herkässä vaiheessa tai, ellei tämä ole tiedossa, 24 tuntia annostuksen jälkeen.
- ii) Jos farmakokineettiset ja metaboliset syyt puoltavat toistuvaa altistusta, useita annoksia voidaan käyttää ja näytteet otetaan kuuden ja 24 tunnin kuluttua viimeisestä käsittelystä.

Luuytimen preparointi

Ennen eläinten lopettamista niille annetaan ruiskeena vatsaonteloon tarpeellinen määrä tumasukkulalan muodostumisen inhibiittoria, jotta c-metafaasissa olevia soluja saadaan riittävästi. Luuydin poistetaan vastalopetettujen eläinten molemmista reisistä huuhtomalla isotonisella liuoksella. Asianmukaisen hypotonisen käsittelyn jälkeen solut fiksoidaan ja levitetään objektilaseille. Lasit värjätään ilmakeivatuksen jälkeen.

Analyysi

Lasit koodataan ennen mikroskooppista analyysia. Vähintään 50 täysimääräistä sentromeeria sisältävää hyvin levinnyttä metafaasia analysoidaan kustakin eläimestä rakenteellisten kromosomiberraatioiden löytämiseksi. Lisäksi voidaan määrittää kunkin eläimen mitotoisi-indeksit.

2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukon muodossa. Kromatidi- ja isokromatidipoikkeamat (aukot, välit, vaihdot) ja määritetyt mitoosi-indeksit ilmoitetaan erikseen kaikista koe- ja kontrollieläimistä. Keskiarvot ja keskipoikkeamat jokaisen koe- ja kontrolliryhmän osalta ilmoitetaan niin ikään. Tulosten merkitsevyys arvioidaan soveltuvin tilastollisin menetelmin.

3 RAPORTOINTI**3.1 Tutkimusseloste**

Tutkimusselosteen tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- koe-eläinten laji, kanta ja ikä,
- naaraitten ja koiraitten lukumäärä koe- ja kontrolliryhmissä,
- koeolosuhteet: tarkat tiedot altistuksesta ja näytteiden aikataulusta, annostasot, käytetty tumasukkulan muodostumisen inhibiittori ja sen pitoisuus ja käsittelyaika,
- analysoitujen metafaasien lukumäärä eläintä kohden,
- mitoosi-indeksit, mikäli määritetty,
- aberraatioiden tyyppi ja lukumäärä erikseen kustakin koe-eläimestä ja kontrollista,
- tulosten tilastollinen käsittely,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohtanto, osa B (C).

4 LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohtanto, osa B (D).

B. 12. MUUT VAIKUTUKSET — MUTAGEENISUUS

MIKROTUMATESTI

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmä

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Mikrotumakoe on nisäkkäillä tehty lyhytaikainen *in vivo* -koe kemikaalien aiheuttamien kromosomi- ja mitoottisten vaurioiden toteamiseksi. Koe perustuu altistettujen eläinten polykromaattisten erytrosyyttien mikrotumien lisääntymiseen kontrolliryhmän eläimiin verrattuna.

Mikrotumia muodostuu kromosomien osista tai kokonaisista kromosomeista mitosisin hidastuessa. Kun erytrosyytteihin kehittyy erythroblasteja, päättämä karkoitetaan, kun taas sytoplasmaan voi jäädä mikrotumia. Kokeessa käytetään testattaville aineille altistettujen koe-eläinten luuytimeistä saatuja nuoria polykromaattisia erytrosyyttejä. Luuytimeistä tehdään siveelypreparaatit, jotka värjätään. Mikroskooppilla lasketaan polykromaattisten erytrosyyttien mikrotumat, ja polykromaattisten ja normokromaattisten erytrosyyttien suhde määritetään.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 Testin valmistelu

Tutkittavat kemikaalit liuotetaan isotoniseen liuokseen. Jos ne ovat liukenemattomia, ne liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuotteisiin. Mikäli liuotinta käytetään, se ei saa vaikuttaa yhdisteeseen eikä aiheuttaa myrkyvaikutuksia. Testattavia yhdisteitä käytetään yleensä vastavalmistettuina liuoksina.

1.6.2 Koeolosuhteet

1.6.2.1 Koe-eläimet

Hiiret ovat suositeltavia, mutta muitakin nisäkkäitä voidaan käyttää. Terveet, nuoret, täysikasvuiset eläimet randomisoidaan ja jaetaan koe- ja kontrolliryhmiin.

1.6.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin koe- ja kontrolliryhmää kohden tarvitaan vähintään viisi naarasta ja viisi urosta. Näin ollen tullaan lopettamaan 10 eläintä kutakin ryhmää ja kutakin aikaväliä kohden, mikäli tutkimussuunnitelma edellyttää useita testausaikoja altistamisen jälkeen.

1.6.2.3 Annostustapa

Testattavat yhdisteet tulee yleensä antaa kerta-annoksena. Toksikologisista syistä annoksia voi olla useita. Useita annoksia voidaan kuitenkin käyttää ainoastaan, mikäli testattava yhdiste ei vaikuta luuytimeen sytotoksisesti. Annostelu tapahtuu yleensä suun kautta tai ruiskeena vatsaonteloon. Muutkin annostustavat voivat tulla kysymykseen.

1.6.2.4 Negatiivisten ja positiivisten kontrollien käyttö

Sekä positiivisia että negatiivisia (liuotin)kontrolliryhmiä käytetään jokaisessa kokeessa.

1.6.2.5 Annostasot

Perustasolla annetaan testattava yhdiste yhtenä annoksena, joka on joko suurin siedetty tai sellainen annos, joka aiheuttaa jonkinasteisia sytotoksisuusoireita, esimerkiksi polykromaattisten ja normokromaattisten erytrosyyttien suhde muuttuu.

Annostasojen määrää voidaan lisätä, mikäli se on tieteellisistä syistä perusteltua.

Mikäli testi tehdään varmistustarkoituksessa, on lisäksi käytettävä vähintään kahta muuta annostasoja.

1.6.3 Testin suorittaminen

Koe voidaan tehdä kahdella tavalla:

- i) Eläimille annetaan testattavaa yhdistettä korkeimpana siedettynä kerta-annoksena. Näytteet otetaan kokeen maksimivastevaiheessa, joka vaihtelee testattavan yhdisteen mukaan. Korkeinta annosta käytettäessä luuydinnäyte otetaan vähintään kolmasti, ensimmäinen aikaisintaan 12 tuntia altistamisen jälkeen ja seuraavat sopivin välein, ei kuitenkaan yli 72 tuntia altistamisesta.

Useita annostasoja käytettäessä näytteet tulee ottaa mahdollisimman herkässä vaiheessa tai, ellei tämä ole tiedossa, 24 tuntia altistamisen jälkeen.

- ii) Jos farmakokineettiset ja metaboliset syyt puoltavat toistuvaa altistamista, useita annoksia voidaan käyttää, ja näytteet otetaan vähintään kolme kertaa alkaen 12 tunnin kuluttua viimeisestä altistamisesta ja seuraavat sopivin välein, mutta kuitenkin 72 tunnin aikana.

Luuytimen preparointi

Luuydin huuhdotaan vastalopetettujen eläinten molemmista reisiluista vasikan sikiöseerumilla. Solut sedimentoidaan sentrifugoimalla ja supernatantti heitetään pois. Homogeenistä solususpensiota sivellään objektilaseille. Lasit värjätään ilmakeivatuksen jälkeen.

Analyysi

Lasit koodataan ennen mikroskooppista analyysia. Mikrotumien esiintymistä tutkitaan vähintään 1 000 polykromaattisesta erytrosyyttisestä eläintä kohden.

Normokromaattisten ja polykromaattisten erytrosyyttien suhde määritetään kustakin eläimestä laskemalla 1 000 erytrosyyttia.

2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukon muodossa. Polykromaattisten erytrosyyttien ja mikrotumallisten polykromaattisten erytrosyyttien laskettu määrä sekä mikrotumallisten solujen prosentuaalinen osuus ilmoitetaan erikseen kaikista koe- ja kontrollieläimistä, kuten myös normokromaattisten ja polykromaattisten erytrosyyttien suhde. Keskiarvot ja keskipoikkeamat jokaisen koe- ja kontrolliryhmän osalta ilmoitetaan niin ikään. Tulosten merkitsevyys arvioidaan soveltuvien tilastollisten menetelmin.

3 RAPORTOINTI**3.1 Tutkimusseloste**

Tutkimusselosteen tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- koe-eläinten laji, kanta ja ikä,
- naaraitten ja koiraitten lukumäärä koe- ja kontrolliryhmissä,
- koeolosuhteet: tarkat tiedot altistamisesta ja näytteiden ottoajasta, annostasot, tiedot myrkyllisyydestä, negatiiviset ja positiiviset kontrollit,
- mikrotumien laskentakriteerit,
- mahdollinen annos/vastesuhde,
- tulosten tilastollinen käsittely,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohdanto, osa B (C).

4 LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohdanto, osa B (D).

B. 13. MUUT VAIKUTUKSET — MUTAGEENISUUS

ESCHERICHIA COLI -TAKAISINMUTAATIOTESTI

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmä

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Escherichia coli tryptofaani (*trp*) -takaisinmutaatiotesti on mikrobiologinen menetelmä, jolla voidaan todeta bakteerin genomissa emäsmuutoksia aikaansaavien aineiden aiheuttamat $trp^- > trp^+$ -takaisinmutaatiot.

Bakteerit altistetaan tutkittaville aineille sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä. Kun bakteereja on kasvatettu sopiva aika minimaalialustalla, revertanttipesäkkeet lasketaan, ja saatua lukua verrataan altistamattoman ja/tai ainoastaan testattavan aineen liuottimelle altistetun viljelmän spontaanirevertanttien määrään.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus

Testissä voidaan käyttää joko i) preinkubaatiomenetelmää tai ii) suoraa altistusmenetelmää, jossa bakteerit ja tutkittava aine sekoitetaan päällysagariin ja seos kaadetaan selektiivisen agarmaljan pinnalle.

1.6.1 Testin valmistelu

1.6.1.1 Bakteerit

Bakteereja kasvatetaan 37 °C:ssa myöhäiseen eksponentiaalivaiheeseen tai varhaiseen stationäärivaiheeseen saakka. Solutiheyden tulee olla 10^8 – 10^9 solua millilitrassa.

1.6.1.2 Metabolinen aktivaatio

Bakteerit tulee altistaa tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiojärjestelmää että soveltuvan, entsyymejä indusoivilla aineilla käsiteltyjen hiirten tai rottien maksaentsyymejä sisältävän aktivaatioseoksen (postmitokondriaalinen fraktio, johon on lisätty kofaktoreita) läsnä ollessa.

1.6.2 Koeolosuhteet

1.6.2.1 Testikannat

Testissä käytetään kolmea kantaa: WP2, WP2 uvr A ja WP2 uvr A pKM 101. Kantaviljelmien kasvatuksessa ja säilytyksessä tulee käyttää yleisesti hyväksytyjä menetelmiä. Kantojen kasvuaati-mukset, kantojen muut geneettiset ominaisuudet, herkkyys ultraviolettivalolle ja mitomysiini-C:lle sekä WP2 uvr A pKM 101 -kannan ampicilliiniresistenssi tulee tarkistaa. Myös spontaanirevertant-tien ilmaantuvuuden tulee olla kannoilla odotusarvojen mukaisella tasolla.

1.6.2.2 Kasvatusalustat

Mutanttien identifiointiin käytetään soveltuvaa kasvatusalustaa ja sopivaa päällysagaria.

1.6.2.3 Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Testissä on käytettävä rinnakkaisia altistamattomia ja testattavan aineen liuottimelle altistettuja kontrolliviljelmiä. Myös positiivisia kontroleja on käytettävä kahdesta syystä:

- i) Bakteerikantojen herkkyyden varmistamiseksi. Testeissä, joissa ei käytetä metabolista aktivaati-ota, voidaan positiivisina kontroleina käyttää metyyylimetaanisulfonaattia, 4-nitrokinoliinioksidia tai etyylinitrosoureaa.
- ii) Testissä käytettävän metabolisen aktivaatiojärjestelmän toimivuuden varmistamiseksi. Kaikille kannoille sopiva metabolisen aktivaatiojärjestelmän toimivuuden positiivinen kontrolli on 2-aminoantraseeni. Jos mahdollista, positiivisen kontrollin tulisi kuulua samaan kemiallisten aineitten ryhmään kuin tutkittava aine.

1.6.2.4 Tutkittavan aineen määrä maljaa kohti

Tutkittava aine testataan vähintään viitenä eri pitoisuutena, siten että pitoisuuserot maljojen välillä ovat puolilogaritmiset. Aineen liukoisuus tai toksisuus määrää korkeimman tutkittavan pitoisuuden. Toksisuus ilmenee spontaanirevertanttien määrän pienemisenä, maljan taustakasvun puuttumisena tai altistettujen viljelmien normaalia suurempana kuolleisuutena. Ei-toksisia aineita tulee testata aina pitoisuuteen 5 mg/malja saakka, ennen kuin mutageenisuustestin tuloksen voidaan katsoa olevan negatiivinen.

1.6.2.5 Inkubaatio-olosuhteet

Maljoja inkuboidaan 48–72 tuntia 37 °C:ssa.

1.6.3 Testin suorittaminen

Suorassa altistusmenetelmässä ilman metabolista aktivaatiota tutkittava aine ja 0,1 ml tuoretta bakteeriviljelmää sekoitetaan 2,0 ml:aan päällysagaria. Metabolista aktivaatiota käytettäessä päälly-sagariin sekoitetaan tutkittava aine ja bakteerit, minkä jälkeen siihen lisätään 0,5 ml maksaentsyy-mejä sisältävää aktivaatioseosta, jossa on sopiva määrä postmitokondriaalista fraktiota. Kunkin koeputken sisältö sekoitetaan ja kaadetaan selektiivisen agarmaljan pinnalle. Päällysagarin annetaan jähmettyä, ja maljoja inkuboidaan 48–72 tuntia 37 °C:ssa. Inkubaation jälkeen lasketaan revertantti-pesäkkeiden lukumäärä kullakin maljalta.

Preinkubaatiomenetelmässä tutkittava aine, 0,1 ml tuotetta bakteeriviljelmää ja sopiva määrä maksaentsyymejä sisältävää aktivaatioseosta tai vastaava tilavuus puskuria sekoitetaan keskenään ja seosta inkuboidaan, minkä jälkeen siihen lisätään 2,0 ml päällysagaria. Kaikki muut vaiheet ovat samoja kuin suorassa altistusmenetelmässä.

Kummassakin menetelmässä kaikki maljat tehdään ainakin kolmena kappaleena.

2 TULOKSET

Sekä kontrolliviljelmistä että altistetuista viljelmistä ilmoitetaan revertanttipesäkkeiden lukumäärä maljaa kohti. Sekä kontrolliviljelmistä että altistetuista viljelmistä ilmoitetaan maljakohtaiset pesäkemäärät sekä keskimääräiset revertanttipesäkkeiden lukumäärät maljaa kohti ja keskipoikkeamat. Kaikki tulokset tulee varmistaa erillisellä kokeella. Tulosten merkitsevyys tulee arvioida soveltuvien tilastollisin menetelmin.

3 RAPORTOINTI

3.1 Tutkimuseloste

Tutkimuselosteen tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

bakteerit, käytetyt bakteerikannat,

koeolosuhteet: annostukset, toksisuus, kasvatusalustojen koostumus, altistusmenetelmä (preinkubaatio, inkubaatio), maksaentsyymejä sisältävä aktivaatioseos, vertailuaineet, negatiiviset kontrollit,

maljakohtaiset pesäkemäärät, keskimääräiset revertanttipesäkkeiden lukumäärät maljaa kohti, keskipoikkeamat ja annos/vastesuhde, jos mahdollista,

tulosten pohdinta,

tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohdanto, osa B (C).

4. LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohdanto, osa B (D).

B.14. MUUT VAIKUTUKSET – MUTAGEENISUUS

SALMONELLA TYPHIMURIUM -TAKAISINMUTAATIOTESTI

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Ks. yleisjohdanto, osa B (A).

1.2 Määritelmä

Ks. yleisjohdanto, osa B (B).

1.3 Vertailuaineet

Ei ole.

1.4 Testin periaate

Salmonella typhimurium histidiini (*his*) -takaisinmutaatiotesti on mikrobiologinen menetelmä, jolla voidaan todeta bakteerin genomissa emäsvaihdoksia tai lukuraaminsiiirtomutaatioita aikaansaavien aineiden aiheuttamat his^- > his^+ -takaisinmutaatiot.

Bakteerit altistetaan tutkittaville aineille sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä ja maljataan minimaalialustalle. Kun bakteereja on kasvatettu sopiva aika, revertanttipesäkkeet lasketaan, ja saatua lukua verrataan altistamattoman ja/tai ainoastaan testattavan aineen liuottimelle altistetun viljelmän spontaanirevertanttien määrään.

1.5 Laatuksiteerit

Ei ole.

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 Testin valmistelu

1.6.1.1 Bakteerit

Tuoreita bakteeriviljelmia kasvatetaan 37 °C:ssa myöhäiseen eksponentiaalivaiheeseen tai varhaiseen stationäärivaiheeseen saakka. Solutiheyden tulee olla 10^8 – 10^9 solua millilitrassa.

1.6.1.2 Metabolinen aktivaatio

Bakteerit tulee altistaa tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiojärjestelmää että soveltuvan, entsyymejä indusoivilla aineilla käsiteltyjen hiirten tai rottien maksaentsyymejä sisältävän aktivaatioseoksen (postmitokondriaalinen fraktio, johon on lisätty kofaktoreita) läsnä ollessa.

1.6.2 Koeolosuhteet

1.6.2.1 Testikannat

Testissä tulee käyttää vähintään neljää kantaa: TA 1535, TA 1537, TA 98 ja TA 100. Lisäksi voidaan käyttää muita kantoja, kuten TA 1538.

Kantaviljelmien kasvatuksessa ja säilytyksessä tulee käyttää yleisesti hyväksyttyjä menetelmiä.

Kantojen kasvuvaatimukset, kantojen muut geneettiset ominaisuudet, herkkyys ultraviolettivalolle ja kristalliviolettelle sekä niiden ampisilliiniresistenssi tulee tarkistaa. Myös spontaanirevertanttien ilmaantuvuuden tulee olla kannoilla odotusarvojen mukaisella tasolla.

1.6.2.2 Kasvatusalustat

Testissä käytetään soveltuvaa selektiivistä kasvatusalustaa ja sopivaa päällysagaria.

1.6.2.3 Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Testissä on käytettävä rinnakkaisia altistamattomia ja testattavan aineen liuottimelle altistettuja kontrolliviljelmiä. Myös positiivisia kontrolleja on käytettävä kahdesta syystä:

i) Bakterikantojen herkkyyden varmistamiseksi.

Seuraavat yhdisteet soveltuvat testeihin, joissa ei käytetä metabolista aktivaatiota:

<i>Kanta</i>	<i>Takaisinmutaatiota aiheuttava yhdiste</i>
TA 1535, TA 100	natriumatsidi
TA 1538, TA 98	2-nitrofluoreeni
TA 1537	9-aminoakridiini

ii) Testissä käytettävän metabolisen aktivaatiojärjestelmän toimivuuden varmistamiseksi. Kaikille kannoille sopiva metabolisen aktivaatiojärjestelmän toimivuuden positiivinen kontrolli on 2-aminoantraseeni. Jos mahdollista, positiivisen kontrollin tulisi kuulua samaan kemiallisten aineitten ryhmään kuin tutkittava aine.

1.6.2.4 Tutkittavan aineen määrä maljaa kohti

Tutkittava aine testataan vähintään viitenä eri pitoisuutena, siten että pitoisuusero maljojen välillä on puolilogaritmisen. Aineen liukoisuus tai toksisuus määrää korkeimman tutkittavan pitoisuuden. Toksisuus ilmenee spontaanirevertanttien määrän pienemisenä, maljan taustakasvun puuttumisena tai altistettujen viljelmien normaalia suurempana kuolleisuutena. Ei-toksisia aineita tulee testata aina pitoisuuteen 5 mg/malja saakka, ennen kuin mutageenisuustestin tuloksen voidaan katsoa olevan negatiivinen.

1.6.2.5 Inkubaatio-olosuhteet

Maljoja inkuboidaan 48–72 tuntia 37 °C:ssa.

1.6.3 Testin suorittaminen

Suorassa altistusmenetelmässä ilman metabolista aktivaatiota tutkittava aine ja 0,1 ml tuoretta bakteeriviljelmää sekoitetaan 2,0 ml:aan päällysagaria. Metabolista aktivaatiota käytettäessä päällysagariin sekoitetaan tutkittava aine ja bakteerit, minkä jälkeen siihen lisätään 0,5 ml maksaentsyymejä sisältävää aktivaatioseosta, jossa on sopiva määrä postmitokondriaalista fraktiota. Kunkin koeputken sisältö sekoitetaan ja kaadetaan selektiivisen agarmaljan pinnalle. Päällysagarin annetaan jähmettyä, ja maljoja inkuboidaan 48–72 tuntia 37 °C:ssa. Inkubaation jälkeen lasketaan revertanttipesäkkeiden lukumäärä kullakin maljalta. Preinkubaatiomenetelmässä tutkittava aine, 0,1 ml tuoretta bakteeriviljelmää ja sopiva määrä maksaentsyymejä sisältävää aktivaatioseosta tai vastaava tilavuus puskuria sekoitetaan keskenään, ja seosta inkuboidaan, minkä jälkeen siihen lisätään 2,0 ml päällysagaria. Kaikki muut vaiheet ovat samoja kuin suorassa malja-altistusmenetelmässä.

Kummassakin menetelmässä kaikki maljat tehdään ainakin kolmena kappaleena.

2 TULOKSET

Sekä kontrolliviljelmistä että altistetuista viljelmistä ilmoitetaan revertanttipesäkkeiden lukumäärä maljaa kohti. Sekä kontrolliviljelmistä että altistetuista viljelmistä ilmoitetaan maljakohtaiset pesäkemäärät sekä keskimääräiset revertanttipesäkkeiden lukumäärät maljaa kohti ja keskipoikkeamat.

Kaikki tulokset tulee varmistaa erillisellä kokeella.

Tulosten merkitsevyys tulee arvioida soveltuvin tilastollisin menetelmin.

3 RAPORTOINTI**3.1 Tutkimusseloste**

Tutkimusselosteen tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- bakteerit, käytetyt bakteerikannat,
- koeolosuhteet: annostukset, toksisuus, kasvatusalustojen koostumus, altistusmenetelmä (preinkubaatio, inkubaatio), maksaentsyymejä sisältävä aktivaatioseos, vertailuaineet, negatiiviset kontrollit,
- maljakohtaiset pesäkemäärät, keskimääräiset revertanttipesäkkeiden lukumäärät maljaa kohti, keskipoikkeamat ja annos/vastesuhde, jos mahdollista,
- tulosten pohdinta,
- tulosten tulkinta.

3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. yleisjohtanto, osa B (C).

4 LÄHDELUETTELO

Ks. yleisjohtanto, osa B (D).

OSA C: YMPÄRISTÖMYRKYLLISYYDEN MÄÄRITYSMENETELMÄT**C. 1. AKUUTTI MYRKYLLISYYS KALOILLA****1 MENETELMÄ****1.1 Johdanto**

On hyvä hankkia etukäteistietoja testattavan aineen vesiliukoisuudesta, höyrynpaineesta, kemiallisesta stabiiliteetista, dissosiaatiovakioista ja biologisesta hajoamisesta, jotta voidaan valita sellainen testausmenetelmä (staattinen, puolistaattinen tai läpivirtaus-), jossa testattavan aineen pitoisuus pysyy riittävän vakaana testin ajan.

Muut tarvittavat tiedot kuten rakennekaava, puhtausaste, merkittävien epäpuhtauksien laatu ja prosentuaalinen osuus, lisäaineiden esiintyminen ja määrä sekä n-oktanolin/veden jakautumiskerroin on otettava huomioon sekä testin suunnittelussa että tulosten tulkinnessa.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Akuutti myrkyllisyys on organismiin lyhytaikaisen (päivissä laskettavan) tietylle aineelle altistamisen tuloksena syntynyt näkyvä haittavaikutus.

Tässä kokeessa akuutti myrkyllisyys ilmoitetaan tappavan pitoisuuden (LC_{50}) mediaanina, jolla tarkoitetaan pitoisuutta vedessä, joka tappaa 50 % testattavasta kalaerästä ilmoitetun pituisen altistusajan kuluessa. Testattavan aineen kaikki pitoisuudet ilmoitetaan painona tilavuudesta (milligrammoina litraa kohden) ja lisäksi painona painosta (ppm).

1.3 Vertailuaineet

Vertailuainetta voidaan testata osoittamaan, että laboratoriotestiolosuhteissa testattavan lajin vaste ei ole muuttunut merkitsevästi.

Tätä testiä varten ei ole määritelty vertailuaineita.

1.4 Testin periaate

Kalat altistetaan lämpimään veteen eri suuruisina pitoisuuksina lisätylle testaavalle aineelle/aineille vähintään 48 tunnin ajan, mutta mieluummin 96 tuntia. Kuolleisuus kirjataan vähintään 24 tunnin välein, ja pitoisuudet, jotka tappavat 50 % kaloista (LC_{50}), lasketaan, mikäli mahdollista, jokaisella huomiointikerralla.

1.5 Laatuksiteerit

Kontrollien kuolleisuus saa olla korkeintaan 10 % testin lopussa.

Happipitoisuuden täytyy olla yli 60 % ilman kyllästysarvosta koko ajan.

Analyysin, kemiallisten ominaisuuksien tai testausmenetelmän avulla tulisi voida osoittaa, että testattavan aineen pitoisuus on pysynyt tyydyttävän vakaana (esim. 80 % alkuperäisestä pitoisuudesta koko testausajan).

1.6 Testin kuvaus

Kolmea menettelytapaa voidaan käyttää:

Staattinen testi:

Vesiorganismeille tehty myrkyllisyystesti, jossa testattava liuos ei virtaa. (Liuokset pysyvät muuttumattomina koko testin kestoajan.)

Puolistaattinen testi:

Testi, jossa testattava liuos ei virtaa, mutta jossa testiliuosannos uusitaan säännöllisin, pitkin väliajoin (esim. 24 tunnin).

Läpivirtaustesti:

Toksisuustesti, jossa vesi vaihtuu koekammioissa jatkuvasti ja testattava kemikaali kulkeutuu vaihdettavassa vedessä.

1.6.1 Reagenssit**1.6.1.1 Testausaineliuokset**

Varastoliuosten tarvittavat pitoisuudet valmistetaan liuottamalla ainetta ionisoimattomaan tai kohdassa 1.6.1.2 määritelyyn veteen.

Heikosti vesiliukoisista aineista voidaan tehdä varastoliuos ultraäänidispersion avulla tai tarpeen mukaan orgaanisten liuottimien, emulgaattoreiden tai dispergoivien aineiden avulla. Tällaisia aineita käytettäessä kontrollikalat altistetaan apuaineen sille pitoisuudelle, jota käytetään testattavan aineen korkeimmassa pitoisuudessa. Tällaisten apuaineiden pitoisuus saa olla korkeintaan 0,1 g litraa kohden.

Valitut pitoisuudet valmistetaan varastoliuosta laimentamalla. Korkeita pitoisuuksia testattaessa aine voidaan liuottaa suoraan laimennusveteen.

Testi suoritetaan pH-arvoa säätämättä. Mikäli pH näyttää huomattavasti muuttuvan, on suositeltavaa säätää pH-arvo, toistaa testi ja raportoida tulokset. Tässä tapauksessa on varastoliuoksen pH-arvo säädettävä vastaamaan laimennusveden pH-arvoa, ellei tätä vastaan ole erityisiä syitä. HCl ja NaOH sopivat parhaiten tähän tarkoitukseen. Tämä pH-arvon säätäminen on tehtävä niin, ettei testattavan aineen pitoisuus varastoaineessa merkittävästi muutu. Säädöstä mahdollisesti aiheutuva testattavan aineen kemiallinen reaktio tai fysikaalinen saostuminen on raportoitava.

1.6.1.2 Säilytys- ja laimennusvesi

Juomavettä (jossa ei ole vaarallisia kloori-, raskasmetalli- ym. kontaminaatiopitoisuuksia), korkealaatua luonnon- tai rekonstruoitua vettä (katso lisäys 1) voidaan käyttää. Vesi, jonka kokonaiskovuus on 50–250 mg litraa kohden (CaCO_3) ja pH 6,0–8,5, on sopivinta.

1.6.2 Laitteet

Kaikkien laitteiden on oltava kemiallisesti inerttiä materiaalia:

- automaattinen laimennusjärjestelmä (läpivirtaustestiä varten),
- happimittari,
- veden kovuuden määrittäslaitteet,
- lämpötilan säätämiseen tarvittavat laitteet,
- pH-mittari.

1.6.3 *Testattavat kalat*

Yhtä tai useampaa lajia voidaan käyttää testauslaboratorion valinnan mukaan.

Lajivalinta ehdotetaan tehtäväksi käytännön näkökohtien perusteella, esim. kalojen saatavuus kaikkina vuodenaikoina, niiden helppohoitoisuus ja sopivuus testattavaksi, niiden suhteellinen herkkyys ja asiaan mahdollisesti vaikuttavat taloudelliset, biologiset tai ekologiset seikat. Kalojen terveydentilan on oltava hyvä, eikä niissä saa olla näkyviä epämuodostumia.

Testeihin suositeltavia kalalajeja on lueteltu lisäyksessä 2.

1.6.3.1 *Säilytys*

Testattavien kalojen tulisi olla samaa kantaa ja samanmittaisia ja -ikäisiä. Kaloja on säilytettävä vähintään 12 päivää seuraavissa olosuhteissa:

— tankit:

kylmän veden kaloille suositellaan käytettäväksi vähintään 300 litran tankkia ja lämpimän veden kaloille vähintään 100 litran tankkia,

— täyttö:

Menetelmän (uudelleenkierrätys tai läpivirtaus) sekä kalalajin mukaan,

— vesi:

katso kohta 1.6.1.2,

— valo:

päivittäin 12–16 tunnin mittainen valojakso,

— liuenneen hapen pitoisuus:

vähintään 80 % ilman kyllästysarvosta,

— ruokinta:

kolmasti viikossa tai päivittäin, ruokinta lopetetaan vuorokautta ennen kokeen alkua.

1.6.3.2 *Kuolleisuus*

Kuolleisuus kirjataan, ja seuraavia kriteerejä noudatetaan 48 tunnin sopeuttamisajan kuluttua:

— Yli 10 % koko määrästä seitsemän päivän kuluessa: koko erä hylätään.

— Koko määrästä 5–10 %: säilytysaikaa jatketaan vielä seitsemän päivää. Ellei kuolleita tule lisää, erä voidaan hyväksyä, muussa tapauksessa se hylätään.

— Korkeintaan 5 % koko määrästä: erä hyväksytään.

1.6.4 *Sopeuttaminen*

Kaikkia kaloja on pidettävä vedessä, joka on laadultaan ja lämpötilaltaan samanlaista kuin testissä käytettävä vesi, vähintään seitsemän päivän ajan ennen niiden käyttöä.

1.6.5 *Testin suorittaminen*

Varsinaista testiä voi edeltää tasotesti, jolla hankitaan tietoja varsinaisessa testissä käytettävistä pitoisuustasoista.

Testisarjan ohella tehdään yksi kontrollitesti ilman testattavaa ainetta, mutta käyttäen päätestissä mahdollisesti käytettyä apuainetta.

Testin kuluessa pitoisuudet saavat laskea korkeintaan 20 %. Testattavan yhdisteen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista riippuu, valitaanko staattinen, puolistaattinen vai läpivirtaustesti, jotta tämä vaatimus tulee täytetyksi.

Kalat altistetaan testattavalle aineelle alla selostetulla tavalla:

- kesto:
vähintään 48 tuntia, mutta mieluummin 96 tuntia,
- kalojen lukumäärä:
vähintään 10 pitoisuutta kohden,
- tankit:
tarpeeksi tilavia suhteessa suositeltuun täyttöasteeseen,
- kalojen suhde vesimäärään:
suositeltava suurin kuormitus on 1,0 g litraa kohden staattisessa ja puolistaattisessa testissä, läpivirtausmenetelmää käytettäessä kuormitus voi olla suurempi,
- testauspitoisuudet:
yksi kontrolli ja vähintään viisi pitoisuutta, joiden vakioero on korkeintaan 1,8 ja jotka kattavat 0–100 %:n kuolleisuuden,
- vesi:
katso kohtaa 1.6.1.2,
- valo:
päivittäin 12–16 tunnin mittainen valojakso,
- lämpötila:
lajille sopiva (ks. isäys 2), mutta ± 1 °C:n rajoissa kussakin testissä,
- liuenneen hapen pitoisuus:
vähintään 60 % ilman kyllästysarvosta valitussa lämpötilassa,
- ruokinta:
ei ruokintaa.

Kalat tutkitaan ensimmäisten 2–4 tunnin kuluttua ja vähintään 24 tunnin väliajoin. Kala katsotaan kuolleeksi, jos pyrstöruodon koskettaminen ei aiheuta reaktiota eikä hengitysliikkeitä näy. Kuolleiksi todetut kalat poistetaan ja kirjataan.

Näkyvät poikkeavuudet (esim. tasapainon menetys, uintitavan muutokset, hengitystoiminnot, pigmentaatio jne.) kirjataan.

Päivittäin mitataan pH, liennut happi sekä lämpötila.

TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Kunkin suositellun altistusajan kuolleisuusprosentti ja testattavan aineen pitoisuus merkitään logaritmi-paperille. Pisteisiin piirretään silmämääräisesti viiva ja todetaan, mikä pitoisuus vastaa 50 %:n vastetta (katso lisäys 3).

Tämä on kyseessä olevan altistusajan LC_{50} -arvio.

Kun tuloksia on tarpeeksi, LC_{50} -mediaani ja sen varmuusrajat ($p = 0,05$) voidaan arvioida tavanomaisin menetelmin.

LC_{50} -arvo pyöristetään yhteen (tai korkeintaan kahteen) merkitsevään numeroon.

Kun pitoisuus/prosentuaalinen vaste -käyrä on niin jyrkkä, ettei siitä voi laskea LC_{50} -arvoa, graafinen arvio on riittävä.

Kun kaksi toisiaan seuraavaa pitoisuutta 1,8 suhteessa antavat tulokseksi vain 0 %:n ja 100 %:n kuolleisuuden, nämä kaksi arvoa riittävät ilmoittamaan sen välin, johon LC_{50} -arvo asettuu.

Mikäli todetaan, että testattavan aineen stabiliteetti tai homogeenisuus ei pysy vakaana testin kuluessa, tämä on raportoitava ja otettava huomioon tulosten tulkinnassa.

3

RAPORTOINTI

Tutkimusselosteen tulee, mikäli mahdollista, sisältää:

- tiedot testattavasta organismista (nimi, kanta, hankintapaikka, mahdollinen esikäsittely, koko ja lukumäärä kunkin testattavan pitoisuuden osalta),
- luettelo käytetyistä pitoisuuksista ja kaikki saatavissa olevat tiedot testattavan kemikaalin pitoisuuden stabiliteetista testausliuoksessa,
- selostus testauslaitteista,
- mikäli kemiallisia analyyseja tehdään, ilmoitetaan käytetyt menetelmät ja tulokset,
- laimennusveden alkuperä ja kemialliset pääominaisuudet (pH, kovuus, lämpötila),
- apuaineiden pitoisuudet,
- huonosti veteen liukenevien aineiden osalta varasto- ja testausliuoksen valmistustapa,
- käytetyn testausmenetelmän valintaperusteet ja yksityiskohdat (esim. testin kesto, staattinen, puolistaattinen, annosvälit, läpivirtausnopeus, mahdollinen ilmastus, kalojen ja vesimäärän suhde,
- valoisuus aika,
- korkein testattu pitoisuus, joka ei aiheuttanut kuolleisuutta testin aikana,
- pienin testattu pitoisuus, joka aiheutti 100 %:n kuolleisuuden testin aikana,
- kumulatiivinen kuolleisuus kunkin pitoisuuden ja kontrollin (tai kontrollin, jossa on käytetty apuainetta) osalta suositeltuihin tarkkailuaikoihin mennessä,
- LC_{50} -arvot kunakin suositeltuna tarkkailuajana (95 %:n varmuusrajoin mikäli mahdollista),
- LC_{50} -arvojen määrittämisessä käytetyt tilastointimenetelmät,
- graafinen käyrä pitoisuus/prosenttivasteesta testin päättyessä,
- mikäli mahdollista, graafinen kaltevuuskäyrä pitoisuus/prosenttivasteesta testin päättyessä 95 %:n varmuusrajoin,
- testiliuoksien liunneen hapen pitoisuus, pH-arvot ja lämpötila 24 tunnin välein,
- mahdollisen vertailuaineen käytöstä saadut tulokset,
- näyttö siitä, että laatukriteerit on täytetty.

4

LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C (81) 30, Final.

*Lisäys 1***Rekonstruoitu vesi***Esimerkki sopivasta laimennusvedestä*

Kaikkien kemikaalien tulee olla analyttistä laatua.

Veden tulee olla hyvänlaatuista tislattua vettä tai ionisoimatonta vettä, jonka johtavuus on alle $5 \mu\text{Scm}^{-1}$

Varastoliuokset

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (kalsiumkloridihydraatti): 11,76 g

Liutetaan veteen ja tehdään 1 litran annos.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (magnesiumsulfaattiheptahydraatti): 4,93 g

Liutetaan veteen ja tehdään 1 litran annos.

NaHCO_3 (natriumvetykarbonaatti): 2,59 g

Liutetaan veteen ja tehdään 1 litran annos.

KCl (kaliumkloridi): 0,23 g

Liutetaan veteen ja tehdään 1 litran annos.

Rekonstruoitu laimennusvesi

Sekoitetaan 25 ml kutakin neljää varastoliuosta, ja valmistetaan veden kanssa 1 litran annos.

Ilmastetaan, kunnes liuoksen hapen pitoisuus on sama kuin ilmakyllästyksen arvo.

pH-arvon tulee olla $7,9 \pm 0,3$.

Tarvittaessa säädetään pH-arvo natriumhydroksidilla (NaOH) tai suolahapolla (HCl).

Näin valmistetun laimennusveden annetaan seistä noin 12 tuntia, eikä sitä saa enää ilmastaa.

Ca- ja Mg-ionien summa tässä liuoksessa on 2,5 mmol/l. Ca:Mg-ionien suhde on 4:1 ja Na:K-ionien 10:1. Tämän liuoksen kokonaisalkalisuus on 0,8 mmol/l.

Poikkeaminen laimennusveden valmistusohjeista ei saa muuttaa veden koostumusta eikä ominaisuuksia.

Lisäys 2

Testattavaksi suositeltavia kalalajeja

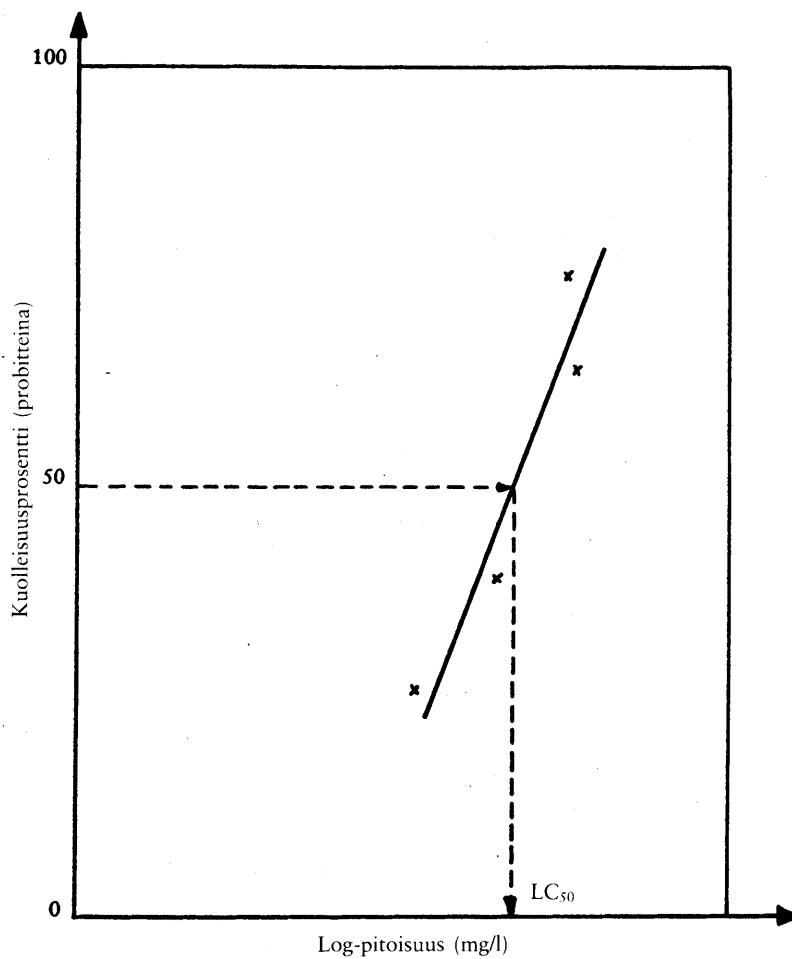
Suosittelu laji	Suosittelu koelämpötilaväli (°C)	Suosittelu kalan kokonaispituus (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Seeprakala	20–24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) Fathead minnow	20–24	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Karppi	20–24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) Hammaskarppi	20–24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Miljoonakala	20–24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Linnaeus 1758) Isoaurinkoahven	20–24	5,0 ± 2,0
<i>Salmo gairdneri</i> (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Kirjolohi	13–17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Säynävä	20–24	6,0 ± 2,0

Valikoima

Edellä lueteltuja kaloja on helppo kasvattaa, ja niitä on helposti saatavilla kaikkina vuodenaikoina. Niitä voi kasvattaa ja viljellä kalanviljelylaitoksissa tai laboratoriossa, joissa tauti- ja loistilanne on valvonnassa siten, että koe-eläin on terve ja sen alkuperä tiedossa. Näitä kaloja on saatavilla eri puolilla maailmaa.

Lisäys 3

Pitoisuusesimerkki: kuolleisuusprosentti

LC₅₀-arvon määrittämisimerkki log-probittipaperia käyttäen

*Lisäys 4***Esimerkkejä standardimenetelmistä**

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council, C (81) 30, Final.
 - (2) ISO/TC/147/SC 5/WG/3. Draft proposal for screening chemicals and products for acute toxicity to fish using a static, semi-static or flow-through method, Document 7436/I, II, III, 1980/06/15 ISO/DP.
 - (3) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.
 - (4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).
 - (5) AFNOR, Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis de *Brachydanio rerio*, T90-303.
 - (6) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.
 - (7) Degradability, Ecotoxicity and Bioaccumulation. The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment, Volume I and II, Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands 1980.
 - (8) Environmental Protection Agency, 1975. 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.
 - (9) Environmental Protection Agency, January 1978. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development EPA-600/4-78-012.
 - (10) Environmental Protection Agency: Toxic Substance Control, 16 March 1979, Part IV.
 - (11) Standard methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th edition, 1975, APHA-AWWA-WPCF.
 - (12) 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.
 - (13) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for Evaluating dose Effects Experiments, J. Pharm, Exp. Therap., Vol. 96, 1949, s. 99.
-

C. 2. AKUUTTI MYRKYLLISYYS *DAPHNIALLA*

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

On hyvä hankkia etukäteistietoja testattavan aineen vesiliukoisuudesta, höyrynpaineesta, kemiallisesta stabiilitetista, dissosiaatiovakioista ja biologisesta hajoamisesta ennen testin suorittamista.

Muut tiedot (kuten rakennekaava, puhtausaste, merkittävien epäpuhtauksien laatu ja prosentuaalinen osuus, lisäaineiden esiintyminen ja määrä sekä n-oktanolin/veden jakautumiskerroin) on otettava huomioon sekä testin suunnittelussa että tulosten tulkinnassa.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Direktiivin LC₅₀-vaatimus Daphnian suhteen katsotaan tulleen täytetyksi määrittelemällä EC₅₀-arvo tässä testausmenetelmässä selostetulla tavalla.

Tässä kokeessa akuutti myrkyllisyys ilmoitetaan tehokkaan pitoisuuden (effective concentration, EC₅₀) mediaanina, joka aiheuttaa liikkumattomuuden. Tämä on pitoisuus (ilmaistuna alkupitoisuutena), joka tekee 50 % testattavan erän Daphnioista liikkumattomaksi 24 tunnin altistusajan kuluessa. Tarvittaessa voidaan myös tehdä 48 tunnin EC₅₀-liikkumattomuusmääritys.

Liikkumattomuus:

Eläinten, jotka eivät pysty uimaan 15 sekuntia testausastian kevyen sekoittamisen jälkeen, katsotaan olevan liikkumattomia.

Testattavan aineen kaikki pitoisuudet ilmoitetaan painona painosta (ppm).

1.3 Vertailuaineet

Vertailuainetta voidaan testata osoittamaan, että laboratoriotestiolosuhteissa testattavan lajin vaste ei ole muuttunut merkittävästi.

Tätä testiä varten ei ole määritelty vertailuaineita.

1.4 Testin periaate

Daphniat altistetaan vedessä testattavan aineen eri pitoisuuksille 24 tunnin ajan. Tarpeen vaatiessa aikaa voidaan pidentää 48 tuntiin.

Kun muuten samoissa testiolosuhteissa testataan riittävän monella eri pitoisuudella, testattavan aineet erilaiset pitoisuudet aiheuttavat erisuuruisia keskimääräisiä vaikutuksia Daphnian uintikykyyn. Eri pitoisuudet antavat tulokseksi erilaiset prosenttiosuudet Daphnioiden uintikyvyttömyydestä testin lopussa. Pitoisuudet, jotka aiheuttavat 0 tai 100 %:n liikkumattomuuden, saadaan suoraan testihavainnoista, mutta 24 tunnin EC₅₀ (tai 48 tunnin EC₅₀) määritetään laskennallisesti milloin mahdollista.

Tässä testissä käytetään staattista menetelmää, joten testausliuosta ei uusita altistusajana.

1.5 Laatuksiteerit

Kontrolliryhmän liikkumattomuus saa olla korkeintaan 10 % testin lopussa.

Happipitoisuus ei saa olla alle 2 mg litraa kohden testin lopussa.

Testattavia Daphnioita ei pitäisi jäädä kiinni vedenpintaan ainakaan kontrolliryhmässä.

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 Reagenssit

1.6.1.1 Testausaineliuokset

Varastoliuosten tarvittavat pitoisuudet valmistetaan liuottamalla ainetta jonoimattomaan tai kohdassa 1.6.1.2 määriteltyyn veteen.

Varastoliuos heikosti vesiliukoisista aineista voidaan tehdä ultraäänidispersion avulla tai tarpeen mukaan orgaanisten liuotteiden, emulgaattoreiden tai dispergoivien aineiden avulla. Tällaisia aineita käytettäessä kontrolliryhmän Daphnialtistetaan apuaineen sille pitoisuudelle, jota käytetään testattavan aineen korkeimmassa pitoisuudessa. Tällaisten apuaineiden pitoisuus saa olla korkeintaan 0,1 g litraa kohden.

Valitut pitoisuudet valmistetaan varastoliuosta laimentamalla. Korkeita pitoisuuksia testattaessa aine voidaan liuottaa suoraan laimennusveteen.

Testi suoritetaan pH-arvoa muuttamatta. Mikäli pH näyttää huomattavasti muuttuvan, on suositeltavaa säätää pH-arvo, toistaa testi ja raportoida tulokset. Tässä tapauksessa on varastoliuoksen pH-arvo säädettävä vastaamaan laimennusveden pH-arvoa, ellei tätä vastaan ole erityisiä syitä. HCl ja NaOH sopivat parhaiten tähän tarkoitukseen. Tämä pH-arvon säätäminen on tehtävä niin, ettei testattavan aineen pitoisuus varastoaineessa merkittävästi muutu. Säädöstä mahdollisesti aiheutuva testattavan aineen kemiallinen reaktio tai fysikaalinen saostuminen on raportoitava.

1.6.1.2 Viljely- ja laimennusvesi

Tässä testissä voidaan käyttää kaikenlaatuista Daphnian viljelyyn soveltuvaa joko luonnon- tai rekonstruoitua vettä.

On suositeltavaa, että testissä käytettävä viljelyvesi ja Daphnioiden viljelyvesi ovat samaa laatua, jolloin ei tarvita testiä edeltävää sopeutumisvaihetta.

1.6.2 Laitteet

Testissä käytetään normaalia laboratoriolaitteistoa. Testattavien liuosten kanssa kosketuksiin tulevien laitteiden on mieluummin oltava kokonaan lasia.

- happimittari (jossa on mikroelektrodi tai muu sopiva laite liuenneen hapen mittaamiseksi näytteistä, joiden tilavuus on pieni),
- lämpötilan säätämiseen tarvittavat laitteet,
- pH-mittari,
- veden kovuuden määrittäyslaitte.

1.6.3 Testattava organismi

Daphnia magna tai *Daphnia pulex*, testin alkaessa iältään yli kuusi tuntia ja alle 24 tuntia, kasvatettu laboratoriossa, ei näkyviä tauteja ja alkuperä tiedossa (esim. kasvatus, ennakkokäsittelyt ym.).

1.6.4

Testin suorittaminen

Varsinaista testiä voi edeltää tasotesti, jolla hankitaan tietoja varsinaisessa testissä käytettävistä pitoisuustasoista. Testisarjan ohella tehdään yksi kontrollitesti ilman testattavaa ainetta, mutta käyttäen testisarjassa mahdollisesti käytettyä apuainetta.

Daphniat altistetaan testattavalle aineelle alla selostetulla tavalla:

— kesto:

vähintään 24 tuntia,

— eläinten lukumäärä:

vähintään 20 eläintä pitoisuutta kohden jaettuna neljään viiden tai kahteen 10 eläimen ryhmään,

— täyttö:

vähintään 2 ml testattavaa liuosta kutakin eläintä kohden,

— testauspitoisuudet:

Daphniat pannaan vastavalmistettuun testiliuokseen, jossa on liuottimena käytetty mieluummin ainoastaan vettä. Pitoisuudet valmistetaan geometrisenä sarjana, jonka pitoisuussuhde on 1,8. Kontrolliryhmän lisäksi testataan pitoisuudet, jotka aiheuttavat 0 %:n ja 100 %:n liikkumattomuuden 24 tunnin kuluttua, ja sarja näiden välisiä liikkumattomuusvaikutuksia, jotta 24 tunnin EC_{50} voidaan laskea,

— vesi:

katso kohtaa 1.6.1.2,

— valo:

valon ja pimeyden vaihtelu on valinnaista; täysi pimeys hyväksytään,

— lämpötila:

testilämpötilan tulee olla 18 – 22 °C, mutta pysyä vakiona ± 1 °C:n rajoissa kussakin yksittäisessä testissä.

— ilmastus:

testattavia liuoksia ei saa ilmastaa niin, että syntyy kuplia,

— ruokinta:

ei ruokintaa.

Kontrolliryhmän ja kaikkien testattavien pitoisuuksien pH ja happipitoisuus mitataan testin jälkeen; testattavien pitoisuuksien pH-arvoa ei tule säätää.

Haihtuvia yhdisteitä testataan kokonaan täytetyissä suljetuissa astioissa, jotka ovat niin suuria, että happikatoa ei synny.

Daphniat tutkitaan viimeistään 24 tunnin kuluttua altistamisesta ja uudelleen 48 tunnin kuluttua, mikäli testiä on jatkettu.

2

TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Kunkin suositellun altistusajan kuolleisuusprosentti ja testattavan aineen pitoisuus merkitään logaritmi-paperille. Pisteisiin piirretään silmämääräisesti viiva ja todetaan, mikä pitoisuus vastaa 50 %:n vastetta.

Kun tuloksia on tarpeeksi, keskipitoisuus ja sen varmuusrajat ($p = 0,05$) voidaan arvioida tavanomaisin menetelmin.

EC₅₀-arvo pyöristetään yhteen (tai korkeintaan kahteen) merkitsevään numeroon.

Kun pitoisuus/prosentuaalinen vaste-käyrä on niin jyrkkä, ettei siitä voi laskea EC₅₀-arvoa, graafinen arvio on riittävä.

Kun kaksi toisiaan seuraavaa pitoisuutta 1,8 suhteessa antavat tulokseksi vain 0 %:n ja 100 %:n kuolleisuuden, nämä kaksi arvoa riittävät ilmoittamaan sen välin, johon EC₅₀-arvo asettuu.

Mikäli todetaan, että testattavan aineen stabiilitetti tai homogeenisuus ei pysy vakaana testin kuluessa, tämä on raportoitava ja otettava huomioon tulosten tulkinnessa.

3

RAPORTOINTI

Tutkimusselosteen tulee, mikäli mahdollista, sisältää:

- tiedot testattavasta organismista (tieteellinen nimi, kanta, toimittaja tai hankintapaikka, mahdollinen esikäsittely, kasvatusmenetelmä – mukaan lukien hankintapaikka, ruoan laatu ja määrä, ruokinnan tiheys),
- Daphnioiden määrä kutakin testattua pitoisuutta kohden,
- luettelo käytetyistä pitoisuuksista ja kaikki saatavissa olevat tiedot testattavan kemikaalin pitoisuuden stabiilitetista testausliuoksessa,
- selostus testausastioista, liuoksen tilavuus ja eläinten määrä kussakin astiassa,
- mikäli kemiallisia analyysejä tehdään, ilmoitetaan käytetyt menetelmät ja tulokset,
- laimennusveden alkuperä ja kemialliset pääominaisuudet
- varasto- ja testausliuosten valmistustapa,
- apuaineiden pitoisuudet (orgaaniset liuottimet, dispergoivat aineet jne.),
- valoisuusaika,
- korkein testattu pitoisuus, joka ei aiheuttanut liikkumattomuutta testin aikana,
- pienin testattu pitoisuus, joka aiheutti 100 %:n liikkumattomuuden testin aikana,
- kumulatiivinen liikkumattomuus nollakokeen, kontrolliryhmän ja kunkin pitoisuuden osalta suositeltuina tarkkailuajankohtina (24 tuntia tai 24 ja 48 tuntia),
- EC₅₀-arvot kunakin suositeltuna tarkkailuajana (95 %:n varmuusrajoin mikäli mahdollista),
- graafinen käyrä pitoisuus/prosenttivasteesta testin päättyessä,
- EC₅₀-arvojen määrittämisessä käytetyt tilastointimenetelmät,
- mikäli mahdollista, graafinen kaltevuuskäyrä pitoisuus/prosenttivasteesta 24 tunnin kohdalla 95 %:n varmuusrajoin,
- testiliuoksien liuenneen hapen pitoisuus, pH-arvot ja lämpötila,
- mahdollisen vertailuaineen nimi ja sen käytöstä saadut tulokset,
- näyttö siitä, että laatukriteerit on täytetty.

4

LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guidelines 202, Decision of the Council C (81) 30, Final.
- (2) ISO Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera – crustacea) ISO/6341.
- (3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera – crustacea) NFT 90 301 (April 1974).
- (4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).

*Lisäys***Rekonstruoitu vesi***Esimerkki sopivasta laimennusvedestä*

Kaikkien kemikaalien tulee olla analyttistä laatua.

Veden tulee olla hyvälaatuista tislattua vettä tai ionisoimatonta vettä, jonka johtavuus on alle $5 \mu\text{Scm}^{-1}$

Varastoliuokset

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (kalsiumklorididihydraatti): 11,76 g

Liuotetaan veteen ja tehdään 1 litran annos.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (magnesiumsulfaattiheptahydraatti): 4,93 g

Liuotetaan veteen ja tehdään 1 litran annos.

NaHCO_3 (natriumvetykarbonaatti): 2,59 g

Liuotetaan veteen ja tehdään 1 litran annos.

KCl (kaliumkloridi): 0,23 g

Liuotetaan veteen ja tehdään 1 litran annos.

Rekonstruoitu laimennusvesi

Sekoitetaan 25 ml kutakin neljää varastoliuosta, ja valmistetaan veden kanssa 1 litran annos.

Ilmastetaan, kunnes liuoksen hapen pitoisuus on sama kuin ilmakyllästyksen arvo.

pH-arvon tulee olla $7,9 \pm 0,3$. Tarvittaessa säädetään pH-arvo natriumhydroksidilla (NaOH) tai suolahapolla (HCl).

Näin valmistetun laimennusveden annetaan seistä noin 12 tuntia, eikä sitä saa enää ilmastaa.

Ca- ja Mg-ionien summa tässä liuoksessa on 2,5 mmol/l. Ca:Mg-ionien suhde on 4:1 ja Na:K-ionien 10:1. Tämän liuoksen kokonaisalkalisuus on 0,8 mmol/l.

Poikkeaminen laimennusveden valmistusohjeista ei saa muuttaa veden koostumusta eikä ominaisuuksia.

C. 3. HAJOAMINEN

BIOLOGINEN HAJOAMINEN: MODIFIOITU OECD:N SEULONTATESTI

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Menetelmän tarkoituksena on mitata vesiliukoisten, haihtumattomien orgaanisten yhdisteiden biologista hajoamista aerobisessa vesielatusaineessa, jossa testattava alkupitoisuus vastaa 5–40 mg liuennutta orgaanista hiiltä (DOC, dissolved organic carbon) litraa kohden. Jos orgaanisen hiilen analysaattoreiden toteamisrajat paranevat, alempien testipitoisuuksien käyttö voi olla eduksi varsinkin toksisten yhdisteiden osalta. Testattavan aineen orgaanisen hiilen pitoisuus on määritettävä.

Menetelmä soveltuu ainostaan sellaisten orgaanisten aineiden testaukseen, jotka kokeessa käytetyn pitoisuuden osalta täyttävät seuraavat edellytykset:

- ovat vesiliukoisia ainakin testattavan pitoisuuden osalta (5–40 mg DOC litraa kohden),
- joilla on mitätön höyrynpaine,
- eivät inhiboi bakteeritoimintaa,
- eivät merkittävästi adsorboidu lasipintoihin.

Testattavan aineen pääkomponenttien suhteellista osuutta koskevat tiedot auttavat tulosten tulkin-
nassa varsinkin niissä tapauksissa, joissa tulokset ovat alhaisia tai marginaalisia.

Tiedot kemikaalin toksisuudesta mikro-organismeille ovat hyödyksi alhaisten tulosten tulkin-
nassa ja sopivien testipitoisuuksien valinnassa.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Hajoaminen määritetään DOC-poistuman prosentteina suhteessa testattavaan aineeseen:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

jossa:

- D_t = hajoaminen DOC-poistuman prosentteina aikana t ,
- C_0 = DOC in alkupitoisuus viljelyaineessa (mg DOC litraa kohden),
- C_t = DOC-pitoisuus viljelyaineessa aikana t , (mg DOC litraa kohden),
- $C_{bl(0)}$ = DOC in alkupitoisuus nollakokeessa (mg DOC litraa kohden),
- $C_{bl(t)}$ = DOC-pitoisuus nollakokeessa aikana t (mg DOC litraa kohden).

1.3 Vertailuaineet

Sopivien vertailukemikaalien käyttö inokulaatin tehokkuuden tarkistamiseksi on suositeltavaa. Esi-
merkiksi aniliinia, natriumasetaattia tai natriumbentsoaattia voidaan käyttää tähän tarkoitukseen, ja
niiden tulee osoittaa ≥ 70 % DOC-poistumia 10 päivän kuluessa siitä päivästä, jolloin biologisen
hajoamisen todettiin ensimmäistä kertaa ylittävän 10 %. Näihin tuloksiin on päästävä kokeen 28
päivän keston aikana. Muussa tapauksessa testi on mitätön, ja se täytyy uusia käyttämällä toisesta
lähteestä saatua inokulaattia.

1.4 Testin periaate

Ennalta määrätty määrä yhdistettä liuotetaan epäorgaaniseen aineeseen (mineraaliravinneliuokseen, joka on väkevöity hivenaineista ja tärkeistä vitamiineista valmistetulla liuoksella), jotta saadaan 5–40 mg DOC/l vastaava pitoisuus. Liuokseen ympätään pieni määrä eri kantoja olevia mikro-organismeja, ja sitä ilmastetaan 20–25 °C:n lämmössä pimeässä tai korkeintaan hajavalossa.

Hajoamista seurataan 28 päivän mittaisen jakson ajan DOC-analyysien avulla.

Menettely tarkistetaan käyttämällä kontrolliainetta.

DOC-nollatesti, jossa ei käytetä testattavaa eikä kontrolliainetta, on tehtävä samanaikaisesti.

1.5 Laatuksiteerit

Testin toistettavuus on todettu OECD:n ja EEC:n rengasreaktioiden avulla.

Testattavan yhdisteen alin pitoisuus, jota tällä menetelmällä voidaan testata, määräytyy pääasiassa orgaanisen hiilianalyysin määrittäysrajojen (0,5 mg hiiltä litraa kohden nykyisellä tekniikalla) sekä ravinneliuoksessa esiintyvän liuennun orgaanisen hiilipitoisuuden perusteella.

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 Reagenssit

1.6.1.1 Vesi

Yleiskäyttöön liuottimena ionisoimatonta tai tislattua vettä, jossa ei ole toksisia aineita (erityisesti kuparia). Tislaamalla tai ioninvaihdolla ionisoimaton vesi soveltuu käytettäväksi.

Tislattu vesi saa sisältää korkeintaan 10 % testattavan aineen tuomasta orgaanisesta hiilestä.

Erittäin hyvin puhdistettu vesi on tarpeen 0–40 mg/l pitoisuusasteiden DOC-analyysihin. Saastuminen johtuu luontaisista epäpuhtauksista mutta myös ioninvaihtohartseista ja mikrobiologisesta kasvusta (bakteerit, valon vaikutuksesta syntynyt levä jne.). Vain yhtä vesierää saa käyttää yhdessä testisarjassa, ja se on tarkistettava etukäteen DOC-analyysillä. Sopivaa vettä voidaan tarvittaessa tuottaa UV-säteilyllä tai jollakin muulla tavoin.

1.6.1.2 Ravinneliuos

Litrassa ravinneliuosta on 1 ml kutakin seuraavaa liuosta a–f-vedessä (1.6.1.1) (AR tarkoittaa analyttistä reagenssia):

- | | |
|---|------------|
| a) KH_2PO_4 (kaliumdivetyfosfaatti): | 8,50 g AR |
| K_2HPO_4 (dikaliumpyetyfosfaatti): | 21,75 g AR |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (dinatriumpyetyfosfaattidihydraatti): | 33,40 g AR |
| NH_4Cl (ammoniumkloridi): | 20,00 g AR |

Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1).
pH-arvon tulisi olla 7,2.

- | | |
|--|------------|
| b) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (magnesiumsulfaattiheptahydraatti): | 22,50 g AR |
|--|------------|

Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml vesiliuos (1.6.1.1)

- | | |
|-------------------------------------|------------|
| c) CaCl_2 (kalsiumkloridi) | 27,50 g AR |
|-------------------------------------|------------|

Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1)

- d) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (rauta-(III)-kloridiheksahydraatti): 0,25 g AR
 Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1)
- e) Hivenaineliuos
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (mangaani-(II)-sulfaattitetrahydraatti)
 (= 30,23 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): 39,9 mg AR
- H_3BO_3 (boorihappo): 57,2 mg AR
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sinkkisulfaattiheptahydraatti): 42,8 mg AR
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (ammoniumheptamolybdaatti (IV))
 (= 36,85 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$): 34,7 mg AR
- Fe-kelaatti (FeCl_3 EDTA): 100,0 mg AR
- Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1).
 Hivenaineiden varastoliuoksen sterilointi 120 °C:ssa, 2 atm, 20 minuuttia.
- f) Vitamiiniliuos
- Biotiini: 0,2 mg AR
- Nikotiinihappo: 2,0 mg AR
- Tiamiini: 1,0 mg AR
- p-Aminobentsoehappo: 1,0 mg AR
- Pantoteenihappo: 1,0 mg AR
- Pyridoksamiini: 5,0 mg AR
- Syanokobalamiini: 2,0 mg AR
- Foolihappo: 5,0 mg AR
- Liuotetaan veteen ja valmistetaan 100 ml:n vesiliuos (1.6.1.1).
- Liuos suodatetaan steriiliksi 0,2 μm :n kalvosuodattimilla. Kohdassa 1.6.1.2 f mainitun liuoksen asemesta voidaan käyttää 15 mg hiivauutetta/100 ml vettä (1.6.1.1).

1.6.1.3 Kontrolliaineet

Aniliini (vastatislattu), natriumasetaatti, natriumbentsoaatti.

1.6.1.4 Elohopeakloridiliuos

1 % HgCl_2 vedessä (1.6.1.1).

1.6.2 Laitteet

1.6.2.1 Ravistin, johon mahtuu kahden litran erlenmeyerpulloja, ja jossa on joko automaattinen lämmönsäätö tai jota käytetään 20–25 °C:n vakioämpöhuoneessa.

1.6.2.2 Kapeakaulaisia kahden litran erlenmeyerpulloja (poimutetut tai uurrospullot ovat suositeltavia). Ennen käyttöä pullot on puhdistettava huolellisesti esim. alkoholisella vetykloridihapolla, huuhdottava ja kuivattava, jotta edellisten testien jätteiden aiheuttamalta kontaminaatiolta vältetään. Pullot on puhdistettava myös ennen ensimmäistä käyttöä, koska niissä voi olla epäpuhtauksia.

1.6.2.3 Kalvosuodatinlaite.

1.6.2.4 Kalvosuodattimia 0,2 μm .

1.6.2.5 Hiilianalysaattori.

1.6.3 Inokulaatin valmistus

Kaikista edempänä luetelluista neljästä lähteestä saatua inokulaattia voidaan käyttää edellyttäen, että sen elinvoimaisuus tarkastetaan kontrolliaineella (1.6.1.3).

1.6.3.1 Kertaalleen selkeytetystä jätevedestä tehty inokulaatti

Pääasiassa kotitalousjätteitä käsittelevän jätevedenpuhdistamon esiselkeytetystä jätevedestä otetaan näyte. Se on pidettävä aerobisissa olosuhteissa näytteenoton ja käytön välisen ajan. Inokulaatin valmistamiseksi näyte suodatetaan karkean suodattimen lävitse, ja ensimmäiset 200 ml heitetään pois. Suodatettu näyte pidetään aerobisena, kunnes se käytetään. Inokulaatti on käytettävä hankintapäivänä.

1.6.3.2 Maaperästä tehty inokulaatti

Tehdään seos, jossa on 100 g maata (viljavaa, ei steriiliä) ja 1 000 ml klooritonta juomavettä (maalaadut, joissa on hyvin suuri osuus savea, hiekkaa tai orgaanista hiiltä, eivät ole sopivia). Sekoituksen jälkeen seoksen annetaan asettua 30 minuuttia.

Supernatantti suodatetaan karkean suodatinpaperin lävitse, ja ensimmäiset 200 ml heitetään pois. Suodatettu neste ilmastetaan välittömästi ja ilmastusta jatketaan käyttöön asti. Inokulaatti on käytettävä sinä päivänä, jona se on tehty.

1.6.3.3 Pintavedestä tehty inokulaatti

Inokulaatti tehdään sopivasta pintavedestä. Näyte suodatetaan karkean suodattimen lävitse ja ensimmäiset 200 ml heitetään pois. Suodatettu näyte pidetään aerobisena, kunnes se käytetään. Inokulaatti on käytettävä sinä päivänä, jona se on tehty.

1.6.3.4 Yhdistetty inokulaatti

Yhtä suuri osa kutakin kolmea inokulaattia sekoitetaan hyvin, ja lopullinen inokulaatti otetaan tästä seoksesta.

Inokulaatin sopivuus tarkistetaan kontrolliaineen avulla (1.6.1.3).

1.6.4 Testin suorittaminen

Testattavilla aineilla ja kontrolliaineella (1.6.1.3) tehdään kaksi samanaikaista testiä. Lisäksi tehdään nollatesti inokulaatilla ilman testattavaa tai kontrolliainetta DOC-nollatestiarvojen määrittämiseksi.

Testattavasta aineesta ja vedestä (1.6.1.1) tehdään varastoliuos. Tätä varastoliuosta lisätään ravinneliuokseen (1.6.1.2) siten, että hiilipitoisuus on 5–40 mg DOC litraa kohden. Kontrolliainetestin (1.6.1.3) alkupitoisuus on 20 mg DOC litraa kohden.

Kahteen koeastiaan (1.6.2.2) pannaan 900 ml ravinneliuosta, ja litraa kohden lisätään 0,5 ml inokulaattia (1.6.3). Astian suu peitetään esimerkiksi alumiinifoliolla siten, ettei ilmanvaihto astiasta tarpeettomasti vaikeudu (vanu ei sovellu DOC-analyysin vuoksi). Sitten astiat asetetaan ravistimeen. Lämpötilan on oltava 20–25 °C koko testin ajan, ja astiat on suojattava valolta. Ilmassa eikä saa olla epäpuhtauksia ei toksisia aineita (kloorattuja liuottimia jne.).

Biologisen hajoamistestin kuluessa DOC-pitoisuudet määritetään kahdesti ensimmäisenä sekä 27. ja 28. päivänä. Vähintään kolmella lisäanalyyysillä (suunnilleen seitsemäntenä, 14. ja 21. päivänä) seurataan hajoamisen edistymistä.

Kutakin määritystä varten otetaan ainoastaan tarvittava määrä elatusainetta. Varsinaista hiilimääritystä edeltävään sentrifugointiin tai kalvosuodatukseen tarvittava määrä vaihtelee laitteesta riippuen. Elatusaineen haihtumishäviö korvataan lisäämällä vettä (1.6.1.1). Elatusainetta sekoitetaan hyvin ennen näytteen ottamista.

Astian seinämiin tarttunut aine liotetaan ennen näytteen ottamista. Kalvosuodatus tai sentrifugointi tehdään välittömästi. Suodatetut tai sentri-fugoidut näytteet on analysoitava samana päivänä; muussa tapauksessa ne on säilöttävä lisäämällä 0,05 ml HgCl_2 -liuosta (1.6.1.4) per 10 ml elatusainetta tai varastoimalla näytteet 2–4 °C:n lämpötilassa korkeintaan vuorokausi tai alle -18 °C:n lämpötilassa tätä pidemmän ajan.

Mikäli tasanne todetaan ennen 28. päivää, testi voidaan lopettaa. Jos hajoaminen on selvästi alkanut 28. päivään mennessä, mutta tasannetta ei ole vielä saavutettu, hyvän tutkimustavan mukaista on jatkaa testiä yhden tai kahden viikon ajan.

Kaikki toimenpiteet edellyttävät suurta huolellisuutta, ja astioiden, pipettien ym. puhtaudesta (mutta ei steriiliydestä) on varmistauduttava.

1.6.5 DOC-määritykset

Kalvosuodattimet ovat sopivia, mikäli on varmaa, että ne eivät vapauta hiiltä eivätkä adsorboi suodatettavaa ainetta.

Jos näytteet sentrifugoidaan, tämä on tehtävä $40\,000\text{ ms}^{-2}$ (~ 4 000 g) 15 minuutin ajan mieluummin jäähdytetyssä sentrifugissa, mutta joka tapauksessa alle 40 °C:n lämpötilassa.

Huomautus

Hyvin alhaisten pitoisuuksien TOC/DOC-differentiointi sentrifugoimalla ei näytä onnistuvan tyydyttävästi, koska joko kaikkia bakteereja ei saada poistetuksi tai hiili liukenee uudelleen bakteeriplasman osana. Suurempia pitoisuuksia ($\geq 10\text{ mg C/l}$) yhtä pienellä ympillä testattaessa sentrifugointivirhe näyttää olevan suhteellisen pieni.

Elatusaineesta otettu näyte (noin 30 ml) sentrifugoidaan tai suodatetaan välittömästi kalvosuodatinlaitteessa (1.6.2.3) käyttäen kohdassa 1.6.2.4 mainittuja kalvosuodattimia. Ensimmäiset 20 ml suodosta heitetään pois.

DOC-pitoisuus määritetään kahdesti jäljelle jäävästä suodatteesta (noin 10 ml) TOC/DOC-laitteen (1.6.2.5) avulla. Jollei suodatetta voida analysoida samana päivänä, se on säilöttävä kohdassa 1.6.4 selostetulla tavalla.

2 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Analyttiset tulokset merkitään liitteenä olevalle kaavakkeelle (lisäys 1), ja biologiset hajoamisarvot lasketaan kohdan 1.2 mukaisesti.

DOC-pitoisuudet lasketaan lähimpään 0,1 mg:aan litraa kohden. D_t -arvojen keskiarvot pyöristetään lähimpään kokonaiseen prosenttiin.

Hajoamistestin kulkua seurataan graafisesti käyrän avulla liitteenä olevan esimerkin mukaisesti (lisäys 2).

Hajoamistestin tulokset hyväksytään, mikäli seuraava ehto täytetään: samassa testisarjassa kontrolli-aineisto antaa tulokseksi $\geq 70\%$ DOC-poistumia 10 päivän kuluessa laskettuna siitä päivästä, jolloin biologisen hajoamistason todettiin ensimmäistä kertaa ylittävän 10 %. Tämä tulos on saavutettava testin 28 päivän keston aikana, muussa tapauksessa koko sarja hylätään.

3 RAPORTOINTI

3.1 Tutkimusselosteet

Tutkimusselosteen tulee, mikäli mahdollista, sisältää:

— Tulokset raportoidaan kaavakkeessa esitetyllä tavalla (lisäys 1).

- Hajoamistestin kulku esitetään graafisesti käyrän muodossa, josta näkyy viivevaihe, hajoamisvaihe, kaltevuus ja aikaikkuna ("aikaikkuna" tarkoittaa tässä 10 päivän jaksoa, joka alkaa siitä päivästä, jolloin biologisen hajoamistason todettiin ensimmäistä kertaa ylittävän 10 %).
- Näyttö testin pätevyydestä (kontrolliaineisto antaa tulokseksi ≥ 70 % DOC-poistuman 10 päivän kuluessa laskettuna siitä päivästä, jolloin biologisen hajoamistason todettiin ensimmäistä kertaa ylittävän 10 %, tulos saavutettava testin 28 päivän keston aikana).

3.2

Tulosten tulkinta

Testin tiukoista vaatimuksista johtuen alhainen tulos ei välttämättä tarkoita, että testattava yhdiste ei ole ympäristöolosuhteissa biologisesti hajoava, mutta se osoittaa, että tämän seikan varmistamiseksi tarvitaan lisätutkimuksia.

Testattavia kemikaaleja, jotka tässä testissä osoittavat korkeaa DOC-poistumaa, pidetään biologisesti helposti hajoavina edellyttäen, että tämä taso on saavutettu 10 päivän aikaikkunan puitteissa laskettuna siitä päivästä, jolloin biologinen hajoamistaso ensi kertaa ylitti 10 %.

4

LÄHDELUETTELO

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301E, Decision of the Council C (81) 30 Final.
- 2) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, N:o 2, 1979, s. 159–173.
- 3) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, N:o 1, 1981, s. 45–55.

Lisäys 1

Biologinen hajoaminen: modifioitu OECD:n seulontatesti

Testaava laitos

Testattava aine

Koe n:o

Testitiedot

Teoreettinen pitoisuus mg DOC/l

Huolimääritykset

	Pullo n:o		DOC-pitoisuudet x päivän kuluttua (mg/l)							
			0 (C ₀)							
<i>Nollakoe</i> Kivennäisravinneliuos ilman testattavaa ainetta mutta sisältäen inokulaatin	1	a ₁								
		a ₂								
		$C_{a(t)} = \frac{a_1 + a_2}{2}$								
	2	b ₁								
		b ₂								
		$C_{b(t)} = \frac{b_1 + b_2}{2}$								
<i>Koe</i> Kivennäisravinneliuos testattavan aineen ja inokulaatin kanssa	3	bl ₁								
		bl ₂								
		$C_{bl(t)} = \frac{bl_1 + bl_2}{2}$								

Käsittelemättömien tietojen arviointi

Pullo n:o	Tulosten laskenta	% DOC-poistuma x päivän kuluttua							
		0							
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0							
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0							
Keskiarvo (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0							

(*) D₁ ja D₂ -luvuista ei lasketa keskiarvoa, jos niiden välillä on huomattava ero.

Biologinen hajoaminen: modifioitu OECD:n seulontatesti (kaavake)

Testaava laitos
 Tutkimuksen johtaja
 Kokeen aloituspäivämäärä Koe n:o
 Testattava aine
 Kemiallinen rakenne
 Varastoliuos:

	mg/l TOC (*) mg/l	mg/l per liter TOC (*)	mg/l DOC (**)
Testattavan aineen pitoisuus			

(*) Ristiriita DOC- ja TOC-arvojen välillä viittaa testattavan aineen riittämättömään liukoisuuteen.
 (**) Kaikki DOC-arvot määritetään kalvosuodatuksen tai sentrifugoinnin jälkeen.

Hiilianalysaattori
 Inokulaatti

Testin tulos

$D_t = \dots\dots\dots$ % DOC-poistuma $\dots\dots\dots$ päivän kuluttua.

Tuloksen vahvistus

Kontrollikemikaali

Tulos $\dots\dots\dots$ % DOC-poistuma $\dots\dots\dots$ päivän kuluttua.

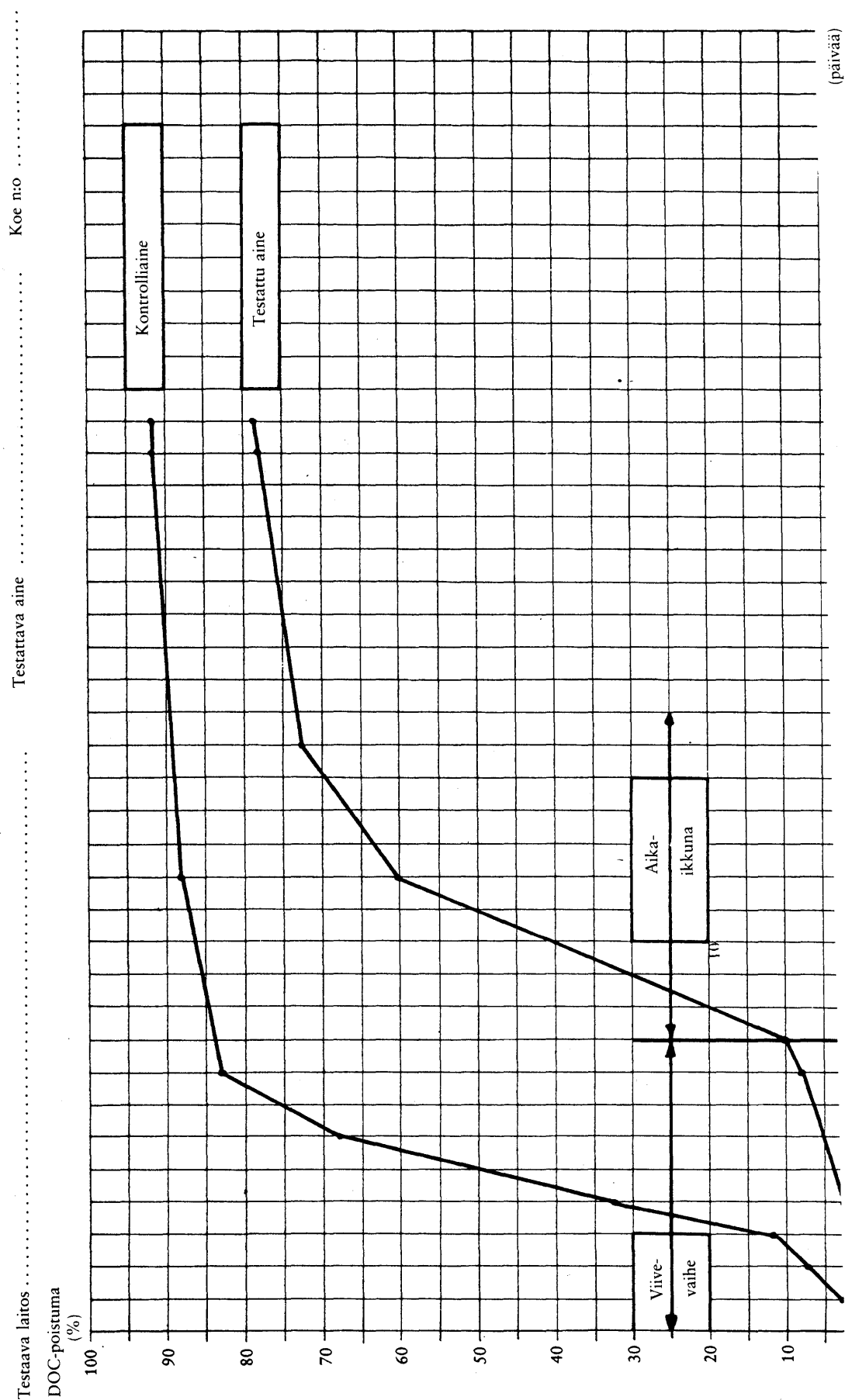
Vertailutestin n:o

Huomautuksia:

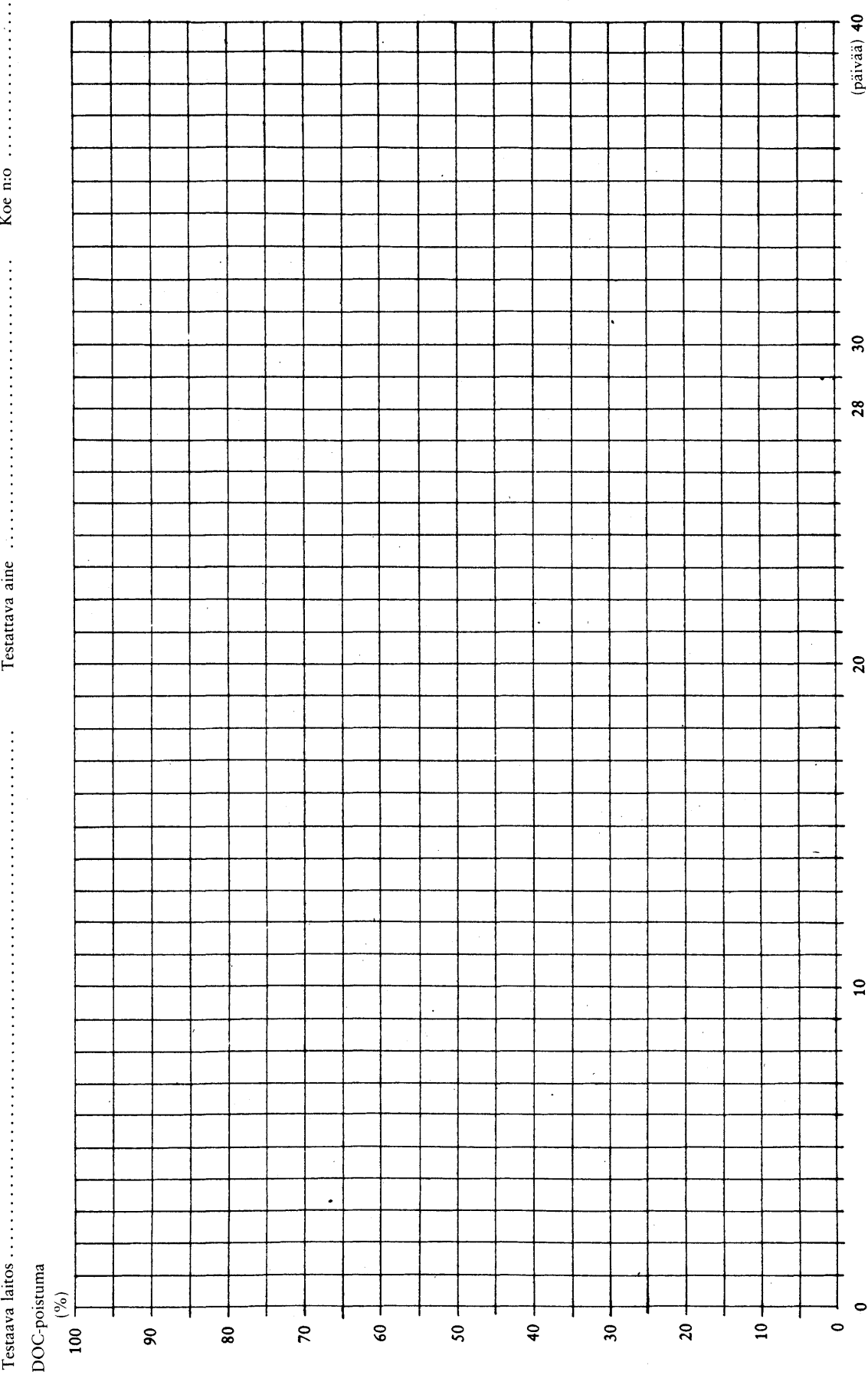
.....
 (Päiväys) (Allekirjoitus)

Lisäys 2

Modifioitu OECS:n seulantesti



Modifioitu OECS:n seulantesti



C. 4. HAJOAMINEN

BIOLOGINEN HAJOAMINEN: MODIFIOITU AFNOR-TESTI NF T 90/302

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Menetelmän tarkoituksena on mitata vesiliukoisten, haihtumattomien orgaanisten yhdisteiden biologista hajoamista aerobisessa vesielatusaineessa, jossa testattava alkupitoisuus vastaa 40 mg liuennutta orgaanista hiiltä (DOC, dissolved organic carbon) litraa kohden. Jos orgaanisen hiilen analyysointilaitteiden toteamisrajat paranevat, alempien testipitoisuuksien käyttö voi olla eduksi varsinkin toksisten yhdisteiden osalta.

Testattavan aineen orgaanisen hiilen pitoisuus on määritettävä.

Menetelmä soveltuu ainostaan sellaisten orgaanisten aineiden testaukseen, jotka kokeessa käytetyn pitoisuuden osalta täyttävät seuraavat edellytykset:

- ovat vesiliukoisia ainakin testattavan pitoisuuden osalta (40 mg DOC litraa kohden),
- joilla on mitätön höyrynpaine,
- eivät inhiboi bakteeritoimintaa,
- eivät merkittävästi adsorboidu lasipintoihin.

Testattavan aineen pääkomponenttien suhteellista osuutta koskevat tiedot auttavat tulosten tulkinnassa varsinkin niiden ollessa alhaisia.

Tiedot kemikaalin toksisuudesta mikro-organismeille ovat hyödyksi alhaisten tulosten tulkinnassa.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Hajoaminen määritetään DOC-poistuman prosentteina suhteessa testattavaan aineeseen:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

jossa:

- D_t = hajoaminen DOC-poistuman prosentteina aikana t ,
- C_0 = DOC in alkupitoisuus viljelyaineessa (mg DOC litraa kohden),
- C_t = DOC-pitoisuus viljelyaineessa aikana t (mg DOC litraa kohden),
- $C_{bl(0)}$ = DOC in alkupitoisuus nollakokeessa (mg DOC litraa kohden),
- $C_{bl(t)}$ = DOC-pitoisuus nollakokeessa aikana t (mg DOC litraa kohden).

1.3 Vertailuaineet

Sopivien kontrollikemikaalien käyttö inokulaatin tehokkuuden tarkistamiseksi on suositeltavaa.

Esimerkiksi aniliinia, natriumasetaattia tai natriumbentsoaattia voidaan käyttää tähän tarkoitukseen, ja niiden tulee osoittaa $\geq 70\%$ DOC-poistumia 28 päivän kuluessa; muussa tapauksessa testi on mitätön ja se täytyy uusialla käyttämällä toisesta lähteestä saatua inokulaattia.

Tämä testausmenetelmä käyttää glukosia nimenomaan inhibitiotestissä ja sillä tarkistetaan inokulaatin tehokkuus, joka voidaan myös tarkistaa aniliinin, natriumasetaatin ja natriumbentsoaatin avulla.

1.4 Testin periaate

Veteen liuotettuja orgaanisia aineita hajotetaan biologisesti kemiallis-organotrofisten mikro-organismien avulla käyttämällä niitä ainoana hiilen ja energian lähteenä. Näitä aineita tutkitaan niin, että niiden orgaanisen hiilen alkupitoisuus on 40 mg litraa kohden. Liuokseen jäävä orgaaninen hiili mitataan ainakin kolmen, seitsemän, 14 ja 28 päivän kuluttua. Samanaikaisesti tarkistetaan, onko testattavalla aineella inokulaattia inhiboiva vaikutus.

Menetelmä tarkistetaan käyttämällä kontrolliainetta.

1.5 Laatuksiteerit

Testin toistettavuus on todettu OECD:n ja EEC:n rengasreaktioiden avulla.

Testattavan yhdisteen alin pitoisuus, jota tällä menetelmällä voi testata, määräytyy pääasiassa orgaanisen hiilianalyysin määrittäysrajojen (0,5 mg hiiltä litraa kohden nykyisellä tekniikalla) sekä ravinneliuksessa esiintyvän liuenneen orgaanisen hiilipitoisuuden perusteella.

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 Reagenssit

Testissä käytettävien kemikaalien tulee olla puhtausasteeltaan analyysilaatua.

1.6.1.1 Tislattu vesi

Tislattu vesi saa sisältää korkeintaan 10 % testattavan aineen tuomasta orgaanisesta hiilestä.

1.6.1.2 Ravinneliuos

Elatusliuos valmistetaan alla esitetyllä tavalla käyttäen steriilejä aineita. Yksi litra liuosta valmistetaan liuottamalla tislattuun veteen (AR tarkoittaa analyttistä reagenssia):

(NH ₄) ₂ SO ₄ (ammoniumsulfaatti):	0,300 g AR
NH ₄ NO ₃ (ammoniumnitraatti):	0,150 g AR
KH ₂ PO ₄ (kaliumdivetyfosfaatti):	0,300 g AR
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (dinatriumvetyfosfaattidodekahydraatti):	2,000 g AR
MgSO ₄ ·7H ₂ O (magnesiumsulfaattiheptahydraatti):	0,050 g AR
CaCl ₂ ·2H ₂ O (kalsiumkloridihydraatti):	0,050 g AR
Hiivauute:	0,005 g AR

pH on 7,5 ± 0,1.

Koostumukseltaan seuraavanlaista hivenaineliuosta lisätään 1 ml:

FeSO ₄ ·7H ₂ O (rauta-(II)-sulfaattiheptahydraatti):	0,100 g (AR)
MnSO ₄ ·H ₂ O (mangaani-(II)-sulfaattimonohydraatti):	0,100 g (AR)
K ₂ OMoO ₄ (kaliummolybdaatti):	0,025 g (AR)
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O (dinatriumtetraaboraattidekahydraatti):	0,025 g (AR)

CuCl ₂ ·2H ₂ O (kupari-(II)-klorididihydraatti):	0,025 g (AR)
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (koboltti-(II)-nitraattiheksahydraatti):	0,025 g (AR)
ZnCl ₂ (sinkkikloridi):	0,025 g (AR)
NH ₄ VO ₃ (ammoniumvanadaatti):	0,010 g (AR)

Lisätään tislattua vettä, jotta saadaan 100 ml.

(Hivenaineliuosta voidaan säilyttää kuukausi + 1 – + 4 °C:n lämpötilassa).

Valmistetaan tarvittava määrä (1 litra) ja sekoitetaan. Ravinneliuos täytyy käyttää 12 tunnin kuluessa.

1.6.1.3 Kontrolliaineet

Aniliini (vastatislattu), natriumasetaatti, natriumbentsoaatti, glukoosi.

1.6.2 Laitteet

Tavanomaiset laboratoriolaitteet sekä:

- orgaanisen hiilen analyysintilaite,
- spektrofotometri,
- sentrifugi (4 000 g),
- ravistin, jolla on tarvittava ilmastus- ja ravistusteho,
- liuenneen hapen analyysintilaite, pH-mittari, 500 ml:n steriilejä, leveäsuisia erlenmeyerpulloja,
- steriili suodatinlaite (kalvosuodattimia 0,22 µm:n huokoisuus).

Lasiastiat on puhdistettava huolellisesti, niin ettei niihin jää orgaanisten tai toksisten aineiden jäämiä.

1.6.3 Inokulaatin valmistus

Saastuneesta pintavedestä ja kunnallisesta jätevedenpuhdistuslaitoksesta otetusta jätevedestä tehtyä kolmen näytteen seosta, jossa ei ole merkittäviä määriä joitakin erityisiä saasteita, otetaan tarvittava määrä. Kunkin näytteen bakteerimäärän on oltava vähintään 10⁵ bakteeria/ml.

Näytteet on käytettävä inokuloimiseen 12 tunnin kuluessa kuljetusaika mukaan lukien, eivätkä ne saa olla kuutta tuntia kauempaa ilmastamatta.

Näytteet suodatetaan paperin läpi suurten liukenemattomien aineosien poistamiseksi, suodos kerätään ja suodatetaan kalvosuodattimella, jonka huokoskoko on 0,22 µm.

Pesu suoritetaan jollakin sopivalla isotonisella liuoksella. Kalvosuodattimeen saostuneet bakteerit otetaan talteen pieneen määrään jotakin sopivaa isotonista liuosta ja sekoitetaan huolellisesti. Absorptio 620 nm:ssä mitataan, ja tämän perusteella päätellään bakteeripitoisuus suhteessa standardikäyrään, joka on saatu aikaisemmin laskemalla *Pseudomonas fluorescens* -kannan ATCC 15453 kiinteät keskiarvot. Tarvittava määrä liuosta lisätään, jotta bakteeripitoisuudeksi tulee (5 ± 3) × 10⁷/ml. Inokulaatti käytetään seuraavan tunnin kuluessa.

1.6.4 Testin suorittaminen

Inkubointi on suoritettava välttämällä voimakasta valoa 20–25 °C:n lämpötilassa lämpökaapissa, jossa ei ole toksisia höyryjä.

Seuraavat liuokset valmistetaan:

- 1 Liuos testattavasta aineesta ravinneliuokseen, siten että orgaanisen hiilen pitoisuus on 40 mg litraa kohden.
- 2 Glukoosiliuos ravinneliuokseen, siten että orgaanisen hiilen pitoisuus on 40 mg litraa kohden.
- 3 Liuos, jossa ravinneliuokseen on lisätty käytetyt pitoisuudet testattavaa ainetta ja glukoosia.
- 4 Tarpeellinen määrä ravinneliuosta pidetään myös saatavilla.

Nämä neljä liuosta sekoitetaan yksitellen ja ne steriloidaan suodattamalla kalvosuodattimen läpi.

Kalvosuodattimet on sopivia, mikäli on varmistauduttu siitä, että ne eivät vapauta hiiltä tai adsorboi ainetta suodatusvaiheen aikana.

Kaikki toimenpiteet on suoritettava steriilein menetelmin. Liuokset jaetaan ennalta steriloituihin koepulloihin seuraavalla tavalla:

Pullo 1 (testi):	150 ml liuosta 1
Pullo 2 (testi):	150 ml liuosta 1
Pullo 3 (testi):	150 ml liuosta 1
Pullo 4 (steriili kontrolli):	150 ml liuosta 1
Pullo 5 (glukoosikontrolli):	150 ml liuosta 2
Pullo 6 (inhibition valvonta):	150 ml liuosta 3
Pullo 7 (nollakoe):	150 ml liuosta 4

Pulloihin 1, 2, 3, 5, 6 ja 7 ympätään 1,5 ml inokulaattia ja ravistellaan käsin huolellisesti.

Kustakin pullosta otetaan 3–5 ml:n määräerä.

Määräeriä sentrifugoidaan 4 000 g:ssä 15 minuuttia alle 26 °C:n lämpötilassa.

Supernatantit otetaan talteen 0-ajan orgaanisen hiilen määrittämiseksi.

Pullot pidetään ravistimessa koko testin ajan. Liuunneen hapen pitoisuuden 3. päivänä pullossa 5 tulee olla vähintään 5 mg litraa kohden.

Sama orgaanisen hiilen analyysi, joka tehtiin 0-ajassa, tehdään pulloista 1, 2, 3, 5, 6 ja 7 ainakin kolmantena, seitsemäntenä, 14. ja 28. inkubaatiopäivänä. Siinä tapauksessa, että pullojen 1, 2 ja 3 hiilipitoisuus laskee 95 % alkupitoisuudesta, testi katsotaan päättyneeksi.

Mikäli tasanne todetaan ennen 28. päivää, testi voidaan lopettaa.

Jos hajoaminen on selvästi alkanut 28. päivään mennessä, mutta tasannetta ei ole vielä saavutettu, hyvän tutkimustavan mukaista on jatkaa testiä yhden tai kahden viikon ajan.

Testin lopussa tehdään pullon 4 orgaanisen hiilen analyysi samalla tavoin kuin 0-ajassa, ja steriiliys tarkistetaan ympäjäällä liuosta elatusnesteputkeen ja inkuboimalla 25 °C:ssa viisi päivää.

Viljelyaine:

— kuivattua hiivauutetta:	3 g
— pankreatiinikaseiinipeptonia:	6 g
— vettä:	1 000 ml

Viljelyaineen kuivat aineosat liuotetaan kiehuvaan veteen. -arvo säädetään tarvittaessa niin, että se steriloinnin jälkeen on $7,2 \pm 0,2$ 20 °C:ssa.

Mikäli orgaanisia hiilipitoisuusanalyysejä ei tehdä välittömästi, supernatantti säilytetään hermeettisesti suljetuissa lasipulloissa pimeässä 4 °C:n lämpötilassa korkeintaan vuorokausi. Ellei analyysejä tehdä vuorokauden kuluessa, supernatantti pakastetaan alle -18 °C:n lämpötilassa.

Haihtumisesta johtuvan vesihäviön korvaamiseksi pullon sisällön määrä tarkistetaan ennen kunkin näytteen ottamista ja tarvittaessa lisätään tislattua vettä, joka on steriloitu suodattamalla se 0,22 μm :n huokoskokoa olevan kalvosuodattimen lävitse, jotta saadaan sama tilavuus, joka mitattiin edellisen näytteenoton jälkeen.

2 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Analyttiset tulokset merkitään liitteenä olevalle kaavakkeelle (lisäys 1), ja biologiset hajoamisarvot lasketaan kohdan 1.2 mukaisesti.

Hajoamistestin tulokset hyväksytään, mikäli seuraavat ehdot täytetään:

- pullon 5 glukoosin hajoamistason on oltava vähintään 80 % 7. päivänä,
- kokeen päättyessä pullon 4 on edelleen oltava steriili,
- liuenneen hapen pitoisuuden 3. päivänä pullossa 5 on oltava vähintään 5 mg litraa kohden.

Pullon 6 glukoosin biologisen hajoamisasteen tulee 7. päivänä olla vähintään 75 % pullossa 5 havaitusta hajoamisasteesta. Ellei tätä rajaa saavuteta, on syytä olettaa, että testattavana olevalla aineella on bakteeritoimintaa inhiboiva vaikutus eivätkä käytetyt pitoisuudet sovellu testattavaksi tällä menetelmällä.

Huomautuksia

Prosentuaalinen hiilen poistuminen pulloissa 1, 2 ja 3 sekä toisaalta pullossa 4 mahdollistaa todetun hajoamisen syiden erittelyn:

- fysikaalis-kemiallinen toiminta pullossa 4,
- fysikaalis-kemiallinen sekä biologinen toiminta pulloissa 1, 2 ja 3.

3 RAPORTOINTI

3.1 Tutkimusseloste

Kaikki testattavaa ainetta, kontrolliainetta ja nollakokeita koskevat tulokset raportoidaan.

Seuraavat seikat tulee erityisesti mainita:

- aineen häviämisaste pullossa 4 testin päättyessä,
- havaitut inhibointivaikutukset,
- näyttö kokeen hyväksyttävyydestä,
- hajoamistestin kulku esitetään graafisesti käyrän muodossa, josta näkyy viivevaihe, hajoamisvaihe, kaltevuus ja aikaikkuna ("aikaikkuna" tarkoittaa tässä 10 päivän jaksoa, joka alkaa siitä päivästä, jolloin biologisen hajoamistason todettiin ensimmäistä kertaa ylittävän 10 %).

3.2 Tulosten tulkinta

Testin tiukoista vaatimuksista johtuen alhainen tulos ei välttämättä tarkoita, että testattava yhdiste ei ole ympäristöolosuhteissa biologisesti hajoava, mutta se osoittaa, että tämän seikan varmistamiseksi tarvitaan lisätutkimuksia.

Testattavia kemikaaleja, jotka tässä testissä osoittavat korkeaa DOC-poistumaa, pidetään biologisesti helposti hajoavina edellyttäen, että tämä taso on saavutettu 10 päivän aikaikkunan puitteissa laskettuna siitä päivästä, jolloin biologinen hajoamistaso ensi kertaa ylitti 10 %.

LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301A, Decision of the Council C (81) 30, Final.
 - (2) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, N:o 2, 1979, s. 159-173.
 - (3) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, N:o 1, 1981, s. 45-55.
 - (4) Afnor, Method for the evaluation in aqueous medium of the biodegradability of so-called "total" of organic products, T 90-302.
-

Lisäys 1

Kaavake modifioitua Afnor-testiä varten

Koe n:o
 Kokeen aloituspäivämäärä
 Testattava/kontrolliaine
 Teoreettinen testipitoisuus
 Hiilianalyysi

DOC-määrittelykset

Elatusaine	Pullo n:o	DOC-pitoisuus x päivän kuluttua (mg/l)				
		t = 0	3	7	14	28 (päivää)
Testi	1	1 _{C₀}	1 _{C₃}	1 _{C₇}	1 _{C₁₄}	1 _{C₂₈}
Testi	2	2 _{C₀}	2 _{C₃}	2 _{C₇}	2 _{C₁₄}	2 _{C₂₈}
Testi	3	3 _{C₀}	3 _{C₃}	3 _{C₇}	3 _{C₁₄}	3 _{C₂₈}
Testikeskiarvo	1-3	$\bar{C}_0$	$\bar{C}_3$	$\bar{C}_7$	$\bar{C}_{14}$	$\bar{C}_{28}$
Steriili kontrolli	4	4 _{C₀}	×	×	×	4 _{C₂₈}
Glukoosikontrolli	5	5 _{C₀}	5 _{C₃}	5 _{C₇}	5 _{C₁₄}	5 _{C₂₈}
Inhibitiokontrolli	6	6 _{C₀}	6 _{C₃}	6 _{C₇}	6 _{C₁₄}	6 _{C₂₈}
Nollakoe	7	7 _{C_{bl(0)}}	7 _{C_{bl(3)}}	7 _{C_{bl(7)}}	7 _{C_{bl(14)}}	7 _{C_{bl(28)}}

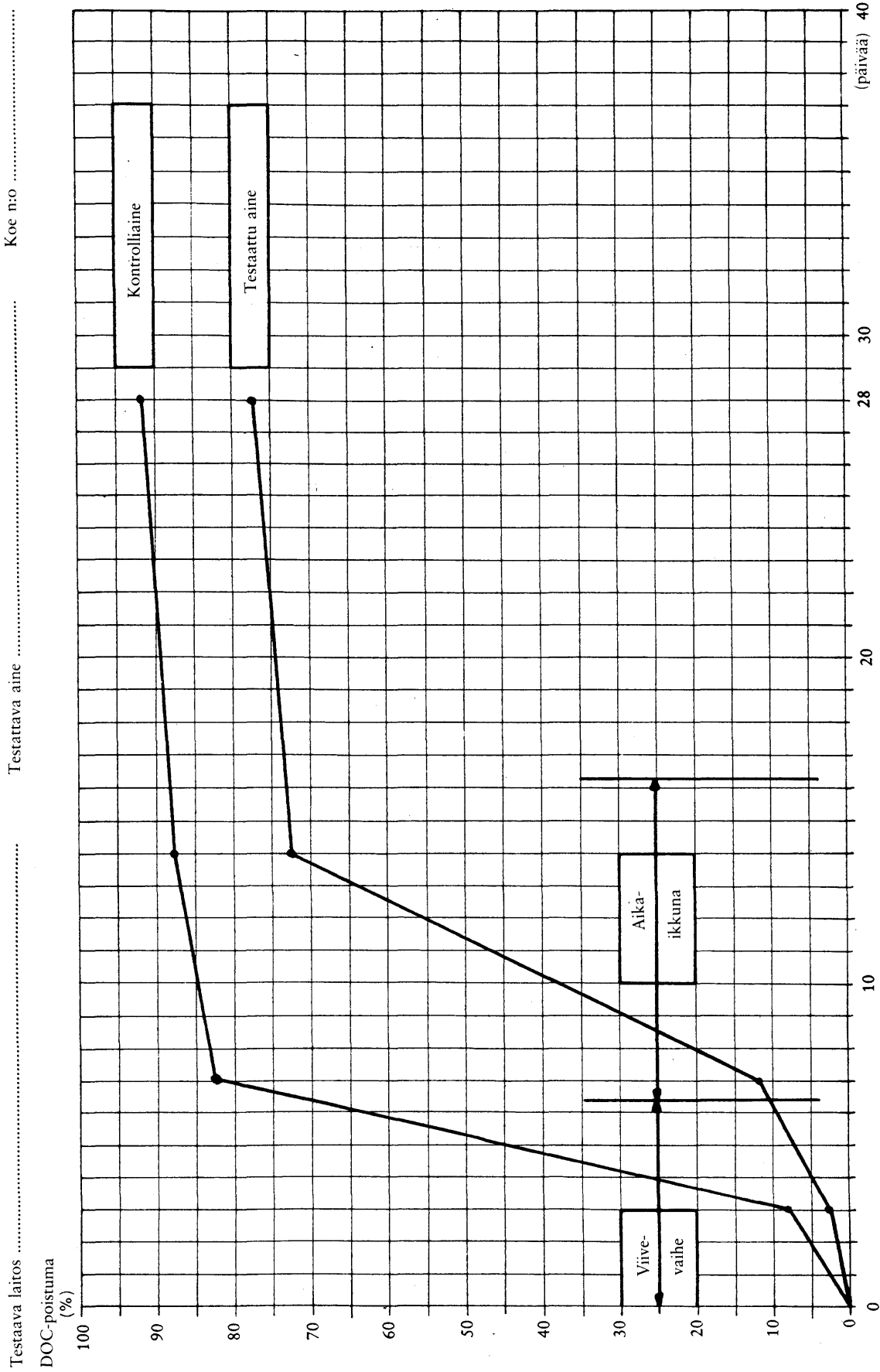
Tulosten arvioiminen

	t = 0	3	7	24	28 (päivää)
Testi $\left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
Glukoosikontrolli $\left[1 - \frac{5_{C_t} - C_{bl(t)}}{5_{C_0} - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
Inhibitiokontrolli $\left[1 - \frac{6_{C_t} - C_{bl(t)}}{6_{C_0} - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				

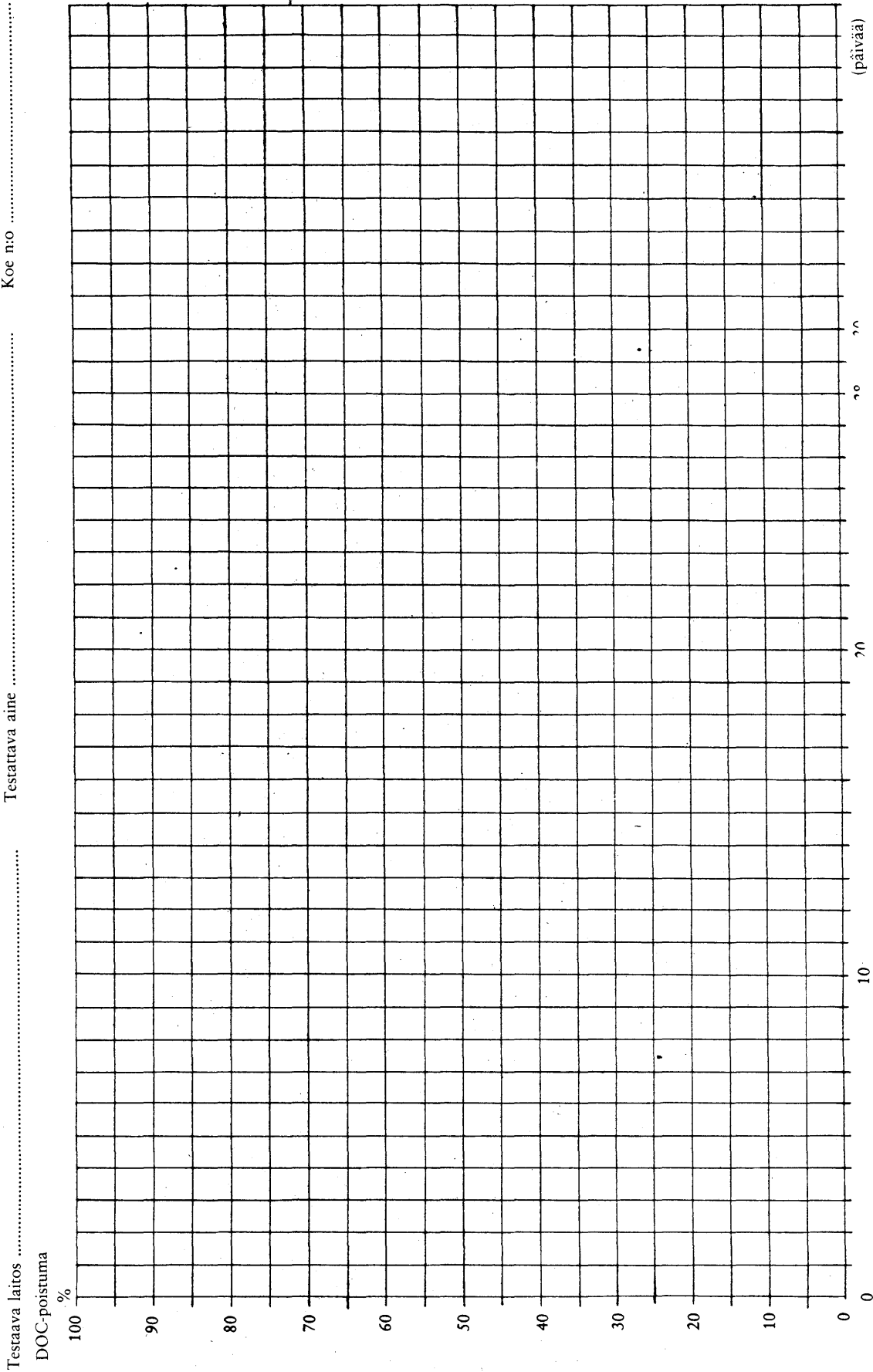
Hyväksyttävyys:

- liuennut happi 3. päivänä pullossa 5 mg litraa kohden
- biologinen hajoamisprosentti 7. päivänä pullossa 5 %
- biologinen hajoamisprosentti 7. päivänä pullossa 6 %
- steriili pullo 4

Lisäys 2
Modifioitu Afnor-testi NR T 90/302



Modifioitu Afnor-testi NR T 90/302



C. 5. HAJOAMINEN

BIOLOGINEN HAJOAMINEN: MODIFIOITU STURM-TESTI

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Menetelmän tarkoituksena on mitata haihtumattomien orgaanisten yhdisteiden biologista hajoamista aerobisessa vesielatusaineessa kahdella testattavalla alkupitoisuudella, jotka ovat 10 ja 20 mg litraa kohden (standardipitoisuudet).

Testattavan aineen orgaanisen hiilen pitoisuuden on oltava saatavilla (TOC-analyysi tai -arvio käyttämällä empiiristä kaavaa CO_2 :n teoreettisen saannon laskemiseksi).

Menetelmä soveltuu ainostaan sellaisten orgaanisten aineiden testaukseen, jotka kokeessa käytetyn pitoisuuden osalta täyttävät seuraavat edellytykset:

- joilla on mitätön höyrynpaine,
- jotka eivät inhiboi bakteeritoimintaa.

Tällä menetelmällä voi ainakin periaatteessa testata aineita, jotka ovat liukenemattomia testattavina pitoisuuksina.

Testattavan aineen pääkomponenttien suhteellista osuutta koskevat tiedot auttavat tulosten tulkin-
nassa varsinkin niissä tapauksissa, joissa tulokset ovat alhaisia.

Tiedot kemikaalin toksisuudesta mikro-organismeille ovat hyödyksi alhaisten tulosten tulkin-
nassa ja sopivien testipitoisuuksien valinnassa.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Hajoaminen määritetään aineen tuottamana CO_2 :na, prosenttina teoreettisesta CO_2 :sta (ThCO_2),
jonka sen olisi pitänyt tuottaa laskettuna aineen sisältämän orgaanisen hiilen määrästä.

1.3 Vertailuaineet

Sopivan kontrollikemikaalin käyttö inokulaatin tehokkuuden tarkistamiseksi on suositeltavaa.

Esimerkiksi aniliinia, natriumasetaattia tai natriumbentsoaattia voidaan käyttää tähän tarkoitukseen,
ja niiden tulee osoittaa $< 60\%$ CO_2 -tuotantoa 28 päivän kuluessa. Muussa tapauksessa testi on
mitätön, ja se täytyy uusaa käyttämällä toisesta lähteestä saatua inokulaattia.

1.4 Testin periaate

Testattavaa ainetta lisätään kemiallisesti määritettyyn nestemäiseen elatusaineeseen, inokuloidaan
jäteveden mikro-organismeilla ja ilmastetaan $20\text{--}25^\circ\text{C}$:ssa. Lämpötilasta pidetään kirjaa kokeen
kestäessä.

Vapautunut CO_2 otetaan talteen BaCO_3 :na, ja hajoamista seurataan CO_2 -analyysin 28 päivän
ajan. Sopivaan nollakontrollitestiin-testeihin vertailun jälkeen testattavan yhdisteen tuottama CO_2 :n
kokonaismäärä

määritetään testausajalta ja lasketaan sen prosentuaalinen osuus CO₂:n siitä kokonaismäärästä, jonka testattava materiaali olisi hiilipitoisuutensa perusteella voinut teoriassa tuottaa.

Menetelmä tarkistetaan käyttämällä inokulaatin kontrolliainetta (katso 1.6.1.3).

1.5 Laatuksiteerit

Testin toistettavuus on todettu OECD:n ja EEC:n rengasreaktioiden avulla.

Inokulaatin nollapullostasta mitattu endogeeninen CO₂-tuotanto on pääsyytä siihen, että testattavasta aineesta ei voi käyttää pienempiä pitoisuuksia kuin 5 mg litraa kohden. (Kun testiä sovelletaan ¹⁴C-merkittyy testattavaan aineeseen, pitoisuus voi olla paljon alhaisempi.)

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 Reagenssit

1.6.1.1 Korkealaatuinen vesi (HQW, high-quality water)

Kahdesti tislattua vettä, jossa ei ole toksisia aineita (erityisesti kuparia) ja jossa on alhainen hiilipitoisuus (> 2,0 mg/l TOC) ja resistiivisyys < 18 megaohmia/cm. Tislattu vesi saa sisältää korkeintaan 10 % testattavan aineen tuomaa orgaanista hiiltä.

1.6.1.2 Ravinneliuos

a) Varastoliuos

FeCl ₃ 6H ₂ O (rauta- (III) -kloridiheksahydraatti):	0,25 g
Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1):	
MgSO ₄ 7H ₂ O (magnesiumsulfaattiheptahydraatti):	22,50 g
Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1):	
CaCl ₂ (kalsiumkloridi):	27,50 g
Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1):	
KH ₂ PO ₄ (kaliumdivetyfosfaatti):	8,50 g
K ₂ HPO ₄ (dikaliumvetyfosfaatti):	21,75 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (dinatriumvetyfosfaattidihydraatti):	33,40 g
NH ₄ Cl (ammoniumkloridi):	1,70 g
Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1):	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (ammoniumsulfaatti):	40,00 g
Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1)	

b) Elatusaine

Elatusaine sisältää vesilitraa (1.6.1.1) kohden seuraavat reagenssit:

- 4 ml ylläolevaa rautakloridiliuosta,
- 1 ml ylläolevaa magnesiumsulfaattiliuosta,
- 1 ml ylläolevaa kalsiumkloridiliuosta,
- 2 ml ylläolevaa fosfaattiliuosta,
- 1 ml ylläolevaa ammoniumsulfaattiliuosta.

pH-arvon tulisi olla 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3 *Kontrolliaineet*

Aniliini (vastatislattu), natriumasetaatti, natriumbentsoaatti.

1.6.1.4 *Bariumhydroksidi 0,025 N (0,0125 M)*

Liuotetaan 4,0 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ litraan HQW:tä. Suodatetaan suodatinpaperin läpi ja kirkas neste suljetaan tiiviisti, jotta CO_2 :n absorptio ilmasta estyy. Liuosta kannattaa tehdä kerrallaan yli 5 litraa testisarjaa tehtäessä.

1.6.2 *Laitteet*1.6.2.1 *CO_2 -pesulaite*

Kolmea testimateriaalia varten 12 lasipullon sarja. (Lasipullolla tarkoitetaan tässä 4–5 litran ruskeata lasipulloa. Läpinäkyviä lasiastioita käytettäessä koe on suoritettava pimeässä.)

Neljä yhden litran muovipulloa, jotka sisältävät 700 ml 10 N (10M) NaOH:ta.

Yksi yhden litran erlenmeyerpullo, joka sisältää 700 ml 0,025 N (0,0125 M) $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -liuosta.

Yksi tyhjä yhden litran erlenmeyerpullo estämään nesteen siirtymistä. Pullosarja yhdistetään inerteillä putkilla paineilmalaitteeseen, josta ilmaa suihkutetaan vakionopeudella pesuliuosten läpi. Kutakin neljän lasipullon lisäsarjaa kohden lisätään yksi yhden litran muovipullo, joka sisältää 700 ml 10 N (10M) NaOH:ta.

1.6.2.2 *CO_2 :n tuottolaite*

Neljä 4–5 litran ruskeata lasipulloa kutakin testattavaa ainetta kohden.

Tulppia, taipuisaa letkua, muoviletkua.

1.6.2.3 *CO_2 :n absorptiopullot*

100 ml:n bariumhydroksidiabsorptiopulloja.

1.6.3 *Inokulaatin valmistus*

Testiorganismeina käytetään hyvin hoidetusta kunnallisesta jätevedenpuhdistamosta vastahankittua aktiivilietettä. Teollisuuden jätevettä ei puhdistamoon pitäisi tulla lainkaan tai vain hyvin vähäisessä määrin.

Laboratorioon tuotua aktiivilietettä ilmastetaan neljän tunnin ajan. Sekoitetusta nesteestä otetaan 500 ml:n näyte, jota homogenisoidaan kahden minuutin ajan mekaanisessa sekoittajassa. Sen jälkeen sen annetaan asettua puolen tunnin ajan.

Jos supernatantissa on puolen tunnin kuluttua edelleen suuria määriä lietteen kiinteitä aineosia, näytteen annetaan asettua vielä 30–60 minuuttia tai se sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin laskeutumisoimainaisuuksien parantamiseksi.

Supernatanttia dekantoidaan niin paljon, että kuhunkin CO_2 -koepulloon saadaan 1 % inokulaattia. Lietteen kiinteitä aineosia on vältettävä ottamasta mukaan, koska ne haittaavat CO_2 -tuotannon määrittystä.

On suositeltavaa arvioida supernatanttifraktiosta mikrobien lukumäärä. Inokulaatin tulisi yleensä sisältää 10^6 – 20×10^6 pesäkkeitä muodostavaa yksikköä millilitraa kohden.

Inokulaatti tulee käyttää valmistuspäivänä.

1.6.4 *Testin suorittaminen*

1.6.4.1 Varastoliuos

Testattavasta aineesta tehdään alkuvarastoliuos korkealaatuiseen veteen siten, että sen pitoisuus on 1 000 mg litraa kohden.

Varastoliukset valmistetaan testattavan aineen orgaanisen hiilipitoisuuden perusteella. Jos tämä ei ole tiedossa, varastoliuksen pitoisuudet valmistetaan painon perusteella.

Näyte sekoitetaan homogeeniseksi välttämällä vaahdottamista, joka voi väkevoittaa testattavaa ainetta. Testattaessa kiinteitä aineita voi olla tarpeen sulattaa ja sekoittaa koko näytepullon sisältö ennen määraerän ottamista. Tämä kokeen osa on erityisen tärkeä, koska biologisen hajoamisen prosentuaalisen osuuden laskeminen riippuu testausmenetelmän oikeasta hiilipitoisuudesta.

Varastoliuksen pH:ta ei tarvitse säätää, mikäli se on 3–10 välissä, koska testiaineen fosfaattipuskuri säätelee sitä. Mikäli pH ei ole tällä välillä, varastoliuksesta otettu määraerän pH säädetään arvoksi $7,0 \pm 1,0$ käyttämällä 1N (1M) HCl:a tai NaOH:a, ja liuosta sekoitetaan voimakkaasti lisättäessä happoa tai emästä.

Testattavan yhdisteen nimellisen orgaanisen hiilipitoisuuden varmistamiseksi varastoliuksesta (tai neutraloidusta määraerästä) voidaan analysoida orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus. Kontrollivarastoliuksen TOC-analyysi on tehtävä niin ikään.

Jos testattava aine on veteen liukenematonta, painoon tai tilavuuteen perustuva määrä testattavaa ainetta lisätään suoraan pulloon.

Jos testattava aine ei liukene testipitoisuutena, voi olla tarpeen turvautua erityistoimenpiteisiin kuten ultraäänidisersion, jotta testattava aine saadaan hajoamaan kunnolla.

1.6.4.2 Olosuhteet

Koska CO₂-testissä käytetään 1-prosenttista inokulaattia, laimennukset tehdään CO₂:n elatusaineseen.

Tämä tehdään helpoimmin seuraavasti:

- kuhunkin 4–5 litran lasipulloon lisätään 2 470 ml korkealaatuista vettä (HQP, katso kohta 1.6.1.1.),
- kuhunkin 4–5 litran lasipulloon lisätään 3 ml ammoniumsulfaattivarastoliuosta ja 3 ml kalsiumkloridivarastoliuosta, 6 ml fosfaattipuskurivarastoliuosta ja 12 ml ferrikloridiliuosta,
- kuhunkin 4–5 litran lasipulloon lisätään 30 ml aktiivilieteinokulaattia.

Tätä seosta ilmastetaan hiilidioksidittomalla ilmalla 24 tunnin ajan, jotta systeemi puhdistuu hiilidioksidista.

Ilmastusajan kuluttua kaikkiin kolmeen CO₂-absorptiopulloon lisätään 100 ml 0,025 N (0,0125 M) Ba(OH)₂:ia, ja ne yhdistetään sarjaan kunkin koepullon poistoilmaputkeen.

1.6.4.3 Testin suorittaminen

Testattava aine lisätään kahteen neljästä lasipullost koeajan alussa. Kustakin aineesta testataan kaksi pitoisuutta: 10 ja 20 mg litraa kohden.

Kutakin lasipulloa varten tarvittavan testattavan aineen varastoliuksen määrä lasketaan seuraavasti:

$$\text{millilitraa varastoainetta lasipulloa kohden} = \frac{B \times C}{A}$$

jossa

B = testattavan aineen pitoisuus koelasipullossa (mg/l),

A = testattavan aineen pitoisuus varastoliuksessa (mg/l),

C = lopullinen ainemäärä koelasipullossa (ml).

Näihin kahteen lasipulloon lisätään halutun pitoisuuden saavuttamiseksi tarvittava, yllä olevalla tavalla laskettu määrä varastoliuosta sekä niin paljon tislattua vettä, että pullossa on 473 ml (varastoliuosta + HQW:tä). Kolmanteen, nollakoe-kontrollina käytettyyn lasipulloon, jossa ei ole testattavaa ainetta, lisätään HQW:tä 473 ml.

Kussakin lasipullossa on nyt 3 000 ml.

Viimeiseen neljästä lasipullost lisätään kontrolliainetta, jonka pitoisuus on 20 mg litraa kohden.

Testi aloitetaan kuplittamalla hiilidioksiditon ilmaa liuoksen läpi 50–100 ml:n minuuttivauhdilla lasipulloa kohden (yksi tai kaksi kuplaa sekunnissa).

Veteen liukenemattomat testattavat aineet voidaan lisätä CO₂-koelasipulloon kuivana, jonka jälkeen sekoitetaan magneettisekoittimella. Kun testataan vaahtoavia kemikaaleja, hiilidioksiditon ilmakuplitus voidaan korvata yläpuolisella ilmastuksella ja magneettisekoituksella.

Lasipulloissa tuotettu CO₂ reagoi bariumhydroksidin kanssa ja saostuu bariumkarbonaatiksi; tuotettu CO₂-määrä määritetään titraamalla jäljellä oleva Ba(OH)₂ 0,05 N (0,05 M) standardisoidulla HCl:lla. Säännöllisin välein (joka toinen tai kolmas päivä) lähinnä lasipulloa oleva CO₂-absorptiopullo poistetaan titrattavaksi. Jäljellä olevat kaksi absorptiopulloa muutetaan yhtä paikkaa lähemmäksi lasipulloa, ja uusi absorptiopullo, joka sisältää 100 ml 0,025 N (0,0125 M) Ba(OH)₂:a, asetetaan sarjan viimeiseksi.

Titraukset suoritetaan tarvittaessa (ennenkuin BaCO₃-saostumia esiintyy toisessa absorptiopullossa) noin joka toisena päivänä ensimmäisen 10 päivän aikana ja joka viidentenä päivänä 28. päivään asti.

Lasipullojen pH mitataan jälleen 27. päivänä, ja sen jälkeen kuhunkin testilasipulloon lisätään 1 ml väkevoitua HCl:a epäorgaanisen karbonaatin poistamiseksi. Lasipulloja ilmastetaan yli yön, ja kustakin lasipullostä otetaan näyte DOC-analyysia varten. Viimeinen titraus suoritetaan 28. päivänä.

Titraukset 100 ml Ba(OH)₂-liuoksella suoritetaan, kun lähinnä lasipulloa olevat pullot on poistettu. Ba(OH)₂ titrataan 0,05 N (0,05M) HCl:lla käyttäen fenoliftaleiinia indikaattorina.

Testaus suoritetaan huoneenlämmössä 20–25 °C:ssa ja lämpötilasta pidetään kirjaa testiajalta.

Mikäli tasanne todetaan ennen 28. päivää, testi voidaan lopettaa.

Jos hajoaminen on selvästi alkanut 28. päivään mennessä, mutta tasannetta ei ole 28. päivänä saavutettu, hyvän tutkimustavan mukaista on jatkaa testiä yhden tai kahden viikon ajan.

1.6.5

CO₂-määrittäminen

Vaihtoehtoja CO₂:n tuotannon määrittämiseksi Ba(OH)₂-erottimien takaisintitrauksen ohella tulisi harkita. Se ei muuta testimenetelmän periaatteita ja voi mahdollistaa hajoamisen kulun jatkuvan mittaamisen.

Ensimmäinen askel tuotetun CO₂-määrän laskemisessa on tehdä korjaus testattavaa ainetta sisältävien lasipullojen endogeeniseen CO₂-tuotantoon. Kontrollilasipullo toimii nollakokeena, jolla oikaistaan bakteerien endogeenisen respiraation mahdollisesti tuottama CO₂. Testattavan aineen tuottama CO₂-määrä määritetään testi- ja nolla-Ba(OH)₂ -erottimien välisestä erosta (millilitroina titrausliuosta).

Kun käytetään 0,05 N (0,05 M) HCl:a absorptiopullon titraamiseen, jokainen titrattu HCl-millilitra vastaa 1,1 mg CO₂-tuotantoa.

2

TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Analyttiset tulokset merkitään liitteenä olevalle kaavakkeelle (katso lisäys 1), ja biologiset hajoamisarvot lasketaan kohdan 1.2 mukaisesti.

CO₂-pitoisuudet lasketaan lähimpään 0,1 mg:aan litraa kohden. Biologiset hajoamisarvot pyöristetään lähimpään kokonaiseen prosenttiin.

Hajoamistestin kulkua seurataan graafisesti käyrän avulla liitteenä olevan esimerkin mukaisesti (lisäys 2).

Hajoamistestin tulokset hyväksytään, mikäli seuraavat ehdot täytetään:

- Samassa testisarjassa kontrolliaineisto antaa < 60-prosenttisen biologisen hajoamistuloksen 28 päivän kuluessa (ellei näin käy, koko sarja hylätään ja uusitaan käyttäen toisesta lähteestä hankittua inokulaattia).
- Nollapullossa ei kehity merkittäviä määriä CO₂:a kokeen kuluessa (viljelyaineen, lasiastian ja ilman kontaminaatio). CO₂:n kokonaistuotanto testin lopussa saa olla korkeintaan 50 mg CO₂:a väliaineen kolmea litraa kohden.

3 TULOKSET

3.1 Tutkimuseloste

Tutkimuselosteen tulee, mikäli mahdollista, sisältää:

- tulokset, jotka raportoidaan kaavakkeessa esitetyllä tavalla (katso lisäys 2),
- hajoamistestin kulku esitettynä graafisesti käyrän muodossa, josta näkyy viivevaihe, hajoamisvaihe, kaltevuus ja aikaikkuna ("aikaikkuna" tarkoittaa tässä 10 päivän jaksoa, joka alkaa siitä päivästä, jolloin biologisen hajoamistason todettiin ensimmäistä kertaa ylittävän 10 %),
- testiolosuhteissa liukenemattomien aineiden dispersiomenetelmä,
- tiedot testattavien organismien hankintapaikasta ja käsittelystä ennen ympäätämistä,
- testausajan kuluessa kirjattu lämpötilaväli on mainittava,
- jos kohdassa 1.6.3 (inokulaatti) ehdotettu määrittäminen on tehty, ilmoitetaan mikro-organismien luku millilitraa kohden (pesäkkeitä muodostavat yksiköt, colony forming units (CFU), millilitraa kohden).
- näyttö testin hyväksyttävyydestä (kontrolliaineella <60 % hajoaminen 28 päivän kuluessa).

3.2 Tulosten tulkinta

Testin tiukoista vaatimuksista johtuen alhainen tulos ei välttämättä tarkoita, että testattava yhdiste ei ole ympäristöolosuhteissa biologisesti hajoava, mutta se osoittaa, että tämän seikan varmistamiseksi tarvitaan lisätutkimuksia.

Testattavia kemikaaleja, jotka tässä testissä antavat korkean hajoamistuloksen, pidetään biologisesti helposti hajoavina edellyttäen, että tämä taso on saavutettu 10 päivän aikaikkunan puitteissa laskettuna siitä päivästä, jolloin biologinen hajoamistaso ensi kertaa ylitti 10 %.

4 LÄHDELUETTELO

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301B, Decision of the Council C (81) 30, Final.
- 2) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, N: 2, 1979, s. 159 – 173.
- 3) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, N: 1, 1981, s. 45 – 55.
- 4) Larson, R.J., Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 38, 1979, s. 1153 – 1161.

Lisäys 1

Kaavake modifioitua Sturm-testiä varten

Koe no:

Testin alkamispäivä

Testattava/kontrolliaine

Teoreettinen testauspitoisuus

Hiilianalyysi

Teoreettinen ThCO_2

Lämpötilaväli kokeen aikana

CO₂-tuotanto:

Päiviä	CO ₂ todettu (mg)	CO ₂ kumulatiivinen (mg)	% ThCO ₂ :sta
28			

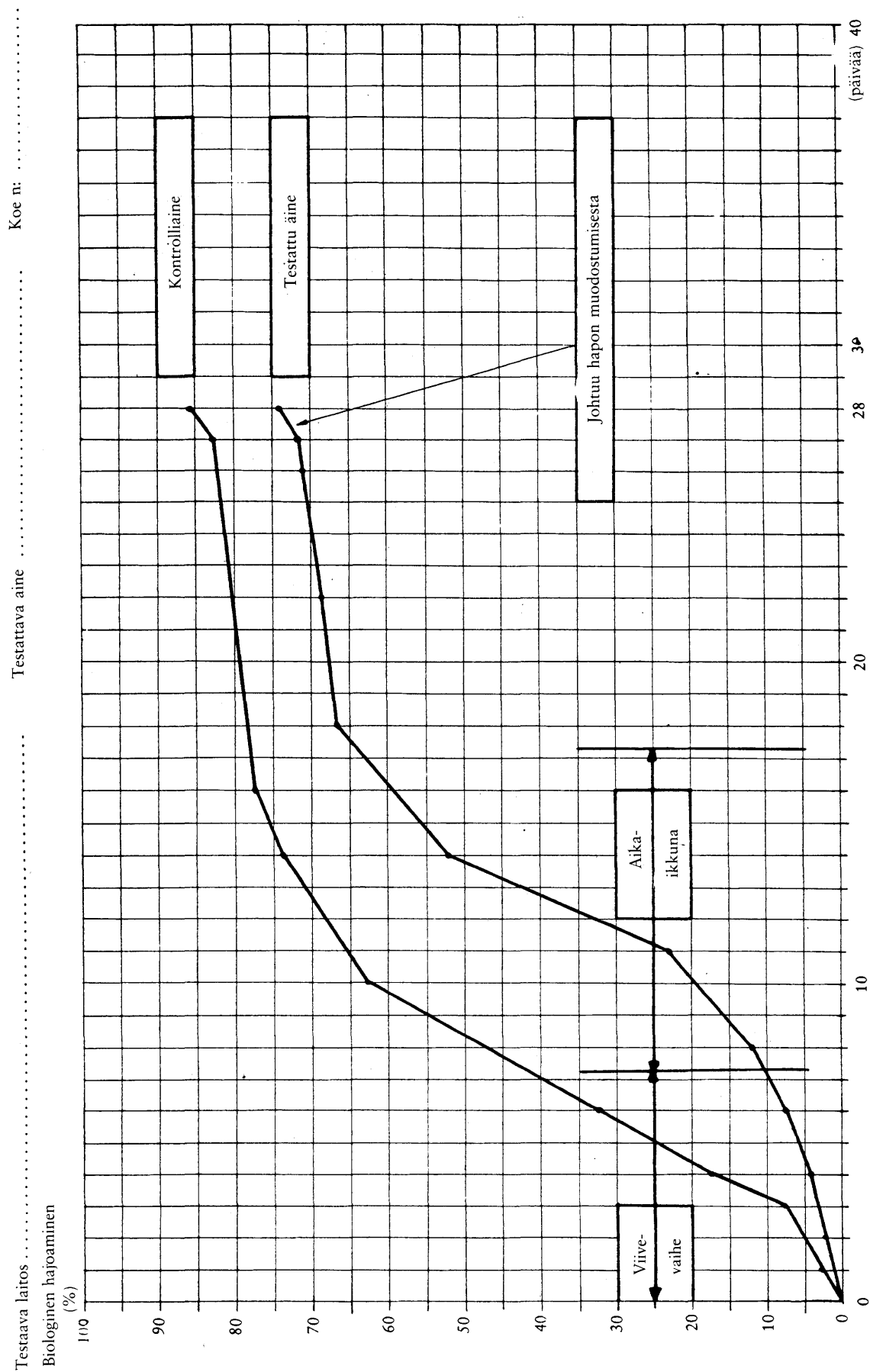
Hyväksyttävyys

— kontrolliaineen biologinen hajoamisprosentti

— nollapullossa kehittynyt CO₂:n kokonaismäärä

Lisäys 2

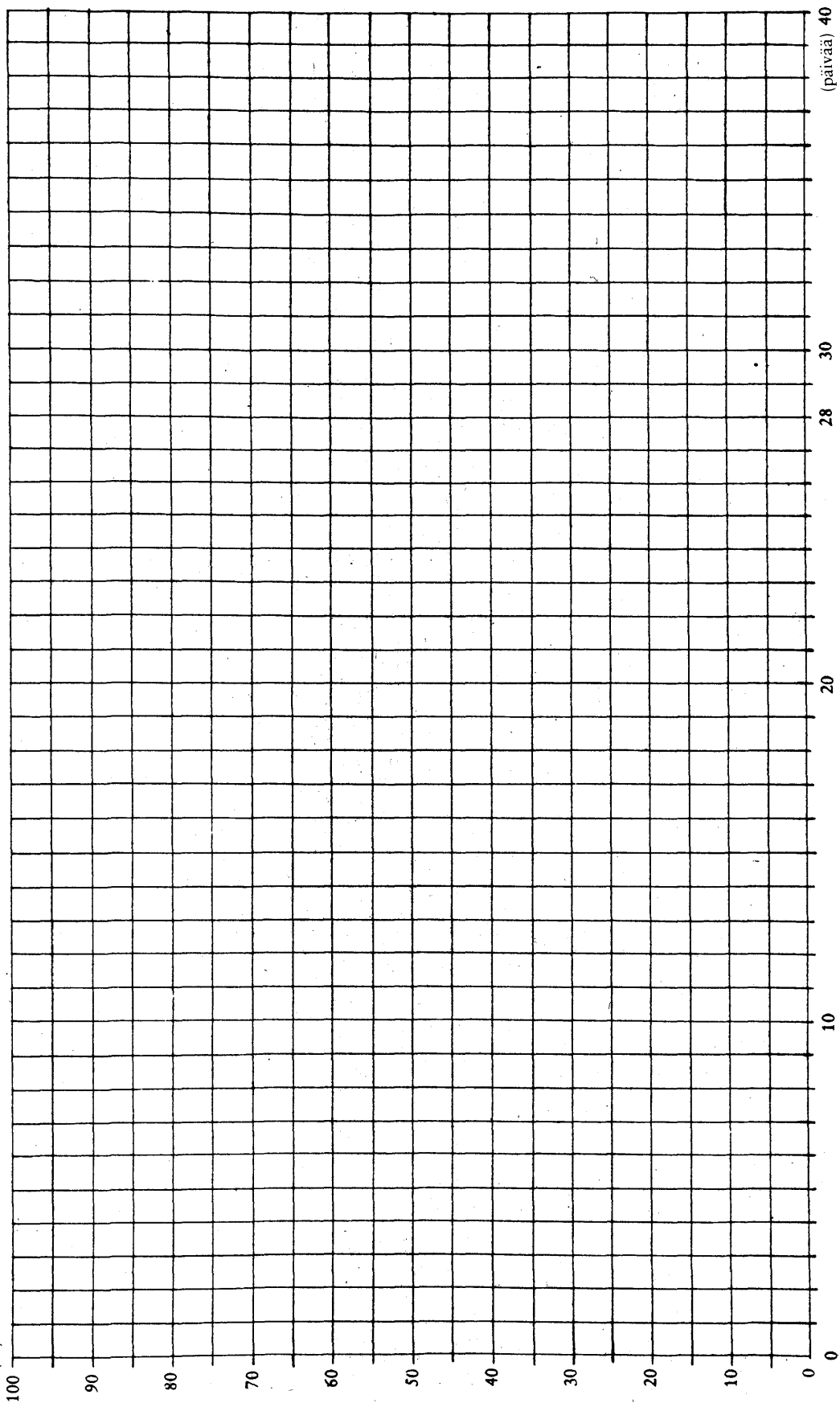
Modifioitu Sturm-testi



Modifioitu Sturm-testi

Testaava laitos Koe n:

Testattava

Biologinen hajoaminen
(%)

C. 6. HAJOAMINEN

BIOLOGINEN HAJOAMINEN: SULJETTU PULLOTESTI

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Menetelmän tarkoituksena on mitata orgaanisten yhdisteiden biologista hajoamista aerobisessa vesielatusaineessa testattavalla pitoisuudella 2—10 mg/l testattavaa ainetta (2 on standardipitoisuus).

Tämänhetkisen kehityksen valossa tämä testi on erityisen sopiva vesiliukoisten yhdisteiden biologisen hajoamisen arviointiin. Sillä voidaan ainakin periaatteessa testata myös haihtuvia ja huonosti liukenevia yhdisteitä.

Testattavan aineen empiirinen kaava on tiedettävä, jotta teoreettinen hapen tarve (theoretical oxygen demand, THOD) voidaan laskea. Jollei sitä tiedetä, testattavan aineen kemiallista hapen tarvetta (chemical oxygen demand, COD) voidaan käyttää vertailuarvona (katso lisäys 1).

Menetelmä soveltuu ainoastaan sellaisten orgaanisten aineiden testaukseen, jotka kokeessa käytetyn pitoisuuden osalta eivät inhiboi bakteeritoimintaa. Jos testattava aine ei liukene testipitoisuutena, voi olla tarpeen turvautua erityistoimenpiteisiin kuten ultraäänidispersioon, jotta testattava aine saadaan hajoamaan kunnolla.

Testattavan aineen pääkomponenttien suhteellisia osuuksia koskevat tiedot auttavat tulosten tulkinnaassa varsinkin niissä tapauksissa, joissa tulokset ovat alhaisia.

Tiedot kemikaalin toksisuudesta mikro-organismeille ovat hyödyksi alhaisten tulosten tulkinnaassa ja sopivien testipitoisuuksien valinnassa.

Tätä menetelmää voidaan käyttää BOD-määrittelyyn.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Biokemiallinen hapen tarve (biochemical oxygen demand, BOD) lasketaan nollakokeessa ja testattavan aineluoksen koeolosuhteissa syntyneen happikadon erona. Aineen pitoisuudella jaettuna (W/w) hapen nettokato saadaan milligrammoina BOD:tä ainemilligrammaa kohden.

Hajoaminen määritetään biokemiallisen hapen tarpeen suhteena joko teoreettiseen hapen tarpeeseen (THOD) tai kemialliseen hapen tarpeeseen (COD) ja ilmoitetaan prosentteina.

Huomautus

Joskus nämä kaksi laskutapaa (prosentti ThOD:stä tai prosentti COD:stä) eivät anna samoja tuloksia.

$$\text{biol.hajoamis-}\% \text{ (ThOD:stä)} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg testattavaa ainetta}}{\text{ThOD}} \times 100$$

tai

$$\text{biol.hajoamis-}\% \text{ (COD:stä)} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg testattavaa ainetta}}{\text{mg COD/mg testattavaa ainetta}} \times 100$$

jossa

ThOD = teoreettinen hapen tarve (laskemistapa lisäyksessä 1)

COD = kemiallinen hapen tarve, määritetään kokeellisesti.

1.3 Vertailuaineet

Sopivien kontrollikemikaalien käyttö inokulaatin tehokkuuden tarkastimiseksi on suositeltavaa.

Esimerkiksi aniliinia, natriumasetaattia tai natriumbentsoaattia voidaan käyttää tähän tarkoitukseen, ja niiden tulee osoittaa $\geq 60\%$ hajoamistulos 28 päivän kuluessa. Muussa tapauksessa testi on mitätön, ja se täytyy uusia käyttämällä toisesta lähteestä saatua inokulaattia.

1.4 Testin periaate

Tietty määrä yhdistettä liuotetaan epäorgaaniseen aineeseen (mineraaliravinneliuos), ja tavanomaisin pitoisuus on 2 mg testattavaa ainetta litrassa. Liuokseen ympätään pieni määrä eri kantoja olevia mikro-organismeja, ja sitä säilytetään suljetuissa pulloissa pimeässä 20–21 °C:n vakio-tilassa hauteessa tai lämpösuojuksessa.

Hajoamista seurataan happianalyysin 28 päivän kuluessa. Menetelmä tarkistetaan käyttämällä inokulaatin kontrolliainetta. Hapen nollakoe, jossa ei käytetä testattavaa eikä kontrolliainetta, on tehtävä samanaikaisella testillä.

Testattavasta aineesta voidaan samanaikaisesti tarkistaa inokulaatin inhibiiovaikutukset.

1.5 Laatuksiteerit

Testin toistettavuus on todettu OECD:n ja EEC:n rengasreaktioiden avulla.

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 Reagenssit

1.6.1.1 Tislattu tai ionisoimaton vesi

Tislattua tai ionisoimatonta vettä, joka sisältää korkeintaan 0,01 mg Cu/l, ilmalla kyllästettyä. Päivittäin tarvittava määrä (esim. 50 l) pidetään huoneenlämmössä mahdollisimman lähellä 20 °C:n lämpötilaa, ja sitä ilmastetaan voimakkaasti 20 minuutin ajan puhtaalla paineilmalla. Vesi on yleensä käyttövalmista oltuaan 20 °C:n lämmössä 20 tuntia. Happi määritetään kontrollitarkoituksiin. Pitoisuuden 20 °C:n lämpötilassa tulisi olla 9,09 mg O₂:a litraa kohden. Kaikki ilmalla kyllästetyn veden siirto- ja täyttötoimenpiteet on suoritettava lapolla synnyttämättä kuplia.

1.6.1.2 Ravinneliuos

a) Varastoliuos

KH ₂ PO ₄ (kaliumdivetyfosfaatti):	8,50 g
K ₂ HPO ₄ (dikaliumpytyfosfaatti):	21,75 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (dinatriumpytyfosfaattidihydraatti):	33,30 g
NH ₄ Cl (ammoniumkloridi):	1,70 g
Liuotetaan tislattuun veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos.	
pH-arvon tulisi olla 7,2.	
MgSO ₄ 7H ₂ O (magnesiumsulfaattiheptahydraatti):	22,50 g
Liuotetaan tislattuun veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos.	
CaCl ₂ (kalsiumkloridi):	27,50 g
Liuotetaan tislattuun veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos.	
FeCl ₃ 6H ₂ O (rauta — (III) — kloridihexahydraatti):	0,25 g
Liuotetaan tislattuun veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos.	

b) Testin elatusaine

Elatusaine sisältää vesilitraa (1.6.1.1) kohden 1 ml kutakin ylläolevaa varastoliuosta.

pH-arvon tulisi olla $7,2 \pm 0,2$.

1.6.1.3 Kontrolliaineet

Aniliini (vastatislattu), natriumasetaatti, natriumbentsoaatti

1.6.2 *Laitteet*

1.6.2.1 Voidaan käyttää kalibroituja lasitulpalla varustettuja 250—300 ml:n BOD-pulloja tai kalibroimattomia kapeakaulaisia lasitulpalla varustettuja 250 ml:n pulloja, joiden tilavuus on mitattava.

1.6.2.2 Useita litra-asteikolla varustettuja 2-, 3- ja 5-litran pulloja käytettäväksi kokeen valmistelussa ja BOD-pulloja täytettäessä.

1.6.2.3 1—10 ml:n pipettejä, suppiloita ja karkeata suodatinpaperia. Pulloja inokulaattin valmistusta varten.

1.6.2.4 Vesihaude pullojen pitämiseksi vakioämpötilassa ilman valoa.

1.6.3 *Inokulaatin valmistus*

Kaikista edempänä luetelluista neljästä lähteestä saatua inokulaattia voidaan käyttää edellyttäen, että sen elinvoimaisuus tarkistetaan kontrolliaineella (1.6.1.3).

1.6.3.1 Maaperästä tehty inokulaatti

Lannoittamattomasta puutarhamullasta veteen tehty suspensio. 100 g puutarhamultaa, jota ei äskettäin ole lannoitettu (koko vuoden vakaassa lämpötilassa olevasta kasvihuoneesta otettu multa on erityisen sopivaa) hajotetaan litraan klooritonta vesijohtovettä. Puolen tunnin kuluttua seos suodatetaan karkean suodatinpaperin läpi, ja ensimmäiset 200 ml suodosta heitetään pois. Seuraava suodoksen pääosa toimii inokulaattina (yksi tippa suippokärkisestä pipetistä lopullisen ainemäärän kutakin litraa kohden). Inokulaatti valmistetaan juuri ennen testiä. Se on ilmastettava, mikäli sitä säilytetään useita tunteja. Bakteerien määrä voidaan määrittää maljalla tai ravinnealustoilla. Lopullisessa ainemäärässä tulisi olla korkeintaan 10^3 — 10^5 bakteeria millilitraa kohden.

1.6.3.2 Esiselkeytetystä jätevedestä tehty inokulaatti

Inokulaatin valmistukseen tulisi käyttää jälkiselkeytyspuhdistamon (aktiivilietepuhdistamon tai biologista, pääasiassa kotitalousjätevettä käsittelevän suodattamon) jätevettä. Se on pidettävä aerobisissa olosuhteissa näytteenoton ja käytön välisen ajan. Inokulaatin valmistamiseksi näyte suodatetaan karkean suodatinpaperin lävitse, ja ensimmäiset 200 ml heitetään pois. Suodos pidetään aerobisena, kunnes se käytetään. Inokulaatti on käytettävä hankintapäivänä.

1.6.3.3 Laboratoriossa aktivoidusta lietteestä tehty inokulaatti

Voimakkaasti ilmastetusta laboratoriossa aktivoidusta liete-erästä saadusta jätevedestä valmistetaan inokulaatti kohdassa 1.6.3.2 selostetulla tavalla.

1.6.3.4 Yhdistetty inokulaatti

Yhtä suuri osa kutakin kolmea inokulaattinäytettä (1.6.3.1—1.6.3.3) sekoitetaan huolellisesti, ja lopullinen inokulaatti otetaan tästä seoksesta.

1.6.4 Testin suorittaminen

Kaikki inkubaatiota edeltävät toimenpiteet on tehtävä noin 20 °C:n lämpötilassa.

Pullosarjat (1.6.2.1) tehdään valmiiksi samanaikaisissa kokeissa suoritettavia testattavien ja kontrolliaineiden BOD-määrittäystä varten (katso lisäys 2). Mikäli kemialliset analyysit tehdään samanaikaisesti, tarvittava määrä pulloja — myös inokulaatin kontrollia ja nollakoetta varten — on varattava, esimerkiksi joko seitsemän tai 15 rinnakkaista pulloa yhtä testimateriaalia kohden 0, 5, 15 ja 28 päivän testeihin, sen jälkeen kun riittävä määrä vettä on valmistettu suurissa pulloissa (1.6.2.2).

Näihin suuriin pulloihin johdetaan lapolla tislattua vettä (1.6.1.1) noin yksi kolmannes niiden tilavuudesta. Sitten niihin pipetoidaan yksittäiset suolavarastoliuokset (1.6.1.2) suhteutettuina lopulliseen nestemäärään sekä niin paljon testattavaa tai kontrolliainetta, että lopulliseksi pitoisuudeksi tulee 2 ja joskus 5 tai 10 mg litraa kohden.

Koska litrassa 20-asteista laimennusvettä on liuennutta happea noin 9 mg, se rajoittaa testattavan aineen alkupitoisuuden noin 2 mg:aan litraa kohden, jotta substraatin oksidation jälkeinen happipitoisuus pysyy merkitseväenä.

Testattaessa huonosti liukenevia aineita ja aineita, joilla on alhainen ThOD, testit kannattaa suorittaa rinnakkain suuremmilla pitoisuuksilla.

Sen jälkeen liuoksiin pipetoidaan inokulaattia yksi tippa lopullisen ainemäärän kutakin litraa kohden. Nollakokeen suhteen menetellään samoin.

Lopuksi liuosta lisätään pullon pohjaan asti ulottuvalla lapolla, kunnes lopullinen määrä on saavutettu. Näin menetellen liuos sekoittuu riittävästi. Välittömästi tämän jälkeen vastaava pullosarja täytetään valmistetulla liuoksella, jota otetaan lapolla pullon alaosasta (ei pohjalta).

Nollakontrollit analysoidaan tai säilötään myöhempää analyysiä varten (O₂-määritys saostamalla MnCl₂:n (mangaani — (II) — kloridin) ja NaOH:n (natriumhydroksidin) kanssa.

Loput rinnakkaissarjat asetetaan 20-asteiseen vesihauteeseen, pidetään pimeässä ja otetaan hauteesta analysoitavaksi viiden, 15 ja 28 päivän kuluttua.

Jokaista sarjaa kohden tehdään täydellinen rinnakkaissarja, jolla määritetään nollakoe, happikato ilman inokulaattia ja kontrolliaine.

Inhibitiotesti:

Suljetulla pullotestillä voidaan aineiden inhibiiovaikutuksia testata helposti ja yksinkertaisesti.

Sarja 1: 2 mg/l helposti hajoavaa yhdistettä, esimerkiksi etyleenioksidilla kondensoitua rasva-alkoholia 1:10 molekyylisuhteessa tai jotakin kontrollikemikaalia.

Sarja 2: x mg litraa kohden testattavaa materiaalia (x on yleensä 2).

Sarja 3: 2 mg litraa kohden helposti hajoavia yhdisteitä sekä x mg litraa kohden testattavaa materiaalia.

Jos sarjan 3 BOD-arvot ovat pienemmät kuin sarjan 1 ja 2 yhteensä, testattavan materiaalin kyseessä olevalla pitoisuudella voidaan katsoa olevan bakteereja inhiboiva vaikutus. Tämä kontrollitesti on aina tehtävä, jos negatiivinen tai huono hajoamistulos näyttää testattavan materiaalin rakenteen perusteella epäjohtomukaiselta eli jos on syytä olettaa, että tulos johtuu inhibitiosta.

1.6.5 Liuenneen hapen määrittäminen

Liuennut happi määritetään kansainvälisesti tai kansallisesti hyväksytyn standardin mukaisella kemiallisella tai elektrokemiallisella menetelmällä.

2 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Analyttiset tulokset merkitään liitteenä olevalle kaavakkeelle (katso lisäys 3).

Hajoamistestin kulkua seurataan graafisesti käyrän avulla liitteenä olevan esimerkin mukaisesti (katso lisäys 4).

Hajoamistestin tulokset voidaan hyväksyä, mikäli ne täyttävät seuraavat ehdot:

- Samassa testisarjassa kontrolliaineisto antaa ≥ 60 -prosenttisen biologisen hajoamistuloksen 28 päivän kuluessa. Ellei näin käy, koko sarja täytyy hylätä.
- Ympäämättömässä pullossa happikato on korkeintaan 0,3 mg O_2/l viiden päivän kuluttua ja vastaavasti 0,4 mg O_2/l 28 päivän kuluttua; inokulaattia sisältävässä nollakokeessa korkeintaan 0,5 mg O_2/l viiden päivän kuluttua ja 0,6 mg O_2/l 15 ja 28 päivän kuluttua.

3 RAPORTOINTI

3.1 Tutkimusseloste

Tutkimusselosteen tulee, mikäli mahdollista, sisältää:

- tiedot, jotka raportoidaan kaavakkeessa esitetyllä tavalla (katso lisäys 3),
- hajoamistestin kulku esitetynä graafisesti käyrän muodossa, josta näkyy viivevaihe, hajoamisvaihe, kaltevuus ja aikaikkuna ("aikaikkuna" tarkoittaa tässä 10 päivän jaksoa, joka alkaa siitä päivästä, jolloin biologisen hajoamistason todettiin ensimmäistä kertaa ylittävän 10 %),
- COD-määritysmenetelmä,
- hapen mittausseloste,
- testiolosuhteissa huonosti hajoavien aineiden dispersiomenetelmä,
- näyttö testin hyväksyttävyydestä.

3.2 Tulosten tulkinta

Typpeä sisältävien yhdisteiden mahdollinen vaikutus tuloksiin on otettava huomioon.

Testin tiukoista vaatimuksista johtuen alhainen tulos ei välttämättä tarkoita, että testattava yhdiste ei ole ympäristöolosuhteissa biologisesti hajoava, mutta se osoittaa, että tämän seikan varmistamiseksi tarvitaan lisätutkimuksia.

Testattavia kemikaaleja, jotka tässä testissä yhteyttävät hyvin happea, pidetään biologisesti helposti hajoavina edellyttäen, että tämä taso on saavutettu 10 päivän aikaikkunan puitteissa laskettuna siitä päivästä, jolloin biologinen hajoamistaso ensi kertaa ylitti 10 %.

4 LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301D, Decision of the Council C (81) 30, Final.
- (2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, N:o 2, 1979, s. 159—173.
- (3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, N:o 1, 1981, s. 45—55.

Lisäys 1

Teoreettisen biokemiallisen hapen tarpeen laskeminen

Aineen nimeltä $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$, jonka molekyylipaino on MW, ThOD lasketaan seuraavasti:

$$\text{ThOD}_{\text{NH}_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{\text{MW}}$$

Tämä laskelma merkitsee, että C mineralisoituu CO_2 :ksi, H H_2O :ksi, P P_2O_5 :ksi ja Na Na_2O :ksi. Halogeeni eliminoiduu vetyhalidiksi ja typpi ammoniakiksi.

Esimerkki:

Glukoosi $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, MW = 180.

$$\text{ThOD} = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg O}_2/\text{mg glukoosia}.$$

Muiden kuin alkalimetallien suolojen molekyylipainot lasketaan olettaen, että suolat on hydrolysoitu.

Rikin hapetusasteen oletetaan olevan +6.

Esimerkki:

Natrium-n-alkyylibentseenisulfonaatti $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{SO}_3\text{Na}$, MW = 348.

$$\text{ThOD} = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} \times 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg O}_2/\text{mg ainetta}.$$

Typpeä sisältävistä aineista typpi voidaan eliminoida ammoniakkinä, nitriittinä tai nitraattina erilaisen teoreettisen biokemiallisen hapen tarpeen mukaan.

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{\text{MW}}$$

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{\text{MW}}$$

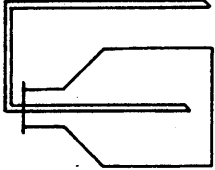
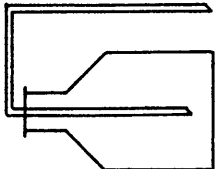
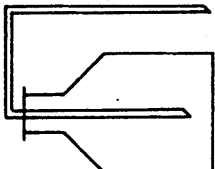
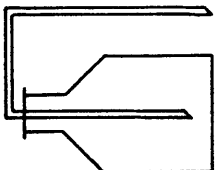
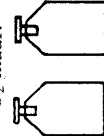
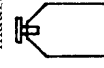
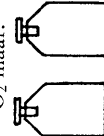
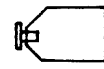
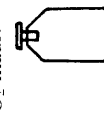
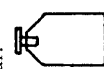
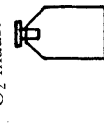
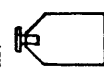
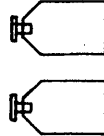
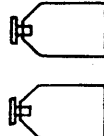
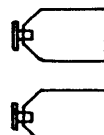
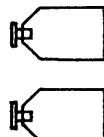
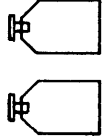
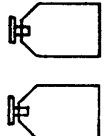
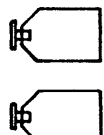
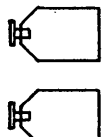
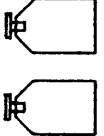
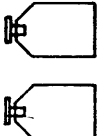
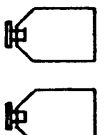
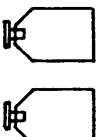
Oletetaan, että analyysillä oli todettu täydellinen nitraatin muodostuminen sekundaarisen amiinin ollessa kyseessä:

$(\text{C}_{12}\text{H}_{25})_2\text{NH}$, MW: 353

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg O}_2/\text{mg ainetta}.$$

Lisäys 2

Suljetum pullotestin pullojärjestysuunnitelma
(* = erityisanalyysi, mikäli saatavissa)

	Kontrollit		Määrittäykset	
	Tislattu vesi Suolaliuokset ↓ Mineraaliravinneliuos (hapen nollakoe-kontrolli)	Tislattu vesi Suolaliuokset Inokulointi ↓ Inokulointinollakoe	Tislattu vesi Suolaliuokset Inokulointi ↓ Kalibrointiyhdiste ↓ Kontrolliaine	Tislattu vesi Suolaliuokset Inokulointi ↓ Testattavat aineet
Analyysit				
Heti	O ₂ -määr.  * -määr. 	O ₂ -määr.  * -määr. 	O ₂ -määr.  * -määr. 	O ₂ -määr.  * -määr. 
5 päivää	 	 	 	 
15 päivää	 	 	 	 
28 päivää	 	 	 	 

*Lisäys 3***Biologinen hajoaminen: suljettu pullo testi (kaavake)**

Testaava laitos
 Tutkimuksen johtaja
 Kokeen aloituspäivämäärä Koe n:o
 Testattava aine
 Kemiallinen rakenne
 Analyysi (Winklerin menetelmä tai happielektrodi)
 Testattavan aineen ThOD tai COD mg O₂/milligramma
 Laimennusveden lämpötila ilmastamisen jälkeen
 Veden O₂-pitoisuus ilmastuksen ja seisotuksen jälkeen ennen testin-alkua mg O₂ litraa kohden
 Inokulaatti

Testin tulokset

D_t = BOD ilmaistuna ThOD-prosanttina 28 päivän kuluttua tai

D_t = BOD ilmaistuna COD-prosanttina 28 päivän kuluttua.

Tuloksen vahvistus

Kontrollikemikaali

Tulos BOD ilmaistuna ThOD-prosanttina 28 päivän kuluttua

Kokeen viitenumero

Huomautuksia:

Testauslaitos

Testimateriaali

Koe n:o

A: O₂-määritykset

	Pullo n:o		mg O ₂ /l x päivän kuluttua			
			0	5	15	28
Mineraaliravinneliuos ilman testattavaa ainetta ja ilman inokulaattia	O ₂ -kontrolli	c ₁		—	—	—
		c ₂		—	—	—
	Keskiarvo	$m_a = \frac{c_1 + c_2}{2}$				
Mineraaliravinneliuos ilman testattavaa ainetta mutta inokulaatin kanssa	1	c ₃				
	2	c ₄				
	Nollakoe-keskiarvo	$m_b = \frac{c_3 + c_4}{2}$				
Mineraaliravinneliuos testatavan aineen ja inokulaatin kanssa	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Testiaine-keskiarvo	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

B: O₂-poistumat (mg BOD/l) x päivän kuluttua

$$BOD_x = (m_0 - m_{bx}) - m_0 - m_{tx} (*)$$

	mg BOD/l x päivän kuluttua		
	5	15	28

(*) Tämä ero on tärkeä kokeen hyväksyttävyyden varmistamiseksi

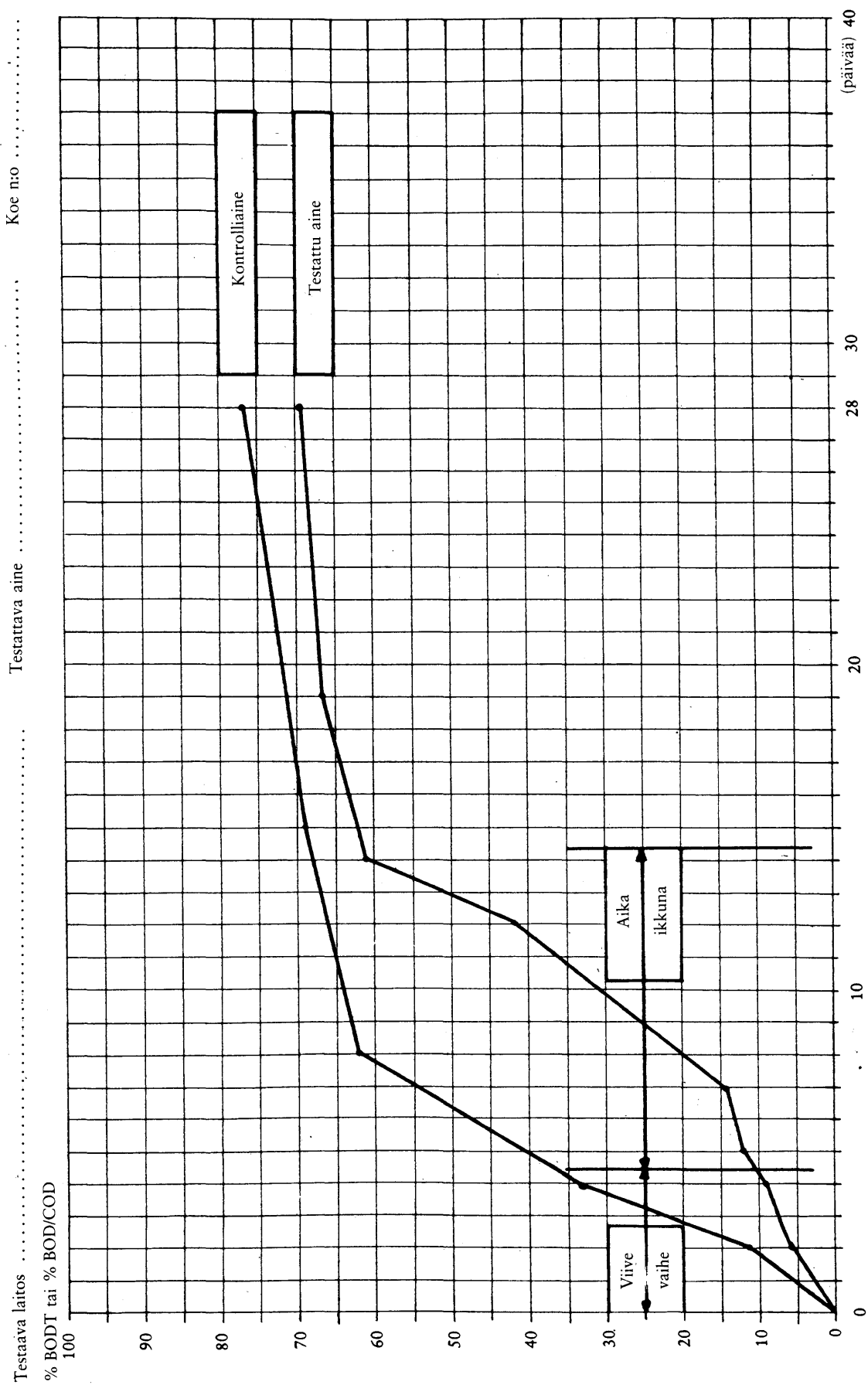
C: Tulosten arviointi

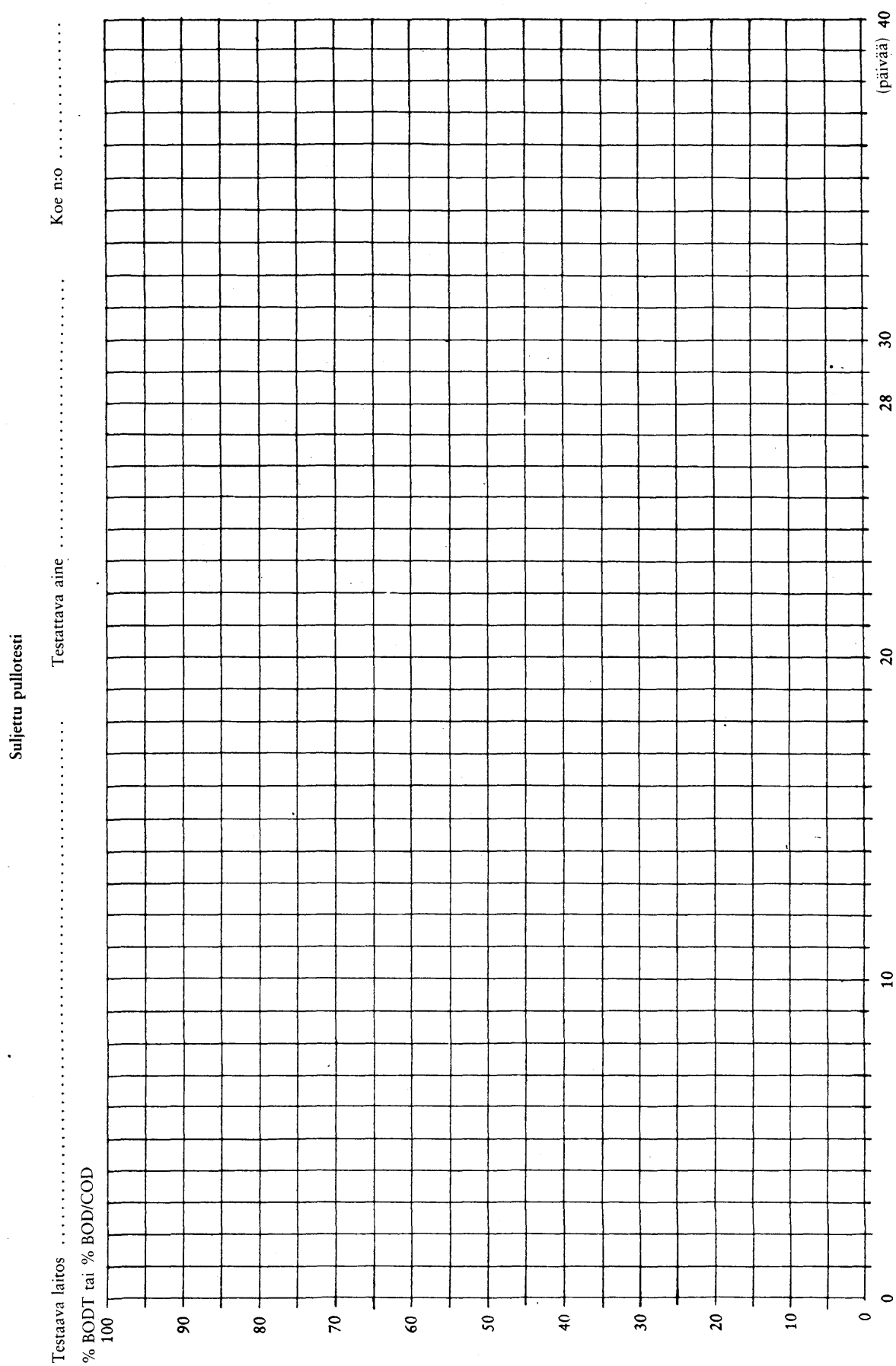
$$D_t = \frac{\text{mg BOD}_x/\text{l}}{\text{mg aine/l} \cdot \text{ThOD}} \cdot 100 \quad \text{tai} \quad \% \text{ BOD}_x/\text{COD} = \frac{\text{mg BOD}_x/\text{l}}{\text{mg aine/l} \cdot \text{COD}} \cdot 100$$

	x päivän kuluttua		
	5	15	28
% BOD/ThOD			
% BOD _x /COD			

Lisäys 4

Suljettu pullo testi





C. 7. HAJOAMINEN

BIOLOGINEN HAJOAMINEN: MODIFIOITU MITI-TESTI

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Menetelmän tarkoituksena on mitata orgaanisten yhdisteiden biologista hajoamista aerobisessa vesielatusaineessa respirometrillä, joka antaa lukemia biokemiallisesta hapen tarpeesta.

Testattavan aineen empiirinen kaava on tiedettävä, jotta teoreettinen hapen tarve (theoretical oxygen demand, THOD) voidaan laskea. Muussa tapauksessa voidaan käyttää COD-arvoa.

Menetelmä soveltuu ainoastaan sellaisten orgaanisten aineiden testaukseen, jotka kokeessa käytetyn pitoisuuden osalta täyttävät seuraavat edellytykset:

- joilla on mitätön höyrynpaine,
- jotka eivät inhiboi bakteeritoimintaa,
- jotka eivät reagoi CO₂-absorboimisaineen kanssa.

Jos testattava aine ei liukene testipitoisuutena, voi olla tarpeen turvautua erityistoimenpiteisiin kuten ultraäänidispersioon, jotta testattava aine saadaan hajoamaan kunnolla.

Tiedot kemikaalin toksisuudesta mikro-organismeille ovat hyödyksi alhaisten tulosten tulkinnassa ja sopivien testipitoisuuksien valinnassa.

Testattavan aineen pääkomponenttien suhteellisia osuuksia koskevat tiedot auttavat tulosten tulkinnassa.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

$$\text{prosentuaalinen hajoaminen} = \frac{\text{BOD} - B}{\text{ThOD (tai COD)}} \times 100 \%$$

tai

$$\text{prosentuaalinen hajoaminen} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

jossa:

BOD = testattavan yhdisteen (kokeellinen) biokemiallinen hapen tarve (milligrammoina) mitattuna BOD-käyrästä,

B = ympätyn peruselatusaineen hapen kulutus (kokeellinen) (milligrammoina) mitattuna BOD-käyrästä,

ThOD = teoreettinen hapen tarve, kun testattava yhdiste on täydellisesti hapettunut (teoreettinen) (milligrammoina),

S_a = testattavan yhdisteen jäljellä oleva määrä hajoamistestin päätyttyä (kokeellinen) (milligrammoina),

S_b = testattavan yhdisteen jäljellä oleva määrä nollakokeessa, jossa veteen on lisätty ainoastaan testattavaa yhdistettä (kokeellinen) (milligrammoina).

1.3 Vertailuaineet

Sopivien kontrollikemikaalien käyttö inokulaatin tehokkuuden tarkistamiseksi on suositeltavaa. Esimerkiksi aniliinia, natriumasetaattia tai natriumbentsoaattia voidaan käyttää tähän tarkoitukseen. Jos aniliinin hapen kulutuksesta laskettu hajoaminen on korkeintaan 40 % seitsemän päivän ja 65 % 14 päivän kuluttua, testi on mitätön. Testiä ei liioin hyväksytä, mikäli S_b:tä jää jäljelle suhteellisen vähän.

1.4 Testin periaate

Testattavat kemikaalit ovat ainoa orgaanisen hapen lähde, eivätkä mikro-organismit ole ennalta sopeutuneet testattaviin kemikaaleihin.

Testissä käytetään automaattista suljetun systeemin hapen kulutuksen mittauslaitetta (BOD-mittaria). Testattaviin kemikaaleihin ympätään mikro-organismeja testausastioissa. Testin aikana biokemiallisen hapen tarvetta mitataan BOD-mittarilla jatkuvasti. BOD-arvon perusteella lasketaan biologinen hajoaminen, ja lisäksi tehdään täydentäviä kemiallisia analyysejä, kuten liuenneen orgaanisen happipitoisuuden mittausta, jäljelle jäävien kemikaalien pitoisuus jne.

1.5 Laatuksiteerit

1.5.1 Toistettavuus

Yleensä hyvä ja erityisen hyvä sellaisia kemikaaleja testattaessa, joiden vesiliukoisuus on yli 0,1 g/l.

1.5.2 Herkkyys

A) Hapen kulutus: toteamisraja = 1 mg (mikro-organismien hapen kulutus).

B) Kemiallinen analyysi: riippuu analyysimenetelmien herkkyydestä.

1.5.3 Spesifisyys

Sopii kaikille kemikaaleille, joiden $(C)_{\text{vesi}}/(C)_{\text{ilma}} < 1$. Haihtuvia kemikaaleja testattaessa on käytettävä "muunneltua BOD-mittaria", jossa normaaliin BOD-mittariin on lisätty kapillaariputki (katso lisäys 1).

1.6 Testin kuvaus

1.6.1 Reagenssit

1.6.1.1 Tislattu vesi saa sisältää korkeintaan 10 % testattavan aineen tuomaa hiiltä.

1.6.1.2 Perusravinneliuos

Kutakin 3 ml:aa kohden liuosta A, liuosta B, liuosta C ja liuosta D lisätään vettä niin paljon, että saadaan 1 000 ml liuosta (käytetään ainoastaan ionisoimatonta vettä).

A) K_2HPO_4 (dikaliumvetyfosfaatti):	21,75 g
KH_2PO_4 (kaliumdivetyfosfaatti):	8,50 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (dinatriumvetyfosfaattidodekahydraatti):	44,60 g

- NH₄Cl (ammoniumkloridi): 1,70 g
Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1).
-arvon tulisi olla 7,2.
- B) MgSO₄·7H₂O (magnesiumsulfaattiheptahydraatti): 22,50 g
Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1).
- C) aCl₂ (kalsiumkloridi): 27,50 g
Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1).
- D) FeCl₃·6H₂O (rauta-(III)-kloridiheksahydraatti): 0,25 g
Liuotetaan veteen ja valmistetaan 1 000 ml:n vesiliuos (1.6.1.1).

1.6.2 Laitteet

BOD-mittari ja kuusi pulloa (kukin 300 ml)

Pullot 1 ja 2:

ionisoimatonta vettä 300 ml + testattavaa kemikaalia 30 mg.

Pullot 3 ja 4:

perusravinneliuosta 300 ml + aktiivilietettä 9 mg (kuiva-aine) + testattavaa kemikaalia 30 mg.

Pullo 5:

perusravinneliuosta 300 ml + aktiivilietettä 9 mg (kuiva-aine) + aniliinia tai muuta kontrolliainetta 30 mg.

Pullo 6:

perusravinneliuosta 300 ml + aktiivilietettä 9 mg (kuiva-aine).

1.6.3 Inokulaatin valmistus

1.6.3.1 Aktiiviliete

Lietteen näytteenottopaikat: lietenäytteitä otetaan periaatteessa ainakin 10:stä eri puolilla maata olevasta paikasta, pääasiallisesti sellaisilta alueilta, joilla voidaan olettaa erilaisia kemiallisia aineita käytettävän ja heitettävän pois.

Japanin kemiallinen biotestauskeskus (Japanese Chemical Biotesting Centre) esimerkiksi hankkii ja sekoittaa standardiaktiivilietteen seuraavista paikoista:

- kaupungin jätevedenpuhdistamo: kolme puhdistamo, jotka sijaitsevat Japanin pohjois-, keski- ja eteläosassa,
- teollisuuden jätevedenpuhdistamo: yksi puhdistamo, jossa käsitellään kemianteollisuuden jätteveä,
- joki: kolme jokea, jotka sijaitsevat Japanin pohjois-, keski- ja eteläosassa,
- järvi: yksi Japanin keskiosassa sijaitseva järvi,
- meri: kaksi Japanin sisämeriä.

Lietenäytteiden ottotaajuus: lietenäytteitä tulisi periaatteessa ottaa neljästi vuodessa (maaliskuussa, kesäkuussa, syyskuussa ja joulukuussa).

Näytteenottotapa:

- kaupungin jätevedet: litra kierrätettyä lietettä jätevedenpuhdistamolta,
- joet, järvet ja suot tai meri: litra pintavettä ja litra ilman kanssa kosketuksissa olevaa pintamaata rannalta.

Valmistus:

Eri paikoista kootut lietenäytteet yhdistetään yhteen astiaan, jota sekoitetaan. Seoksen annetaan asettua. Kelluvat aineosat poistetaan, ja supernatantti suodatetaan no 2 suodatinpaperilla. Suodoksen pH:ksi säädetään $7,0 \pm 1,0$ natriumhydroksidilla tai fosforihapolla, ja se siirretään viljelytankkiin ja ilmastetaan.

Viljely:

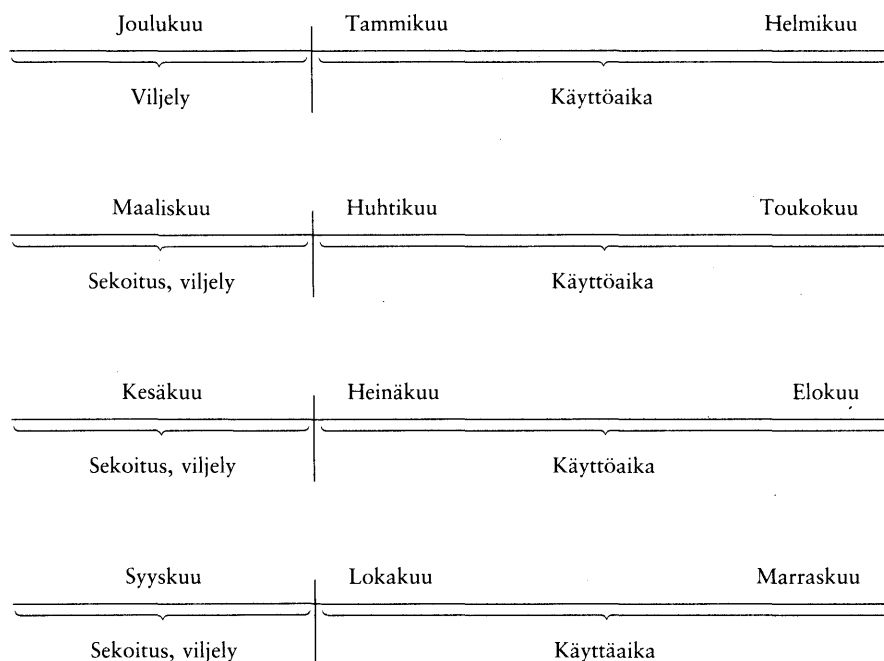
Puolisen tuntia ilmastuksen jälkeen noin kolmannes supernatantista poistetaan. Sama määrä 0,1-prosentista synteettistä jätevettä lisätään jäljellä olevaan osaan supernatanttia, ja seos ilmastetaan uudelleen (0,1 prosenttinen synteettinen jätevesi: 1 g glukosia, 1 g peptonia ja 1 g monokaliumfosfaattia liuotetaan litraan vettä ja pH:ksi säädetään $7,0 \pm 1,0$ natriumhydroksidilla). Tämä menettely toistetaan kerran päivässä. Viljely suoritetaan 25 ± 2 °C:n lämpötilassa.

Valvonta:

Viljelyn valvontatoimenpiteinä tarkistetaan seuraavat seikat, ja säätötoimenpiteet suoritetaan tarvittaessa:

- Supernatantin ulkonäkö: aktiivilietteen supernatantin tulee olla kirkasta.
- Aktiivilietteen laskeutumisominaisuudet: suuria hahtuvia sisältävällä aktiivilietteellä on oltava hyvät laskeutumisominaisuudet.
- Aktiivilietteen muodostumisaste: mikäli hahtuvien kasvua ei todeta, on joko lisättävä 0,1-prosenttisen synteettisen jäteveden määrää tai annostuskertoja.
- Supernatantin pH on $7,0 \pm 1,0$.
- Lämpötila: aktiivilietteen viljelylämpötila on 25 ± 2 °C.
- Ilmastuksen määrä: kun aktiivilietteen supernatanttia korvataan synteettisellä jätevedellä, viljelytankissa olevaa suspensiota on ilmastettava, jotta liuenneen hapen pitoisuus liuoksessa pysyy yli 5 mg:na litraa kohden.
- Aktiivilietteen mikroflora: kun aktiivilietettä tarkastellaan mikroskoopilla (100–400-kertaisella suurennoksella), eri lajien alkueläimiä sekä sameita hahtuvia on oltava näkyvissä.
- Tuoreen ja vanhan aktiivilietteen sekoittaminen: tuoreen ja vanhan aktiivilietteen pitämiseksi yhtä aktiivisina testissä käytettävän aktiivilietteen supernatantin suodosta sekoitetaan samaan määrään vastahankittua aktiivilietteen supernatantin suodosta, ja seos viljellään.
- Aktiivilietteen aktiiviteetin tarkistus: aktiivilietteen aktiiviteetti tarkistetaan standardiaineilla määrääjain, vähintään kerran kolmessa kuukaudessa, käyttäen alla selostettua testausmenetelmää. Varsinkin tuoreen ja vanhan aktiivilietteen seoksista on huolellisesti tarkistettava vanhan aktiivilietteen toiminta.

Esimerkki aktiivilietenäytteiden valmistuksesta ja käyttöajasta:



(Sama valmistus- ja käyttökaavio jatkuu).

1.6.4 Testattavan kemikaalin esikäsittely

Jos testattava yhdiste ei liukene veteen testipitoisuutena, se on jauhettava mahdollisimman hienoksi.

1.6.5 Testattavan aineen lisäys ja testin valmistelu

Seuraavat testausastiat (katso kohtaa 1.6.2) ovat tarpeen, ja ne säädetään testauslämpötilaan:

- 1) Kaksi vettä sisältävää testausastiaa, joihin lisätään 100 mg/l testattavaa yhdistettä (astiat 1 ja 2).
- 2) Kaksi perusravinneliuosta sisältävää testausastiaa, joihin lisätään 100 mg/l testattavaa yhdistettä; tämän seoksen pH:ksi säädetään 7 ennen kuin siihen ympätään aktiivilietettä (astiat 3 ja 4).
- 3) Yksi perusravinneliuosta sisältävä testausastia, johon lisätään 100 mg/l aniliinia tai jotakin muuta kontrolliainetta (astia 5).
- 4) Yksi pelkästään perusravinneliuosta sisältävä testausastia nollakoe-kontrollia varten (astia 6).

1.6.5.1 Inokulointi aktiivilietteellä

Inokulaattia lisätään astioihin 3, 4, 5 ja 6 siten, että esimerkiksi Japanin teollisuusstandardien (3) määrittelemä aineesta tehdyn seoksen pitoisuus on 30 mg/l.

1.6.5.2 Koeolosuhteet

Testattavien kemikaalien pitoisuus: 100 mg/l.

Aktiivilietteen pitoisuus: 30 mg/l.

Koelämpötila: 20–25 °C.

Aika: 28 päivää.

Testi tehdään pimeässä. Joka päivä tarkistetaan lämpötila ja viljelytankin sisällön värinmuutos ja sekoitetaan voimakkaasti mekaanisella sekoittajalla.

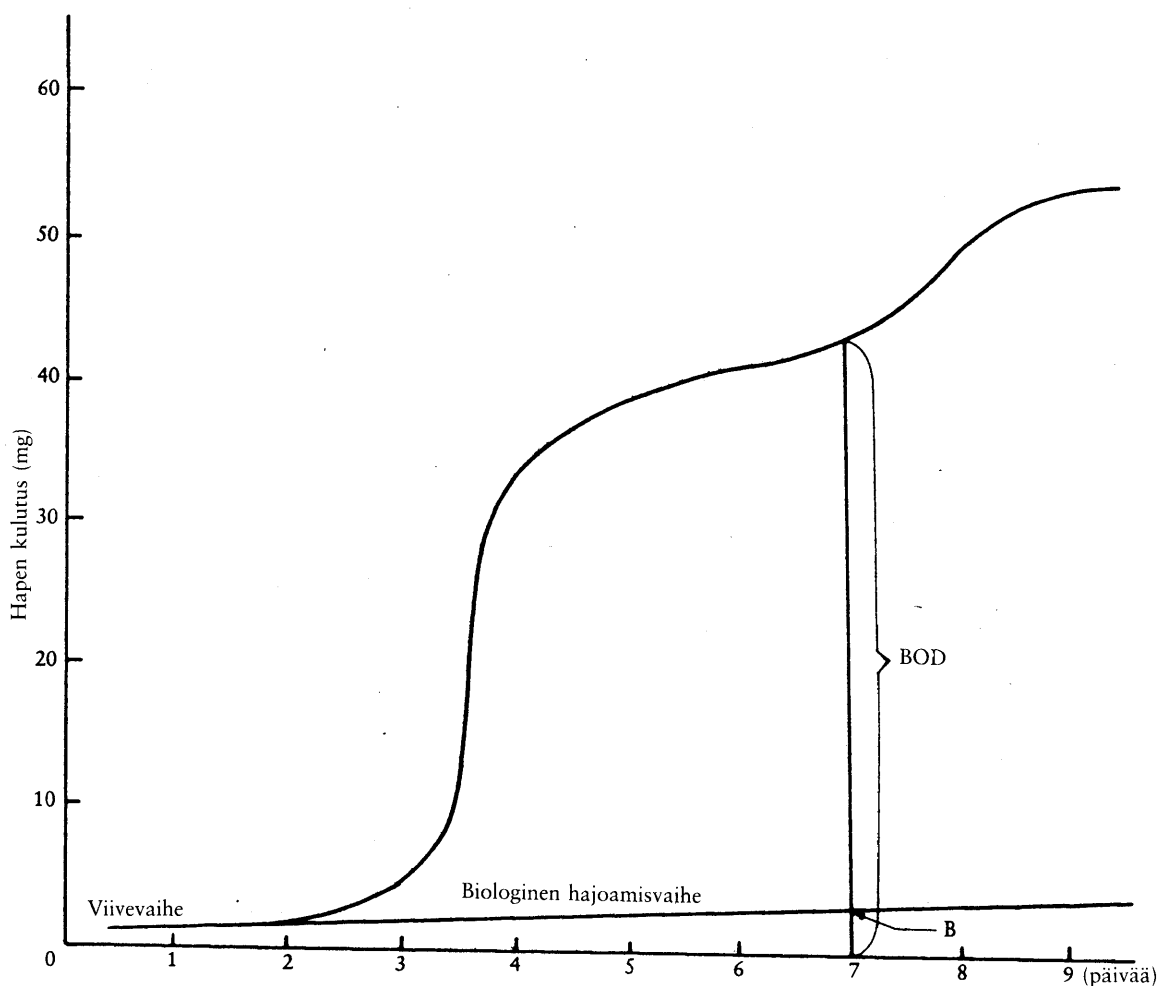
1.6.6

Testin suorittaminen

BOD-käyrä kirjataan jatkuvana viivana 28 päivän ajan (katso kuvaa). Kun 28 päivän koeaika on lopussa, testausastioissa jäljellä olevien kemikaalien ja välituotteiden pH ja pitoisuus määritetään.

Kuva

Aniliinin BOD-käyrä



Aktiivilietettä sisältämättömässä testausastiassa olevat testattavat kemikaalit analysoidaan niin ikään, jotta voidaan todeta, onko testausajan kuluessa testattavassa kemikaalissa tapahtunut muutoksia ja onko sen määrä pienentynyt haihtumisen tai testausastian reunoihin adsorboitumisen vuoksi jne.

1.6.7

Analysointilaitteet

Mikäli testattava yhdiste on vesiliukoinen, myös orgaanisen hiilen jäljellä oleva kokonaismäärä määritetään testin päätyttyä.

a) Käytettäessä kokonaishiilen analysointilaitetta:

Testausastiasta otetaan 10 ml testattavaa liuosta, ja sitä sentrifugoidaan 3 000 g viiden minuutin ajan. Supernatantissa jäljellä oleva orgaanisen hiilen kokonaismäärä määritetään kokonaishiilen analysointilaitteella.

b) Käytettäessä muita analysointilaitteita:

Testausastian koko sisältö poistetaan testattavalle yhdisteelle sopivalla liuottimella, ja asianmukaisen esikäsittelyn, esimerkiksi väkevöinnin, jälkeen testattavan yhdisteen jäljellä oleva määrä määritetään analysointilaitteella (kaasukromatografilla, massaspektrometrillä, spektrofotometrillä jne.).

Kun testataan haihtuvia aineita, BOD-mittarin lämpösäädely haude jäähdytetään 10 °C:een ja pidetään tässä lämpötilassa vähintään 30 minuuttia haihtumisen estämiseksi. Kohtien a ja b analysoinnit aloitetaan tämän jälkeen.

2 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

2.1 Tulosten käsittely

Hapen kulutuksesta ja suorasta analyysistä laskettavan hajoamisprosentin määritysmenetelmä selostetaan kohdassa 1.2.

2.2 Tulosten arviointi

Teoreettinen hapen tarve voidaan laskea joko lisäyksessä 2 esitetyllä tavalla tai käyttämällä alkuperäistä MITI-menetelmää:

<i>Alkuaine:</i>	<i>Hapetettu muoto:</i>
C	CO ₂
H	H ₂ O
N	NO ₂
S	SO ₂
X (halogeeni)	X

3. RAPORTOINTI

3.1 Tutkimusseloste

Tutkimusselosteen tulee, mikäli mahdollista, sisältää:

- testattavia kemikaaleja koskevat tiedot (nimi, rakennekaava, molekyylipaino, puhtaus, epäpuhtauksien luonne, testattavan kemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, testattavan kemikaalin määrittelytiedot),
- koeolosuhteet,
- aktiiviliete: lietenäytteiden ottoajat ja pitoisuudet,
- testattava kemikaali: pitoisuus,
- koeajan pituus,
- koelämpötila,
- analyysimenettely:
 - esikäsittely,
 - laitteen analyttiset ominaisuudet,
 - analyysin saanto,
 - välituotteen identifiointi,

— tulokset:

hajoamiskäyrät (inokulaatin tehon tarkistus + aineen käyrä)

BOD (mg)

B (mg)

Sa (mg)

Sb (mg)

ThOD (mg)

BOD:n avulla laskettu hajoamisprosentti, kemiallisella analyysillä saatu hajoamisprosentti, testattavien kemikaalien analyyseissä käytetyt kromatogrammit tai spektrit,

— näyttö testin hyväksyttävyydestä (katso kohtaa 1.3).

3.2

Tulosten tulkinta

Typeä sisältävien yhdisteiden mahdollinen vaikutus tuloksiin on otettava huomioon.

Jos Sb_n:n saanto on noin 10 prosentin luokkaa tai sen alle, tämä viittaa analyyttisiin ongelmiin tai esimerkiksi hydrolyysiin. Tällöin on tulkintaan kiinnitettävä erityistä huomiota.

Testin tiukoista vaatimuksista johtuen alhainen tulos ei välttämättä tarkoita, että testattava yhdiste ei ole ympäristöolosuhteissa biologisesti hajoava, mutta se osoittaa, että tämän seikan varmistamiseksi tarvitaan lisätutkimuksia.

Testattavia kemikaaleja, jotka tässä testissä yhteyttävät hyvin happea, pidetään biologisesti helposti hajoavina edellyttäen, että tämä taso on saavutettu 10 päivän aikaikkunan puitteissa laskettuna siitä päivästä, jolloin biologinen hajoamistaso ensi kertaa ylitti 10 %.

4

LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301 C, Decision of the Council C (81) 30, Final.
- (2) Biodegradability and bioaccumulation test of chemical substances (C-5/98/JAP), 1978.
- (3) The chemical substance control law in Japan (Chemical Products Safety Division, Basic Industries Bureau, MITI) (C-2/78/JAP), 1978.
- (4) The biodegradability and bioaccumulation of new and existing chemical substances, 5,8 (C-3/78/JAP), 1978.

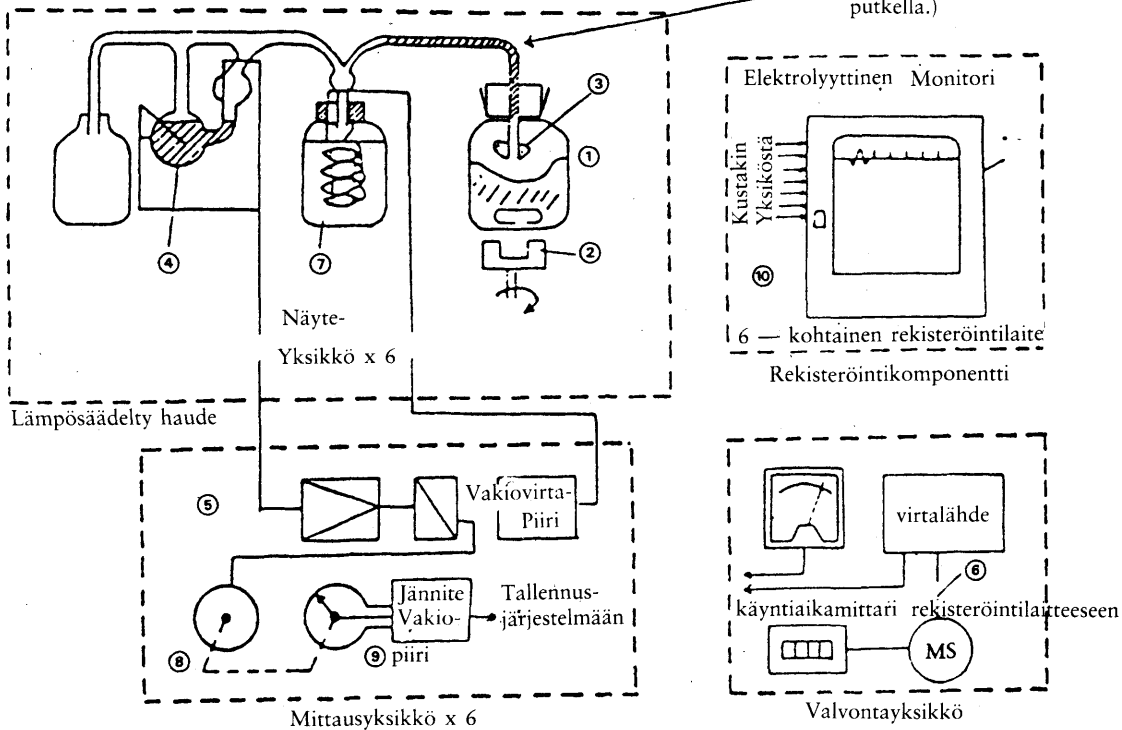
Lisäys 1

Suljetun systeemin hapenkulutuksen mittauslaitteen periaate

Mikro-organismien hapenkulutus voidaan määrittää elektrokemiallisella analyysimenetelmällä (esim. coulometrialalla).

Seuraavassa esitetään lohkokkaavio:

(Modifioidussa BOD-mittarissa varjostettu putken osa korvataan kapillaari-putkella.)



Viljelypullossa (1) olevaa näytettä sekoitetaan magneettisekoittimella (2). Reaktion jatkuessa nesteeseen liennut happi kulutetaan. Viljelypullon ilmassa oleva happi (O_2) liukenee nesteeseen, jolloin sen sijaan muodostuu CO_2 :a.

Kun CO_2 absorboituu natronkalkkiin (3), ilmatilassa olevan hapen osapaine ja kokonaispaine laskevat.

Elektrodimanometri (4) toteaa paineen laskun ja muuttaa sen sähkösignaaliksi, jonka vahvistin (5) vahvistaa ja käyttää relepiiriä, joka käyttää synkronimoottoria (8). Samanaikaisesti tuotetaan vakiovirralla elektrolyyttistä happea elektrolyysipullossa (7) olevasta rikkihappokupariliuoksesta.

Tätä happea syötetään viljelypulloon, ja manometrillä todetaan paineen palautuminen, joka aiheuttaa relepiirin irtikytkennän ja elektrolyytti- ja synkronimoottorin sammuttamisen.

Viljelypullon yläosassa säilytetään vakaa hapen paine, ja viljelypullossa kulutetun hapen määrä on suhteessa elektrolyyttiseen happeen. Koska tämä elektrolyyttisen hapen määrä on suhteessa elektrolyysiaikaan, elektrolyysivirta on vakio.

Synkronimoottorin (9) kierroskulma muunnetaan mV-signaaliksi moottoriin kytketyllä potentio-metrillä, jolloin valvontalaite (10) osoittaa kulutetun hapen määrän.

Lisäys 2

Teoreettisen biokemiallisen hapen tarpeen laskeminen

Aineen nimeltä $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$, jonka molekyylipaino on MW, ThOD lasketaan seuraavasti:

$$\text{ThOD}_{\text{NH}_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2} (h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2} p + \frac{1}{2} na - o \right]}{\text{MW}}$$

Tämä laskelma merkitsee, että C mineralisoituu CO_2 :ksi, H H_2O :ksi, P P_2O_5 :ksi ja Na Na_2O :ksi. Halogeeni eliminoiduu vetyhalidiksi ja typpi ammoniakiksi.

Esimerkki:

Glukoosi $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, MW = 180.

$$\text{ThOD} = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg O}_2/\text{mg glukoosia}.$$

Muiden kuin alkalimetallien suolojen molekyylipainot lasketaan olettaen, että suolat on hydrolysoitu.

Rikin hapetusasteen oletetaan olevan +6.

Esimerkki:

Natrium-n-alkyylibentseenisulfonaatti $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{SO}_3\text{Na}$, MW = 348

$$\text{ThOD} = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg O}_2/\text{mg ainetta}.$$

Tyypeä sisältävistä aineista typpi voidaan eliminoida ammoniakkinä, nitriittinä tai nitraattina erilaisen teoreettisen biokemiallisen hapen tarpeen mukaan.

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2} (h - cl) + 3s + \frac{3}{2} n + \frac{5}{2} p + \frac{1}{2} na - o \right]}{\text{MW}}$$

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2} (h - cl) + 3s + \frac{3}{2} n + \frac{5}{2} p + \frac{1}{2} na - o \right]}{\text{MW}}$$

Oletetaan, että analyysillä oli todettu täydellinen nitraatin muodostuminen sekundaarisen amiinin ollessa kyseessä:

$(\text{C}_{12}\text{H}_{25})_2\text{NH}$, MW = 353

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg O}_2/\text{mg ainetta}.$$

Lisäys 3

Biologinen hajoaminen: modifioitu MITI-testi

Testaava laitos

Tutkimuksen johtaja

Kokeen aloituspäivämäärä Testattava aine

Koe n:o

Kemiallinen rakenne

Analyttinen menetelmä

Testattavan aineen ThOD tai COD

Inokulaatti

Näytteenottoaika

Pitoisuus

Kokeen tulokset

..... % hajoaminen = $\frac{BOD - B}{ThOD} \times 100\%$ 28 päivän kuluttua

tai

..... % hajoaminen = $\frac{BOD - B}{COD} \times 100\%$ 28 päivän kuluttua

..... % hajoaminen = $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\%$ 28 päivän kuluttua

Tulosten vahvistus

Kontrollikemikaali

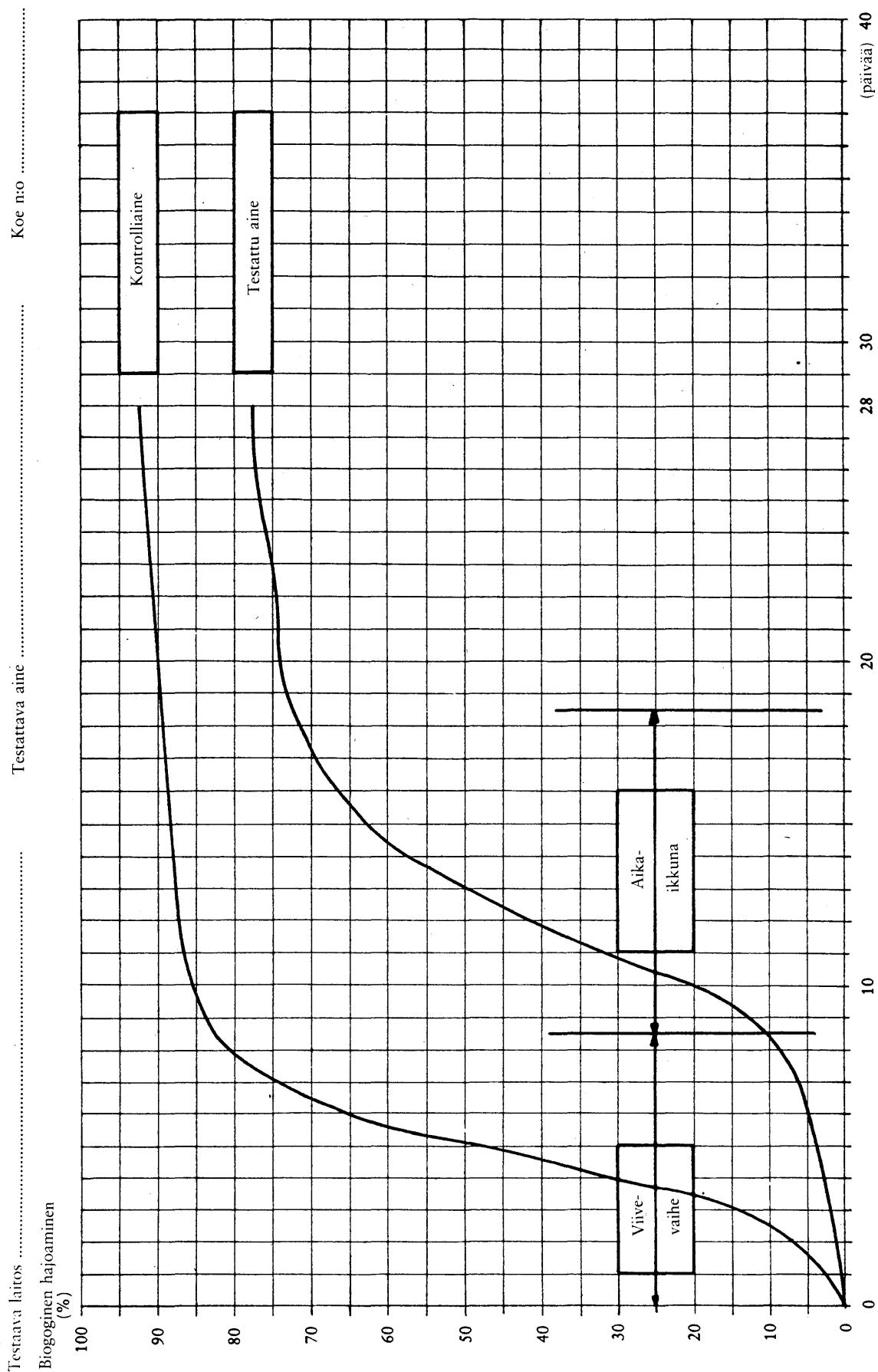
Tulos: % hajoamisprosentti 28 päivän kuluttua

Kokeen viitenumero

Huomautuksia

Lisäys 4

Modifioitu MITI-testi



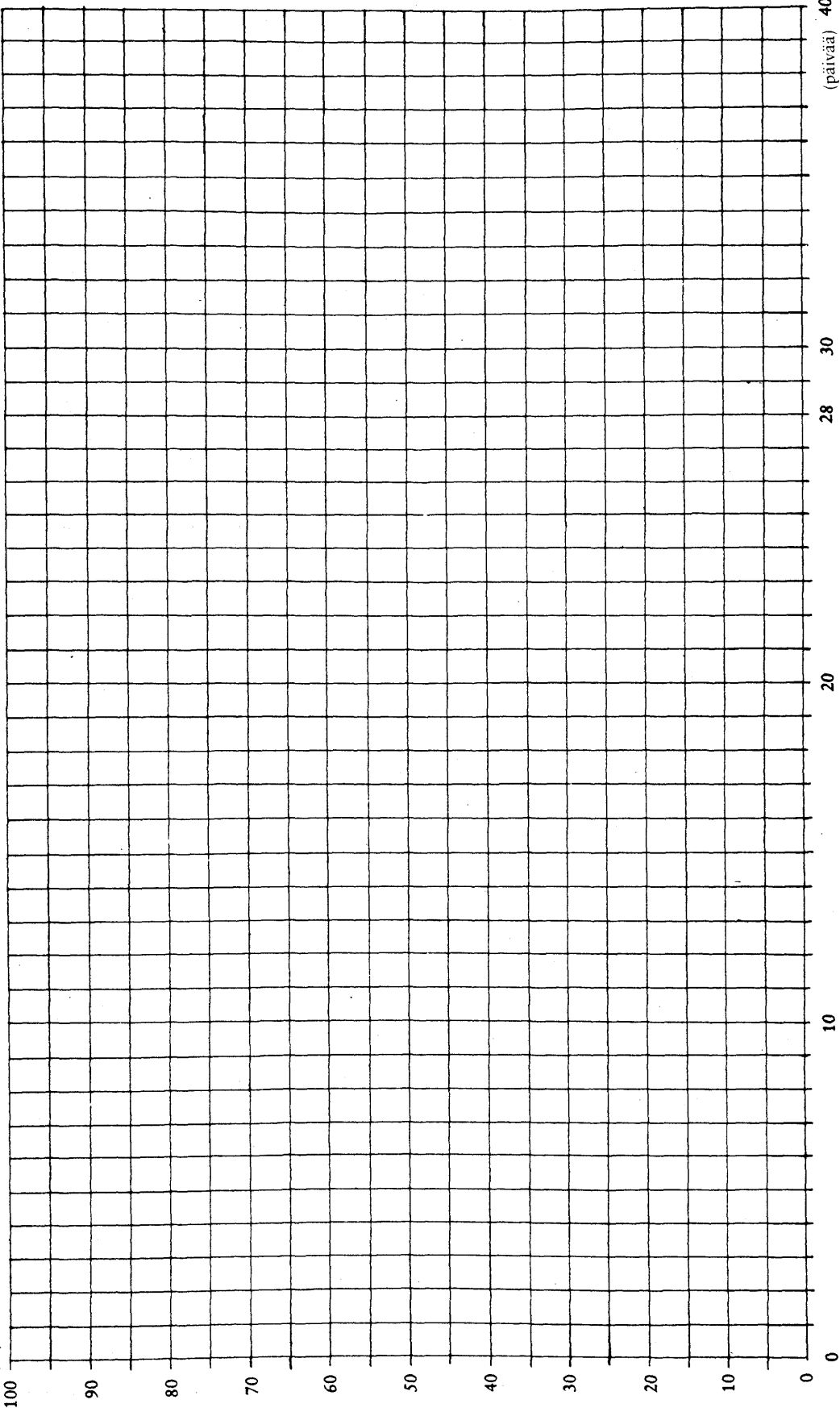
Modifioitu MITI-testi

Koe n:o

Testattava aine

Testaava laitos

Biologinen hajoaminen (%)



C. 8. HAJOAMINEN

BIOKEMIALLINEN HAPEN TARVE

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Menetelmän tarkoituksena on määrittää kiinteiden tai nestemäisten orgaanisten yhdisteiden biokemiallinen hapen tarve (biochemical oxygen demand, BOD).

Tällä testillä saadut tulokset koskevat vesiliukoisia yhdisteitä. Sillä voi kuitenkin ainakin periaatteessa testata myös haihtuvia ja huonosti veteen liukenevia yhdisteitä.

Menetelmä soveltuu ainostaan sellaisten orgaanisten aineiden testaukseen, jotka kokeessa käytetyn pitoisuuden osalta eivät inhiboi bakteeritoimintaa. Jos aine ei liukene testipitoisuutena, voi olla tarpeen turvautua erityistoimenpiteisiin kuten ultraäänidispersioon, jotta testattava aine saadaan hajotamaan kunnolla.

Tiedot kemikaalin toksisuudesta ovat hyödyksi alhaisten tulosten tulkinnassa ja sopivien testipitoisuuksien valinnassa.

1.2 Määritelmät ja yksiköt

BOD on liuenneen hapen massa, jonka tietty määrä testattavasta aineesta tehtyä liuosta tarvitsee määrätyissä olosuhteissa biokemialliseen hapettumisprosessiin.

Tulokset ilmoitetaan grammoina BOD:ia testattavaa ainegrammaa kohden.

1.3 Vertailuaineet

Vertailuaineita menetelmän tarkistamiseksi ei vielä voida suositella.

Sopivan kontrollikemikaalin käyttö inokulaatin tehokkuuden tarkistamiseksi on suotavaa.

1.4 Testin periaate

Tiettyyn määrään yhdistettä, joka on liuotettu tai hajotettu hyvin ilmastettuun sopivaan väliaineeseen, ympätään mikro-organismeja ja liuosta inkuboidaan pimeässä tietyssä vakioämpötilassa.

BOD on liuenneen hapen pitoisuuksien välinen ero testin alussa ja lopussa. Testin kesto aika on vähintään viisi ja korkeintaan 28 päivää.

Nollakoe on tehtävä samanaikaisella testillä, jossa ei käytetä testattavaa ainetta.

1.5 Laatuksiteerit

BOD-määrittäystä ei voida pitää pätevänä aineen biologisten hajoamisominaisuuksien määrittämismenetelmänä. Testin voidaan katsoa olevan ainoastaan seulontatesti.

1.6 Testin kuvaus

Aineesta valmistetaan alustava liuos tai seos, jotta saadaan käytettyyn menetelmään soveltuva BOD-pitoisuus. BOD määritetään sen jälkeen jollakin kansallisella standardimenetelmällä. Kansainvälinen standardimenetelmä olisi suositeltavampi, mutta siitä ei vielä ole sovittu.

2 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Alustavan liuoksen sisältämä BOD lasketaan valitulla normitetulla menetelmällä ja muunnetaan grammoiksi BOD:ia testattavaa ainegrammaa kohden.

3 RAPORTOINTI

On ilmoitettava, mitä menetelmää on käytetty.

Biokemiallinen hapen tarve ilmoitetaan vähintään kolmen hyväksyttävän määrittelyn keskiarvona.

Kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomautukset on raportoitava, etenkin testattavan aineen epäpuhtaudet, fysikaalinen tila, toksiset vaikutukset ja luontainen koostumus, jotka voivat vaikuttaa testin tuloksiin.

Biologista nitrifikaatiota estävän lisäaineen käyttö on mainittava.

4 LÄHDELUETTELO

Luettelo standardimenetelmistä, esimerkiksi:

NF T 90-103: Determination of the Biochemical Oxygen Demand.

NBN 407: Biochemical Oxygen Demand.

NBN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The Determination of biochemical Oxygen Demand, 1981, Methods for the examination of Water and Associated Materials, HMSO, London.

C. 9. HAJOAMINEN

KEMIALLINEN HAPEN TARVE

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Menetelmän tarkoituksena on määrittää kiinteiden tai nestemäisten orgaanisten yhdisteiden kemiallinen hapen tarve (chemical oxygen demand, COD) valinnaisella standardimenetelmällä tietyissä laboratorio-olosuhteissa.

Aineen kemiallista kaavaa koskevat tiedot helpottavat kokeen suoritusta ja tulosten tulkintaa (esim. orgaanisten yhdisteiden halogeeni- ja rautasuolat, orgaaniset klooria sisältävät yhdisteet).

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Kemiallinen hapen tarve on aineen hapettumiskyky ilmaistuna aineen tietyissä laboratorio-olosuhteissa hapettumisreagenssista käyttämän hapen vastaavana määränä.

Tulokset ilmoitetaan grammoina COD:ia testattavaa ainegrammaa kohden.

1.3 Vertailuaineet

Aina ei tarvitse käyttää vertailuaineita tutkittaessa uutta ainetta. Niitä käytetään etupäässä menetelmän kalibrointiin ja tulosten vertailuun jotakin muuta menetelmää käytettäessä.

1.4 Testin periaate

Tietty määrä yhdistettä, joka on liuotettu tai hajotettu veteen, hapetetaan takaisinvirtauksella kahden tunnin ajan kaliumdikromaatilla vahvassa rikkihappoliuoksessa, jossa hopeasulfaatti toimii katalyyttinä. Jäljelle jäävä dikromaatti määritetään titraamalla standardisoidulla rautapitoisella ammoniumsulfaatilla.

Testattaessa klooria sisältäviä aineita lisätään elohopeasulfaattia kloridin vaikutuksen vähentämiseksi.

1.5 Laatuksiteerit

Vapaavalintaisen määrittystavan vuoksi COD-arvoa on pidettävä enemmän "hapettumisen osoittajana" kuin orgaanisen aineen mittayksikkönä.

Kloridi saattaa vaikuttaa tähän testiin; epäorgaaninen pelkistin tai hapetin voi niin ikään häiritä kemiallisen hapen tarpeen määrittystä.

Tietyt rengasyhdisteet eivät hapetu täysin tässä kokeessa.

1.6 Testin kuvaus

Aineesta valmistetaan alustava liuos tai seos, jonka kemiallinen hapen tarve (COD) on 250–600 mg/l.

Huomautukset:

Testattaessa huonosti liukenevia ja hajoamattomia aineita, voidaan noin 5 mg COD:ia vastaava määrä hienoksi jauhattua ainetta tai nestemäistä ainetta punnita ja asettaa testauslaitteeseen veden kera.

Sen jälkeen määritetään COD käyttämällä jotakin kansallista standardimenetelmää. Kansainvälinen standardimenetelmä olisi parempi vaihtoehto, mutta sellaista ei vielä ole julkaistu.

2 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Koepullon COD lasketaan valittua normalisoitua menetelmää käyttäen ja muunnetaan grammoiksi COD:ia testattua ainegrammaa kohden.

3 RAPORTOINTI

On ilmoitettava, mitä menetelmää on käytetty.

Kemiallinen hapen tarve ilmoitetaan vähintään kolmen määrittelyn keskiarvona. Kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomautukset on raportoitava, etenkin testattavan aineen epäpuhtaudet, fysikaalinen tila, toksiset vaikutukset ja luontainen koostumus (mikäli ne ovat tiedossa), jotka voivat vaikuttaa testin tuloksiin.

Elohopeasulfaatin käyttö kloridivaikutusten minimoimiseksi on mainittava.

4 LÄHDELUETTELO

Esimerkkejä standardimenetelmistä:

NBN T 91-201	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
ISBN 0 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 of 15 mg/l.
NEN 3235 5.3	Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.
ISO DP 6060	Water Quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate Methods.

C.10. HAJOAMINEN

ABIOOTTINEN HAJOAMINEN: HYDROLYYSI pH:N FUNKTIONA

1 MENETELMÄ

Tämä menetelmä perustuu OECD:n testiohjeisiin (1).

1.1 Johdanto

Hydrolyysi on tärkeä abioottisen hajoamisen säätelyreaktio. Tämä reaktio on merkityksellinen etenkin aineilla, joiden biologinen hajoamiskyky on alhainen, ja se voi vaikuttaa aineen hitaaseen hajoamiseen luonnossa.

Useimmat hydrolyysireaktiot ovat näennäisesti ensimmäisen asteen reaktioita ja siksi puoliintumisajat eivät riipu pitoisuudesta. Tästä syystä laboratoriopitoisuuksilla saadut tulokset voidaan yleensä ekstrapoloida ympäristöolosuhteisiin.

Tämän lisäksi on raportoitu useita esimerkkejä (2), jotka osoittavat tyydyttävää yhtäläisyyttä useilla kemikaalityypeillä puhtaassa ja luonnonvedessä saatujen tulosten välillä.

Tiedot aineen höyrynpaineesta helpottavat testin suorittamista.

Tällä menetelmällä voidaan testata ainoastaan vesiliukoisia aineita. Epäpuhtaudet vaikuttavat usein tuloksiin.

Kemikaalien hydrolyysitutkimuksissa tulisi käyttää luonnossa yleisesti esiintyviä pH-arvoja (pH 4–9).

1.2 Määritelmät ja yksiköt

Hydrolyysi on RX-kemikaalin ja veden reaktio. Tämä reaktio voidaan esittää X-ryhmän ja OH:n kokonaisvaihtoreaktiona:



RX:n pitoisuuden vähenemisnopeus saadaan seuraavasti:

$$\text{nopeus} = k \cdot (\text{H}_2\text{O}) \cdot [\text{RX}] \quad [2]$$

Koska vettä on tarvittavaa huomattavasti suurempi määrä kemikaaliin verrattuna, tämän tyyppistä reaktiota sanotaan yleensä näennäiseksi ensimmäisen asteen reaktioksi, jossa todettu nopeusvakio saadaan yhtälöllä

$$k_{\text{obs}} = k \times (\text{H}_2\text{O}) \quad [3]$$

Tämä vakio voidaan määrittää yhdelle pH-arvolle ja yhdelle lämpötilalle T käyttämällä lauseketta

$$k_{\text{obs}} \frac{2,303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

jossa

t = aika,

C₀ = aineen pitoisuus aikana 0,

C_t = aineen pitoisuus aikana t,

2,303 = luonnollisen ja kymmenkantaisen logaritmin konversiokerroin.

Pitoisuudet ilmoitetaan grammoina tai mooleina litraa kohden.

Tämän k_{obs} -vakion dimensio on (aika)⁻¹.

”Puoliintumisaika” $t_{1/2}$ tarkoittaa aikaa, joka tarvitaan testattavan aineen pitoisuuden vähentämiseen 50 prosentilla eli:

$$C_t = C_{1/2} \quad [5]$$

Lausekkeista [4] ja [5] voidaan osoittaa, että

$$t_{1/2} = 0,693/k_{\text{obs}} \quad [6]$$

1.3 Vertailuaineet

Aina ei tarvitse käyttää vertailuaineita tutkittaessa uutta ainetta. Niitä käytetään etupäässä menetelmän kalibrointiin ja tulosten vertailuun jotakin muuta menetelmää käytettäessä.

Asetyyლისასყილიჰოპო (aspiriini) fosforotioottihappo 0,0-dietyyli 0-(6 metyyli-2-(1-metyylietyyli)4-pyrimidinyyliesteriä (Dimpylatea, Diazinonia) on käytetty vertailuaineina (1).

1.4 Testin periaate

Aine liuotetaan veteen niin, että saadaan alhainen pitoisuus. pH-arvo ja lämpötila säädetään.

Aineen pitoisuuden alenemista koeajan kuluessa seurataan jollakin sopivalla analyysimenetelmällä.

Pitoisuuden logaritmi piirretään ajan funktiona, ja mikäli tuloksena on suora viiva, ensimmäisen asteen nopeusvakio saadaan sen kaltevuudesta (katso kohtaa 2).

Mikäli ei ole tarkoituksenmukaista määrittää tietyn lämpötilan nopeusvakiota, on yleensä mahdollista arvioida vakio käyttämällä Arrheniuksen yhtälöä, joka ilmoittaa lämpötilan riippuvuuden nopeusvakiosta. Nopeusvakion logaritmin lineaarisesta käyrästä, joka on määritetty sopivassa lämpötilassa absoluuttisen lämpötilan (K) käänteisarvon funktiona, on mahdollista ekstrapoloida nopeuden vakioarvo, joka ei ole suoraan saatavissa.

1.5 Laatuksiteerit

Lähdeluettelon kohdassa (2) raportoidaan, että 13 orgaanisen rakenneluokan hydrolyysin nopeusvakio määritykset saattavat olla erittäin tarkkoja.

Toistettavuus riippuu erityisesti pH-arvon valvonnasta ja liuenneen hapen pitoisuudesta, ja mikro-organismien esiintyminen voi vaikuttaa siihen.

1.6 Testin kuvaus**1.6.1 Reagenssit****1.6.1.1 Puskuriliuokset**

Testi suoritetaan käyttäen kolmea pH-arvoa: 4,0, 7,0 ja 9,0.

Puskuriliuokset valmistetaan käyttäen reagenssilaatuisia kemikaaleja ja tislattua tai ionisoimatonta, steriiliä vettä. Lisäyksessä mainitaan esimerkkejä puskurimenetelmistä.

Valittu puskurimenetelmä voi vaikuttaa hydrolyysin nopeuteen; mikäli tästä on näyttöä, tulee käyttää jotakin muuta puskurimenetelmää. Lähdeluettelon kohdassa (2) suositellaan käytettäväksi boraatti- tai asetaattipuskureita fosfaatin asemesta.

Jos puskuriliuoksen pH-arvo testissä käytetyssä lämpötilassa ei ole tiedossa, se voidaan määrittää kalibroidulla pH-mittarilla valitussa lämpötilassa $\pm 0,1$ pH-yksikön tarkkuudella.

1.6.1.2 Koeliuokset

Testattava aine liuotetaan valittuun puskuriin, ja pitoisuus saa olla korkeintaan 0,01 M tai puolet saturaatiopitoisuudesta. Näistä kahdesta valitaan alempi.

Veteen sekoittuvien orgaanisten liuotteiden käyttöä suositellaan ainoastaan tutkittaessa huonosti veteen liukenevia aineita. Liuottimen määrä saa olla korkeintaan 1 % eikä se saa vaikuttaa hydrolyysiin.

1.6.2 Laitteet

Kokeessa käytetään tulpalla varustettuja lasipulloja, joiden hioksessa ei saa olla rasvaa.

Mikäli kemikaali tai puskurimenetelmä on haihtuvaa tai mikäli testaus tehdään korkeassa lämpötilassa, on parasta käyttää suljettuja tai septumilla suljettuja putkia, joihin ei jää tyhjää tilaa.

1.6.3 Analyysimenetelmä

Analyysimenetelmän valinta riippuu testattavasta aineesta, ja sen tarkkuuden ja herkkyyden on oltava sellainen, että alkupitoisuuden 10 %:n lasku voidaan todeta.

Menetelmän tulee soveltua testattavan aineen testattavien pitoisuuksien määrittäisiin, ja se voi koostua useista analyysimenetelmistä.

1.6.4 Koeolosuhteet

Testit suoritetaan termostaatilla säädelyssä suojuksessa tai $\pm 0,5$ °C:n vakiolämpöisessä hauteessa. Lämpötila pidetään ja mitataan $\pm 0,2$ °C:n tarkkuudella. Fotolyysiä estävät toimenpiteet on suoritettava.

Kaikki asianmukaiset varotoimet liuenneen hapen välttämiseksi on tehtävä (esim. viiden minuutin typpi- tai argonkuplitus ennen liuoksen valmistamista).

1.6.5 *Testin suorittaminen*

1.6.5.1 Alustava testi

Kaikkien aineiden alustavat testit suoritetaan $50 \pm 0,5$ °C:n lämpötilassa käyttäen kolmea pH-arvoa: 4,0, 7,0 ja 9,0.

Määrittämiä tehdään niin monta, että niiden perusteella voidaan arvioida, onko kunkin pH-arvon osalta puoliintumisaika ($t_{1/2}$) 50 °C:n lämmössä alle 2,4 t tai todetaanko alle 10 prosentin hydrolyysi viiden päivän kuluttua. (Voidaan olettaa, että nämä arvot vastaavat yhtä päivää pienempiä tai vuotta suurempia puoliintumisaikoja luonnonmukaisemmissa olosuhteissa [25 °C].

Mikäli alustava testi osoittaa, että vähintään 50 % testattavasta aineesta on hydrolysoitunut 2,4 tunnin kuluessa 50 °C:n lämmössä tai että alle 10 % on hydrolysoitunut viiden päivän kuluttua kunkin kolmen pH-arvon osalta (4, 7 ja 9), koetta ei tarvitse jatkaa.

Muussa tapauksessa suoritetaan testi 1. Sillä testataan myös ne pH-arvot, jotka eivät täyttäneet tätä edellytystä.

1.6.5.2 Testi 1

Testi 1 suoritetaan tietyssä lämpötilassa, mikäli mahdollista 50 ± 1 °C:ssa, steriileissä olosuhteissa käyttäen niitä pH-arvoja, joita alustavan testin perusteella täytyy edelleen tutkia.

Tarpeellinen määrä näytteitä (vähintään neljä) valitaan kattamaan 20–70 %:n hydrolyysi testattaessa tiettyjen pH-arvojen näennäistä ensimmäisen asteen reagenttia.

Reaktioaste määritetään kunkin käytetyn pH-arvon osalta, jolle testi 1 tehdään.

Nopeusvakion arvio 25 °C:ssa:

Kokeen jatkamistapa riippuu siitä, voidaanko 1. testin perusteella päätellä, onko kyseessä näennäinen ensimmäisen asteen reaktio vai ei.

Ellei 1. testistä voida varmasti päätellä, että kyseessä on näennäinen ensimmäisen asteen reaktio, koetta jatketaan testissä 2 selostetulla tavalla.

Mikäli 1. testistä voidaan varmasti päätellä, että kyseessä on näennäinen ensimmäisen asteen reaktio, koetta jatketaan testissä 3. selostetulla tavalla. (Vaihtoehtoisesti voi joissakin tapauksissa olla mahdollista laskea 25 °C:n nopeusvakior 50 °C:n nopeusvakioista 1. testin tulosten avulla [katso kohtaa 3.2]).

1.6.5.3 Testi 2

Tämä testi tehdään käyttäen niitä pH-arvoja, joiden osalta 1. testi osoitti lisättestaustarvetta:

- joko yhdessä alle 40 °C:n lämpötilassa,
- tai kahdessa yli 50 °C:n lämpötilassa, joiden ero on vähintään 10 °C.

Kutakin pH-arvoa ja lämpötilaa varten on 2. testiä varten oltava vähintään kuusi sellaisin välein olevaa määrityskohtaa, että hydrolyysi on 20–70 %.

Kutakin pH-arvoa ja lämpötilaa kohden tehdään kaksi testiä. Kun 2. testi tehdään kahdessa yli 50 °C:n lämpötilassa, suositellaan jälkimmäisen testin tekemistä alemmassa näistä kahdesta lämpötilasta.

Graafinen puoliintumisaika-arvio ($t_{1/2}$) annetaan mahdollisuuksien mukaan kustakin pH-arvosta ja lämpötilasta, jotka testattiin 2. testillä.

1.6.5.4 Testi 3

Tämä testi tehdään käyttäen niitä pH-arvoja, joiden osalta 1. testi osoitti lisätestaustarvetta:

- joko yhdessä alle 40 °C:n lämpötilassa,
- tai kahdessa yli 50 °C:n lämpötilassa, joiden ero on vähintään 10 °C.

Kutakin pH-arvoa ja lämpötilaa varten on 3. testiä varten valittava vähintään kolme määrittyskohtaa, ensimmäinen aikana 0 ja toinen ja kolmas, kun hydrolyysi on yli 30 %. K_{obs} - ja $t_{1/2}$ -vakiot lasketaan.

2 TULOKSET

Logaritmikäyristä, joissa pitoisuus esitetään ajan funktiona, saadaan näennäistä ensimmäisen asteen reaktiota varten kunkin testatun pH-arvon ja lämpötilan K_{obs} -arvot lausekkeella:

$$K_{\text{obs}} = - \text{kaltevuus} \times 2,303$$

Tämän lisäksi t_{∞} voidaan laskea yhtälöllä [6]. Arrheniuksen yhtälön avulla lasketaan tarvittaessa k_{25} °C.

Ei-näennäinen ensimmäisen asteen reaktio – katso kohtaa 3.1.

3 RAPORTOINTI

3.1 Tutkimusseloste

Tutkimusselosteen tulee, mikäli mahdollista, sisältää seuraavat tiedot:

- aineen määrittely,
- vertailuaineilla saadut tulokset,
- käytetyn analyysimenetelmän periaate ja yksityiskohdat,
- kustakin testistä: lämpötila, pH-arvo, puskurin koostumus ja taulukko kaikista pitoisuutta ja aikaa koskevista määrittyskohdista,
- näennäisen ensimmäisen asteen reaktion osalta K_{obs} - ja $t_{1/2}$ -arvot ja laskentatapa,
- ei-näennäisen ensimmäisen asteen reaktion osalta logaritmikäyrä, jossa pitoisuus on ajan funktiona,
- kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomautukset.

3.2 Tulosten tulkinta

Voi olla mahdollista laskea hyväksyttävät testattavien aineiden nopeusvakioarvot (25 °C:ssa) edellyttäen, että testattavan aineen homologien aktivointienergian kokeelliset arvot ovat tiedossa ja että testattavan aineen aktivointienergian voidaan olettaa olevan samaa suuruusluokkaa.

4.

LÄHDELUETTELO

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C (81) 30 Final.
 - (2) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C (81) 30 Final, reference 2.
-

Lisäys

PUSKURISEOKSET

A. CLARK JA LUBS

Näissä taulukoissa ilmoitetut pH-arvot on laskettu potentiaalimittauksista käyttäen Sörensenin standardiyhtälöitä (1909). Todellinen pH-arvo on 0,4 yksikköä korkeampi kuin taulukon arvot.

Koostumus	pH
0,1 M kaliumvetyftalaattia + 0,1 N HCl 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalaattia 100 ml:aan	3,8
0,1 M kaliumvetyftalaattia + 0,1 N NaOH 20°C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalaattia 100 ml:aan	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalaattia 100 ml:aan	4,2
0,1 M monokaliumfosfaattia + 0,1 N NaOH 20°C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaattia 100 ml:aan	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaattia 100 ml:aan	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaattia 100 ml:aan	7,2
0,1 M H ₃ BO ₃ ja 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH 20 °C	
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorihappoa 100 ml:aan	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorihappoa 100 ml:aan	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorihappoa 100 ml:aan	9,2

B. KOLTHOFF JA VLEESHOUWER

Koostumus	pH
0,1 M monokaliumsitraattia ja 0,1 N NaOH 18 °C (lisätään pieni tymolikide tai muutama milligramma elohopeajodidia homeen kasvun estämiseksi).	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sitraattia 100 ml:aan	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sitraattia 100 ml:aan	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sitraattia 100 ml:aan	4,2

C. SÖRENSEN

0,05 M booraksia + 0,1 N HCl

Koostumus		pH			
Booraksi (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 borax + 0,1 N NaOH

Koostumus		pH			
Booraksi (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