

## II

(Besluiten waarvan de publikatie niet voorwaarde is voor de toepassing)

## COMMISSIE

## RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 25 april 1984

houdende zesde aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen

(84/449/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE  
GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 67/548/EEG van de Raad van 27 juni 1967 betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen <sup>(1)</sup>, voor de zesde maal gewijzigd bij Richtlijn 79/831/EEG van de Raad <sup>(2)</sup>, inzonderheid op de artikelen 19, 20 en 21,

Overwegende dat in artikel 3, lid 1, van Richtlijn 79/831/EEG is bepaald dat de fysisch-chemische eigenschappen en de toxiciteit en ecotoxiciteit van de stoffen en preparaten worden vastgesteld volgens de in bijlage V genoemde methoden;

Overwegende dat in artikel 19 van Richtlijn 79/831/EEG van 18 september 1979 is bepaald dat met betrekking tot bijlage V de procedure van het Comité voor aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van toepassing is; dat met name rekening moet worden gehouden met door de ter zake bevoegde internationale instellingen erkende en aanbevolen methoden indien dergelijke aanbevelingen bestaan;

Overwegende dat de bepalingen van deze richtlijn in overeenstemming zijn met het advies van het Comité voor aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van de richtlijnen die zijn gericht op de opheffing van

technische handelsbelemmeringen in de sector gevaarlijke stoffen en preparaten,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

*Artikel 1*

De tekst van bijlage V bij Richtlijn 67/548/EEG wordt vervangen door de tekst van de bijlage bij deze richtlijn.

*Artikel 2*

De Lid-Staten dienen vóór 1 juli 1985 de bepalingen vast te stellen en bekend te maken die nodig zijn om aan deze richtlijn te voldoen.

Zij stellen de Commissie hiervan onmiddellijk in kennis. Zij passen deze bepalingen uiterlijk met ingang van 1 juli 1986 toe.

*Artikel 3*

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 25 april 1984.

Voor de Commissie

Karl-Heinz NARJES

Lid van de Commissie

<sup>(1)</sup> PB nr. L 196 van 16. 8. 1967, blz. 1.

<sup>(2)</sup> PB nr. L 259 van 15. 10. 1979, blz. 10.

*BIJLAGE*

In deze bijlage worden de methoden uiteengezet voor de bepaling van de fysisch-chemische, toxicologische en ecotoxicologische eigenschappen die zijn opgesomd in bijlage VII en in bijlage VIII van Richtlijn 79/831/EEG. De methoden zijn gebaseerd op die welke zijn erkend en aanbevolen door bevoegde internationale organen (in het bijzonder de OESO).

Indien dergelijke methoden niet beschikbaar waren, is gebruik gemaakt van nationale normen of wetenschappelijk overeengekomen methoden. Over het algemeen moeten de tests worden verricht met de stof, zoals die in de handel wordt gebracht. Aandacht moet worden besteed aan de mogelijke invloed van onzuiverheden op de testresultaten.

Indien de methoden van deze bijlage niet geschikt zijn voor onderzoek van een bepaalde eigenschap, moet de gebruikte alternatieve methode worden gemotiveerd.

Dierproeven dienen te worden uitgevoerd overeenkomstig de in elk land geldende voorschriften, waarbij men zich tevens moet laten leiden door de thans alom heersende opvattingen op het gebied van het dierlijk welzijn.

Bij gelijkwaardige testmethoden moet die gebruikt worden, die de minste dierenoffers eist.

## INHOUD

DEEL A: Methoden voor de bepaling van de fysisch-chemische eigenschappen	4
A. 1. Smeltpunt/smeltraject	4
A. 2. Kookpunt/kooktraject	13
A. 3. Relatieve dichtheid	20
A. 4. Dampspanning	25
A. 5. Oppervlaktespanning	37
A. 6. Oplosbaarheid in water	44
A. 7. Oplosbaarheid in vetten	53
A. 8. Verdelingscoëfficiënt	57
A. 9. Vlampunt	61
A. 10. Ontvlambaarheid van vaste stoffen	63
A. 11. Ontvlambaarheid van gassen	66
A. 12. Ontvlambaarheid van stoffen en preparaten die bij aanraking met water of vochtige lucht, licht ontvlambare gassen in een gevaarlijke hoeveelheid ontwikkelen	68
A. 13. Ontvlambaarheid van vaste stoffen en vloeistoffen	72
A. 14. Ontploffingsgevaar	74
A. 15. Zelfontvlambaarheid van vluchtige vloeistoffen en gassen	84
A. 16. Zelfontvlambaarheid van vaste stoffen	86
A. 17. Oxiderende eigenschappen	89
DEEL B: Methoden voor de bepaling van de toxiciteit	94
Algemene inleiding	94
B. 1. Acute orale toxiciteit	96
B. 2. Acute inhalatietoxiciteit	99
B. 3. Acute dermale toxiciteit	103
B. 4. Acute toxiciteit — huidirritatie	106
B. 5. Acute toxiciteit — irritatie van het oog	109
B. 6. Acute toxiciteit — sensibilisering van de huid	113
B. 7. Subacute orale toxiciteit	118
B. 8. Subacute inhalatietoxiciteit	122
B. 9. Subacute dermale toxiciteit	127
B. 10. Overige effecten — mutageniteit — zoogdieren — in-vitro cytogenetische test	131
B. 11. Overige effecten — mutageniteit — zoogdieren — in-vivo beenmergtest	134
B. 12. Overige effecten — mutageniteit — zoogdieren — in-vivo micronucleustest	137
B. 13. Overige effecten — mutageniteit — terugmutatietest — <i>Escherichia coli</i>	140
B. 14. Overige effecten — mutageniteit — terugmutatietest — <i>Salmonella typhimurium</i>	143
DEEL C: Methoden voor de bepaling van de ecotoxiciteit	146
C. 1. Acute toxiciteit voor vissen	146
C. 2. Acute toxiciteit voor dafnia's	155
C. 3. Degradatie — biologische afbraak: gewijzigde OESO screeningtest	160
C. 4. Degradatie — biologische afbraak: gewijzigde AFNOR-test NF T 90/302	170
C. 5. Degradatie — biologische afbraak: gewijzigde Sturm-test	179
C. 6. Degradatie — biologische afbraak: gesloten-flesproef	188
C. 7. Degradatie — biologische afbraak: gewijzigde MITI-test	199
C. 8. Degradatie — biochemisch zuurstofverbruik	212
C. 9. Degradatie — chemisch zuurstofverbruik	214
C. 10. Degradatie — niet-biologische afbraak: hydrolyse als functie van de pH	216

**DEEL A: METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE FYSISCH-CHEMISCHE  
EIGENSCHAPPEN****A. 1. SMELTPUNT/SMELTTRAJECT****1. METHODE**

De beschreven methoden berusten op de testrichtlijnen van de OESO (1).

**1.1. Inleiding**

De hier beschreven methoden en toestellen dienen te worden toegepast voor de bepaling van het smeltpunt van chemische stoffen, ongeacht de mate van zuiverheid ervan.

De keuze van de methode hangt af van de aard van de te onderzoeken stof.

De beperkende factor zal dan ook worden bepaald door de vraag of de stof gemakkelijk, moeilijk of helemaal niet kan worden fijngemalen.

Voor sommige stoffen is de bepaling van het vries- of stolpunt zinvoller; ook de normen voor deze bepaling werden in de richtlijn opgenomen.

**1.2. Definities en eenheden**

Onder smeltpunt wordt verstaan, de temperatuur, waarbij de fase-overgang van vaste naar vloeibare toestand bij normale atmosferische druk plaatsvindt.

Deze temperatuur komt in het ideale geval overeen met de temperatuur waarbij het stol- of vriespunt wordt bereikt.

Aangezien de fase-overgang bij veel stoffen over een ruim temperatuurbereik plaatsvindt, wordt deze vaak omschreven als het smeltraject.

Smeltpunt en -traject worden steeds uitgedrukt in K.

$$t = T - 273,15$$

waarbij t in °C en T in K worden uitgedrukt.

**1.3. Referentiestoffen**

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om de resultaten te kunnen vergelijken, wanneer een andere methode wordt gebruikt.

In de referenties is een aantal ijkstoffen genoemd (2).

**1.4. Principe van de testmethoden**

De temperatuur (het temperatuurbereik), waarbij fase-overgang van vaste naar vloeibare toestand plaatsvindt, wordt bepaald. In de praktijk betekent dit dat een monster van de te onderzoeken stof bij atmosferische druk wordt verwarmd en dat de temperatuur in het begin- en het eindstadium van het smeltproces wordt bepaald. Drie onderzoeksmethoden worden beschreven, namelijk: de capillaire methode, de methode met de verhitte plaat, en de methode voor vriespuntbepaling.



1.4.1. *Capillaire methode*

## 1.4.1.1. Toestellen ter bepaling van het smeltpunt waarbij gebruik wordt gemaakt van een vloeistofbad

Een kleine hoeveelheid van de fijngemalen stof wordt in een capillair aangebracht en stevig aangedrukt. Het buisje wordt samen met een thermometer verwarmd, waarbij ervoor wordt gezorgd dat de temperatuurstijging tijdens het eigenlijke smeltproces minder dan circa 1 K/min bedraagt. De temperatuur in het begin- en eindstadium van het smeltproces wordt bepaald.

## 1.4.1.2. Metalen blok

Als omschreven sub 1.4.1.1, met dit verschil dat het capillair en de thermometer in een verwarmd metalen blok zijn aangebracht en door openingen in het blok kunnen worden waargenomen.

## 1.4.1.3. Fotoceldetectie

Het monster in het capillair wordt automatisch verhit in een metalen cilinder. Een lichtbundel wordt, via openingen in de cilinder, door de stof heen op een nauwkeurig geijkte fotocel gericht. De optische eigenschappen van de meeste stoffen veranderen van opaak naar doorschijnend bij het smelten. Zodra de lichtintensiteit die de fotocel bereikt toeneemt, zendt deze een stopsignaal naar de digitale meter die de temperatuur afleest van een thermometer met platinaweerstand in de verwarmingskamer. Deze methode leent zich niet voor toepassing op sommige sterk gekleurde stoffen.

1.4.2. *Methode waarbij gebruik wordt gemaakt van een verhit oppervlak (hot stage)*

## 1.4.2.1. De verhitte staaf volgens Kofler

De verhitte staaf volgens Kofler bestaat uit twee stukken metaal die een verschillend warmtegeleidingsvermogen bezitten en elektrisch worden verwarmd. De staaf is zo ontworpen dat de temperatuur nagenoeg lineair langs de lengte ervan varieert. De temperatuur van de verhitte staaf kan variëren van 283 K tot 543 K; de temperatuur wordt met een voor elke staaf afzonderlijk geijkt ruitertje (met wijzer) afgelezen.

Om een smeltpunt te bepalen, wordt de stof in een dunne laag direct op het oppervlak van de verhitte staaf geplaatst. Binnen enkele seconden ontstaat er een scherpe scheidingslijn tussen de vloeibare en de vaste fase. De wijzer wordt ingesteld op de scheidingslijn, waarna de temperatuur op de scheidingslijn kan worden afgelezen.

## 1.4.2.2. Smeltpuntmicroscop

Er bestaan verschillende verhitte platen voor microscopische smeltpuntbepaling waarbij met zeer kleine hoeveelheden materiaal kan worden gewerkt. Bij de meeste verhitte platen wordt de temperatuur gemeten met een gevoelig thermokoppel, maar bij sommige ook met een kwikthermometer. Een toestel voor microscopische smeltpuntbepaling met behulp van een verhitte plaat bestaat uit een verwarmingskamer met een metalen plaat waarop het monster op een voorwerpglasje wordt geplaatst. In het midden van de metalen plaat is een opening aangebracht voor het licht dat de spiegel van de microscop weerkaatst. Tijdens het gebruik wordt de verwarmingskamer met een glazen plaat afgesloten, zodat er geen lucht uit de werkruimte bij kan komen.

De verwarming van het monster wordt ingesteld met een regelweerstand. Voor zeer nauwkeurige metingen bij optisch anisotrope stoffen kan gebruik worden gemaakt van gepolariseerd licht.

## 1.4.2.3. De meniscusmethode

Deze methode wordt speciaal toegepast voor polyamiden. Bepaling van de temperatuur, waarbij de verplaatsing van een meniscus van siliconenolie, die tussen een verhit oppervlak (hot stage) en een door het te onderzoeken polyamide-monster ondersteund dekglas is ingesloten, visueel wordt waargenomen.

1.4.3. *Methode voor vriespuntbepaling*

Het monster wordt in een speciaal proefbuisje in een toestel geplaatst voor de bepaling van het kristallisatiepunt.

Tijdens de afkoeling wordt het monster voortdurend zachtjes geroerd en de temperatuur wordt iedere 30 seconden afgelezen en geregistreerd.

Zodra de temperatuur gedurende enkele aflezingen constant blijft, wordt deze temperatuur (na correctie voor thermometerfouten), geregistreerd als het kristallisatiepunt.

1.5. **Kwaliteitscriteria**

De toepasbaarheid en nauwkeurigheid van de verschillende methoden voor de bepaling van smeltpunten/smelttrajecten staat vermeld in de tabel.

TABEL: TOEPASBAARHEID VAN DE METHODEN

## A. Capillaire methoden

Meetmethode	Stoffen die kunnen worden fijngemalen	Stoffen die niet gemakkelijk kunnen worden fijngemalen	Temperatuurbereik	Maximum nauwkeurigheid (bij benadering) (1)	Opmerkingen
Toestellen voor smeltpuntbepaling met vloeistofbad	Ja	Enkele	273 K tot 573 K	± 0,3 K	Bestaande norm JIS K 0064
Toestellen voor smeltpuntbepaling met metalen blok	Ja	Enkele	293 K tot 573 K	± 0,5 K	Bestaande norm ISO 1218 (E)
Fotoceldetectie	Ja	Verscheidene met toepassing van hulpapparatuur	253 K tot 573 K	± 0,1 K	

(1) Afhankelijk van het type instrument en de zuiverheid van de stof.

## B. Methodes waarbij gebruik wordt gemaakt van een verhit oppervlak (hot stage) en methodes voor vriespuntbepaling

Meetmethode	Stoffen die kunnen worden fijngemalen	Stoffen die niet gemakkelijk kunnen worden fijngemalen	Temperatuurbereik	Maximum nauwkeurigheid (bij benadering) (1)	Opmerkingen
Verhitte staaf volgens Kofler	Ja	Neen	283 K tot 543 K	± 1,0 K	Bestaande norm ANSI/ ASTM D 3451-76
Smeltpuntmicroscop	Ja	Enkele	273 K tot 573 K (tot 1773 K)	± 0,2 K	Bestaande norm DIN 53736
Meniscusmethode	Neen	Specifiek voor polyamiden	293 K tot 573 K	± 0,5 K	Bestaande norm ISO 1218 (E)
Methodes voor vriespuntbepaling	Voor vloeistoffen	Voor vloeistoffen	223 K tot 573 K	± 0,5 K	Bestaande norm, zoals BS 4699

(1) Afhankelijk van het type instrument en van de zuiverheid van de stof.

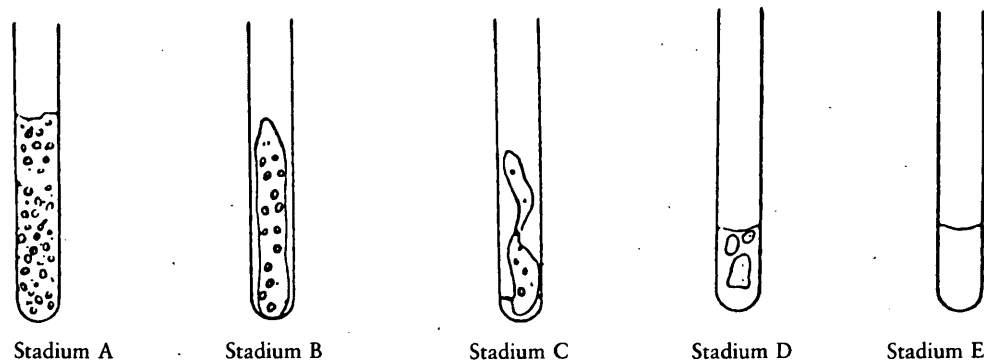
### 1.6. Beschrijving van de testmethoden

Voor verschillende testmethoden is de aan te houden werkwijze vastgelegd in internationale en nationale normen (zie aanhangsel).

#### 1.6.1. Methoden waarbij gebruik wordt gemaakt van een capillair

Het smeltproces verloopt bij fijngemalen stoffen en langzame temperatuurstijging doorgaans als in figuur 1 weergegeven.

Figuur 1



Stadium A (begin van het smeltproces; druppelpunt): fijne druppeltjes hangen op uniforme wijze aan de binnenwand van het capillair.

Stadium B (krimppunt): er ontstaat ruimte tussen het monster en de binnenwand wegens krimpen van de smelt.

Stadium C (instortingspunt): het gekrompen monster begint in te storten en wordt vloeibaar.

Stadium D (vervloeingspunt): op de oppervlakte wordt een volledige meniscus gevormd, maar een aanzienlijk gedeelte van het monster is nog vast.

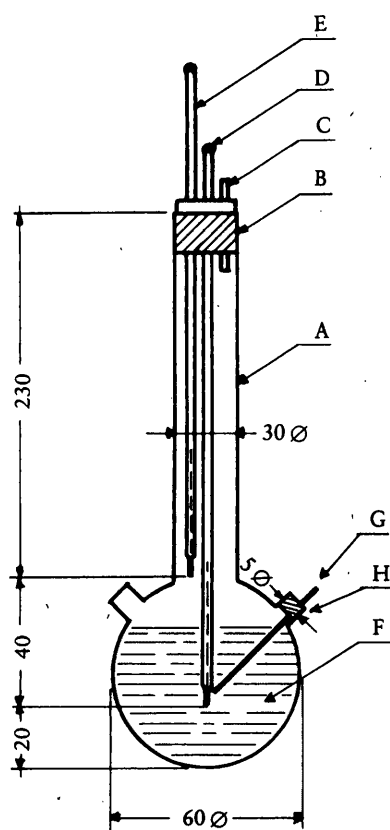
Stadium E (eindstadium van het smeltproces): er zijn geen vaste deeltjes meer.

Tijdens de smeltpuntbepaling wordt de temperatuur in het begin- en eindstadium van het smeltproces geregistreerd.

#### 1.6.1.1. Toestellen voor smeltpuntbepaling waarbij gebruik wordt gemaakt van een vloeistofbad

In figuur 2 is een genormaliseerd glazen apparaat voor smeltpuntbepaling (JIS K 0064) afgebeeld. Alle specificaties zijn opgegeven in mm.

Figuur 2



- A: Meetvat  
 B: Kurk  
 C: Opening  
 D: Thermometer  
 E: Hulphermometer  
 F: Vloeistofbad  
 G: Glazen capillair met een lengte van 80 tot 100 mm, inwendige zijdelingse diameter:  $1,0 \pm 0,2$  mm, wanddikte: 0,2 tot 0,3 mm  
 H: Zijbuis

#### Badvloeistof

De geschikte badvloeistof moet uit onderstaande stoffen wordt gekozen, afhankelijk van het smeltpunt van de te onderzoeken stof: vloeibare paraffine voor stoffen met een smeltpunt van maximaal 473 K, geconcentreerd zwavelzuur of siliconenolie voor stoffen met een smeltpunt van maximaal 573 K.

Voor stoffen met een smeltpunt van meer dan 523 K kan een mengsel, bestaande uit drie delen zwavelzuur en twee delen kaliumsulfaat (naar gewicht), worden gebruikt.

#### Thermometer

Er mag alleen gebruik worden gemaakt van thermometers die aan de eisen in de volgende of daarmee overeenkomende normen voldoen: ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

#### Werkwijze

De droge stof wordt fijngemalen in een mortier en in een aan één uiteinde dichtgesmolten capillair gebracht en wel zo dat het niveau van de vulling, nadat de stof stevig is aangedrukt, circa 3 mm bedraagt. Ten einde een gelijkvormig aangedrukt monster te verkrijgen, laat men het capillair vanaf een hoogte van circa 700 mm door een glazen buis verticaal op een horlogeglas vallen.

De gevulde capillaire buisjes worden in een bad geplaatst en wel zo dat het midden van de kwikbol van de thermometer het capillair ter hoogte van het monster aanraakt. Doorgaans wordt het capillair in het toestel gebracht bij ongeveer 10 K beneden het smeltpunt.

De badvloeistof wordt zodanig verwarmd dat de temperatuurstijging circa 3 K/min bedraagt. De vloeistof moet worden geroerd. Bij ongeveer 10 K beneden de verwachte smelttemperatuur wordt de snelheid van de temperatuurstijging ingesteld op ten hoogste 1 K/min.

#### Berekening

Het smeltpunt wordt als volgt berekend:

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

waarin:

$T$  = de gecorrigeerde smelttemperatuur, uitgedrukt in K,

$T_D$  = de van thermometer D afgelezen temperatuur, uitgedrukt in K,

$T_E$  = de van thermometer E afgelezen temperatuur, uitgedrukt in K,

$n$  = het aantal schaalverdelingen van het kwikdraad op het uitstekende gedeelte van thermometer D.

### 1.6.1.2. Metalen blok

De apparatuur bestaat uit:

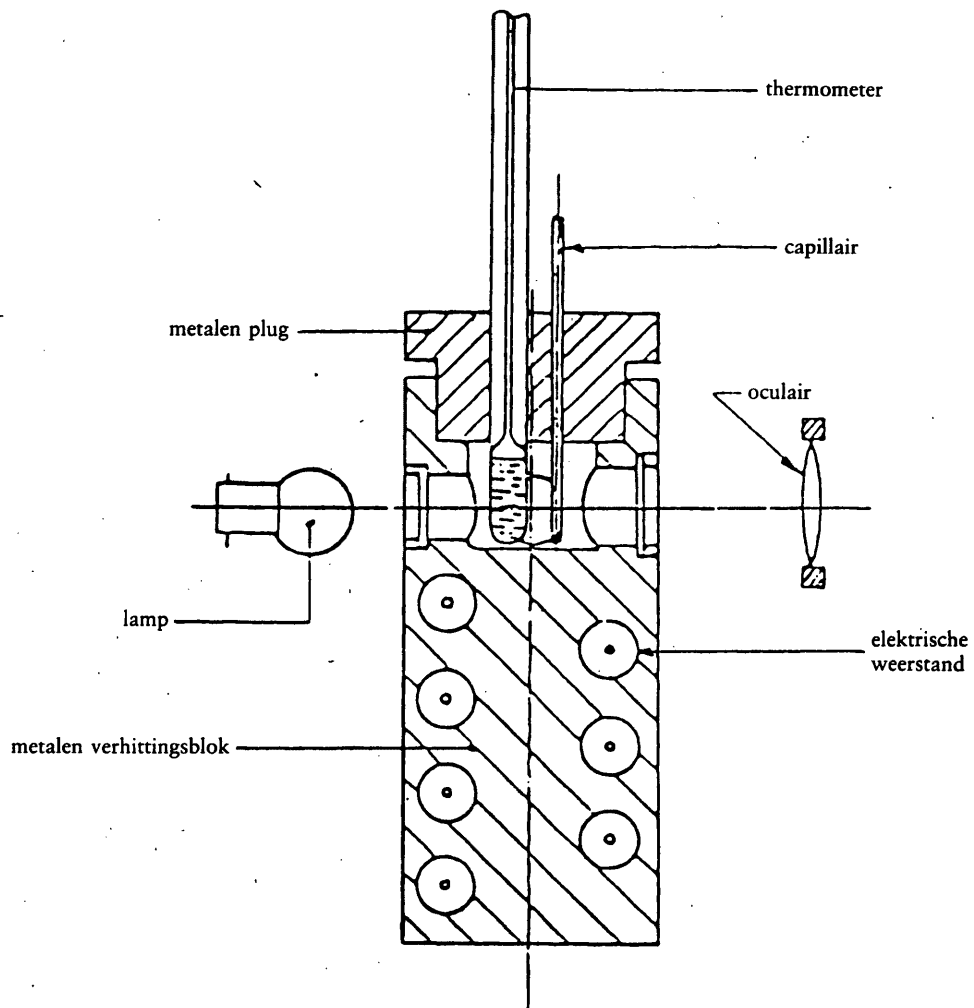
- een cilindervormig metalen blok, waarvan het bovenste gedeelte hol is en een kamer vormt (zie figuur 3);
- een metalen stop met twee of meer openingen, waarlangs buisjes in het metalen blok kunnen worden gebracht;
- een verwarmingssysteem voor het metalen blok, bij voorbeeld een in het blok ingesloten elektrische weerstand;
- een regelbare weerstand voor de stroomtoevoer, indien van elektrische verwarming gebruik wordt gemaakt;
- in de zijwanden van de kamer, in rechte hoeken ten opzichte van elkaar, vier vensters van hittebestendig glas; voor één van deze vensters is een oculair aangebracht, waardoor het capillair kan worden waargenomen, de overige drie vensters worden gebruikt voor de verlichting van de kamer en inhoud daarvan;
- een aan één uiteinde gesloten capillair van hittebestendig glas (zie 1.6.1.1).

Thermometer

Zie normen 1.6.1.1.

Ook kunnen thermo-elektrische instrumenten van vergelijkbare nauwkeurigheid worden gebruikt.

Figuur 3



**Werkwijze**

Zie 1.6.1.1. Thermometercorrectie hoeft hier niet te worden toegepast. De geregistreerde temperatuur komt overeen met het smeltpunt.

**1.6.1.3. Fotoceldetectie****Apparatuur en werkwijze**

Het apparaat bestaat uit een metalen kamer met een geautomatiseerd verwarmingssysteem. Drie capillairen worden overeenkomstig 1.6.1.1 gevuld en in de oven geplaatst.

Er zijn vijf lineaire temperatuurstijgingen beschikbaar voor het ijken van het apparaat; de gewenste temperatuurstijging wordt elektrisch ingesteld met een van tevoren gekozen constante snelheid en heeft een lineair verloop. Recorders geven de werkelijke oventemperatuur en het smeltpunt van de stof in het capillair aan.

**1.6.2. Verwarmede oppervlakken (hot stages)****1.6.2.1. De verhitte staaf volgens Kofler**

(zie aanhangsel).

**1.6.2.2. Smeltpuntmicroscoop**

(zie aanhangsel).

**1.6.2.3. Meniscusmethode (polyamiden)**

(zie aanhangsel).

De opwarmingsnelheid bij temperaturen in de buurt van het smeltpunt moet minder zijn dan 1 K/min.

**1.6.3. Methoden voor de vriespuntbepaling**

(zie aanhangsel).

**2. GEGEVENS**

Soms is een thermometercorrectie noodzakelijk.

**3. RAPPORTAGE**

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

de gebruikte testmethode en eventuele wijzigingen hierin;

het smeltpunt en een raming van de nauwkeurigheid hiervan; het gerapporteerde smeltpunt is het gemiddelde van ten minste twee metingen die binnen de nauwkeurigheidsgrenzen volgens de tabel vallen; als het temperatuurverschil tussen het beginpunt en het eindpunt van het smelten binnen de nauwkeurigheidsgrenzen van de methode valt, wordt de temperatuur van het eindstadium genomen als het smeltpunt; zo niet, dan moeten beide temperaturen worden gerapporteerd;

eventuele ontleding of sublimatie van de onderzochte stof, voordat het smeltpunt is bereikt;

alle gegevens en opmerkingen, die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, en met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof.

**4. LITERATUUR**

(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, p. 505-515.

*Aanhangsel*

Voor aanvullende technische gegevens kunnen de volgende normen als voorbeeld worden geraadpleegd.

**1. Capillaire methoden****1.1. *Smeltpuntoestellen met een vloeistofbad***

ASTM E 324-69	Standard Test Method for Relative Initial and Final Melting Points and the Melting Range of Organic Chemicals.
BS 4634	Method for the Determination of Melting Point and/or Melting Range.
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren.
JIS K 00-64	Testing Methods for Melting Point of Chemical Products.

**1.2. *Smeltpuntoestellen met een metalen blok***

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

**2. Hete oppervlakken****2.1. *Verwarmde staaf volgens Kofler***

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

**2.2. *Smeltpuntmicroscop***

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

**2.3. *Meniscusmethode (polyamiden)***

ISO 1218 (E)	Plastics — Polyamides — Determination of „Melting Point”.
ANSI/ASTM D 2133-66	Standard Specification for Acetal Resin Injection Moulding and Extrusion Materials.
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion”; méthode du ménisque.

**3. Methoden voor vriespuntbepaling**

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. KOOKPUNT/KOOKTRAJECT

## 1. METHODE

De beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1).

## 1.1. Inleiding

De hieronder beschreven methoden en toestellen kunnen worden toegepast op vloeistoffen, welke beneden het kookpunt geen chemische reactie ondergaan (bij voorbeeld: auto-oxidatie, omlegging, ontleding, enz.). De methoden zijn van toepassing op zuivere en onzuivere vloeistoffen.

De meeste aandacht wordt gegeven aan de fotocel detectiemethode, omdat hiermee zowel smeltpunten als kookpunten kunnen worden bepaald. Bovendien kunnen de metingen met deze methode worden geautomatiseerd.

Het voordeel van de „dynamische” methode is, dat deze ook kan worden toegepast voor de bepaling van de dampspanning en dat het niet nodig is de kooktemperatuur te corrigeren tot normale druk (101,325 kPa) omdat de standaarddruk tijdens de meting kan worden ingesteld. Deze methode is tot nu toe echter nog niet geautomatiseerd.

*Opmerkingen:*

De invloed van verontreinigingen op de bepaling van het kookpunt is sterk afhankelijk van de aard van de verontreiniging. Zo kan het effect aanzienlijk zijn, indien in het monster een zeer vluchtig oplosmiddel aanwezig is.

De samenstelling van het te onderzoeken monster verandert tussen de metingen als gevolg van de verdamping van laagkokende componenten: in dergelijke gevallen worden steeds hogere waarden verkregen.

## 1.2. Definities en eenheden

Het standaardkookpunt wordt beschreven als de temperatuur waarbij de druk van de verzadigde damp van een vloeistof overeenkomt met de standaarddruk.

Het gemeten kookpunt is afhankelijk van de druk. Deze afhankelijkheid kan als volgt worden gekwantificeerd met de vergelijking van Clausius-Clapeyron:

$$\text{Log } p = - \frac{\Delta H_V}{2,3 RT} + \text{constante,}$$

waarin:

$p$  = de dampspanning van de stof in Pa,

$\Delta H_V$  = de verdampingswarmte in  $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,

$R$  = de universele molaire gasconstante:  $R = 8,31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ,

$T$  = de temperatuur in K.

Bij vermelding van de temperatuur bij het kookpunt (kooktemperatuur) moet de druk tijdens de meting worden opgegeven.

**Herleidingen**

**Druk (eenheid: kPa)**

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(„bar”-eenheden zijn nog toegestaan, doch het gebruik hiervan wordt niet aanbevolen).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(de eenheden mm Hg en Torr zijn niet meer toegestaan).

**Temperatuur (eenheid: K)**

$t = T - 273,15$

$t$  in °C en  $T$  in K.

**1.3. Referentiestoffen**

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om de resultaten te kunnen vergelijken wanneer een andere methode wordt gebruikt.

Een aantal ijkstoffen is te vinden in de methoden die zijn opgenomen in het aanhangsel.

**1.4. Principe van de testmethoden**

Alle methoden voor de bepaling van het kookpunt (of kooktraject) berusten op de meting van de kooktemperatuur.

Er worden vijf methoden beschreven.

**1.4.1. Bepaling met behulp van een ebullioscoop**

De ebullioscoop is oorspronkelijk ontwikkeld voor de bepaling van het molecuulgewicht via de kookpuntverhoging, doch leent zich ook voor nauwkeurige kookpuntmetingen. Een zeer eenvoudig toestel is beschreven in ASTM D 1120-72 (zie aanhangsel). De vloeistof wordt in dit toestel onder evenwichtscondities bij atmosferische druk verwarmd totdat zij kookt.

**1.4.2. Dynamische methode**

Bij deze methode meet men de condensatietemperatuur van de damp met behulp van een thermokoppel in de reflux tijdens het koken. De druk kan bij deze methode worden gevarieerd.

**1.4.3. Destillatiemethode voor kookpunt en kooktraject**

Bij deze methode destilleert men de vloeistof en meet men de condensatietemperatuur van de damp, alsmede de hoeveelheid destillaat.

**1.4.4. Methode volgens Siwoloboff**

Bij deze methode verwarmt men het monster in een monsterbuisje, dat in een verwarmd vloeistofbad wordt gehouden. Een dichtgesmolten capillair met een luchtbel onderin wordt in het monsterbuisje gebracht.

Men bepaalt de temperatuur waarbij een regelmatige sliert belletjes uit het capillair komt of, bij tijdelijke afkoeling, de temperatuur waarbij de bellenvorming stopt en de vloeistof plotseling in het capillair begint te stijgen (Siwoloboff).

**1.4.5. Fotoceldetectie**

Naar het beginsel volgens Siwoloboff worden de opstijgende bellen automatisch gemeten met de fotocel.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

De toepasbaarheid en nauwkeurigheid van de verschillende methoden voor de bepaling van het kookpunt (kooktraject) staan vermeld in tabel 1.

**1.6. Beschrijving van de testmethoden**

De werkwijzen van een aantal testmethoden zijn beschreven in internationale en nationale normen (zie aanhangsel).

**1.6.1. Ebullioscoop**

Zie aanhangsel.

1.6.2. *Dynamische methode*

Zie testmethode A.4 voor de bepaling van de dampspanning.

De waargenomen kooktemperatuur bij een druk van 101,325 kPa wordt geregistreerd.

1.6.3. *Destillatieproces (kooktraject)*

Zie aanhangsel.

TABEL 1: VERGELIJKING VAN DE METHODEN

Meetmethode	Nauwkeurigheid, bij benadering	Opmerkingen
Ebullioscoop	$\pm 1,4$ K (tot 373 K) <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> $\pm 2,5$ K (boven 373 K) <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>	Bestaande norm ASTM D 1120-72 <sup>(1)</sup>
Dynamische methode	$\pm 0,5$ K <sup>(2)</sup>	
Destillatieproces (kooktraject)	$\pm 0,5$ K	Bestaande norm, bij voor- beeld ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Volgens Siwoloboff	$\pm 1$ K tot $\pm 2$ K <sup>(2)</sup>	
Fotoceldetectie	$\pm 0,3$ K (bij 373 K) <sup>(2)</sup>	

<sup>(1)</sup> Deze nauwkeurigheid geldt alleen voor eenvoudige toestellen zoals bij voorbeeld beschreven in ASTM D 1120-72; de nauwkeurigheid kan worden verbeterd met meer verfijnde versies van de ebullioscoop.

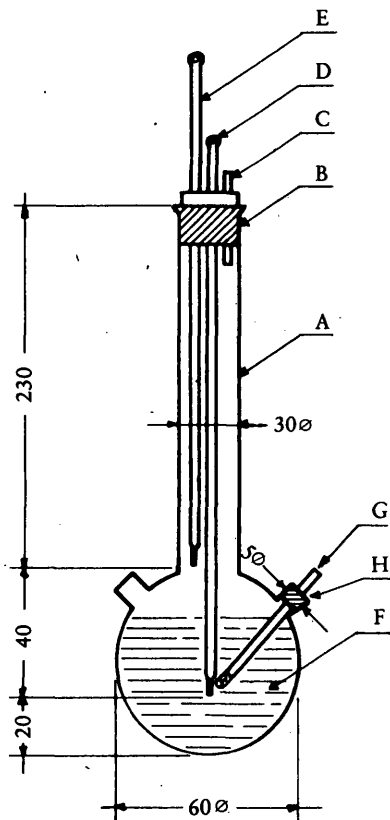
<sup>(2)</sup> Deze nauwkeurigheid geldt alleen voor zuivere stoffen.

1.6.4. *Methode volgens Siwoloboff*

Het monster wordt verwarmd in een smeltpunttoestel in een monsterbuisje met een diameter van ongeveer 5 mm (figuur 1).

In figuur 1 staat een standaardapparaat voor de bepaling van smelt- en kookpunt (JIS K 0064) afgebeeld (glas, alle afmetingen in mm).

Figuur 1



- A: Meetbuis
- B: Kurk
- C: Opening
- D: Thermometer
- E: Hulpthermometer
- F: Vloeistofbad
- G: Monsterbuisje: buitendiameter maximaal 5 mm; capillair van ongeveer 100 mm lengte en een binnendiameter van circa 1 mm en een wanddikte van circa 0,2 tot 0,3 mm
- H: Zijbuis

Een capillair (kookcapillair) dat op ongeveer 1 cm boven het ondereind is dichtgesmolten, wordt in het monsterbuisje gebracht. Het monsterbuisje wordt met de te onderzoeken stof gevuld, totdat het dichtgesmolten deel van het capillair zich onder het vloeistofoppervlak bevindt. Het monsterbuisje met het kookcapillair wordt met een elastiekje aan de thermometer bevestigd of met een zijstuk vastgezet (zie figuur 2).

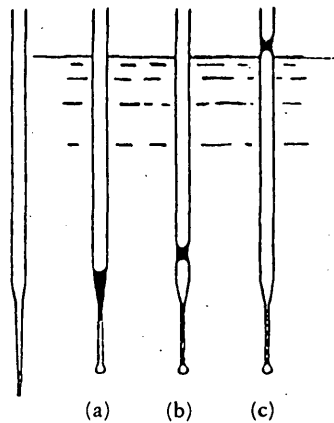
Figuur 2

Beginsel volgens Siwoloboff



Figuur 3

Gewijzigd beginsel



De badvloeistof wordt gekozen aan de hand van de kooktemperatuur. Bij temperaturen tot 573 K kan zwavelzuur of siliconenolie worden gebruikt. Vloeibare paraffine mag slechts worden gebruikt bij temperaturen tot 473 K. De verwarming van het vloeistofbad moet zo zijn geregeld, dat de temperatuur aanvankelijk 3 K/min stijgt. Het vloeistofbad moet worden geroerd. Bij ongeveer 10 K beneden het verwachte kookpunt, moet de verwarming zo worden ingesteld dat de temperatuur met minder dan 10 K/min stijgt. Tegen de tijd dat de kooktemperatuur wordt bereikt, beginnen er belletjes uit het kookcapillair te komen.

Het kookpunt wordt bereikt wanneer, bij tijdelijke afkoeling, de bellenvorming stopt en de vloeistof plotseling in het capillair omhoog komt. De bijbehorende stand van de thermometer is de kooktemperatuur van de te onderzoeken stof.

Bij het gewijzigd beginsel (figuur 3) wordt het kookpunt bepaald in een smeltpuntcapillair. Het smeltpuntcapillair wordt uitgetrokken tot een fijne punt van ongeveer 2 cm lengte, waarin een geringe hoeveelheid van het monster wordt opgezogen. Het open uiteinde van de fijne punt wordt dichtgesmolten, zodat er zich onderaan een kleine luchtbel bevindt (a). Bij verwarming in het smeltpuntoestel (b) zet de luchtbel uit. Het kookpunt komt overeen met de temperatuur waarbij de prop van de stof op het niveau van het vloeistofoppervlak komt (c).

#### 1.6.5. *Fotoceldetectie*

Het monster wordt verwarmd in een capillair in een verwarmd metaalblok.

Via geschikte openingen in het blok wordt een lichtbundel door de stof heen op een zorgvuldig geijkte fotocel gericht.

Terwijl de temperatuur van het monster oploopt, komen er luchtbellens uit het kookcapillair. Wanneer de kooktemperatuur wordt bereikt, neemt het aantal bellen flink toe. Hierbij verandert de intensiteit van het licht dat op de cel valt, waardoor het apparaat wordt stilgezet dat de temperatuur afleest van een thermometer met platina weerstand die in het blok is gemonteerd.

Deze methode is bijzonder nuttig omdat hiermee ook bepalingen mogelijk zijn beneden kamertemperatuur tot 253,15 K (-20 °C) zonder enige veranderingen in de apparatuur. Het instrument moet alleen in een koude kamer of koelbad worden geplaatst. Hoe de kookpuntbepaling precies moet worden gedaan, is aangegeven in de handleiding bij het toestel.

## 2. GEGEVENS

Bij kleine afwijkingen van de normale druk (max.  $\pm 5$  kPa) worden de kooktemperaturen genormaliseerd tot  $T_n$  met behulp van de volgende numerieke vergelijking van Sidney Young:

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

waarin:

$\Delta p$  = (101,325 - p) (let op het teken!),

p = barometerstand in kPa,

$f_T$  = tempo waarin het kookpunt verandert met de druk in K/kPa,

T = gemeten kooktemperatuur in K,

$T_n$  = kooktemperatuur gecorrigeerd tot normale druk in K.

De temperatuurcorrectiefactoren  $f_T$  en de vergelijkingen voor de benadering daarvan zijn opgenomen in de internationale en nationale normen die hierboven voor een groot aantal stoffen zijn genoemd.

Zo worden bij voorbeeld in de methode DIN 53171 bij de benadering de volgende correcties vermeld voor oplosmiddelen in verf (zie tabel 2).

TABEL 2: TEMPERATUURCORRECTIEFACTOREN  $f_T$ 

Temperatuur T K	Correctiefactor $f_T$ 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. RAPPORTAGE

Het tetrarapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- de gebruikte testmethoden en eventuele wijzigingen hierin;
- de gemeten kookpunten en het gemiddelde hiervan; het gerapporteerde kookpunt is het gemiddelde van ten minste twee metingen die binnen de nauwkeurigheidsgrenzen volgens tabel 1 vallen; als de resultaten niet reproduceerbaar zijn, dient een andere testmethode te worden overwogen; wanneer de onderzochte stof kookt over een temperatuurtraject, moet dit traject worden gerapporteerd;
- de geschatte nauwkeurigheid voor alle resultaten;
- de druk(ken), waarbij de metingen zijn uitgevoerd, in kPa; deze druk(ken) dient (dienen) bij voorkeur dicht bij de normale druk te liggen;
- alle gegevens en opmerkingen, die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, en met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof.

### 4. LITERATUUR

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

*Aanhangsel*

Voor aanvullende technische gegevens kunnen de volgende normen als voorbeeld worden geraadpleegd:

1. **Ebullioscoop**  
ASTM D 1120-72      Standard Test Method for Boiling Point of Engine Anti-freezes.
  
  2. **Destillatieproces (kooktraject)**  
ISO/R 918            Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range).  
BS 4349/68           Method for Determination of Distillation of Petroleum Products.  
BS 4591/71           Method for the Determination of Distillation Characteristics.  
DIN 53171            Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes.
-

### A. 3. RELATIEVE DICHTHEID

#### 1. METHODE

De beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1).

#### 1.1. Inleiding

De hieronder beschreven methoden voor het bepalen van de relatieve dichtheid zijn van toepassing op vaste stoffen en op vloeistoffen, ongeacht de zuiverheid van deze stoffen.

De verschillende methoden zijn vermeld in de tabel.

#### 1.2. Definities en eenheden

De relatieve dichtheid ( $D_4^{20}$ ) van vaste stoffen of vloeistoffen is de verhouding tussen de massa van een volume te onderzoeken stof bij 20 °C en de massa van hetzelfde volume water bij 4 °C. De relatieve dichtheid heeft geen dimensie.

De dichtheid  $\rho$  van een stof is het quotiënt van de massa  $m$  en het volume  $v$  van deze stof.

De dichtheid wordt uitgedrukt in  $\text{kg/m}^3$  (SI-eenheden).

#### 1.3. Referentiestoffen (1) (2)

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om de resultaten te kunnen vergelijken, wanneer een andere methode wordt gebruikt.

#### 1.4. Principe van de testmethoden

Er worden vier methoden gebruikt.

#### 1.4.1. *Methoden gebaseerd op de opwaartse kracht*

##### 1.4.1.1. Areometer (hydrometer voor vloeistoffen)

Voldoende nauwkeurige en snelle dichtheidsbepalingen kunnen worden uitgevoerd met drijvende areometers; het gedeelte van de areometer dat in de vloeistof zakt, is bepalend voor de dichtheid van de vloeistof en kan van een schaalverdeling worden afgelezen.

##### 1.4.1.2. Hydrostatische balans (voor vloeistoffen en vaste stoffen)

Het gewichtsverschil van een monster, gemeten in lucht en in water, kan worden gebruikt om de dichtheid ervan te bepalen. Voor vaste stoffen geldt de gemeten dichtheid slechts voor het bewuste monster. Voor het bepalen van de dichtheid van vloeistoffen wordt een lichaam met volume  $v$  eerst in lucht en vervolgens in de vloeistof gewogen.

##### 1.4.1.3. Methode met de ondergedompelde bol (voor vloeistoffen) (3)

Bij deze methode wordt de dichtheid van een vloeistof bepaald aan de hand van het verschil tussen de resultaten van een weging van de vloeistof voor en na het onderdompelen van een bol met bekend volume in de te onderzoeken vloeistof.



**1.4.2. Methoden met de pyknometer**

Voor vaste stoffen of vloeistoffen kunnen pyknometers van uiteenlopende vorm en met bekend volume worden gebruikt. De dichtheid wordt berekend uit het verschil in gewicht tussen de volle en de lege pyknometer en het bekende volume daarvan.

**1.4.3. Vergelijkingspyknometer met lucht (voor vaste stoffen)**

De dichtheid van een vaste stof in willekeurige vorm kan bij kamertemperatuur worden gemeten met behulp van een gasvergelijkingspyknometer. Het volume van een stof wordt in lucht of in een inert gas gemeten in een cilinder waarvan het variabele volume gekalibreerd is. Voor de berekening van de dichtheid wordt na meting van het volume een massameting verricht.

**1.4.4. Oscillerende dichtheidsmeter (4), (5), (6)**

De dichtheid van een vloeistof kan worden gemeten met behulp van een oscillerende dichtheidsmeter. Een mechanische oscillator in de vorm van een U-buis wordt in trilling gebracht bij een specifieke frequentie die afhankelijk is van de massa van de oscillator. Bij het inbrengen van een monster verandert de resonantiefrequentie van de oscillator. Het apparaat moet worden geijkt met twee stoffen van bekende dichtheid.

De ijkstoffen moeten bij voorkeur zo worden gekozen dat de dichtheden ervan zich aan de uiteinden van het meetbereik bevinden.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

De toepasbaarheid van de verschillende methoden voor bepaling van de relatieve dichtheid staat vermeld in de tabel.

De nauwkeurigheid zoals opgegeven in de ISO-normen, geldt alleen voor zuivere stoffen.

**1.6. Beschrijving van de testmethoden**

Normen, die als voorbeeld kunnen worden geraadpleegd voor aanvullende technische gegevens, zijn bijgevoegd in het aanhangsel. De proeven moeten worden uitgevoerd bij 20 °C en ten minste in tweevoud.

**2. GEGEVENS**

Zie normen.

**3. RAPPORTAGE**

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- de gebruikte testmethode of norm en eventuele wijzigingen hierin;
- de relatieve dichtheid  $D_4^{20}$ , zoals gedefinieerd onder 1.2, alsmede de fysische toestand van de onderzochte stof;
- de gebruikte referentiestoffen;
- alle gegevens en opmerkingen, die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, en met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de stof.

TABEL: TOEPASBAARHEID VAN DE METHODEN

Meetmethode	Dichtheid		Maximale dynamische viscositeit	Opmerkingen
	Vaste stof	Vloeistof		
1.4.1.1. Areometer		x	5 Pa·s	ISO/387 ISO/R 649
1.4.1.2. Hydrostatische balans a) vaste stoffen b) vloeistoffen	x	x	5 Pa·s	ISO/R 1185 (A) ISO/R 91 en R 758
1.4.1.3. Methode met de ondergedompelde bol		x	20 Pa·s	DIN 53217 (uitbreiding)
1.4.2. Pyknometer a) vaste stoffen b) vloeistoffen	x	x	500 Pa·s	ISO/R 3507 ISO/R 1183 (B) ISO/R 758
1.4.3. Vergelijkingspyknometer met lucht	x			DIN 55990 deel 3 DIN 53243
1.4.4. Oscillerende dichtheidsmeter		x	5 Pa·s	

## 4.

## LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109 — Decision of the Council C(81)30 Final.
- (2) IUPAC, Recommended Reference Materials for Realisation of Physico-chemical Properties. — Pure and Applied Chemistry, Vol. 48, 1976, p. 508.
- (3) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm; Vol. 11, 1979, p. 427-430.
- (4) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, Vol. 19, 1970, p. 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, p. 717-726.
- (6) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, Vol. 9, 1976, p. 253-255.

*Aanhangsel*

Voor aanvullende technische gegevens kunnen de volgende normen als voorbeeld worden geraadpleegd.

**1. Methoden gebaseerd op de opwaartse kracht****1.1. Areometer**

DIN 12790 Areometer; algemene aanwijzingen.

ISO 387.

DIN 12791 Deel I: Dichtheidsareometers: constructie, instelling en gebruik.

Deel II: Dichtheidsareometers: genormaliseerde maten, benaming.

ISO/R 649.

DIN 12793 Laboratoriumglaswerk: areometers voor bepaling van het meetbereik.

**1.2. Hydrostatische balans****Voor vaste stoffen**

ISO/R 1183 Methode A: Methoden voor het bepalen van de dichtheid en relatieve dichtheid van kunststoffen met uitzondering van schuimplastics.

ASTM D 792 Soortelijk gewicht en dichtheid van kunststoffen door vloeistofverplaatsing.

DIN 53479 Proeven voor kunststoffen en elastomeren: bepaling van de dichtheid.

**Voor vloeistoffen**

ISO R 91, ISO/R 758.

DIN 51757 Proeven voor minerale oliën en verwante materialen: bepaling van de dichtheid.

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 en ASTM D 1481-62.

ASTM D 1298 Dichtheid, soortelijk gewicht of API gewicht van ruwe aardolie en vloeibare aardolieproducten met de areometermethode.

BS 4714 Dichtheid, soortelijk gewicht of API gewicht van ruwe aardolie en vloeibare aardolieproducten met de areometermethode.

**1.3. Methode met de ondergedompelde bol**

DIN 53217 Proeven voor verf, vernis en soortgelijke producten: dichtheidsbepaling met de pyknometer (uitbreiding van de methode met de ondergedompelde bol, verschenen in 1981).

**2. Pyknometermethoden****2.1. Voor vloeistoffen**

ISO 3507 Pyknometers.

ISO/R 758 Vloeibare chemische producten; bepaling van de dichtheid bij 20 °C.

DIN 12797 Gay-Lussac pyknometer (voor niet-vluchtige vloeistoffen die niet al te visceus zijn).

DIN 12798 Lipkin pyknometer (voor vloeistoffen met een kinematische viscositeit van minder dan  $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  bij 15 °C).

DIN 12800	Sprengel pyknometer (voor vloeistoffen zoals in DIN 12798).
DIN 12801	Reischauer pyknometer (voor vloeistoffen met een kinematische viscositeit van minder dan $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ bij 20 °C), vooral ook toepasbaar op koolwaterstoffen en oplossingen in water, alsmede op vloeistoffen met een hogere dampdruk, ongeveer 100 kPa bij 90 °C).
DIN 12806	Hubbard pyknometer (voor alle soorten visceuze vloeistoffen met een niet al te hoge dampdruk, in het bijzonder voor verven, vernissen en bitumen).
DIN 12807	Bingham pyknometer (voor vloeistoffen zoals in DIN 12801).
DIN 12808	Jaulmes pyknometer (in het bijzonder voor mengsels van ethanol en water).
DIN 12809	Pyknometer met ingeslepen thermometer en capillaire zijbuis (voor vloeistoffen die niet al te visceus zijn).
DIN 53217	Proeven voor verven, vernissen en soortgelijke produkten; bepaling van de dichtheid met behulp van een pyknometer.
DIN 51757	Punt 7; Proeven voor minerale oliën en verwante materialen; bepaling van de dichtheid.
ASTM D 297	Hoofdstuk 15; Rubberprodukten; chemische analyse.
ASTM D 2111	Methode C: Organische halogeenvbindingen.
BS 4699	Methode voor het bepalen van soortelijk gewicht en dichtheid van aardolieprodukten (met behulp van een bicapillaire pyknometer met schaalverdeling).
BS 5903	Methode voor het bepalen van de relatieve dichtheid en dichtheid van aardolieprodukten met behulp van een pyknometer met capillaire stop.

## 2.2. *Voor vaste stoffen*

ISO/R 1183	Methode B: Methode voor het bepalen van de dichtheid en relatieve dichtheid van kunststoffen, met uitzondering van schuimplastics.
DIN 19683	Bepaling van de dichtheid van grond.

## 3. **Vergelijkingspyknometer met lucht**

DIN 55990	— deel 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack, Bestimmung der Dichte.
DIN 53243	Anstrichstoffe; chlorhaltige Polymere; Prüfung.

## A. 4. DAMSPANNING

### 1. METHODE

De beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1).

#### 1.1. Inleiding

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de structuur, het smeltpunt en het kookpunt van de stof.

Er bestaat geen meetmethode die voor alle mogelijke waarden van de dampspanning van toepassing is. Er worden daarom verschillende methoden aanbevolen voor het meten van de dampspanning van  $<10^{-3}$  Pa tot  $10^5$  Pa.

In de regel zal de dampspanning worden beïnvloed door verontreinigingen. De invloed van verontreinigingen op de bepaling van de dampspanning is sterk afhankelijk van de soort verontreiniging. Het effect kan aanzienlijk zijn als een zeer vluchtig oplosmiddel in het monster voorkomt.

#### 1.2. Definities en eenheden

De dampspanning van een stof wordt gedefinieerd als de druk bij verzadiging boven een vaste stof of vloeistof. Bij thermodynamisch evenwicht is de dampspanning van een zuivere stof alleen een functie van temperatuur.

De SI-eenheid van druk die moet worden gebruikt is de pascal (newton/m<sup>2</sup>).

Enkele tot nu toe gebruikte eenheden en hun omrekeningsfactoren zijn:

$$1 \text{ Torr (mm Hg)} = 1,333 \times 10^2 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ atmosfeer (fysische atm)} = 1,013 \times 10^5 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ atmosfeer (technische at)} = 9,81 \times 10^4 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$$

De SI-eenheid van temperatuur is de kelvin (K).

#### 1.3. Referentiestoffen

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren, en om de resultaten te kunnen vergelijken wanneer een andere methode wordt gebruikt.

#### 1.4. Principe van de testmethoden

Voor het bepalen van de dampspanning worden vijf methoden voorgesteld die in verschillende meetbereiken van de dampspanning kunnen worden toegepast. In elke methode wordt de dampspanning bepaald bij verschillende temperaturen. Binnen een beperkt temperatuurgebied is de logaritme van de dampspanning van een zuivere stof een lineaire functie van de inverse van de temperatuur.

##### 1.4.1. Dynamische methode

In de dynamische methode wordt de kooktemperatuur bij een bepaalde druk gemeten.

Aanbevolen meetbereik:

van  $10^3$  Pa tot  $10^5$  Pa, van  $20$  °C tot  $100$  °C.

Deze methode wordt ook aanbevolen voor kookpuntsbepalingen en is voor dat doel bruikbaar tot  $350$  °C.

**1.4.2. Statische methode**

In de statische methode wordt de dampspanning bij thermodynamisch evenwicht in een afgesloten systeem bepaald bij een bepaalde temperatuur.

Deze methode is geschikt voor vaste stoffen en vloeistoffen bestaande uit één of meer componenten.

Aanbevolen meetbereik:

van 10 Pa tot  $10^5$  Pa, van 0 °C tot 100 °C.

**1.4.3. Isoteniscoop**

Deze genormaliseerde methode is ook een statische methode, maar is in het algemeen niet geschikt voor systemen met meerdere componenten. Meer gegevens zijn beschikbaar in ASTM-methode D-2879-75.

Aanbevolen meetbereik:

van 100 Pa tot  $10^5$  Pa, van 0 °C tot 100 °C.

**1.4.4. Dampspanningsbalans**

De hoeveelheid stof die een cel per tijdseenheid verlaat door een opening met bekende afmetingen, wordt bepaald onder vacuümomstandigheden, waarbij terugkeer van de stof naar de cel verwaarloosbaar is (bij voorbeeld door meting van de kracht welke door een dampstroom op een gevoelige balans wordt uitgeoefend of door meting van de afname van het gewicht).

Aanbevolen meetbereik:

van  $10^{-3}$  Pa tot 1 Pa, van 0 °C tot 100 °C.

**1.4.5. Gasverzadigingsmethode**

Een stroom inert dragergas wordt over de stof geleid, zodat het gas verzadigd wordt met de damp van de stof. Vervolgens wordt de damp in een geschikte val opgevangen. De gemeten hoeveelheid stof die door een bekende hoeveelheid dragergas is getransporteerd, wordt gebruikt om de dampspanning bij een gegeven temperatuur te berekenen.

Aanbevolen meetbereik:

lager dan 1 Pa.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

De verschillende methoden voor het bepalen van de dampspanning worden in de tabel vergeleken op toepasbaarheid, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid, meetbereik en bestaande normalisatie.

TABEL: KWALITEITSCRITEIA

Meetmethode	Vaste stof	Vloeistof	Geschatte herhaalbaarheid <sup>(1)</sup>	Geschatte reproduceerbaarheid <sup>(1)</sup>	Aanbevolen meetbereik	Bestaande normen
1.4.1. Dynamische methode		×	tot 25 % 1— 5 %	tot 25 % 1— 5 %	10 <sup>3</sup> Pa tot 2 · 10 <sup>3</sup> Pa 2 · 10 <sup>3</sup> Pa tot 10 <sup>5</sup> Pa	— —
1.4.2. Statische methode	×	×	5—10 %	5—10 %	10 Pa tot 10 <sup>5</sup> Pa	—
1.4.3. Isoteniscoop	×	×	5—10 %	5—10 %	10 <sup>2</sup> Pa tot 10 <sup>5</sup> Pa	ASTM D 2879-75
1.4.4. Dampspanningsbalans	×	×	5—20 %	tot 50 %	10 <sup>-3</sup> Pa tot 1 Pa	—
1.4.5. Gasverzadigingsmethode	×	×	10—30 %	tot 50 %	< 10 <sup>-3</sup> Pa tot 1 Pa	—

(<sup>1</sup>) Afhankelijk van de zuiverheidsgraad.

## 1.6. Beschrijving van de testmethoden

### 1.6.1. *Dynamische methode*

#### 1.6.1.1. Apparatuur

De meetapparatuur bestaat uit een kookvat met glazen of metalen koeler en voorzieningen voor het regelen en meten van temperatuur en druk. De meetapparatuur die in figuur 1 is afgebeeld, is van hittebestendig glas en bestaat uit vijf delen:

De grote, gedeeltelijk dubbelwandige buis bestaat uit een glazen slijpstuk, een koeler, een koelvat en een inlaatbuis.

De glazen cilinder met een Cottrell-pomp is gemonteerd in het kookgedeelte van de buis en heeft een ruw oppervlak van gebroken glas om „stoten” tijdens het kookproces te voorkomen.

De temperatuur wordt gemeten met behulp van een thermokoppel of een weerstandsthermometer die in een kleine hoeveelheid olie gedompeld is. Deze is in de vulbuis gebracht, welke een geslepen insteekverbindingstuk heeft en aan de onderkant afgesloten is.

Het dwarsstuk zorgt voor de noodzakelijke verbinding met het gedeelte voor het regelen en meten van de druk.

De bol, die als buffervolume werkt, is verbonden met de meetapparatuur door middel van een capillaire buis.

Een verwarmingselement, dat aan de buitenkant van onderen in de glazen apparatuur steekt, zorgt voor de verwarming van het kookvat. De gewenste verwarmingsstroom wordt ingesteld door middel van een transformator met variabele spanning en afgelezen op een ampèremeter.

Voor het instellen van het gewenste vacuüm tussen 10<sup>2</sup> Pa en ongeveer 10<sup>5</sup> Pa wordt een oliepomp gebruikt.

Voor het instellen van de gewenste druk wordt een stikstofcilinder gebruikt, welke is aangesloten via een kraan die tevens dient voor het ontlichten van de apparatuur. Voor het meten van de druk wordt een precisieanometer gebruikt, die met het dwarsstuk is verbonden.

### 1.6.1.2. Meetprocedure

De dampspanning wordt gemeten door het kookpunt van het monster bij verschillende ingestelde waarden van de druk tussen ongeveer  $10^3$  Pa en  $10^5$  Pa te bepalen. Als de temperatuur bij constante druk constant wordt, betekent dit dat het kookpunt (voor een mengsel het kookevenwicht) is bereikt. Schuimende stoffen kunnen met deze methode niet worden onderzocht.

Voor het uitvoeren van de meting worden alle glazen delen eerst grondig gereinigd en gedroogd en vervolgens vacuümgezogen onder een gasstroom. Vervolgens wordt de stof in de apparatuur gebracht. Indien vaste stoffen niet als poeder beschikbaar zijn, kunnen er problemen ontstaan bij het vullen. Deze problemen kunnen echter worden omzeild door de koelwatermantel te verwarmen. Na het vullen wordt de apparatuur in elkaar gezet en wordt de stof ontgast. Vervolgens wordt de laagste gewenste druk ingesteld en wordt het verwarmingssysteem aangezet. Tegelijkertijd wordt het thermokoppel of de weerstandsthermometer verbonden met een recorder. Het evenwicht is bereikt, wanneer bij een constante druk een constante kooktemperatuur kan worden afgelezen. Nadat dit evenwichtspunt is geregistreerd, wordt een hogere druk ingesteld. Dit proces wordt herhaald totdat een druk van  $10^5$  Pa is bereikt (ongeveer 5 tot 10 meetpunten in totaal). Ter controle moeten de evenwichtspunten nogmaals worden bepaald bij afnemende drukken.

### 1.6.2. Statische methode

#### 1.6.2.1. Apparatuur

De meetapparatuur (figuur 2) omvat een verwarmings- en een koelsysteem van glas en metaal om het monster op een ingestelde temperatuur te brengen, alsmede voorzieningen om de druk en de temperatuur in te stellen en te meten.

De monsterruimte is aan één zijde voorzien van een hoogvacuümkraan van roestvrij staal en aan de andere zijde van een U-vormige buis die een geschikte manometervloeistof bevat. Het andere uiteinde van de U-vormige buis komt uit in een dwarsstuk met vertakkingen naar respectievelijk: een vacuümpomp, een stikstofcilinder, en een precisie-manometer.

Om de stof op een ingestelde temperatuur te brengen, wordt de gehele monsterruimte, inclusief de klep van de kraan en een voldoende groot gedeelte van de U-vormige buis (in de praktijk tot de hoogte van de klep van de kraan), in een bad met de gewenste constante temperatuur gebracht. De temperatuur wordt zo dicht mogelijk bij de buitenkant van de monsterruimte gemeten met een thermokoppel of een weerstandsthermometer en kan worden geregistreerd op een recorder.

Om het monster op zeer lage temperatuur te brengen kan vloeibare stikstof of een droogijs/alcoholmengsel worden gebruikt. Een ultracryostaat wordt gebruikt voor het meten bij lage temperatuur.

Om de apparatuur tot de vereiste druk leeg te pompen wordt een geschikte pomp gebruikt.

De dampspanning van een stof wordt doorgaans indirect via een nulaanwijzer gemeten. Als nulaanwijzer kan een U-vormige buis met vloeistof, zoals hieronder beschreven, worden gebruikt of, onder andere, een membraanmanometer. In een bad met temperatuurregeling zal de vloeistof in de U-vormige buis uit de evenwichtstoestand geraken onder invloed van de dampspanning. Vervolgens wordt stikstof uit de aangesloten stikstofcilinder via een kraan in de apparatuur gelaten om het effect van de dampspanning te compenseren en de manometeraanwijzing weer op nul te brengen. De hiervoor benodigde stikstofdruk wordt afgelezen op een precisie-manometer op kamertemperatuur. Deze druk komt overeen met de dampspanning van de stof bij de overeenkomstige constante temperatuur. Voor de nulpuntsinstelling kunnen in de U-vormige buis, afhankelijk van het drukgebied en het chemisch gedrag van de stof, verschillende vloeistoffen worden gebruikt: bij voorbeeld kwik, siliconenoliën, ftalaten.

Kwik kan worden gebruikt voor drukken groter dan  $10^2$  Pa, siliconenoliën en ftalaten ook voor drukken van  $10$  tot  $10^2$  Pa; de membraanmanometer kan zelfs worden gebruikt bij drukken lager dan  $10^{-1}$  Pa.

#### 1.6.2.2. Meetprocedure

Vóór de meting worden alle onderdelen van de apparatuur in figuur 2 grondig gereinigd met oplosmiddel en daarna gedroogd onder vacuüm. Vervolgens wordt de U-vormige buis gevuld met de gewenste manometervloeistof die van tevoren moet zijn ontgast bij verhoogde temperatuur.



Na het vullen met de stof wordt de apparatuur in elkaar gezet en de monsterruimte op zeer lage temperatuur gebracht. Met de kraan boven de monsterruimte in geopende stand wordt vervolgens de ingesloten lucht gedurende een aantal minuten uit de apparatuur gepompt. Daarna wordt de kraan boven de stof gesloten, het monster op de gewenste temperatuur gebracht en de niveauperandering van de kolommen, die hieruit voortvloeit, waargenomen en zo nodig met stikstof gecompenseerd tot de nulpositie, totdat de temperatuur constant is geworden. Vervolgens wordt de monsterruimte weer op zeer lage temperatuur gebracht. Als er in die toestand nog een restdruk wordt waargenomen, komt dit omdat er nog lucht in het monster is achtergebleven welke bij het opwarmen is vrijgekomen en alsnog kan worden afgezogen, of omdat de afkoeling nog niet tot een voldoende lage temperatuur heeft plaatsgevonden. In dat geval moet vloeibare stikstof als koelmiddel worden gebruikt.

Als het monster eenmaal voldoende is ontgast, wordt de temperatuurafhankelijkheid van de dampspanning bepaald met voldoende kleine temperatuurintervallen.

### 1.6.3. *Isoteniscoop*

Zie (2) voor een volledige beschrijving van deze methode. Het principe van het meetinstrument is afgebeeld in figuur 3. Evenals de statische methode, die is beschreven in 1.6.2, is de isoteniscoop geschikt voor onderzoek van vaste stoffen en vloeistoffen.

Voor vloeistoffen dient de stof zelf als vulvloeistof in de hulpmanometer. Voor vaste stoffen worden afhankelijk van het druk- en temperatuurgebied de in 1.6.2 genoemde manometervloeistoffen gebruikt. Voor vloeistoffen wordt de bol van de isoteniscoop gevuld met de te onderzoeken stof, welke bij verhoogde temperatuur tijdens het koken wordt ontgast.

Tegelijkertijd wordt een gedeelte van de vloeistof uit de bol gedistilleerd en in de bovenste gekoelde bol gecondenseerd, waarna het in de U-buis terugvloeit. Wanneer deze voldoende gevuld is met de ontgaste vloeistof, wordt de onderste bol met de U-buis in een bad met thermostaatregeling op de gewenste temperatuur gebracht en wordt de resulterende dampspanning indirect gemeten volgens de in 1.6.2 beschreven methode.

Voor vaste stoffen wordt de ontgaste manometervloeistof in de ronding aan de lange arm van de isoteniscoop gebracht. Daarna wordt de te onderzoeken vaste stof in de onderste bol gebracht en bij hogere temperatuur ontgast. Vervolgens wordt de isoteniscoop gekanteld zodat de manometervloeistof in de U-buis kan stromen. Het meten van de dampspanning als functie van de temperatuur vindt plaats volgens 1.6.2.

### 1.6.4. *Dampspanningsbalans*

#### 1.6.4.1. *Apparatuur*

In de literatuur worden verschillende ontwerpen beschreven (1). Het hier beschreven ontwerp illustreert de principes. Een aantal onderdelen zijn afgebeeld in figuur 4. Dit zijn de grondplaat en de stolp, een pomp met vacuümmeter en apparatuur voor het meten van de dampspanning door middel van de uitslag van een wijzer. De volgende onderdelen zijn op de grondplaat gemonteerd:

- Een verdampingsoven met een flens en een draaiende doorvoer. De verdampingsoven is een plat cilindrisch koperen vat (de oven kan ook zijn vervaardigd van glas omgeven door een koperen wand). Deze is geplaatst in een koperen houder welke met zijn onderste uitstekende rand op een stuk roestvrij staal is geschroefd. Het stuk roestvrij staal is op zijn beurt door middel van een flens op de grondplaat gemonteerd. Het kan rond de as van de oven worden gedraaid. De verwarming wordt verzorgd door een verwarmingsspoel, die aan de binnenkant van het stuk roestvrij staal is geplaatst en diens volgorde is afgesloten van de vacuümkamer.
- Het ovendeksel is van koper en heeft drie afzuigopeningen van verschillende doorsnede welke op 90° ten opzichte van elkaar zijn geplaatst. Door de oven te draaien kan de gewenste opening van de oven of een tussenliggende positie onder de gleuf in de koeler worden gebracht, welke excentrisch boven de oven is geplaatst, waardoor de molecuulbundel op of naast de balansschaal wordt gericht. Op de wand van de oven is een thermokoppel of weerstandsthermometer gemonteerd.
- De balans is een draaispoelinstrument. De wijzer is vervangen door een buisje waarop de balansarm en het tegengewicht zijn gemonteerd. De balansarm heeft een verwisselbare schaal welke vervaardigd is uit een dun stuk verguld aluminium. Een constantaandraad van 0,1 mm dik, waarop ijkgewichten kunnen worden aangebracht, is ongeveer in het midden van de balansarm vastgemaakt. De dampspanning kan worden geregistreerd met behulp van een foto-elektrisch nulpuntsinstrument.

- Een cilindrische pot van messing omgeeft de balansschaal aan alle zijden met uitzondering van de twee gleuven voor de beweging van de balansarm en een nauwe opening waardoor de molecuulbundel binnenkomt. De warmteafvoer naar buiten vindt plaats door een koperen staaf bovenop de messing pot. Deze wordt via een roestvrij stalen buis door de grondplaat geleid en is daarvan thermisch geïsoleerd. De staaf wordt onder de grondplaat in een dewarvat met vloeibare stikstof gedompeld.

#### 1.6.4.2. Meetprocedure

De koperen oven wordt gevuld met de stof, het deksel gesloten en de plaat met de openingen, het scherm en de messing pot (koeling) worden over de oven geschoven. De stolp wordt gemonteerd en de vacuumpompen worden ingeschakeld. De einddruk voor het begin van de meting is ongeveer  $10^{-4}$  Pa. Vanaf  $10^{-2}$  Pa wordt de koeling aangezet.

Na enige tijd zal de temperatuur van de balans laag genoeg zijn geworden, zodat de ontsnappende dampstraal kan condenseren op de schaal. Deze condensatie veroorzaakt een signaal op de aangesloten recorder. Dit signaal kan op twee manieren worden gebruikt: voor het hier beschreven apparaat wordt de dampspanning direct bepaald uit de druk op de schaal (hiervoor is de molecuulmassa niet nodig). Tegelijkertijd wordt de gecondenseerde massa bepaald zodat de verdampingssnelheid vanaf het moment van afzetting kan worden berekend. Dit laatste is van toepassing op meer algemene apparatuur. De dampspanning kan ook worden berekend uit de verdampingssnelheid en de molecuulmassa door gebruik te maken van de relatie van Herz:

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

waarin:

- G = verdampingssnelheid ( $\text{kg/s} \cdot \text{m}^2$ ),
- M = molaire massa ( $\text{g/mol}$ ),
- T = temperatuur (K),
- R = universeel molaire gasconstante ( $\text{J/mol} \cdot \text{K}$ ),
- p = dampspanning (Pa).

Als het vereiste vacuüm is bereikt, begint de serie metingen bij de laagste gewenste meettemperatuur. De gewenste opening wordt voorgedraaid en de dampstraal passeert het direct boven het deksel aangebrachte scherm en treft de afgekoelde schaal. De afmetingen van de schaal zijn zodanig dat de gehele kegelvormige straal wordt opgevangen. De impuls van de dampstraal veroorzaakt een kracht op de schaal waar de moleculen op het gekoelde oppervlak condenseren. Door de kracht van de dampstraal zal de balansarm uit de evenwichtspositie worden geduwd. Aan het uiteinde van de balansarm bevindt zich een lipje dat optisch wordt waargenomen via een prismasysteem en twee fotodiodes. Een daarmee verbonden stuurcircuit begint op hetzelfde ogenblik te werken en brengt de balansarm terug in de oorspronkelijke staat. Het vereiste draaimoment wordt geregistreerd en komt, na ijking met gewichten, overeen met de dampspanning van de stof.

Voor verdere metingen wordt de temperatuur in kleine stappen verhoogd, totdat de hoogste gewenste temperatuur is bereikt. Vervolgens wordt het monster weer afgekoeld en eventueel wordt een tweede kromme van de dampspanning gemeten. De twee reeksen zullen alleen reproduceerbaar zijn als het gemeten monster voldoende zuiver is. Als de derde reeks de resultaten van de tweede niet bevestigt, dan is het mogelijk dat de stof in het gekozen temperatuurgebied ontleedt.

#### 1.6.5. Gasverzadigingsmethode

##### 1.6.5.1. Apparatuur

De apparatuur voor deze test bestaat uit de onderdelen zoals afgebeeld in figuur 5 en zoals hieronder beschreven (1).

Inert gas

Het dragergas mag niet chemisch met de te onderzoeken stof reageren. Stikstof voldoet meestal, maar in een enkel geval kan een ander gas nodig zijn. Het gebruikte gas moet droog zijn (zie figuur 5, onderdeel 4: relatieve vochtigheidsmeter).

#### Regeling van de gasstroom

Voor het instellen van een constante gasstroom door de verzadigingskolom is een gasregelingsstelsel nodig.

#### Dampvallen

De keuze van het type dampval hangt af van de eigenschappen van het monster en de gekozen analysemethode. De damp moet kwantitatief worden opgevangen in een vorm waarin vervolgens analyse mogelijk is. Voor sommige stoffen zullen dampvallen met een vloeistof zoals hexaan of ethyleenglycol geschikt zijn. Voor andere stoffen zijn vaste adsorbentia meer geschikt.

#### Warmtewisselaar

Voor metingen bij verschillende temperaturen kan het noodzakelijk zijn om een warmtewisselaar in de opstelling aan te brengen.

#### Verzadigingskolom

De te onderzoeken stof wordt, vanuit een oplossing, op een geschikte inerte drager gebracht. De aldus beladen drager wordt in een verzadigingskolom gebracht; de afmetingen van de kolom en de stroomsnelheid van het dragergas moeten een volledige verzadiging van het dragergas verzekeren. De verzadigingskolom moet zijn voorzien van een thermostaatregeling. Voor metingen bij temperaturen boven 20 °C moet het gedeelte tussen de verzadigingskolom en de dampvallen worden verwarmd om te voorkomen dat de te onderzoeken stof daar condenseert.

### 1.6.5.2. Meetprocedure

#### Bereiding van de verzadigingskolom

Een oplossing van de te onderzoeken stof in een zeer vluchtig oplosmiddel wordt toegevoegd aan een geschikte hoeveelheid dragermateriaal. Er moet voldoende te onderzoeken stof worden toegevoegd om gedurende de gehele proef verzadiging te verzekeren. Het oplosmiddel wordt volledig afgedampt aan de lucht of in een roterende verdamer, waarna het grondig gemengde materiaal in de verzadigingskolom wordt gebracht. Nadat het monster op de gewenste temperatuur is gebracht, wordt droge stikstof door de apparatuur geleid.

#### Meting

De dampvallen worden verbonden met de uitstroombuis van de kolom en de tijd wordt geregistreerd. De stroomsnelheid wordt aan het begin en op gezette tijden gedurende het experiment gecontroleerd met behulp van een bellenteller (of continu met een massastroommeter).

De druk bij de uitgang van de verzadigingskolom moet worden gemeten:

- a) of wel door een manometer tussen de verzadigingskolom en de dampvallen te plaatsen (vanwege de grote dode ruimte en adsorberende oppervlakte),
- b) of wel door in een afzonderlijk experiment de drukvervalen over het gebruikte opvangstelsel te bepalen als functie van de stroomsnelheid (misschien weinig bevredigend bij gebruik van vloeistofvallen).

De tijd die nodig is om de voor de verschillende analysemethoden vereiste hoeveelheid stof op te vangen, wordt bepaald aan de hand van inleidende proeven of schattingen. Voordat de dampdruk bij een bepaalde temperatuur wordt berekend, moeten inleidende proeven worden uitgevoerd om de maximale stroomsnelheid te bepalen waarbij het dragergas volledig wordt verzadigd met de damp van de te onderzoeken stof. Dit is het geval als het dragergas zo langzaam door de verzadiger wordt geleid, dat een nog geringere snelheid geen grotere berekende dampdruk geeft.

De te gebruiken analysemethode, bij voorbeeld gaschromatografie of gravimetrie, hangt af van de aard van de te onderzoeken stof.

De hoeveelheid stof, die door een bekend volume dragergas wordt getransporteerd, wordt bepaald.

### 1.6.5.3. Berekening van de dampspanning

De dampspanning wordt berekend uit de dampdichtheid,  $W/V$ , met behulp van de vergelijking:

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

waarin:

- $p$  = dampspanning (Pa),
- $W$  = massa van de geadsorbeerde stof (g),
- $V$  = volume verzadigd gas ( $m^3$ ),
- $R$  = universeel molaire gasconstante ( $J/mol \cdot K$ ),
- $T$  = temperatuur (K),
- $M$  = molaire massa (g/mol).

De gemeten volumes moeten worden gecorrigeerd voor druk- en temperatuurverschillen tussen de stroomsnelheidsmeter en de verzadigingskolom die met een thermostaat op constante temperatuur gehouden wordt. Als de stroomsnelheidsmeter zich achter de dampval bevindt, kan het nodig zijn te corrigeren voor bestanddelen die uit de val verdampt zijn (1).

## 2. GEGEVENS

De dampspanning uit elk van de voorafgaande methoden moet ten minste bij twee temperaturen worden bepaald. Bepaling van de dampspanning bij drie of meer temperaturen in het gebied van 0 tot 50 °C verdient de voorkeur, aangezien men dan kan controleren of de dampspanningskromme lineair is.

## 3. RAPPORTAGE

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- nauwkeurige beschrijving van de stof (identiteit en onzuiverheden);
- ten minste twee waarden voor de dampspanning en de bijbehorende temperaturen, bij voorkeur in het gebied van 0 tot 50 °C; voorts alle ruwe gegevens en de grafiek van  $\log p$  tegen  $1/T$  alsmede een geschatte waarde van de dampspanning bij 20 of 25 °C.

Indien een verandering (faseovergang, ontleding) in de onderzochte stof werd waargenomen, dient het testrapport in het bijzonder de volgende gegevens te bevatten:

- aard van de verandering;
- temperatuur waarbij de verandering optreedt bij atmosferische druk;
- dampspanning bij 10 °C respectievelijk 20 °C beneden de overgangstemperatuur en bij 10 °C respectievelijk 20 °C boven de overgangstemperatuur (tenzij het een overgang is van vaste fase naar gasfase).

De gebruikte testmethode en eventuele wijzigingen hierin dienen te worden aangegeven.

Alle gegevens en opmerkingen die van belang kunnen zijn voor een goede interpretatie van de resultaten dienen te worden vermeld.

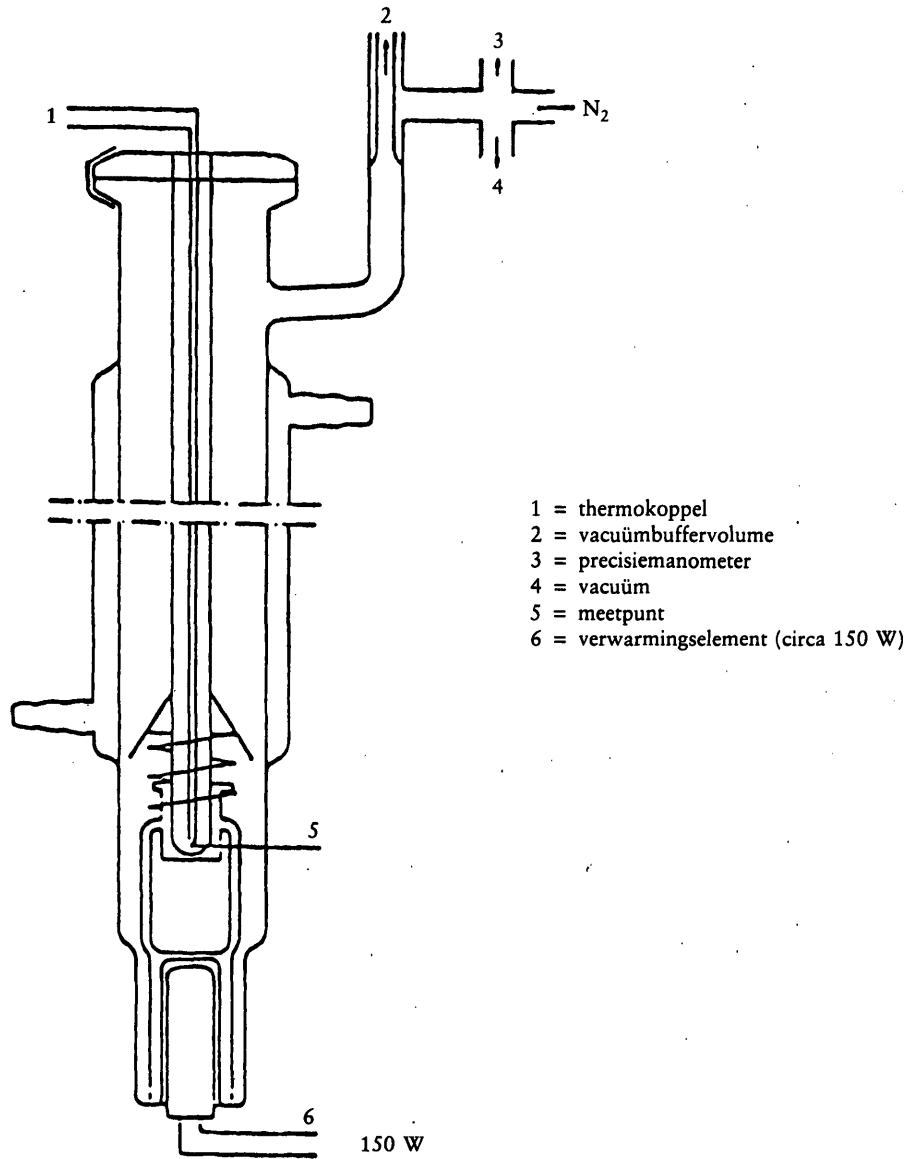
## 4. LITERATUUR

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

## Aanhangsel

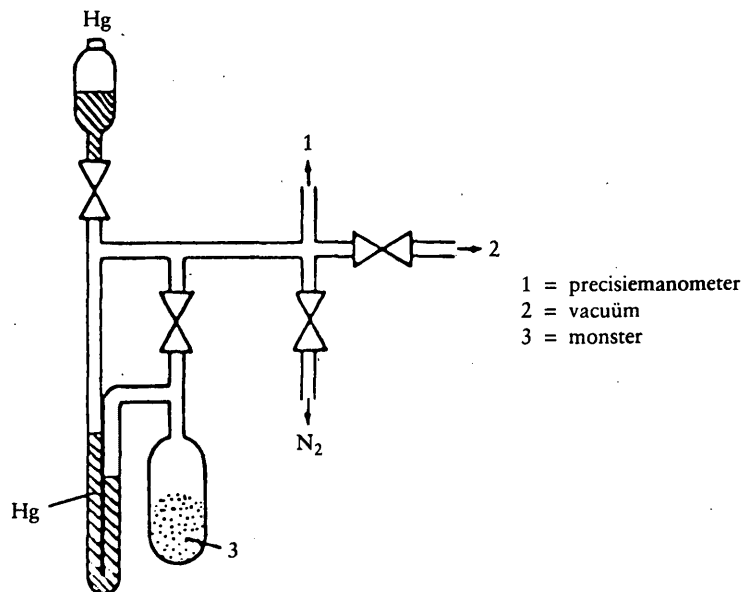
Figuur 1

Apparaat voor bepaling van de dampspanningskromme volgens de dynamische methode



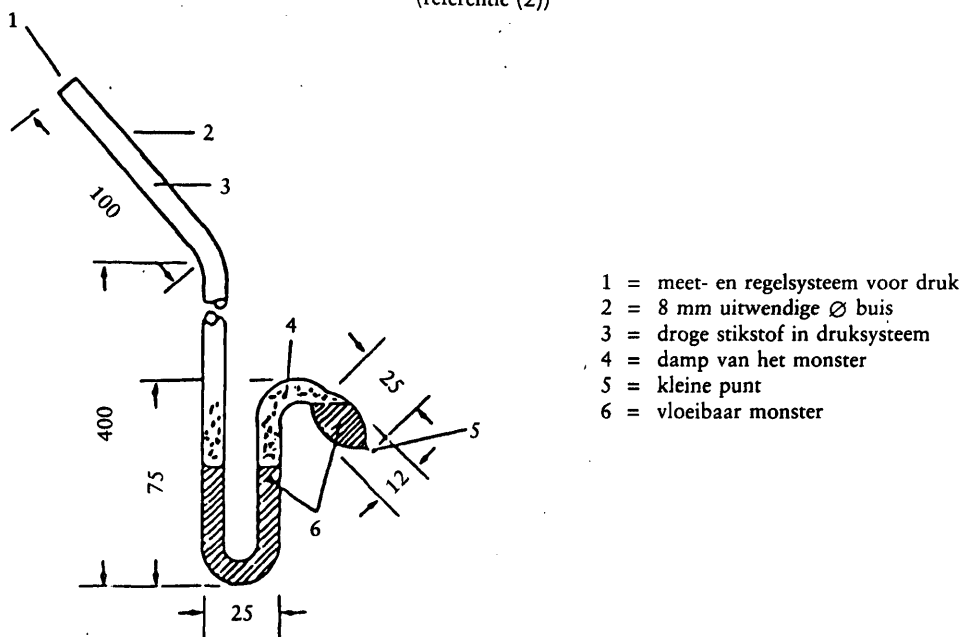
Figuur 2

Apparaat voor bepaling van de dampspanningskromme volgens de statische methode



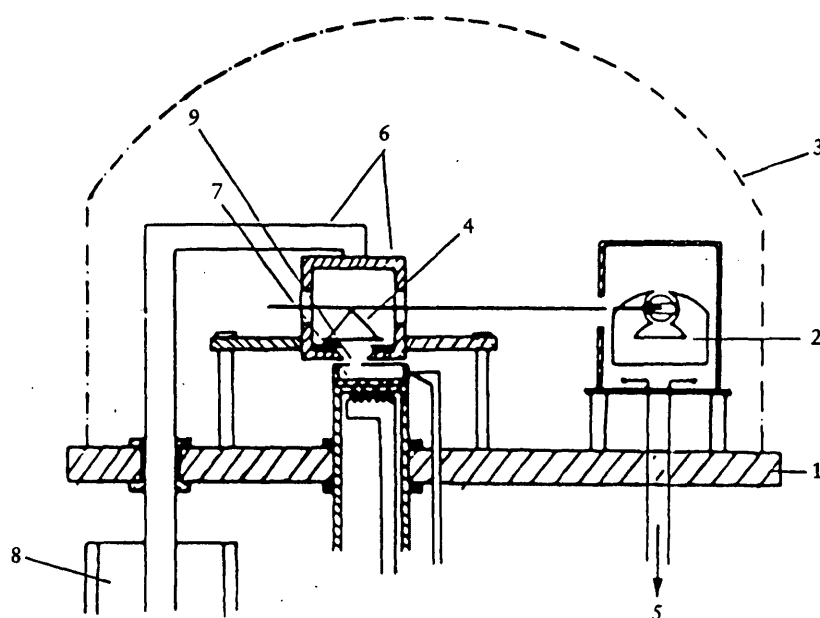
Figuur 3

Isoteniscoop  
 (referentie (2))



Figuur 4

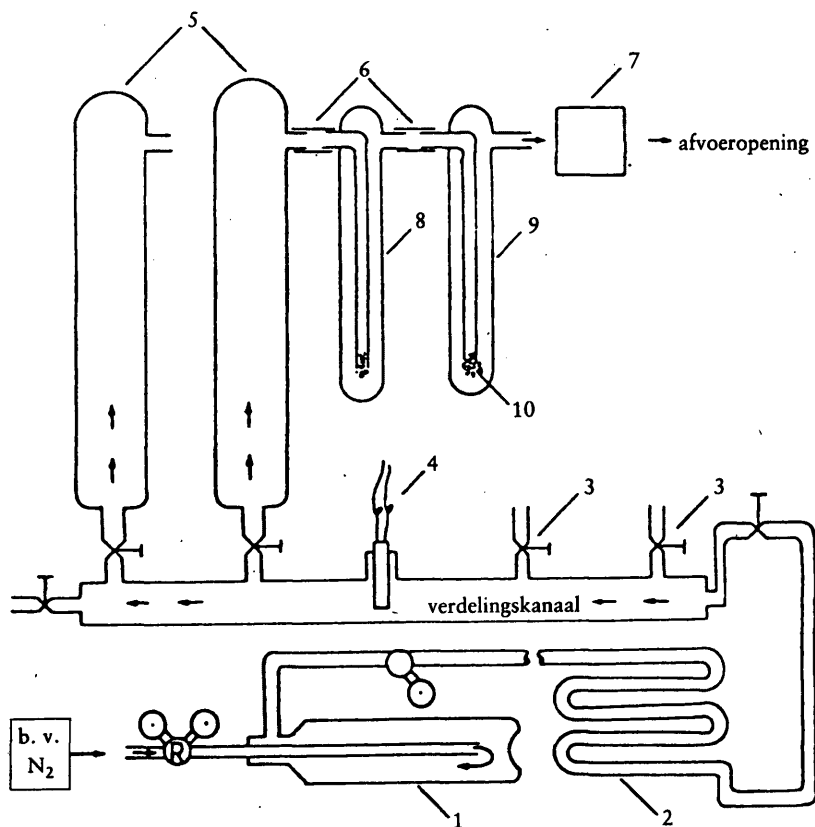
Apparatuur voor bepaling van de dampspanningskromme met behulp van de dampspanningsbalans



- 1 = grondplaat
- 2 = draaispoelinstrument
- 3 = stolp
- 4 = balans met schaal
- 5 = apparatuur voor vacuümmeeting
- 6 = koelbox en koelstaaf
- 7 = verdampingsoven
- 8 = dewarvat met vloeibare stikstof
- 9 = scherm

Figuur 5

Voorbeeld van een gasstroomstelsel voor bepaling van de dampspanning volgens de gasverzadigingsmethode



- 1 = gasstroomregelaar
- 2 = warmtewisselaars
- 3 = naaldventielen
- 4 = sensor (%) relatieve vochtigheid
- 5 = verzadigingskolommen
- 6 = PTFE-verbindingstukken
- 7 = gasstroommeter
- 8 = dampval (absorptie)
- 9 = olieval
- 10 = bellenteller met glasfilter



## A. 5. OPPERVLAKTESPANNING

### 1. METHODE

De beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1).

#### 1.1. Inleiding

De hieronder beschreven methoden zijn geschikt voor bepaling van de oppervlaktespanning van waterige oplossingen.

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de oplosbaarheid in water, de structuur, de hydrolyseerbaarheid en de kritische concentraties voor de vorming van micellen.

De hieronder beschreven methoden zijn geschikt voor de meeste chemische stoffen, ongeacht de zuiverheid ervan.

Bepaling van de oppervlaktespanning met behulp van de ringspanningsmeter is alleen mogelijk voor waterige oplossingen met een dynamische viscositeit van minder dan ongeveer 200 mPa·s.

#### 1.2. Definities en eenheden

De vrije oppervlakte-enthalpie per oppervlakte-eenheid heet de oppervlaktespanning. De oppervlaktespanning wordt uitgedrukt in N/m (SI-eenheid) of in mN/m (SI-subeenheid).

$$1 \text{ N/m} = 10^3 \text{ dyn/cm}$$

$$1 \text{ mN/m} = 1 \text{ dyn/cm in het verouderde cgs-systeem.}$$

#### 1.3. Referentiestoffen

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om de resultaten te kunnen vergelijken, wanneer een andere methode wordt gebruikt.

Een aantal referentiestoffen met zeer uiteenlopende oppervlaktespanningen staat vermeld in referenties (1) en (2).

#### 1.4. Principe van de testmethoden

De methoden berusten op de meting van de maximale kracht die verticaal moet worden uitgeoefend op een beugel of een ring die het oppervlak van de te onderzoeken vloeistof in een meetbak raakt, om deze beugel of ring van dit oppervlak te scheiden, of op een plaat waarvan een rand het oppervlak raakt, om de vloeistoflaag die zich heeft gevormd op te trekken.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

Deze methoden zijn nauwkeuriger dan waarschijnlijk voor milieubeoordelingsdoeleinden noodzakelijk is.

#### 1.6. Beschrijving van de testmethoden

##### 1.6.1. Plaatmethode

Zie ISO 304 („Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films”).

**1.6.2. Beugelmethode**

Zie ISO 304 („Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films”).

**1.6.3. Ringmethode**

Zie ISO 304 („Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films”).

**1.6.4. Geharmoniseerde ringmethode (OESO)****1.6.4.1. Apparatuur**

In de handel verkrijgbare spanningsmeters kunnen voor deze metingen worden gebruikt. Zij bestaan uit:

- draaitafeltje;
- systeem voor het meten van de kracht;
- meetlichaam (ring);
- meetvat.

**1.6.4.1.1. Draaitafeltje**

Het draaitafeltje wordt gebruikt als draagvlak voor het meetvat met temperatuurregeling, waarin de te onderzoeken vloeistof zich bevindt. Te zamen met het systeem voor het meten van de kracht is het draaitafeltje aan een rek gemonteerd.

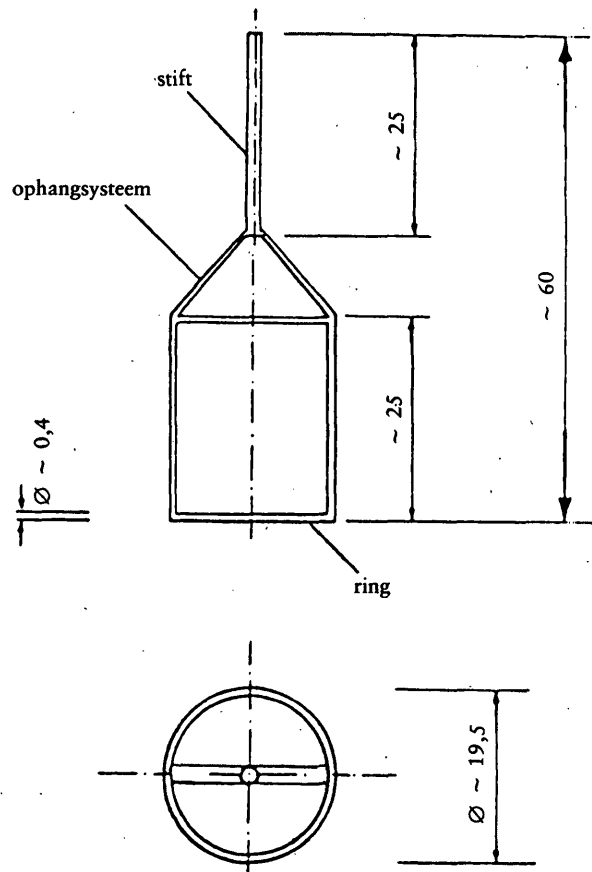
**1.6.4.1.2. Systeem voor het meten van de kracht**

Het systeem voor het meten van de kracht (zie figuur) bevindt zich boven het draaitafeltje. De fout bij het meten van de kracht mag niet meer bedragen dan  $\pm 10^{-6}$  N, hetgeen overeenkomt met een foutgrens van  $\pm 0,1$  mg in een massameting. De meetschaal van in de handel verkrijgbare tensiometers is meestal geijkt in mN/m zodat de oppervlaktespanning met een nauwkeurigheid van 0,1 mN/m rechtstreeks in mN/m kan worden afgelezen.

**1.6.4.1.3. Meetlichaam (ring)**

De ring bestaat meestal uit een draad van platina-iridium met een dikte van ongeveer 0,4 mm en een gemiddelde omtrek van 60 mm. De ring wordt horizontaal opgehangen aan een metalen stift en een ophangstelsel om de verbinding met het krachtmeetsysteem tot stand te brengen (zie figuur).

Figuur  
Meetlichaam  
(alle maten in mm)



#### 1.6.4.1.4. Meetvat

Voor de te onderzoeken oplossing wordt een glazen meetvat met temperatuurregeling gebruikt. Het meetvat dient zo te zijn ontworpen dat tijdens de meting de temperatuur van de testvloeistof en de gasfase daarboven constant is en dat het monster niet kan verdampen. Ronde glazen bekertjes met een inwendige doorsnede van ten minste 45 mm zijn aanvaardbaar.

#### 1.6.4.2. Voorbereiding van het apparaat

##### 1.6.4.2.1. Schoonmaken

Glazen vaten dienen zorgvuldig te worden schoongemaakt. Zo nodig moeten zij worden gespoeld met heet chroomzuur en vervolgens met stroperig fosforzuur (83 tot 98 gewichtsprocent  $H_3PO_4$ ), dan grondig gespoeld met leidingwater, uitgewassen met tweemaal gedestilleerd water tot een neutrale pH, en vervolgens gedroogd of omgespoeld met een gedeelte van de te onderzoeken vloeistof.

De ring wordt eerst zorgvuldig in water gespoeld ten einde water-oplosbare stoffen te verwijderen, daarna kort in chroomzuur gedompeld, in tweemaal gedestilleerd water gewassen tot een neutrale pH is bereikt en tenslotte kort verhit boven een methanolvlam.

NB:

Verontreinigende stoffen zoals siliconen die niet in chroomzuur of fosforzuur oplossen, dienen met een geschikt organisch oplosmiddel te worden verwijderd.

#### 1.6.4.2.2. Ijking van het apparaat

Bij de verificatie van het apparaat wordt het nulpunt gecontroleerd en zodanig ingesteld dat met de uitslag van de wijzer een nauwkeurige bepaling in mN/m mogelijk is.

##### Opstellen

Het apparaat wordt, bij voorbeeld met behulp van een waterpas aan de onderzijde van de tensiometer, horizontaal opgesteld; hiertoe wordt gebruik gemaakt van de schroeven aan de onderzijde van het apparaat.

##### Instelling van het nulpunt

Na het aanbrengen van de ring aan het apparaat en alvorens deze in de vloeistof te dompelen wordt de wijzer van de tensiometer op nul gezet en wordt nagegaan of de ring evenwijdig aan het vloeistofoppervlak loopt. Hierbij kan het vloeistofoppervlak als spiegel worden gebruikt.

##### Ijking

Het ijken kan op twee manieren geschieden:

- a) Met behulp van een massa; hierbij worden ruiters met een bekende massa van 0,1 tot 1,0 g op de ring aangebracht; de ijfactor  $\Phi_a$ , waarmee alle afgelezen waarden moeten worden vermenigvuldigd, wordt bepaald met behulp van de volgende vergelijking:

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \quad [1]$$

waarin:

$$\sigma_r = \frac{m \cdot g}{2b} \text{ (mN/m),}$$

$m$  = massa van de ruiters (g),

$g$  = versnelling door de zwaartekracht ( $981 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-2}$  op zeeniveau),

$b$  = gemiddelde omtrek van de ring (in cm),

$\sigma_a$  = uitslag van de tensiometer na het plaatsen van de ruiters op de ring (mN/m).

- b) Met behulp van water; hierbij wordt gebruik gemaakt van zuiver water met een oppervlaktespanning van bij voorbeeld 72,3 mN/m bij 23 °C; deze procedure verloopt weliswaar vlotter dan die met de ruiters, maar houdt steeds het gevaar in dat de oppervlaktespanning van het water onjuist is door de aanwezigheid van sporen oppervlakteactieve stoffen.

De ijfactor  $\Phi_b$ , waarmee alle meetresultaten moeten worden vermenigvuldigd, wordt bepaald met behulp van de volgende vergelijking:

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \quad [2]$$

waarin:

$\sigma_o$  = literatuurwaarde voor de oppervlaktespanning van water (mN/m),

$\sigma_g$  = gemeten waarde voor de oppervlaktespanning van het water (mN/m),

beide bij dezelfde temperatuur.

#### 1.6.4.3. Bereiding van de monsters

De te onderzoeken stoffen worden tot de gewenste concentraties in water opgelost; er mogen geen onoplosbare stoffen in het water voorkomen.

De oplossing moet op constante temperatuur worden gehouden ( $\pm 0,5$  °C). Aangezien de oppervlaktespanning van een oplossing in het meetvat met de tijd verandert, moeten er op verschillende tijdstippen

metingen worden verricht en moet van de resultaten een kromme worden uitgezet waaruit het verloop van de oppervlaktespanning als functie van de tijd blijkt. Zodra geen verdere wijzigingen meer worden waargenomen, is er een evenwichtstoestand bereikt.

Stof en gasvormige verontreinigingen beïnvloeden het resultaat van de meting. De meting dient derhalve te worden verricht onder een scherm.

1.6.5. *Testomstandigheden*

De metingen dienen plaats te vinden bij ongeveer 20 °C en de temperatuur dient op  $\pm 0,5$  °C na constant te zijn.

1.6.6. *Uitvoering van de proef*

De te onderzoeken oplossing wordt in het zorgvuldig schoongemaakte meetvat gebracht waarbij schuimvorming wordt vermeden; vervolgens wordt het meetvat op de tafel van het testapparaat geplaatst. Het tafelblad met het meetvat wordt omhoog gebracht tot de ring is gedompeld onder het oppervlak van de te onderzoeken oplossing. Vervolgens laat men het tafelblad geleidelijk en regelmatig (met een snelheid van ongeveer 0,5 cm/min) zakken om de ring van het oppervlak vrij te maken, tot de maximale kracht is bereikt. De vloeistoflaag die aan de ring hangt, mag de ring niet loslaten. Na de meting wordt de ring weer onder het oppervlak gedompeld en wordt de meting herhaald tot een constante waarde voor de oppervlaktespanning is bereikt. Bij iedere bepaling dient de tijd, die verlopen is sinds het overbrengen van de vloeistof in het meetvat, te worden genoteerd. De meter wordt afgelezen op het moment van de maximale kracht die vereist is om de ring van het oppervlak van de vloeistof los te trekken.

2. **GEGEVENS**

Ter berekening van de oppervlaktespanning wordt de van het apparaat afgelezen waarde in mN/m eerst vermenigvuldigd met de ijkfactor  $\Phi_a$  of  $\Phi_b$  (afhankelijk van de toepaste ijkprocedure). Dit leidt tot een waarde die slechts bij benadering juist is en daarom nog verder moet worden gecorrigeerd.

Harkins en Jordan (3) hebben langs empirische weg correctiefactoren bepaald voor oppervlaktespanningen die met de ringmethode zijn gemeten; deze correctiefactoren zijn afhankelijk van de afmetingen van de ring, de dichtheid van de vloeistof en de oppervlaktespanning.

Het is tamelijk omslachtig om de correctiefactor voor iedere meting afzonderlijk met behulp van de tabellen van Harkins en Jordan te bepalen voor de berekening van de oppervlaktespanning; daarom kan voor waterige oplossingen gebruik worden gemaakt van een vereenvoudigde procedure waarbij de gecorrigeerde waarden voor de oppervlaktespanning rechtstreeks uit volgende tabel worden afgelezen (tussenliggende waarden worden via interpolatie verkregen).

TABEL: CORRECTIE VAN DE GEMETEN OPPERVLAKTESPANNING

Uitsluitend voor waterige oplossingen,  $\rho \approx 1 \text{ g/cm}^3$ 

R = 9,55 mm (gemiddelde straal van de ring)

r = 0,185 mm (straal van de draad van de ring)

Gemeten waarde (mN/m)	Gecorrigeerde waarde (mN/m)	
	Ijking met massa (zie 1.6.4.2.2. a))	Ijking met water (zie 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	71,2	—
78	73,2	—

Deze tabel werd opgesteld aan de hand van de correctie volgens Harkins en Jordan en overeenkomstig de DIN-normen (DIN 53914) voor water en waterige oplossingen (met een dichtheid van  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ ) en voor in de handel verkrijgbare ringen met afmetingen R = 9,55 mm (gemiddelde straal van de ring) en r = 0,185 mm (straal van de draad van de ring). De tabel geeft de gecorrigeerde waarden voor oppervlaktespanningsmetingen die werden uitgevoerd na ijking met massa of met water.

Volgens een alternatieve methode zonder voorafgaande ijking kan de oppervlaktespanning als volgt worden berekend:

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

waarin:

F = de kracht (in mN) die op de dynamometer wordt afgelezen bij het breken van de film;

R = de straal van de ring;

f = de correctiefactor (1).

3. **RAPPORTAGE**

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- gebruikte testmethode (ISO of geharmoniseerde ringmethode van de OESO);
- gebruikt type water of oplossing;
- nauwkeurige specificatie van de stoffen (identiteit en verontreinigingen);
- meetresultaten: afgelezen oppervlaktespanning waarbij zowel de afzonderlijke resultaten als het rekenkundig gemiddelde daarvan moet worden vermeld, alsmede het gecorrigeerde gemiddelde (waarbij rekening is gehouden met de correctiefactor voor het apparaat en de correctietabel);
- concentratie van de oplossing;
- temperatuur bij de meting;
- ouderdom van de gebruikte oplossing, en met name de tijd tussen de bereiding van de oplossing en de meting;
- beschrijving van de tijdafhankelijkheid van de oppervlaktespanning, na het overbrengen van de oplossing in het meetvat;
- alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, en met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de stof.

4. **LITERATUUR**

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

## A. 6. OPLOSBAARHEID IN WATER

### 1. METHODE

De beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1).

#### 1.1. Inleiding

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de structuurformule, de dampspanning, de dissociatieconstanten en de hydrolyse (als functie van de pH) van de stof.

Er bestaat niet één methode waarmee alle mogelijke waarden van de oplosbaarheid in water kunnen worden onderzocht. De methode is niet van toepassing op vluchtige stoffen.

De twee hieronder beschreven methoden beslaan alle mogelijke waarden van de oplosbaarheid:

- de eerste methode wordt aangeduid als de „kolom-elutie”-methode en is van toepassing op chemisch zuivere stoffen met een geringe oplosbaarheid ( $< 10^{-2}$  g/l), welke stabiel zijn in water;
- de tweede methode wordt aangeduid als de „methode met de kolf” en is van toepassing op chemisch zuivere stoffen met een hogere oplosbaarheid ( $> 10^{-2}$  g/l), welke stabiel zijn in water;

De oplosbaarheid in water van de te onderzoeken stof kan aanzienlijk worden beïnvloed door de aanwezigheid van verontreinigingen.

#### 1.2. Definities en eenheden

De oplosbaarheid van een stof in water wordt opgegeven als de massaconcentratie van de stof in een verzadigde oplossing in water bij een gegeven temperatuur. De oplosbaarheid in water wordt uitgedrukt in eenheden massa per volume oplossing. De SI-eenheid is  $\text{kg/m}^3$  (g/l kan ook worden gebruikt).

#### 1.3. Referentiestoffen

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om de resultaten te kunnen vergelijken wanneer een andere methode wordt gebruikt.

#### 1.4. Principe van de testmethoden

De hoeveelheid van het monster en de tijd die nodig zijn om de verzadigingswaarde van de massaconcentratie te bereiken, moeten bij benadering worden bepaald in een eenvoudige inleidende test.

##### 1.4.1. Kolom-elutie-methode

Deze methode is gebaseerd op de elutie van de te onderzoeken stof met water uit een microkolom welke is gevuld met een inert dragermateriaal zoals glasporel, silicagel of zand en een overmaat aan de te onderzoeken stof. De oplosbaarheid in water is bepaald zodra de massaconcentratie van het eluaat constant is. Dit blijkt uit een constante concentratiewaarde als functie van de tijd.

##### 1.4.2. Methode met de kolf

Bij deze methode wordt de stof (vaste stoffen moeten worden fijngemaakt) opgelost in water bij een temperatuur die iets hoger is dan de testtemperatuur. Zodra verzadiging is bereikt wordt het mengsel afgekoeld en op de testtemperatuur gehouden, terwijl net zo lang wordt geroerd totdat er een evenwichtstoestand is bereikt (2). Vervolgens wordt de massaconcentratie van de stof in de waterige oplossing, welke geen onopgeloste deeltjes mag bevatten, bepaald aan de hand van een geschikte analysemethode.



1.5. **Kwaliteitscriteria**1.5.1. *Herhaalbaarheid*

Voor de kolom-elutie-methode is < 30 % haalbaar; voor de methode met de kolf dient < 15 % in acht te worden genomen.

1.5.2. *Gevoeligheid*

Deze is afhankelijk van de analysemethode, maar het is zeker mogelijk massaconcentraties te bepalen tot een waarde van  $10^{-6}$  g/l.

1.6. **Beschrijving van de testmethoden**1.6.1. *Testomstandigheden*

De test wordt bij voorkeur uitgevoerd bij 20 °C ( $\pm 0,5$  °C). Als wordt verwacht dat de oplosbaarheid temperatuurafhankelijk is (> 3 % per °C), dan wordt nog bij twee andere temperaturen gemeten, die ten minste 10 °C boven, respectievelijk 10 °C onder, de eerste temperatuur liggen. In dit geval dient de temperatuurregeling op  $\pm 0,1$  °C nauwkeurig te zijn. De gekozen temperatuur moet in alle betrokken delen van de apparatuur constant worden gehouden.

1.6.2. *Inleidende test*

In een maatcilinder van 10 ml, voorzien van een glazen stop, wordt gedestilleerd water op kamertemperatuur toegevoegd aan ongeveer 0,1 g monster (vaste stoffen moeten worden fijngemaakt). Toenemende volumes gedestilleerd water worden stapsgewijze toegevoegd, volgens onderstaande tabel.

0,1 g opgeloste stof in „x” ml water	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Oplosbaarheid bij benadering (g/l)	> 1 000	1 000—200	200—100	100—50	50—10	10—1	< 1

Nadat de aangegeven hoeveelheid water is toegevoegd, wordt het mengsel telkens gedurende 10 minuten hard geschud en vervolgens visueel onderzocht op eventuele onopgeloste delen van het monster. Als het monster of delen ervan onopgelost zijn nadat 10 ml water is toegevoegd, wordt de inhoud van de maatcilinder overgebracht in een maatcilinder van 100 ml die verder met water wordt gevuld en vervolgens wordt geschud. De tijd nodig om een stof op te lossen kan bij lagere waarden van de oplosbaarheid aanzienlijk langer zijn (24 uur dient in acht te worden genomen). De benaderde waarde van de oplosbaarheid is in de tabel vermeld onder de hoeveelheid water waarin het monster geheel wordt opgelost. Als de stof nog steeds onoplosbaar blijkt, dient verdere verdunning plaats te vinden om te bepalen of de kolom-elutie-methode dan wel de methode met de kolf moet worden gebruikt.

1.6.3. *Kolom-elutie-methode*1.6.3.1. *Dragermateriaal, oplosmiddel en eluens*

Het dragermateriaal voor de kolom-elutie-methode moet inert zijn. Bruikbare materialen zijn bij voorbeeld glasporel en silica. Voor het aanbrengen van de te onderzoeken stof op het dragermateriaal dient gebruik te worden gemaakt van een geschikt vluchtig en analytisch zuiver oplosmiddel. Als eluens of oplosmiddel dient dubbel gedestilleerd water uit glas- of kwartsapparatuur te worden gebruikt.

*Opmerking:*

Er mag geen gebruik worden gemaakt van water dat rechtstreeks uit een organische ionenwisselaar komt.

### 1.6.3.2. Laden van het dragermateriaal

Ongeveer 600 mg dragermateriaal wordt afgewogen en overgebracht in een rondbodempkolf van 50 ml.

Een afgewogen hoeveelheid van de te onderzoeken stof wordt opgelost in het gekozen oplosmiddel. De juiste hoeveelheid van de oplossing van de te onderzoeken stof wordt bij het dragermateriaal gevoegd. Het oplosmiddel moet, bij voorbeeld in een roterende verdampers, volledig worden verdampt. Bij onvolledige verwijdering van het oplosmiddel kan het dragermateriaal, ten gevolge van verdelingseffecten aan het oppervlak, later niet worden verzadigd met water.

Het laden van het dragermateriaal kan aanleiding geven tot problemen (verkeerde resultaten) als de te onderzoeken stof wordt afgezet als olie of in een andere kristalvorm. Dit probleem moet experimenteel worden onderzocht.

Het beladen dragermateriaal wordt gedurende ongeveer 2 uur bevochtigd in ongeveer 5 ml water, waarna de suspensie wordt aangebracht op de microkolom. Anderzijds kan men ook het droge, beladen dragermateriaal direct in de met water gevulde microkolom brengen, en daarna ongeveer 2 uur wachten totdat een evenwichtstoestand is ontstaan.

Testprocedure: de stof kan op twee verschillende manieren van het dragermateriaal worden geëluëerd:

- circulatiepomp (zie figuur 1);
- voorraadfles (zie figuur 4).

### 1.6.3.3. Kolom-elutie-methode met circulatiepomp

#### Apparatuur

Een schema van het systeem is afgebeeld in figuur 1. In figuur 2 is een geschikte microkolom afgebeeld: elke maat is echter aanvaardbaar mits deze voldoet aan de criteria voor reproduceerbaarheid en gevoeligheid. De kolom moet aan de bovenzijde zijn voorzien van een reservoir voor ten minste vijf kolomvolumina water plus minimaal vijf monsters. Eventueel kunnen de afmetingen worden vermindert indien extra oplosmiddel wordt gebruikt ter vervanging van de eerste vijf kolomvolumina welke met onzuiverheden worden afgevoerd.

De kolom moet worden aangesloten op een circulatiepomp waarmee een debiet van ongeveer 25 ml/uur kan worden ingesteld. De pomp wordt aangesloten door middel van polytetrafluorethyleen en/of glazen verbindingstukken. De kolom en de pomp moeten zo worden opgesteld dat het mogelijk is om monsters te nemen van de uitstromende vloeistof en om het reservoir in evenwicht te houden met de atmosferische druk. Het kolommateriaal wordt ondersteund door een kleine (5 mm) prop glaswol waarmee ook deeltjes worden weggefilterd. Als circulatiepomp kan bij voorbeeld een peristaltische pomp of een membraanpomp worden gebruikt. Bij gebruik van een peristaltische pomp moet worden toegezien dat aan de slangwand geen verontreiniging en/of adsorptie plaatsvindt.

#### Meetprocedure

De stroming door de kolom wordt op gang gebracht. Een debiet van ongeveer 25 ml/uur (ongeveer 10 kolomvolumina/uur voor de beschreven kolom) wordt aanbevolen. De eerste vijf kolomvolumina (minimaal) worden afgevoerd om water-oplosbare verontreinigingen te verwijderen. Vervolgens wordt de RE-circulatiepomp aan de onderzijde van de kolom aangesloten. De apparatuur blijft in werking totdat een evenwichtstoestand is bereikt; hiervoor geldt dat de concentraties in vijf opeenvolgende monsters niet meer dan  $\pm 30\%$  mogen verschillen op aselechte wijze. Tussen de tijdstippen, waarop deze monsters worden genomen, moeten ten minste 10 kolomvolumina van het eluens passeren.

### 1.6.3.4. Kolom-elutie-methode met voorraadfles

#### Apparatuur (zie figuur 3 en 4)

Voorraadfles: voor aansluiting van de voorraadfles wordt gebruik gemaakt van een rond glazen slijpstuk en polytetrafluorethyleenslangen. Een debiet van ongeveer 25 ml/uur wordt aanbevolen. Er wordt een aantal opeenvolgende monsters van het eluaat genomen voor analyse volgens de gekozen methode.

### Meetprocedure

In het middengebied van het eluaat, waar de concentraties constant zijn ( $\pm 30\%$ ), worden ten minste vijf opeenvolgende monsters genomen om de oplosbaarheid in water te bepalen.

Er wordt een tweede reeks metingen verricht waarbij het debiet de helft is van de aanvankelijke waarde. Als de resultaten van beide series metingen overeenstemmen, worden de testresultaten geaccepteerd. Als de oplosbaarheid bij het laagste debiet hoger blijkt, dan moet het halveren van het debiet worden voortgezet, totdat twee opeenvolgende series metingen dezelfde oplosbaarheid geven.

In beide gevallen (recirculatiepomp of voorraadfles) moeten de monsters aan de hand van het Tyndall-effect (verstrooiing van licht) worden gecontroleerd op aanwezigheid van deeltjes in colloïdale toestand. De aanwezigheid van dergelijke deeltjes maakt de resultaten ongeldig, zodat de test moet worden herhaald nadat de filterwerking van de kolom is verbeterd. De pH van elk monster moet worden geregistreerd. Er moet een tweede serie metingen worden uitgevoerd bij dezelfde temperatuur.

### 1.6.4. *Methode met de kolf*

#### 1.6.4.1. **Apparatuur**

Voor de methode met de kolf is het volgende materiaal nodig:

- gangbaar laboratoriumglaswerk en -apparatuur;
- een apparaat om de oplossingen in beweging te brengen bij een constante temperatuur;
- zonodig, voor emulsies een centrifuge (bij voorkeur met thermostaat);
- apparatuur voor de analytische bepaling.

#### 1.6.4.2. **Meetprocedure**

Aan de hand van de inleidende test wordt bepaald hoeveel materiaal nodig is om de gewenste hoeveelheid water te verzadigen. De benodigde hoeveelheid water hangt af van de analysemethode en van de oplosbaarheid. In drie van een glazen stop voorziene glazen vaten (bij voorbeeld centrifugebuisen, kolven) wordt telkens ongeveer vijfmaal de aldus bepaalde hoeveelheid materiaal afgewogen. De gewenste hoeveelheid water wordt in elk vat gegoten, waarna de vaten goed worden afgesloten. De afgesloten vaten worden vervolgens bij een temperatuur van 30 °C in beweging gebracht. (Hiervoor wordt een schud- of roermachine gebruikt waarmee bij constante temperatuur kan worden gewerkt, bij voorbeeld een magneetroerder in een waterbak met thermostaatregeling). Na één dag wordt één van de vaten verwijderd, waarna onder af en toe roeren 24 uur wordt gewacht totdat bij de testtemperatuur een nieuwe evenwichtstoestand is ontstaan. Vervolgens wordt de inhoud van het vat gecentrifugeerd bij de testtemperatuur, waarna de concentratie van de stof in de heldere waterige oplossing analytisch wordt bepaald. De beide andere kolven ondergaan dezelfde behandeling nadat zij gedurende twee respectievelijk drie dagen bij 30 °C zijn geëquilibreerd. Als de waarden voor de concentratie in ten minste de laatste twee vaten voldoen aan de vereiste reproduceerbaarheid, worden de testresultaten geaccepteerd. Als de resultaten van de vaten 1, 2 en 3 toenemende waarden geven, moet de gehele test worden herhaald, waarbij langer wordt gewacht tot een evenwichtstoestand is ontstaan.

De pH van elk monster moet worden geregistreerd.

#### 1.6.5. *Analyse*

Hiervoor dient bij voorkeur een methode te worden toegepast waarmee verschillende stoffen kunnen worden onderscheiden, aangezien kleine hoeveelheden opgeloste verontreinigingen kunnen leiden tot grote fouten in de gemeten oplosbaarheid. Voorbeelden van zulke methoden zijn: gas- of vloeistofchromatografie, titratie, fotometrie, voltametrie.

**2. GEGEVENS****2.1. Kolom-elutie-methode**

Voor elke serie metingen moeten het gemiddelde en de standaardafwijking worden berekend van ten minste vijf opeenvolgende monsters, die op het verzadigingsniveau zijn genomen.

**2.2. Methode met de kolf**

Voor de drie kolven moeten de afzonderlijke resultaten worden vermeld en het gemiddelde van de als constant beschouwde resultaten (herhaalbaarheid beter dan 15 %) moet worden bepaald en opgegeven in eenheden massa per volume oplossing. Hiervoor kan het nodig zijn massa-eenheden om te rekenen naar volume-eenheden, waarbij rekening wordt gehouden met de dichtheid indien de oplosbaarheid zeer hoog is (> 100 g/l).

**3. RAPPORTAGE****3.1. Kolom-elutie-methode**

Het rapport dient zo mogelijk de resultaten van de inleidende test te bevatten, alsmede de volgende gegevens:

- nauwkeurige beschrijving van de stof (identiteit en onzuiverheden);
- de afzonderlijke concentraties, debieten en pH-waarden van elk monster;
- het gemiddelde en de standaardafwijking van ten minste vijf monsters uit elke serie die zijn genomen op het verzadigingsniveau;
- het gemiddelde van de twee opeenvolgende acceptabele series;
- de temperatuur van het water tijdens het verzadigingsproces;
- de analysemethode;
- de aard van het dragermateriaal;
- het laden van het dragermateriaal;
- het gebruikte oplosmiddel;
- elke gebleken chemische instabiliteit van de stof tijdens de test en de gebruikte methode;
- alle gegevens die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

**3.2. Methode met de kolf**

Het rapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- nauwkeurige beschrijving van de stof (identiteit en onzuiverheden);
- de afzonderlijke analyses en het gemiddelde, indien meer dan één waarde werd bepaald, voor iedere kolf;
- de pH van elk monster;
- het gemiddelde van de waarden voor de verschillende kolven die onderling overeenstemden;
- de testtemperatuur;
- de analysemethode;
- elke gebleken chemische instabiliteit van de stof tijdens de test en de gebruikte methode;
- alle gegevens die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

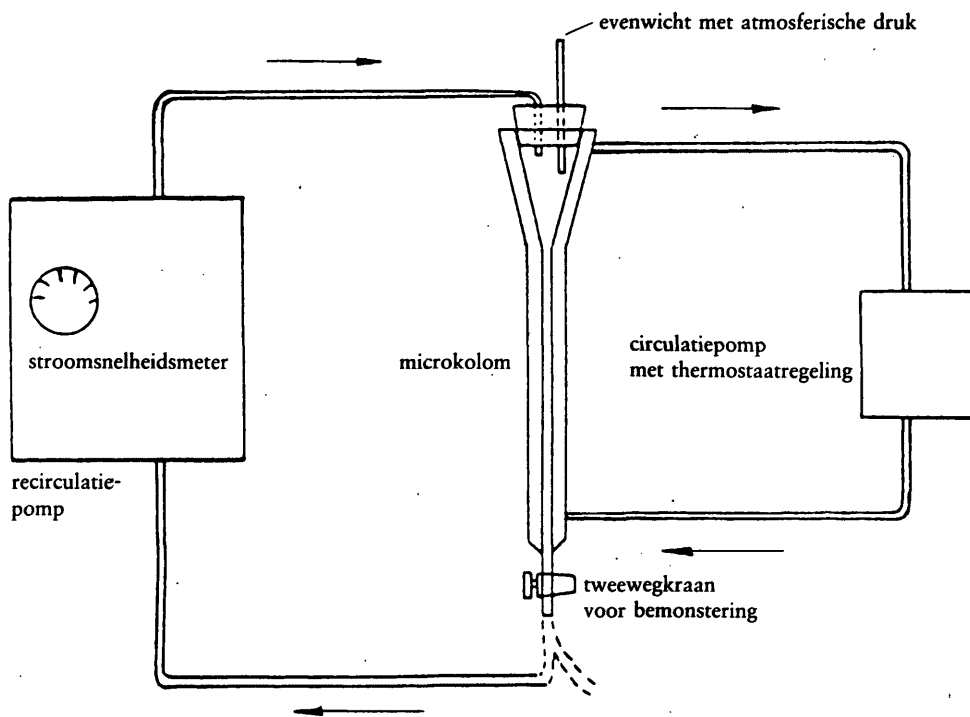
**4. LITERATUUR**

- (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.

Aanhangsel

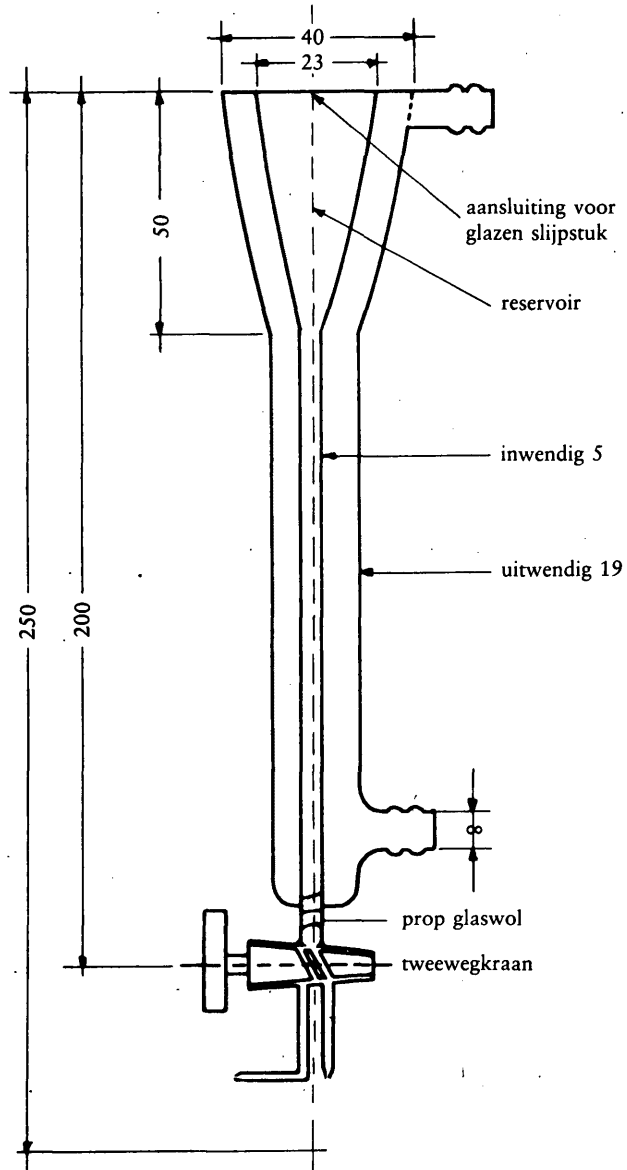
Figuur 1

Schematische testopstelling



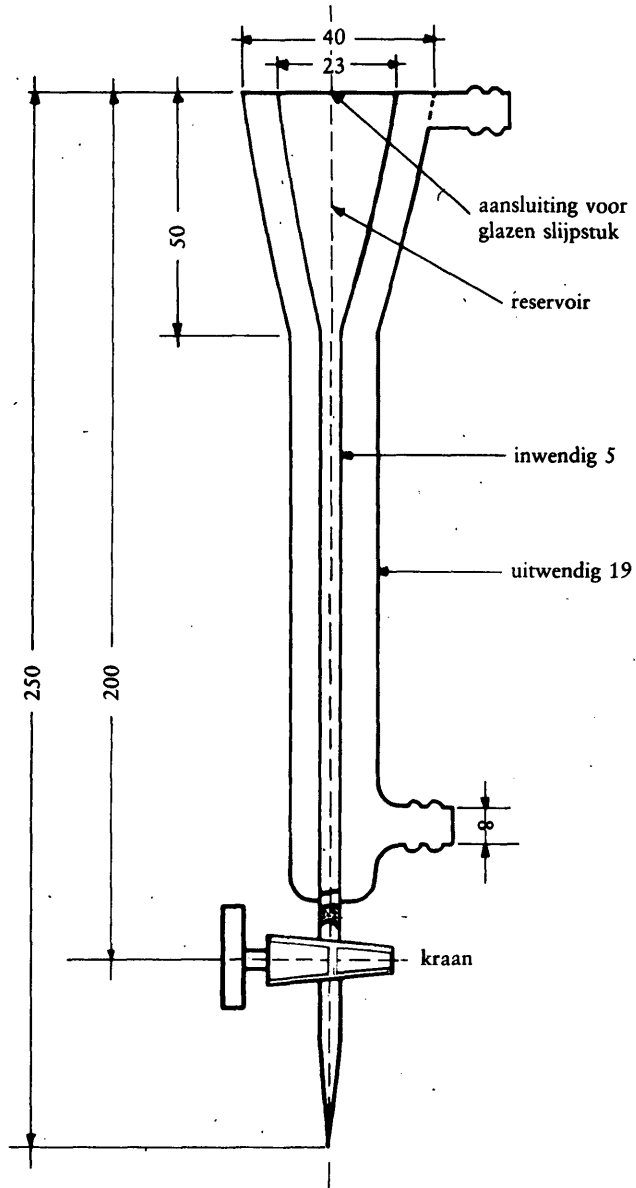
Figuur 2

Een voorbeeld van een microkolom  
(alle afmetingen in mm)



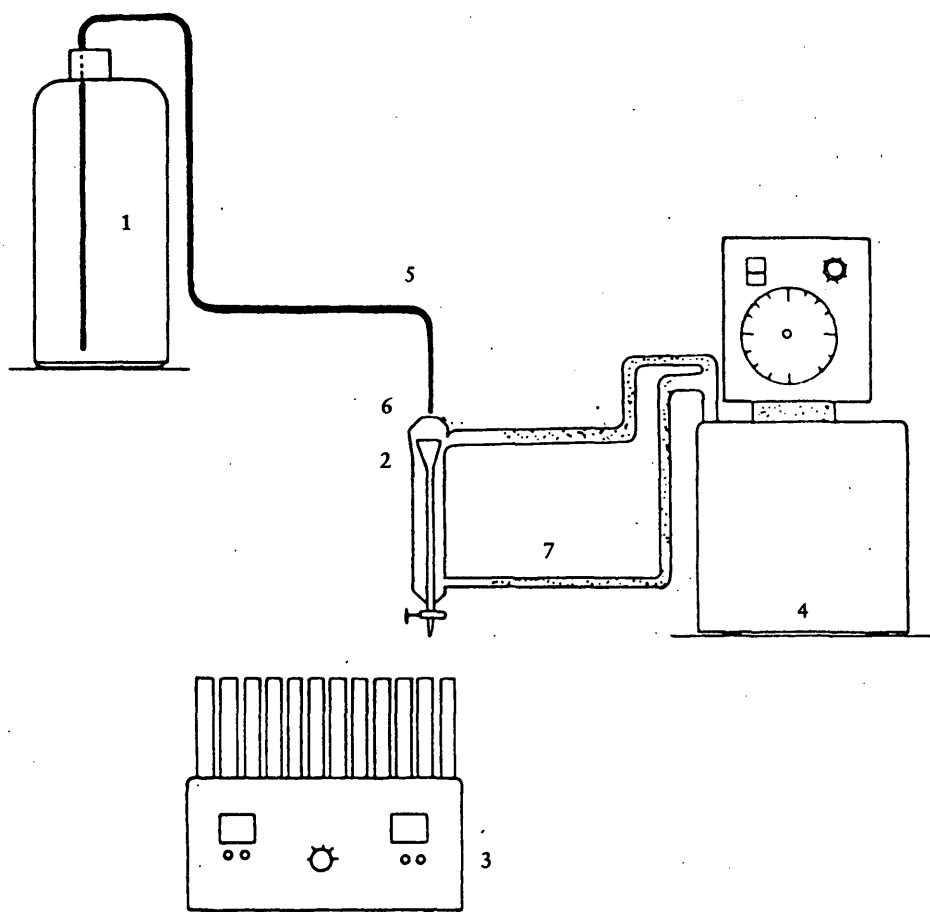
Figuur 3

Voorbeeld van een microkolom  
(alle afmetingen in mm)



Figuur 4

Testopstelling voor bepaling van de oplosbaarheid in water van matig oplosbare stoffen met een geringe vluchtigheid



- 1 = voorraadfles (bij voorbeeld een glazen fles van 2,5 liter)
- 2 = kolom (zie figuur 3)
- 3 = monsterverzamelaar
- 4 = thermostaat
- 5 = teflon slang
- 6 = glazen stop
- 7 = waterleiding (tussen thermostaat en kolom, inwendige diameter ongeveer 8 mm)



## A. 7. OPLOSBAARHEID IN VETTEN

### 1. METHODE

De beschreven methode berust op de testrichtlijn van de OESO (1).

#### 1.1. Inleiding

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de verdelingscoëfficiënt, oplosbaarheid in water, structuurformule en stabiliteit bij 50 °C van de stof. Deze methode is alleen van toepassing op stoffen die chemisch zuiver zijn, stabiel bij 50 °C, en weinig vluchtig onder deze omstandigheden.

De methode is niet geschikt voor het onderzoek van stoffen die met triglyceriden reageren.

#### 1.2. Definities en eenheden

De oplosbaarheid in vet wordt gedefinieerd als de massaconcentratie van een stof die een homogene fase vormt met een vloeibaar vet (olie) zonder dat chemische reactie plaatsvindt. De maximale waarde van deze massaconcentratie wordt de verzadigingswaarde van de massaconcentratie genoemd; deze is een functie van de temperatuur.

De verzadigingswaarde van de massaconcentratie van een stof dient te worden opgegeven in mg/100 g standaardvet bij 37 °C ± 0,5 °C.

Tussen de oplosbaarheid in g per 100 g oplossing (S') en de oplosbaarheid in g per 100 g oplosmiddel (S) bestaat de volgende relatie:

$$S = \frac{100 \times S'}{100 - S'} \text{ g/100 g standaardvet}$$

Vermenigvuldiging van de S-waarde met 1 000 geeft mg/100 g standaardvet.

#### 1.3. Referentiestoffen

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om resultaten te kunnen vergelijken wanneer een andere methode wordt gebruikt.

#### 1.4. Principe van de testmethode

De stof wordt, onder roeren, toegevoegd aan een vloeibaar „standaardvet”. Een voldoende hoeveelheid wordt toegevoegd om een overmaat te verzekeren. De opgeloste hoeveelheid wordt bepaald met een geschikte analytische methode.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

##### 1.5.1. Specificiteit

De herhaalbaarheid van de meting is momenteel onbekend. De resultaten moeten betrekking hebben op standaardvetten en op tamelijk zuivere stoffen. Zelfs bij 37 °C kunnen vetten emulsies of fijne suspensies van vaste stoffen vormen. Aangezien suspensies en emulsies de bepaling van de massaconcentratie storen, moet hun vorming worden vermeden.

## 1.6. Beschrijving van de testmethode

### 1.6.1. Voorbereiding

#### 1.6.1.1. Apparatuur

De volgende apparatuur is noodzakelijk:

- gangbaar laboratoriumglaswerk;
- balans;
- centrifuge met thermostaat;
- een roerder die kan worden gebruikt in combinatie met een temperatuurregeling;
- thermostaat.

#### 1.6.1.2. Standaardvetten

Het gebruik van standaardvetten is noodzakelijk. Deze standaardvetten moeten goed gedefinieerd zijn; een voorbeeld van een standaardvet wordt gegeven in het aanhangsel.

#### 1.6.1.3. Inleidende test

Er dient een inleidende test te worden uitgevoerd ten einde te bepalen hoeveel stof ongeveer nodig is om de verzadigingswaarde van de massaconcentratie bij de testtemperatuur (37 °C) te bereiken.

*Opmerking:*

Voor vaste stoffen kan de snelheid, waarmee de verzadigingswaarde wordt bereikt, sterk afhangen van de deeltjesgrootte. Vaste stoffen moeten daarom worden fijngemaakt.

#### 1.6.1.4. Bereiding van de stof

Weeg acht monsters af in kolven van 50 ml. Gewoonlijk dient elk monster het dubbele te zijn van de in de inleidende test bepaalde hoeveelheid nodig voor verzadiging.

Nadat een afgewogen hoeveelheid van ongeveer 25 g vloeibaar en gemengd standaardvet is toegevoegd, worden de kolven van roeders voorzien en goed afgesloten met geslepen glazen stoppen. Gedurende ten minste één uur wordt de ene helft (groep I) geroerd bij 30 °C en de andere helft (groep II) bij ongeveer 50 °C.

### 1.6.2. Testomstandigheden

De oplosbaarheid in vet wordt bepaald bij 37 °C ± 0,5 °C.

### 1.6.3. Meetprocedure

Roer de inhoud van de kolven in beide groepen bij 37 °C ± 0,5 °C totdat deze goed is gemengd.

Over het algemeen kan niet worden voorspeld hoelang moet worden geroerd voordat een evenwichtstoestand is bereikt. Voor vloeibare stoffen kan een verzadigingstoestand binnen enkele minuten zijn bereikt; voor vaste stoffen kan dit uren duren. Over het algemeen hoeft niet langer dan drie uur te worden geroerd; hierna dient in beide groepen het roeren in twee van de kolven te worden stopgezet. Deze twee kolven blijven ten minste één uur bij 37 °C staan, ten einde de niet-opgeloste fractie van de stof te scheiden zodat een homogene fase overblijft. Indien een emulsie of suspensie wordt gevormd (bij voorbeeld Tyndall-effect), moet deze bij voorbeeld door centrifugeren bij constante temperatuur worden gebroken.

De derde en vierde kolf in beide groepen moeten ten minste 24 uur worden geroerd en daarna ten minste één uur bij  $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  blijven staan.

*Opmerking:*

Indien na deze periode geen bodembezinksel (voor vaste stoffen) is gevormd of geen fasescheiding (voor vloeibare stoffen) is opgetreden, moet de test worden herhaald met een grotere hoeveelheid stof.

1.6.4. *Analyse*

Uit iedere verzadigde vetfase wordt één monster genomen voor analyse. Dit monster wordt gewogen en de massaconcentratie wordt bepaald.

Elke geschikte analysemethode kan worden gebruikt: ofwel direct, ofwel na extractie met water of een organisch oplosmiddel, ofwel na eventuele andere scheidingsmethode.

Voorbeelden van geschikte analysemethoden zijn:

- spectrofotometrie;
- gas- of vloeistofchromatografie;
- voltametrie.

2. **GEGEVENS**

Indien belangrijke verschillen optreden in de resultaten ten gevolge van onder- of oververzadiging over korte en lange perioden, dient de test te worden herhaald met langere roertijden.

3. **RAPPORTAGE**

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- nauwkeurige beschrijving van de stof (identiteit en onzuiverheden);
- nauwkeurige beschrijving van het vet (bij voorbeeld een beschrijving van eigenschappen, herkomst en samenstelling);
- analysemethode, afwijkingen en bijzonderheden;
- de resultaten en verwerking zoals hierboven beschreven: indien geen significante verschillen aanwezig waren tussen de verschillende meetwaarden in milligram per 100 gram, moeten de afzonderlijke waarden, het gemiddelde en de standaardafwijking worden vermeld; indien zelfs nadat opnieuw is getest, significante verschillen bestaan, dienen alleen de afzonderlijke resultaten te worden vermeld;
- alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

4. **LITERATUUR**

- (1) OESO Testrichtlijn 116, Besluit van de OESO Ministerraad C(81)30 Definitief, Parijs, 1981.

## Aanhangsel

## VOORBEELD VAN EEN STANDAARDVET

In onderstaande tabel wordt een voorbeeld van de samenstelling van een standaardvet beschreven.

## Vetzuurverdeling

Aantal C-atomen in de vetzuurketen	6	8	10	12	14	16	18	overige
Oppervlakte in GC-spectrum (%)	0,5	7,5	10,3	50,4	13,9	7,6	8,6	1

## Glycerideverdeling

Totaal aantal C-atomen in de vetzuurketens	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
Oppervlakte in GC-spectrum (%)	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

## Zuiverheid

Monoglyceridegehalte (enzymatisch) $\leq$	0,1 %
Diglyceridegehalte (enzymatisch) $\leq$	0,4 %
Niet-verzeepbare bestanddelen $\leq$	0,1 %
Wijsgetal $\leq$	0,5
Zuurgetal	0,02
Watergehalte (K. Fischer) $\leq$	0,1 %
Helder smeltpunt	28,5 °C

Voorbeeld van een absorptiespectrum (laagdikte  $d = 1$  cm, vergelijking: water, 35 °C)

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

Lichttransmissie bij 303 nm ten minste 10 %.

Dit nagebootste vet is een synthetisch mengsel van verzadigde triglyceriden met een vetzuur- en triglycerideverdeling zoals in kokosnootvet.

## A. 8. VERDELINGSCOËFFICIËNT

### 1. METHODE

De beschreven methode berust op de testrichtlijn van de OESO (1).

#### 1.1. Inleiding

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de dissociatieconstante, oplosbaarheid in water en oppervlaktespanning van de stof.

Deze methode is alleen van toepassing op chemisch zuivere stoffen die oplosbaar zijn in water en n-octanol. De methode is niet van toepassing op oppervlakte-actieve stoffen.

#### 1.2. Definities en eenheden

De verdelingscoëfficiënt (P) is gedefinieerd als de verhouding van de concentraties in evenwichtstoestand ( $c_i$ ) van een opgeloste stof in een twee-fasensysteem bestaande uit twee niet mengbare oplosmiddelen. Voor n-octanol en water:

$$P_{ow} = \frac{c_{\text{octanol}}}{c_{\text{water}}}$$

De verdelingscoëfficiënt (P) is daarom het quotiënt van twee concentraties; gewoonlijk wordt deze waarde opgegeven als een logaritme met grondtal tien (log P).

#### 1.3. Referentiestoffen

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. De referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om resultaten te kunnen vergelijken wanneer een andere methode wordt gebruikt.

#### 1.4. Principe van de testmethode

Om een verdelingscoëfficiënt te kunnen bepalen, moet een evenwichtstoestand zijn bereikt tussen alle componenten van het systeem; de concentraties van de opgeloste stoffen moeten vervolgens in beide fasen worden bepaald. Uit de literatuur blijkt dat er veel verschillende technische oplossingen bestaan voor dit probleem, dat wil zeggen het grondig mengen van beide fasen gevolgd door fasescheiding ten einde de evenwichtsconcentraties van de te onderzoeken stof te bepalen.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

##### 1.5.1. Herhaalbaarheid

Om zeker te zijn van de nauwkeurigheid van de verdelingscoëfficiënt, moeten duplo-metingen worden verricht onder drie uiteenlopende testomstandigheden; hierbij kan zowel de hoeveelheid stof als de verhouding van de hoeveelheden oplosmiddel worden gevarieerd. De gevonden waarden van de verdelingscoëfficiënt moeten, uitgedrukt in gewone logaritmen, binnen een interval van  $\pm 0,3$  log-eenheden vallen.

##### 1.5.2. Gevoeligheid

De meetgevoeligheid van de methode wordt bepaald door de detectiegrens van de analysemethode. Deze moet voldoende laag zijn om  $P_{ow}$ -waarden tot  $10^5$  te bepalen wanneer de concentratie van de opgeloste stof in geen van beide fasen hoger is dan 0,01 mol/l.

**1.5.3. Specificiteit**

De verdelingswet van Nernst geldt alleen voor verdunde oplossingen bij constante temperatuur, druk en pH. De wet geldt bovendien voor een zuivere stof die wordt verdeeld tussen twee zuivere oplosmiddelen. Indien in één of beide fasen tegelijkertijd verschillende opgeloste stoffen voorkomen, dan kan dit van invloed zijn op de resultaten.

Dissociatie of associatie van de opgeloste moleculen leidt tot afwijkingen van de verdelingswet van Nernst. Dergelijke afwijkingen blijken uit de concentratieafhankelijkheid van de verdelingscoëfficiënt.

Wegens het voorkomen van meervoudige evenwichtstoestanden mag deze test niet zonder correcties worden toegepast op ioniseerbare stoffen. (Voor dergelijke stoffen dient het gebruik van bufferoplossingen in plaats van water te worden overwogen.)

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Inleidende schatting van de verdelingscoëfficiënt**

De waarde van de verdelingscoëfficiënt kan worden geraamd aan de hand van een eenvoudige berekening (2) of door uit te gaan van de oplosbaarheid van de te onderzoeken stof in zuiver oplosmiddel (1). Hiervoor geldt:

$$P_{\text{geschat}} = \frac{\text{verzadiging } c_{\text{n-octanol}}}{\text{verzadiging } c_{\text{water}}}$$

Een schatting van de verdelingscoëfficiënt kan eveneens worden verkregen met behulp van een inleidende test.

**1.6.2. Voorbereiding**

n-Octanol: de verdelingscoëfficiënt moet worden bepaald met analytisch zuiver oplosmiddel.

Water: er moet gebruik worden gemaakt van gedestilleerd of dubbel gedestilleerd water uit apparatuur van glas of kwarts.

**Opmerking:**

Er mag geen gebruik worden gemaakt van water dat rechtstreeks uit een ionenwisselaar komt.

**1.6.2.1. Voorverzadiging van de oplosmiddelen**

Alvorens een verdelingscoëfficiënt te bepalen, worden de fasen van het oplosmiddelsysteem onderling verzadigd door uitschudden bij de temperatuur van het experiment. Hiertoe is het handig om gedurende 24 uur twee grote voorraadflessen met analytisch zeer zuiver n-octanol, respectievelijk water, waaraan voldoende water respectievelijk n-octanol is toegevoegd, mechanisch te schudden en daarna te laten staan totdat de fasen zich afscheiden en een verzadigingstoestand is ontstaan.

**1.6.2.2. Voorbereiding van de test**

Het twee-fasensysteem moet het testvat bijna vullen. Aldus wordt vervluchtiging van de vloeistof voorkomen.

De volumeverhouding en de benodigde hoeveelheid van de te onderzoeken stof worden bepaald door:

- de inleidende bepaling van de verdelingscoëfficiënt (zie 1.6.1);
- de minimale hoeveelheid van de te onderzoeken stof vereist voor de analyse;
- de beperking van de maximale concentratie in beide fasen tot 0,01 mol/l.

Er worden drie testen uitgevoerd: in de eerste test wordt gewerkt met de berekende volumeverhouding; in de tweede test wordt gewerkt met het dubbele volume n-octanol, in de derde test met het halve volume n-octanol.

**1.6.2.3. De te onderzoeken stof**

Voor de materiaalvoorziening tijdens de test wordt een voorraadoplossing bereid in n-octanol met een massaconcentratie tussen 1 en 100 mg/ml. De werkelijke massaconcentratie van deze voorraadoplossing moet nauwkeurig worden bepaald vóór gebruik bij de bepaling van de verdelingscoëfficiënt. Deze oplossing moet onder stabiele omstandigheden worden bewaard.

**1.6.3. Testomstandigheden**

De testtemperatuur moet constant ( $\pm 1$  °C) worden gehouden binnen een gebied van 20—25 °C.

**1.6.4. Meetprocedure****1.6.4.1. Instelling van het verdelingsevenwicht**

Voor de verschillende testomstandigheden moeten steeds twee testvaten worden gevuld met de vereiste, nauwkeurig bekende hoeveelheden van beide oplosmiddelen en de gewenste hoeveelheid voorraadoplossing.

Het volume van de octanol-fase moet worden gemeten. De testvaten moeten in een schudmachine worden geplaatst of met de hand worden geschud. Aanbevolen wordt om de centrifugebuizen snel 180° te draaien om de transversale as, zodat de ingesloten lucht door de beide fasen omhoog beweegt.

**1.6.4.2. Scheiding van de fasen**

Om de fasen te scheiden moet het mengsel worden gecentrifugeerd. Dit moet worden gedaan in een laboratoriumcentrifuge op kamertemperatuur; indien een centrifuge zonder temperatuurregeling wordt gebruikt, moeten de centrifugebuizen ten minste gedurende één uur op de testtemperatuur worden gehouden, zodat een evenwichtstoestand ontstaat voordat de analyse wordt uitgevoerd.

**1.6.5. Analyse**

Voor bepaling van de verdelingscoëfficiënt moet de concentratie van de te onderzoeken stof in beide fasen worden bepaald. Dit kan worden gedaan door onder de verschillende testomstandigheden uit alle buizen een monster van iedere fase te nemen en dit volgens de gekozen procedure te analyseren. De totale hoeveelheid van de te onderzoeken stof in beide fasen wordt berekend en vergeleken met de oorspronkelijke hoeveelheid toegevoegde stof.

Van de water-fase moet een monster worden genomen volgens een procedure waardoor zo min mogelijk sporen octanol worden meegenomen; voor de bemonstering van de water-fase kan een glazen injectiespuit met verwisselbare naald worden gebruikt. De injectiespuit moet van tevoren gedeeltelijk worden gevuld met lucht. De lucht moet zachtjes worden uitgedreven terwijl de naald door de octanol-fase wordt gestoken. De benodigde hoeveelheid van de water-fase wordt in de injectiespuit gezogen. De spuit wordt snel uit de oplossing gehaald, waarna de naald wordt losgemaakt. De inhoud van de injectiespuit kan nu worden gebruikt als monster van de water-fase. De concentratie in de twee afzonderlijke fasen dient bij voorkeur te worden bepaald met behulp van een analysemethode waarmee verschillende stoffen kunnen worden onderscheiden. Enkele voorbeelden van geschikte analysemethoden zijn:

- fotometrische methoden;
- gaschromatografie;
- hoge druk-vloeistofchromatografie.

**2. GEGEVENS**

Als de gemeten waarde voor  $P_{ow}$  groter is dan  $10^4$ , dan verdient het aanbeveling om de resultaten te vergelijken met een berekende  $P_{ow}$ -waarde, bij voorbeeld een waarde verkregen volgens de methode in de literatuur (3).

De betrouwbaarheid van de gevonden waarden voor P kan worden gecontroleerd door de gemiddelden van de duplo-bepalingen te vergelijken met het totale gemiddelde.

**3. RAPPORTAGE**

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- nauwkeurige beschrijving van de stof (identiteit en onzuiverheden);
- testtemperatuur;
- gegevens over de analytische procedures voor bepaling van de concentraties;
- de gemeten concentraties in beide fasen voor elke meting (dit betekent dat in totaal 12 concentraties worden vermeld);
- het gewicht van de onderzochte stof, het volume van elke fase in elk testvat en de berekende totale hoeveelheid van de onderzochte stof in elke fase bij evenwicht;
- de berekende waarden van de verdelingscoëfficiënt (P) en het gemiddelde voor iedere groep testomstandigheden, evenals het gemiddelde van alle metingen; indien er aanwijzingen zijn dat de verdelingscoëfficiënt afhankelijk is van de concentratie, dient dit te worden vermeld in het testrapport;
- de standaardafwijking van de afzonderlijke P-waarden ten opzichte van het gemiddelde;
- de logaritme (grondtal 10) van de P-waarde gemiddeld over alle metingen;
- de theoretisch berekende waarde van  $P_{ow}$ , wanneer deze is bepaald of wanneer de gemeten waarde groter is dan  $10^4$ ;
- pH van het gebruikte water en van de waterfase tijdens het experiment;
- alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor interpretatie van de resultaten.

**4. LITERATUUR**

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107 — Decision of the Council C(81)30 Final.
- (2) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107. ref (2) — Decision of the Council C(81)30 Final.
- (3) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107. ref (10) — Decision of the Council C(81)30 Final.



## A. 9. VLAMPUNT

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de brandbaarheid van de stof. De testprocedure is van toepassing op in de handel verkrijgbare vloeistoffen waarvan de dampen door een ontstekingsbron tot ontbranding kunnen worden gebracht. De hier beschreven testmethoden zijn alleen betrouwbaar indien de gemeten waarde van het vlampunt valt binnen een bereik zoals voor de afzonderlijke methoden is aangegeven.

#### 1.2. Definities en eenheden

Het vlampunt is de laagste temperatuur, gecorrigeerd tot een druk van 101,325 kPa, waarbij een vloeistof in een gesloten testvat onder de beschreven omstandigheden zoveel damp doet ontstaan, dat in het testvat een brandbaar mengsel van lucht en damp wordt gevormd.

Eenheden: °C

$$t = T - 273,15$$

(t in °C en T in K).

#### 1.3. Referentiestoffen

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de methode te ijken en om resultaten te kunnen vergelijken wanneer een andere methode wordt gebruikt.

#### 1.4. Principe van de testmethode

De stof wordt in een testvat gebracht en geleidelijk verwarmd tot de concentratie van de damp in lucht voldoende hoog is geworden om een brandbaar mengsel te vormen dat tot ontsteking kan worden gebracht.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

##### 1.5.1. Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid varieert met de gemeten waarde van het vlampunt en met de gebruikte testmethode; max.  $\pm 2$  °C.

##### 1.5.2. Gevoeligheid

De gevoeligheid is afhankelijk van de gebruikte testmethode.

##### 1.5.3. Specificiteit

De toepasbaarheid van bepaalde testmethoden blijft beperkt tot bepaalde vlampuntswaarden en wordt bepaald door gegevens die verband houden met de aard van de stof (bij voorbeeld hoge viscositeit).

#### 1.6. Beschrijving van de testmethode

##### 1.6.1. Voorbereiding

Monsters van de te onderzoeken stof worden in een testapparaat overeenkomstig 1.6.3.1, respectievelijk 1.6.3.2, gebracht.

**1.6.2. Testomstandigheden**

Het apparaat wordt bij voorkeur op een tochtvrije plaats opgesteld.

**1.6.3. Uitvoering van de test****1.6.3.1. Evenwichtsmethode**

Zie: ISO 1516; ISO 3680; ISO 1523; ISO 3679.

**1.6.3.2. Niet-evenwichtsmethode**

Apparatuur van Abel:

Zie: BS 2000, part 170; NF M07-011; NF T66-009.

Apparatuur van Abel-Pensky:

Zie: (EN 57); DIN 51755 deel 1 (voor temperaturen van 5 tot 65 °C); DIN 51755 deel 2 (voor temperaturen lager dan 5 °C); NF M 07 036.

Apparatuur van Tag:

Zie: ASTM D 56; ISO 2719.

Apparatuur van Pensky-Martens:

Zie: ISO 2719; (EN 11); DIN 51758; ASTM 8013; ASTM D 93; BS 2000, part 34; NF M07 019.

*Opmerkingen:*

Indien het vlampunt, bepaald volgens een van de niet-evenwichtsmethoden onder 1.6.3.2, de volgende waarden blijkt te hebben:

$0 \pm 2$  °C,  $21 \pm 2$  °C,  $55 \pm 2$  °C,

dient het te worden bevestigd volgens een evenwichtsmethode met gebruik van dezelfde apparatuur.

Alleen de methoden waarmee de temperatuur van het vlampunt kan worden bepaald, komen in aanmerking voor gebruik ten behoeve van een kennisgeving.

Voor de bepaling van het vlampunt van visceuze vloeistoffen (verven, gommen en dergelijke) met oplosmiddelen, mag uitsluitend gebruik worden gemaakt van apparatuur en testmethoden die geschikt zijn voor bepaling van het vlampunt van visceuze vloeistoffen. Zie: ISO 3679; ISO 3680; ISO 1523; DIN 53213, deel 1.

**2. GEGEVENS****3. RAPPORTAGE**

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- nauwkeurige beschrijving van de stof (identiteit en onzuiverheden);
- de gebruikte testmethode alsmede eventuele wijzigingen;
- de resultaten en alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

**4. LITERATUUR**

Geen.

## A. 10. ONTVLAMBAARHEID VAN VASTE STOFFEN

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake potentieel explosieve eigenschappen van de stof.

Deze test dient alleen te worden toegepast op stoffen in poeder-, korrel- of pastavorm.

Niet alle stoffen die kunnen worden ontstoken, maar alleen die stoffen die snel verbranden of waarvan het verbrandingsgedrag buitengewoon gevaarlijk is, worden hier inbegrepen. Daarom worden alleen stoffen, waarvan de verbrandingssnelheid hoger is dan een bepaalde drempelwaarde, als licht ontvlambaar beschouwd. Bovendien worden metaalpoeders die kunnen smeulen als licht ontvlambaar beschouwd, indien het smeulproces zich voortplant door het gehele monster. Smeulende metaalpoeders zijn buitengewoon gevaarlijk, omdat zij moeilijk zijn te doven en omdat normale blusmiddelen zoals kooldioxide of water het gevaar nog aanmerkelijk kunnen verhogen.

#### 1.2. Definities en eenheden

Verbrandingstijd in seconden.

#### 1.3. Referentiestoffen

Niet gekozen.

#### 1.4. Principe van de testmethode

Van de stof zoals in de handel verkrijgbaar wordt een hoopje gevormd met een lengte van 250 mm. Vervolgens wordt getracht dit monster te ontsteken onder de in 1.6.3 beschreven omstandigheden, waarna de verbrandingstijd wordt gemeten.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

#### 1.6. Beschrijving van de testmethode

##### 1.6.1. Voorbereidingen

Poeder- of korrelvormige stoffen zoals in de handel verkrijgbaar worden losjes in een vorm gestrooid. De vorm is van metaal, heeft een lengte van 250 mm en een driehoekige doorsnede met een inwendige hoogte van 10 mm en een inwendige breedte van 20 mm. Om de zijanten te begrenzen zijn aan beide kanten van de vorm in de lengterichting twee metalen platen gemonteerd die 2 mm uitsteken over de bovenrand van de driehoekige doorsnede (zie figuur). Vervolgens laat men de vorm driemaal van een hoogte van 2 cm op een vast oppervlak vallen. Zo nodig wordt de vorm weer opgevuld. Vervolgens worden de zijplaten verwijderd en wordt de overtollige stof weggeveegd. Een onbrandbare, niet-poreuze plaat wordt bovenop de vorm gelegd, het apparaat wordt omgekeerd, waarna de vorm wordt verwijderd.

Pastavormige stoffen worden op een onbrandbaar oppervlak uitgesmeerd in de vorm van een sliert met een lengte van 250 mm en een doorsnede van ongeveer 1 cm<sup>2</sup>.

Met behulp van een ontstekingsbron, bij voorbeeld een vlammetje of een hete draad met een temperatuur van ten minste 1 000 °C, wordt de sliert aan één uiteinde ontstoken.

1.6.2. *Testomstandigheden*

Bij een vochtgevoelige stof dient de test zo spoedig mogelijk na verwijderen van de verpakking te worden uitgevoerd.

1.6.3. *Uitvoering van de test*

Ontsteek één uiteinde van de sliert. Zodra de sliert over een lengte van 80 mm is opgebrand, wordt de verbrandingssnelheid over de volgende 100 mm gemeten. De test wordt zesmaal uitgevoerd, waarbij telkens een schone koele plaat wordt gebruikt.

2. **GEGEVENS**

Voor de beoordeling zijn de waarden van de verbrandingstijd uit alle zes tests noodzakelijk.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. **Testrapport**

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- een nauwkeurige beschrijving van de stof (identiteit en onzuiverheden);
- een beschrijving van de fysische toestand en het vochtgehalte van de onderzochte stof;
- de meetresultaten;
- alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

3.2. **Interpretatie van de resultaten**

Poedervormige, korrelvormige of pastavormige stoffen worden als licht ontvlambaar beschouwd indien tijdens één van de zes tests volgens 1.6 de verbrandingstijd minder dan 45 seconden bedraagt. Poeders van metalen of metaallegeringen worden als licht ontvlambaar beschouwd, indien zij kunnen worden ontstoken en indien de vlam of reactiezone zich over het gehele monster uitbreidt.

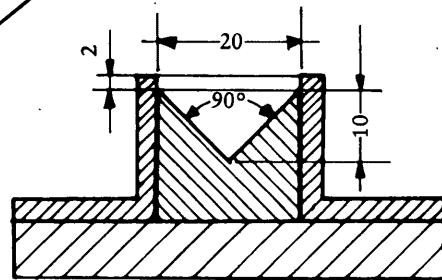
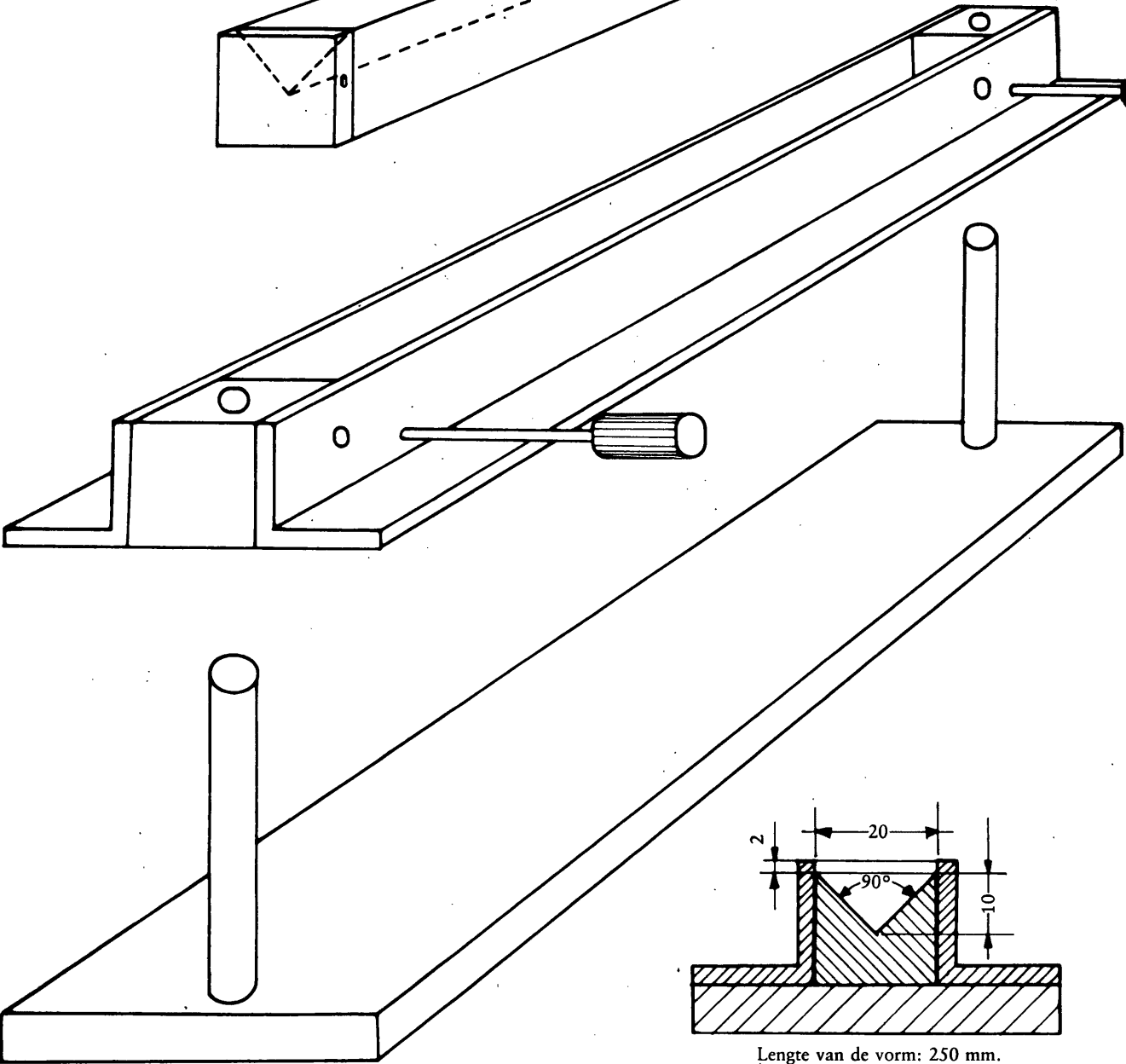
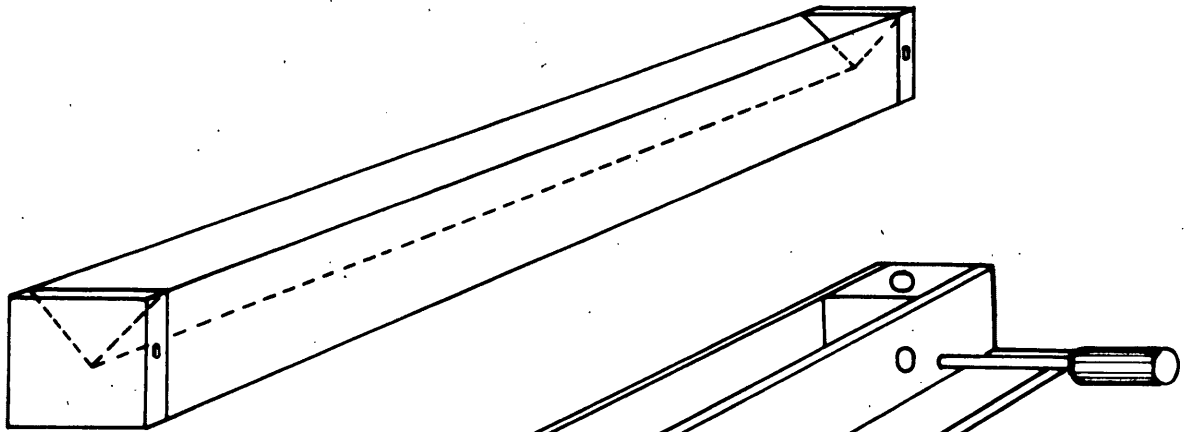
4. **LITERATUUR**

Geen.

---

Figuur

Vorm en toebehoren om een sliert van de te onderzoeken stof te vormen  
(alle afmetingen in mm)



Lengte van de vorm: 250 mm.  
Materiaal: aluminium.

## A. 11. ONTVLAMBAARHEID VAN GASSEN

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Met deze methode kan worden vastgesteld of mengsels van gassen en lucht bij kamertemperatuur en atmosferische druk binnen een zeker bereik brandbaar zijn. Mengsels met toenemende concentraties van het te onderzoeken gas in lucht worden blootgesteld aan een elektrische vonk. Vervolgens wordt vastgesteld of ontbranding plaatsvindt.

#### 1.2. Definitie en eenheden

De maat voor de brandbaarheid is het bereik van de concentratiewaarden tussen de onderste en bovenste ontploffingsgrens. De onderste en bovenste ontploffingsgrens worden gevormd door de uiterste concentraties van het brandbare gas in lucht waarbij een vlam zich niet voortplant.

#### 1.3. Referentiestof

Niet gegeven.

#### 1.4. Principe van de testmethode

De concentratie van het gas in de lucht wordt stap voor stap opgevoerd, waarbij het mengsel in iedere stap wordt blootgesteld aan een elektrische vonk.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

Niet gegeven.

#### 1.6. Beschrijving van de testmethode

##### 1.6.1. Apparatuur

Het testvat is een staande glazen cilinder met een inwendige diameter van minimaal 50 mm en een hoogte van minimaal 300 mm. De ontstekingselektroden bevinden zich op een onderlinge afstand van 3 tot 5 mm en worden 60 mm boven de cilinderbodem geplaatst. De cilinder is voorzien van een overdrukventiel. Het apparaat moet worden afgeschermd om schade bij een eventuele ontploffing te beperken.

Als ontstekingsbron wordt gebruik gemaakt van een inductievonk met een duur van 0,5 sec, opgewekt door een hoogspanningstransformator met een uitgangsspanning van 10 tot 15 kV (maximaal ingangsvermogen 300 W).

##### 1.6.2. Testomstandigheden

De test moet worden uitgevoerd bij kamertemperatuur.

##### 1.6.3. Uitvoering van de test

Met behulp van doseringspompen wordt een bekende concentratie van het gas in lucht naar de glazen cilinder geleid. Het mengsel wordt blootgesteld aan een vonk en er wordt vastgesteld of uit de ontstekingsbron een vlam slaat die zich zelfstandig voortplant. De gasconcentratie wordt in stappen van 1 vol. % opgevoerd, totdat ontbranding zoals boven bedoeld, plaatsvindt.

**2. GEGEVENS**

Het enige gegeven van belang voor bepaling van deze eigenschap is het optreden van een vlam, die zich zelfstandig voortplant.

**3. RAPPORTAGE**

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- een nauwkeurige beschrijving van de stof (identiteit en onzuiverheden);
- een beschrijving met de afmetingen van de gebruikte apparatuur;
- de temperatuur van de kamer waarin de test is uitgevoerd;
- de onderzochte concentraties en de verkregen resultaten;
- het resultaat van de test: niet ontvlambaar of licht ontvlambaar gas;
- indien de conclusie „niet ontvlambaar” is, moet worden verklaard dat alle concentraties werden onderzocht door de concentratie te verhogen van 0 tot 100 % in stappen van 1 %;
- alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

**4. LITERATUUR**

Geen.

## A. 12. ONTVLAMBAARHEID VAN STOFFEN EN PREPARATEN DIE BIJ AANRAKING MET WATER OF VOCHTIGE LUCHT, LICHT ONTVLAMBARE GASSEN IN EEN GEVAARLIJKE HOEVEELHEID ONTWIKKELEN

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Deze testmethode kan worden gebruikt om vast te stellen of de reactie van een stof met water leidt tot het vrijkomen van een gevaarlijke hoeveelheid van één of meerdere licht ontvlambare of giftige gassen. De testmethode kan zowel op vaste als op vloeibare stoffen worden toegepast. Deze methode is niet van toepassing op stoffen die in aanraking met lucht spontaan ontbranden.

#### 1.2. Definities en eenheden

Licht ontvlambaar:

Stoffen en preparaten die bij aanraking met water of vochtige lucht, licht ontvlambare gassen in een gevaarlijke hoeveelheid ontwikkelen met een minimumsnelheid van 1 liter/kg·uur. Bij vaststelling van deze grens is geen rekening gehouden met de giftigheid van het gas.

#### 1.3. Principe van de testmethode

De stof wordt volgens de hieronder beschreven stappen getest; als bij één van de stappen ontbranding optreedt, is verder onderzoek overbodig.

##### 1.3.1. Stap 1

De te onderzoeken stof wordt in een buis met gedestilleerd water op 20 °C gebracht en er wordt nagegaan of het vrijkomende gas ontbrandt.

##### 1.3.2. Stap 2

De te onderzoeken stof wordt gebracht op een filtreerpapier dat in een schotel met gedestilleerd water van 20 °C drijft, en er wordt nagegaan of het vrijkomende gas ontbrandt. Het filtreerpapier dient alleen om de stof op één plaats te houden, waardoor de kans op ontbranding toeneemt.

##### 1.3.3. Stap 3

Van de te onderzoeken stof wordt een hoopje van ongeveer 2 cm hoog en 3 cm doorsnede gemaakt. Hierop worden een paar druppels water gebracht en er wordt nagegaan of het vrijkomende gas ontbrandt.

##### 1.3.4. Stap 4

De te onderzoeken stof wordt met gedestilleerd water van 20 °C gemengd en de snelheid van gasontwikkeling wordt gedurende 7 uur ieder uur gemeten. Als de snelheid van de gasontwikkeling onregelmatig is of na 7 uur toeneemt, moet de duur van de meting tot maximaal 5 dagen worden verlengd. De test kan op ieder moment worden gestaakt zodra de snelheid van de gasontwikkeling hoger wordt dan 1 liter/kg·uur.



**1.4. Referentiestof**

Niet gegeven.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Niet gegeven.

**1.6. Beschrijving van de methoden****1.6.1. Stap 1****1.6.1.1. Testomstandigheden**

De stof in de vorm zoals in de handel verkrijgbaar wordt onderzocht bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C).

**1.6.1.2. Uitvoering van de test**

Een kleine hoeveelheid (ongeveer 2 mm doorsnede) van de te onderzoeken stof wordt in een buis met gedestilleerd water gebracht. Genoteerd wordt (i) of er gas ontwijkt en (ii) of er ontbranding van het gas plaatsvindt. Indien ontbranding van het gas plaatsvindt, is verder onderzoek van de stof niet nodig, omdat de stof dan als gevaarlijk wordt beschouwd.

**1.6.2. Stap 2****1.6.2.1. Apparatuur**

Een filtreerpapier laat men plat op het oppervlak van een hoeveelheid gedestilleerd water drijven in een geschikt vat, bij voorbeeld een verdampingsschotel van 100 mm doorsnede.

**1.6.2.2. Testomstandigheden**

De stof in de vorm zoals in de handel verkrijgbaar wordt onderzocht bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C).

**1.6.2.3. Uitvoering van de test**

Een kleine hoeveelheid van de te onderzoeken stof (ongeveer 2 mm doorsnede) wordt midden op het filtreerpapier gebracht. Genoteerd wordt (i) of er gas ontwijkt en (ii) of er ontbranding van het gas plaatsvindt. Indien ontbranding van het gas plaatsvindt, is verder onderzoek van de stof niet nodig, omdat de stof dan als gevaarlijk wordt beschouwd.

**1.6.3. Stap 3****1.6.3.1. Testomstandigheden**

De stof in een vorm zoals in de handel verkrijgbaar wordt onderzocht bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C).

#### 1.6.3.2. Uitvoering van de test

Van de te onderzoeken stof wordt een hoopje van ongeveer 2 cm hoog en 3 cm doorsnede gemaakt met een kuiltje bovenin. In het kuiltje worden een paar druppels water gebracht en genoteerd wordt (i) of er gas ontwijkt en (ii) of er ontbranding van het gas plaatsvindt. Indien ontbranding van het gas plaatsvindt, is verder onderzoek van de stof niet nodig, omdat de stof dan als gevaarlijk wordt beschouwd.

#### 1.6.4. Stap 4

##### 1.6.4.1. Apparatuur

De apparatuur wordt opgesteld als in de figuur.

##### 1.6.4.2. Testomstandigheden

Kijk of het vat van de te onderzoeken stof poeder bestaande uit deeltjes van minder dan 500  $\mu\text{m}$  diameter bevat. Indien meer dan 1 gewichtsprocent van de stof in poedervorm voorkomt of indien het monster brokkelig is, wordt de stof in zijn geheel vóór de test tot poeder gemalen; op deze manier wordt tevens rekening gehouden met mogelijk verkleining van de deeltjesgrootte tijdens opslag en verwerking van de stof. In alle andere gevallen wordt de stof, in een vorm zoals in de handel verkrijgbaar, onderzocht bij kamertemperatuur (20 °C) en atmosferische druk.

##### 1.6.4.3. Uitvoering van de test

In de druppeltrechter wordt water gebracht en voldoende stof voor de vorming van 100 tot 250  $\text{cm}^3$  gas, doch niet meer dan 25 g, wordt afgewogen in de erlenmeyerkolf. Het volume van het vrijkomende gas kan op elke geschikte wijze worden gemeten. De kraan van de druppeltrechter wordt geopend zodat het water in de erlenmeyerkolf komt, en op dat moment wordt een chronometer gestart. De tijd nodig voor het vrijkomen en de totale hoeveelheid gas worden genoteerd en zo mogelijk worden ook tussentijds metingen verricht. De test wordt uitgevoerd in triplo.

Indien de identiteit van het gas niet bekend is, dient het te worden geanalyseerd. Indien het gas licht ontvlambare componenten bevat en niet bekend is of het totale mengsel licht ontvlambaar is, moet een mengsel van dezelfde samenstelling worden bereid en getest volgens de testmethode voor ontvlambaarheid van gassen (A. 11).

## 2. GEGEVENS

Eén ontbranding of vrijkomen van licht ontvlambaar gas met een snelheid hoger dan 1 liter/kg·uur in drie proeven is voldoende om de onderzochte stof als gevaarlijk te beschouwen (1.6.1, 1.6.2 en 1.6.3).

## 3. RAPPORTAGE

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- nauwkeurige specificatie en beschrijving van de stof zoals hij is ontvangen (bij voorbeeld de kleur, deeltjesgrootte en de fysische toestand);
- eventuele voorbehandeling van de onderzochte stof;
- de resultaten van de tests;
- de chemische identiteit van het vrijkomende gas;
- de snelheid waarmee het gas vrijkomt (1.6.4);
- alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor interpretatie van de resultaten.

## 4. LITERATUUR

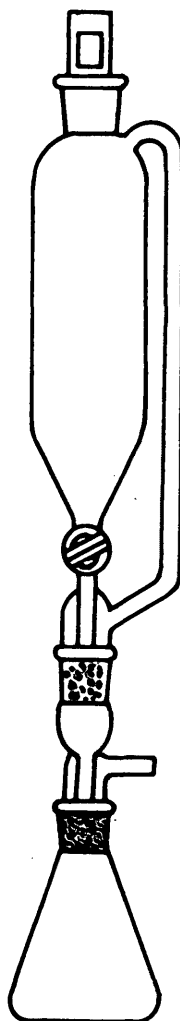
- (1) ISO 1773.
- (2) OECD, Paris, Preliminary Test Guideline for the Determination of Substances which give off Highly Inflammable Gases in Dangerous Amounts on Contact with Water A — 80/28 — Final report of the OECD chemical testing programme.
- (3) UN doc. No ST/SG/AC10/1 rev. 1.

---

*Aanhangsel*

*Figuur*

**Apparatuur**



**A. 13. ONTVLAMBAARHEID VAN VASTE STOFFEN EN VLOEISTOFFEN****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de zelfontvlambaarheid van een stof. De testprocedure is van toepassing op vaste en vloeibare stoffen, in een vorm zoals in de handel verkrijgbaar, die in kleine hoeveelheden spontaan ontbranden kort nadat ze bij kamertemperatuur in aanraking zijn gekomen met lucht.

Deze testprocedure is niet van toepassing op stoffen die bij kamertemperatuur eerst na uren of dagen spontaan ontbranden of die op aanmerkelijk hogere temperatuur moeten worden gebracht om tot zelfontbranding te komen.

**1.2. Definities en eenheden**

Vloeistoffen en vaste stoffen worden als licht ontvlambaar beschouwd als ze ten minste éénmaal ontbranden binnen een serie van zes proeven onder omstandigheden zoals beschreven onder 1.6.

Voor de zelfontvlambaarheid van vloeistoffen kan ook een test nodig zijn volgens methode A. 15: bepaling van de zelfontbrandingstemperatuur van gassen en vluchtige vloeistoffen.

**1.3. Referentiestoffen**

Niet gegeven.

**1.4. Principe van de testmethode**

De stof wordt gedurende 5 minuten bij een temperatuur van  $25\text{ °C} \pm 10\text{ °C}$  in aanraking gebracht met lucht. Indien ontbranding optreedt wordt de stof beschouwd als licht ontvlambaar.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Herhaalbaarheid: gezien het belang met betrekking tot veiligheid is één positief resultaat binnen zes proeven voldoende om de stof als licht ontvlambaar te beschouwen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Apparatuur**

Een porseleinen bakje van ongeveer 10 cm doorsnede wordt bij kamertemperatuur tot een hoogte van ongeveer 5 mm gevuld met diatomeeënaarde.

**Opmerking:**

Diatomeeënaarde of een vergelijkbare en gangbare, inerte stof wordt representatief geacht voor aarde waarmee gemorste stoffen in geval van een ongeluk in aanraking kunnen komen.

**1.6.2. Uitvoering van de test****a) Poedervormige vaste stoffen**

1 tot 2 cm<sup>3</sup> van de te onderzoeken, poedervormige stof wordt vanaf ongeveer 1 m hoogte op een niet-brandbaar oppervlak gestrooid; nagegaan wordt of de stof tijdens het vallen, of binnen 5 minuten na het neerkomen, ontbrandt.

## b) Vloeistoffen

Ongeveer 5 cm<sup>3</sup> van de te onderzoeken vloeistof wordt in het porseleinen bakje gegoten en nagegaan wordt of de stof binnen 5 minuten ontbrandt.

## 2. GEGEVENS

De resultaten van zes proeven zijn maatgevend voor de beoordeling.

## 3. RAPPORTAGE

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- een nauwkeurige beschrijving van de onderzochte stof;
- de resultaten van de test.

## 4. LITERATUUR

- (1) OESO voorlopige testrichtlijn A 80/23 voor bepaling van het pyrofore gedrag van vaste stoffen en vloeistoffen — Eindrapport van het OESO chemisch testprogramma, OESO, Parijs.

## A. 14. ONTPLOFFINGSGEVAAR

## 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

De methode omvat een testschema om vast te stellen of een vaste stof, een vloeistof of een deegachtige stof of preparaat ontploffingsgevaar oplevert wanneer de stof aan een vlam (thermische gevoeligheid) of aan wrijving (mechanische gevoeligheid) wordt blootgesteld.

De methode bestaat uit drie delen:

- a) een test voor de thermische gevoeligheid;
- b) een test voor de mechanische gevoeligheid bij schokken;
- c) een test voor de mechanische gevoeligheid bij wrijving.

De methode levert gegevens op waarmee de kans tot ontstaan van een ontploffing door bepaalde veel voorkomende oorzaken kan worden beoordeeld. De methode is niet bedoeld om te controleren of een stof of preparaat al dan niet onder alle omstandigheden kan ontploffen; evenmin om vast te stellen in welke mate een beginnende ontleding kan leiden tot ontploffing van het gehele monster.

De methode is geschikt om te bepalen of een stof of preparaat ontploffingsgevaar oplevert (thermische en mechanische gevoeligheid) onder omstandigheden zoals beschreven in Richtlijn 79/831/EEG. De proeven hebben geen zin als uit de beschikbare thermodynamische gegevens (vormingswarmte, ontledingswarmte, afwezigheid van bepaalde reactieve groepen (1) in het molecuul) met redelijke zekerheid kan worden afgeleid dat de stof of het preparaat niet kan ontleden, geen gassen kan vormen of zeer snel warmte kan afgeven (dat wil zeggen dat het materiaal geen ontploffingsgevaar oplevert). Erkend wordt dat de methode niet definitief is. Zij bestaat uit een aantal gekozen typen van nader omschreven apparatuur, die internationaal worden gebruikt en doorgaans zinvolle resultaten geven.

Naar keuze kan ook andere apparatuur in de drie besproken methoden worden gebruikt, mits dit op wetenschappelijke gronden gerechtvaardigd is en de apparatuur internationaal is erkend. In dat geval moeten de resultaten worden getoetst aan de resultaten welke worden verkregen met de hieronder beschreven apparatuur.

## 1.2. Definities en eenheden

Als explosief worden gedefinieerd: stoffen en preparaten die door de werking van een vlam kunnen ontploffen of die gevoeliger zijn voor schokken en wrijving dan dinitrobenzeen.

## 1.3. Referentiestof

Technisch, kristallijn meta-dinitrobenzeen voor de wrijving- en schokmethode.

## 1.4. Principe van de testmethoden

Om veilige omstandigheden voor het uitvoeren van de drie gevoeligheidstests te vinden, is een oriënterende proef nodig.

**1.4.1. Oriënterende proef**

Zeer kleine monsters (ongeveer 10 mg van de stof of het preparaat) worden zonder afsluiting verwarmd in een bunsenvlam, blootgesteld aan schokken in een geschikt apparaat, en aan wrijving door middel van een hamer tegen een aambeeld of door middel van elk ander wrijvingstoestel. Het doel is om vast te stellen of de stof zo gevoelig en ontploffingsgevaarlijk is dat de voorgeschreven gevoeligheidstests moeten worden uitgevoerd met speciale voorzorgen om te voorkomen dat de onderzoeker gewond raakt.

**1.4.2. Thermische gevoeligheid**

Bij deze methode wordt de stof of het preparaat verwarmd in een stalen buis, waarbij door afsluitplaten met openingen van verschillende doorsnede een verschillende mate van afsluiting is bereikt, om vast te stellen of de stof of het preparaat bij thermische belasting kan ontploffen.

**1.4.3. Mechanische gevoeligheid (schok)**

Bij deze methode wordt de stof of het preparaat aan de slag van een vallende hamer op een stalen aambeeld onderworpen.

**1.4.4. Mechanische gevoeligheid (wrijving)**

Bij deze methode wordt de stof of het preparaat onder bepaalde omstandigheden van belasting en relatieve beweging onderworpen aan wrijving tussen standaardoppervlakken.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Niet gegeven.

**1.6. Beschrijving van de testmethoden****1.6.1. Apparatuur****1.6.1.1. Thermische gevoeligheid (werking van een vlam)**

De stalen buis is gemaakt uit diepgetrokken plaat (zie aanhangsel) via een trekproces. De inwendige doorsnede is 24 mm, de lengte 75 mm en de wanddikte 0,5 mm. Aan het open einde is de buis voorzien van een flens voor de afsluiting (figuur 1). De buis is voorzien van een drukkbestendige ronde afsluitplaat met een gat in het midden en deze plaat wordt met behulp van een tweedelige schroefverbinding (moer en dopmoer) stevig op de buis bevestigd. De afsluitplaat (zie figuur 1) is 6 mm dik en gemaakt van hittebestendig chroomstaal (zie aanhangsel).

Een reeks afsluitplaten met verschillende openingen (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20 . . . mm) staat de onderzoeker ter beschikking om vast te stellen hoe groot het gevaar voor ontploffing van de stof of het preparaat is. De moer en de dopmoer (van figuur 1) bestaan uit chroommangaanstaal (zie aanhangsel) dat tot 800 °C vonkvrij is. De stalen buizen worden slechts voor één experiment gebruikt.

**1.6.1.2. Mechanische gevoeligheid (schok)**

De belangrijkste onderdelen van een apparaat voor vallende massa zijn gewoonlijk een gietstalen blok (grijs gietwerk) met voet en aambeeld, kolom, geleiders, valgewicht en een ontkoppelinrichting. Op het stalen blok van 230 mm diep × 250 mm breed × 200 mm hoog met een gegoten voet van 450 mm diep × 450 mm breed × 60 mm hoog, zit het stalen aambeeld van 100 mm doorsnede × 70 mm hoogte vastgeschroefd. Aan de achterkant van het stalen blok is de houder geschroefd en hierop is de kolom, bestaande uit een naadloze getrokken stalen buis met een uitwendige diameter van 90 mm en inwendige diameter van 70 mm bevestigd. Vier schroeven die verankerd zitten in een massief betonnen blok van

60 × 60 × 60 cm houden de valhamer in een zodanige positie dat de geleiderbalken volkomen verticaal staan en het valgewicht soepel wordt geleid. De massa van de valhamer moet 10 kg zijn. Het gewicht bestaat uit massief staal en heeft een slagoppervlak van getemperd staal, HRC 60 tot 63, en een minimumdoorsnede van 25 mm. De proeven worden uitgevoerd met een valhoogte van 0,4 m.

Het te onderzoeken monster wordt geplaatst in een voetstuk dat bestaat uit twee massieve, in het verlengde boven elkaar liggende stalen cilinders en een holle stalen cilinder als geleiderring. De massief stalen cilinders hebben een doorsnede van 10 (- 0,003; - 0,005) mm en een hoogte van 10 mm, met gepolijste oppervlakken, afgeronde zijvlakken (rondingsstraal 0,5 mm) en een hardheid van HRC 58 tot 65. De holle cilinder heeft een uitwendige diameter van 16 mm, een gepolijste binnenkant met een doorsnede van 10 (+ 0,005; + 0,010) mm en een hoogte van 13 mm. Na een ontploffing mogen de twee massieve cilinders en de holle cilinder niet voor verdere proeven worden gebruikt. Het voetstuk wordt opgericht op een stalen tussen-aambeeld van 26 mm doorsnede en 26 mm hoogte en wordt in het midden gehouden door een centreer-ring met een extra ring waarlangs de explosiedampen kunnen worden afgevoerd.

#### 1.6.1.3. Mechanische gevoeligheid (wrijving)

Het wrijvingsapparaat bestaat uit een gietstalen grondplaat (grijs gietwerk) met daarop gemonteerd het wrijvingstoestel zelf. Het wrijvingstoestel bestaat uit een vaste porseleinen pen en beweegbare porseleinen platen. De porseleinen plaat is bevestigd op een schuifslide welke tussen twee geleiders beweegt. De slide wordt via een aandrijfstang, een excentrische schijf en een tussendrijfwerk door een elektromotor aangedreven. Hierdoor wordt de porseleinen plaat onder de porseleinen staaf 10 mm heen en weer bewogen. De porseleinen pen wordt belast met ongeveer 360 newton.

De porseleinen platen zijn van wit technisch porselein en zijn 25 mm lang, 25 mm breed en 5 mm hoog. De beide wrijvingsoppervlakken van de plaat zijn voor het bakken ruw gemaakt (diepte van de groeven 9 tot 32 µm) door wrijven met een spons.

De ronde porseleinen pen is eveneens van wit technisch porselein. Hij is 15 mm lang, heeft een doorsnede van 10 mm en bolvormige uiteinden, rondingsstraal 10 mm, met ruw oppervlak.

#### 1.6.2. Testomstandigheden

##### 1.6.2.1. Thermische gevoeligheid (werking van een vlam)

De buis wordt in drie gelijke porties tot een hoogte van 60 mm gevuld met de stof in de fysische vorm waarin deze wordt geleverd. Elke portie wordt voorzichtig met een kracht van 80 newton op het oppervlak aangedrukt met behulp van een geschikte houten plunjer die iets smaller is dan de buis. Bij een gelei-achtige stof dient te worden opgelet dat bij het vullen geen luchtballen ontstaan.

##### 1.6.2.2. Mechanische gevoeligheid (schok)

De stof wordt in droge toestand onderzocht. Het monster heeft een volume van 40 mm<sup>3</sup> of een volume dat in het gebruikte apparaat past. Voor vaste stoffen, met uitzondering van pasta's, geldt het volgende:

- a) poedervormige stoffen worden gezeefd (maaswijdte 0,5 mm); alles wat de zeef passeert, wordt voor de test gebruikt;
- b) samengedrukte, gegoten of op andere wijze verdichte stoffen worden losgemaakt en gezeefd; de zeef fractie van 0,5 tot 1 mm doorsnede wordt gebruikt voor de test.

Bij vloeibare stoffen wordt de bovenste stalen cilinder naar beneden gedrukt totdat deze zich op een afstand van 1 mm van de onderste cilinder bevindt en dan wordt hij in deze positie gehouden.



### 1.6.2.3. Mechanische gevoeligheid (wrijving)

De stof wordt in droge toestand onderzocht. Het monster heeft een volume van 10 mm<sup>3</sup>. Voor vaste stoffen, met uitzondering van pasta's, geldt het volgende:

- a) poedervormige stoffen worden gezeefd (maaswijdte 0,5 mm); alles wat de zeef passeert, wordt voor de test gebruikt;
- b) samengedrukte, gegoten of op andere wijze verdichte stoffen worden losgemaakt en gezeefd; de zeef fractie van minder dan 0,5 mm doorsnede wordt gebruikt voor de test.

### 1.6.3. Uitvoering van de proeven

#### 1.6.3.1. Thermische gevoeligheid (werking van een vlam)

De verwarming geschiedt met behulp van propaan uit een industriële cilinder met drukregelaar (500 mbar), dat via een gasmeter door een verdeelstuk wordt geleid naar de vier branders. De vier branders verbruiken 3,2 liter propaan per minuut. Als voor de verwarming van andere stookgassen gebruik wordt gemaakt dienen de branders, het gasverbruik en de luchttoevoer zodanig te worden gekozen, dat bij vergelijkende metingen met inerte stoffen (zand, dibutylftalaat) dezelfde temperatuur/tijd-curven worden genoteerd als bij verwarming met propaan.

De branders worden rond de testkamer geplaatst zoals aangegeven in figuur 2.

De branders worden zo afgesteld dat de top van de binnenste blauwe vlamkegel bijna de buis raakt. De test wordt uitgevoerd in een stalen kamer met afmetingen, zoals aangegeven in figuur 2. De afmetingen van de propaanbranders zijn aangegeven in figuur 3 (a, b).

Twee reeksen van drie proeven zijn verplicht, waarbij in de eerste reeks een afsluitplaat met een opening van 2 mm doorsnede wordt gebruikt en in de tweede reeks een afsluitplaat met een opening groter dan 2 mm (bij voorbeeld 6 mm).

Indien in de eerste reeks (2 mm opening) een ontploffing optreedt, kan de volgende reeks achterwege blijven. Indien binnen 5 minuten geen ontploffing plaatsvindt, wordt de proef beëindigd.

#### 1.6.3.2. Mechanische gevoeligheid (schok)

In het beschreven slagapparaat (zie 1.6.1.2) worden zes proeven uitgevoerd waarbij men de massa van 10 kg van 0,4 m hoogte laat vallen. Bij gebruik van andere apparaten wordt het monster vergeleken met m-dinitrobenzeen via de vastgestelde procedure (op-en-neer techniek, enz.).

#### 1.6.3.3. Mechanische gevoeligheid (wrijving)

De porseleinen pen wordt op het te onderzoeken monster geplaatst en het gewicht wordt opgehangen. Tijdens de test moeten de sponsstroken op de porseleinen plaat loodrecht op de bewegingsrichting liggen. Er moet goed op worden gelet dat de pen op het monster rust, dat voldoende van de te onderzoeken stof onder de pen ligt en dat de plaat goed onder de pen beweegt. De porseleinen plaat moet onder de porseleinen pen heen en weer worden bewogen over een afstand van 10 mm in 0,44 seconden. Elk gedeelte van het oppervlak mag slechts voor één test worden gebruikt.

## 2. GEGEVENS

### 2.1. Verwerking van de resultaten

Het onderzoek kan worden gestaakt zodra in één van de tests een positief resultaat wordt gevonden.

### 2.2. Beoordeling van de resultaten

In beginsel wordt in de zin van deze richtlijn aan een stof of preparaat ontploffingsgevaar toegeschreven indien:

- a) binnen het vastgestelde aantal thermische gevoeligheidstests een ontploffing plaatsvindt (dat wil zeggen, de buis barst in drie of meer fragmenten uiteen); of
- b) ten minste éénmaal in zes proeven een ontploffing (het ontbranden staat hiermee gelijk) plaatsvindt met het beschreven slagapparaat of het monster in een andere slagproef gevoeliger is dan m-dinitrobenzeen; of
- c) ten minste éénmaal in zes proeven een ontploffing (knetteren of ontbranden staat hiermee gelijk) plaatsvindt met het omschreven wrijvingsapparaat of het monster in een andere wrijvingsproef gevoeliger is dan m-dinitrobenzeen.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. Testrapport

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- de identiteit, samenstelling, zuiverheid, vochtgehalte, enz. van de onderzochte stof of het onderzochte preparaat;
- de fysische vorm van het monster, zowel vóór als na zeven;
- waarnemingen tijdens de tests (soort reactie, vonken, vlammen, ontploffing, aantal fragmenten, enz.);
- de resultaten van elke test;
- indien een afwijkende apparatuur is gebruikt, moet dit op wetenschappelijke gronden worden gerechtvaardigd; bovendien moeten de resultaten worden gecorreleerd aan gelijkwaardige resultaten, welke zijn verkregen met de in deze testrichtlijn beschreven apparatuur;
- alle opmerkingen, die van belang kunnen zijn voor een goede interpretatie van de resultaten (bij voorbeeld verwijzing naar proeven met soortgelijke produkten).

### 3.2. Interpretatie van de resultaten

In het testrapport moet worden vermeld welke resultaten vals, afwijkend of niet-representatief worden beschouwd. Indien een gedeelte van de resultaten moet worden verworpen, dienen een toelichting en de resultaten van alle alternatieve of aanvullende proeven te worden gegeven.

Soms is het resultaat een toevallig gevolg van de fysische vorm of het vluchtige karakter van de stof of het preparaat tijdens de proef. In een dergelijk geval is het nuttig om te weten welk resultaat zou worden verkregen wanneer de stof of het preparaat zich bevindt in een vorm zoals in de handel verkrijgbaar. Dit kan met behulp van aanvullende proeven worden vastgesteld. Indien een afwijkend resultaat niet op deze wijze kan worden verklaard, moet het worden aanvaard en gebruikt om de stof of het preparaat overeenkomstig in te delen.

4.

**LITERATUUR**

- (1) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, London. Butterworths, 1979, p. 60—63.
- (2) Koenen, H., Ide, K.H., Über die Prüfung explosiver Stoffe, I. Ermittlung der Reibempfindlichkeit, Explosive Stoffe, Vol. 3, 1955, p. 57—65, 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, p. 119—125, 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, p. 178—189, 202—214, 223—235.
- (5) ONU, 1980, December, United Nations Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods (document ST/SG/AC/.10/5/Add.3, Table 4.3).

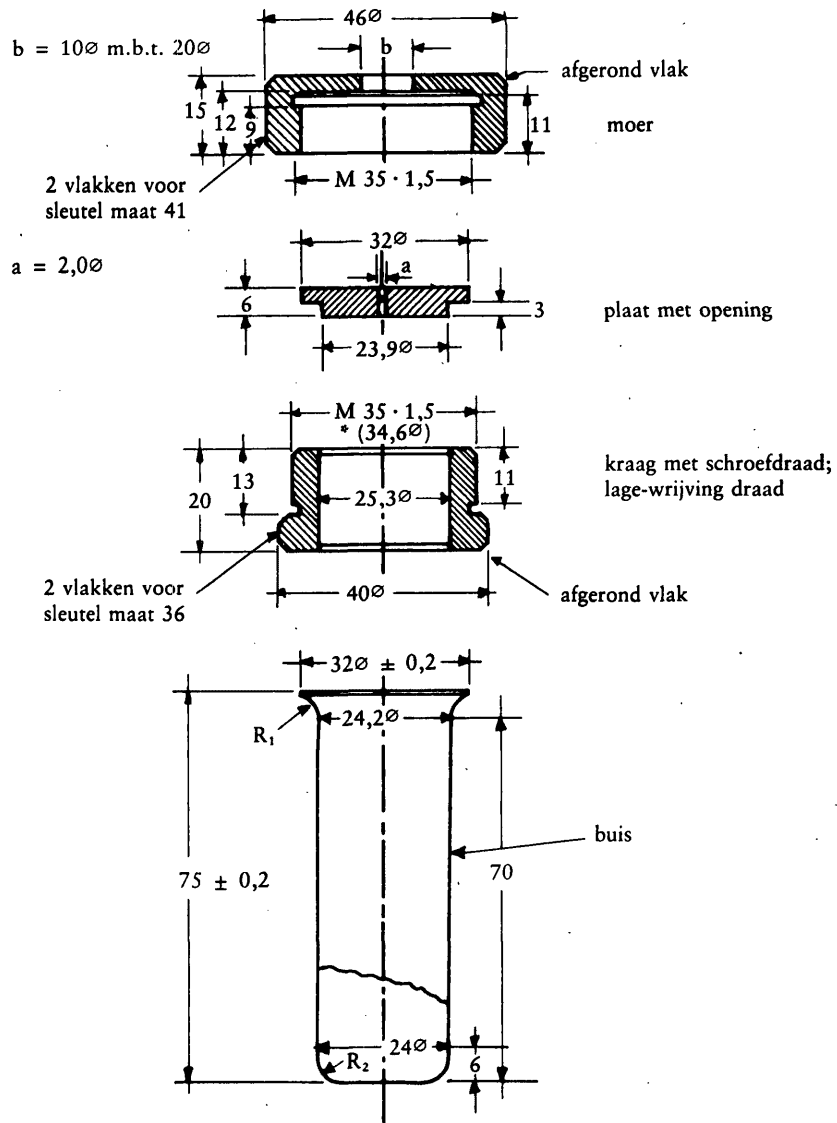
---

*Aanhangsel***Voorbeeld van materiaalspecificatie**

- (1) Materiaalspecificatie nr. 1.0336.505 g, overeenkomstig DIN 1623 blad 1.
  - (2) Materiaalspecificatie nr. 1.4873, overeenkomstig blad „Stahl-Eisen-Werkstoff“ 490-52.
  - (3) Materiaalspecificatie nr. 1.3817, overeenkomstig blad „Stahl-Eisen-Werkstoff“ 490-52.
-

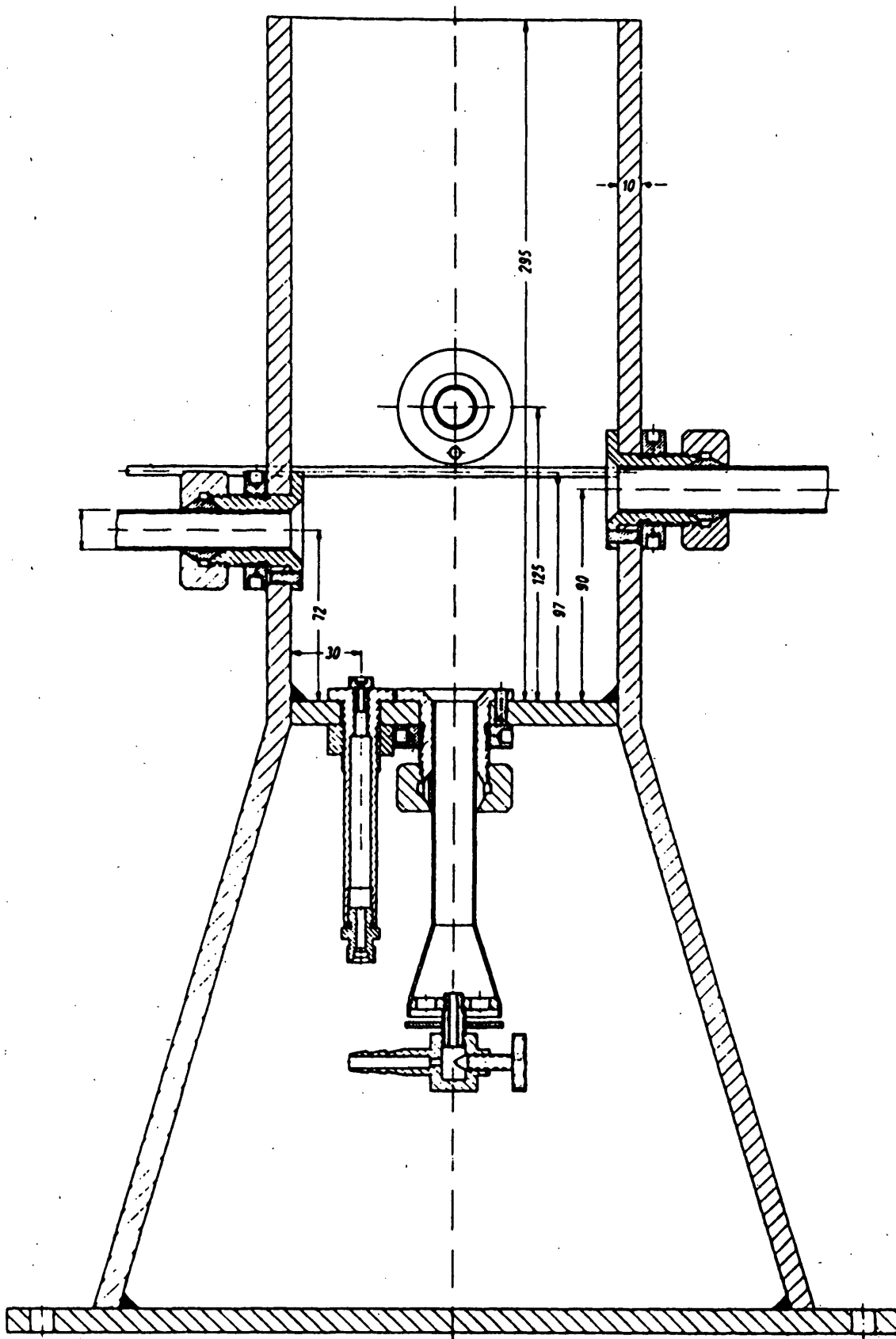
Figuur 1

Afmetingen in mm



Figuur 2

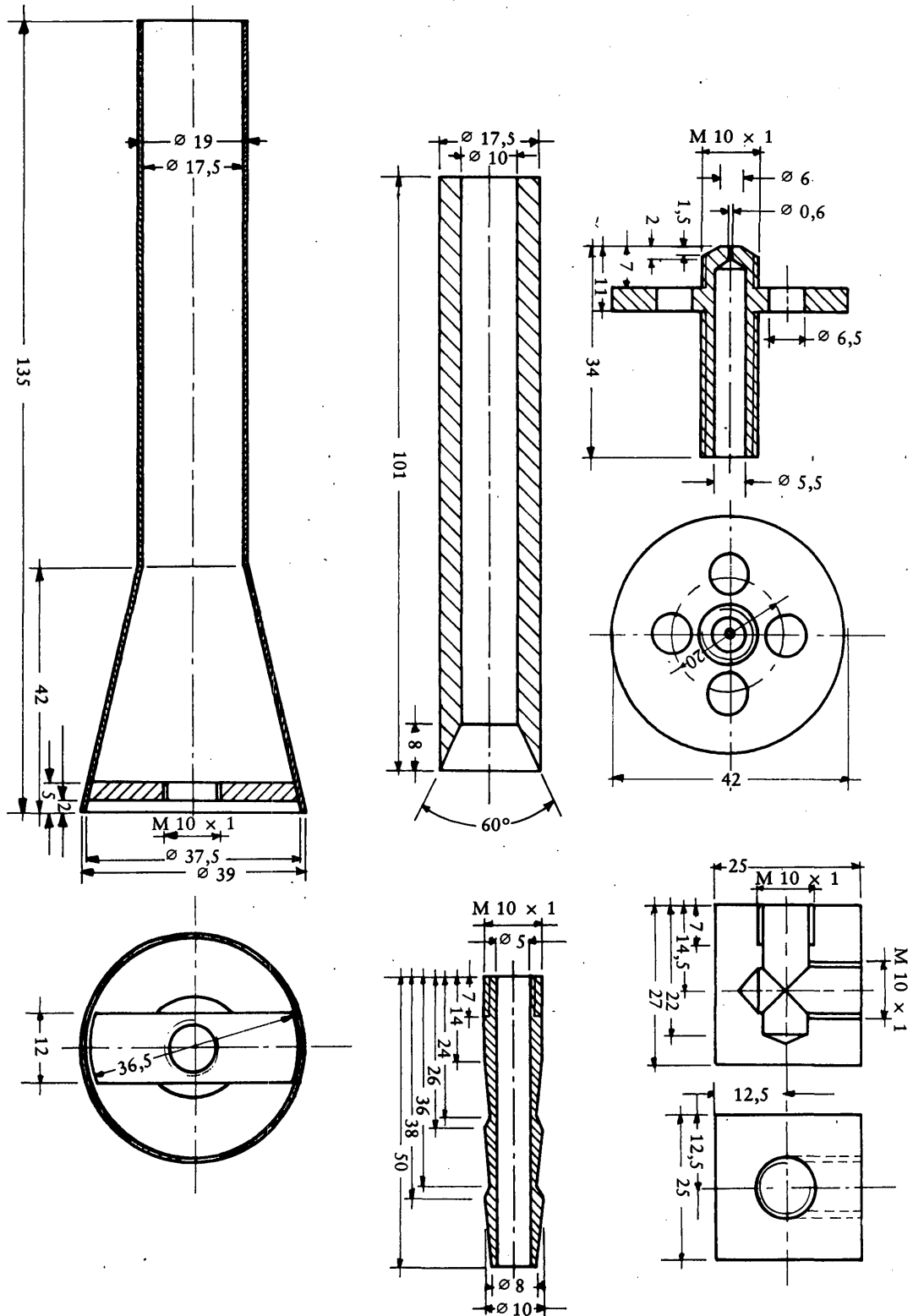
Afmetingen in mm



Figuur 3,a

Materiaal: messing

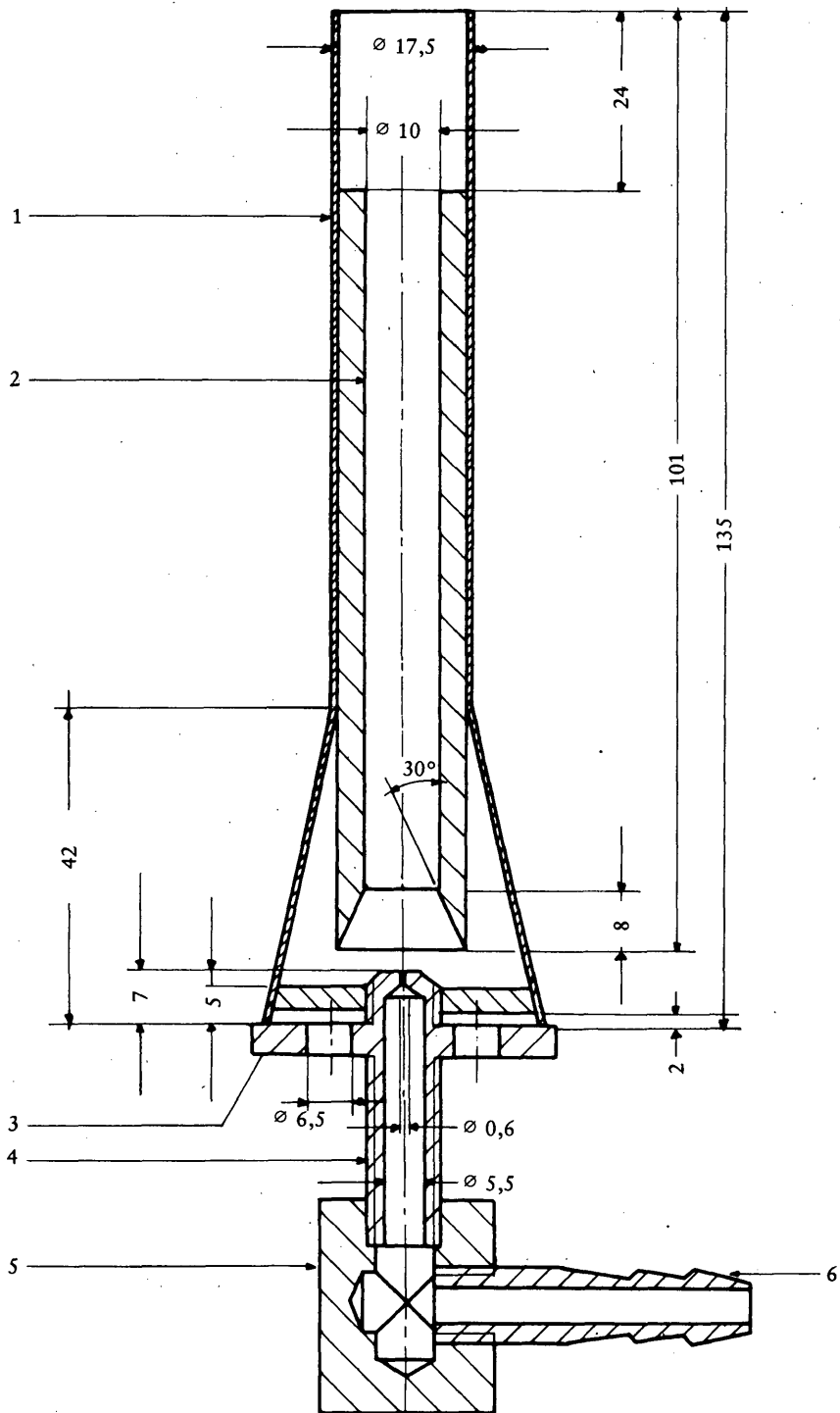
Afmetingen in mm



Figuur 3,b

Materiaal: messing

Afmetingen in mm



**A. 15. ZELFONTVLAMBAARHEID VAN VLUCHTIGE VLOEISTOFFEN EN GASSEN****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de zelfontvlambaarheid van een stof. De testprocedure is van toepassing op in de handel verkrijgbare gassen en vluchtige vloeistoffen, die (of waarvan de dampen) in aanwezigheid van lucht door een heet oppervlak tot ontbranding kunnen worden gebracht. De temperatuur waarbij zelfontbranding optreedt, kan aanzienlijk worden verlaagd door de aanwezigheid van katalytische onzuiverheden.

**1.2. Definities en eenheden**

De mate van zelfontbranding wordt uitgedrukt in de zelfontbrandingstemperatuur. De zelfontbrandings-temperatuur is de laagste temperatuur waarbij de te onderzoeken stof gemengd met lucht tot ontbranding komt onder omstandigheden zoals beschreven in deze testrichtlijn.

**1.3. Referentiestoffen**

Niet gegeven.

**1.4. Principe van de testmethode**

De zelfontvlambaarheid van gassen en dampen wordt bepaald met de apparatuur beschreven in IEC 79-4.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

De herhaalbaarheid is afhankelijk van het temperatuurgebied waarin de zelfontbranding optreedt, en van de gebruikte testmethode; maximaal  $\pm 5$  °C.

De gevoeligheid is afhankelijk van de gebruikte testmethode.

De specificiteit is afhankelijk van de gebruikte testmethode.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Apparatuur**

De apparatuur wordt beschreven in de methode onder 1.6.3.

**1.6.2. Testomstandigheden**

De te onderzoeken stof wordt onderzocht volgens de methode beschreven onder 1.6.3.

**1.6.3. Uitvoering van de test**

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



**2. GEGEVENS**

Registreer de testtemperatuur, de atmosferische druk, de hoeveelheid van de te onderzoeken stof, en het tijdsinterval tot ontbranding.

**3. RAPPORTAGE**

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- een nauwkeurige beschrijving van de stof (identiteit en onzuiverheden);
- de gebruikte hoeveelheid van de onderzochte stof en de atmosferische druk;
- de resultaten van metingen (testtemperaturen, resultaten met betrekking tot ontbranding en de bijbehorende tijdsintervallen);
- alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor interpretatie van de resultaten.

**4. LITERATUUR**

Geen.

## A. 16. ZELFONTVLAMBAARHEID VAN VASTE STOFFEN

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Ontploffingsgevaarlijke stoffen en stoffen die in contact met lucht bij kamertemperatuur spontaan ontbranden, moeten niet aan deze test worden onderworpen.

Deze test geeft oriënterende informatie over de zelfontvlambaarheid van vaste stoffen bij verhoogde temperatuur.

Indien de warmte, die vrijkomt bij reactie van de stof met zuurstof of bij exotherme ontleding, niet snel genoeg aan de omgeving wordt afgegeven, vindt verhitting en uiteindelijk zelfontbranding plaats. Zelfontbranding treedt dus op als de warmteproductie groter is dan het warmteverlies. De testprocedure is bruikbaar als een oriënterende proef voor vaste stoffen. Omdat de ontsteking en verbranding van vaste stoffen ingewikkelde processen zijn, mag de volgens deze testmethode bepaalde zelfontbrandings-temperatuur alleen voor vergelijkingsdoeleinden worden gebruikt.

#### 1.2. Definities en eenheden

De zelfontbrandingstemperatuur, die met deze methode verkregen wordt, is de laagste omgevingstemperatuur in °C waarbij een bepaald volume van een stof onder welbepaalde omstandigheden ontbrandt.

#### 1.3. Referentiestoffen

Niet gegeven.

#### 1.4. Principe van de testmethode

Een bepaald volume van de te onderzoeken stof wordt bij kamertemperatuur in een oven geplaatst; het temperatuurverloop in het midden van het monster wordt tegen de tijd geregistreerd, terwijl de temperatuur van de oven met een snelheid van 0,5 °C/minuut wordt opgevoerd tot 400 °C. De temperatuur van de oven, waarbij de temperatuur van het monster door zelfverhitting 400 °C bereikt, wordt de zelfontbrandingstemperatuur genoemd voor het doel van deze test.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

Niet gegeven.

#### 1.6. Beschrijving van de testmethode

##### 1.6.1. Apparatuur

##### 1.6.1.1. Oven

Een laboratoriumoven van ongeveer 2 liter, waarvan de temperatuur geprogrammeerd kan worden, en voorzien van natuurlijke luchtcirculatie en ontploffingsbeveiliging. Ten einde explosiegevaar te vermijden, mogen de ontledingsgassen niet in contact komen met de elektrische verhittingsdraden.

**1.6.1.2. Gazen blokje**

Een stukje roestvrij staalgaas met openingen van 0,045 mm wordt uitgeknipt volgens het patroon van figuur 1. Het gaasje wordt gevouwen en vastgemaakt met draad tot blokjes met open bovenkant.

**1.6.1.3. Thermokoppels**

Geschikte thermokoppels.

**1.6.1.4. Recorder**

Tweekanaalsrecorder, geijkt van 0 tot 600 °C of op overeenkomstige spanning.

**1.6.2. Testomstandigheden**

De stoffen worden getest in een vorm zoals in de handel verkrijgbaar.

**1.6.3. Uitvoering van de test**

Het blokje wordt gevuld met de te onderzoeken stof en onder zachtjes tikkén wordt nog meer stof toegevoegd totdat het blokje volledig gevuld is. Vervolgens wordt het monster bij kamertemperatuur midden in de oven gehangen. Het ene thermokoppel wordt in het middelpunt van het blokje gebracht en het tweede tussen het blokje en de ovenwand voor het registreren van de oventemperatuur.

De temperaturen van de oven en van het monster worden continu geregistreerd terwijl de temperatuur van de oven met een snelheid van 0,5 °C/min wordt opgevoerd tot 400 °C of tot het smeltpunt van de vaste stof indien dit lager is dan 400 °C.

Wanneer de stof ontbrandt, zal het thermokoppel in het monster een scherpe temperatuurstijging boven de oventemperatuur te zien geven.

**2. GEGEVENS**

De oventemperatuur, waarbij de temperatuur van het monster door zelfverhitting 400 °C bereikt, is van belang voor de beoordeling (zie figuur 2).

**3. RAPPORTAGE**

Het rapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

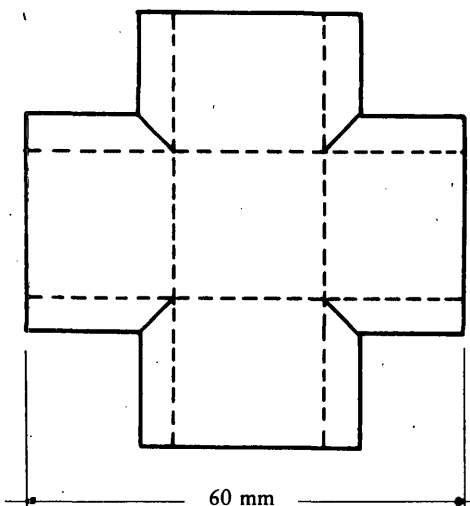
- een beschrijving van de onderzochte stof;
- de meetresultaten inclusief de temperatuur/tijd-grafiek;
- alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor interpretatie van de resultaten.

**4. LITERATUUR**

Geen.

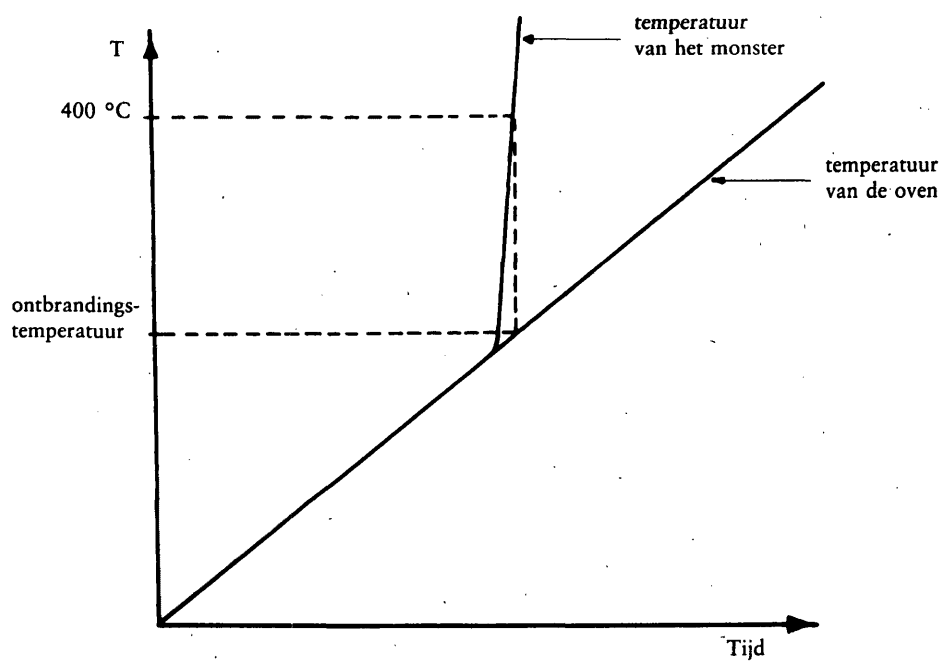
*Figuur 1*

Model van het testblokje met ribben van 20 mm



*Figuur 2*

Voorbeeld van een temperatuur/tijd-grafiek



## A . 17. OXIDERENDE EIGENSCHAPPEN

## 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

Het is nuttig om, voordat deze test wordt uitgevoerd, te beschikken over gegevens over de mogelijke explosieve eigenschappen en de toxiciteit van de te onderzoeken stof.

Deze test is niet van toepassing op vloeistoffen en gassen, explosieve of licht ontvlambare vaste stoffen, organische peroxiden en op brandbare stoffen die onder de testomstandigheden smelten.

Deze test is overbodig als op grond van de structuurformule redelijkerwijs kan worden aangenomen dat de stof of het preparaat niet exothermisch kan reageren met een brandbare stof.

Ten einde vast te stellen of voor deze test speciale voorzorgsmaatregelen nodig zijn moet een oriënterende proef worden uitgevoerd.

## 1.2. Definities en eenheden

Verbrandingstijd: de reactietijd in seconden die de reactiezone nodig heeft om zich langs een liggende kolom te verplaatsen, volgens de werkwijze van 1.6.

Verbrandingssnelheid: de bijbehorende snelheid in mm/s.

Maximale verbrandingssnelheid: de hoogste waarde van de verbrandingssnelheden van mengsels die 10 tot 90 gewichtsprocenten oxidator bevatten.

## 1.3. Referentiestof

Als referentiestof voor de test en de oriënterende proef wordt bariumnitraat (analytisch zuiver) gebruikt.

In de oriënterende proeven kan ook kaliumdichromaat worden gebruikt, maar bij de behandeling van deze stof moeten speciale voorzorgen worden getroffen.

Het referentiemengsel is het volgens 1.6 bereide mengsel van bariumnitraat en poedervormige cellulose dat de maximale verbrandingssnelheid heeft (doorgaans een mengsel met 60 gewichtsprocenten bariumnitraat).

## 1.4. Principe van de testmethode

Met het oog op de veiligheid wordt een oriënterende proef uitgevoerd. Deze proef is op zich voldoende wanneer daaruit duidelijk blijkt dat de te onderzoeken stof of het preparaat oxiderende eigenschappen heeft. In andere gevallen wordt de stof of het preparaat aan een volgende test onderworpen.

In de volgende test wordt de te onderzoeken stof in verschillende verhoudingen gemengd met een bepaalde brandbare stof. Van dit mengsel wordt een liggende kolom gemaakt en deze wordt aan één uiteinde aangestoken. De maximale verbrandingssnelheid wordt bepaald en vergeleken met de maximale verbrandingssnelheid van het referentiemengsel.

## 1.5. Kwaliteitscriteria

Indien nodig kunnen de stoffen op willekeurige wijze worden gemalen of gemengd, mits de maximale verbrandingssnelheden uit zes verschillende bepalingen niet meer dan 10 % verschillen van hun rekenkundige gemiddelde.

**1.6. Beschrijving van de methode****1.6.1. Oriënterende proef**

De stof wordt gedroogd in de vorm waarin deze wordt verhandeld. Twee gewichtsdelen gedroogde stof worden grof gemengd met één gewichtsdeel cellulose of houtmeel. Van het mengsel wordt, bij voorbeeld met behulp van een glazen trechter waarvan de steel is dichtgestopt, zonder aandrukken een kegelvormig bergje gemaakt met een basisdiameter van 3,5 cm en een hoogte van 2,5 cm.

Deze kegel wordt op een koel, niet-absorberend, niet-geleidend oppervlak boven een ontstekingsbron geplaatst; deze ontstekingsbron bestaat uit een draad van inert metaal, bij voorbeeld platina of nikkel, die elektrisch kan worden verhit tot ongeveer 1 000 °C. De draad bevindt zich ongeveer 1 mm boven het testoppervlak en omspant de gehele basis van het kegelvormige bergje. Deze oriënterende proef moet worden uitgevoerd in een zuurkast zoals beschreven in 1.6.3.

De ontstekingsbron wordt ingeschakeld en gedurende de reactie niet uitgeschakeld. De heftigheid en de duur van de reactie worden geobserveerd en geregistreerd.

De stof of het preparaat kan worden aangemerkt als oxiderend als de reactie heftig is.

Zodra het resultaat aanleiding geeft tot enige twijfel, dient de hieronder beschreven volledige test te worden uitgevoerd.

**1.6.2. Voorbereiding****1.6.2.1. Teststof**

De deeltjesgrootte van het te onderzoeken monster wordt als volgt tot minder dan 0,125 mm verkleind:

De stof wordt zonder voorbewerking gezeefd door openingen van 0,125 mm, de overblijvende fractie gemalen en deze handelingen worden herhaald totdat de gehele portie door de zeef is gegaan. Iedere methode voor malen en zeven kan worden gebruikt, zolang aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

Vóór het bereiden van het mengsel wordt de stof eerst tot constant gewicht gedroogd bij 105 °C. Indien de ontledingstemperatuur van de te onderzoeken stof beneden 105 °C ligt, wordt deze bij een lagere temperatuur gedroogd.

**1.6.2.2. Brandbare stof**

Poedervormige cellulose wordt gebruikt als brandbare stof. De cellulose moet van een type zijn dat wordt gebruikt voor dunne-laagchromatografie of kolomchromatografie. Een type waarbij meer dan 85 % van de vezels een lengte hebben tussen 0,020 en 0,075 mm is geschikt gebleken. Het cellulosepoeder wordt gezeefd door een zeef met openingen van 0,125 mm.

Vóór het bereiden van het mengsel wordt de poedervormige cellulose bij 105 °C tot constant gewicht gedroogd.

Indien in de oriënterende proef houtmeel is gebruikt, wordt houtmeel van naaldhout bereid door zeven met openingen van 1 600 µm; het gezeefde houtmeel wordt grondig gemengd en vervolgens vier uur bij 105 °C gedroogd in een laag van maximaal 25 mm dikte. Na afkoelen wordt het houtmeel in een luchtdicht vat dat zover mogelijk gevuld is, opgeborgen tot het ogenblik dat het wordt gebruikt, zo mogelijk binnen 24 uur na het drogen.

**1.6.2.3. Mengsel**

Er worden mengsels van oxidator en brandbare stof gemaakt, waarbij het gehalte oxidator in stappen van 10 gewichtsprocenten oploopt van 10 tot 90 gewichtsprocenten. In grensgevallen moeten tussenliggende mengverhoudingen worden bereid, zodat de maximale verbrandingssnelheid nauwkeuriger kan worden bepaald.

Opmerking: In verband met mogelijk ontploffingsgevaar moeten mengsels van oxidator en cellulose met de nodige voorzichtigheid worden behandeld.

De liggende kolom wordt gevormd met behulp van een mal. Deze mal is van metaal, heeft een lengte van 250 mm en een driehoekige doorsnede met een hoogte van 10 mm en een basis van 20 mm. Aan weerszijden van de mal worden in de lengterichting twee metalen stroken aangebracht die 2 mm boven de driehoekige doorsnede uitsteken (zie figuur). De mal wordt losjes gevuld met een kleine overmaat van het mengsel. Na de mal eenmaal van een hoogte van 2 cm op een vast oppervlak te hebben laten vallen, wordt de overmaat mengsel met een schuin blad weggeveegd. De zijstroken worden verwijderd en het overblijvende poeder wordt met een rol glad gestreken. Tenslotte wordt bovenop de mal een vuurvaste plaat gelegd, het geheel wordt omgekeerd en de mal verwijderd.

#### 1.6.2.4. Ontstekingsbron

Als ontstekingsbron dient ofwel een gasbrander, ofwel een platinadraad die elektrisch verhit wordt tot ongeveer 1 000 °C.

#### 1.6.3. Uitvoering van de test

De kolom wordt in de zuurkast geplaatst in een richting loodrecht op de richting van de trek. De luchtsnelheid moet voldoende zijn om te verhinderen dat verbrandingsgassen naar de laboratoriumruimte ontsnappen; de luchtsnelheid mag gedurende de test niet veranderen. De apparatuur moet worden omgeven door een tochtscherm.

In verband met de hygroscopische eigenschappen van cellulose en de te onderzoeken stoffen moet de test zo snel mogelijk worden uitgevoerd.

Eén uiteinde van de kolom wordt aangestoken door aanraking met de vlam of met een gloeiende platinadraad.

De reactietijd wordt gemeten over een lengte van 200 mm, nadat de reactiezone reeds een beginafstand van 30 mm heeft afgelegd.

De test wordt uitgevoerd met de referentiestof. De test wordt vervolgens met elk mengsel van de te onderzoeken stof en cellulose ten minste éénmaal uitgevoerd.

Indien een maximale verbrandingssnelheid wordt waargenomen die aanzienlijk hoger is dan de maximale verbrandingssnelheid van de referentiestof, kan de test worden gestaakt; zo niet, dan moet de test vijfmaal worden herhaald met de drie mengsels, waarbij de hoogste verbrandingssnelheid waargenomen werd.

## 2. GEGEVENS

Om veiligheidsredenen moet de maximale verbrandingssnelheid — en niet de gemiddelde waarde — worden beschouwd als kenmerk voor de oxiderende eigenschappen van de stof.

De hoogste waarde van de verbrandingssnelheid, binnen een serie van zes metingen, voor één bepaald mengsel, geldt voor de beoordeling.

Zet de hoogste waarde van de verbrandingssnelheid in een grafiek uit tegen het gehalte van de oxidator in het mengsel; bepaal uit deze grafiek de maximale verbrandingssnelheid.

De zes waarden van de verbrandingssnelheid, in een serie van zes metingen op het mengsel met de maximale verbrandingssnelheid, mogen niet meer dan 10 % afwijken van hun rekenkundig gemiddelde; anders moeten de gebruikte methoden voor malen en mengen verbeterd worden.

Vergelijk de verkregen maximale verbrandingssnelheid met de maximale verbrandingssnelheid van het referentiemengsel (zie 1.3).

### 3. RAPPORTAGE

#### 3.1. Testrapport

Het testrapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

- een beschrijving van de onderzochte stof;
- eventuele voorbehandeling van de onderzochte stof (bij voorbeeld malen, drogen, enz.);
- de resultaten van de metingen;
- de wijze van reactie (bij voorbeeld een flitsende verbranding aan het oppervlak of een verbranding door de gehele massa, eventuele informatie met betrekking tot de verbrandingsprodukten, enz.);
- alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, inclusief een beschrijving van de heftigheid (vlammen, vonken, rook, smeulen, en dergelijke) en een schatting van de duur van de oriënterende proef, zowel voor de teststof als voor de referentiestof.

#### 3.2. Interpretatie van de resultaten

Een stof wordt aangemerkt als een oxiderende stof wanneer:

- a) er in de oriënterende proef een heftige reactie optreedt;
- b) in de volledige test de maximale verbrandingssnelheid van de onderzochte mengsels groter is dan of gelijk is aan de maximale verbrandingssnelheid van het referentiemengsel van cellulose en bariumnitraat.

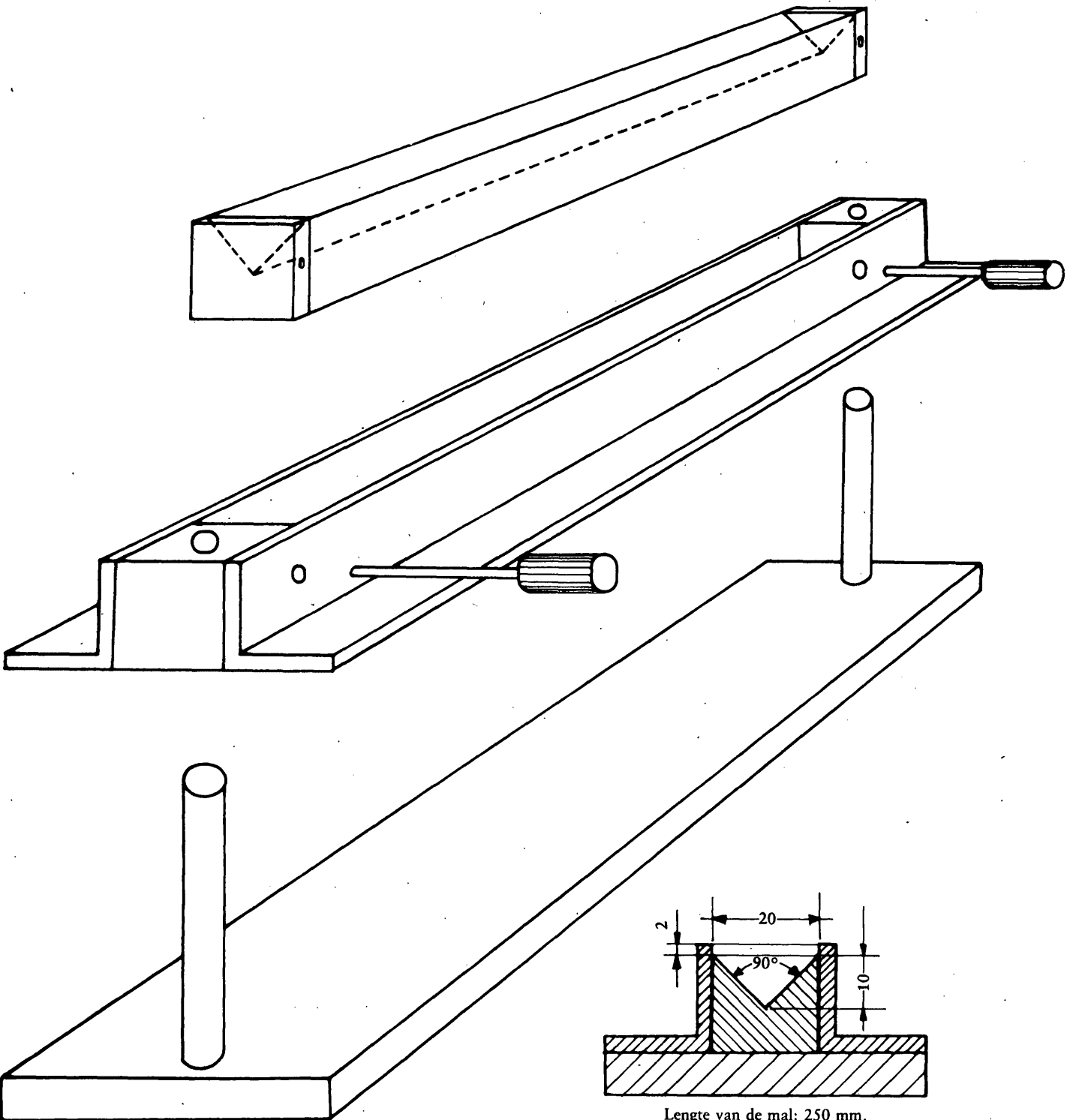
### 4. LITERATUUR

Geen.



*Aanhangsel**Figuur*

Mal en hulpstukken voor de bereiding van de kolom  
(maten in mm)



Lengte van de mal: 250 mm.  
Materiaal: aluminium.

**DEEL B: METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE TOXICITEIT****ALGEMENE INLEIDING DEEL B****A. INLEIDING**

Zie algemene inleiding.

**B. DEFINITIES**

- i) *Acute toxiciteit* omvat de schadelijke effecten die binnen een gegeven tijd (meestal 14 dagen) na de toediening van een enkelvoudige dosis van een stof optreden.
- ii)  $LD_{50}$  (mediaan letale dosis) is de statistisch vastgestelde enkelvoudige dosis van een stof, waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de dieren die de dosis hebben ontvangen de dood intreedt.  
De  $LD_{50}$ -waarde wordt uitgedrukt in het gewicht van de teststof per gewichtseenheid proefdier (mg/kg).
- iii)  $LC_{50}$  (mediaan letale concentratie) is de statistisch vastgestelde concentratie van een stof, waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de gedurende een bepaalde tijd blootgestelde dieren, tijdens de blootstelling of binnen een bepaalde tijd na de blootstelling, de dood intreedt.  
De  $LC_{50}$ -waarde wordt uitgedrukt in het gewicht van de teststof per standaardvolume lucht (mg/l).
- iv) *Het niveau waarop geen toxische effecten optreden* is de hoogste dosis of het hoogste niveau van blootstelling tijdens een proef, waarbij nog geen waarneembare schadelijke effecten optreden.
- v) *Subacute/subchronische toxiciteit* omvat de schadelijke effecten die bij proefdieren optreden als gevolg van de dagelijks herhaalde toediening van of blootstelling aan een chemische stof gedurende een klein gedeelte van hun verwachte levensduur.
- vi) *De maximaal te verdragen dosis (MTD)* is het hoogste dosisniveau dat tekenen van toxiciteit tot gevolg heeft zonder dat dit belangrijke gevolgen heeft voor de overleving in de test waarin ze wordt gebruikt, bij voorbeeld in cancerogeniteitsstudies omwille van andere effecten dan tumoren.
- vii) *Huidirritatie* is het ontstaan van een reversibele ontstekingsreactie in de huid als gevolg van het toedienen van een teststof op de huid.
- viii) *Oogirritatie* is het ontstaan van reversibele veranderingen in het oog als gevolg van de toediening van een teststof op het oppervlak aan de buitenkant van het oog.
- ix) *Sensibilisering van de huid* (allergische contactdermatitis) is een via het immuunsysteem veroorzaakte reactie van de huid op een stof.

**C. EVALUATIE EN INTERPRETATIE**

Bij de evaluatie en interpretatie van de testresultaten moet er rekening mee worden gehouden dat de resultaten van dierproeven en in-vitro tests slechts in beperkte mate kunnen worden geëxtrapoleerd naar de mens.

Wanneer gegevens over de mens beschikbaar zijn, moet hieraan meer waarde worden gehecht voor de bepaling van de mogelijke effecten van chemische stoffen op de mens.

**MUTAGENITEIT (inclusief pre-screeningtest carcinogeniteit)**

Voor de voorlopige bepaling van de mutagene werking van een stof is het noodzakelijk gegevens te verkrijgen over twee categorieën van eindpunten namelijk genmutaties en chromosoomafwijkingen.

Deze twee eindpunten worden geëvalueerd aan de hand van de volgende proeven:

- i) tests voor genmutaties in prokaryotische cellen zoals *Salmonella typhimurium*; tests die gebruik maken van *Escherichia coli* zijn ook aanvaardbaar. Welke van deze twee testorganismen gekozen wordt, kan afhangen van de aard van de chemische stof die getest wordt;

- ii) tests voor chromosoomafwijkingen in de in-vitro gekweekte cellen van zoogdieren; een in-vivo test (de micronucleustest of het metafaseonderzoek van beenmergcellen) is eveneens aanvaardbaar.

#### D. LITERATUUR

Toxicologie is een zich snel ontwikkelende experimentele wetenschap waarover overvloedig literatuurgegevens ter beschikking zijn.

Relevante informatie kan worden gevonden in de „Test Guidelines” van de OESO.

#### Nadere opmerkingen

##### *Verzorging van de dieren*

Bij toxiciteitstests zijn een strenge controle van de leefomstandigheden en een goede verzorging van de dieren een eerste vereiste.

##### i) Huisvestingsomstandigheden

De leefomstandigheden in de kamers of ruimten waar de proefdieren zijn ondergebracht, moeten geschikt zijn voor het soort proefdier. Voor knaagdieren is een kamertemperatuur van 22 °C ( $\pm 3$  °C) en een relatieve vochtigheidsgraad van 30—70 % passend; voor konijnen en cavia's moet de temperatuur 20 °C ( $\pm 3$  °C) en de relatieve vochtigheidsgraad 30—70 % bedragen.

Sommige experimentele technieken zijn bijzonder gevoelig voor temperatuureffecten; in dergelijke gevallen wordt in de beschrijving van de onderzoeksmethode uitvoerig ingegaan op de in dat geval juiste omstandigheden. Bij ieder onderzoek naar toxische effecten moeten de temperatuur en de vochtigheidsgraad worden gecontroleerd, opgetekend en in het eindverslag over de studie worden opgenomen.

Bij gebruik van kunstlicht moet in normale gevallen een schema van twaalf uur licht — twaalf uur duisternis worden aangehouden. Nadere gegevens over de verlichting moeten worden opgetekend en in het eindverslag worden opgenomen.

Het is belangrijk om in verslagen over dierproeven steeds aan te geven welk soort kooien is gebruikt en hoeveel dieren tijdens de blootstelling aan de chemische stof en tijdens latere waarnemingsperiodes in iedere kooi waren gehuisvest.

##### ii) Voeding

Bij de samenstelling van het voedsel moet rekening worden gehouden met alle eisen die de aan de proef onderworpen diersoorten aan hun voeding stellen. Indien chemische stoffen worden toegediend aan de dieren via de voeding, kan de voedingswaarde door interactie tussen de stof en een bestanddeel van de voeding verminderd worden.

Bij het interpreteren van de resultaten dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid van dergelijke reacties.

Onzuiverheden in de voeding waarvan bekend is dat ze de toxiciteit beïnvloeden, mogen niet in interfererende concentraties voorkomen.

**B. 1. ACUTE ORALE TOXICITEIT****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode**

De teststof wordt oraal via een maagsonde in geleidelijk stijgende doseringen aan verscheidene groepen proefdieren toegediend. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Vervolgens worden de symptomen en sterfte waargenomen. Bij de dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proefnemingen nog leven, wordt necropsie verricht. Deze methode is in de eerste plaats gericht op studies met knaagdieren.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

Vóór het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Gezonde jonge volwassen dieren worden op een willekeurige manier vóór de behandeling in groepen ingedeeld.

Zo nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspenderd. Het verdient aanbeveling om zoveel mogelijk gebruik te maken van een oplossing in water. Als dit niet mogelijk is, kan achtereenvolgens plantaardige olie of een ander medium worden overwogen als oplosmiddel, of kan de stof gesuspenderd worden. Van niet-waterige media moeten de toxische eigenschappen bekend zijn; als dit niet het geval is, moeten deze eigenschappen vóór of gedurende de proefneming worden bepaald.

Bij knaagdieren mag het maximale volume dat voor de proef gebruikt wordt normaliter niet groter zijn dan 10 ml/kg lichaamsgewicht, behalve bij oplossingen in water waarvan het volume maximaal 20 ml/kg mag bedragen. De variabiliteit in het voor de proef gebruikte volume moet zo klein mogelijk worden gehouden door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus een constant volume wordt gewaarborgd.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Proefdieren**

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten.

De proef dient te worden uitgevoerd met een rattenstam die gewoonlijk in laboratoria wordt gebruikt. Voor ieder geslacht mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt, niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken.

#### 1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste tien knaagdieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger.

#### 1.6.2.3. Dosisniveaus

Bij de proeven moeten voldoende (ten minste drie) dosisniveaus worden toegepast die zodanig onderling verschillen dat proefgroepen worden verkregen met duidelijke verschillen in toxische effecten en sterftecijfers. De gegevens moeten voldoende zijn om een dosis/respons-curve te maken en om, indien mogelijk, op aanvaardbare wijze een  $LD_{50}$  te bepalen.

#### 1.6.2.4. Limiettest

Voor de meeste doeleinden kan een voldoende nauwkeurig beeld van de mogelijke acute orale toxiciteit van een teststof worden verkregen, indien er in een behandelde groep (vijf dieren per geslacht) binnen 14 dagen na de toediening van een dosis van 5 000 mg/kg geen sterfte wordt vastgesteld die met de teststof verband houdt.

#### 1.6.2.5. Observatieperiode

De observatieperiode moet ten minste 14 dagen bedragen. Deze duur van de observatie moet echter niet als een streng vastgelegde periode beschouwd worden, maar moet door de toxische reacties, het tijdstip waarop deze voor het eerst worden waargenomen en de duur van het herstel worden bepaald; de observatieperiode kan dus, indien noodzakelijk, worden verlengd. Van belang zijn het tijdstip waarop de intoxicatieverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen, het tijdstip waarop zij weer verdwijnen en het tijdstip waarop de dood intreedt, in het bijzonder wanneer de kans bestaat voor een uitgestelde dood.

#### 1.6.3. Uitvoering

Vóór de toediening van de teststof moet de dieren voedsel worden onthouden. Aan ratten wordt in de nacht vóór de dosering geen voedsel verstrekt; voor dieren met een snellere stofwisseling kan die periode worden verkort; de consumptie van water is niet aan beperkingen onderworpen. De volgende dag worden de dieren gewogen en dan wordt de teststof in één enkele dosis aan de dieren per groep via een maagsonde toegediend. Als het niet mogelijk is de teststof in één enkele dosis te geven, kan deze in kleinere porties worden verdeeld, waarbij niet meer dan 24 uur tussen de eerste en laatste toediening mag liggen. Na toediening van de teststof kunnen de dieren nog 3 tot 4 uur zonder voedsel worden gelaten. Als één dosis bij gedeelten over een bepaalde periode wordt toegediend, kan het nodig zijn om de dieren gedurende de doseringsperiode van voedsel en water te voorzien. Na de toediening worden systematisch waarnemingen gedaan en geregistreerd. Dit moet indien mogelijk voor ieder dier individueel worden gedaan. Tijdens de eerste dag moeten regelmatig waarnemingen worden verricht. Ten minste één keer per werkdag moet een zorgvuldig klinisch onderzoek worden verricht. De andere waarnemingen moeten iedere dag worden gedaan waarbij ervoor gezorgd moet worden dat er zo weinig mogelijk dieren voor het onderzoek verloren gaan, bij voorbeeld door necropsie of invriezen van dood aangetroffen dieren en afzondering of opoffering van zwakke of stervende dieren. Bij het observeren van de dieren in de kooien moet in ieder geval aandacht besteed worden aan veranderingen in huid en vacht, ogen, slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan de waarneming van tremor, convulsies, speekselvloed, diarree, lethargie, slaap en coma. Het tijdstip waarop de dood intreedt, moet zo nauwkeurig mogelijk worden geregistreerd.

Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die op het einde van de proefnemingen nog leven, wordt necropsie verricht. Alle macroscopisch waarneembare pathologische veranderingen worden geregistreerd. Als hiertoe aanleiding bestaat, worden weefselmonsters genomen voor histopathologisch onderzoek.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren intrad, het aantal dieren dat andere intoxicatieverschijnselen vertoont, een beschrijving van de toxische effecten en de bevindingen bij de necropsie. Het gewicht van ieder individueel dier wordt bepaald en genoteerd kort voordat teststof wordt toegediend, vervolgens één keer iedere week en ten slotte bij hun dood;

veranderingen in het gewicht worden berekend en geregistreerd, indien de dieren langer dan één dag in leven blijven. Door middel van een erkende methode kan de  $LD_{50}$  worden bepaald. Bij de evaluatie van de gegevens moet ook aandacht worden besteed aan het eventuele verband dat bestaat tussen de blootstelling van de dieren aan de teststof en het aantal en de ernst van alle voorkomende afwijkingen, waaronder gedrags- en klinische afwijkingen, macroscopisch waarneembare beschadigingen, veranderingen in het lichaamsgewicht, sterfte en eventuele andere toxicologische effecten.

### 3. **RAPPORTAGE**

#### 3.1. **Verslag van de proefnemingen**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden;
- dosisniveau (met het eventuele medium en de concentraties);
- tabellarische gegevens betreffende de effecten naar geslacht en dosisniveau (dat wil zeggen het aantal dieren dat tijdens de proef sterft, het aantal dat intoxicatieverschijnselen vertoont; het aantal blootgestelde dieren);
- het tijdstip na toediening van de teststof waarop de dood intreedt;
- waarnemingen gedaan bij de dieren tijdens hun verblijf in de kooien;
- de  $LD_{50}$  voor beide geslachten bepaald na 14 dagen (waarbij de berekeningsmethode dient te worden omschreven);
- 95 %-betrouwbaarheidsinterval voor de  $LD_{50}$ ;
- dosis/sterfte-curve met helling indien dit bij de gebruikte bepalingsmethode mogelijk is;
- bevindingen bij de necropsie;
- eventuele histopathologische bevindingen;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

#### 3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

### 4. **LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

**B. 2. ACUTE INHALATIETOXICITEIT****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode**

Verscheidene groepen proefdieren worden gedurende een vastgestelde periode aan geleidelijk stijgende concentraties van de teststof blootgesteld. Er wordt één concentratie per groep gebruikt. Vervolgens worden de symptomen en sterfte waargenomen. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het einde van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

Vóór het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Gezonde jonge dieren worden op een willekeurige manier vóór de behandeling in het vereiste aantal groepen ingedeeld. Het is niet nodig de dieren aan een gesimuleerde blootstelling te onderwerpen, tenzij dit wenselijk is bij het type expositieapparatuur dat wordt gebruikt. Waar nodig wordt een passend medium aan de teststof toegevoegd, ten einde de juiste concentratie van de proefstof in de atmosfeer te bereiken; in dat geval moet ook een mediumcontrole-groep worden toegevoegd. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet bekend zijn dat deze geen toxische effecten veroorzaken. In voorkomend geval kunnen bestaande gegevens worden gebruikt.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Proefdieren**

Tenzij er contra-indicaties bestaan, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. De proef dient te worden uitgevoerd met een rattenstam die gewoonlijk in laboratoria wordt gebruikt. Voor ieder geslacht mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken.

**1.6.2.2. Aantal en geslacht**

Voor ieder concentratieniveau moeten ten minste tien knaagdieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

**1.6.2.3. Blootstellingsconcentraties**

Bij de proeven moeten voldoende (ten minste drie) expositieconcentraties worden gebruikt die zodanig onderling verschillen dat proefgroepen worden verkregen met duidelijke verschillen in toxische effecten en sterftecijfers. De gegevens moeten voldoende zijn om een concentratie/respons-curve te verkrijgen en om, indien mogelijk, op aanvaardbare wijze een  $LC_{50}$  te bepalen.

**1.6.2.4. Limiettest**

Als binnen een periode van 14 dagen geen sterfte wordt veroorzaakt door de expositie gedurende 4 uur van vijf mannelijke en vijf vrouwelijke proefdieren aan 20 mg/l in de vorm van een gas of aan 5 mg/l in de vorm van een vloeistofaërosol of van een stoffaërosol, is het wellicht niet noodzakelijk verdere proeven te nemen. Indien de test echter bij voornoemde concentraties ten gevolge van de fysische of chemische eigenschappen van de teststof — waaronder ook de explosieve eigenschappen worden gerekend — niet kan worden uitgevoerd, moet in plaats van 20 mg/l respectievelijk 5 mg/l de maximaal mogelijke concentratie worden gebruikt.

**1.6.2.5. Blootstellingstijd**

De minimale blootstellingstijd bedraagt 4 uur.

**1.6.2.6. Apparatuur**

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld met behulp van inhalatieapparatuur die zodanig gehouden is dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste twaalf luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststoffen in de atmosfeer.

Als van een blootstellingskamer gebruik wordt gemaakt, moet deze op een zodanige wijze zijn ontworpen dat de dieren zo min mogelijk hoeven te dringen en zoveel mogelijk door inhalatie aan de teststof worden blootgesteld.

Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de blootstellingskamer geldt, dat het totale „volume” van de proefdieren niet meer mag bedragen dan 5 % van het volume van de blootstellingskamer. Naar keuze kan de oronasale methode worden toegepast, de kop alleen worden geëxposeerd of het gehele lichaam in een afzonderlijke ruimte worden blootgesteld; de eerste twee methoden zullen ertoe bijdragen dat zo min mogelijk van de teststof via andere wegen in het lichaam wordt opgenomen.

**1.6.2.7. Observatieperiode**

De observatieperiode moet ten minste 14 dagen bedragen. Deze duur van de observatie moet echter niet als een streng vastgelegde periode worden beschouwd, maar moet door de toxische reacties, het tijdstip waarop deze voor het eerst worden waargenomen en de duur van het herstel worden bepaald; de observatieperiode kan dus, indien noodzakelijk, worden verlengd. Van belang zijn het tijdstip waarop intoxicatieverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen, het tijdstip waarop zij weer verdwijnen en het tijdstip waarop de dood intreedt, in het bijzonder wanneer de kans bestaat voor een uitgestelde dood.

**1.6.3. Uitvoering**

Kort vóór de blootstelling worden de dieren gewogen en vervolgens ten minste 4 uur lang aan de testconcentratie blootgesteld in het daarvoor bestemde apparaat, na evenwichtsinstelling van de concentratie in de blootstellingskamer. De evenwichtsinstelling mag niet veel tijd in beslag nemen. Tijdens de proef dient de temperatuur op  $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  te worden gehouden. In het ideale geval moet de relatieve vochtigheid tussen 30 en 70 % worden gehouden, behalve waar dit niet goed uitvoerbaar is, (bij voorbeeld bij het testen van sommige aërosolen). Gedurende de blootstelling wordt de dieren voedsel en water onthouden. Er moet gebruik gemaakt worden van een dynamisch inhalatiesysteem met een geschikt systeem voor de analytische controle van de concentratie. Een verkennende test wordt aanbevolen om uit te maken welke blootstellingsconcentraties het meest geschikt zijn. Het systeem moet de waarborgen bieden dat de expositieomstandigheden bij de proef zo spoedig mogelijk stabiel zijn. Het aantal luchtverversingen per uur moet worden aangepast, zodat in de gehele blootstellingskamer homogene omstandigheden heersen.



De volgende parameters moeten worden gemeten of gecontroleerd:

- a) gedurende de gehele proef het aantal luchtverversingen per uur;
- b) de feitelijke concentratie van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren. Tijdens de blootstelling mag de concentratie niet meer dan  $\pm 15\%$  van het gemiddelde afwijken. Bij stoffaërosolen en sommige vloeistoffaërosolen is het mogelijk dat de concentratie niet binnen deze grenzen gehouden kan worden; in dat geval kan een grotere afwijking worden aanvaard. Voor stoffaërosolen en vloeistoffaërosolen moet zo dikwijls als noodzakelijk is (ten minste éénmaal) een analyse worden uitgevoerd om de verdeling van de deeltjesgrootte te bepalen;
- c) de temperatuur en de vochtigheid;
- d) tijdens en na de blootstelling worden waarnemingen gedaan die voor ieder individueel dier systematisch worden geregistreerd. Tijdens de eerste dag moeten frequent waarnemingen worden verricht. Ten minste één keer per werkdag moet een zorgvuldig klinisch onderzoek worden verricht. De andere waarnemingen moeten iedere dag worden gedaan waarbij erop moet worden toegezien dat er zo weinig mogelijk dieren voor het onderzoek verloren gaan, bij voorbeeld door necropsie of invriezing van dood aangetroffen dieren en afzondering of opoffering van zwakke of stervende dieren.

Bij het observeren van de dieren in de kooien moet in ieder geval aandacht worden besteed aan veranderingen in huid, vacht, ogen, slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteiten en gedrag. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan de waarneming van het ademhalingsgedrag, tremor, convulsies, speekselvloed, diarree, lethargie, slaap en coma. Het tijdstip waarop de dood intreedt, moet zo nauwkeurig mogelijk worden geregistreerd. Het gewicht van ieder individueel dier wordt éénmaal per week na de expositie bepaald en bij de dood van de dieren. Veranderingen in het gewicht worden berekend en geregistreerd, indien de dieren langer dan één dag in leven blijven.

Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht, waarbij vooral aandacht wordt besteed aan veranderingen in het bovenste en onderste gedeelte van de ademhalingswegen. Alle macroscopisch waarneembare pathologische veranderingen worden geregistreerd. Als hiertoe aanleiding bestaat, worden weefselmonsters genomen voor histopathologisch onderzoek.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: aantal dieren bij het begin van het onderzoek, tijdstip waarop de dood intreedt bij de individuele dieren, het aantal dieren dat andere toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de toxische effecten en de bevindingen bij de necropsie. Veranderingen in het gewicht worden berekend en geregistreerd indien de dieren langer dan één dag in leven blijven. Door middel van een erkende methode wordt de  $LC_{50}$  bepaald. Bij de evaluatie van de gegevens moet ook aandacht worden besteed aan het eventuele verband dat bestaat tussen de blootstelling van de dieren aan de teststof en het aantal en de ernst van alle voorkomende afwijkingen, waaronder gedrags- en klinische afwijkingen, macroscopisch waarneembare beschadigingen, veranderingen in het lichaamsgewicht, sterfte en eventuele andere toxicologische effecten.

## 3. IN HET VERSLAG OP TE NEMEN GEGEVENS

### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden:

Beschrijving van de expositieapparatuur met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het bereiden van stof- en vloeistoffaërosolen, methoden voor het conditioneren van de lucht, behandeling van de afgewerkte lucht en de wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht (als deze gebruikt is).

Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid, concentratie en deeltjesgrootte van de stoffaërosolen;

- gegevens betreffende de expositie:

Deze moeten tabellarisch worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bij voorbeeld standaardafwijking).

Zij dienen, indien mogelijk, te omvatten:

- a) het aantal luchtverversingen per uur van de inhalatieapparatuur,
- b) temperatuur en vochtigheid van de lucht,

- c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume),
  - d) aard van het eventuele medium,
  - e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren,
  - f) mediaan van de deeltjesgrootte,
  - g) duur van de evenwichtsinstelling,
  - h) duur van de expositie;
- tabellarische gegevens betreffende de effecten volgens geslacht en dosisniveau (dat wil zeggen het aantal dieren dat tijdens de proef sterft, het aantal dieren dat intoxicatieverschijnselen vertoont, het aantal blootgestelde dieren);
  - het tijdstip gedurende of na de blootstelling waarop de dood intreedt;
  - waarnemingen gedaan bij de dieren tijdens hun verblijf in de kooien;
  - de  $LC_{50}$  voor beide geslachten bepaald aan het eind van de observatieperiode (waarbij de berekeningsmethode dient te worden omschreven);
  - 95 %-betrouwbaarheidsinterval voor de  $LC_{50}$ ;
  - dosis/sterfte-curve met helling (indien dit bij de gebruikte bepalingsmethode mogelijk is);
  - bevindingen bij de necropsie;
  - eventuele histopatologische bevindingen;
  - bespreking van de resultaten,
  - interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

### 4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

**B. 3. ACUTE DERMALE TOXICITEIT****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode**

De teststof wordt in geleidelijk stijgende doseringen op de huid van verscheidene groepen proefdieren aangebracht. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Vervolgens worden de symptomen en sterfte waargenomen. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

Vóór het onderzoek worden de dieren in hun proefkooien ten minste 5 dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Gezonde jonge, volwassen dieren worden op een willekeurige manier vóór de behandeling in groepen ingedeeld. Ongeveer 24 uur vóór de proef wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren door knippen of scheren verwijderd; bij het knippen of scheren moet erop worden gelet dat de huid niet wordt geschaafd, omdat daardoor de doorlaatbaarheid van de huid zou kunnen veranderen. Ten minste 10 % van de lichaamsoppervlakte moet voor het aanbrengen van de teststof worden onthaard. Bij een proef met vaste stoffen, die eventueel tot poeder kunnen worden fijngemaakt, moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Als van een medium gebruik wordt gemaakt, moet rekening worden gehouden met de invloed hiervan op de mate waarin de huid de teststof doorlaat. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Proefdieren**

Er kan gebruik worden gemaakt van volwassen ratten of konijnen. Ook andere diersoorten kunnen worden gebruikt, maar de noodzakelijkheid hiervan moet worden gerechtvaardigd. De proef dient te worden uitgevoerd met de rattenstam die gewoonlijk in laboratoria wordt gebruikt. Per geslacht mag het gewicht van de voor de test gebruikte dieren niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken.

**1.6.2.2. Aantal en geslacht**

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) met een gezonde, gave huid worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. Bij konijnen kan het soms gerechtvaardigd zijn minder dieren te gebruiken.

**1.6.2.3. Dosisniveaus**

Bij de proeven moeten voldoende (ten minste drie) dosisniveaus worden toegepast die zodanig onderling verschillen dat proefgroepen worden verkregen met duidelijke verschillen in toxische effecten en sterftcijfers. Bij de vaststelling van de dosisniveaus moet rekening worden gehouden met alle mogelijke irriterende of corrosieve effecten. De gegevens moeten voldoende zijn om een dosis/respons-curve te maken en om, indien mogelijk, op aanvaardbare wijze een LD<sub>50</sub> te bepalen.

**1.6.2.4. Limiettest**

Indien een dosis van 2 000 mg/kg of meer, aangebracht op de gave huid van ten minste vijf dieren per geslacht bij een verkennende proef binnen 14 dagen geen sterfte veroorzaakt, die verband houdt met de toegediende stof, is het wellicht niet noodzakelijk om verdere proeven met andere dosisniveaus te ondernemen.

**1.6.2.5. Observatieperiode**

De observatieperiode moet ten minste 14 dagen bedragen. Deze duur van de observatie moet echter niet als een streng vastgelegde periode beschouwd worden, maar moet door de toxische reacties, het tijdstip waarop deze voor het eerst worden waargenomen en de duur van het herstel worden bepaald; de observatieperiode kan dus, indien noodzakelijk, worden verlengd. Van belang zijn het tijdstip waarop intoxicatieverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, hun duur en het tijdstip waarop de dood intreedt, in het bijzonder wanneer de kans bestaat voor een uitgestelde dood.

**1.6.3. Uitvoering**

Ieder dier moet afzonderlijk in een kooi worden gehuisvest. De teststof wordt gelijkmatig verdeeld over een oppervlak van ongeveer 10 % van de totale lichaamsoppervlakte. Bij zeer toxische stoffen mag het te behandelen oppervlak kleiner zijn, maar een zo groot mogelijke oppervlakte moet worden bedekt met een zo dun en zo gelijkmatig mogelijk aangebrachte laag.

De teststof moet gedurende de expositietijd van 24 uur door middel van poreus verbandgaas en niet-irriterend plakband in contact met de huid blijven. Het behandelde gedeelte van de huid moet op een geschikte wijze verder worden bedekt om het verbandgaas en de teststof op hun plaats te houden en om te verhinderen dat de dieren de teststof langs orale weg opnemen. Hulpmiddelen om de dieren te fixeren, kunnen worden gebruikt om te voorkomen dat de dieren de teststof via de mond opnemen, maar het wordt niet aangeraden de dieren volledig te immobiliseren.

Aan het eind van de expositieperiode wordt de resterende teststof — zo mogelijk met water — van de huid verwijderd of anders door middel van een andere geschikte reinigingstechniek.

De gedane waarnemingen moeten systematisch worden geregistreerd voor ieder individueel dier. Tijdens de eerste dag worden de dieren regelmatig geobserveerd. Ten minste één keer per werkdag moet een zorgvuldig klinisch onderzoek worden verricht. De andere waarnemingen moeten iedere dag worden verricht, waarbij erop moet worden toegezien dat er zo weinig mogelijk dieren voor het onderzoek verloren gaan, bij voorbeeld door necropsie of invriezing van dood aangetroffen dieren en afzondering of opoffering van zwakke of stervende dieren. Bij het observeren van de dieren in de kooien wordt aandacht besteed aan veranderingen in vacht, behandelde huid, ogen, slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan de waarneming van tremor, speekselvloed, diarree, lethargie, slaap en coma. Het tijdstip waarop de dood intreedt moet zo nauwkeurig mogelijk worden geregistreerd. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het einde van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht. Alle macroscopisch waarneembare pathologische veranderingen worden geregistreerd. Als hiertoe aanleiding bestaat, worden weefselmonsters genomen voor histopathologisch onderzoek.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het tijdstip waarop de dood intreedt bij de individuele dieren bij verschillende dosisniveaus, het aantal dieren dat andere intoxicatieverschijnselen vertoont, een beschrijving van de toxische effecten en de bevindingen bij de necropsie. Het gewicht van ieder individueel dier wordt bepaald kort voordat de teststof wordt aangebracht, en vervolgens één keer iedere week en ten slotte bij zijn dood; veranderingen in het gewicht worden berekend en geregistreerd, indien de dieren langer dan één dag in leven blijven. Door middel van een erkende methode moet de  $LD_{50}$  worden bepaald. Bij de evaluatie van de gegevens moet ook aandacht worden besteed aan het eventuele verband dat bestaat tussen de blootstelling van de dieren aan de teststof en het aantal en de ernst van alle voorkomende afwijkingen, waaronder gedrags- en klinische afwijkingen, macroscopisch waarneembare beschadigingen, veranderingen in het lichaamsgewicht, sterfte en eventuele andere toxicologische effecten.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden (met vermelding van de wijze waarop de huid is schoongemaakt);
- dosisniveaus (met het eventuele medium en de concentraties);
- tabellarische gegevens betreffende de effecten volgens geslacht en dosisniveau (dat wil zeggen het aantal dieren dat tijdens de proef sterft, het aantal dieren dat intoxicatieverschijnselen vertoont, het aantal blootgestelde dieren);
- het tijdstip na aanbrenge van de teststof waarop de dood intreedt;
- waarnemingen gedaan bij de dieren tijdens hun verblijf in de kooien;
- de  $LD_{50}$  voor beide geslachten bepaald na 14 dagen, met beschrijving van de berekeningsmethode;
- 95 %-betrouwbaarheidsinterval voor de  $LD_{50}$  (indien mogelijk);
- dosis/sterfte-curve met helling indien dit bij de gebruikte bepalingsmethode mogelijk is;
- bevindingen bij de necropsie;
- eventuele histopathologische bevindingen;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

## 4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

**B. 4. ACUTE TOXICITEIT — HUIDIRRITATIE****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode**

De teststof wordt in één enkele dosis op de huid van verschillende proefdieren aangebracht. Ieder dier wordt als eigen controle gebruikt. De graad van irritatie wordt na een bepaald tijdsverloop afgelezen en geregistreerd en wordt uitvoeriger beschreven om een volledige evaluatie van de effecten mogelijk te maken. De duur van de waarnemingen moet voldoende zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de waargenomen effecten ten volle te kunnen beoordelen.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

Ongeveer 24 uur vóór de proef wordt het haar van het ruggedeelte van de romp van de dieren door knippen of scheren verwijderd.

Bij het knippen of scheren van het haar moet erop worden gelet dat de huid niet wordt geschaafd. Er mogen alleen dieren worden gebruikt met een gezonde en gave huid.

Bij een proef met vaste stoffen (die eventueel tot poeder kunnen worden fijngemaakt) moet de teststof met voldoende water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact komt met de huid. Als van een medium gebruik wordt gemaakt, moet rekening worden gehouden met de invloed hiervan op de irritatie van de huid door de teststof. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt.

Teststoffen die sterk zuur of alkalisch reageren moeten niet worden getest voor primaire huidirritatie, gezien hun voorspelbare corrosieve eigenschappen. Het is niet nodig stoffen te testen waarvan reeds is vastgesteld dat zij zeer toxisch werken langs dermale weg.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Proefdieren**

Hoewel er diverse soorten zoogdieren gebruikt kunnen worden, is het albinokonijn de soort die de voorkeur heeft.

**1.6.2.2. Aantal dieren**

Ten minste drie gezonde volwassen dieren worden gebruikt. Het aantal proefdieren kan worden opgevoerd in geval van moeilijk te interpreteren resultaten.

**1.6.2.3. Dosisniveau**

Tenzij er contra-indicaties bestaan, wordt een dosis van 0,5 ml vloeistof of 0,5 g vaste of semi-vaste stof op het testgedeelte van de huid aangebracht. Afzonderlijke dieren zijn niet nodig voor de samenstelling van de controlegroep. De onbehandelde huid dient als controle voor de test.

**1.6.2.4. Observatieperiode**

De duur van de waarneming moet niet als een streng vastgelegde periode worden beschouwd, maar moet lang genoeg zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de geobserveerde effecten ten volle te kunnen beoordelen. De observatieperiode hoeft in de regel echter niet langer te duren dan 14 dagen vanaf de datum van de applicatie.

**1.6.3. Uitvoering**

De dieren moeten afzonderlijk in kooien worden gehuisvest.

De teststof wordt aangebracht op een klein huidoppervlak (circa 6 cm<sup>2</sup>) en de plek wordt met gaas dat met behulp van niet-irriterend plakband op zijn plaats wordt gehouden bedekt. Bij gebruik van vloeistof of vloeibare pasta kan het nodig zijn de vloeistof eerst op het gaas aan te brengen en het gaas daarna op de huid te leggen. Het gaas moet voor de duur van de expositie in aanraking met de huid blijven door middel van een geschikt half-afsluitend verband. In sommige gevallen kan het aangewezen zijn een volledig afsluitend verband te gebruiken. Er moet tevens voor worden gezorgd dat het dier niet in contact komt met het verband om opname van de teststoffen via de mond of door inhalatie te voorkomen.

De expositie duurt 4 uur. Indien vermoed wordt dat de stof een ernstige huidreactie kan veroorzaken (bij voorbeeld als deze corrosief is) moet de expositieduur beperkt worden (bij voorbeeld tot 1 uur of 3 minuten). Indien bij expositie gedurende minder dan 4 uur een ernstige reactie van de huid wordt waargenomen, is het niet nodig de test te herhalen met een expositieduur van 4 uur. Onder bepaalde omstandigheden, bij voorbeeld gezien het verwachte toepassings- en blootstellingspatroon van de mens, kan het nuttig zijn de blootstelling te verlengen. Aan het einde van de blootstellingsperiode moet de resterende teststof worden verwijderd, zo mogelijk met water of met een geschikt oplosmiddel zonder het bestaande effect of de toestand van de huid te wijzigen.

**1.6.3.1. Observatie en scoring**

De dieren moeten worden onderzocht op tekenen van erytheem en oedeem en de reacties moeten 30-60 minuten en vervolgens 24, 48 en 72 uur na de verwijdering van het verband worden genoteerd. De huidirritatie moet worden geëvalueerd en geregistreerd volgens de in de tabel opgenomen schaal. Het is ook mogelijk dat er nog nadere waarnemingen moeten worden verricht om het reversibele of irreversibele karakter vast te stellen. Behalve de waarneming van irritatie moeten eventuele ernstige beschadigingen zoals corrosie (onomkeerbare vernietiging van huidweefsel) en andere toxische effecten volledig worden beschreven.

**2. GEGEVENS**

De volgende gegevens moeten voor ieder dier afzonderlijk in tabellen worden samengevat: irritatiescores voor erytheem en oedeem in de loop van de observatieperiode, ernstige beschadigingen, graad en aard van de irritatie, het reversibele of irreversibele karakter van de letsels of corrosie, en alle andere waargenomen toxische effecten moeten worden beschreven.

3. **RAPPORTAGE**3.1. **Verslag van de proefnemingen**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden (inclusief de belangrijkste fysisch-chemische eigenschappen van de gebruikte stof en de toegepaste techniek voor de ontharing en reiniging van de huid);
- tabellarische rangschikking van de gegevens betreffende de irritatiereactie voor ieder afzonderlijk dier en voor iedere observatietijd (1, 24, 48, 72 uur, enzovoort, na verwijdering van het gaas);
- beschrijving van eventueel waargenomen ernstige letsels waaronder corrosie;
- uitvoerige beschrijving van de graad en de aard van de waargenomen irritatie en van alle histopathologische bevindingen;
- beschrijving van eventuele toxische effecten, andere dan huidirritatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

4. **LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

---

*Aanhangsel*

**TABEL: HUIDREACTIESCHAAL**

**Vorming van erytheem en eschara**

	Score
Geen erytheem	0
Zeer licht erytheem (nauwelijks zichtbaar)	1
Duidelijk begrensd erytheem	2
Matig tot ernstig erytheem	3
Ernstig erytheem (diepe roodheid) tot lichte escharavorming (wonden in de diepte)	4

**Oedeemvorming**

Geen oedeem	0
Zeer licht oedeem (nauwelijks zichtbaar)	1
Licht oedeem (de randen van de zwelling zijn goed te onderscheiden door een duidelijke verhoging)	2
Matig oedeem (de randen zijn ongeveer 1 mm verhoogd)	3
Ernstig oedeem (de zwelling is meer dan 1 mm hoog en strekt zich uit tot buiten het behandelde gebied)	4

---



**B. 5. ACUTE TOXICITEIT — IRRITATIE VAN HET OOG****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de onderzoekmethode**

De teststof wordt in één enkele dosis in één van de ogen van ieder van de verschillende proefdieren aangebracht; het onbehandelde oog dient als controle. De graad van irritatie wordt op bepaalde tijdstippen beoordeeld en genoteerd en wordt uitvoeriger beschreven om een volledige evaluatie van de effecten mogelijk te maken. De duur van de waarnemingen moet voldoende lang zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de waargenomen effecten ten volle te kunnen beoordelen.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

Beide ogen van ieder voorlopig voor de test geselecteerd proefdier moeten in de loop van de 24 uur vóór het begin van de test worden onderzocht. Dieren die lijden aan oogirritatie, oogaandoeningen of een reeds bestaand hoornvliesletsel, mogen niet worden gebruikt.

Sterk zuur of alkalisch reagerende teststoffen en stoffen waarvan het uitgesproken corrosieve karakter in een onderzoek naar de huidirritatie of in andere tests werd aangetoond, behoeven niet meer op oogirritatie te worden getest.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Proefdieren**

Hoewel er diverse soorten proefdieren voor deze test gebruikt worden, wordt aanbevolen om bij de tests gebruik te maken van gezonde volwassen albinokonijnen.

**1.6.2.2. Aantal proefdieren**

Ten minste drie dieren moeten worden gebruikt. Het aantal proefdieren kan worden opgevoerd in geval van moeilijk te interpreteren resultaten.

**1.6.2.3. Dosisniveau**

Bij vloeistoffen wordt een dosis van 0,1 ml gebruikt. Bij vaste stoffen, pasta's en uit deeltjes samengestelde stoffen moet een volume van 0,1 ml of een gewicht van circa 0,1 g worden gebruikt (het gewicht moet altijd worden geregistreerd). Indien de teststof bestaat uit een vaste of korrelige stof, moet deze worden fijngemalen. Het volume van de deeltjes moet worden gemeten na deze eerst zacht te hebben samengepakt, bij voorbeeld door het tikken met de maathouder.

**1.6.2.4. Observatieperiode**

De duur van de waarneming moet niet als een streng vastgelegde periode worden beschouwd. Ze moet echter voldoende lang zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de waargenomen effecten te kunnen beoordelen, maar in de regel niet langer dan 21 dagen vanaf de toediening van de teststof.

**1.6.3. Uitvoering**

De dieren moeten afzonderlijk in kooien worden gehuisvest. Bij elk van de dieren wordt de teststof druppelsgewijs aangebracht in de bindvlieszak van één oog, waarbij het onderste ooglid voorzichtig van de oogbol wordt weggetrokken. De oogleden worden dan ongeveer één seconde zachtjes dichtgehouden om verlies te voorkomen. Het andere oog, dat onbehandeld blijft, dient als controle.

De ogen van de proefdieren mogen gedurende 24 uur na de toediening van de teststof niet worden uitgewassen. Na verloop van 24 uur kan dit zo nodig wel gebeuren.

Als uit de test blijkt dat sommige stoffen irriterend zijn, kan de doeltreffendheid van oogspoelingen worden onderzocht als middel om de irriterende of andere schadelijke effecten te verminderen. In deze gevallen wordt het gebruik van zes konijnen aanbevolen. Vier seconden na de toediening van de teststof worden de ogen van drie konijnen uitgewassen en 30 seconden na de toediening worden de ogen van de drie andere konijnen uitgewassen. Bij beide groepen worden de ogen 5 minuten lang gewassen, waarbij het volume en de stroomsnelheid geen letsels mogen veroorzaken.

**1.6.3.1. Observatie en scoring**

De ogen moeten worden onderzocht na 1, 24, 48 en 72 uur. Als er na 72 uur geen irritatieverschijnselen zijn, kan het onderzoek worden beëindigd.

Verlenging van de observatieperiode kan nodig zijn in geval van een blijvende aandoening van het hoornvlies of andere oogirritaties, ten einde te bepalen of deze beschadigingen erger worden en het reversibele of irreversibele karakter. Behalve de observatie van het hoornvlies, de iris en de bindvliezen, moeten eventuele andere letsels die worden opgemerkt ook worden opgetekend en in het verslag worden vermeld. Bij ieder onderzoek moeten de oogreacties (tabel) worden beoordeeld en opgetekend. (De scoring van de oogreacties is voor verschillende interpretaties vatbaar. Ten behoeve van de laboratoria waar de proeven worden uitgevoerd en van degenen die de waarnemingen doen en interpreteren, kan een geïllustreerde handleiding over oogirritaties gebruikt worden.)

Het onderzoek van de reacties kan worden vergemakkelijkt met behulp van een binoculaire loep, een hand-spleetlamp, een biomicroscop of andere geschikte instrumenten. Nadat de waarnemingen na 24 uur zijn geregistreerd, kunnen de ogen van sommige of alle konijnen verder worden onderzocht met behulp van fluoresceïne.

**2. GEGEVENS**

Voor ieder dier afzonderlijk moeten de irritatie-scores op de vastgestelde observatietijdstippen in tabellen worden samengevat. Een beschrijving van de graad en aard van de irritatie, aanwezigheid van ernstige beschadigingen en optreden van effecten aan andere lichaamsdelen dan de ogen moeten in het rapport worden vermeld.

**3. IN HET VERSLAG OP TE NEMEN GEGEVENS****3.1. Verslag van de proefnemingen**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden (inclusief de van belang zijnde fysisch-chemische eigenschappen van de teststof);
- tabel van irritatie/corrosiereactie van elk afzonderlijk dier op de verschillende observatietijdstippen (bij voorbeeld 1, 24, 48 en 72 uur);
- beschrijving van eventueel waargenomen ernstige beschadigingen;
- uitvoerige beschrijving van de graad en aard van de waargenomen irritatie of corrosie, met inbegrip van het reversibele of irreversibele karakter;
- beschrijving van de toegepaste methode voor het vaststellen van de irritatie na 1, 24, 48 en 72 uur (bij voorbeeld hand-spleetlamp, biomicroscop, fluoresceïne);
- omschrijving van eventueel geconstateerde plaatselijke beschadigingen aan andere lichaamsdelen dan de ogen;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

**3.2. Evaluatie en interpretatie**

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

**4. LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

*Aanhangsel*

## TABEL: OOGIRRITATIESCHAAL

**Hoornvlies**

*Opaciteit: graad van optische dichtheid* (het gebied met de grootste dichtheid wordt beoordeeld)

Geen verzwering of opaciteit	0
Verspreide of diffuse opake gebieden (andere dan een lichte vertroebeling van de normale glans), de details van het regenboogvlies zijn nog duidelijk zichtbaar	1
Duidelijk te onderscheiden opaak gebied, de details van het regenboogvlies zijn iets vervaagd	2
Parelmoerkleurige gebieden, details van het regenboogvlies niet meer zichtbaar, de omvang van de pupil is nog nauwelijks te onderscheiden	3
Volledig opaak hoornvlies, het regenboogvlies is niet meer te onderscheiden	4

**Iris**

Normaal	0
Duidelijk verdiepte rugae, congestie, zwelling, matige circumcorneale hyperemie rondom het hoornvlies of injectie, één van deze verschijnselen of een combinatie ervan, waarbij de iris nog op licht reageert (een trage reactie is positief)	1
Geen reactie op licht, bloeding, verregaande weefselverniëting (één of meerdere van deze verschijnselen)	2

**Bindvlies**

*Roodheid (het bindvlies van de oogleden en oogbal, hoornvlies en regenboogvlies)*

Bloedvaten normaal	0
Duidelijke hyperemie van sommige bloedvaten (geïnjecteerd)	1
Diffuse karmozijnrode verkleuring, afzonderlijke bloedvaten zijn niet gemakkelijk te onderscheiden	2
Diffuus vleeskleurig rood	3
<i>Chemosis: oogleden en/of derde ooglid (membrana nictitans)</i>	
Geen zwelling	0
Zwelling, iets meer dan normaal (met inbegrip van derde ooglid)	1
Duidelijke zwelling met gedeeltelijk uitpuilende oogleden	2
Zwelling met de oogleden ongeveer halfgesloten	3
Zwelling met oogleden voor meer dan de helft gesloten	4

**B. 6. ACUTE TOXICITEIT — SENSIBILISERING VAN DE HUID****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode/Guinea Pig Maximisation Test**

Na de eerste blootstelling aan een teststof (de „inductieperiode”) ondergaan de dieren twee weken na de laatste inductie een „toetsingsblootstelling” aan de teststof om vast te stellen of een overgevoeligheid is geïnduceerd. De overgevoeligheid wordt bepaald door het onderzoeken van de reactie van de huid bij de toetsingstest.

**1.5. Kwaliteiscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren (tot één jaar) op willekeurige wijze bij de behandelde en de controlegroepen ingedeeld. Voor de dosering wordt de schouder door knippen of scheren onthaard. Hierbij moet erop worden gelet dat de huid niet wordt beschadigd.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Proefdieren**

De albinocavia wordt gebruikt.

**1.6.2.2. Aantal en geslacht**

Er kan gebruik worden gemaakt van mannelijke en/of vrouwelijke dieren. Vrouwelijke dieren moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

Er worden twintig dieren gebruikt voor de behandelde groep en ten minste tien voor de controlegroep. Het gebruik van een kleiner aantal dieren moet worden gerechtvaardigd.

### 1.6.2.3. Dosisniveaus

De concentratie van de teststof wordt aangepast aan het hoogste niveau dat in iedere fase van de inductie goed kan worden verdragen.

De toetsingsconcentratie mag bij niet-gesensibiliseerde dieren niet leiden tot huidirritatie. Deze concentratie kan worden vastgesteld door een verkennende proef uit te voeren op kleine schaal (twee of drie dieren).

### 1.6.2.4. Observatieperiode

Gedurende de inductieperiode wordt de huid geobserveerd om eventuele irritatie-effecten te ontdekken. Na de toetsingsexpositie wordt de reactie van de huid na 48 en na 72 uur geregistreerd.

### 1.6.3. Uitvoering

De dieren worden gewogen voor het begin van de inductieperiode en bij het einde van de test. De schouder wordt onthaard. De procedure bestaat uit twee fasen:

#### 1.6.3.1. Inductie

Dag 0 — Behandelde groep

In de schouderstreek worden de volgende intradermale injecties in tweevoud, steeds één aan iedere zijde, gegeven:

- 1) 0,1 ml Freund's Compleet Adjuvans (FCA);
- 2) 0,1 ml teststof, zo nodig in een medium;
- 3) 0,1 ml teststof in FCA.

De injecties 1) en 2) worden dicht bij elkaar en het dichtst bij het hoofd gegeven en 3) aan de staartzijde van het testgebied.

Dag 0 — Controlegroep

Er worden steeds twee intradermale injecties op dezelfde plaatsen als hierboven is beschreven gegeven met onderstaande stoffen:

- 1) 0,1 ml FCA;
- 2) 0,1 ml medium;
- 3) 0,1 ml medium in FCA.

Dag 7 — Behandelde groep

Het testgebied wordt opnieuw onthaard. De teststof wordt in een geschikt medium (vloeistoffen kunnen eventueel direct worden aangebracht) over een filtreerpapier verspreid en op het testgebied aangebracht waarmee het, met behulp van een goed verband, 48 uur in contact moet blijven.

Dag 7 — Controlegroep

Het testgebied wordt opnieuw onthaard. Alleen het medium wordt op soortgelijke wijze op het testgebied aangebracht waarmee het met een goed verband 48 uur in contact moet blijven.

#### 1.6.3.2. Toetsing

Dag 21

Beide zijden van de dieren in de behandelde en in de controlegroep worden onthaard. Op de linkerkant van de behandelde dieren wordt een gaas of een houder met de teststof aangebracht en op de rechterkant een gaas of een houder met alleen het medium.

Door middel van een geschikt verband wordt ervoor gezorgd dat het gaas 24 uur met de huid in contact blijft.

De controlegroep wordt op identieke wijze blootgesteld.

Dag 23 en 24

- 21 uur na het verwijderen van het gaas wordt het gebied waar de toetsing plaatsvond, schoongemaakt en zonodig geschoren;
- 3 uur later (48 uur na het begin van de toetsing) wordt de reactie van de huid geobserveerd en geregistreerd;
- 24 uur later (72 uur na het begin) wordt de huid voor de tweede maal geobserveerd en worden de resultaten geregistreerd.

Om de tijdens de eerste toetsing verkregen resultaten te bevestigen kan overwogen worden om ongeveer een week later een tweede toetsing, zo nodig met een nieuwe controlegroep voor het medium, uit te voeren.

#### 1.6.3.3. Observatie en scoring

Alle reacties van de huid en alle ongewone bevindingen als gevolg van de inductie en toetsing moeten worden geregistreerd en gerapporteerd.

## 2. GEGEVENS

De gegevens moeten, indien mogelijk, in tabelvorm worden samengevat met voor ieder dier de reacties van de huid bij iedere waarneming.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

- gebruikte caviastam;
- proefomstandigheden;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- gewicht van ieder dier afzonderlijk bij het begin en aan het eind van het onderzoek;
- iedere waarneming op ieder dier afzonderlijk, en indien hiervan gebruik is gemaakt, ook het score-systeem;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

## 4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

### *Opmerkingen*

De maximisatietest met cavia's (GPMT) is een algemeen toegepaste test van het type waarbij een adjuvans gebruikt wordt. Andere methoden die opgenomen zijn in de bijgevoegde tabel kunnen eveneens gebruikt worden om het sensibiliserend vermogen van een stof op de huid aan te tonen.

De maximisatietest wordt als de voorkeurs-(referentie-)methode beschouwd.

De gevoeligheid van deze test en het vermogen stoffen op te sporen die de menselijke huid kunnen sensibiliseren, worden belangrijk geacht in een systeem voor de classificatie van toxische stoffen ten behoeve van de volksgezondheid. Bij de keuze van een alternatieve test moeten criteria worden aangelegd die de deugdelijkheid ervan waarborgen. Hiertoe behoort een verwachte reactie op standaard-allergenen als 2,4-dinitrochlorobenzeen of p-fenyleendiamine of een andere krachtige sensibiliserende stof die behoort tot de chemische klasse van de stof die wordt getest.

Er bestaat geen enkele testmethode waarmee alle stoffen die de menselijke huid kunnen sensibiliseren adequaat kunnen worden geïdentificeerd en die voor alle stoffen van toepassing is.

Factoren als de fysische kenmerken van een stof, zoals het vermogen om door de huid heen te dringen en de wijze waarop mensen die waarschijnlijk aan de stof worden blootgesteld, ermee in contact komen, moeten bij de keuze van een test in aanmerking worden genomen. Tests waarbij gebruik gemaakt wordt van cavia's kunnen worden onderverdeeld in een type waarin gebruik gemaakt wordt van een adjuvans, waarbij een allergie mogelijk wordt gemaakt door het oplossen of suspenderen van de teststof in Freund's Compleet Adjuvans (FCA), en een type waarin geen adjuvans wordt gebruikt. In bepaalde gevallen kunnen er goede redenen zijn een test te kiezen waarbij de toediening uitwendig plaatsvindt en niet door middel van een intradermale injectie, zoals bij de maximisatieproef voor cavia's. Ook hier spelen de fysische kenmerken van de teststof en de omstandigheden, waaronder de mensen waarschijnlijk aan de stof worden blootgesteld, een rol.

Ongeacht de gebruikte methode, moet de gevoeligheid van de caviastam die gebruikt wordt voor het testen van de sensibilisering van de huid met regelmatige tussenpozen (om de 6 maanden) worden gecontroleerd met behulp van bekende sterk en middelmatig sensibiliserende stoffen; hierbij moet een voldoende aantal positieve reacties worden verkregen.



Tabel

Proef	Draize	Freunds Compleet Adjuvans (FCA)	Maur optimalisering	Buehler	Open epidermale proef	Split adjuvans
Diersoort	cavia	cavia	cavia	cavia	cavia	cavia
Toedieningswijze	intradermaal (id)	intradermaal (id)	intradermaal (id)	epicutaan (ec)	epicutaan (ec)	id en ec
Aantal dieren per testgroep	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
Aantal testgroepen	1	1	1	1	1 tot 6	1
Aantal dieren per controlegroep	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
Toedieningswijze van de inductie	id	id	id	dermaal	dermaal	id en dermaal
Aantal exposities	10	5	9	3	20 of 21	4
Blootstellingsduur	—	—	24 uur	6 uur per keer	continu	48 uur per keer
Soort kompres	—	—	—	gesloten	open	gesloten
Testgroep(en)	TS <sup>(1)</sup>	TS in FCA	TS in FCA	TS	TS	TS
Controlegroep	—	alleen FCA	—	—	alleen medium	—
Plaats	linkerzijde	rechterzijde	rug	linkerzijde	rechterzijde	schouder
Frequentie	om de dag	om de dag	om de dag	iedere 7 dagen	dagelijks	0, 2, 4, 7 dagen
Duur	0—18 dagen	0—8 dagen	0—21 dagen	0—14 dagen	0—20 dagen	0—7 dagen
Concentratie	2—10-maal zoveel als de eerste	steeds dezelfde	0,1 ml van 0,1 %	steeds dezelfde	dezelfde in de groep, verschil- lende per groep	steeds dezelfde
Toetsing						
Toedieningswijze	id	dermaal	id	dermaal	dermaal	dermaal
Aantal blootstellingen	1	2	2	1	2	1
Dagen	35	22 en 35	14 en 28	28	21 en 35	20
Blootstellingsperiode	—	—	24 uur	6 uur	—	24 uur
Soort verbandgaas	—	open	—	gesloten	open	gesloten
Testgroep(en)	TS	TS	TS	TS	TS	TS
Controlegroep	TS	TS	TS	TS	TS	TS
Plaats	rechterzijde	linkerzijde	rug, andere plaats	rechterzijde	linkerzijde	schouder
Concentratie	dezelfde als de eerste	4 verschillende	0,1 ml van 0,1 %	dezelfde als bij de inductie	4 verschillende	de helft van de inductieconcentratie
Evaluatie (uren na de toetsing)	24, 48	24, 48, 72	24	24, 48	24, 48 en/of 72	24, 48

<sup>(1)</sup> TS = teststof.

**B. 7. SUBACUTE ORALE TOXICITEIT****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode**

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks in geleidelijk stijgende doseringen aan verscheidene groepen proefdieren toegediend. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proef leven, wordt necropsie verricht.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

Vóór het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Gezonde jonge dieren worden op willekeurige wijze vóór de behandeling in groepen ingedeeld. De teststoffen kunnen met de voeding, via een maagsonde, in capsules of met het drinkwater worden toegediend. De teststof moet bij alle dieren gedurende de volledige proefperiode op dezelfde manier worden toegediend. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet bekend zijn dat deze geen toxische effecten veroorzaken. In voorkomend geval kunnen bestaande gegevens worden gebruikt.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Proefdieren**

Tenzij er contra-indicaties bestaan, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Er dient gebruik te worden gemaakt van rattenstammen van jonge gezonde dieren, die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. In het ideale geval moet met de dosering worden begonnen vóór de ratten 6 weken oud zijn. Zij mogen in ieder geval niet ouder zijn dan 8 weken. Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt, niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddeld gewicht afwijken.

#### 1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal dieren worden verhoogd met het aantal dat vóór de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan nog een satellietgroep van tien dieren (vijf dieren per geslacht) gedurende 28 dagen worden behandeld met het hoge dosisniveau, waarna zij nog gedurende 14 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of pas later tot uiting komen.

#### 1.6.2.3. Dosisniveaus

Ten minste drie dosisniveaus en een controle zijn vereist. Afgezien van de toediening van de teststof moeten de dieren van de controlegroep op dezelfde wijze als de dieren van de testgroep worden behandeld. Indien een medium wordt gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet het medium aan de dieren van de controlegroep op dezelfde wijze worden toegediend als aan die van de testgroepen en de dosis die van het medium wordt toegediend moet even groot zijn als de dosis die de dieren in de groep met het hoogste dosisniveau ontvangen. Het hoogste dosisniveau van de teststof moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Indien het blootstellingsniveau van de mens kan worden geschat, moet het laagste niveau deze overschrijden. In het ideale geval treden bij het middelste dosisniveau minimaal waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussendosis moet het verschil tussen de dosisniveaus zó groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen.

In de groep met de laagste dosis, in de tussengroep en in de controlegroep mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (ppm of mg/kg) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Indien de stof via een maagsonde wordt toegediend, moeten de doses op vaste tijdstippen worden gegeven. De dosisniveaus moeten geregeld worden aangepast (wekelijks of om de 14 dagen) om een constant dosering te verkrijgen als functie van het lichaamsgewicht van het dier.

#### 1.6.2.4. Limiettest

Indien bij een onderzoek van 28 dagen, verricht volgens onderstaande methode bij een dosisniveau van 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag, of een hoger niveau dat verband houdt met het niveau waaraan de mens, voor zover bekend, kan worden blootgesteld, geen toxische effecten optreden, is het wellicht niet noodzakelijk om verdere proeven te ondernemen. Bij stoffen met lage toxiciteit moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden en andere eigenschappen van de teststof bij toediening met de voeding de normale voedingsvereisten niet aantasten.

#### 1.6.2.5. Observatieperiode

De proefdieren moeten dagelijks worden geobserveerd. Tekenen van toxiciteit moeten met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden en de mate en duur ervan worden genoteerd. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop de intoxicatieverschijnselen zich voor het eerst voordoen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten eveneens worden genoteerd.

#### 1.6.3. Uitvoering

De dieren krijgen in het ideale geval gedurende een periode van 28 dagen, 7 dagen per week, een dosis van de teststof toegediend. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 14 dagen zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen.

Bij het observeren van de dieren in de kooien moet aandacht worden besteed aan veranderingen in huid, vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Wekelijks moet het voerverbruik (en het waterverbruik indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend) worden gemeten en moeten de dieren worden gewogen.

De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of omdat de dieren in verkeerde kooien zijn geplaatst. Na afloop van de onderzoeksperiode wordt bij alle overlevende dieren van de behandelde groepen (afgezien van de dieren in de satellietgroep) necropsie verricht. Indien stervende dieren worden opgemerkt, moeten zij worden verwijderd; op hen wordt eveneens necropsie verricht.

Na afloop van de proeven moeten bij alle dieren met inbegrip van die uit de controlegroepen de volgende onderzoeken worden verricht:

- 1) hematologie, waarbij tenminste bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totaal telling en gedifferentieerde telling van de leucocyten en meting van stollingseigenschappen;
- 2) klinisch-biochemische bepalingen in het bloed waarbij ten minste één parameter van de leverfunctie en nierfunctie: serumalanineaminotransferase (vroegere benaming: serum glutaminezuur-pyrodruivenzuur-transaminase), serumaspartaataminotransferase (vroegere benaming: serum glutaminezuur-oxaalazijnzuur-transaminase), ureum-stikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumeiwit.

Voor een goede toxicologische evaluatie kan het nodig zijn het onderzoek uit te breiden met: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, glucosegehalte bij nuchtere toestand, analyse van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine, en cholinesteraseactiviteit.

Zo nodig kan verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden.

#### 1.6.3.1. Macroscopische necropsie

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd. De lever, de nieren, de bijnieren en de testes moeten zo spoedig mogelijk na sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. Organen en weefsels (lever, nieren, milt, bijnieren en hart, en organen die grote beschadigingen of veranderingen in grootte vertonen) moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek.

#### 1.6.3.2. Histopathologisch onderzoek

Bij de dieren in de groep die een hoge dosis hebben ontvangen en bij de dieren in de controlegroep moet histopathologisch onderzoek worden verricht op de bewaarde organen en weefsels.

Organen en weefsels die door de teststof bij het hoogste dosisniveau blijken te zijn beschadigd, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht. Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroep moet speciaal worden gelet op de organen en weefsels waar, bij de andere behandelde groepen, effecten blijken te zijn opgetreden.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, en het aantal dieren dat ieder type beschadiging vertoont.

Alle waargenomen resultaten moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Dit geldt zowel voor kwantitatieve resultaten als voor de incidentie van kwalitatieve resultaten. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

**3. RAPPORTAGE****3.1. Verslag van de proefnemingen**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden;
- dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;
- gegevens over de toxische reacties naar geslacht en dosis;
- waar mogelijk het dosisniveau waarbij geen effect optreedt;
- tijdstip gedurende studie waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het eind van de proef bleven leven;
- toxische of andere effecten;
- tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en het verloop hiervan;
- gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;
- uitgevoerde hematologische proeven en alle resultaten;
- uitgevoerde klinisch-biochemische proeven en alle resultaten;
- bevindingen bij de necropsie;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- waar mogelijk statistische behandeling van de resultaten;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

**3.2. Evaluatie en interpretatie**

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

**4. LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

**B. 8. SUBACUTE INHALATIETOXICITEIT****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode**

Verscheidene groepen proefdieren worden gedurende een periode van 28 dagen dagelijks aan geleidelijk stijgende concentraties van de teststof blootgesteld. Er wordt een concentratie per groep gebruikt. Indien een medium wordt gebruikt om de juiste concentratie van de teststof in de atmosfeer te bereiken, moet een mediumcontrolegroep worden toegevoegd. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proef leven, wordt necropsie verricht.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

Vóór het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als gedurende de proef. Gezonde jonge dieren worden op willekeurige wijze vóór het onderzoek in het vereiste aantal groepen ingedeeld. Waar nodig wordt een passend medium aan de teststof toegevoegd ten einde de juiste concentratie van de teststof in de atmosfeer te bereiken. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet bekend zijn dat deze geen toxische effecten veroorzaken. In voorkomend geval kunnen bestaande gegevens worden gebruikt.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Proefdieren**

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Er dient gebruik te worden gemaakt van rattenstammen van jonge gezonde dieren, die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. Bij het begin van de studie mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt niet meer dan  $\pm 20\%$  van het gemiddelde gewicht afwijken.

**1.6.2.2. Aantal en geslacht**

Voor iedere testgroep moeten ten minste tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan vóór de voltooiing van de

studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van tien dieren (vijf per geslacht) gedurende 28 dagen worden behandeld met het hoogste concentratieniveau, waarna zij nog gedurende 14 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of pas later tot uiting komen.

#### 1.6.2.3. Blootstellingsconcentraties

Ten minste drie concentraties met een controle of een mediumcontrole (overeenkomend met de concentratie van het medium bij het hoogste expositieniveau), indien een medium wordt gebruikt, zijn vereist. Afgezien van de toediening van de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze als de dieren in de testgroepen worden behandeld. De hoogste concentratie moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij de laagste concentratie mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Indien het blootstellingsniveau van de mens kan worden geschat, moet de laagste concentratie deze overschrijden. In het ideale geval treden bij de middelste concentratie minimaal waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussenconcentratie moet het verschil tussen de concentraties zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de laagste concentratie, in de tussengroepen en in de controlegroepen mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

#### 1.6.2.4. Blootstellingstijd

De dagelijkse blootstellingstijd bedraagt 6 uur, maar een afwijkende duur kan in verband met specifieke vereisten nodig zijn.

#### 1.6.2.5. Apparatuur

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld met behulp van inhalatieapparatuur, die zodanig is gebouwd dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste 12 luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en gelijkmatige verdeling van de teststof in de atmosfeer. Als van een expositiekamer gebruik wordt gemaakt, moet deze op zodanige wijze zijn ontworpen dat de dieren zo min mogelijk hoeven te dringen en zoveel mogelijk door inhalatie aan de proefstoffen worden blootgesteld. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de expositiekamer geldt dat het totale „volume” van de proefdieren niet méér mag bedragen dan 5 % van het volume van de blootstellingskamer. Naar keuze kan de oronasale methode worden toegepast, of de kop alleen of individueel het gehele lichaam in een expositieruimte worden blootgesteld; de eerste twee methoden zullen ertoe bijdragen dat zo min mogelijk teststof via andere wegen in het lichaam wordt opgenomen.

#### 1.6.2.6. Observatieperiode

De proefdieren moeten tijdens de gehele periode van behandeling en herstel dagelijks op tekenen van toxiciteit worden onderzocht. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop intoxicatieverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten worden genoteerd.

#### 1.6.3. Uitvoering

De dieren worden gedurende een periode van 28 dagen, 5 tot 7 dagen per week aan de teststof blootgesteld. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 14 dagen zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. Tijdens de proefnemingen dient de temperatuur op  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  te worden gehouden. In het ideale geval moet de relatieve vochtigheid tussen 30 % en 70 % worden gehouden, behalve waar dit niet goed uitvoerbaar is (bij voorbeeld bij het testen van sommige aerosolen). Gedurende de blootstelling wordt de dieren voedsel en water onthouden.

Er moet gebruik worden gemaakt van een dynamisch inhalatiesysteem met een geschikt systeem voor de analytische controle van de concentratie. Aanbevolen wordt in een verkennende proef vast te stellen

welke blootstellingsconcentraties voor de proeven het meest geschikt zijn. Het systeem moet waarborgen dat de omstandigheden bij de proef zo spoedig mogelijk stabiel zijn.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gecontroleerd:

- a) gedurende de gehele proef het aantal luchtverversingen per uur;
- b) de feitelijke concentratie van de teststof in het ademhalingsgebied. Tijdens de dagelijkse blootstelling mag de concentratie met niet méér dan  $\pm 15\%$  van het gemiddelde afwijken. Bij stof- en vloeistof-aërosolen is het mogelijk dat de concentratie niet binnen deze grenzen gehouden kan worden; in dat geval kan een grotere afwijking worden aanvaard. Tijdens de gehele duur van de studie moeten de dagelijkse concentraties zo constant mogelijk worden gehouden. Voor stof- en vloeistofaërosolen wordt, ten einde de consistentie van de verdeling van de deeltjesgrootte te schatten, deze laatste zo dikwijls als nodig gemeten;
- c) temperatuur en vochtigheid;
- d) tijdens en na de blootstelling worden waarnemingen gedaan die voor ieder individueel dier systematisch worden geregistreerd. Alle dieren moeten dagelijks worden geobserveerd; tekenen van toxiciteit moeten worden genoteerd met het tijdstip waarop deze voor het eerst optraden en de mate en de duur ervan. Bij het observeren van de dieren in de kooien wordt in ieder geval aandacht besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen, slijmvliezen, ademhalingsorganen, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Wekelijks moeten de dieren worden gewogen. Het wordt eveneens aanbevolen het voerverbruik wekelijks te meten. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd, om te voorkomen dat ze voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of omdat de dieren in verkeerde kooien zijn geplaatst. Na afloop van de onderzoeksperiode wordt bij alle overlevende dieren in de behandelde groepen (afgezien van de dieren in de satellietgroep) necropsie verricht. Wanneer stervende dieren worden aangetroffen, moeten zij worden verwijderd; bij hen wordt eveneens necropsie verricht.

Na afloop van de proeven moeten bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroep, de volgende onderzoeken worden uitgevoerd:

- i) Hematologie, waarbij ten minste bepaling van hematocriet en hemoglobinegehaltebepaling, erythrocytentelling, totaalstelling en gedifferentieerde telling van de leukocyten en meting van stollingseigenschappen.
- ii) Klinisch-biochemische bepalingen in het bloed waarbij ten minste één parameter van de leverfunctie en nierfunctie: serumalanineaminotransferase (vroegere benaming serum glutaminezuur-pyrodruivenzuur-transaminase), serumaspartaataminotransferase (vroegere benaming serum glutaminezuur-oxaalzijnzuur-transaminase), ureum-stikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumewit. Voor een goede toxicologische evaluatie kan het nodig zijn het onderzoek uit te breiden met: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, glucosegehalte bij nuchtere toestand, analyse van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesteraseactiviteit.

Zo nodig kan verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden.

#### 1.6.3.1. Macroscopische necropsie

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd. De lever, nieren, bijniere en testes moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om uitdrogen te voorkomen. Organen en weefsels (de ademhalingswegen, lever, nieren, milt, bijniere, hart en alle organen die macroscopisch waarneembaar letsel of veranderingen in omvang vertonen) moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek. De nasopharynx en de longen moeten in hun geheel worden verwijderd, gewogen en behandeld met een geschikt fixatief om ervoor te zorgen dat de longstructuur intact blijft. Het perfunderen met een fixatief wordt als een doeltreffende methode beschouwd.



### 1.6.3.2. Histopathologisch onderzoek

Bij de dieren in de groep die een hoge concentratie hebben ontvangen en bij de dieren in de controlegroep(en) moet histopathologisch onderzoek op de bewaarde organen en weefsels worden verricht. Organen en weefsels die bij het hoogste dosisniveau door de teststof blijken te zijn beschadigd, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht. Bij het histopathologisch onderzoek van dieren in satellietgroepen moet speciaal worden gelet op organen en weefsels waar, bij de andere behandelde groepen, effecten blijken te zijn opgetreden.

## 2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, en het aantal dieren waarbij ieder type beschadiging voorkomt.

Alle waargenomen kwantitatieve en incidentele resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Dit geldt zowel voor kwantitatieve resultaten als voor de incidentie van kwalitatieve resultaten. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. Verslag van de proefnemingen

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, dieet, enzovoort;
- proefomstandigheden:

Beschrijving van de blootstellingsapparatuur met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het bereiden van stof- en vloeistofaërosolen, methoden voor het conditioneren van de lucht, behandeling van de afgevoerde lucht en de wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht als deze is gebruikt. Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid en, in voorkomend geval, de stabiliteit van de concentratie of de deeltjesgrootte van de aërosolen.

Gegevens betreffende de blootstelling:

Deze moeten tabellarisch worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bij voorbeeld standaardafwijking).

Zij dienen, indien mogelijk, te omvatten:

- a) aantal luchtverversingen per uur van de inhalatieapparatuur;
  - b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;
  - c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);
  - d) aard van het eventuele medium;
  - e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren;
  - f) mediaan van de deeltjesgrootte (in voorkomend geval);
- gegevens over de toxische reactie volgens geslacht en concentratie;
  - tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt, of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;
  - toxische of andere effecten; niveau waarbij geen effect wordt waargenomen;
  - tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel wordt waargenomen en verloop hiervan;
  - gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;
  - uitgevoerde hematologische proeven en resultaten;

- uitgevoerde klinisch-biochemische proeven en resultaten;
- bevindingen bij de necropsie;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- waar mogelijk statistische behandeling van de resultaten;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. **Evaluatie en interpretatie**

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

4. **LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

---

**B. 9. SUBACUTE DERMAL TOXICITEIT****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode**

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks in geleidelijk stijgende doseringen op de huid van verscheidene groepen proefdieren aangebracht. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proef leven, wordt necropsie verricht.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

Vóór het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef voorkomen. Gezonde jonge dieren worden op willekeurige wijze vóór de behandeling ingedeeld bij testgroepen en controlegroepen. Kort voor de proef wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren geknipt; het haar kan ook worden geschoren, maar dit moet dan ongeveer 24 uur vóór de proef worden gedaan. Gewoonlijk zal het dier ongeveer om de week opnieuw moeten worden geknipt of geschoren. Bij het knippen of scheren moet erop worden gelet dat de huid niet wordt geschaafd. Ten minste 10 % van de lichaamsoppervlakte moet voor het aanbrengen van de teststof worden onthaard. Bij het bepalen van de oppervlakte die moet worden onthaard en de afmetingen van de aan te brengen bedekking moet rekening worden gehouden met het gewicht van het dier. Bij een proef met vaste stoffen, die eventueel tot poeder kunnen worden fijngemaakt, moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt. De teststof wordt gedurende 5 tot 7 dagen per week dagelijks aangebracht.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Proefdieren**

Er kan gebruik worden gemaakt van volwassen ratten, konijnen of cavia's. Ook andere diersoorten kunnen worden gebruikt, maar de noodzaak hiervoor moet worden aangetoond. Bij het begin van de proef mag het gewicht van de dieren niet meer dan  $\pm 20$  % van het gemiddelde gewicht afwijken.

#### 1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) met een gezonde huid worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan vóór de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van tien dieren (vijf per geslacht) gedurende 28 dagen worden behandeld met het hoge dosisniveau, waarna zij nog gedurende 14 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of pas later tot uiting komen.

#### 1.6.2.3. Dosisniveau

Ten minste drie dosisniveaus, met een controlegroep of een mediumcontrolegroep, indien een medium wordt gebruikt, zijn vereist. De expositieduur moet ten minste 6 uur per dag bedragen. De teststof moet iedere dag op ongeveer dezelfde tijd worden toegediend; op vastgestelde tijden (iedere week of om de 14 dagen) is een correctie vereist om ervoor te zorgen dat het dosisniveau in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier constant blijft. Afgezien van de toediening van de teststoffen moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze als de dieren in de proefgroep worden behandeld. Indien een medium is gebruikt om het doseren te vergemakkelijken moet aan de mediumcontrolegroep op dezelfde wijze als aan de testgroep een dosis van het medium worden toegediend en deze dosis moet even groot zijn als die van de dieren in de groep met het hoogste dosisniveau. Het hoogste dosisniveau van de teststof moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Indien het blootstellingsniveau van de mens kan worden geschat, moet het laagste niveau deze overschrijden. In het ideale geval treden bij het middelste dosisniveau minimaal waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussendosis moet het verschil tussen de dosisniveaus zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de laagste dosis en in de tussengroepen, alsmede in de controlegroepen, mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

Indien toediening van de teststof tot ernstige huidirritatie leidt, moeten de concentraties worden verlaagd, wat vermindering of ontbreken van andere toxische effecten bij het hoge dosisniveau tot gevolg kan hebben. Indien de huid ernstig is beschadigd, kan het zelfs noodzakelijk zijn de studie te beëindigen en een nieuwe studie met lagere concentraties te beginnen.

#### 1.6.2.4. Limiettest

Indien bij een verkennende proef geen toxische effecten optreden bij een dosisniveau van 1 000 mg/kg, of een hoger niveau dat verband houdt met het niveau waaraan de mens, voor zover bekend, kan worden blootgesteld, is het wellicht niet noodzakelijk om verdere proeven te nemen.

#### 1.6.2.5. Observatieperiode

De proefdieren moeten dagelijks worden onderzocht op tekenen van toxiciteit. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop toxiciteitsverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten worden opgetekend.

#### 1.6.3. Uitvoering

De dieren moeten afzonderlijk in kooien worden gehuisvest. De dieren worden gedurende een periode van 28 dagen, zo mogelijk 7 dagen per week, met de teststof behandeld. Dieren in eventuele satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 14 dagen zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. De blootstellingstijd moet 6 uur per dag bedragen.

De teststof moet gelijkmatig worden verdeeld over een oppervlakte van ongeveer 10 % van de totale lichaamsoppervlakte. Bij zeer toxische stoffen kan de te bedekken oppervlakte kleiner zijn, maar een zo groot mogelijke oppervlakte moet worden bedekt met een zo dun en gelijkmatig mogelijk aangebrachte laag.

De teststof moet gedurende de blootstellingstijd door middel van poreus verbandgaas en niet-irriterend plakband in contact met de huid blijven. Het testgedeelte van de huid moet op geschikte wijze verder worden bedekt om het verbandgaas en de teststof op hun plaats te houden en om te verhinderen dat de

dieren de teststof via de mond opnemen. Hulpmiddelen om de dieren te fixeren kunnen worden gebruikt om te voorkomen dat de dieren de teststof via de mond opnemen, maar het wordt niet aangeraden de dieren volledig te immobiliseren.

Aan het einde van de blootstellingsperiode wordt de resterende teststof zo mogelijk met water van de huid verwijderd of anders door middel van een andere geschikte reinigingstechniek.

Alle dieren moeten dagelijks worden geobserveerd; tekenen van toxiciteit moeten worden genoteerd met inbegrip van het tijdstip waarop deze voor het eerst optraden en de mate en de duur ervan. Bij het observeren van de dieren in kooien moet aandacht worden besteed aan veranderingen in de huid, de vacht, de ogen en de slijmvliezen, de ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het autonome en het centrale zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en het gedrag. Wekelijks moeten de dieren worden gewogen. Het is eveneens aanbevolen het voerverbruik wekelijks te meten. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of omdat de dieren in verkeerde kooien zijn geplaatst. Na afloop van de onderzoeksperiode wordt bij alle overlevende dieren in de behandelde groepen (afgezien van de dieren in de satellietgroep), necropsie verricht. Indien stervende dieren worden aangetroffen, moeten zij worden verwijderd; op hen wordt necropsie verricht.

Na afloop van de proeven moeten bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroep, de volgende onderzoeken worden uitgevoerd:

- 1) Hematologie waarbij tenminste bepaling van hematocriet en hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totaalstelling en gedifferentieerde telling van de leucocyten en meting van stollingseigenschappen.
- 2) Klinisch-biochemische bepalingen in het bloed waarbij ten minste één parameter van de lever- en nierfunctie: serumalanineaminotransferase (vroegere benaming serum glutaminezuur-pyrodruivenzuur-transaminase), serumaspartaataminotransferase (vroegere benaming serum glutaminezuur-oxaalazijnzuur-transaminase), ureum-stikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumeiwit.

Voor een goede toxicologische evaluatie kan het nodig zijn het onderzoek uit te breiden tot: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, glucosegehalte bij nuchtere toestand, analyse van de lipoiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesteraseactiviteit.

Zo nodig kan verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden.

#### 1.6.4. *Macroscopische necropsie*

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd. De lever, nieren, bijnieren en testes moeten zo spoedig mogelijk na sectie nat worden gewogen om uitdrogen te voorkomen. De organen en de weefsels in de normale en de behandelde huid, de lever, de nieren en de organen die grote beschadigingen of veranderingen in grootte vertonen, moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek.

#### 1.6.5. *Histopathologisch onderzoek*

Bij de dieren in de groep die een hoge dosis heeft ontvangen en bij die in de controlegroep moet histopathologisch onderzoek op de bewaarde organen en weefsels worden verricht. Organen en weefsels die bij het hoogste doseringsniveau door de teststof blijken te zijn beschadigd, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht. Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroep moet speciaal worden gelet op de organen en weefsels waar, bij de andere behandelde groepen, effecten blijken te zijn opgetreden.

**2. GEGEVENS**

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, en het aantal dieren waarbij ieder type beschadiging voorkomt.

Alle waargenomen resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Dit geldt zowel voor kwantitatieve resultaten als voor de incidentie van kwalitatieve resultaten. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

**3. RAPPORTAGE****3.1. Verslag van de proefnemingen**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, dieet, enzovoort;
- proefomstandigheden;
- dosisniveaus (met het eventueel medium) en concentraties;
- waar mogelijk het hoogste dosisniveau waarbij geen effect optreedt;
- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;
- tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het eind van de proef bleven leven;
- toxische of andere effecten;
- tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en het verloop hiervan;
- gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;
- uitgevoerde hematologische proeven en resultaten;
- uitgevoerde klinisch-biochemische proeven en resultaten;
- bevindingen bij de necropsie;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- waar mogelijk statistische behandeling van de resultaten;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

**3.2. Evaluatie en interpretatie**

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

**4. LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

**B. 10. OVERIGE EFFECTEN — MUTAGENITEIT****ZOOGDIEREN — IN-VITRO CYTOGENETISCHE TEST****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode**

Deze cytogenetische test (in vitro) is een korte-termijn mutageniteitstest voor de opsporing van structurele chromosoomafwijkingen in gekweekte zoogdiercellen. Culturen van zowel erkende cellijnen als van primaire celculturen kunnen worden gebruikt. Na blootstelling aan de teststoffen met en zonder een leverenzymactiveringsmengsel (een van co-factoren voorziene post-mitochondriale fractie) worden celculturen behandeld met mitoseremmende stoffen, zoals colchicine, om cellen te accumuleren in een metafaseachtig stadium van de mitose (c-metafase). Op vastgestelde tijden worden de cellen geogst en worden chromosoompreparaten gemaakt. De preparaten worden gekleurd en de metafasecellen worden geanalyseerd op chromosoomafwijkingen.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

De teststoffen worden in een voedingsbodem verwerkt of opgelost in passende media alvorens de cellen behandeld worden. Erkende cellijnen of culturen van primaire cellen worden gebruikt, zoals Chinese-hamstercellen en menselijke lymfocyten.

**1.6.2. Proefomstandigheden****Aantal culturen**

Voor elk experimenteel punt worden minstens twee culturen gebruikt.

**Gebruik van negatieve en positieve controles**

Het oplosmiddel (wanneer het oplosmiddel niet bestaat uit voedingsbodem of water), het leverenzymactiveringsmengsel, het leverenzymactiveringsmengsel met oplosmiddel, en onbehandelde controles worden als negatieve controles gebruikt.

Bij elke proef behoort een positieve controle; wanneer leverenzymactiveringsmengsel wordt gebruikt om de teststoffen te activeren, moet als positieve controle een stof worden gebruikt waarvan bekend is dat deze metabole activering nodig heeft.

**Dosisniveau**

Minstens drie doses van de teststof, met een spreiding van ten minste een factor 10 in de dosis, worden toegepast, waarbij de hoogste dosis de mitotische activiteit met circa 50 % onderdrukt.

**Omstandigheden voor de cultuur**

Een geschikte voedingsbodem, incubatieomstandigheden (bij voorbeeld temperatuur, gebruikte kweekvaten, CO<sub>2</sub>-concentraties) en vochtigheid worden gebruikt.

**1.6.3. Procedure****1.6.3.1. Bereiding van culturen**

Erkende cellijnen: de cellen worden gekweekt uit voorraadculturen (bij voorbeeld door trypsinebehandeling of door afschudden), met de juiste dichtheid geënt in kweekvaten en geïncubeerd bij 37 °C.

Menselijke lymfocyten: bloed waaraan heparine is toegevoegd, wordt gebracht in een voedingsbodem die fytohemagglutinine, foetaal kalfsserum en antibiotica bevat en wordt bij 37 °C geïncubeerd.

**1.6.3.2. Behandeling van de culturen met de te testen stof****i) Behandeling zonder leverenzymactiveringsmengsel**

Alle behandelingen beslaan een volledige celcyclus, en fixatieschema's zorgen voor de analyse van de eerste mitoses (na de behandeling) van cellen behandeld in verschillende stadia van hun cyclus. Wanneer de behandeling niet de gehele lengte van een celcyclus beslaat, worden meervoudige fixatietijden gekozen om de cellen te bemonsteren die tijdens de behandeling in verschillende stadia van de celcyclus verkeren, dat wil zeggen G<sub>1</sub>, S en G<sub>2</sub>.

De teststof wordt toegevoegd aan culturen van erkende cellijnen wanneer deze in het exponentiële groeistadium verkeren. Culturen van menselijke lymfocyten worden behandeld terwijl zij nog in een halfsynchrone toestand zijn. Indien de te testen stof de duur van de celcyclus verandert, dient het fixatie-interval overeenkomstig gewijzigd te worden.

**ii) Behandeling met leverenzymactiveringsmengsel**

Voor de behandeling dient de teststof in combinatie met het activeringstelsel zo lang mogelijk aanwezig te zijn, zonder een toxisch effect op de cellen uit te oefenen. Indien deze behandeling vanwege de toxiciteit niet de gehele duur van een celcyclus beslaat, worden meervoudige fixatietijden gekozen om de cellen te bemonsteren die tijdens de behandeling in verschillende stadia van de celcyclus verkeren, dat wil zeggen G<sub>1</sub>, S en G<sub>2</sub>.

**Oogsten van cellen**

Celculturen worden 1—2 uur voor het oogsten behandeld met mitoseremmende stoffen met colchicine. Elke cultuur wordt afzonderlijk geoogst en verwerkt voor chromosoompreparaten.

**1.6.3.3. Chromosoompreparaten**

Voor chromosoompreparaten zijn nodig: hypotonische behandeling van de cellen, fixatie, uitstrijken op objectglaasjes en kleuring.

**Analyse**

Per cultuur worden minstens 100 goed uitgestreken metafasen geanalyseerd op chromosoomafwijkingen. Voor de analyse worden de objectglaasjes gecodeerd.

Bij menselijke lymfocyten worden alleen metafasen met 46 centromeren geanalyseerd.

Bij erkende cellijnen worden alleen metafasen geanalyseerd die ± 2 centromeren van het modale aantal bevatten.



## 2. GEGEVENS

De gegevens worden in een tabel opgenomen. Chromatideafwijkingen (gaten, breuken, uitwisselingen), chromosoomafwijkingen (gaten, breuken, zeer kleine stukjes, ringen, dicentrische en polycentrische structuren) en het aantal afwijkende metafasen (met en zonder gaten) worden voor alle behandelde en controleculturen afzonderlijk vermeld.

De gegevens dienen aan de hand van een passende statistische methode te worden geëvalueerd.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. Verslag van de proefnemingen

Het verslag van de proef dient, indien mogelijk, de volgende gegevens te bevatten:

- gebruikte cellen;
- proefomstandigheden: samenstelling van de voedingsbodem, CO<sub>2</sub>-concentratie, incubatietemperatuur, incubatieduur, dosisniveaus, duur van de behandeling, duur van de behandeling met en concentratie van de mitoseremmende stof, soort leverenzymactiveringsmengsel, dat men heeft gebruikt, positieve en negatieve controles;
- aantal celculturen;
- aantal geanalyseerde metafasen (voor elke cultuur worden de gegevens afzonderlijk vermeld);
- mitotische index;
- type en aantal afwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elke behandelde en controlecultuur, modaal aantal chromosomen in de gevestigde cellijnen die men heeft gebruikt;
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

## 4. LITERATUR

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

**B. 11. OVERIGE EFFECTEN — MUTAGENITEIT****ZOOGDIEREN — IN-VIVO BEENMERG — CYTOGENETISCHE TEST, CHROMOSOOMANALYSES****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode**

Deze cytogenetische in-vivo test is een korte-termijn mutageniteitsproef voor het vaststellen van structurele chromosoomafwijkingen. Chromosoomafwijkingen worden in het algemeen geëvalueerd in de eerste mitoses na de behandeling. Bij chemische mutagenen zijn de meeste geïnduceerde afwijkingen van het chromatide type.

Bij deze methode worden beenmergcellen van zoogdieren gebruikt, die op de meest geschikte wijze aan teststoffen worden blootgesteld en met opeenvolgende tussenperioden worden gedood. Alvorens zij gedood worden, worden de dieren behandeld met een mitoseremmende stof, zoals cochincine, ten einde cellen in een metafaseachtig stadium van de mitose (c-metafase) te accumuleren. Er worden aan de lucht gedroogde chromosoompreparaten van de cellen vervaardigd en gekleurd, en de metafasen worden onder de microscoop op chromosoomafwijkingen geanalyseerd.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

De teststoffen worden in een isotone zoutoplossing opgelost. Indien zij onoplosbaar zijn, worden zij in passende media opgelost of gesuspenderd.

Er moeten vers bereide oplossingen van de teststof worden gebruikt.

Indien men een medium gebruikt om de toediening te vergemakkelijken, mag dit toxische werking van de teststof niet beïnvloeden.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Proefdieren**

Er worden knaagdieren zoals ratten, muizen of Chinese hamsters gebruikt. Gezonde, jonge volwassen dieren worden willekeurig gekozen en vervolgd in behandelings- en controlegroepen ingedeeld.

#### 1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor elke behandelings- en controlegroep worden minstens vijf wijfjes en vijf mannetjes gebruikt. Er worden dus per periode tien dieren per groep gedood indien verscheidene testtijden na de behandeling in het testschema zijn opgenomen.

#### 1.6.2.3. Wijze van toediening

De teststoffen worden meestal slechts eenmaal toegediend. Op basis van toxicologische gegevens, kan een schema voor een herhaalde behandeling worden toegepast. Een herhaalde behandeling kan echter alleen worden toegepast indien de teststof geen cytotoxische effecten in beenmerg vertoont. De gebruikelijke methoden voor toediening zijn: oraal of via intraperitoneale injectie. Ook andere wijzen van toediening kunnen in aanmerking komen.

#### 1.6.2.4. Gebruik van negatieve en positieve controles

Als een positieve controle wordt een stof gebruikt, waarvan men weet dat deze in vivo chromosoomafwijkingen veroorzaakt terwijl een negatieve controlegroep (oplosmiddel) ook tot de opzet van iedere proef behoort.

#### 1.6.2.5. Dosisniveau

Voor het basisdossier wordt één dosis van de teststof gebruikt; deze dosis is de maximaal te verdragen dosis of de dosis die enige cytotoxiciteit, bij voorbeeld gedeeltelijke mitoseremming, produceert.

Om wetenschappelijke redenen kunnen aanvullende dosisniveaus gebruikt worden.

Wanneer de test als controlemethode gebruikt wordt, dienen minstens twee aanvullende dosisniveaus te worden gebruikt.

#### 1.6.3. Uitvoering

De proef kan op twee manieren worden uitgevoerd:

- i) De dieren worden eenmaal met de maximaal te verdragen dosis van de teststof behandeld. Na de behandeling worden driemaal monsters genomen. Het centrale bemonsteringsinterval is 24 uur; aangezien de kinetiek van de celcyclus door de teststof kan worden beïnvloed, wordt een vroeger en een later bemonsteringsinterval, voldoende gespreid in de tijd tussen 6 en 48 uur, toegepast.

Wanneer aanvullende dosisniveaus worden gebruikt, dienen de monsters op de bijzonder gevoelige intervallen te worden genomen of, als die niet bekend zijn, 24 uur na de behandeling.

- ii) Als op grond van farmacokinetische en metabole gegevens een schema voor herhaalde behandeling nodig is, kan een herhaalde dosering plaatsvinden en dienen de monsters tussen 6 en 24 uur na de laatste behandeling te worden genomen.

#### Beenmergpreparaat

Alvorens de dieren worden gedood, worden zij intraperitoneaal geïnjecteerd met een passende dosis mitoseremmende stof om een voldoende aantal cellen in de c-metafase te verkrijgen. Het beenmerg wordt uit de beide femora van pas gedode dieren verkregen door spoelen met een isotone oplossing. Na een passende hypotonische behandeling worden de cellen gefixeerd, en vervolgens op objectglasjes uitgestreken. Na droging aan de lucht worden de glasjes gekleurd.

#### Analyse

De glasjes worden voor de microscopische analyse gecodeerd. Minstens 50 goedgespreide metafasen met het volledige aantal centromeren worden geanalyseerd op chromosoomafwijkingen. Bovendien kunnen voor elk dier de mitotische indexen worden vastgesteld.

**2. GEGEVENS**

De gegevens worden gepresenteerd in de vorm van tabellen. De afwijkingen van chromatide of isochromatide aard (gaten, breuken, verwisselingen), en het aantal afwijkende metafasen (met en zonder gaten) en de mitotische indexen, indien ze werden vastgesteld, worden voor alle behandelde en controledieren afzonderlijk genoteerd. Tevens worden gemiddelde aantallen en standaardafwijkingen voor elk van de proef- en controlegroepen genoteerd. De gegevens worden met behulp van passende statistische methoden geëvalueerd.

**3. RAPPORTAGE****3.1. Verslag van de proef**

Het verslag van de proef dient, indien mogelijk, de volgende gegevens te bevatten:

- soort, stam en leeftijd van de gebruikte dieren;
- aantal dieren per geslacht in de proef- en controlegroepen;
- proefomstandigheden: gedetailleerde beschrijving van het schema voor de behandeling en bemonstering, dosisniveaus, duur van de behandeling met een concentratie van de mitoseremmende stof;
- aantal per dier geanalyseerde metafasen;
- mitotische indexen, indien ze werden vastgesteld;
- soort en aantal afwijkingen, voor elk behandeld en controledier afzonderlijk;
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

**3.2. Evaluatie en interpretatie**

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

**4. LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

---

**B. 12. OVERIGE EFFECTEN — MUTAGENITEIT****ZOOGDIEREN — IN-VIVO MICRONUCLEUSTEST****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode**

De micronucleustest is een korte-termijn test, die in vivo op zoogdieren wordt toegepast voor het vaststellen van chromosoomschade of schade aan het mitotisch apparaat door de inwerking van chemische stoffen. Basis voor deze proef is de toename van het aantal micronuclei in de polychromatische erythrocyten van behandelde dieren vergeleken met de controledieren.

De micronuclei worden gevormd uit chromosoomfragmenten of gehele chromosomen die achterblijven in de mitose. Wanneer erythroblasten zich ontwikkelen tot erythrocyten, wordt de hoofdkern uitgestoten terwijl de micronucleus in het cytoplasma bewaard kan blijven. Bij deze proef worden jonge polychromatische erythrocyten in het beenmerg van laboratoriumzoogdieren, die op de meest geschikte wijze aan de teststoffen zijn blootgesteld, gebruikt. Het beenmerg wordt uit een been gehaald, er worden uitstrijkpreparaten vervaardigd en vervolgens gekleurd. Polychromatische erythrocyten worden onder de microscoop op micronuclei onderzocht, en vervolgens wordt de verhouding tussen polychromatische en normochromatische erythrocyten vastgesteld.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen**

De teststoffen worden in een isotone zoutoplossing opgelost; indien zij onoplosbaar zijn, worden zij in andere, passende media opgelost of gesuspendeerd. Wanneer men een medium gebruikt, mag dit de teststof niet beïnvloeden of toxische effecten veroorzaken. In normale gevallen worden vers bereide oplossingen van de teststof gebruikt.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Proefdieren**

Muizen verdienen de voorkeur, maar ook andere zoogdieren kunnen worden gebruikt. Gezonde, jonge volwassen dieren worden willekeurig gekozen en vervolgens in behandelings- en controlegroepen ingedeeld.

**1.6.2.2. Aantal en geslacht**

Voor elke behandelings- en controlegroep worden minstens vijf wijfjes en vijf mannetjes gebruikt.

Er worden per periode tien dieren per groep gedood indien verscheidene testtijden na de behandeling in het testschema zijn opgenomen.

#### 1.6.2.3. Wijze van toediening

De teststoffen worden meestal slechts eenmaal toegediend. Op basis van toxicologische gegevens kan een schema voor een herhaalde behandeling worden toegepast. Een herhaalde behandeling kan echter alleen worden toegepast indien de teststof geen cytotoxische effecten in beenmerg vertoont. De gebruikelijke methoden voor toediening zijn: oraal of via intraperitoneale injectie. Ook andere wijzen van toediening kunnen in aanmerking komen.

#### 1.6.2.4. Gebruik van negatieve en positieve controles

Bij elke proef dienen zowel positieve als negatieve (oplosmiddel) controles te worden gebruikt.

#### 1.6.2.5. Dosisniveau

Voor het basisdossier wordt één dosis van de teststof gebruikt; de dosis is de maximaal te verdragen dosis of de dosis die enige cytotoxiciteit, bij voorbeeld door verandering in de verhouding tussen polychromatische en normochromatische erythrocyten, produceert.

Om wetenschappelijke redenen kunnen aanvullende dosisniveaus gebruikt worden.

Wanneer de test als controlemethode gebruikt wordt, dienen minstens twee aanvullende dosisniveaus te worden gebruikt.

#### 1.6.3. Uitvoering

De proef kan op twee manieren worden uitgevoerd:

- i) De dieren worden eenmaal met de maximaal te verdragen dosis van de teststof behandeld. De bemonsteringstijden dienen samen te vallen met de maximale reactie van de test, die varieert met de teststof. Daarom worden bij de hoogste dosis minstens driemaal beenmergmonsters genomen, en de eerste daarvan niet vroeger dan 12 uur na de behandeling, met voldoende intervallen na de eerste bemonstering, maar niet langer dan 72 uur.

Wanneer aanvullende dosisniveaus worden gebruikt, dienen de monsters in de meest gevoelige periode genomen te worden of, als die niet bekend is, 24 uur na de behandeling.

- ii) Als op grond van de farmacokinetische en metabole gegevens een schema voor herhaalde behandeling nodig is, kan een herhaalde dosering plaatsvinden en dienen de monsters minstens drie keer te worden genomen, de eerste niet vroeger dan 12 uur na de laatste behandeling en vervolgens met voldoende intervallen na de eerste bemonstering, doch niet langer dan na 72 uur.

#### Beenmergpreparaat

Het beenmerg wordt verkregen uit de twee femora van pas gedode dieren door uitspoelen met foetaal kalfserum. De cellen worden afgecentrifugeerd en het supernatans verwijderd. Druppels gehomogeniseerde celsuspensie worden op objectglasjes gebracht en uitgestreken. Na droging aan de lucht worden de glasjes gekleurd.

#### Analyse

De objectglasjes worden voor de microscopische analyse gecodeerd. Per dier worden minstens 1 000 polychromatische erythrocyten onderzocht op de aanwezigheid van micronuclei.

De verhouding tussen normochromatische en polychromatische erythrocyten wordt voor elk dier bepaald door een totaal van 1 000 erythrocyten te tellen.

**2. GEGEVENS**

De gegevens worden in de vorm van tabellen gepresenteerd. Het aantal gevonden polychromatische erythrocyten, het aantal polychromatische erythrocyten met micronuclei, en het percentage cellen met micronuclei worden afzonderlijk vermeld voor alle behandelde en controledieren, en dat geldt ook voor de verhouding tussen normochromatische en polychromatische erythrocyten. Tevens worden voor elk van de proef- en controledieren gemiddelde aantallen en standaardafwijkingen vermeld. De gegevens worden met behulp van geschikte statistische methoden geëvalueerd.

**3. RAPPORTAGE****3.1. Verslag van de proef**

Het verslag van de proef dient, indien mogelijk, de volgende gegevens te bevatten:

- soort, stam en leeftijd van de gebruikte dieren;
- aantal dieren per geslacht in de proef- en controlegroepen;
- proefomstandigheden: gedetailleerde beschrijving van het schema voor behandeling en bemonstering, dosisniveaus, toxiciteitsgegevens, negatieve en positieve controles;
- criteria voor het onderzoek naar micronuclei;
- wanneer mogelijk, dosis/effect-relatie;
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

**3.2. Evaluatie en interpretatie**

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

**4. LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

## B. 13. OVERIGE EFFECTEN — MUTAGENITEIT

*ESCHERICHIA COLI* — TERUGMUTATIETEST

## 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

## 1.2. Definities

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

## 1.3. Referentiestoffen

Geen.

## 1.4. Principe van de testmethode

Het tryptofaananterugmutatiesysteem van *Escherichia coli* (*trp*) is een microbiologische bepaling waarbij de terugmutatie *trp*<sup>-</sup> → *trp*<sup>+</sup> wordt gemeten onder invloed van chemische stoffen die baseveranderingen in het genetisch materiaal van het organisme veroorzaken.

De bacteriën worden met en zonder metabole activering blootgesteld aan de teststof. Na een geschikte incubatietijd op een minimale voedingsbodem worden de terugmutantkolonies geteld en vergeleken met het aantal spontane terugmutanten in een onbehandelde controlecultuur en/of in een controlecultuur met oplosmiddel.

## 1.5. Kwaliteitscriteria

Geen.

## 1.6. Beschrijving van de testmethode

Voor het verrichten van de bepaling kunnen de volgende methoden worden toegepast:

- 1) de pre-incubatiemethode en
- 2) de directe methode, waarbij de bacteriën en de te testen stof met de agar worden gemengd en over het oppervlak van een selectieve agarplaat worden uitgegeven.

## 1.6.1. Voorbereidingen

## 1.6.1.1. Bacteriën

De bacteriën worden gekweekt bij 37 °C tot de laat-exponentiële of de vroeg-stationaire groeifase. De celdichtheid dient circa 10<sup>8</sup> à 10<sup>9</sup> cellen per milliliter te zijn.

## 1.6.1.2. Metabole activering

De bacteriën dienen aan de teststof te worden blootgesteld zowel met als zonder een geschikt leverenzymactiveringsmengsel (een van co-factor voorziene post-mitochondriale fractie), dat bereid is uit muizen of ratten die vooraf met stoffen die enzyminductie veroorzaken behandeld zijn.



## 1.6.2. *Proefomstandigheden*

### 1.6.2.1. Teststammen

Drie stammen, te weten WP2, WP2 uvr A en WP2 uvr A pKM 101, dienen te worden gebruikt. Er moeten erkende methoden voor bereiding van voorraadculturen en opslag worden gebruikt. De eisen inzake de groei en de genetische identiteit van de stammen, hun gevoeligheid voor UV-straling of mitomycine C en de resistentie tegen ampicilline in stam WP2 uvr A pKM 101 dienen te worden gecontroleerd. De bacteriestammen dienen ook spontane terugmutanten op te leveren binnen de verwachte frequentiegrenzen.

### 1.6.2.2. Voedingsbodems

Een voor de uitdrukking en selectie van mutanten geschikte voedingsbodem wordt gebruikt met een toereikende dekagar.

### 1.6.2.3. Gebruik van negatieve en positieve controles

Testen met onbehandelde controles en controles met oplosmiddel dienen gelijktijdig te worden uitgevoerd. Positieve controles moeten ook worden uitgevoerd:

i) Om de gevoeligheid van de bacteriestammen te bevestigen.

Methylmethaansulfonaat, 4-nitrochinolineoxide of ethylnitroso-ureum kunnen als positieve controles voor proefnemingen zonder metabole activering worden gebruikt.

ii) Om de activiteit van het geschikte metaboliseringssysteem te controleren.

Een positieve controle voor de activiteit van één (het) metaboliseringssysteem voor alle bacteriestammen is 2-aminoanthraceen. Wanneer deze voorhanden is, dient een positieve controlestof van dezelfde chemische klasse als de teststof te worden gebruikt.

### 1.6.2.4. Hoeveelheid teststof per plaat

Minstens vijf verschillende hoeveelheden van de teststof worden getest met halflogintervallen tussen de platen. De stoffen worden getest tot de grens van oplosbaarheid of toxiciteit is bereikt. De toxiciteit blijkt uit de vermindering van het aantal spontane terugmutanten, de opheldering van de achtergrond of uit de mate van overleving van behandelde culturen. Niet-toxische stoffen dient men te testen tot 5 mg/plaat alvorens men mag zeggen dat de te testen stof negatief is.

### 1.6.2.5. Incubatieomstandigheden

De platen worden 48 à 72 uur geïncubeerd bij 37 °C.

## 1.6.3. *Uitvoering*

Voor de methode waarbij de te testen stof direct aan de plaat wordt toegevoegd zonder enzymactivering worden de teststof en 0,1 ml van een verse bacteriecultuur toegevoegd aan 2,0 ml dekagar. Voor proeven met metabole activering wordt 0,5 ml leverenzymactiveringsmengsel met een voldoende hoeveelheid post-mitochondriale fractie toegevoegd aan de dekagar nadat de te testen stof en de bacteriën zijn toegevoegd. De inhoud van elk van de buisjes wordt gemengd en uitgegoten over het oppervlak van een selectieve agarplaat. De dekagar krijgt de gelegenheid te stollen, en vervolgens worden de platen 48 à 72 uur bij 37 °C geïncubeerd. Aan het einde van de incubatietijd telt men de terugmutantkolonies per plaat.

Voor de preïncubatiemethode wordt een mengsel van de te testen stof, 0,1 ml van een verse bacteriecultuur en een voldoende hoeveelheid leverenzymactiveringsmengsel of dezelfde hoeveelheid buffer geïncubeerd alvorens 2,0 ml dekagar wordt toegevoegd. Alle overige procedures verlopen zoals hierboven voor de directe methode is aangegeven.

Bij beide methoden dient het uitplaten minstens in drievoud te geschieden.

## 2. GEGEVENS

De aantallen terugmutantkolonies per plaat worden zowel voor de controleculturen als voor de behandelde culturen gerapporteerd. Individuele plaattellingen, het gemiddelde aantal terugmutantkolonies per plaat en standaardafwijkingen dienen voor de teststof en voor de controles te worden opgegeven. Alle resultaten worden in een onafhankelijke proef bevestigd. De gegevens dienen aan de hand van geschikte statistische methoden te worden geëvalueerd.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. Verslag van de proef

Het verslag van de proef dient de volgende gegevens te bevatten:

- gebruikte bacteriestam;
- proefomstandigheden: dosisniveaus, toxiciteit, samenstelling van de voedingsbodem, behandelingsprocedures (preïncubatie — incubatie), leverenzymactiveringsmengsel, referentiestoffen, negatieve controles;
- individuele plaattelling, gemiddeld aantal terugmutantkolonies per plaat, standaardafwijking; dosis/effect-relatie als dat mogelijk is;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

### 3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

## 4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

**B. 14. OVERIGE EFFECTEN — MUTAGENITEIT****SALMONELLA TYPHIMURIUM — TERUGMUTATIETEST****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

**1.2. Definities**

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

**1.3. Referentiestoffen**

Geen.

**1.4. Principe van de testmethode**

Het histidinerugmutatiesysteem van *Salmonella typhimurium* (his) is een microbiologische bepaling, waarbij de terugmutatie *his*<sup>-</sup> — *his*<sup>+</sup> wordt gemeten onder invloed van chemische stoffen die basesubstituties of „Frameshift“-mutaties in het genetisch materiaal van het organisme veroorzaken.

De bacteriën worden met en zonder metabole activering blootgesteld aan de teststof, en op een minimale voedingsbodem uitgeplaat. Na een geschikte incubatietijd worden de terugmutantkolonies geteld en vergeleken met het aantal spontane terugmutanten in een onbehandelde controlecultuur en/of in een controlecultuur met oplosmiddel.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

Geen.

**1.6. Beschrijving van de testmethode****1.6.1. Voorbereidingen****1.6.1.1. Bacteriën**

Verse culturen van bacteriën worden bij 37 °C gekweekt tot de laat-exponentiële of vroeg-stationaire groeifase. De celdichtheid dient bij benadering 10<sup>8</sup> tot 10<sup>9</sup> cellen per milliliter te zijn.

**1.6.1.2. Metabole activering**

De bacteriën dienen aan de teststof te worden blootgesteld, zowel met als zonder een geschikt leverenzymactiveringsmengsel (een van co-factoren voorziene post-mitochondriale fractie) dat bereid wordt uit muizen of ratten, die vooraf met stoffen die enzyminductie veroorzaken behandeld zijn.

**1.6.2. Proefomstandigheden****1.6.2.1. Teststammen**

Op zijn minst moeten vier bacteriestammen: TA 1535, TA 1537, TA 98 en TA 100 worden gebruikt; daarnaast mogen ook nog andere stammen, zoals TA 1538, worden gebruikt.

Er moeten erkende methoden voor de bereiding en de opslag van de voorraadculturen worden gebruikt. De eisen inzake de groei en de genetische identiteit van de stammen, hun gevoeligheid voor UV-straling en kristalviolet, en de resistentie tegen ampicilline dienen te worden gecontroleerd. De stammen dienen ook spontane terugmutanten op te leveren binnen de te verwachten frequentiegrenzen.

#### 1.6.2.2. Voedingsbodems

Een geschikte selectieve voedingsbodem wordt gebruikt, met een toereikende dekagar.

#### 1.6.2.3. Gebruik van negatieve en positieve controles

Testen met onbehandelde controles en controles met oplosmiddel, dienen gelijktijdig te worden uitgevoerd.

Positieve controles moeten worden uitgevoerd:

i) om de identiteit van de bacteriestammen te bevestigen.

De volgende verbindingen kan men gebruiken voor tests zonder metabole activering:

<i>Bacteriestam</i>	<i>Muteert terug met</i>
TA 1535, TA 100	natriumazide
TA 1538, TA 98	2-nitrofluoreen
TA 1537	9-aminoacridine

ii) om de activiteit van het geschikte metaboliseringssysteem te controleren.

Een positieve controle voor de activiteit van één metaboliseringssysteem voor alle bacteriestammen is 2-aminoanthraceen.

Wanneer deze voorhanden is, dient een positieve controlestof van dezelfde chemische klasse als de teststof te worden gebruikt.

#### 1.6.2.4. Hoeveelheid teststof per plaat

Minstens vijf verschillende hoeveelheden teststof worden getest met halflogintervallen tussen de platen. De stoffen worden getest tot de grens van oplosbaarheid of toxiciteit is bereikt. De toxiciteit blijkt uit de vermindering van het aantal spontane terugmutanten, de opheldering van de achtergrond of uit de mate van overleving van de behandelde culturen. Niet-toxische chemicaliën dient men te testen tot 5 mg/plaat, voordat men mag zeggen dat een teststof negatief is.

#### 1.6.2.5. Incubatieomstandigheden

De platen worden 48 à 72 uur geïncubeerd bij 37 °C.

#### 1.6.3. Procedure

Voor de methode waarbij de te testen stof direct aan de plaat wordt toegevoegd zonder enzymactivering, worden de teststof en 0,1 ml van de verse bacteriecultuur toegevoegd aan 2,0 ml dekagar.

Voor proeven met metabole activering wordt 0,5 ml van het leverenzymactiveringsmengsel, dat een voldoende hoeveelheid post-mitochondriale fractie bevat, toegevoegd aan de dekagar nadat de te testen stof en de bacteriën zijn toegevoegd. De inhoud van ieder buisje wordt gemengd en uitgedogen over de oppervlakte van een selectieve agarplaat. De dekagar krijgt de gelegenheid om te stollen, en vervolgens worden de platen 48 à 72 uur geïncubeerd bij 37 °C. Aan het einde van de incubatieperiode worden de terugmutantkolonies per plaat geteld.

Voor de preïncubatie wordt een mengsel van de teststof, 0,1 ml verse bacteriecultuur en een toereikende hoeveelheid leverenzymactiveringsmengsel of dezelfde hoeveelheid buffer gepreïncubeerd, alvorens 2,0 ml dekagar wordt toegevoegd. Alle overige procedures verlopen zoals hierboven voor de directe methode is aangegeven.

Bij beide methoden dient het platen ten minste in drievoud te geschieden.

**2. GEGEVENS**

Het aantal terugmutantkolonies per plaat wordt zowel voor de controlereeks als voor de behandelde reeks gemeld.

Voor de teststof en de controles dienen individuele plaattellingen, het gemiddelde aantal terugmutantkolonies per plaat en standaardafwijkingen te worden opgegeven.

Alle resultaten worden in een onafhankelijke proef bevestigd.

De gegevens dienen aan de hand van een geschikte statistische methode te worden geëvalueerd.

**3. RAPPORTAGE****3.1. Verslag van de proef**

Het verslag van de proef dient, indien mogelijk, de volgende gegevens te bevatten:

- gebruikte bacteriestam;
- proefomstandigheden: dosisniveaus, toxiciteit, samenstelling van de voedingsbodems, behandelingsprocedures (preïncubatie — incubatie), leverenzymactiveringsmengsel, referentiestoffen, negatieve controles;
- individuele plaattelling, het gemiddelde aantal terugmutantkolonies per plaat, standaardafwijking, dosis/effect-relatie als dat mogelijk is;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

**3.2. Evaluatie en interpretatie**

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

**4. LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

**DEEL C: METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE ECOTOXICITEIT****C. 1. ACUTE TOXICITEIT VOOR VISSSEN****1. METHODE****1.1. Inleiding**

Met het oog op de keuze van de testmethode (statisch, semi-statisch of doorstroming) die het meest geschikt is om concentraties van de teststof gedurende de testperiode voldoende constant te houden, is het wenselijk om, voor zover mogelijk, te beschikken over gegevens over de oplosbaarheid in water, dampspanning, chemische stabiliteit, dissociatieconstanten en biologische afbreekbaarheid van de teststof.

Zowel bij de voorbereiding als bij de interpretatie van de testresultaten moet rekening worden gehouden met andere vereiste gegevens, bij voorbeeld structuurformule, zuiverheidsgraad, aard en percentage van van belang zijnde onzuiverheden, aanwezigheid en hoeveelheden van additieven en de n-octanol/water-verdelingscoëfficiënt.

**1.2. Definities en eenheden**

Acute toxiciteit is het waarneembare schadelijke effect dat in een organisme wordt teweeggebracht binnen een korte tijd (dagen) van blootstelling aan een stof. In deze test wordt de acute toxiciteit uitgedrukt als de mediaan letale concentratie ( $LC_{50}$ ), dat wil zeggen de concentratie in water waardoor 50 % van een groep vissen in de proef wordt gedood binnen een continue blootstellingsperiode, die moet worden vermeld.

Alle concentraties van de teststof worden opgegeven in gewicht per volume (mg/l) en ook uitgedrukt als gewicht per gewicht (parts per million).

**1.3. Referentiestoffen**

Een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de respons van geteste soorten onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate is veranderd.

Voor deze test worden geen referentiestoffen gespecificeerd.

**1.4. Principe van de testmethode**

De vissen worden gedurende minimaal 48 uur, maar bij voorkeur 96 uur, blootgesteld aan de teststof(fen) die in een reeks concentraties aan het water is (zijn) toegevoegd. De sterfte wordt ten minste elke 24 uur genoteerd en de concentraties waarbij 50 % van de vissen sterft ( $LC_{50}$ ) wordt indien mogelijk berekend voor elke waarnemingstijd.

**1.5. Kwaliteitscriteria**

De sterfte in de controlegroepen mag aan het einde van de test niet hoger zijn dan 10 %.

De zuurstofconcentratie moet gedurende de gehele test meer dan 60 % van de verzadigingswaarde voor lucht zijn geweest.

Het moet op grond van analyse dan wel van de chemische eigenschappen van het gebruikte testsysteem aannemelijk zijn dat de concentratie van de geteste stof voldoende constant is gebleven (bij voorbeeld gedurende de testperiode binnen 80 % van de oorspronkelijke concentratie).

## 1.6. Beschrijving van de testmethode

Er kunnen drie verschillende procedures worden toegepast:

Statische test:

toxiciteitstest met aquatische organismen waarbij de te onderzoeken oplossing niet stroomt. (Oplossingen blijven ongewijzigd gedurende de test.)

Semi-statische test:

test waarbij de oplossing niet stroomt, maar de testoplossing periodiek per bak wordt verversd na een langere periode (bij voorbeeld 24 uur).

Doorstroomtest:

toxiciteitstest waarin het water voortdurend wordt verversd in de testbakken waarbij de te onderzoeken stof wordt meegevoerd met het water ten einde het testmedium te verversen.

### 1.6.1. Reagentia

#### 1.6.1.1. Oplossingen van de teststoffen

Stamoplossingen van de gewenste sterkte worden bereid door de stof op te lossen in gedeïoniseerd water of water volgens 1.6.1.2.

Stamoplossingen van slecht in water oplosbare stoffen kunnen worden bereid door ultrasone dispersie of zo nodig door gebruik van organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen. Indien dergelijke hulpstoffen worden gebruikt, moeten de controlevissen worden blootgesteld aan dezelfde concentratie van de hulpstof als die welke is gebruikt in de hoogste concentratie van de teststof.

De concentratie van dergelijke hulpstoffen mag niet hoger zijn dan 0,1 g/l.

De gekozen testconcentraties worden bereid door de voorraadoplossing te verdunnen. Indien hoge concentraties worden onderzocht, kan de stof rechtstreeks worden opgelost in het verdunningswater.

De test dient te worden uitgevoerd zonder correctie van de pH. Indien er aanwijzingen zijn voor een duidelijke verandering van de pH, wordt geadviseerd om de test te herhalen met gecorrigeerde pH en de resultaten te vermelden. In dat geval dient de pH-waarde van de stamoplossing te worden aangepast aan de pH-waarde van het verdunningswater tenzij er speciale redenen zijn om dit niet te doen. Voor dit doel verdienen HCl en NaOH de voorkeur. Deze pH-correctie dient zodanig te geschieden dat de concentratie van de teststof in de stamoplossing niet in belangrijke mate wordt gewijzigd. Indien ten gevolge van de correctie een chemische reactie of fysische neerslagvorming van de teststof mocht optreden, dan dient dit te worden vermeld in het rapport.

#### 1.6.1.2. Voorraad en verdunningswater

Leidingwater (waarin geen chloor, zware metalen of andere stoffen in gevaarlijke concentraties voorkomen), goede kwaliteit natuurlijk water of synthetisch water (zie aanhangsel 1) kunnen worden gebruikt.

Water met een totale hardheid van 50 tot 250 mg/l (als CaCO<sub>3</sub>) en met een pH van 6,0 tot 8,5 verdient de voorkeur.

### 1.6.2. Apparatuur

Alle apparatuur dient te zijn vervaardigd van chemisch inert materiaal.

- Automatisch verdunningssysteem (voor doorstroomtest).
- Zuurstofmeter.
- Apparatuur voor de bepaling van de hardheid van water.
- Apparatuur voor de temperatuurbeheersing.
- pH-meter.

### 1.6.3. *Testvissen*

Er kan gebruik worden gemaakt van één of meerdere soorten; de keuze wordt overgelaten aan het testlaboratorium.

Het verdient aanbeveling om de te gebruiken soorten te selecteren op basis van relevante praktische overwegingen, zoals de goede beschikbaarheid gedurende het gehele jaar, goede houdbaarheid, geschiktheid voor testdoeleinden, relatieve gevoeligheid, alsmede alle economische, biologische of ecologische factoren die van belang zijn. De vissen moeten gezond zijn en vrij van elke waarneembare misvorming.

Voor testdoeleinden aanbevolen vissoorten zijn vermeld in aanhangsel 2.

#### 1.6.3.1. Het houden van voorraad

Testvissen dienen bij voorkeur afkomstig te zijn van één partij, met ongeveer dezelfde lengte en leeftijd. De vissen moeten ten minste 12 dagen onder de volgende omstandigheden worden bewaard:

Tanks:

ten minste 300 liter voor koudwatervissen en ten minste 100 liter voor warmwatervissen wordt aanbevolen.

Hoeveelheid vis per liter:

aangepast aan het systeem (recirculatie of doorstroming) en de vissoort.

Water:

zie 1.6.1.2.

Licht:

per dag een fotoperiode van 12 tot 16 uur.

Zuurstofgehalte:

ten minste 80 % van de verzadigingswaarde voor lucht.

Voeren:

drie keer per week of dagelijks; dit wordt 24 uur voor het begin van de test stopgezet.

#### 1.6.3.2. Sterfte

Na een gewenningsperiode van 48 uur wordt de sterfte geregistreerd, waarbij de volgende criteria worden gehanteerd:

- in 7 dagen meer dan 10 % van de populatie:  
de gehele partij wordt afgekeurd;
- 5 tot 10 % van de populatie:  
de periode van het in voorraad houden wordt met nog 7 dagen verlengd. Indien geen nieuwe sterfgevallen optreden, wordt de partij goedgekeurd. Anders dient deze te worden afgekeurd;
- minder dan 5 % van de populatie:  
de partij wordt goedgekeurd.

### 1.6.4. *Adaptatie*

Alle vissen moeten gedurende ten minste 7 dagen voor het gebruik worden blootgesteld aan water van de kwaliteit en de temperatuur, zoals dat in de test zal worden gebruikt.

### 1.6.5. *Testprocedure*

Een definitieve test kan worden voorafgegaan door een test om het meetgebied vast te stellen. Deze verschaft gegevens over de voor de eigenlijke test te gebruiken reeks concentraties.



Naast de testreeks wordt een controletest zonder de teststof uitgevoerd; zo nodig wordt de hulpstof toegevoegd.

De concentraties mogen niet met meer dan 20 % afnemen gedurende de testperiode. Afhankelijk van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof kan gebruik worden gemaakt van een statische, semi-statische of doorstroomtest om aan deze voorwaarde te voldoen.

Vissen worden als volgt aan de stof blootgesteld:

- Tijdsduur:  
minimaal 48 uur, maar bij voorkeur 96 uur.
- Aantal dieren:  
ten minste tien per concentratie.
- Bakken:  
van een capaciteit die in overeenstemming is met de aanbevolen hoeveelheid vis per liter.
- Hoeveelheid vis per liter:  
een maximale bezettingsgraad van 1,0 g/l voor statische en semi-statische tests wordt aanbevolen; voor doorstroomsystemen kan een grotere hoeveelheid vis per liter aanvaardbaar zijn.
- Testconcentratie:  
een controle en ten minste vijf concentraties die een constante factor verschillen, welke niet groter is dan 1,8; het gebied met een sterfte van 0 % tot 100 % moet worden bestreken.
- Water:  
zie 1.6.1.2.
- Licht:  
dagelijks een fotoperiode van 12 tot 16 uur.
- Temperatuur:  
aangepast aan de soort (aanhangel 2) maar binnen  $\pm 1$  °C gedurende elke afzonderlijke test.
- Zuurstofgehalte:  
ten minste 60 % van de verzadigingswaarde voor lucht bij de gekozen temperatuur.
- Voeren:  
achterwege laten.

De vissen worden gecontroleerd na de eerste 2-4 uur en ten minste elke 24 uur. Vissen worden geacht dood te zijn indien aanraking van de staartwortel geen reactie teweeg brengt en geen ademhalingsbewegingen zichtbaar zijn. Dode vissen worden, zodra zij zijn opgemerkt, verwijderd en de sterfte wordt geregistreerd.

Er wordt aantekening gemaakt van zichtbare afwijkingen (bij voorbeeld evenwichtsverlies, veranderingen in zwemgedrag, ademhalingsfunctie, pigmentatie enzovoort).

De pH, zuurstofconcentratie en temperatuur moeten dagelijks worden gemeten.

## 2. GEGEVENS EN EVALUATIE

Zet voor alle aanbevolen blootstellingsperioden het sterftepercentage uit tegen de concentratie op logaritmischeschijnlijksheidspapier. Trek op het oog een lijn die zo goed mogelijk aansluit bij de punten en lees de concentratie af die overeenkomt met de 50 % respons (zie figuur in aanhangsel 3).

Dit is een schatting van de  $LC_{50}$ -waarde voor de desbetreffende testduur.

Als de gegevens toereikend zijn kunnen de mediane concentratie  $LC_{50}$  en de bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen ( $p = 0,05$ ) worden geschat met behulp van standaardprocedures.

De  $LC_{50}$ -waarde dient te worden afgerond op een (of ten hoogste twee) significante cijfers.

In die gevallen waarin de helling van de concentratie/responspercentage-curve te steil is voor een berekening van de  $LC_{50}$ -waarde, is een grafische schatting van deze waarde voldoende.

Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 1,8 slechts een sterfte van 0 respectievelijk 100 % geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de  $LC_{50}$  ligt.

Indien mocht blijken dat de stabiliteit of homogeniteit van de teststof niet kan worden gehandhaafd, dan dient dit te worden vermeld en dient voorzichtigheid betracht te worden bij de interpretatie van de resultaten.

### 3. RAPPORTAGE

Het testrapport moet indien mogelijk bevatten:

- gegevens over het testorganisme (wetenschappelijke naam; stam; leverancier; elke voorbehandeling; afmeting en aantal dat in elke testconcentratie gebruikt is;
- lijst van de gebruikte concentraties en alle beschikbare gegevens over de stabiliteit van de concentraties van de teststof in de gebruikte oplossing;
- beschrijving van de testuitrusting;
- als chemische analyses zijn uitgevoerd, dienen de toegepaste methoden en de verkregen resultaten te worden vermeld;
- bron van het verdunningswater alsmede belangrijkste chemische kenmerken (pH, hardheid, temperatuur);
- concentratie van eventuele hulpstoffen;
- voor stoffen met een geringe oplosbaarheid in water, de methode voor de bereiding van de stam- en testoplossingen;
- redenen voor de keuze van de testprocedure alsmede verdere details (bij voorbeeld testduur, statisch, semi-statisch, doseersnelheid, doorstromingsnelheid, of er belucht is, hoeveelheid vis per liter, enzovoort);
- lichtregime;
- hoogste testconcentratie die binnen de testperiode geen sterfte veroorzaakte;
- laagste testconcentratie die binnen de testperiode 100 % sterfte veroorzaakte;
- cumulatieve mortaliteit in elke concentratie en in de blanco (controle met, zo nodig, hulpstof) op de aanbevolen waarnemingstijden;
- de  $LC_{50}$ -waarden op elk van de aanbevolen waarnemingstijden (met zo mogelijk de 95 % betrouwbaarheidsintervallen);
- statistische procedures voor de bepaling van de  $LC_{50}$ -waarden;
- grafiek van deze concentratie/respons-curve aan het einde van de test;
- zo mogelijk de helling van de concentratie/respons-curve aan het einde van de test en de bijbehorende 95 % betrouwbaarheidsintervallen;
- iedere 24 uur het zuurstofgehalte, de pH-waarde en de temperatuur van de testoplossingen;
- als een referentiestof wordt gebruikt moeten ook hiervan de resultaten worden vermeld;
- vermeld moet worden of aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

### 4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81)30 Final.

*Aanhangsel 1***Synthetisch water***Voorbeeld van een geschikt verdunningswater*

Alle chemicaliën moeten van pro-analyse kwaliteit zijn.

Het water moet gedestilleerd of gedeïoniseerd water van goede kwaliteit zijn met een geleidingsvermogen van minder dan  $5 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

*Stamoplossingen*

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (calciumchloridedihydraat)	11,76 g
oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (magnesiumsulfaatheptahydraat)	4,93 g
zelfde procedure.	
NaHCO <sub>3</sub> (natriumwaterstofcarbonaat)	2,59 g
zelfde procedure.	
KCl (kaliumchloride)	0,23 g
zelfde procedure.	

*Synthetisch verdunningswater*

Meng 25 ml van elk van de vier stamoplossingen met water en vul dit aan tot 1 liter.

Belucht tot het zuurstofgehalte overeenkomt met de verzadigingswaarde voor lucht.

De pH moet  $7,9 \pm 0,3$  zijn.

De pH zo nodig bijstellen met NaOH (natriumhydroxide) of HCl (waterstofchloride).

Het aldus verkregen verdunningswater wordt gedurende ongeveer 12 uur weggezet en behoeft niet verder te worden belucht.

De som van de Ca- en Mg-ionen in deze oplossing bedraagt 2,5 mmol/l. De verhouding van de Ca- en Mg-ionen is 4:1 en die van de Na- en K-ionen 10:1. De totale alkaliteit van deze oplossing is 0,8 mmol/l.

Eventuele afwijkingen van de bereidingswijze van het verdunningswater mogen niet leiden tot een andere samenstelling of andere eigenschappen van het water.

## Aanhangsel 2

## Voor tests aanbevolen vissoorten

Aanbevolen soort	Aanbevolen testtemperatuur (°C)	Aanbevolen totale lengte van het proefdier (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebravis	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) Gewone karp	20 — 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) Japans rijstvisje	20 — 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 — 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Linnaeus 1758) Zonnebaars	20 — 24	5,0 ± 2,0
<i>Salmo gairdneri</i> (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Regenboogforel	13 — 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Goudwinde	20 — 24	6,0 ± 2,0

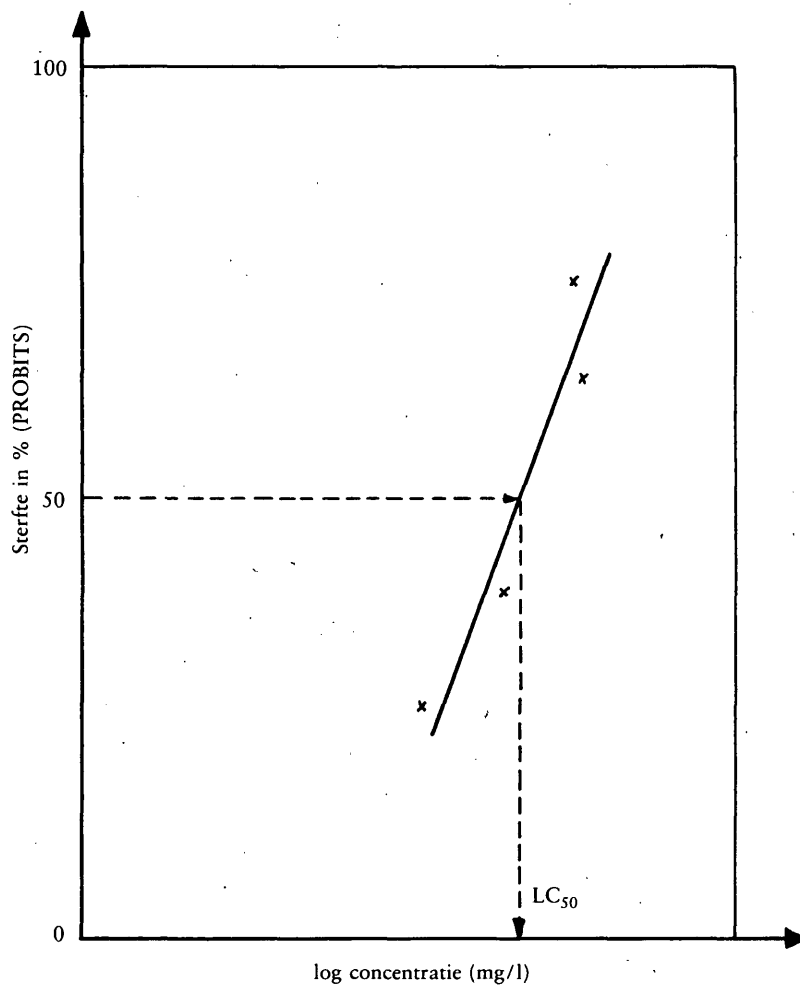
## Herkomst

Bovengenoemde vissen laten zich gemakkelijk kweken en/of zijn het gehele jaar ruim verkrijgbaar. Zij kunnen worden geteeld en gekweekt in viskwekerijen of in het laboratorium onder omstandigheden waarbij ziektekiemen en parasieten onder controle gehouden worden, zodat de proefdieren gezond zijn en hun afkomst bekend is. Deze vissen zijn in veel delen van de wereld beschikbaar.

## Aanhangsel 3

## Voorbeeld van een concentratie/sterftepercentage-curve

Voorbeeld van de bepaling van de  $LC_{50}$ -waarde waarbij logaritmic-waarschijnlijkheidspapier wordt gebruikt



*Aanhangsel 4***Lijst van voorbeelden van standaardprocedures**

- (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 7346/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. CEE 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, p. 99.

## C. 2. ACUTE TOXICITEIT VOOR DAPHNIA'S

### 1. METHODE

#### 1.1. Inleiding

Alvorens de test te beginnen is het wenselijk om, voor zover mogelijk, te beschikken over gegevens over de oplosbaarheid in water, dampspanning, chemische stabiliteit, dissociatieconstanten en biologische afbreekbaarheid van de stof.

Zowel bij de voorbereiding als bij de interpretatie van de testresultaten moet rekening worden gehouden met andere gegevens (bij voorbeeld structuurformule, zuiverheidsgraad, aard en percentage van van belang zijnde onzuiverheden, aanwezigheid en hoeveelheden van additieven en de *n*-octanol/water-verdelingscoëfficiënt).

#### 1.2. Definities en eenheden

Aan de eis van de richtlijn met betrekking tot de  $LC_{50}$  voor dafnia's wordt beschouwd te zijn voldaan door de bepaling van de  $EC_{50}$  zoals beschreven in deze testmethode.

In deze test wordt de acute toxiciteit uitgedrukt als de mediaan effectieve concentratie ( $EC_{50}$ ) voor immobilisatie. Dit is de concentratie (uitgaande van de beginwaarden) waardoor 50 % van de dafnia's in een testgroep wordt geïmmobiliseerd binnen een blootstellingsperiode van 24 uur. De 48-uur  $EC_{50}$  voor immobilisatie kan desgewenst eveneens worden bepaald.

##### Immobilisatie

Dieren die niet in staat zijn om gedurende een periode van 15 seconden nadat het testvat zachtjes is bewogen, te zwemmen, worden geacht immobiel te zijn.

Alle concentraties van de teststof worden opgegeven als gewicht per gewicht (parts per million).

#### 1.3. Referentiestoffen

Een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van geteste soorten onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate is veranderd.

Voor deze test worden geen referentiestoffen gespecificeerd.

#### 1.4. Principe van de testmethode

De dafnia's worden gedurende 24 uur blootgesteld aan de teststof die in een aantal uiteenlopende concentraties aan het water is toegevoegd; zo nodig kan deze tijdsduur worden verlengd tot 48 uur.

Als de concentraties van de teststof een geschikt gebied beslaan, zal onder overigens gelijke testomstandigheden het zwemvermogen van de dafnia's door verschillende concentraties van de teststof gemiddeld in verschillende mate worden beïnvloed. Verschillende concentraties hebben tot gevolg dat verschillende percentages dafnia's niet meer kunnen zwemmen aan het einde van de test. De concentraties die een immobilisatie van 0 tot 100 % veroorzaken, worden rechtstreeks aan de waarnemingen ontleend, terwijl de 24-uur  $EC_{50}$  (of de 48-uur  $EC_{50}$ ) zo mogelijk door berekening wordt bepaald.

Voor deze methode wordt een statisch systeem gebruikt. Testoplossingen worden dan ook niet vernieuwd tijdens de blootstellingsperiode.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

— De immobilisatie in de controlegroepen mag aan het einde van de test niet hoger zijn dan 10 %.

- De zuurstofconcentratie mag aan het eind van de test niet lager zijn dan 2 mg/l.
- De dafnia's dienen in ieder geval in de controlegroep niet aan het oppervlak van het water vast te zitten.

## 1.6. Beschrijving van de testmethode

### 1.6.1. Reagentia

#### 1.6.1.1. Oplossingen van de teststoffen

Stamoplossingen van de gewenste sterkte worden bereid door de stof op te lossen in gedeïoniseerd of gedestilleerd water volgens 1.6.1.2.

Stamoplossingen van slecht in water oplosbare stoffen kunnen worden bereid door ultrasonische dispersie of, zo nodig, het gebruik van organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen. Indien dergelijke hulpstoffen worden gebruikt, moeten de controle-dafnia's worden blootgesteld aan dezelfde concentratie van de hulpstof als die welke is gebruikt in de hoogste concentratie van de teststof. De concentratie van dergelijke hulpstoffen mag niet hoger zijn dan 0,1 mg/l.

De gekozen testconcentraties worden bereid door de stamoplossing te verdunnen. Indien hoge concentraties worden onderzocht kan de stof rechtstreeks worden opgelost in het verdunningswater.

De test dient te worden uitgevoerd zonder correctie van de pH. Indien er aanwijzingen zijn voor een duidelijke verandering van de pH, wordt geadviseerd om de test te herhalen met gecorrigeerde pH en de resultaten te vermelden. In dat geval dient de pH-waarde van de stamoplossing te worden aangepast aan de pH-waarde van het verdunningswater, tenzij er speciale redenen zijn om dit niet te doen. Voor dit doel verdienen HCl en NaOH de voorkeur. Deze pH-correctie dient zodanig te geschieden dat de concentratie van de teststof in de stamoplossing niet in belangrijke mate wordt gewijzigd. Indien tengevolge van de correctie een chemische reactie of fysische neerslagvorming van de teststof mocht optreden, dan dient dit te worden vermeld in het rapport.

#### 1.6.1.2. Teelt- en verdunningswater

Elk water, zowel natuurlijk als synthetisch water (zie aanhangsel), dat geschikt is voor de teelt van dafnia's, kan voor deze test worden gebruikt. Om de noodzaak van adaptatie vóór de test te vermijden wordt aanbevolen om voor de teelt hetzelfde water te gebruiken als voor de test.

### 1.6.2. Apparatuur

Er moet gebruik worden gemaakt van gangbare laboratoriumapparatuur en uitrusting. Materiaal dat rechtstreeks in contact komt met de testoplossingen moet bij voorkeur geheel van glas zijn.

- Zuurstofmeter (met micro-elektrode of andere voorzieningen voor de meting van zuurstof in monsters met een gering volume).
- Adequate apparatuur voor de temperatuurbeheersing.
- pH-meter.
- Uitrusting voor de bepaling van de hardheid van water.

### 1.6.3. Testorganisme

*Daphnia magna* of *Daphnia pulex* die aan het begin van de test 6 tot 24 uur oud zijn, in het laboratorium gekweekt, vrij van zichtbare ziekten en met een bekende geschiedenis (bij voorbeeld: kweek, eventuele voorbehandelingen enzovoort).



#### 1.6.4. Testprocedure

De definitieve test kan worden voorafgegaan door een test om het meetgebied vast te stellen. Deze verschaft gegevens over de voor de eigenlijke test te gebruiken reeks concentraties. Naast de testreeks wordt een controletest zonder de teststof uitgevoerd; zonodig wordt de hulpstof toegevoegd.

Dafnia's worden als volgt aan de stof blootgesteld:

- tijdsduur:  
ten minste 24 uur;
- aantal dieren:  
ten minste 20 dieren in iedere testconcentratie, bij voorkeur verdeeld in vier groepen van vijf dieren of twee groepen van tien;
- benodigd volume:  
voor ieder dier dient ten minste 2 ml testoplossing aanwezig te zijn;
- testconcentratie:  
de testoplossing moet onmiddellijk voor het toevoegen van de dafnia's worden bereid, bij voorkeur zonder andere oplosmiddelen dan water. De concentraties worden zo bereid dat ze een meetkundige reeks vormen, met een reden van 1,8 na 24 uur een immobilisatie van 0 en 100 % veroorzaken alsmede een reeks tussenliggende immobilisatiewaarden aan de hand waarvan de EC<sub>50</sub>-waarde na 24 uur kan worden berekend. Daarnaast dient een controletest te worden uitgevoerd;
- water:  
zie 1.6.1.2;
- licht:  
een licht-donker cyclus naar keuze, volledige duisternis is aanvaardbaar;
- temperatuur:  
de testtemperatuur moet tussen 18 en 22 °C liggen; voor iedere afzonderlijke test moet de temperatuur evenwel constant blijven binnen  $\pm 1,0$  °C;
- beluchting:  
de testoplossing mag niet met luchtbellen worden belucht;
- voeren:  
achterwege laten.

De pH en de zuurstofconcentratie van de controles en van alle testoplossingen moeten na afloop van de test worden gemeten; de pH van de testoplossingen mag niet worden gewijzigd.

Vluchtige stoffen moeten worden getest in volledig gevulde, afgesloten vaten, die groot genoeg zijn om zuurstofgebrek te voorkomen.

De dafnia's worden in ieder geval geïnspecteerd na een blootstellingsperiode van 24 uur en nogmaals na 48 uur als de test is verlengd.

## 2. GEGEVENS EN EVALUATIE

Zet op log-probitpapier het cumulatieve percentage immobilisatie in elke concentratie na een blootstellingsperiode van ten minste 24 uur uit tegen de concentratie. Trek een lijn die zo goed mogelijk aansluit bij de punten en lees de concentratie af die overeenkomt met 50 % respons.

Als de gegevens toereikend zijn, kunnen de mediane concentratie en de bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen ( $p = 0,05$ ) worden geschat met behulp van standaardprocedures.

De EC<sub>50</sub>-waarde dient te worden afgerond op één (of ten hoogste twee) significant(e) cijfer(s).

In die gevallen waarin de helling van de concentratie/responspercentage-curve te steil is voor berekening van de EC<sub>50</sub>-waarde, is een grafische schatting van deze waarde voldoende.

Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 1,8 slechts 0 en 100 % immobilisatie geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de EC<sub>50</sub> ligt.

Indien mocht blijken dat de stabiliteit of homogeniteit van de teststof niet kan worden gehandhaafd, dan dient dit te worden vermeld en is voorzichtigheid te betrachten bij de interpretatie van de resultaten.

### 3. RAPPORTAGE

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

- gegevens over het testorganisme (wetenschappelijke naam; stam; leverancier; elke voorbehandeling; kweekmethode — met inbegrip van de herkomst van het voer, de soort en hoeveelheid voer en de frequentie waarmee gevoerd is);
- in iedere testconcentratie gebruikte aantallen dafnia's;
- lijst van de gebruikte concentraties en alle beschikbare gegevens over de stabiliteit van de concentraties van de opgeloste teststof;
- beschrijving van de testvaten; hoeveelheden oplossing in elk testvat, aantal gebruikte dieren;
- in geval van chemische analyses: toegepaste methoden en resultaten;
- herkomst van het verdunningswater alsmede de belangrijkste chemische kenmerken;
- methode voor de bereiding van de stam- en testoplossingen;
- concentraties van eventuele hulpstoffen (organische oplosmiddelen, dispergeermiddelen, enzovoort);
- lichtregime;
- hoogste testconcentratie die binnen de testperiode geen immobilisatie veroorzaakte;
- laagste testconcentratie die binnen de testperiode de immobilisatie 100 % veroorzaakte;
- cumulatieve immobilisatie in de blanco, in de controle met de hulpstof en in iedere geteste concentratie, op de aanbevolen waarnemingstijden (24 uur of 24 en 48 uur);
- de EC<sub>50</sub>-waarden op elk van de aanbevolen waarnemingstijden (met zo mogelijk de 95 %-betrouwbaarheidsintervallen);
- grafiek van deze concentratie/responspercentage-curve aan het einde van de test;
- statistische procedures voor de bepaling van de EC<sub>50</sub>-waarden;
- zo mogelijk de helling van de concentratie/responspercentage-curve na 24 uur en de bijbehorende 95 %-betrouwbaarheidsintervallen;
- zuurstofgehalte, pH-waarden en temperatuur van de testoplossingen;
- als een referentiestof wordt gebruikt moeten hiervan de naam en de resultaten worden vermeld;
- vermeld moet worden of aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

### 4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 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.
- (4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).

*Aanhangsel***Synthetisch water***Voorbeeld van een geschikt verdunningswater*

Alle chemicaliën moeten van pro-analyse kwaliteit zijn.

Het water moet gedestilleerd of gedeïoniseerd water van goede kwaliteit zijn met een geleidingsvermogen van minder dan  $5 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

*Stamoplossingen*

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (calciumchloridedihydraat) oplossen in water tot een totaal volume van 1 liter.	11,76 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (magnesiumsulfaatheptahydraat) zelfde procedure.	4,93 g
NaHCO <sub>3</sub> (natriumwaterstofcarbonaat) zelfde procedure.	2,59 g
KCl (kaliumchloride) zelfde procedure.	0,23 g

*Synthetisch verdunningswater*

Meng 25 ml van elk van de vier stamoplossingen met water en vul dit aan tot 1 liter.

Belucht tot het zuurstofgehalte overeenkomt met de verzadigingswaarde voor lucht.

De pH moet  $7,9 \pm 0,3$  zijn.

De pH zo nodig bijstellen met NaOH (natriumhydroxide) of HCl (waterstofchloride).

Het aldus verkregen verdunningswater wordt gedurende ongeveer 12 uur weggezet en hoeft niet verder te worden belucht.

De som van de Ca- en Mg-ionen in deze oplossing bedraagt 2,5 mmol/l. De verhouding van de Ca- en Mg-ionen is 4:1 en die van de Na- en K-ionen 10:1. De totale alkaliteit van deze oplossing is 0,8 mmol/l.

Eventuele afwijkingen van de bereidingswijze van het verdunningswater mogen niet leiden tot een andere samenstelling of andere eigenschappen van het water.

## C. 3. DEGRADATIE

## BIOLOGISCHE AFBRAAK: GEWIJZIGDE OESO SCREENINGTEST

## 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

Het doel van deze methode is de meting van de biologische afbreekbaarheid van in water oplosbare, niet-vluchtige organische verbindingen in een aëroob waterig medium met een beginconcentratie overeenkomend met 5—40 mg DOC/l (opgelost organisch koolstof per liter). Als de detectiegrenzen van de organisch-koolstofanalyseapparaten worden verlaagd, kan het, met name voor toxische verbindingen, voordelig zijn om lagere testconcentraties te gebruiken. Het organisch-koolstofgehalte van het testmateriaal moet worden bepaald.

De methode is alleen van toepassing op die organische testmaterialen die bij de in de test gebruikte concentratie:

- in water tenminste oplosbaar zijn tot de te onderzoeken concentratie (5—40 mg DOC/l);
- een verwaarloosbare dampspanning hebben;
- niet remmend werken op bacteriën;
- niet in belangrijke mate worden geadsorbeerd aan glazen oppervlakken.

Gegevens over de onderlinge verhoudingen van de belangrijkste bestanddelen van het testmateriaal zijn nuttig voor de interpretatie van de verkregen resultaten, met name indien de gevonden waarden laag of marginaal zijn.

Gegevens over de toxiciteit van de stof voor micro-organismen kunnen nuttig zijn voor de interpretatie van lage gevonden waarden en voor de keuze van geschikte testconcentraties.

## 1.2. Definities en eenheden

De afbraak is gedefinieerd als het percentage DOC-verwijdering ten opzichte van het testmateriaal.

$$D_t = \left[ 1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

waarin:

- $D_t$  = afbraak in procenten DOC-verwijdering op het tijdstip  $t$ ;
- $C_0$  = beginconcentratie DOC van de voedingsoplossing (mg DOC/l);
- $C_t$  = DOC-concentratie van de voedingsoplossing op tijdstip  $t$  (mg DOC/l);
- $C_{bl(0)}$  = beginconcentratie DOC van de blanco (mg DOC/l);
- $C_{bl(t)}$  = DOC-concentratie van de blanco op tijdstip  $t$  (mg DOC/l).
- DOC = opgelost organisch koolstof („dissolved organic carbon”).

## 1.3. Referentiestoffen

Het is wenselijk om de activiteit van het inoculum te controleren met behulp van geschikte controlechemicaliën. Hiervoor kan bij voorbeeld aniline, natriumacetaat of natriumbenzoaat worden gebruikt. Deze stoffen moeten een DOC-verwijdering van  $\geq 70\%$  vertonen binnen 10 dagen gerekend vanaf de eerste dag waarop de waargenomen biologische afbraak groter was dan 10%. Deze resultaten moeten worden verkregen binnen de testduur van 28 dagen, anders wordt de test als ongeldig beschouwd, en dient te worden herhaald met een inoculum van een andere herkomst.

#### 1.4. Principe van de testmethode

Een van tevoren bepaalde hoeveelheid van de verbinding wordt opgelost in een anorganisch medium (minerale voedingsoplossing, versterkt met een oplossing van sporenelementen en essentiële vitamines) zodat de concentratie overeenkomt met 5—40 mg DOC/l. De oplossing wordt geënt met een kleine hoeveelheid micro-organismen uit een gemengde populatie en in het donker of althans zonder rechtstreekse belichting belucht bij 20—25 °C.

De afbraak wordt gedurende 28 dagen gevolgd aan de hand van DOC-analyse.

De procedure wordt gecontroleerd met behulp van een controlestof.

In een parallele test zonder test- of controlemateriaal moet een DOC-blanco worden bepaald.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

De reproduceerbaarheid van de methode werd aangetoond in de ringtest van de OESO en de EEG.

De laagste concentratie van de teststof waarvoor deze methode kan worden gebruikt, wordt grotendeels bepaald door de detectiegrens van de analyse op organisch koolstof (bij de huidige stand van de techniek 0,5 mg C/l) en door de concentratie van het opgeloste organisch koolstof in de voedingsoplossing.

#### 1.6. Beschrijving van de testmethode

##### 1.6.1. Reagentia

##### 1.6.1.1. Water

Gedeïoniseerd of gedestilleerd water, vrij van toxische stoffen (met name koper), voor algemeen gebruik als oplosmiddel. Water dat door destillatie of ionenwisseling is gedeïoniseerd, is bruikbaar.

Het gedestilleerde water mag niet meer dan 10 % van het door het testmateriaal geïntroduceerde organisch koolstof bevatten.

Zeer zuiver water is nodig met het oog op de DOC-analyses in het concentratiegebied van 0—40 mg/l. De verontreinigingen zijn het gevolg van onzuiverheden in het water zelf, maar ook van de harsen van de ionenwisselaar en van microbiële ontwikkelingen (bacteriën, algen onder invloed van licht, enzovoort). Er mag voor één testreeks slechts één watervoorraad worden gebruikt, welke van tevoren met DOC-analyse moet worden gecontroleerd. Geschikt water kan zo nodig worden verkregen door UV-bestraling of op andere wijze.

##### 1.6.1.2. Voedingsoplossing

De voedingsoplossing bevat per liter 1 ml van elk van de hieronder staande oplossingen a) tot en met f) in water (1.6.1.1) (p.a. betekent pro analyse).

- |  |               |
|--|---------------|
| a) $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (kaliumdiwaterstoffosfaat)                                   | p. a. 8,50 g  |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (kaliumwaterstoffosfaat)  | p. a. 21,75 g |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (dinatriumwaterstoffosfaatdihydraat) | p. a. 33,40 g |
| $\text{NH}_4\text{Cl}$ (ammoniumchloride)  | p. a. 20,00 g |
| Oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.<br>De pH moet 7,2 zijn.           |               |
| b) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (magnesiumsulfaatheptahydraat)              | p. a. 22,50 g |
| Oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.                                   |               |
| c) $\text{CaCl}_2$ (calciumchloride)   | p. a. 27,50 g |
| Oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.                                   |               |

- d)  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (ijzer(III)chloridehexahydraat) p. a. 0,25 g  
Oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.  
Deze oplossing wordt vlak voor het gebruik vers bereid.
- e) Oplossing van sporenelementen p. a. 39,9 mg  
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (mangaansulfaat tetrahydraat)  
(= 30,23 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )  
 $\text{H}_3\text{BO}_3$  (boorzuur) p. a. 57,2 mg  
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (zinksulfaat heptahydraat) p. a. 42,8 mg  
 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (ammoniumheptamolybdaat(VI)) p. a. 34,7 mg  
(= 36,85 mg  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )  
Fe-chelaat ( $\text{FeCl}_3 \cdot \text{EDTA}$ ) p. a. 100,0 mg  
Oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.  
Sterilisatie van de stamoplossing van sporenelementen bij 120 °C, 2 atm, 20 min.
- f) Vitamineoplossing  
Biotine p. a. 0,2 mg  
Nicotinezuur p. a. 2,0 mg  
Thiamine p. a. 1,0 mg  
p-Aminobenzoëzuur p. a. 1,0 mg  
Pantotheenzuur p. a. 1,0 mg  
Pyridoxamine p. a. 5,0 mg  
Cyanocobalamine p. a. 2,0 mg  
Foliumzuur p. a. 5,0 mg  
Oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 100 ml.  
De oplossing wordt steriel gefiltreerd door 0,2 µm membraanfilters. In plaats van oplossing 1.6.1.2. f) kan 15 mg gistextract per 100 ml water (1.6.1.1) worden gebruikt.

## 1.6.1.3. Controlestoffen

Aniline (vers gedestilleerd), natriumacetaat, natriumbenzoaat.

## 1.6.1.4. Kwik(II)chloride-oplossing

1 %  $\text{HgCl}_2$  in water (1.6.1.1).

## 1.6.2. Apparatuur

1.6.2.1. Schudmachine voor erlenmeyerkolven van twee liter, met automatische temperatuurregeling of opgesteld in een ruimte met constante temperatuur van 20–25 °C.

1.6.2.2. Erlenmeyerkolven van 2 liter met nauwe hals (geribbelde kolven worden aanbevolen). De kolven moeten voor het gebruik zorgvuldig worden gereinigd, bij voorbeeld met alcoholisch zoutzuur, en worden gespoeld en gedroogd om verontreiniging door restanten van voorafgaande proeven te vermijden. Ook wanneer de kolven voor het eerst worden gebruikt, moeten deze worden schoongemaakt, omdat zij verontreinigingen kunnen bevatten.

1.6.2.3. Membraanfiltratieapparaat.

1.6.2.4. Membraanfilters 0,2 µm.

1.6.2.5. Koolstofanalyseapparaat.

## 1.6.3. Bereiding van het inoculum

Voor het inoculum kan worden gekozen uit de volgende vier mogelijkheden op voorwaarde dat de levensvatbaarheid wordt gecontroleerd met behulp van een controlestof (1.6.1.3).

#### 1.6.3.1. Inoculum uit secundair afvalwater

Het inoculum wordt bij voorkeur gehaald uit secundair afvalwater van goede kwaliteit, afkomstig van een zuiveringsinstallatie met voornamelijk huishoudelijk rioolwater. Het effluent moet tijdens de periode tussen monsterneming en gebruik worden bewaard onder aërobe omstandigheden. Voor de bereiding van het inoculum wordt het monster door een grof filter gefiltreerd, waarbij de eerste 200 ml wordt verwijderd. Het filtraat wordt aëroob bewaard tot het gebruik. Het inoculum moet worden gebruikt op de dag waarop het is gewonnen.

#### 1.6.3.2. Inoculum uit grond

100 g grond (vruchtbaar, niet steriel) wordt gesuspenseerd in 1 000 ml chloorvrij drinkwater (grond met een uitzonderlijk hoog gehalte aan klei, zand of organisch koolstof is ongeschikt). Na roeren laat men de suspensie gedurende 30 minuten bezinken.

De bovenstaande vloeistof wordt door grof filterpapier gefiltreerd, waarbij de eerste 200 ml wordt verwijderd. Het filtraat wordt onmiddellijk belucht en blijft belucht tot het moment van gebruik. Het inoculum moet worden gebruikt op de dag waarop het is gewonnen.

#### 1.6.3.3. Inoculum uit oppervlaktewater

Een hoeveelheid entmateriaal wordt betrokken uit geschikt oppervlaktewater. Het monster wordt gefiltreerd door grof filterpapier, waarbij de eerste 200 ml wordt verwijderd. Het filtraat wordt aëroob bewaard tot gebruik. Het inoculum moet worden gebruikt op de dag waarop het is gewonnen.

#### 1.6.3.4. Samengesteld inoculum

Gelijke volumina van de drie entmonsters worden goed gemengd, waarna het uiteindelijke inoculum uit dit mengsel wordt betrokken.

De geschiktheid van het inoculum wordt gecontroleerd met behulp van een controlestof (1.6.1.3).

#### 1.6.4. *Testprocedure*

De testmaterialen worden gelijktijdig in duplo onderzocht, samen met de controlestof (1.6.1.3). Ook wordt een blanco test uitgevoerd met inoculum maar zonder test- of controlemateriaal voor de bepaling van de DOC-blanco's.

Er wordt een stamoplossing van het testmateriaal in water (1.6.1.1) bereid. Van deze stamoplossing wordt zoveel aan de voedingsoplossing (1.6.1.2) toegevoegd, dat een koolstofconcentratie van 5—40 mg DOC/l wordt bereikt. Het controlemateriaal (1.6.1.3) wordt onderzocht bij een beginconcentratie die overeenkomt met 20 mg DOC/l.

Twee reactievaten (1.6.2.2) worden elk gevuld met 900 ml voedingsoplossing die wordt geënt met 0,5 ml/l inoculum (1.6.3). De opening van het vat wordt zodanig met bij voorbeeld aluminiumfolie bedekt dat de uitwisseling van lucht tussen de kolf en de omgeving niet al teveel wordt belemmerd (watten zijn ongeschikt in verband met de DOC-analyse). De vaten worden vervolgens in de schudmachine geplaatst. De temperatuur moet tijdens de test constant op 20—25 °C worden gehouden en de vaten moeten worden afgeschermd van licht. De lucht moet vrij zijn van verontreinigingen en toxische stoffen (gechloreerde oplosmiddelen, enzovoort).

In de loop van de biologische afbreekbaarheidstest worden de DOC-concentraties in duplo bepaald op de 1e, de 27e en 28e dag. Daarnaast moeten nog eens ten minste drie analyses worden uitgevoerd (omstreeks de 7e, 14e en 21e dag) om het verloop van de afbraak te volgen.

Voor elke bepaling wordt niet meer dan de noodzakelijke hoeveelheid voedingsoplossing gebruikt. Het centrifugeren of de membraanfiltratie die aan de eigenlijke koolstofbepaling vooraf gaat, vereist verschillende volumina voor verschillende instrumenten. Verliezen van de voedingsoplossing tengevolge van verdamping moeten worden aangevuld met water (1.6.1.1) in de vereiste hoeveelheden. De voedingsoplossing moet goed worden gemengd voordat een monster wordt genomen. Materiaal dat vastzit aan de wand van het vat moet worden opgelost of gesuspenseerd vóór monsterneming. De membraanfiltratie of het centrifugeren moet onmiddellijk worden uitgevoerd. De gefiltreerde of gecentrifugeerde monsters moeten op dezelfde dag worden geanalyseerd. Zo niet dan dienen deze te

worden geconserveerd met 0,05 ml van de  $\text{HgCl}_2$ -oplossing (1.6.1.4) per 10 ml voedingsoplossing of door bewaring bij 2—4 °C voor maximaal 24 uur, of bij temperaturen onder -18 °C voor langere perioden.

Indien voor de 28e dag een plateau wordt waargenomen, mag de test worden beëindigd. Als tegen de 28e dag de afbraak duidelijk is ingezet, maar nog geen plateau heeft bereikt, kan het als goed gebruik beschouwd worden om het experiment met een of twee weken te verlengen.

Alle stappen vereisen grote zorgvuldigheid en schone vaten, pipetten, enzovoort (steriliteit is niet vereist).

#### 1.6.5. DOC-bepalingen

Membranefilters zijn geschikt indien vaststaat dat deze tijdens de filtratie geen koolstof afgeven en ook de verbinding niet adsorberen.

Indien de monsters worden gecentrifugeerd, moet dit gebeuren bij  $40\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$  (ongeveer 4 000 g) gedurende 15 minuten, zo mogelijk in een gekoelde centrifuge, in ieder geval minder dan 40 °C.

(Opmerking: het onderscheid TOC:DOC door middel van centrifugering schijnt bij zeer lage concentraties niet goed te werken, omdat of niet alle bacteriën worden verwijderd of koolstof als onderdeel van het bacterieel plasma weer wordt opgelost. Bij hogere testconcentratie ( $\geq 10\text{ mg C/l}$ ) en dezelfde kleine hoeveelheid inoculum schijnt de fout als gevolg van het centrifugeren relatief klein te zijn.)

Het uit de voedingsoplossing genomen monster (ongeveer 30 ml) wordt gecentrifugeerd of direct door het membraan in het filterapparaat gefilterd (1.6.2.3) waarbij de in 1.6.2.4 beschreven membranefilters worden gebruikt. De eerste 20 ml van het filtraat wordt verwijderd.

De DOC-concentratie wordt in het overblijvende filtraat (ongeveer 10 ml) tweemaal bepaald door middel van het TOC/DOC-instrument (1.6.2.5). Als het filtraat niet op dezelfde dag kan worden geanalyseerd, moet het worden bewaard zoals beschreven onder 1.6.4.

## 2. GEGEVENS EN EVALUATIE

De analysesresultaten worden geregistreerd op het bijgevoegde formulier (aanhangsel 1). De waarden van de biologische afbraak worden berekend volgens 1.2.

De DOC-concentraties worden afgerond op de dichtstbijzijnde 0,1 mg/l. De gemiddelden van de  $D_t$ -waarden worden afgerond op de dichtstbijzijnde hele procent.

Het verloop van de afbraaktest wordt grafisch weergegeven in een grafiek zoals afgebeeld in het bijgevoegde voorbeeld (aanhangsel 2).

De resultaten van de afbraaktest zijn geldig als aan de volgende voorwaarden is voldaan: in dezelfde testreeks moet het controlemateriaal een DOC-verwijdering van  $\geq 70\%$  opleveren binnen 10 dagen gerekend vanaf de eerste dag waarop de waargenomen biologische afbraak hoger was dan 10%. Dit resultaat dient te worden verkregen binnen de testduur van 28 dagen, anders dient de gehele reeks te worden verworpen.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. Testrapport

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

— de gegevens die moeten worden vermeld volgens het formulier (aanhangsel 1);



- het verloop van de afbraaktest, grafisch voorgesteld in een diagram dat opstartfase, afbraakfase, helling en tijdsinterval weergeeft (tijdsinterval betekent hier een periode van 10 dagen die begint op de dag dat de biodegradatie 10 % overschrijdt);
- bewijs van geldigheid van de test (DOC-verwijdering voor de controlestof  $\geq 70$  % in 10 dagen gerekend vanaf de dag waarop de afbraak groter was dan 10 %, resultaat verkregen binnen de testduur van 28 dagen).

### 3.2. Interpretatie van de resultaten

Ten gevolge van het stringente karakter van deze test betekent een lage gevonden waarde niet noodzakelijk dat de teststof niet biologisch afbreekbaar is in het milieu. Het vormt een aanwijzing dat nader onderzoek nodig is om dit vast te stellen.

Stoffen met een hoog DOC-verlies in deze test moeten worden beschouwd als gemakkelijk biologisch afbreekbaar, mits dit niveau wordt bereikt binnen het tijdsinterval van 10 dagen gerekend vanaf de eerste dag waarop de waargenomen biologische afbraak hoger was dan 10 %.

### 4. LITERATUUR

- (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, No 2, 1979, p. 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, No 1, 1981, p. 45—55.

Aanhangsel 1

Biologische afbraak: Gewijzigde OECD screeningtest

Onderzoekinstelling: .....

Testmateriaal: .....

Exp. nr.: .....

Testgegevens

Theoretische concentratie: ..... mg/l DOC

Koolstofbepalingen

	Kolf nr.		DOC-concentraties na x dagen (mg/l)						
			0 (C <sub>0</sub> )						
<i>Test:</i> minerale voedingsoplossing met testmateriaal en met ent	1	a <sub>1</sub>							
		a <sub>2</sub>							
		$C_{a(t)} = \frac{a_1 + a_2}{2}$							
	2	b <sub>1</sub>							
		b <sub>2</sub>							
		$C_{b(t)} = \frac{b_1 + b_2}{2}$							
<i>Blanco:</i> minerale voedingsoplossing zonder testmateriaal maar met ent	3	bl <sub>1</sub>							
		bl <sub>2</sub>							
		$C_{bl(t)} = \frac{bl_1 + bl_2}{2}$							

Uitwerking van de onbewerkte gegevens

Kolf nr.	Berekening van resultaten	% DOC-verwijdering na x dagen						
		0						
1	$D_1 = \left( 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right) \times 100$	0						
2	$D_2 = \left( 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right) \times 100$	0						
Gemiddelde	$D_t^* = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0						

\* D<sub>1</sub> en D<sub>2</sub> mogen niet worden gemiddeld indien aanzienlijke verschillen bestaan.

## Biologische afbraak: Gewijzigde OECD screeningtest (Formulier)

Onderzoekinstelling: .....

Leider van het onderzoek: .....

Begindatum van de test: ..... Exp. nr. ....

Testmateriaal: .....

Chemische structuur: .....

Stamoplossing:

	mg/l	mg/l TOC*	mg/l DOC**
Conc. testmateriaal			

\* Verschillen tussen DOC- en TOC-waarden wijzen op onvoldoende oplosbaarheid van het testmateriaal.

\*\* Alle DOC-waarden bepaald na membraanfiltratie of centrifugeren.

Koolstofanalyseapparaat: .....

Inoculum: .....

*Testresultaat* $D_t = \dots\dots\dots$  % DOC*Geldigheid van het resultaat*

Controlestof: .....

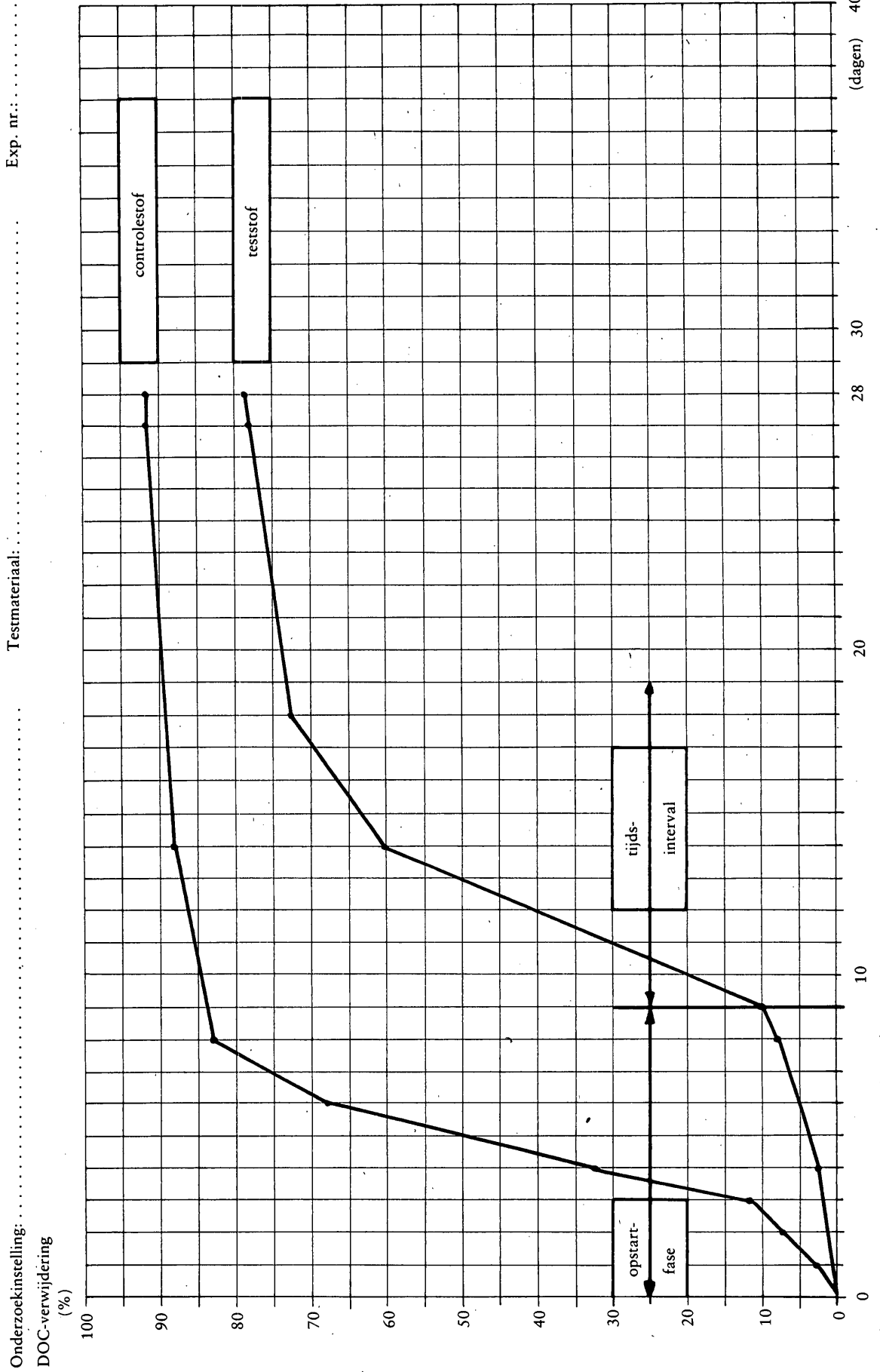
Resultaat: ..... % DOC-verwijdering na ..... dagen

Referentie-exp. nr.: .....

*Opmerkingen:*.....  
(Datum).....  
(Handtekening)

Aanhangsel 2

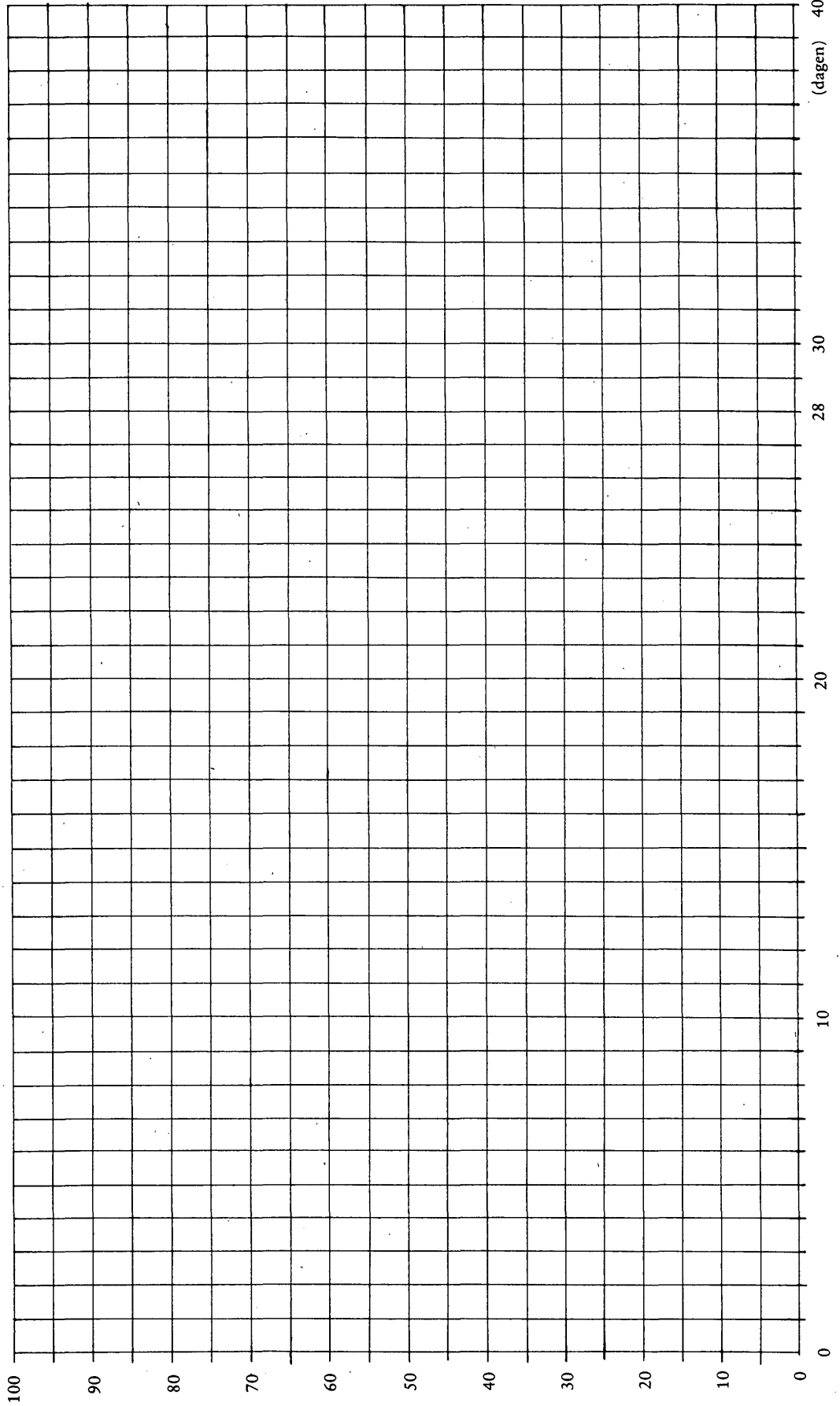
Gewijzigde OECD screeningtest



**Gewijzigde OECD screeningtest**

Onderzoekinstelling: ..... Testmateriaal: ..... Exp. nr.: .....

DOC-verwijdering (%)



## C. 4. DEGRADATIE

## BIOLOGISCHE AFBRAAK: GEWIJZIGDE AFNOR-TEST NFT 90/302

## 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

Het doel van deze methode is de meting van de biologische afbreekbaarheid van in water oplosbare, niet-vluchtige organische verbindingen in een aëroob waterig medium bij een beginconcentratie overeenkomend met 40 mg DOC/l (opgelost organisch koolstof per liter). Als de detectiegrenzen van de organisch-koolstofanalyseapparaten worden verbeterd, kan het met name voor toxische verbindingen, voordelig zijn om lagere testconcentraties te gebruiken.

Het organisch-koolstofgehalte van het testmateriaal moet worden bepaald.

De methode is alleen van toepassing op die organische testmaterialen die bij de in de test gebruikte concentratie:

- in water tenminste oplosbaar zijn tot de te onderzoeken concentratie (40 mg DOC/l);
- een verwaarloosbare dampspanning hebben;
- niet remmend werken op bacteriën;
- niet in belangrijke mate worden geadsorbeerd aan glazen oppervlakken.

Gegevens over de onderlinge verhoudingen van de belangrijkste bestanddelen van het testmateriaal zijn nuttig voor de interpretatie van de verkregen resultaten, met name indien de gevonden waarden laag zijn.

Gegevens over de toxiciteit van de stof voor micro-organismen kunnen nuttig zijn voor de interpretatie van lage gevonden waarden.

## 1.2. Definities en eenheden

De afbraak wordt gedefinieerd als het percentage DOC-verwijdering ten opzichte van het testmateriaal:

$$D_t = \left[ 1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

$D_t$  = afbraak in procenten DOC-verwijdering op tijdstip  $t$ ;

$C_0$  = beginconcentratie DOC van de voedingsoplossing (mg DOC/l);

$C_t$  = DOC-concentratie van de voedingsoplossing op tijdstip  $t$  (mg DOC/l);

$C_{bl(0)}$  = beginconcentratie DOC van de blanco (mg DOC/l);

$C_{bl(t)}$  = DOC-concentratie van de blanco op tijdstip  $t$  (mg DOC/l).

DOC = opgelost organisch koolstof („dissolved organic carbon”).

## 1.3. Referentiestoffen

Het is wenselijk om de activiteit van het inoculum te controleren met behulp van geschikte controlestoffen.

Hiervoor kan bij voorbeeld aniline, natriumacetaat of natriumbenzoaat worden gebruikt. Deze stoffen moeten binnen 28 dagen een DOC-verwijdering groter dan 70 % vertonen, anders wordt de test als ongeldig beschouwd en moet deze worden herhaald met een inoculum van een andere herkomst.

In de onderhavige testmethode wordt met name glucose gebruikt voor de remmingstest en voor de controle van de activiteit van het inoculum. Dit laatste kan ook worden gecontroleerd met behulp van aniline, natriumacetaat en natriumbenzoaat.

#### 1.4. Principe van de testmethode

In water opgeloste organische stoffen worden biologisch afgebroken door chemisch-organotrofe micro-organismen die deze stoffen als enige bron van koolstof en energie gebruiken. Deze produkten worden in een zodanige concentratie onderzocht dat het begingehalte aan organisch koolstof 40 mg/l bedraagt. Het in oplossing achtergebleven organisch koolstof wordt in ieder geval gemeten na 3, 7, 14 en 28 dagen. Tegelijkertijd wordt de teststof onderzocht op eventuele remmende effecten op het inoculum. De procedure wordt gecontroleerd met behulp van een controlestof.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

De reproduceerbaarheid van de methode werd aangetoond door de ringtest van de OESO en de EEG.

De laagste concentratie van de teststof waarvoor deze testmethode kan worden gebruikt, wordt vooral bepaald door de detectiegrens van de organisch-koolstofanalyse, welke bij de huidige stand van de techniek 0,5 mg C/l bedraagt en door de concentratie van het opgeloste organisch koolstof in de voedingsoplossing.

#### 1.6. Beschrijving van de testmethode

##### 1.6.1. Reagentia

De gebruikte chemicaliën moeten analytisch zuiver zijn.

##### 1.6.1.1. Gedestilleerd water

Gedestilleerd water mag niet meer dan 10 % van het door de teststof geïntroduceerde organisch koolstof bevatten.

##### 1.6.1.2. Voedingsoplossing

Bereid het testmedium zoals hieronder aangegeven, met behulp van steriel materiaal. Voor één liter oplossing moeten de volgende stoffen worden opgelost in gedestilleerd water (p.a. betekent pro-analyse):

— $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ammoniumsulfaat)	p. a. 0,300 g
— $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (ammoniumnitraat)	p. a. 0,150 g
— $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (kaliumdiwaterstoffosfaat)	p. a. 0,300 g
— $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (dinatriumwaterstoffosfaatdodecahydraat)	p. a. 2,000 g
— $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (magnesiumsulfaatheptahydraat)	p. a. 0,050 g
— $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (calciumchloridedihydraat)	p. a. 0,050 g
— Gistextract	0,005 g

De pH is  $7,5 \pm 0,1$ .

Voeg 1 ml sporenelementoplossing toe van de volgende samenstelling:

— $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ijzer(II)sulfaatheptahydraat)	p. a. 0,100 g
— $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (mangaan(II)sulfaatmonohydraat)	p. a. 0,100 g
— $\text{K}_2\text{MoO}_4$ (kaliummolybdaat)	p. a. 0,025 g
— $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (dinatriumtetraboraatdecahydraat)	p. a. 0,025 g

- $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (cobalt(II)nitraathexahydraat) p. a. 0,025 g
  - $\text{ZnCl}_2$  (zinkchloride) p. a. 0,025 g
  - $\text{NH}_4\text{VO}_3$  (ammoniumvanadaat) p. a. 0,010 g
  - $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (koperchloridedihydraat) p. a. 0,025 g
- Gedestilleerd water tot 100 ml.

(De sporenelementoplossing kan één maand worden bewaard bij een temperatuur tussen +1 en +4 °C.)

Vul aan tot 1 liter en meng. Het medium moet binnen 12 uur worden gebruikt.

#### 1.6.1.3. Controlestoffen

Aniline (vers gedestilleerd), natriumacetaat, natriumbenzoaat, glucose.

#### 1.6.2. Apparatuur

Gebruikelijke laboratoriumuitrusting alsmede:

- apparaat voor de bepaling van organisch koolstof;
- spectrofotometer;
- centrifuge 4 000 g;
- schudmachine voor het schudden met passende beluchting;
- apparaat voor de bepaling van opgeloste zuurstof, pH-meter, 500 ml konische kolven met wijde hals, steriel;
- apparaat voor steriel filtreren (membraanfilters met een poriegrootte van 0,22  $\mu\text{m}$ ).

Het glaswerk moet grondig gereinigd zijn en volledig vrij van alle sporen van organische of toxische stof.

#### 1.6.3. Bereiding van het entmateriaal

Neem een passende hoeveelheid van een mengsel van drie monsters verontreinigd oppervlaktewater en effluent van gemeentelijke rioolwaterzuiveringsinrichtingen, die vrij zijn van belangrijke specifieke verontreinigingen. De hoeveelheid bacteriën in elk monster moet bij telling ten minste  $10^5$  bacteria per ml bedragen.

De monsters moeten binnen 12 uur, het vervoer inbegrepen, voor enting worden gebruikt, en mogen niet langer dan 6 uur zonder beluchting blijven.

Filtreer door papier ten einde de grotere onoplosbare deeltjes te verwijderen, verzamel het filtraat en zeef dit door een membraanfilter met een poriegrootte van 0,22  $\mu\text{m}$ .

Spoel met een isotone oplossing. Verzamel de op het membraanfilter afgezette bacteriën in een kleine hoeveelheid isotone oplossing. Meng goed. Meet de absorptie bij 620 nm en bepaal hieruit de bacterieconcentratie met behulp van een standaardkromme die eerder is vastgesteld door middel van telling van *Pseudomonas fluorescens* stam ATCC 15453 in een vast medium. Voeg de hoeveelheid oplossing toe die nodig is om de bacterieconcentratie op  $(5 \pm 3) \times 10^7$  per ml te brengen. Gebruik het inoculum binnen een uur.

#### 1.6.4. Testprocedure

De incubatie moet geschieden zonder intense verlichting in een incubator met een temperatuur van 20—25 °C, welke vrij is van toxische dampen.



Bereid de volgende oplossingen:

- 1: een zodanige oplossing van de teststof in het testmedium dat een concentratie van 40 mg/l organisch koolstof wordt verkregen;
- 2: een zodanige oplossing van glucose in het testmedium dat een concentratie van 40 mg/l organisch koolstof wordt verkregen;
- 3: een oplossing waarbij in het testmedium de gebruikte concentraties van de teststof en glucose aanwezig zijn;
- 4: zorg ook voor voldoende testmedium.

Meng de vier oplossingen afzonderlijk en steriliseer door middel van membraanfiltratie.

Membranafilters zijn geschikt als vaststaat dat zij tijdens de filtratie geen koolstof afgeven of teststof absorberen.

Alle noodzakelijke handelingen moeten met behulp van steriele methoden worden uitgevoerd. Verdeel de oplossingen over de (gestriliseerde) testkolven aan de hand van onderstaand schema:

Kolf 1 (test)	150 ml oplossing 1
Kolf 2 (test)	150 ml oplossing 1
Kolf 3 (test)	150 ml oplossing 1
Kolf 4 (steriele controle)	150 ml oplossing 1
Kolf 5 (glucose controle)	150 ml oplossing 2
Kolf 6 (bepaling van remmende werking)	150 ml oplossing 3
Kolf 7 (blanco)	150 ml oplossing 4

Breng in de kolven 1, 2, 3, 5, 6 en 7 1,5 ml inoculum en meng dit grondig door met de hand te schudden.

Neem uit elke kolf een monster van 3—5 ml.

Centrifugeer deze monsters gedurende 15 minuten bij 4 000 g, terwijl de temperatuur onder 26 °C wordt gehouden.

Verzamel de bovenstaande vloeistof voor de bepaling van organisch koolstof op het tijdstip 0.

Plaats de kolven op de schudmachine en laat deze gedurende de gehele test hierop staan; op dag 3 moet de concentratie van de opgeloste zuurstof in kolf 5 ten minste 5 mg/l zijn.

Voer, op dezelfde wijze als voor tijdstip 0, de bepaling van organisch koolstof bij de kolven 1, 2, 3, 5, 6 en 7 uit na een incubatieperiode van in ieder geval 3, 7, 14 en 28 dagen. Indien de afname van het koolstofgehalte echter 95 % bereikt van het aanvankelijke gehalte in de kolven 1, 2 en 3, dan moet de test als beëindigd worden beschouwd.

De test mag worden beëindigd vóór de 28e dag als vóór die tijd een plateau wordt waargenomen.

Als tegen de 28e dag de afbraak duidelijk is ingezet, maar nog geen plateau heeft bereikt, kan het als goed gebruik beschouwd worden om het experiment met 1 of 2 weken te verlengen.

Voer aan het einde van de test een organisch-koolstofbepaling uit bij kolf 4 zoals dit voor tijdstip 0 is gebeurd. Controleer op steriliteit door een kweek te maken in een buis met vloeibare voedingsoplossing welke men gedurende 5 dagen bij 25 °C laat incuberen.

Voedingsoplossing:

Gedroogd gistextract	3 g
Pancreas caseïnepepton	6 g
Water	1 000 ml

Los de bestanddelen van het gedroogde complete medium op in kokend water. Stel zo nodig de pH bij zodat deze na sterilisatie  $7,2 \pm 0,2$  bedraagt bij 20 °C.

Indien de bepalingen van het organisch-koolstofgehalte moeten worden uitgesteld, dan moet de bovenstaande vloeistof in het donker bij 4 °C worden bewaard in hermetisch afgesloten glazen kolven;

de maximaal aanvaardbare bewaartijd is 24 uur. Kan de analyse niet binnen 24 uur plaatsvinden, vries dan in tot een temperatuur lager dan  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Ter compensatie van waterverlies door verdamping moet vóór elke monsterneming de hoeveelheid van het medium in de kolf worden gecontroleerd en zo nodig worden aangevuld tot de vereiste hoeveelheid met gedestilleerd water dat gesteriliseerd is door filtrering door een membraan met poriëgrootte  $0,22\ \mu\text{m}$ , zodat het na de voorafgaande monsterneming gemeten volume wordt hersteld.

## 2. GEGEVENS EN EVALUATIE

De analyseresultaten worden geregistreerd op het bijgevoegde formulier (aanhangsel 1). De waarden van de biologische afbraak worden berekend volgens 1.2.

De resultaten van de afbraaktest zijn geldig als aan de volgende voorwaarden is voldaan:

- de glucoseafbraak in kolf 5 moet op dag 7 ten minste 80 % bedragen;
- aan het einde van de test moet kolf 4 nog steeds steriel zijn;
- de concentratie van de opgeloste zuurstof in kolf 5 moet op dag 3 ten minste 5 mg/l bedragen.

De biologische afbraak van glucose in kolf 6 moet op dag 7 ten minste 75 % zijn van de in kolf 5 waargenomen waarde. Als deze waarde niet wordt bereikt mag worden aangenomen dat de onderzochte teststof een remmende werking heeft op de aanwezige bacteriën, zodat de methode niet toepasbaar is bij de opgegeven concentratie.

*Opmerkingen:*

De vergelijking van de percentages koolstofverwijdering in kolven 1, 2 en 3 enerzijds en in kolf 4 anderzijds, maken het mogelijk de oorzaak van de waargenomen afbraak te onderscheiden:

- fysisch-chemisch mechanisme in kolf 4;
- fysisch-chemisch plus biologische mechanismen in kolven 1, 2 en 3.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. Testrapport

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

- alle experimentele resultaten met betrekking tot de teststof, de referentiestof en de blanco oplossingen.

Met name dienen de volgende punten te worden vermeld:

- mate waarin het produkt uit kolf 4 is verdwenen aan het einde van de test;
- eventueel waargenomen remmingsverschijnselen;
- bewijs van geldigheid;
- het verloop van de afbraaktest, grafisch voorgesteld in een diagram dat opstartfase, helling en tijdsinterval weergeeft (tijdsinterval betekent hier een periode van 10 dagen die begint op de dag dat de biodegradatie 10 % overschrijdt).

### 3.2. Interpretatie van de resultaten

Tengevolge van het stringente karakter van deze test betekent een lage gevonden waarde niet noodzakelijk dat de testverbinding niet biologisch afbreekbaar is in het milieu. Het vormt een aanwijzing dat nader onderzoek nodig is om dit vast te stellen.

Teststoffen waarvoor in deze test een hoge waarde voor het DOC-verlies is gevonden, dienen te worden beschouwd als gemakkelijk biologisch afbreekbaar, mits dit resultaat wordt bereikt binnen een tijdsinterval van 10 dagen, gerekend vanaf de eerste dag waarop de waargenomen biologische afbraak hoger was dan 10 %.

## 4.

## LITERATUUR

- (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, No. 2, 1979, p. 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, No. 1, 1981, p. 45—55.
- (4) AFNOR: Method for the evaluation in aqueous medium of the biodegradability of so called „total” of organic products. T 90/302.

Aanhangsel 1

Formulier voor de gewijzigde AFNOR-test NF T 90/302

Exp. nr.: .....

Begindatum van de test: .....

Test/controle materiaal: .....

Theoretische testconcentratie: .....

Koolstofanalyse: .....

DOC-bepalingen

Voedingsoplossing	Kolf nr.	DOC-concentratie (mg/l) na				
		t = 0	3	7	14	28 (dagen)
Test	1	${}^1C_0$	${}^1C_3$	${}^1C_7$	${}^1C_{14}$	${}^1C_{28}$
Test	2	${}^2C_0$	${}^2C_3$	${}^2C_7$	${}^2C_{14}$	${}^2C_{28}$
Test	3	${}^3C_0$	${}^3C_3$	${}^3C_7$	${}^3C_{14}$	${}^3C_{28}$
Test gemiddelde	1 - 3	$\bar{C}_0$	$\bar{C}_3$	$\bar{C}_7$	$\bar{C}_{14}$	$\bar{C}_{28}$
Steriele controle	4	${}^4C_0$	<del> </del>	<del> </del>	<del> </del>	${}^4C_{28}$
Glucose controle	5	${}^5C_0$	${}^5C_3$	${}^5C_7$	${}^5C_{14}$	${}^5C_{28}$
Controle remmende werking	6	${}^6C_0$	${}^6C_3$	${}^6C_7$	${}^6C_{14}$	${}^6C_{28}$
Blanco	7	$C_{bl(0)}$	$C_{bl(3)}$	$C_{bl(7)}$	$C_{bl(14)}$	$C_{bl(28)}$

Verwerking van resultaten

	t = 0	3	7	24	28 (dagen)
Test $\left[ 1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
Glucose controle $\left[ 1 - \frac{{}^5C_t - C_{bl(t)}}{{}^5C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
Controle remmende werking $\left[ 1 - \frac{{}^6C_t - C_{bl(t)}}{{}^6C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				

Geldigheid:

Opgeloste zuurstof kolf 5, dag 3: ..... mg/l

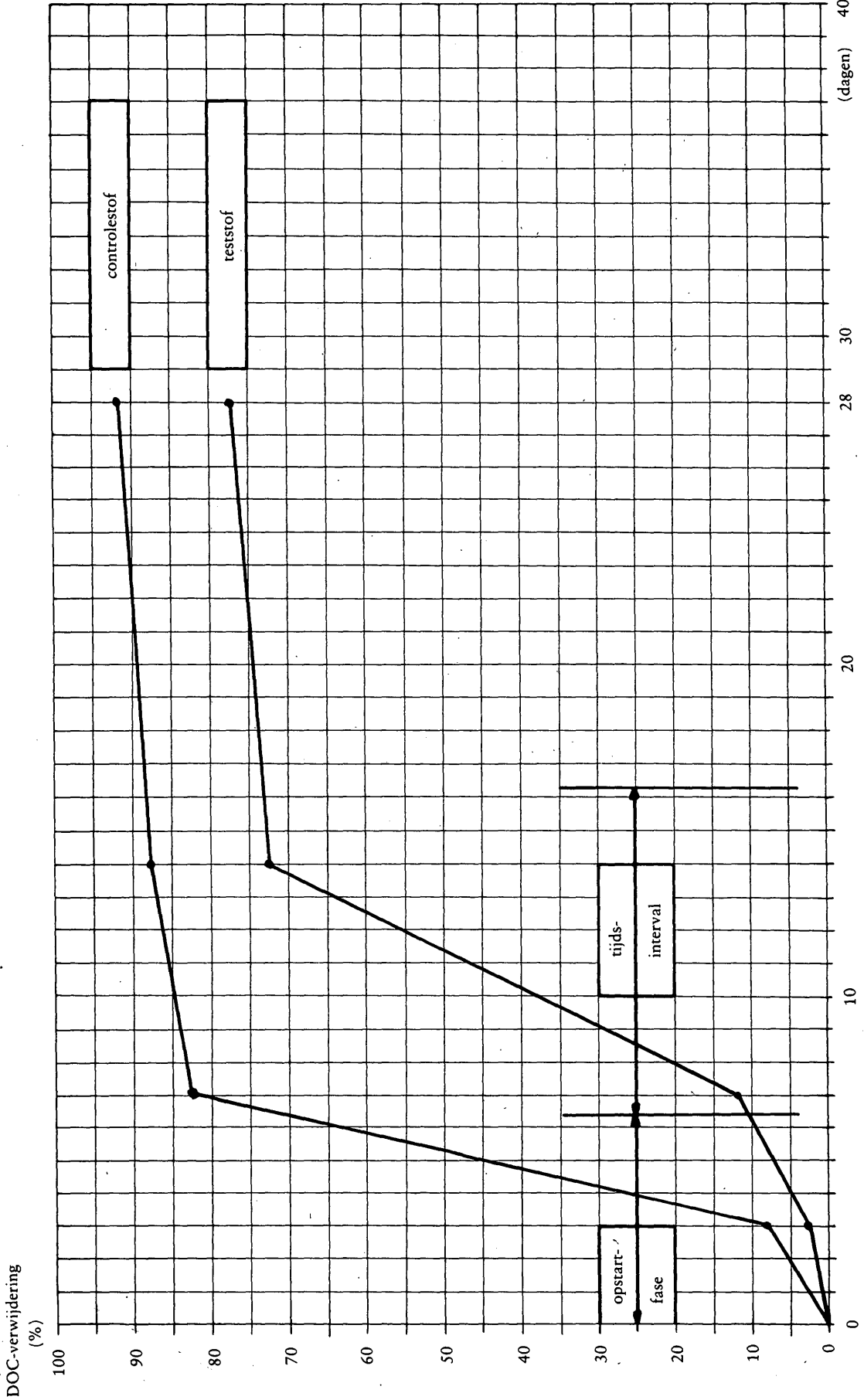
% biologische afbraak kolf 5, dag 7: ..... %

% biologische afbraak kolf 6, dag 7: ..... %

Steriliteit kolf 4: .....

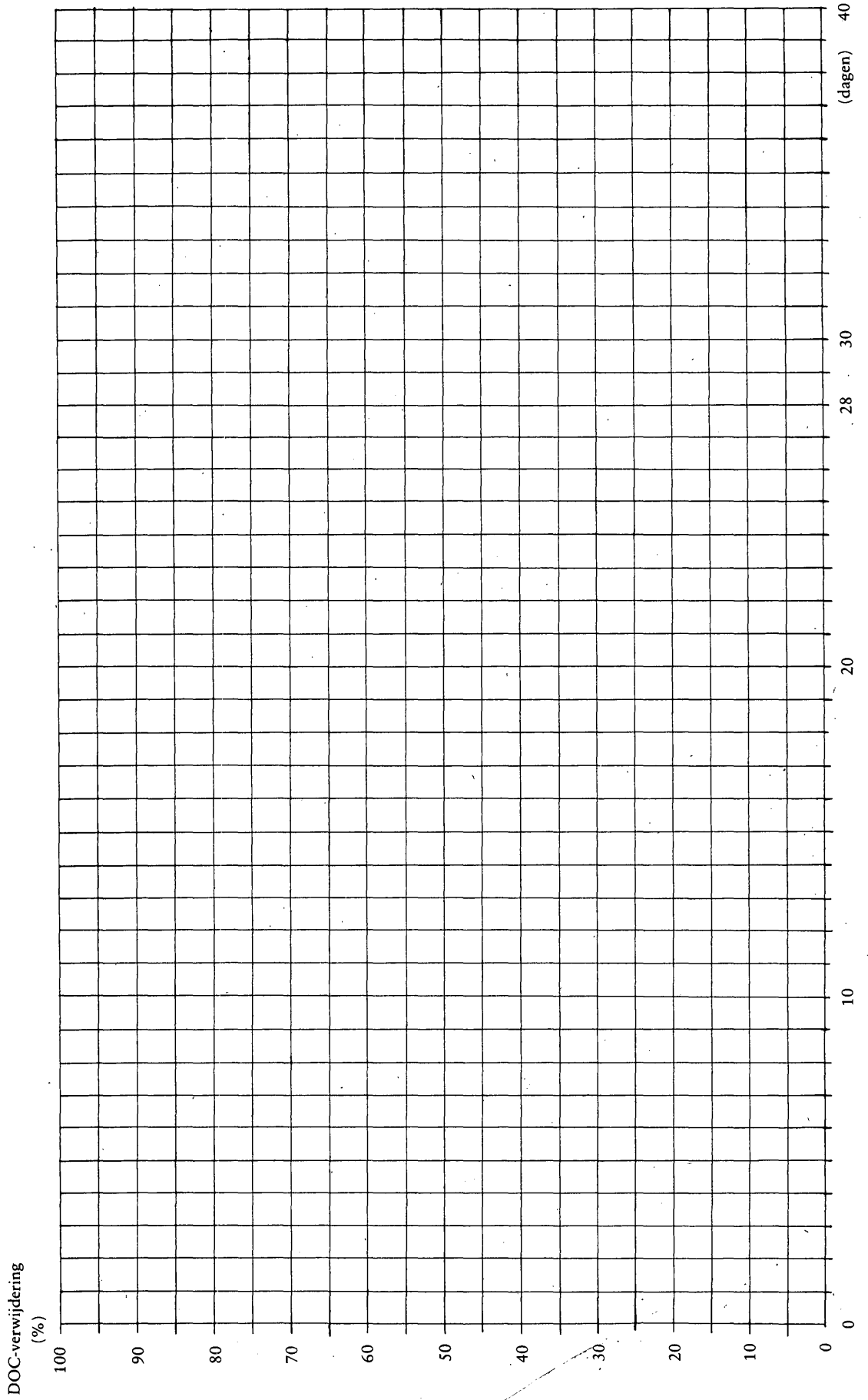
Aanhangsel 2  
Gewijzigde AFNOR-test NF T 90/302

Onderzoekinstelling: ..... Testmateriaal: ..... Exp. nr.: .....



Gewijzigde AFNOR-test NF T 90/302

Onderzoekinstelling: ..... Testmateriaal: ..... Exp. nr.: .....



## C. 5. DEGRADATIE

### BIOLOGISCHE AFBRAAK: GEWIJZIGDE STURM-TEST

#### 1. METHODE

##### 1.1. Inleiding

Het doel van deze methode is de meting van de biologische afbreekbaarheid van niet-vluchtige organische stoffen in een aëroob, waterig medium bij twee beginconcentraties: 10 en 20 mg/l (standaardconcentraties).

Het organisch-koolstofgehalte van het testmateriaal moet bekend zijn (TOC-analyse of schatting op grond van de empirische formule om de theoretische CO<sub>2</sub>-opbrengst te kunnen berekenen).

De methode is alleen van toepassing op die organische stoffen die bij de in de test gebruikte concentratie:

- een verwaarloosbare dampspanning hebben;
- niet remmend werken op bacteriën.

Deze methode kan, althans in principe, worden toegepast op stoffen die slecht oplosbaar zijn bij de te onderzoeken concentraties.

Gegevens over de onderlinge verhoudingen van de belangrijkste bestanddelen van het testmateriaal zijn nuttig voor de interpretatie van de verkregen resultaten, met name indien de gevonden waarden laag zijn.

Gegevens over de toxiciteit van de stof voor micro-organismen kunnen nuttig zijn voor de interpretatie van lage gevonden waarden en voor de keuze van geschikte testconcentraties.

##### 1.2. Definities en eenheden

De afbraak wordt gedefinieerd als de hoeveelheid door de stof geproduceerde CO<sub>2</sub> als percentage van de hoeveelheid CO<sub>2</sub> die theoretisch zou zijn geproduceerd („ThCO<sub>2</sub>”), berekend uit het organisch koolstofgehalte van de stof:

##### 1.3. Referentiestoffen

Het is wenselijk om de activiteit van het inoculum te controleren met behulp van een geschikte controlestof.

Hiervoor kan bij voorbeeld aniline, natriumacetaat of natriumbenzoaat worden gebruikt. Deze stoffen moeten binnen 28 dagen een CO<sub>2</sub>-productie  $\geq 60\%$  vertonen, anders wordt de test als ongelukkig beschouwd en moet deze worden herhaald met een inoculum van een andere herkomst.

##### 1.4. Principe van de testmethode

Het testmateriaal wordt in een vloeibaar medium met een bekende chemische samenstelling gebracht. Vervolgens wordt geënt met micro-organismen uit rioolwater en belucht bij 20—25 °C. De temperatuur wordt tijdens de test geregistreerd.

Het vrijkomende CO<sub>2</sub> wordt afgevangen als BaCO<sub>3</sub>. De afbraak wordt gedurende 28 dagen gevolgd aan de hand van CO<sub>2</sub>-analyse. Na vergelijken met blanco controles wordt de totale tijdens de test door de teststof geproduceerde hoeveelheid CO<sub>2</sub> bepaald als percentage van de totale hoeveelheid CO<sub>2</sub> die de teststof theoretisch op basis van het koolstofgehalte had kunnen opleveren.

De procedure wordt gecontroleerd door middel van een controlestof voor het inoculum (zie 1.6.1.3).

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

De reproduceerbaarheid van de methode werd aangetoond door de ringtests van de OESO en de EEG.

De belangrijkste reden waarom de concentratie van de testverbinding niet lager dan 5 mg/l mag zijn, is de endogene CO<sub>2</sub>-productie van het inoculum, zoals die in de blanco kolf wordt gemeten. (Als de test is aangepast aan met <sup>14</sup>C gemerkte teststoffen, kan de concentratie veel lager zijn.)

#### 1.6. Beschrijving van de testmethode

##### 1.6.1. Reagentia

##### 1.6.1.1. Water van hoge kwaliteit (WHK)

Dubbelgedestilleerd water, vrij van toxische stoffen (met name koper), met een laag koolstofgehalte (< 2,0 mg/l TOC) en met een soortelijke weerstand ≥ 18 megohm · cm. Het gedestilleerde water mag niet meer dan 10 % van de door het testmateriaal geïntroduceerde organische koolstof bevatten.

##### 1.6.1.2. Voedingsoplossing

###### a) Stamoplossing

FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O (ijzer(III)chloridehexahydraat)	0,25 g
oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (magnesiumsulfaatheptahydraat)	22,50 g
oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.	
CaCl <sub>2</sub> (calciumchloride)	27,50 g
oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (kaliumdiwaterstoffosfaat)	8,50 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (kaliumwaterstoffosfaat)	21,75 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (dinatriumwaterstoffosfaatheptahydraat)	33,40 g
NH <sub>4</sub> Cl (ammoniumchloride)	1,70 g
oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ammoniumsulfaat)	40,00 g
oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.	

###### b) Testmedium

Het testmedium bevat per liter water (1.6.1.1) de volgende reagentia:

- 4 ml ijzer(III)chloride-oplossing (zie boven);
- 1 ml magnesiumsulfaat-oplossing (zie boven);
- 1 ml calciumchloride-oplossing (zie boven);
- 2 ml fosfaat-oplossing (zie boven);
- 1 ml ammoniumsulfaat-oplossing (zie boven).

De pH moet 7,2 ± 0,2 zijn.



## 1.6.1.3. Controlestoffen

Aniline (vers gedestilleerd), natriumacetaat, natriumbenzoaat.

## 1.6.1.4. Bariumhydroxide 0,025 N (0,0125 M)

Bereid een oplossing van 4,0 g  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  per liter WHK. Filtreer dit door filtreerpapier en sluit de heldere oplossing af om absorptie van  $\text{CO}_2$  uit de lucht te voorkomen. Het verdient aanbeveling om meer dan 5 liter tegelijk te bereiden wanneer de proeven worden uitgevoerd.

## 1.6.2. Apparatuur

1.6.2.1. Opstelling voor  $\text{CO}_2$ -verwijdering

Er wordt gebruik gemaakt van een serie van twaalf mandflessen (drie testmaterialen). (Met „mandfles” wordt hier een bruine glazen fles van 4 tot 5 liter bedoeld. Als gebruik wordt gemaakt van heldere glazen vaten, moet de test in het donker worden uitgevoerd.)

- Vier kunststofflessen van 1 liter, gevuld met 700 ml 10 N (10 M) NaOH.
- Een erlenmeyerkolf van 1 liter met 700 ml 0,025 N (0,0125 M)  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -oplossing.
- Een lege erlenmeyerkolf van 1 liter om vloeistofoverslag te voorkomen.

Deze flessen worden met inerte slangen in serie verbonden met een persluchtbron. De lucht wordt met constante snelheid door de wasoplossingen geleid.

Voor elke bijkomende groep van vier mandflessen nog één extra kunststoffles met 700 ml 10 N (10 M) NaOH.

1.6.2.2.  $\text{CO}_2$ -produktieapparaat

Voor elk testmateriaal vier bruine wegwerpmandflessen van 4 tot 5 liter.

Stoppen, buigzame slang, kunststofslang.

1.6.2.3.  $\text{CO}_2$ -absorptieflessen

Bariumhydroxide-wasflessen van 100 ml.

1.6.3. *Bereiding van het inoculum*

De bron van testorganismen is actief slib dat vers betrokken is van een goed functionerende gemeentelijke rioolwaterzuiveringsinrichting. In deze inrichting mag geen of hoogstens zeer weinig industrieel afvalwater worden behandeld.

Na aankomst in het laboratorium wordt het actief slib gedurende vier uur belucht. Er wordt 500 ml van de gemengde vloeistof genomen. Dit wordt gedurende 2 minuten met een mechanisch mengapparaat gehomogeniseerd. Vervolgens laat men dit een half uur bezinken.

Als de bovenstaande vloeistof na die 30 minuten nog grote hoeveelheden vaste slibdeeltjes bevat, kan de bezinking nog gedurende 30 tot 60 minuten worden voortgezet of kan de vloeistof worden aangepast aan laboratoriumomstandigheden zodat de bezinking wordt bevorderd.

Er wordt voldoende bovenstaande vloeistof afgegoten voor 1 % inoculum voor elke  $\text{CO}_2$ -testkolf. Vermijd overslag van slibdeeltjes welke de meting van de  $\text{CO}_2$ -productie zouden verstoren. Hoewel facultatief, is het nuttig om het aantal microben in de vloeistoffractie te bepalen. Dit inoculum moet normaal gesproken  $10^6$  tot  $20 \times 10^6$  kolonievormende eenheden per milliliter bevatten.

Het moet worden gebruikt op de dag van bereiding.

1.6.4. *Testprocedure*

## 1.6.4.1. Stamoplossing

Een eerste stamoplossing van de te onderzoeken stof wordt bereid door deze op te lossen in water van hoge kwaliteit tot een concentratie van 1 000 mg/l.

Stamoplossingen worden bereid op basis van het percentage actieve verbinding in het testmateriaal. Als dit onbekend is, worden stamoplossingen bereid tot een concentratie op gewichtsbasis. Om een homogeen monster te verkrijgen moet grondig worden gemengd. Hierbij moet de vorming van schuim waarin de teststof kan worden geconcentreerd, worden vermeden. Bij vaste monsters kan het nodig zijn deze te smelten en de gehele inhoud van de monsterfles te vermengen alvorens er een hoeveelheid uit te nemen. Dit gedeelte van de procedure is buitengewoon belangrijk omdat de nauwkeurigheid van de berekeningen van de procentuele biologische afbraak afhankelijk is van het kennen van de juiste hoeveelheid koolstof in het testsysteem.

De pH van de stamoplossing hoeft niet te worden bijgesteld, tenzij deze buiten het gebied van 3 tot 10 valt, omdat de fosfaatbuffer in het testmedium de pH regelt. Mocht de pH buiten het aangegeven gebied liggen, stel dan een gedeelte van de stamoplossing bij tot pH 7,0 ( $\pm 1,0$ ) met 1 N (1 M) HCl of NaOH, onder krachtig mengen van de oplossing. Om de nominale concentratie van organisch koolstof van de testverbinding te verifiëren, kan de stamoplossing (of het geneutraliseerde gedeelte) worden geanalyseerd op totaal organisch koolstof. Een TOC-analyse is ook vereist voor de stamoplossing van de controle.

Als een teststof niet oplosbaar is in water, breng dan de gewenste hoeveelheid testmateriaal op gewichts- of volumebasis rechtstreeks in de mandfles.

Als het testmateriaal niet oplosbaar is bij de te onderzoeken concentratie, moeten bijzondere maatregelen, bij voorbeeld het toepassen van ultrasone dispersie, worden toegepast om een goede dispersie van het testmateriaal te verkrijgen.

## 1.6.4.2. Omstandigheden

Omdat 1 % inoculum wordt gebruikt in de CO<sub>2</sub>-test, is het nodig om verdunningen in het CO<sub>2</sub>-testmedium te maken.

Het gemakkelijkst gaat dit als volgt:

- a) breng in elk van de mandflessen van 4 à 5 liter 2 470 ml water van hoge kwaliteit (WHK zie 1.6.1.1);
- b) breng in elk van de mandflessen van 4 à 5 liter 3 ml van elke stamoplossing van ammoniumsulfaat, magnesiumsulfaat en calciumchloride, 6 ml fosfaatbuffer-oplossing en 12 ml ijzer(III)chloride-oplossing;
- c) breng in elk van de mandflessen van 4 à 5 liter 30 ml van het actief-slib inoculum.

Dit mengsel wordt gedurende 24 uur belucht met CO<sub>2</sub>-vrije lucht, om het systeem te ontdoen van kooldioxide.

Na de beluchtingsperiode worden drie CO<sub>2</sub>-wasflessen gevuld met 100 ml 0,025 N (0,0125 M) Ba(OH)<sub>2</sub> en in serie verbonden met de luchtafvoer van elke mandfles.

## 1.6.4.3. Uitvoering van de test

Als start van de testperiode wordt aan twee van de vier mandflessen testmateriaal toegevoegd. Elk materiaal wordt in twee concentraties getest: 10 en 20 mg/l.

De voor de mandfles benodigde hoeveelheid van de stamoplossing testmateriaal wordt als volgt berekend:

$$\text{aantal ml stamoplossing per mandfles} = \frac{B \times C}{A}$$

waarin:

B = de concentratie van de testverbinding in de mandfles (mg/l);

A = de concentratie van de testverbinding in de stamoplossing (mg/l);

C = het eindvolume van het testmedium in de mandfles (ml).

De mandflessen worden bijgevuld met voldoende stamoplossing om de gewenste testconcentratie, zoals hierboven berekend, te bereiken en met zoveel gedestilleerd water dat de toevoeging in totaal 473 ml bedraagt (stamoplossing + WHK). Aan de derde mandfles, die als blanco-controle wordt gebruikt en geen testmateriaal bevat, wordt 473 ml WHK toegevoegd. Het eindvolume in elke mandfles is nu 3 000 ml.

Aan de laatste van de vier mandflessen wordt een controlestof met een concentratie van 20 mg/l toegevoegd.

De test wordt gestart door CO<sub>2</sub>-vrije lucht door de oplossing te laten borrelen met een snelheid van 50–100 ml/min per mandfles (= 1–2 belLEN/seconde).

In water onoplosbare testmaterialen kunnen droog in de CO<sub>2</sub>-testfles worden gebracht en met een magneetroerder worden gemengd. Voor schuimende chemicaliën kan de beluchting met CO<sub>2</sub>-vrije luchtbelletjes worden vervangen door beluchting van bovenaf met magnetisch roeren.

De in de mandflessen geproduceerde CO<sub>2</sub> reageert met het bariumhydroxide en slaat neer als bariumcarbonaat; de geproduceerde hoeveelheid CO<sub>2</sub> wordt bepaald door het overblijvende Ba(OH)<sub>2</sub> te titreren met 0,05 N (0,05 M) HCl standaard. Met geregelde tussenpozen (om de twee of drie dagen) wordt de CO<sub>2</sub>-wasfles die het dichtst bij de mandfles staat, verwijderd voor titratie. De twee overblijvende wasflessen worden dan één plaats dicht bij de mandfles gebracht en een nieuwe wasfles, gevuld met 100 ml verse 0,025 N (0,0125 M) Ba(OH)<sub>2</sub>, wordt aan het eind van de reeks geplaatst.

De titraties worden naar behoefte uitgevoerd (voordat er een waarneembare neerslag van BaCO<sub>3</sub> in de tweede wasfles is), gedurende de eerste 10 dagen ongeveer om de dag en tot de 28e dag om de 5 dagen.

Op de 27e dag wordt de pH van de inhoud van de mandflessen weer gemeten, waarna 1 ml geconcentreerde HCl aan elk van de mandflessen wordt toegevoegd om anorganisch carbonaat te verdrijven. De mandflessen worden gedurende de nacht belucht en uit elke mandfles worden monsters genomen voor DOC-analyse. De laatste titratie vindt plaats op de 28e dag.

Titraties op de 100 ml Ba(OH)<sub>2</sub>-oplossing vinden plaats na verwijdering van de flessen die zich het dichtst bij de mandfles bevinden. Het Ba(OH)<sub>2</sub> wordt getitreerd met 0,05 N (0,05 M) HCl met fenolftaleïne als indicator.

De test wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur (20–25 °C). Gedurende de test wordt de temperatuur geregistreerd.

Als vóór de 28e dag een plateau wordt waargenomen, kan de test worden beëindigd.

Als tegen de 28e dag de afbraak duidelijk is ingezet, maar op de 28e dag nog geen plateau is bereikt, kan het als goed gebruik worden beschouwd om het experiment met één of twee weken te verlengen.

#### 1.6.5. CO<sub>2</sub>-bepaling

Behalve de terugtitratie van Ba(OH)<sub>2</sub>-vallen, kunnen nog andere mogelijkheden om de CO<sub>2</sub>-ontwikkeling te meten worden overwogen. Dit doet geen afbreuk aan het principe van deze test en kan eventueel leiden tot een continue meting van de voortschrijdende biologische afbraak.

De eerste stap bij de berekening van de geproduceerde hoeveelheid CO<sub>2</sub> is de correctie voor de endogene CO<sub>2</sub>-productie in de mandflessen met teststof. De controlemandfles dient als „geënte blanco” om te kunnen corrigeren voor eventueel via endogene ademhaling van de bacteriën geproduceerd CO<sub>2</sub>. De door een teststof geproduceerde hoeveelheid CO<sub>2</sub> wordt bepaald door het verschil (in ml titreervloeistof) tussen de Ba(OH)<sub>2</sub>-vallen in de experimenten en in de blanco.

Als voor de titratie van de wasfles 0,05 N (0,05 M) HCl wordt gebruikt dan komt elke ml getitreerde HCl overeen met 1,1 mg geproduceerde CO<sub>2</sub>.

## 2. GEGEVENS EN EVALUATIE

De analyseresultaten worden geregistreerd op het bijgevoegde formulier (aanhangsel 1). De waarden van de biologische afbraak worden berekend volgens 1.2.

De CO<sub>2</sub>-concentraties worden afgerond op de dichtstbijzijnde 0,1 mg/l. De waarden van biologische afbraak worden afgerond op de dichtstbijzijnde hele procent.

Het verloop van de afbraaktest wordt grafisch weergegeven in een grafiek als afgebeeld in het bijgevoegde voorbeeld (aanhangsel 2).

De resultaten van de afbraaktest zijn geldig als aan de volgende voorwaarden is voldaan:

- in dezelfde testreeks moet het controlemateriaal een biologische afbraak  $\geq 60$  % vertonen binnen 28 dagen. (Als dit niet het geval is moet de gehele reeks worden verworpen en worden herhaald met een inoculum uit een andere bron.);
- tijdens de test mag in de blanco-fles geen significante hoeveelheid CO<sub>2</sub> zijn ontwikkeld (verontreiniging van het medium, glaswerk en luchttoevoer. De totale CO<sub>2</sub>-productie aan het einde van de test mag niet hoger zijn dan 50 mg CO<sub>2</sub>/3 liter medium.

### 3. RAPPORTAGE

#### 3.1. Testrapport

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

- de gegevens die moeten worden vermeld volgens het formulier (aanhangsel 1);
- het verloop van de afbraaktest, grafisch voorgesteld in een diagram dat opstartfase, afbraakfase, helling en tijdsinterval weergeeft (tijdsinterval betekent hier een periode van 10 dagen die begint op de dag dat de biodegradatie 10 % overschrijdt);
- dispersieprocedure voor stoffen die onder de testomstandigheden niet oplosbaar zijn;
- vermelding van datum en plaats waar de testorganismen werden verzameld en de manier waarop deze werden behandeld vóór de enting;
- het tijdens de test geregistreerde temperatuurgebied;
- indien is gemeten volgens 1.6.2 (enting), vermelding van het aantal micro-organismen per ml (kolonievormende eenheden — KVE/ml);
- bewijs van geldigheid van de test (60 % afbraak van de controlestof binnen 28 dagen).

#### 3.2. Interpretatie van de resultaten

Ten gevolge van het stringente karakter van deze test betekent een lage gevonden waarde niet noodzakelijk dat de onderzochte stof niet biologisch afbreekbaar is in het milieu. Het vormt een aanwijzing dat nader onderzoek noodzakelijk is om dit vast te stellen.

Onderzochte stoffen waarvoor in deze test een hoge biologische afbraak is gevonden, dienen te worden beschouwd als gemakkelijk biologisch afbreekbaar, mits deze waarde wordt bereikt binnen een tijdsinterval van 10 dagen gerekend vanaf de eerste dag waarop de waargenomen biologische afbraak hoger was dan 10 %.

### 4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301B. Decision of the Council C(81)30 Final.
- (2) Gerike, P., Fisher, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159—173.
- (3) Gerike, P., Fisher, 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, No 1, 1981, p. 45—55.
- (4) Larson, R.J., Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 38, 1979, p. 1153—1161.

## Aanhangsel 1

## Formulier voor de gewijzigde Sturm-test

Exp. nr.: .....

Begindatum van de test: .....

Test/controlemateriaal: .....

Theoretische testconcentratie: .....

Koolstofanalyse: .....

Theoretische CO<sub>2</sub>-opbrengst (ThCO<sub>2</sub>): .....

Temperatuurgebied tijdens de test: .....

CO<sub>2</sub>-productie: .....

Dagen	Gevonden CO <sub>2</sub> mg	Cumulatieve CO <sub>2</sub> mg	% van ThCO <sub>2</sub>
28			

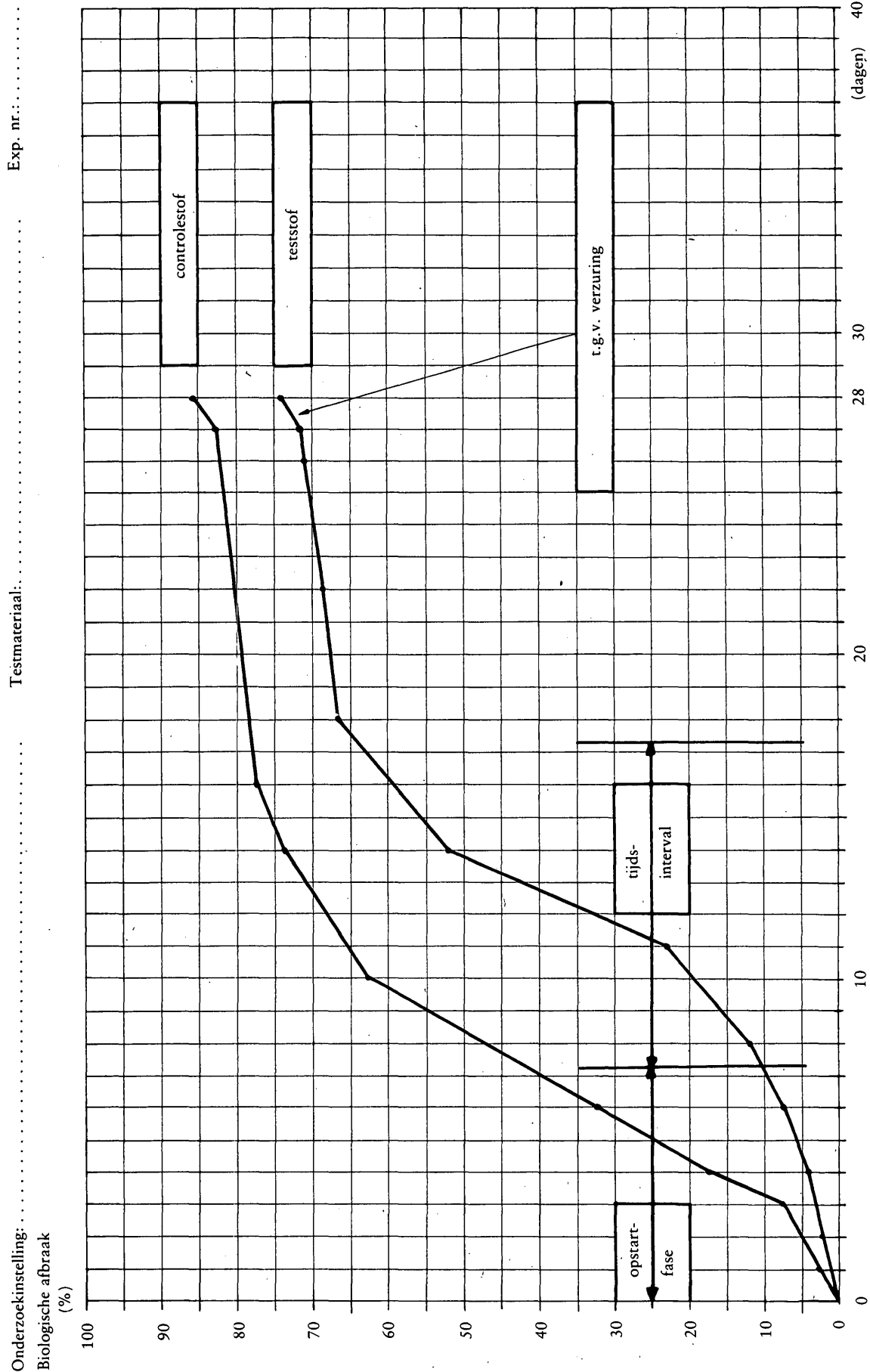
Geldigheid: .....

— % biologische afbraak controlemateriaal: .....

— totale CO<sub>2</sub>-ontwikkeling van blanco-fles: .....

Aanhangsel 2

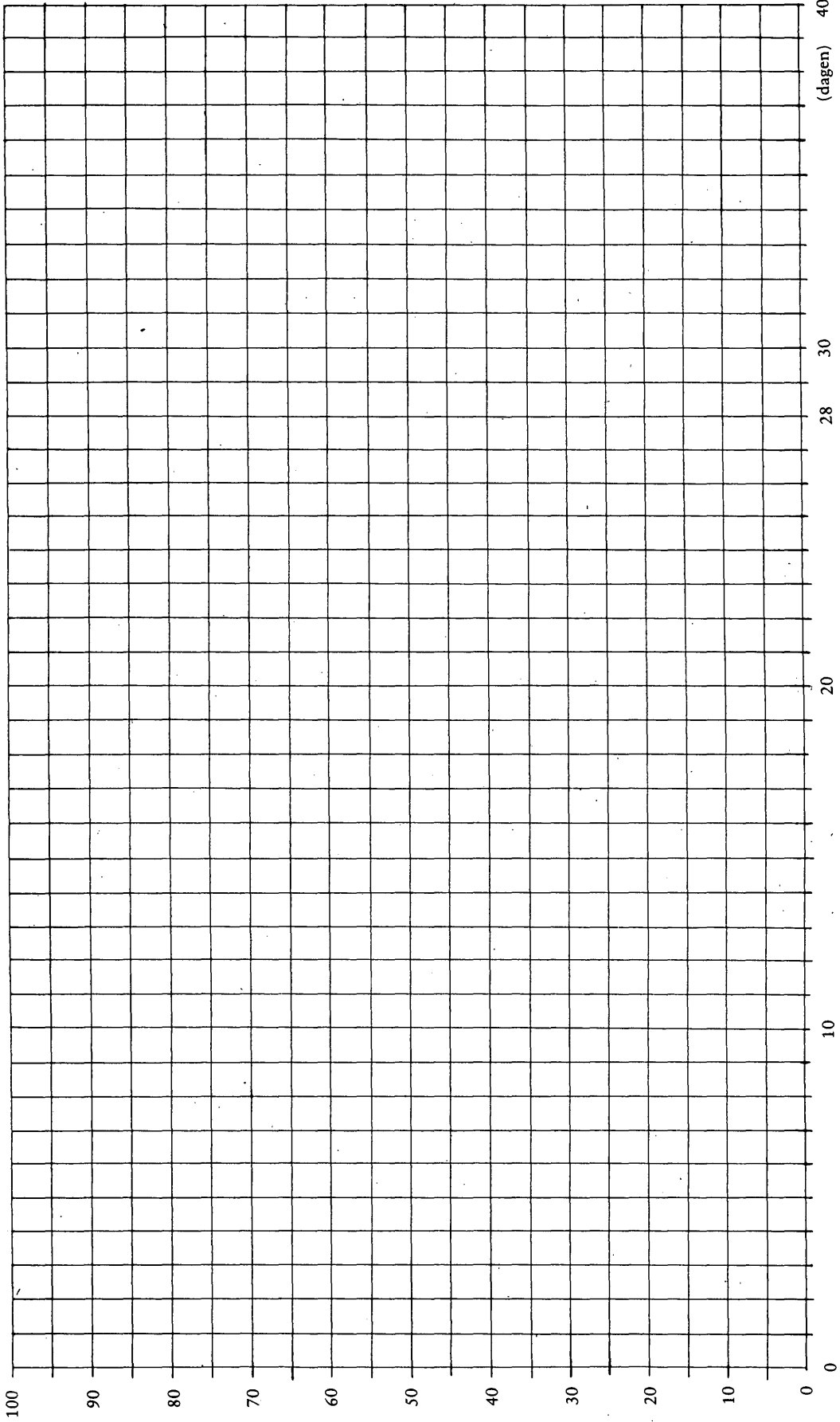
Gewijzigde Sturm-test



Gewijzigde Sturm-test

Onderzoekinstelling: ..... Exp. nr.: .....  
Testmateriaal: .....

Biologische afbraak (%)



## C. 6. DEGRADATIE

## BIOLOGISCHE AFBRAAK: GESLOTEN-FLESPROEF

## 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

Het doel van deze methode is de meting van de biologische afbreekbaarheid van organische verbindingen in een aëroob, waterig medium met een testconcentratie van 2 (standaardconcentratie) tot 10 mg/l teststof.

Bij de huidige stand van zaken is de test vooral geschikt voor het onderzoek van de biologische afbreekbaarheid van in water oplosbare verbindingen. Vluchtige stoffen en slecht oplosbare stoffen kunnen echter, althans in principe, ook worden onderzocht.

De empirische formule van het testmateriaal is nodig voor de berekening van het theoretisch zuurstofverbruik (ThOD); als deze formule niet bekend is, kan het chemisch zuurstofverbruik (COD) van het testmateriaal worden gebruikt als referentiewaarde (aanhangel 1).

De methode is alleen van toepassing op die organische testmaterialen die bij de in de test gebruikte concentratie niet remmend werken op bacteriën. Als het testmateriaal niet oplosbaar is bij de te onderzoeken concentratie kunnen speciale maatregelen, zoals het toepassen van dispersie, nodig zijn om het testmateriaal goed te dispergeren.

Gegevens over de onderlinge verhoudingen van de belangrijkste bestanddelen van het testmateriaal zijn nuttig voor de interpretatie van de resultaten, met name indien de gevonden waarden laag zijn.

Gegevens over de toxiciteit van de stof voor micro-organismen kunnen nuttig zijn voor de interpretatie van lage gevonden waarden en voor de keuze van geschikte testconcentraties.

Deze methode kan worden gebruikt voor de BOD-bepaling.

## 1.2. Definities en eenheden

Het biochemisch zuurstofverbruik (BOD — „Biological Oxygen Demand”) wordt berekend als het verschil in zuurstofafname tussen een blanco oplossing en een oplossing van testmateriaal onder de testomstandigheden. Na deling door de concentratie (m/v) van de stof wordt de netto zuurstofvermindering verkregen in mg BOD/mg stof.

De afbraak wordt gedefinieerd als de verhouding tussen het biochemisch zuurstofverbruik en het theoretisch zuurstofverbruik (ThOD — „Theoretical Oxygen Demand”) of het chemisch zuurstofverbruik (COD — „Chemical Oxygen Demand”) en uitgedrukt in procenten.

Opmerking: Soms geven de twee verschillende berekeningen (% ThOD of % COD) niet dezelfde resultaten.

$$\% \text{ biologische afbraak (van ThOD)} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg teststof}}{\text{ThOD}} \times 100$$

of

$$\% \text{ biologische afbraak (van COD)} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg teststof}}{\text{mg COD/mg teststof}} \times 100$$

waarin:

ThOD = theoretisch zuurstofverbruik (berekening zie aanhangsel 1);

COD = chemisch zuurstofverbruik, experimenteel bepaald.



## 1.3. Referentiestoffen

Het is wenselijk om de activiteit van het inoculum te controleren met behulp van geschikte controlestoffen. Hiervoor kan bij voorbeeld aniline, natriumacetaat of natriumbenzoaat worden gebruikt. Deze stoffen moeten binnen 28 dagen een afbraak  $\geq 60\%$  vertonen, anders wordt de test als ongeldig beschouwd en moet deze worden herhaald met een ent van een andere herkomst.

## 1.4. Principe van de testmethode

Een van tevoren bepaalde hoeveelheid van de verbinding wordt opgelost in een anorganisch medium (minerale voedingsoplossing), meestal tot een concentratie van 2 mg teststof/l. De oplossing wordt geënt met een klein aantal micro-organismen van een gemengde populatie en in gesloten flessen in het donker in een bad met een constante temperatuur van 20—21 °C bewaard.

De afbraak wordt gedurende 28 dagen gevolgd aan de hand van zuurstofanalyses. De procedure wordt gecontroleerd met behulp van een controlestof voor het inoculum.

Een zuurstof-blanco moet worden bepaald in een parallel uitgevoerde test zonder test- of controlemateriaal.

Tegelijkertijd kan de teststof worden onderzocht op eventuele remmende effecten op het inoculum.

## 1.5. Kwaliteitscriteria

De reproduceerbaarheid van de methode werd aangetoond door de ringtest van de OESO en de EEG.

## 1.6. Beschrijving van de testmethode

## 1.6.1. Reagentia

## 1.6.1.1. Gedestilleerd of gedeïoniseerd water

Gedestilleerd of gedeïoniseerd water dat niet meer dan 0,01 mg Cu/l bevat, verzadigd met lucht. Volume aangepast aan de behoefte van de dag (bij voorbeeld 50 liter), op kamertemperatuur, zo dicht mogelijk bij 20 °C, gedurende 20 minuten krachtig belucht met schone perslucht. Over het algemeen kan het water worden gebruikt na 20 uur op 20 °C te hebben gestaan. Voor controledoeleinden wordt zuurstof bepaald. De concentratie bij 20 °C moet 9,09 mg O<sub>2</sub>/l zijn. Alle overbreng- en vulhandelingen met het met lucht verzadigde water moeten zonder bellen met een hevel worden uitgevoerd.

## 1.6.1.2. Voedingsoplossing

## a) Stamoplossingen

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (kaliumdiwaterstoffosfaat)	8,50 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (kaliumwaterstoffosfaat)	21,75 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (dinatriumwaterstoffosfaatdihydraat)	33,30 g
NH <sub>4</sub> Cl (ammoniumchloride)	1,70 g
oplossen in gedestilleerd water en aanvullen tot 1 000 ml.	
De pH moet 7,2 zijn.	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (magnesiumsulfaatheptahydraat)	22,50 g
oplossen in gedestilleerd water en aanvullen tot 1 000 ml.	
CaCl <sub>2</sub> (calciumchloride)	27,50 g
oplossen in gedestilleerd water en aanvullen tot 1 000 ml.	
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (ijzer(III)chloridehexahydraat)	0,25 g
oplossen in gedestilleerd water en aanvullen tot 1 000 ml.	

## b) Testmedium

Het testmedium bevat per liter water (1.6.1.1) 1 ml van elk van boven beschreven stamoplossingen.

De pH moet  $7,2 \pm 0,2$  zijn.

## 1.6.1.3. Controlestoffen

Aniline (vers gedestilleerd), natriumacetaat, natriumbenzoaat.

## 1.6.2. Apparatuur

1.6.2.1. Geijkte BOD-flessen van 250—300 ml met glazen stoppen of niet-geijkte flessen van 250 ml met nauwe hals en glazen stoppen waarvan het volume moet worden bepaald, kunnen worden gebruikt.

1.6.2.2. Verschillende flessen van 2, 3 en 5 liter met litermaatstrepen voor de voorbereiding van het experiment en voor het vullen van de BOD-flessen.

1.6.2.3. Pipetten met een volume van 1 tot 10 ml.

Trechters en grof filtreerpapier.

Flessen voor de bereiding van het inoculum.

1.6.2.4. Een waterbad om de flessen op constante temperatuur te houden onder uitsluiting van licht.

1.6.3. *Bereiding van het inoculum*

Voor het inoculum kan worden gekozen uit de volgende vier mogelijkheden. De levensvatbaarheid wordt gecontroleerd met behulp van een controlestof (1.6.1.3).

## 1.6.3.1. Inoculum van grond

Voor een waterige suspensie van onbemeste tuingrond wordt 100 g tuingrond die niet recent bemest is geweest (kasgrond, welke het hele jaar een constante temperatuur heeft, is buitengewoon geschikt) gedispergeerd in één liter chloorvrij leidingwater. Na 30 minuten wordt de suspensie door grof filtreerpapier gefiltreerd, waarbij de eerste 200 ml van het filtraat wordt verwijderd. De rest van het filtraat wordt gebruikt voor de enting (1 druppel uit een spitse pipet per liter eindvolume). Het inoculum wordt vlak vóór het experiment bereid. Als het enkele uren wordt bewaard, moet het worden belucht. Het aantal bacteriën kan worden bepaald met behulp van een telplaat of met „nutrient pad sets”. Er mogen niet meer dan  $10^3$  tot  $10^5$  bacteriën per milliliter eindvolume zijn.

## 1.6.3.2. Inoculum van secundair afvalwater

Het inoculum moet bij voorkeur afkomstig zijn van een secundaire installatie (actief-slibinstallatie of oxydatiebed waarmee vooral huishoudelijk afvalwater wordt verwerkt). Het afvalwater moet in de periode tussen monsternamen en gebruik onder aërobe omstandigheden worden bewaard. Voor de bereiding van het inoculum wordt het monster gefiltreerd door grof filtreerpapier. De eerste 200 ml wordt verwijderd. De rest van het filtraat wordt aëroob bewaard tot gebruik. Het inoculum moet worden gebruikt op de dag waarop het is gewonnen.

## 1.6.3.3. Inoculum uit een laboratorium-actief-slibinstallatie

Hiervoor wordt afvoerwater van een krachtig beluchte laboratorium-actief-slibinstallatie gebruikt. Het inoculum wordt bereid als beschreven onder 1.6.3.2.

## 1.6.3.4. Samengesteld inoculum

Gelijke volumina van de drie inoculummonsters (1.6.3.1 tot en met 1.6.3.3) worden goed gemengd, waarna het uiteindelijke inoculum uit dit mengsel wordt betrokken.

1.6.4. *Testprocedure*

Alle noodzakelijke handelingen voorafgaand aan de incubatie moeten worden uitgevoerd bij circa 20 °C.

Groepen flessen (1.6.2.1) worden klaargemaakt om de BOD van de test- en controlestoffen in gelijktijdige reeksen experimenten te bepalen (aanhangel 2). Indien tegelijkertijd chemische analyses worden uitgevoerd, moet een voldoende aantal flessen — waaronder de controles voor het inoculum en de blanco — worden gereedgemaakt. Zo worden bij voorbeeld voor één teststof 7 of 15 flessen naast elkaar klaargemaakt voor de 0-, 5-, 15- en 28-dagetest, nadat voldoende water is bereid in grote flessen (1.6.2.2).

Deze grote flessen worden eerst met een hevel tot ongeveer een derde van hun volume gevuld met gedestilleerd water (1.6.1.1). Vervolgens worden de afzonderlijke stam-zoutoplossingen (1.6.1.2) in deze flessen gepipetteerd naar gelang van het eindvolume en worden de respectieve test- of controlematerialen in zulke hoeveelheden toegevoegd dat eindconcentraties van 2 en soms 5 of 10 mg/l worden verkregen.

Ten gevolge van de concentratie van ongeveer 9 mg opgeloste zuurstof per liter verdunningswater van 20 °C blijft de mogelijke beginconcentratie van het testmateriaal beperkt tot ongeveer 2 mg/l ten einde een significante zuurstofconcentratie te handhaven na de oxydatie van de teststof.

Het verdient aanbeveling om slecht afbreekbare stoffen of stoffen met een lage ThOD parallel bij hogere concentraties te onderzoeken. Vervolgens wordt het experiment geënt met één druppel uit een spitse pipet per liter eindvolume. Dit geldt ook voor de blanco.

Tenslotte wordt de oplossing op volume gebracht met een hevel die tot op de bodem van de kolf komt. Hierdoor is voldoende menging verzekerd. Vervolgens wordt de betreffende groep flessen onmiddellijk met behulp van een hevel gevuld met elke bereide oplossing uit het onderste kwart (niet van de bodem) van de fles.

Bovendien worden de nulcontroles geanalyseerd of bewaard voor latere analyse (voor de O<sub>2</sub>-bepaling door neerslag met MnCl<sub>2</sub> en NaOH).

De overige parallel-flessen worden in een waterbad van 20 °C gezet, in het donker bewaard en respectievelijk na 5, 15 en 28 dagen uit het bad gehaald en geanalyseerd. Parallel aan elke serie wordt een complete serie afgewerkt voor het onderzoek van de blanco, de zuurstofafname zonder enting en de controlestof.

*Remmingstest*

Stoffen kunnen gemakkelijk en eenvoudig in de gesloten-flesproef worden onderzocht op remmende effecten:

reeks 1: 2 mg/l van een goed afbreekbare verbinding, bij voorbeeld vetalcohol gecondenseerd met ethyleenoxide, in een moleculaire verhouding van 1:10, of één van de controlestoffen;

reeks 2: x mg/l testmateriaal (x is meestal 2);

reeks 3: 2 mg/l van de goed afbreekbare verbindingen plus x mg/l testmateriaal.

Als de BOD-waarden van serie 3 lager zijn dan de som van de waarden van serie 1 en 2, kan het testmateriaal bij deze concentratie worden beschouwd als bacterieremmend. Dit controle-experiment is altijd noodzakelijk als een gemeten negatieve of slechte afbreekbaarheid onlogisch lijkt in verband met de structuur van het testmateriaal; dat wil zeggen als er aanwijzingen bestaan dat dit resultaat wordt veroorzaakt door remming.

1.6.5. *Bepaling van de opgeloste zuurstof*

De zuurstofconcentratie wordt bepaald volgens een chemische of elektrochemische, internationaal of nationaal erkende standaardmethode.

## 2. GEGEVENS EN EVALUATIE

De analyseresultaten worden geregistreerd op het bijgevoegde formulier (aanhangel 3).

Het verloop van de afbraaktest wordt grafisch voorgesteld in een diagram (aanhangel 4).

De resultaten van de afbreekbaarheidstest zijn geldig als aan de volgende voorwaarden is voldaan:

- in dezelfde testreeks moet het controlemateriaal binnen 28 dagen een biologische afbraak  $\geq 60\%$  opleveren. Als dit niet het geval is, dient de gehele testreeks te worden verworpen;
- het zuurstofverbruik in de fles zonder enting mag niet hoger zijn dan 0,3 mg O<sub>2</sub>/l na 5 dagen en 0,4 mg O<sub>2</sub>/l na 28 dagen; de waarden van de geënte blanco mogen niet hoger zijn dan 0,5 mg O<sub>2</sub>/l na 5 dagen en 0,6 mg O<sub>2</sub>/l na 15 en 28 dagen.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. Testrapport

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

- de gegevens die moeten worden vermeld volgens het formulier (zie aanhangsel 3),
- het verloop van de afbraaktest, grafisch voorgesteld in een diagram dat opstartfase, afbraakfase, helling en tijdsinterval weergeeft (tijdsinterval betekent hier een periode van 10 dagen die begint op de dag dat de biodegradatie 10 % overschrijdt);
- methode voor de COD-bepaling,
- methode voor de zuurstofmetingen;
- dispersieprocedure voor onder de testomstandigheden slecht oplosbare stoffen;
- bewijs van geldigheid van de test.

### 3.2. Interpretatie van de resultaten

Er moet rekening worden gehouden met de mogelijkheid dat stikstofhoudende verbindingen de resultaten kunnen beïnvloeden.

Ten gevolge van het stringente karakter van deze test betekent een lage gevonden waarde niet noodzakelijk dat de testverbinding niet biologisch afbreekbaar is in het milieu; het vormt een aanwijzing dat nader onderzoek nodig is om dit vast te stellen.

Onderzochte stoffen met een hoog zuurstofverbruik tijdens deze test moeten worden beschouwd als gemakkelijk biologisch afbreekbaar, mits dit niveau wordt bereikt binnen een tijdsinterval van 10 dagen gerekend vanaf de eerste dag waarop de waargenomen biologische afbraak hoger was dan 10 %.

## 4. LITERATUUR

- (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, No 2, 1979, p. 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, No 1, 1981, p. 45—55.

## Aanhangsel 1

## Berekening van het theoretisch biochemisch zuurstofverbruik

De ThOD-waarde van de verbinding  $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$  met molecuulgewicht MW wordt berekend volgens:

$$\text{ThOD}_{\text{NH}_3} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{\text{MW}}$$

Deze berekening houdt in dat C wordt omgezet in  $\text{CO}_2$ , H in  $\text{H}_2\text{O}$ , P in  $\text{P}_2\text{O}_5$  en Na in  $\text{Na}_2\text{O}$ . Halogeen wordt verwijderd als waterstofhalogenide en stikstof als ammoniak.

Voorbeeld: Glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), MW = 180

$$\text{ThOD} = \frac{16 \left( 2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg O}_2/\text{mg glucose.}$$

Molecuulgewichten van andere zouten dan die van de alkalimetalen worden berekend uitgaande van de veronderstelling dat de zouten zijn gehydrolyseerd.

Zwavel wordt verondersteld 6-waardig te zijn geoxydeerd.

Voorbeeld: Natrium n-alkylbenzeensulfonaat ( $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{SO}_3\text{Na}$ ), MW = 348

$$\text{ThOD} = \frac{16 \left( 36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg O}_2/\text{mg stof.}$$

Bij stikstofhoudende verbindingen kan de stikstof worden verwijderd als ammoniak, nitriet of nitraat afhankelijk van de waarde van het theoretisch biochemisch zuurstofverbruik.

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_2^-} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{\text{MW}}$$

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_3^-} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{\text{MW}}$$

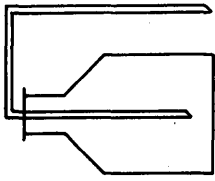
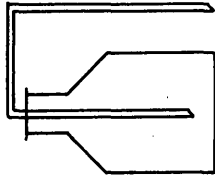
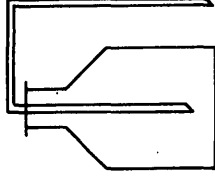
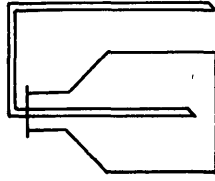
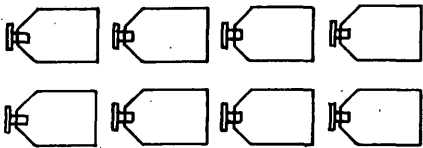
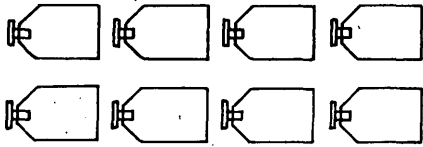
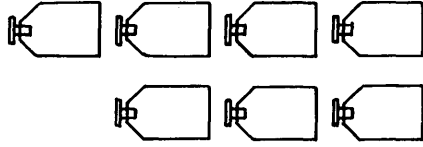
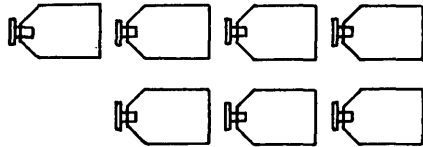


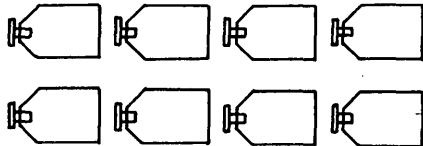
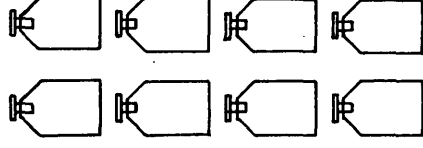
Stel dat tijdens een analyse volledige nitraatvorming zou zijn waargenomen in geval van een secundair amine:  $(\text{C}_{12}\text{H}_{25})_2\text{NH}$ , MW = 353

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_3^-} = \frac{16 \left( 48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg O}_2/\text{mg stof.}$$

Aanhangsel 2

Schema voor de indeling van flessen voor de gesloten-flesproef

(\* = specifieke analyse indien beschikbaar)

	Controles		Bepalingen	
Analyses onmiddellijk 5 dagen 15 dagen 28 dagen	Gedest. water/zout-oplossingen ↓ Minerale voedingsoplossing (controle van zuurstofblanco)	↓ Entingsblanco	Gedest. water/zout-oplossingen/enting/ijkverbinding ↓ Controlestof	Gedest. water/zout-oplossingen/enting/testmateriaal ↓ Testmaterialen
				
	O <sub>2</sub> -bep. 	O <sub>2</sub> -bep. 	O <sub>2</sub> -bep. 	O <sub>2</sub> -bep. 
	*-bep. 	*-bep. 	*-bep. 	*-bep. 

## Aanhangsel 3

## Biologische afbraak: gesloten-flesproef (formulier)

Onderzoekinstelling: .....

Leider van het onderzoek: .....

Begindatum van de test: ..... Exp. nr.: .....

Testmateriaal: .....

Chemische structuur: .....

Analyse (Winkler-methode of zuurstofelektrode): .....

ThOD of COD van het testmateriaal: ..... mg O<sub>2</sub>/mg

Temperatuur van het verdunningswater na beluchting: .....

O<sub>2</sub>-concentratie van het water na beluchting en stabiel van de test: ..... mg O<sub>2</sub>/l

Inoculum: .....

---

*Testresultaat:*

$D_t$  = ..... BOD in procenten ThOD na 28 dagen,  
 of  
 $D_t$  = ..... BOD in procenten COD na 28 dagen

*Geldigheid van de test:*

Controlestof: .....

Resultaat: ... BOD in procenten ThOD na 28 dagen

Referentie: Exp. nr.: .....

*Opmerkingen:*

Biologische afbraak: gesloten-flesproef

Onderzoekinstelling: .....

Testmateriaal: .....

Exp. nr.: .....

A: O<sub>2</sub>-bepalingen

	Kolf nr.		mg O <sub>2</sub> /l na x dagen			
			0	5	15	28
Minerale voedingsoplossing zonder testmateriaal en zonder inoculum	O <sub>2</sub> -controle	c <sub>1</sub>		—	—	—
		c <sub>2</sub>		—	—	—
	gemiddelde	$m_o = \frac{c_1 + c_2}{2}$				
Minerale voedingsoplossing zonder testmateriaal maar met inoculum	1	c <sub>3</sub>				
	2	c <sub>4</sub>				
	gemiddelde blanco	$m_b = \frac{c_3 + c_4}{2}$				
Minerale voedingsoplossing met testmateriaal en met inoculum	1	a <sub>1</sub>				
	2	a <sub>2</sub>				
	gemiddelde testmateriaal	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

B: O<sub>2</sub>-verbruik (mg BOD/l) na x dagen

$$BOD_x = (m_o - m_{t_x}) - (m_o - m_{b_x}) \quad (1)$$

mg BOD/l na x dagen		
5	15	28

(1) Dit verschil is belangrijk als controle op de geldigheid van de test (zie 1.6.3.1.3).

C: Uitwerking

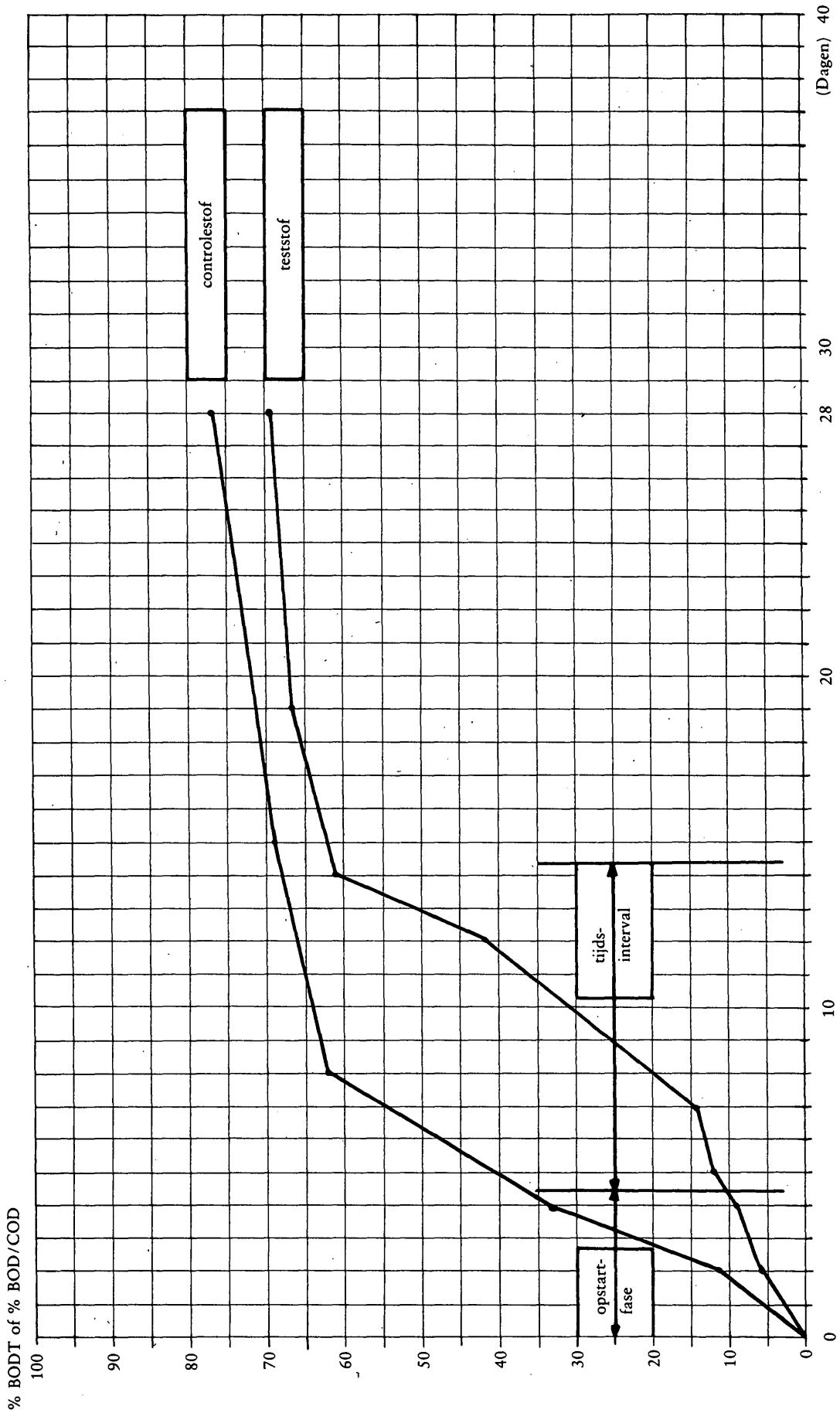
$$D_t = \frac{\text{mg BOD}_x/\text{l}}{\text{mg stof/l} \cdot \text{ThOD}} \cdot 100 \quad \text{of} \quad \% \text{ BOD}_x/\text{COD} = \frac{\text{mg BOD}_x/\text{l}}{\text{mg stof/l} \cdot \text{COD}} \cdot 100$$

	na x dagen		
	5	15	28
% BOD/ThOD			
% BOD <sub>x</sub> /COD			



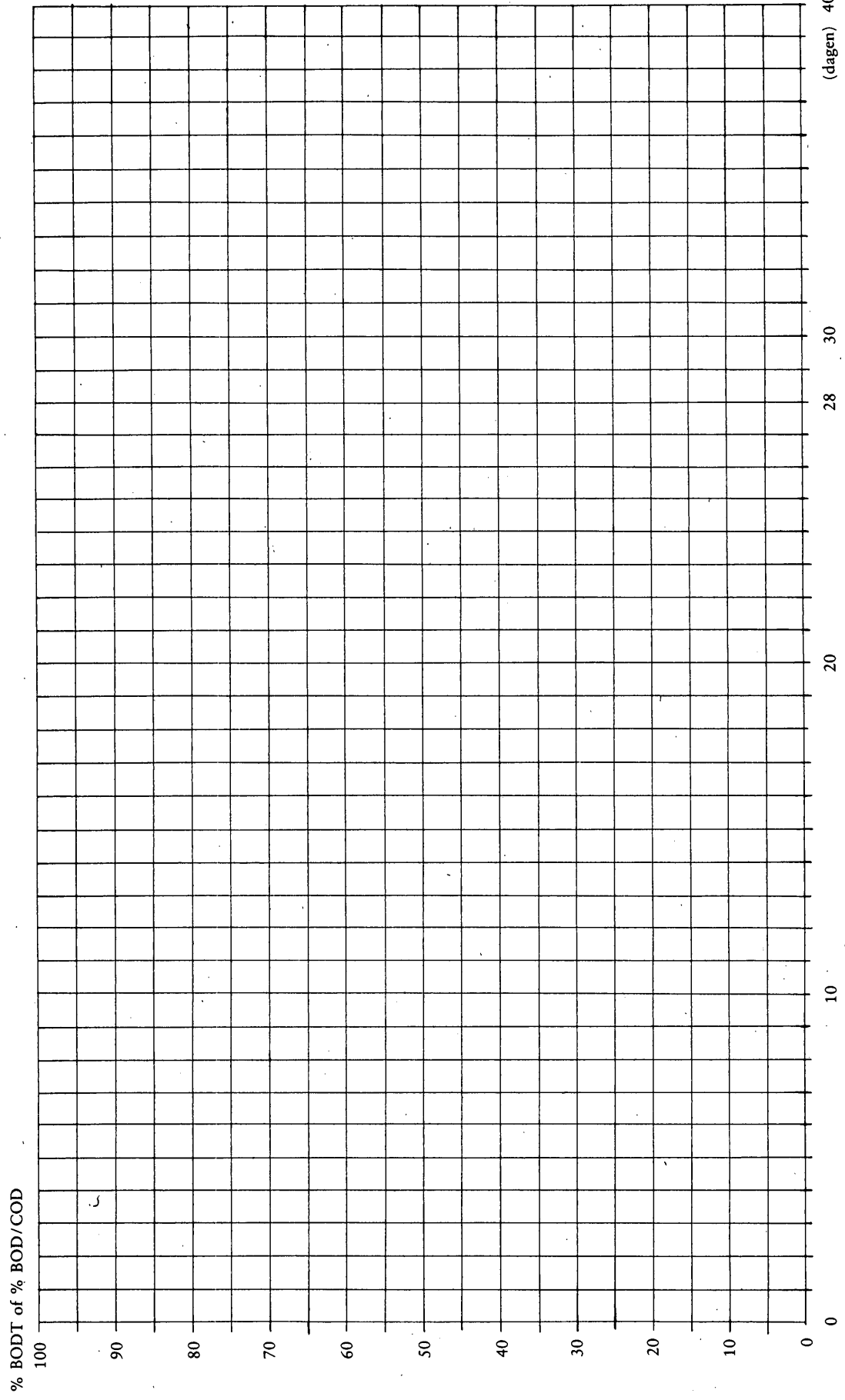
Aanhangsel 4  
Gesloten-flesproef

Onderzoekinstelling: ..... Testmateriaal: ..... Exp. nr.: .....



Gesloten-flesproef

Onderzoekinstelling: ..... Testmateriaal: ..... Exp. nr.: .....



## C. 7. DEGRADATIE

## BIOLOGISCHE AFBRAAK: GEWIJZIGDE MITI-TEST

## 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

Het doel van deze testmethode is de meting van de biologische afbreekbaarheid van organische stoffen in een waterig medium met een ingesloten respirometer waarmee het biochemisch zuurstofverbruik (BOD) kan worden afgelezen.

Voor de berekening van het theoretisch zuurstofverbruik (ThOD) is de empirische formule van het testmateriaal vereist; indien dit niet bekend is kan het COD worden gebruikt.

De methode is alleen van toepassing op die organische teststoffen die bij de in de test gebruikte concentratie:

- een verwaarloosbare dampspanning hebben;
- niet remmend werken op bacteriën;
- niet de CO<sub>2</sub>-absorbans bereiken en ermee een reactie aangaan.

Als het testmateriaal niet oplosbaar is bij de in de test te gebruiken concentratie kunnen bijzondere maatregelen, bij voorbeeld het toepassen van ultrasonische dispersie, nodig zijn om de teststof goed te dispergeren.

Gegevens over de toxiciteit van de stof voor micro-organismen kunnen nuttig zijn voor de interpretatie van lage gevonden waarden en bij de keuze van geschikte testconcentraties.

Gegevens over de onderlinge verhoudingen van de belangrijkste bestanddelen van het testmateriaal zijn nuttig voor de interpretatie van de verkregen resultaten.

## 1.2. Definities en eenheden

$$\text{Procentuele afbraak} = \frac{\text{BOD} - B}{\text{ThOD (of COD)}} \times 100 \%$$

of

$$\text{Procentuele afbraak} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

waarin:

BOD = biochemisch zuurstofverbruik („Biological Oxygen Demand”) van de testverbinding (experimenteel) (mg) gemeten op de BOD-curve.

B = zuurstofverbruik van de basisvoedingsoplossing, waaraan inoculum is toegevoegd (experimenteel) (mg) gemeten op de BOD-curve.

ThOD = theoretisch zuurstofverbruik („Theoretical Oxygen Demand”) wanneer de testverbinding volledig zou worden geoxydeerd (theoretisch) (mg).

COD = chemisch zuurstofgebruik („Chemical Oxygen Demand”).

S<sub>a</sub> = resthoeveelheid testverbinding na beëindiging van de biologische afbreekbaarheidstest (experimenteel) (mg).

S<sub>b</sub> = resthoeveelheid testverbinding in de blanco-test met water waaraan alleen de testverbinding is toegevoegd (experimenteel) (mg).

## 1.3. Referentiestoffen

Het is wenselijk om de activiteit van het inoculum te controleren met behulp van controlestoffen. Hiervoor kan aniline, natriumacetaat of natriumbenzoaat worden gebruikt. Als de uit het zuurstofver-

bruik berekende procentuele afbraak van aniline na 7 dagen niet meer dan 40 % en na 14 dagen niet meer dan 65 % bedraagt, wordt de test als ongeldig beschouwd. Ook als het recovery-percentage van Sb tamelijk laag blijkt te zijn, wordt de test als ongeldig beschouwd.

#### 1.4. Principe van de testmethode

De testchemicaliën zijn de enige bron van organisch koolstof. Er vindt geen adaptatie van micro-organismen aan testchemicaliën plaats.

Er wordt een automatisch meetapparaat voor het zuurstofverbruik in een gesloten systeem (BOD-meter) gebruikt. De te onderzoeken stoffen worden in de testvaten geënt met micro-organismen. Tijdens de testperiode wordt het biochemisch zuurstofverbruik continu gemeten met de BOD-meter. De biologische afbreekbaarheid wordt berekend op basis van het BOD. Daarnaast worden aanvullende chemische analyses uitgevoerd, zoals de meting van de concentratie van opgelost organisch koolstof, de concentratie van overblijvende chemicaliën, enzovoort.

#### 1.5. Kwaliteitscriteria

##### 1.5.1. Reproduceerbaarheid

Over het algemeen goed, vooral bij chemicaliën met een oplosbaarheid in water die groter is dan 0,1 g/l.

##### 1.5.2. Gevoeligheid

A. Zuurstofverbruik: detectiegrens = 1 mg (zuurstofverbruik door micro-organismen).

B. Chemische analyse: afhankelijk van de gevoeligheid van de analysemethoden.

##### 1.5.3. Specificiteit

Toepasbaar op alle soorten chemicaliën met  $(C)_{\text{water}} / (C)_{\text{lucht}} \geq 1$ . Voor vluchtige stoffen moet een „aangepaste BOD-meter” bestaande uit capillaire buizen en een gewone BOD-meter worden gebruikt (zie aanhangsel 1).

#### 1.6. Beschrijving van de testmethode

##### 1.6.1. Reagentia

1.6.1.1. Het gedestilleerde water mag niet meer dan 10 % van de door het testmateriaal geïntroduceerde organisch koolstof bevatten.

##### 1.6.1.2. Basisvoedingsoplossing

Aan 3 ml van elk der oplossingen A, B, C en D wordt water toegevoegd tot een totaal van 1 000 ml. (Er wordt steeds gebruik gemaakt van gedeïoniseerd water.)

A: $K_2HPO_4$ (kaliumdiwaterstoffosfaat)	21,75 g
$KH_2PO_4$ (kaliumwaterstoffosfaat)	8,50 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (dinatriumwaterstoffosfaatdihydraat)	44,60 g

NH <sub>4</sub> Cl (ammoniumchloride)	1,70 g'
Oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml. De pH moet 7,2 zijn.	
B: MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (magnesiumsulfaatheptahydraat)	22,50 g
Oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.	
C: CaCl <sub>2</sub> (calciumchloride)	27,50 g
Oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.	
D: FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (ijzer(III)chloridehexahydraat)	0,25 g
Oplossen in water (1.6.1.1) en aanvullen tot 1 000 ml.	

### 1.6.2. *Apparatuur*

BOD-meter uitgerust met zes flessen (elk 300 ml):

fles 1 en 2:

300 ml gedeïoniseerd water + 30 mg teststof;

fles 3 en 4:

300 ml basisvoedingsoplossing + 9 mg actief slib (droge stof) + 30 mg teststof;

fles 5:

300 ml basisvoedingsoplossing + 9 mg actief slib (droge stof) + 30 mg aniline of andere referentiestof;

fles 6:

300 ml basisvoedingsoplossing + 9 mg actief slib (droge stof).

### 1.6.3. *Bereiding van het inoculum*

#### 1.6.3.1. Actief slib

Verzamelpaatsen van slibmonsters: slibmonsters worden in principe op ten minste 10 plaatsen over het gehele land genomen, vooral in die gebieden waar mag worden aangenomen dat een verscheidenheid aan chemische stoffen wordt gebruikt en geloosd.

In Japan wordt, bij voorbeeld, het standaard actief slib van het Japanese Chemical Biotesting Center betrokken van de volgende plaatsen en vervolgens gemengd.

- Stadsafvalwaterzuivering: drie installaties respectievelijk gelegen in het noorden, midden en zuiden van Japan.
- Industriële afvalwaterzuivering: één installatie die wordt gebruikt voor de zuivering van afvalwater van de chemische industrieën.
- Rivier: drie rivieren respectievelijk gelegen in het noorden, midden en zuiden van Japan.
- Meer: één meer gelegen in het midden van Japan.
- Zee: twee binnenzeeën van Japan.

Frequentie waarmee slibmonsters worden genomen: slibmonsters moeten in principe viermaal per jaar worden genomen: in maart, juni, september en december.

Methoden voor het nemen van slibmonsters:

- Stadsafvalwater: 1 liter retourslib van een afvalwaterinstallatie.
- Rivieren, meren en moerassen of zee: 1 liter oppervlaktewater en 1 liter oppervlaktegrond van de oever, welke in contact is met de atmosfeer.

### Bereiding

De slibmonsters van de verschillende bronnen worden gemengd door deze in één vat te roeren, waarna men het mengsel laat staan. Drijvend vreemd materiaal wordt verwijderd en de bovenstaande vloeistof wordt gefiltreerd door filtreerpapier No. 2. De pH van het filtraat wordt op  $7,0 \pm 1,0$  gebracht met natronloog of fosforzuur. Het filtraat wordt overgebracht in een kweekreservoir en belucht.

### Kweek

Nadat de beluchting van de verkregen oplossing gedurende ongeveer 30 minuten is stopgezet, wordt ongeveer een derde gedeelte van de bovenstaande vloeistof verwijderd.

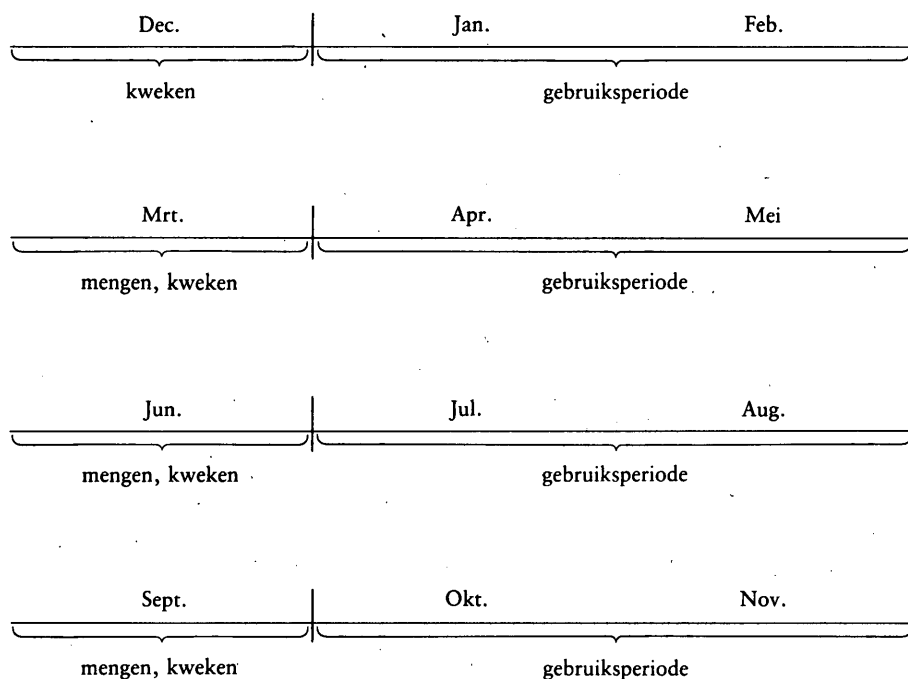
Aan het restant wordt een even groot volume van 0,1 % synthetisch rioolwater (0,1 % synthetisch rioolwater: 1 g glucose, 1 g peptonen en 1 g monokaliumfosfaat worden opgelost in 1 liter water waarna de pH van de oplossing met natronloog op  $7,0 \pm 1,0$  wordt gebracht.) toegevoegd en het mengsel wordt wederom belucht. Deze procedure wordt iedere dag éénmaal herhaald. Het kweken vindt plaats bij  $25 \pm 2$  °C.

### Controle

Ter controle van de kweekprocedure worden de volgende zaken gecontroleerd en zonodig bijgesteld:

- aanzicht van de bovenstaande vloeistof: de bovenstaande vloeistof van het actief slib moet helder zijn;
- bezinking van het actief slib: het actief slib moet goed neerslaan in grote vlokken;
- vormingstoestand van het actief slib: indien geen groei van de vlokken wordt waargenomen, wordt of het toe te voegen volume 0,1 % synthetisch rioolwater of de frequentie waarmee dit wordt toegevoegd, verhoogd;
- de pH van de bovenstaande vloeistof is  $7,0 \pm 1,0$ ;
- temperatuur: de kweektemperatuur voor actief slib is  $25 \pm 2$  °C;
- mate van beluchting: bij de vervanging van de bovenstaande vloeistof door synthetisch rioolwater moet de oplossing in het kweekreservoir voldoende worden belucht, zodat de concentratie opgelost zuurstof in de oplossing hoger dan 5 mg/l blijft;
- microflora van het actief slib: bij microscopisch onderzoek van het actief slib (vergrotingsfactor 100—400) moeten een aantal protozoa van verschillende soorten protozoa en wolkachtige vlokken worden waargenomen;
- menging van vers en oud actief slib: ten einde vers en oud actief slib dezelfde activiteit te laten behouden, wordt het filtraat van de bovenstaande vloeistof van het op dat moment in de test gebruikte actief slib gemengd met een gelijk volume filtraat van de bovenstaande vloeistof van een vers verzameld actief slib. Met dit mengsel wordt verder gekweekt;
- controle op de activiteit van actief slib: de activiteit van actief slib moet periodiek (ten minste éénmaal per drie maanden) volgens de hierna beschreven testmethode worden gecontroleerd met behulp van standaardstoffen. Met name wanneer monsters van vers en oud actief slib worden gemengd, moet een nauwkeurige controle plaatsvinden ten opzichte van het oude actief slib.

Voorbeeld van bereiding van actief-slibmonsters en gebruiksperiode:



(Enzovoort)

#### 1.6.4. Voorbehandeling van de teststof

Als de teststof niet in water oplosbaar is bij de te onderzoeken concentratie, moet de stof tot een zo fijn mogelijk poeder worden gemaakt.

#### 1.6.5. Toevoeging van de teststof en voorbereiding voor de test

De volgende testvaten (zie 1.6.2) zijn nodig. Deze worden op de testtemperatuur gebracht.

- 1) Twee testvaten met water waaraan 100 mg/l teststof is toegevoegd (testvaten 1 en 2).
- 2) Twee testvaten met de basisvoedingsoplossing, waaraan 100 mg/l teststof is toegevoegd; de pH van deze oplossing wordt zonodig op 7 gebracht vóór enting met actief slib (testvaten 3 en 4).
- 3) Een testvat met basisvoedingsoplossing waaraan 100 mg/l aniline of andere referentiestof is toegevoegd (testvat 5).
- 4) Een testvat voor de blanco controletest, met uitsluitend de basisvoedingsoplossing (testvat 6).

##### 1.6.5.1. Enting met actief slib

Aan de testvaten 3, 4, 5 en 6 wordt zoveel inoculum toegevoegd, dat de in de Japanese Industrial Standards (3) bij wijze van voorbeeld omschreven gesuspendeerde stof een concentratie van 30 mg/l heeft.

##### 1.6.5.2. Testomstandigheden

- Concentratie testchemicaliën: 100 mg/l.
- Concentratie actief slib: 30 mg/l.
- Testtemperatuur: 20—25 °C.

- Duur: 28 dagen.
- Uitvoeren in het donker. Iedere dag moeten de temperatuur en kleurverandering van de inhoud van het kweekvat worden gecontroleerd.
- Krachtig roeren met mechanische roerder.

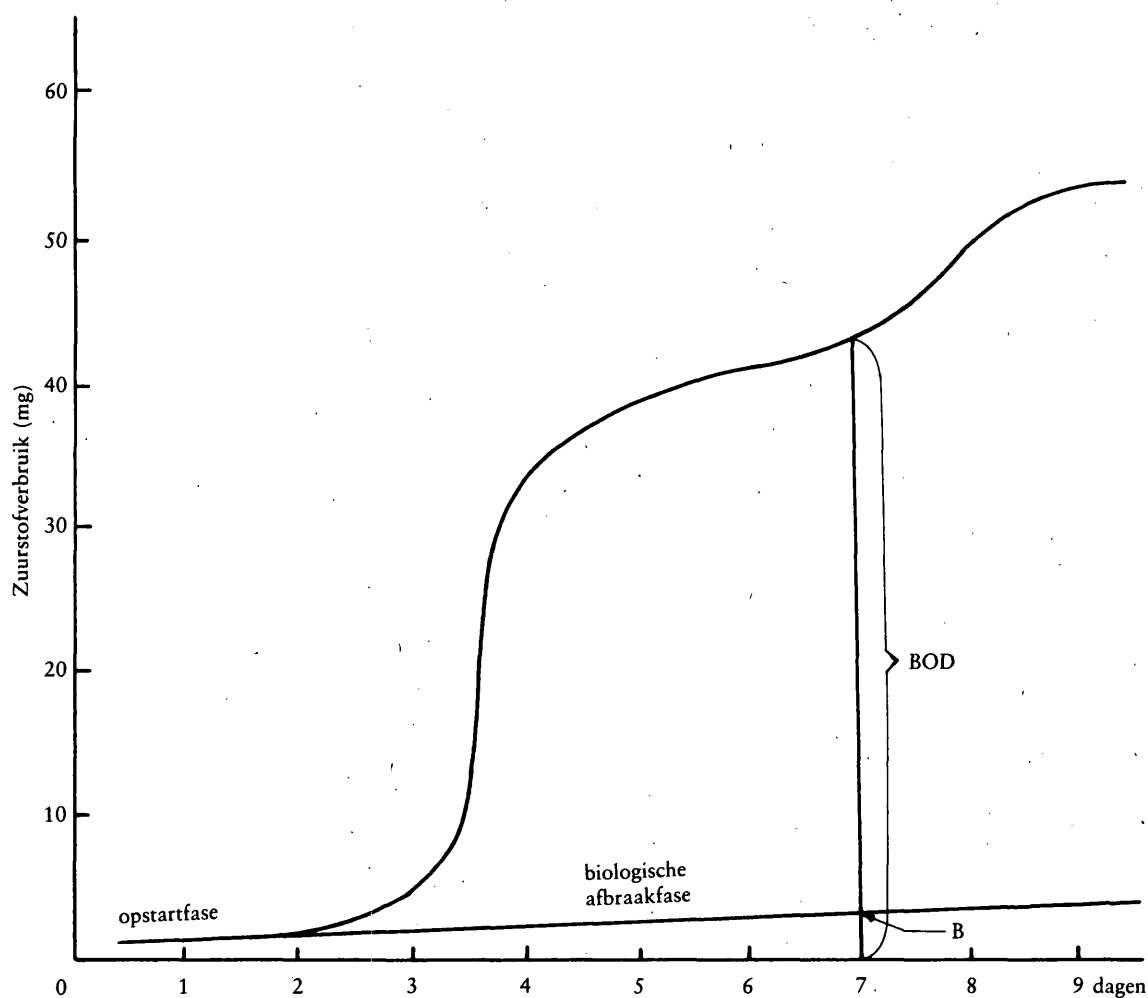
#### 1.6.6. *Uitvoering van de test*

De BOD-curve wordt continu gedurende 28 dagen geregistreerd (zie figuur).

Na de testperiode van 28 dagen worden de pH en de concentraties van overblijvende chemicaliën en intermediaire stoffen in de testvaten bepaald.

*Figuur*

BOD-kromme van aniline



De testschemicaliën in het vat zonder actief slib worden ook geanalyseerd om te kunnen vaststellen, of de teststof enige verandering heeft ondergaan tijdens de testperiode of dat er verliezen zijn opgetreden van de oorspronkelijke teststof tengevolge van verdamping of adsorptie aan de wanden van de testvaten, enzovoort.

#### 1.6.7. *Analytische hulpmiddelen*

Als de teststof in water oplosbaar is, wordt ook de resthoeveelheid totaal organisch koolstof bepaald aan het einde van de test.



## a) Wanneer een totaal-organisch-koolstofanalyseapparaat wordt gebruikt:

uit het testvat wordt een monster van 10 ml van de te onderzoeken oplossing genomen en 5 minuten bij 3 000 g gecentrifugeerd. De resthoeveelheid totaal organisch koolstof in de bovenstaande vloeistof wordt bepaald met een totaal-organisch-koolstofanalyseapparaat.

## b) Bij gebruik van andere analyseapparaten:

de gehele inhoud van een testvat wordt geëxtraheerd met een voor de testverbinding geschikt oplosmiddel en na geschikte voorbehandeling, zoals concentreren, wordt de resthoeveelheid testverbinding met een analyse-instrument bepaald (gaschromatograaf, massaspectrometer, spectrofotometer, enzovoort).

Voor vluchtige verbindingen moet het temperatuurregelbad van de BOD-meter tot 10 °C worden gekoeld. Deze temperatuur moet ten minste 30 minuten worden gehandhaafd om verdamping te voorkomen. Vervolgens moeten de analysestappen a) en b) worden uitgevoerd.

## 2. GEGEVENS EN EVALUATIE

## 2.1. Verwerking van de resultaten

De methoden om de procentuele afbraak te berekenen uit het zuurstofverbruik en uit de resultaten van directe analyse zijn gedefinieerd in 1.2.

## 2.2. Evaluatie van de resultaten

Het theoretisch zuurstofverbruik kan worden berekend op de manier zoals beschreven is in aanhangsel 2 of met gebruikmaking van de oorspronkelijke MITI-procedure:

<i>Element</i>	<i>Geoxydeerde vorm</i>
C	CO <sub>2</sub>
H	H <sub>2</sub> O
N	NO <sub>2</sub>
S	SO <sub>2</sub>
X (halogen)	X

## 3. RAPPORTAGE

## 3.1. Testrapport

Het testrapport moet, indien mogelijk, de volgende gegevens bevatten:

- gegevens over de testchemicaliën: naam, structuurformule, molecuulgewicht, zuiverheid, aard van verontreinigingen, fysisch-chemische eigenschappen van de teststof, identificatiegegevens van de teststof;
- testomstandigheden;
- actief slib: plaats waar slibmonsters werden genomen en concentratie;
- teststof: concentratie;
- testduur;
- testtemperatuur;
- analytische procedure:
  - voorbehandeling,
  - analytische conditie van het instrument,
  - recovery-percentages van de analyse,
  - identificatie van intermediaire stof;

- resultaten:
  - krommen van de biologische afbraak (controle van de activiteit van het inoculum plus kromme van de stof),
  - BOD (mg),
  - B (mg),
  - Sa (mg),
  - Sb (mg),
  - ThOD (mg),
  - procentuele afbraak via BOD,
  - procentuele afbraak via chemische analyse,
  - chromatogrammen af spectra van testverbindingen die zijn gebruikt voor de analyse;
- bewijs van geldigheid (zie 1.3).

### 3.2. Interpretatie van de resultaten

Er dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid dat de resultaten worden beïnvloed door stikstofhoudende verbindingen.

Als het recovery-percentage van  $S_b$  ongeveer 10 % of minder blijkt te zijn, wijst dit op analytische problemen of bij voorbeeld hydrolyse; in dat geval dient de interpretatie met de nodige voorzichtigheid te geschieden.

Ten gevolge van het stringente karakter van deze test betekent een lage gevonden waarde niet noodzakelijk dat de teststof niet biologisch afbreekbaar is in het milieu. Het vormt een aanwijzing dat nader onderzoek nodig is om dit vast te stellen.

Teststoffen die in deze test een hoog zuurstofverbruik opleveren moeten worden beschouwd als gemakkelijk biologisch afbreekbaar, mits dit niveau wordt bereikt binnen een tijdsinterval van 10 dagen gerekend vanaf de eerste dag waarop de waargenomen biologische afbraak hoger was dan 10 %.

## 4. LITERATUUR

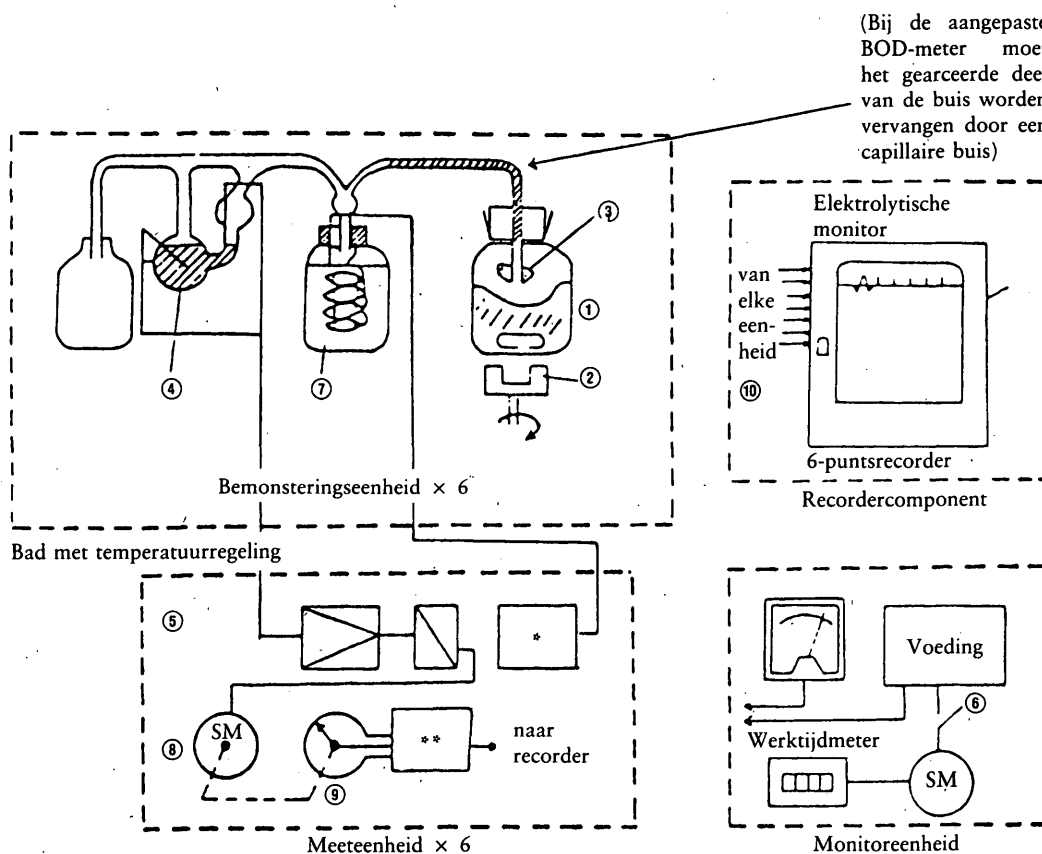
- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301C. Decision of the Council C(81)30 Final.
- (2) Biodegradability and bioaccumulation test of chemical substances (C-5/98/JAP), 1978.
- (3) The chemical substances control law in Japan (Chemical Products Safety Division, Basic Industries Bureau, MITI) (C-2/78/JAP), 1978.
- (4) The biodegradability and bioaccumulation of new and existing chemical substances, 5,8 (C-3/78/JAP), 1978.

## Aanhangsel 1

## Principe van de meetapparatuur voor de bepaling van het zuurstofverbruik in een gesloten systeem

Het zuurstofverbruik door micro-organismen kan worden bepaald door middel van een elektrochemisch analyseproces (coulometrie).

## Blok-schema van een elektrochemisch analyseproces



\* = constante-stroomcircuit

\*\* = constante-spanningcircuit

Het monster in de kweekfles (1) wordt geroerd door middel van een magnetische roerder (2). Naarmate de reactie verloopt wordt de opgeloste zuurstof in de vloeistof verbruikt. Zuurstof ( $O_2$ ) bovenin de kweekfles lost op in de vloeistof, waarbij  $CO_2$  in plaats daarvan wordt gevormd.

Naarmate deze  $CO_2$  wordt geabsorbeerd door natronkalk (3), nemen de partiële zuurstofdruk in de ruimte en de totale druk af.

De vermindering van de druk wordt waargenomen en omgezet in een elektrisch signaal door middel van een elektrodemanometer (4) en dit wordt versterkt met een versterker (5) om het relaiscircuit (6) in werking te stellen. Dit heeft tot gevolg dat de synchronomotor (8) in werking wordt gesteld. Tegelijkertijd wordt door een constante stroom elektrolytisch zuurstof gevormd uit de zwavelzuur-koperoplossing in een elektrolysevat (7).

Deze zuurstof wordt naar de kweekfles gevoerd en het drukherstel wordt waargenomen met de manometer, waardoor het relaiscircuit wordt uitgeschakeld en de elektrolyse en de synchronomotor worden stopgezet.

De bovenruimte in de kweekfles wordt voortdurend op constante zuurstofdruk gehouden. De in de kweekfles verbruikte hoeveelheid zuurstof is evenredig met de hoeveelheid elektrolytisch gewonnen zuurstof. Daar deze hoeveelheid elektrolytisch gewonnen zuurstof evenredig is met de elektrolysetijd, is de elektrolysestroom constant. Dienovereenkomstig wordt de omwentelingshoek van de synchronomotor (9) omgezet in een mV-signaal door middel van de gekoppelde potentiometer, waardoor de verbruikte hoeveelheid zuurstof wordt aangegeven op de recorder (10).

## Aanhangsel 2

## Berekening van het theoretisch biochemisch zuurstofverbruik

De ThOD-waarde van de verbinding  $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$  met molecuulgewicht MW wordt berekend volgens:

$$\text{ThOD}_{\text{NH}_3} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{\text{MW}}$$

Deze berekening houdt in dat C wordt omgezet in  $\text{CO}_2$ , H in  $\text{H}_2\text{O}$ , P in  $\text{P}_2\text{O}_5$  en Na in  $\text{Na}_2\text{O}$ . Halogeen wordt verwijderd als waterstofhalogenide en stikstof als ammoniak.

Voorbeeld: Glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), MW = 180

$$\text{ThOD} = \frac{16 \left( 2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg O}_2/\text{mg glucose.}$$

Molecuulgewichten van andere zouten dan die van de alkalimetalen worden berekend uitgaande van de veronderstelling dat de zouten zijn gehydrolyseerd.

Zwavel wordt verondersteld 6-waardig te zijn geoxydeerd.

Voorbeeld: Natrium-n-alkylbenzeensulfonaat ( $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{SO}_3\text{Na}$ ), MW = 348

$$\text{ThOD} = \frac{16 \left( 36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg O}_2/\text{mg stof.}$$

Bij stikstofhoudende verbindingen kan de stikstof worden verwijderd als ammoniak, nitriet of nitraat, overeenkomend met verschillende waarden van het theoretisch biochemisch zuurstofverbruik.

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_2^-} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{\text{MW}}$$

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_3^-} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{\text{MW}}$$

Stel dat tijdens een analyse volledige nitraatvorming zou zijn vastgesteld bij een secundaire amine:

$(\text{C}_{12}\text{H}_{25})_2\text{NH}$ , MW = 353

$$\text{ThOD}_{\text{NO}_3^-} = \frac{16 \left( 48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg O}_2/\text{mg stof.}$$

## Aanhangsel 3

## Biologische afbraak: gewijzigde MITI-test

Onderzoekinstelling: .....

Leider van het onderzoek: .....

Begindatum van de test: ..... Exp. nr.: .....

Testmateriaal: .....

Chemische structuur: .....

Analyse (Winkler-methode of zuurstofelektrode): .....

ThOD of COD van het testmateriaal: ..... mg O<sub>2</sub>/mg

Temperatuur van het verdunningswater na beluchting: .....

O<sub>2</sub>-concentratie van het water na beluchting en stabiel van de test: ..... mg O<sub>2</sub>/l

Inoculum: .....

*Testresultaat:*..... % afbraak =  $\frac{BOD - B}{ThOD} \times 100$  % na 28 dagen,

of

..... % afbraak =  $\frac{BOD - B}{COD} \times 100$  % na 28 dagen...... % afbraak =  $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$  % na 28 dagen.*Geldigheid van de test:*

Controlestof: .....

Resultaat: ..... BOD in procenten ThOD na 28 dagen

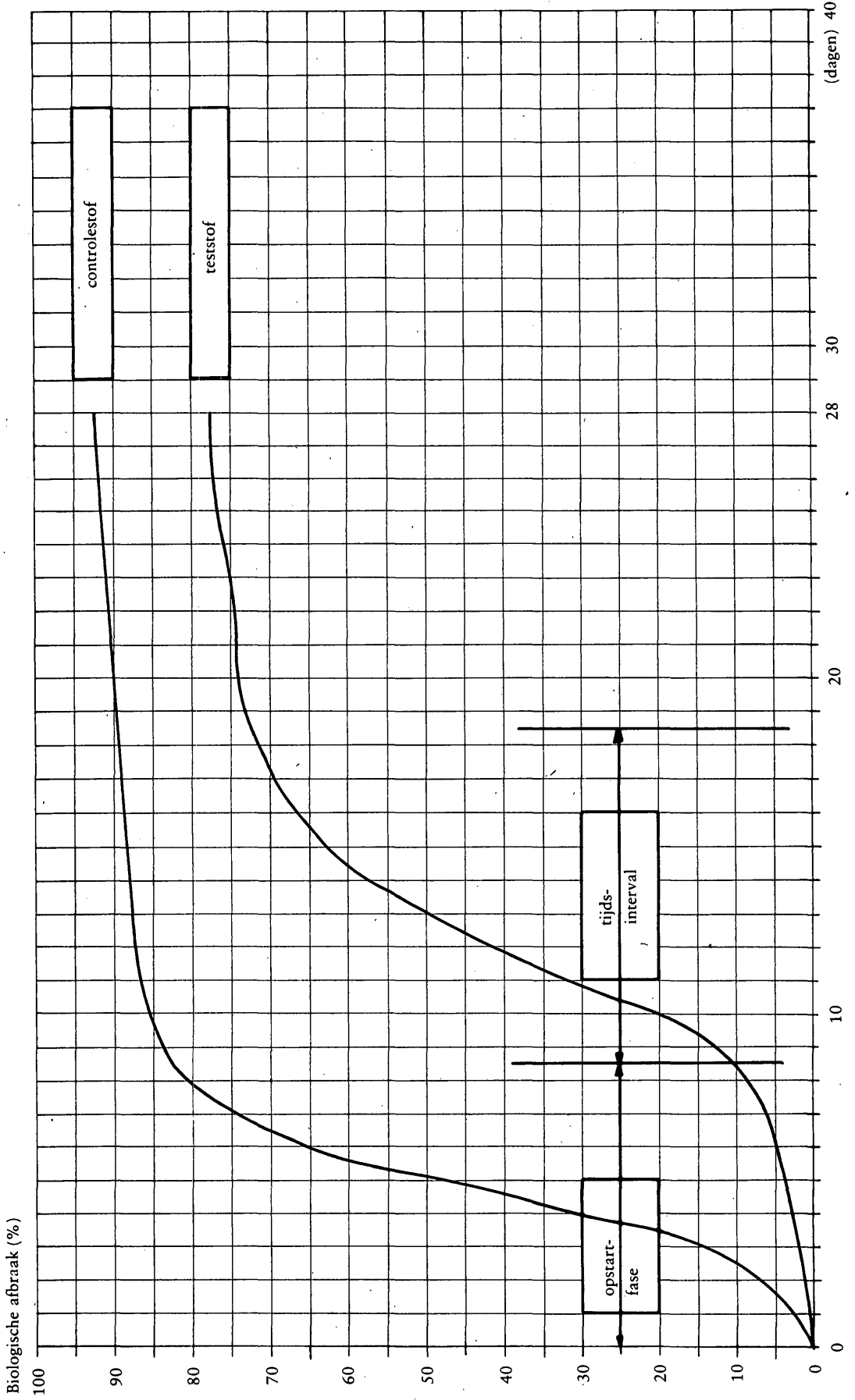
Referentie: Exp. nr.: .....

*Opmerkingen:*

Aanhangsel 4

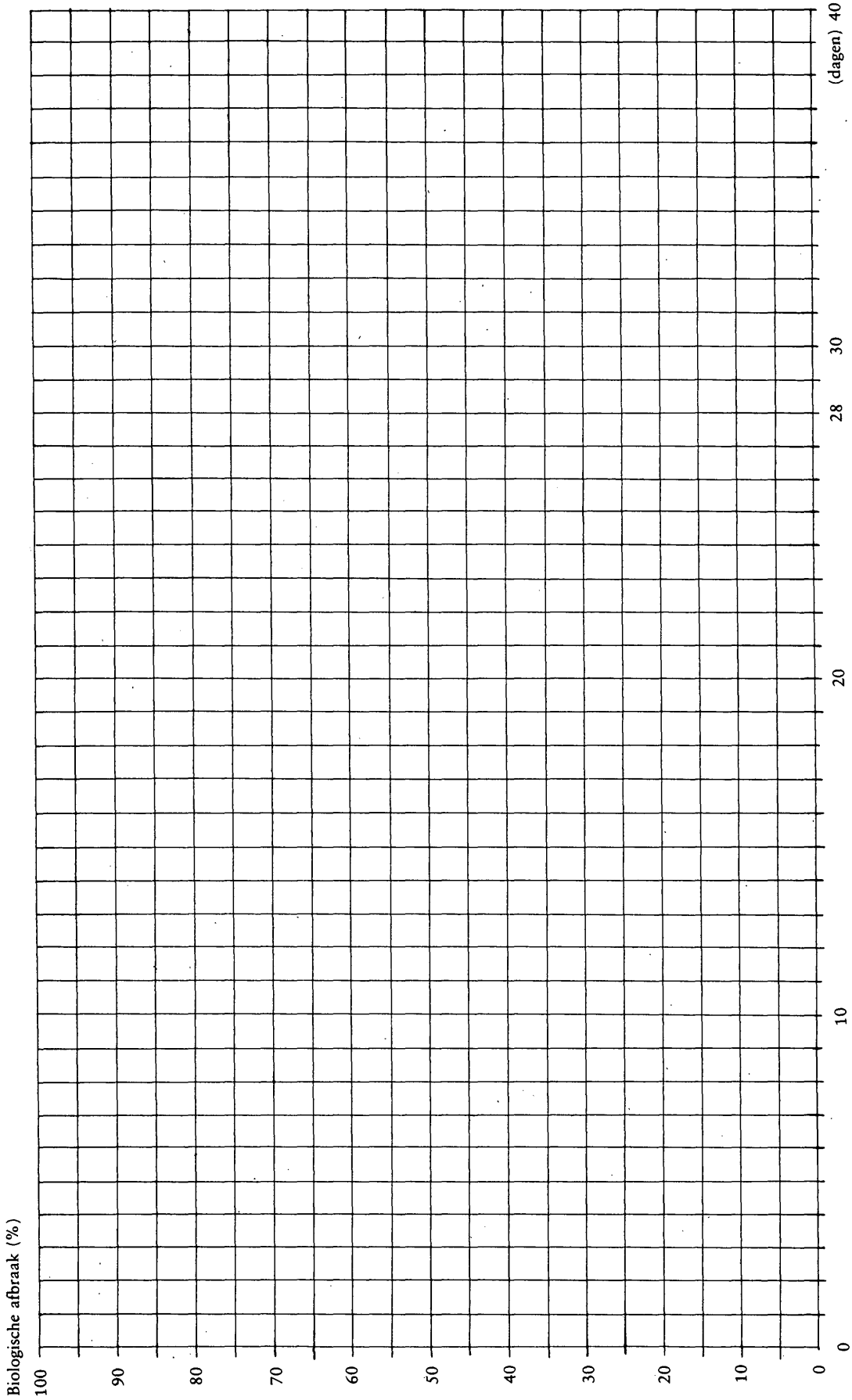
Gewijzigde MITI-test

Onderzoekinstelling: ..... Testmateriaal: ..... Exp. nr.: .....



Gewijzigde MITI-test

Onderzoekinstelling: ..... Testmateriaal: ..... Exp. nr.: .....



## C. 8. DEGRADATIE

### BIOCHEMISCH ZUURSTOFVERBRUIK

#### 1. METHODE

##### 1.1. Inleiding

Het doel van de methode is de meting van het biochemisch zuurstofverbruik (BOD — „Biochemical Oxygen Demand”) van vaste of vloeibare organische stoffen.

De gegevens die in deze test zijn verwerkt, hebben betrekking op in water oplosbare verbindingen; vluchtige verbindingen en verbindingen die slechts in geringe mate in water oplosbaar zijn, kunnen echter in principe ook worden getest.

De methode is alleen van toepassing op die organische teststoffen die bij de in de test gebruikte concentratie niet remmend werken op bacteriën. Als de teststof niet oplosbaar is bij de te onderzoeken concentratie, kunnen speciale maatregelen, zoals de toepassing van ultrasonische dispersie, nodig zijn om de teststof goed te dispergeren.

Gegevens over de toxiciteit van de stof kunnen van nut zijn bij de interpretatie van lage gevonden waarden en bij de keuze van geschikte testconcentraties.

##### 1.2. Definities en eenheden

Het BOD is gedefinieerd als de massa opgeloste zuurstof die onder voorgeschreven omstandigheden nodig is voor de biochemische oxydatie van een bepaald volume van een oplossing van de stof.

De resultaten worden weergegeven als g BOD per g geteste stof.

##### 1.3. Referentiestoffen

Het is nog niet mogelijk voor de ijking bepaalde referentiestoffen aan te bevelen. Het is wel wenselijk met een geschikte controlestof de activiteit van het inoculum te controleren.

##### 1.4. Principe van de testmethode

Een van tevoren bepaalde hoeveelheid van de stof wordt opgelost of gedispergeerd in een geschikt, goed belucht medium, geënt met micro-organismen en bij een constante vastgestelde temperatuur in het donker geïncubeerd.

Het BOD wordt bepaald door het verschil in de hoeveelheid opgeloste zuurstof bij het begin en bij het einde van de test. De testduur mag niet minder dan 5 dagen en niet meer dan 28 dagen bedragen.

Parallel wordt een blanco proef uitgevoerd zonder teststof.

##### 1.5. Kwaliteitscriteria

De bepaling van het BOD geldt niet zonder meer als bepaling van de biologische afbreekbaarheid van de stof. Deze test is alleen te beschouwen als oriënterende proef.

##### 1.6. Beschrijving van de testmethode

Eerst wordt een oplossing of dispersie van de stof bereid om een BOD-concentratie te verkrijgen die verenigbaar is met de gebruikte methode. Vervolgens wordt het BOD bepaald volgens een geschikte nationale genormaliseerde methode. Een internationale methode verdient de voorkeur, maar daar moet nog overeenstemming over worden bereikt.



**2. GEGEVENS — EVALUATIE**

Het BOD van de oplossing wordt berekend volgens de gekozen genormaliseerde methode en herleid naar g BOD per g teststof.

**3. RAPPORTAGE**

De gebruikte methode moet worden vermeld.

Het biochemisch zuurstofverbruik moet het gemiddelde zijn van ten minste drie geldige metingen.

Alle informatieve opmerkingen die van belang kunnen zijn voor de interpretatie van de resultaten moeten worden vermeld, vooral wat betreft verontreinigingen, fysische toestand, toxische effecten en de oorspronkelijke samenstelling van de stof welke van invloed zouden kunnen zijn op de resultaten.

Indien een stof is toegevoegd om de biologische nitrificatie te remmen, moet dit worden vermeld.

**4. LITERATUUR**

Lijst van genormaliseerde methoden, bij voorbeeld:

NF T 90—103: Determination of the Biochemical Oxygen Demand.

NBN 407: Biochemical Oxygen Demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The Determination of Biochemical Oxygen Demand (Methods for the Examination of Water and Associated Materials, HMSO, London).

## C. 9. DEGRADATIE

## CHEMISCH ZUURSTOFVERBRUIK

## 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

Het chemisch zuurstofverbruik is een maat voor de oxydeerbaarheid van een stof, uitgedrukt als de door de stof onder vaste laboratoriumomstandigheden verbruikte equivalente hoeveelheid zuurstof van een oxyderend reagens.

Informatie betreffende de formule van de stof is nuttig voor de uitvoering van deze test en de interpretatie van de resultaten (bij voorbeeld halogeenzouten, ijzer(II)zouten van organische verbindingen, organochloorverbindingen).

## 1.2. Definities en eenheden

Het chemisch zuurstofverbruik is een maat voor de oxydeerbaarheid van een stof, uitgedrukt als de door de stof onder vaste laboratoriumomstandigheden verbruikte equivalente hoeveelheid zuurstof van een oxyderend reagens.

Het resultaat wordt gegeven in:

g COD/g teststof.

## 1.3. Referentiestoffen

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de methode te ijken en om de resultaten te kunnen vergelijken als een andere methode wordt gebruikt.

## 1.4. Principe van de testmethode

Een bekende in water opgeloste of gedispergeerde hoeveelheid van de stof wordt geoxydeerd met kaliumdichromaat in een sterke zwavelzuuroplossing met zilversulfaat als katalysator; deze laat men gedurende 2 uur „refluxen”. Het resterende dichromaat wordt bepaald aan de hand van titratie met gestandaardiseerd ijzer(II)ammoniumsulfaat.

Bij chloorhoudende stoffen wordt kwik(II)sulfaat toegevoegd om de chloride-invloed te verminderen.

## 1.5. Kwaliteitscriteria

Vanwege het willekeurige karakter van de bepaling moet de COD-waarde veeleer worden beschouwd als een „oxydeerbaarheidsindicator” dan als een maat voor de organische stof.

Deze test kan worden beïnvloed door chloride; ook kan de COD-bepaling worden beïnvloed door anorganische reducerende of oxyderende agentia.

Enkele cyclische verbindingen worden niet geheel geoxydeerd in deze test.

## 1.6. Beschrijving van de testmethode

Allereerst wordt een oplossing of dispersie van de stof bereid met een COD tussen 250 en 600 mg/l.

*Opmerking:*

Van slecht oplosbare en niet-dispergeerbare stoffen kan een hoeveelheid fijn verpulverde stof of een hoeveelheid vloeistof worden afgewogen die overeenkomt met ongeveer 5 mg COD. Dit wordt met water in de opstelling voor het experiment gebracht.

Vervolgens wordt, in afwachting van de publikatie van een internationaal gestandaardiseerde methode, die de voorkeur zou verdienen, het COD bepaald aan de hand van een nationale gestandaardiseerde methode.

**2. GEGEVENS EN EVALUATIE**

Het COD van de inhoud van het testvat wordt berekend aan de hand van de gekozen genormaliseerde methode en omgerekend tot g COD per g teststof.

**3. RAPPORTAGE**

De gehanteerde referentiemethode moet worden vermeld.

Het chemisch zuurstofverbruik moet een gemiddelde van ten minste drie metingen zijn. Alle informatie en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten moeten worden vermeld, met name wat betreft onzuiverheden, fysische toestand en de oorspronkelijke samenstelling van de stof (indien bekend) die van invloed kunnen zijn op de resultaten.

Het gebruik van kwik(II)sulfaat om de invloed van het chloride te verminderen, moet worden vermeld.

**4. LITERATUUR**

Enkele gestandaardiseerde methoden:

NBN T 91—201:	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
ISBN O 11 7512494:	Chemical Oxygen Demand (Dichromate Value) of Polluted and Waste Waters — 1977.
NF T 90—101:	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
DS 217 = Water Analysis:	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
DIN 38409 — H — 41:	Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD) within the Range above 15 mg/l.
NEN 3235 5.3:	Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.
ISO DP 6060:	Water Quality: Chemical Oxygen Demand — Dichromate Methods.

## C. 10. DEGRADATIE

## NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK: HYDROLYSE IN AFHANKELIJKHEID VAN DE pH

## 1. METHODE

Deze methode is gebaseerd op de OESO-testrichtlijn (1).

## 1.1. Inleiding

Hydrolyse is een belangrijke reactie voor het bepalen van de niet-biologische afbraak. De reactie is vooral van betekenis voor stoffen die biologisch slecht afbreekbaar zijn en kan van invloed zijn op de persistentie van een stof in het milieu.

De meeste hydrolysereacties zijn pseudo-eersteorderreacties en daarom zijn de halveringstijden onafhankelijk van de concentratie. Hierdoor kunnen de resultaten van laboratoriumconcentraties worden geëxtrapoleerd naar milieuomstandigheden.

Bovendien zijn er verscheidene gevallen bekend (zie punt 2) waarin een bevredigende overeenstemming werd gevonden tussen de resultaten in zuiver en in natuurlijk water en wel voor verschillende typen chemicaliën.

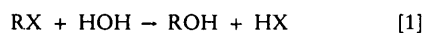
Informatie vooraf over de dampspanning van de stof is van nut voor de uitvoering van deze test.

Deze methode is alleen toepasbaar op in water oplosbare stoffen. Meestal hebben onzuiverheden invloed op de resultaten.

Het hydrolytisch gedrag van stoffen dient te worden onderzocht bij zuurtegraden die normaal in het milieu voorkomen (pH 4—9).

## 1.2. Definities en eenheden

Hydrolyse is een reactie van een verbinding RX met water, die kan worden weergegeven als de uitwisseling van de groep X tegen OH:



De snelheid waarmee de concentratie van RX afneemt wordt gegeven door:

$$\text{snelheid} = k \cdot [\text{H}_2\text{O}] \cdot [\text{RX}] \quad [2]$$

Omdat water in grote overmaat ten opzichte van de uitgangsverbinding aanwezig is wordt dit reactietype doorgaans beschreven als een pseudo-eersteorderreactie waarin de waargenomen snelheidsconstante ( $k_{\text{obs}}$ ) wordt gegeven door de volgende vergelijking:

$$k_{\text{obs}} = k \cdot [\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

Deze constante kan voor een bepaalde pH en temperatuur T worden bepaald met behulp van de formule:

$$k_{\text{obs}} = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

waarin:

t = tijd;

$C_0$  = concentratie uitgangsstof op het tijdstip 0;

$C_t$  = concentratie uitgangsstof op het tijdstip t;

2,303 = omrekeningsfactor tussen natuurlijke en Briggse logaritmen.

De concentraties worden uitgedrukt in g/l of mol/l.

Deze constante  $k_{\text{obs}}$  heeft de dimensie (tijd)<sup>-1</sup>.

De halveringstijd  $t_{1/2}$  is de tijd die nodig is om de concentratie van de teststof met 50 % te verminderen, dat wil zeggen:

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

Combinatie van de formules [4] en [5] levert op:

$$t_{1/2} = 0,693/k_{\text{obs}} \quad [6]$$

### 1.3. Referentiestoffen

Bij het onderzoeken van een nieuwe stof is het niet in alle gevallen nodig referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen dienen in eerste instantie om van tijd tot tijd te controleren of de methode goed werkt en bieden de mogelijkheid bij toepassing van een andere methode de resultaten te vergelijken.

Als referentiestoffen worden gebruikt (1):

Acetylsalicylzuur (Aspirine)

Thiofosforzuur-O,O-diëthyl-O-[6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pyrimidiny]ester (Dimpylaal, Diazinon).

### 1.4. Principe van de testmethode

De stof wordt in lage concentratie in water opgelost en de pH en de temperatuur van de oplossing worden gecontroleerd.

De afname van de concentratie van de stof tegen de tijd wordt gevolgd volgens een geschikte analytische methode.

De logaritmen van de concentratie worden uitgezet tegen de tijd en indien de punten een rechte lijn opleveren, wordt de eerste-ordensnelheidsconstante verkregen uit de helling van die rechte (zie punt 2).

Als de rechtstreekse bepaling van de snelheidsconstante bij een bepaalde temperatuur op moeilijkheden stuit, kan doorgaans een schatting van deze constante worden verkregen met behulp van de Arrhenius-vergelijking, die de temperatuurafhankelijkheid van de snelheidsconstante aangeeft.

Uit het rechtlijnig verband tussen de logaritme van de bij een aantal temperaturen gemeten snelheidsconstante en de reciproque waarde van de absolute temperatuur (K) kan de waarde van de snelheidsconstante, die niet rechtstreeks meetbaar was, worden geëxtrapoleerd.

### 1.5. Kwaliteitscriteria

Volgens referentie (2) kunnen metingen van hydrolysesnelheidsconstanten van 13 klassen organische verbindingen zeer nauwkeurig zijn.

De herhaalbaarheid is vooral afhankelijk van de beheersing van de pH, van de concentratie opgeloste zuurstof en wellicht eveneens van de aanwezigheid van micro-organismen.

## 1.6. Beschrijving van de testmethode

### 1.6.1. *Reagentia*

#### 1.6.1.1 Bufferoplossingen

De test wordt uitgevoerd bij drie pH-waarden: 4,0, 7,0 en 9,0.

Hiertoe worden bufferoplossingen bereid met zuivere chemicaliën en gedestilleerd of gedeïoniseerd, steriel water. Het aanhangsel bevat een aantal bruikbare buffersystemen.

De keuze van het buffersysteem kan van invloed zijn op de hydrolysesnelheid; als afwijkingen blijken, moet een alternatief buffersysteem worden gebruikt. In referentie (2) wordt het gebruik van boraat- of acetaatbuffers aanbevolen in plaats van fosfaat.

Indien de pH van een bufferoplossing bij de in de test gebruikte temperatuur niet bekend is, kan deze bij de gekozen temperatuur worden gemeten met een geijkte pH-meter met een nauwkeurigheid van  $\pm 0,1$  pH-eenheden.

#### 1.6.1.2. Testoplossingen

De teststof wordt opgelost in de gekozen buffer in een concentratie die niet hoger is dan 0,01 M of niet hoger dan de helft van de verzadigingsconcentratie, naar gelang welke van beide waarden de laagste is.

Het gebruik van met water mengbare, organische oplosmiddelen is alleen raadzaam als de stof slecht in water oplosbaar is. De hoeveelheid oplosmiddel mag niet meer zijn dan 1 % en het hulpoplosmiddel mag het hydrolyseproces niet storen.

### 1.6.2. *Apparatuur*

Er wordt gebruik gemaakt van glazen kolven met ingeslepen stop zonder vet op de slijpstukken.

Als de teststof of het buffersysteem vluchtig is of als de test wordt uitgevoerd bij hoge temperatuur, verdienen verzegelde of met een septum afgesloten buizen de voorkeur en moet het gasvolume boven de oplossing zo klein mogelijk zijn.

### 1.6.3. *Analysemethode*

De aard van de te onderzoeken stof is bepalend voor de keuze van de analysemethode. Deze methode moet zo gevoelig en nauwkeurig zijn dat een afname van de beginconcentratie met 10 % wordt ontdekt.

De methode moet ook specifiek zijn, zodat de te onderzoeken stof bij de testconcentraties kan worden bepaald en hiervoor is een combinatie van analysetechnieken soms de beste oplossing.

### 1.6.4. *Testomstandigheden*

De proeven worden uitgevoerd in een thermostatisch geregelde ruimte of in een bad met constante temperatuur op  $\pm 0,5$  °C van de gekozen temperatuur. De temperatuur wordt geregeld en gemeten op  $\pm 0,1$  °C. Ontleding door licht moet met de daartoe strekkende middelen worden voorkomen.

Verder moeten maatregelen worden getroffen om zuurstof uit te sluiten (bij voorbeeld door vóór het bereiden van de oplossing gedurende 5 minuten stikstof of argon door te borrelen).

1.6.5. *Werkwijze*

## 1.6.5.1. Oriënterende proef

Op alle stoffen moet een oriënterende proef bij  $50\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  worden uitgevoerd bij drie pH-waarden: 4,0, 7,0 en 9,0. Hierbij dient een voldoende aantal metingen te worden verricht om te kunnen bepalen of bij elke pH-waarde en bij  $50\text{ °C}$  de halveringstijd kleiner is dan 2,4 uur dan wel of na 5 dagen minder dan 10 % is gehydrolyseerd. (Dit levert voor een temperatuur die meer met de milieu-omstandigheden overeenkomt ( $25\text{ °C}$ ) geschatte halveringstijden op van respectievelijk korter dan een dag en langer dan een jaar.)

Als uit de oriënterende proef naar voren komt dat bij de drie pH-waarden (4, 7 en 9) binnen 2,4 uur 50 % of meer van de te onderzoeken stof is gehydrolyseerd dan wel na 5 dagen nog steeds minder dan 10 % is gehydrolyseerd, zijn er geen verdere proeven nodig.

Als het resultaat voor een of meer pH-waarden daar tussenin ligt, wordt test nr. 1 uitgevoerd.

## 1.6.5.2 Test nr. 1

Test nr. 1 wordt uitgevoerd bij één temperatuur, bij voorkeur bij  $50 \pm 0,5\text{ °C}$  en, zo mogelijk, onder steriele omstandigheden, en wel bij die pH's waarvoor op grond van de oriënterende proef nader onderzoek nodig is.

Er wordt een voldoende aantal monsters (ten minste vier) genomen, dat het gebied tussen 20 % en 70 % hydrolyse bestrijkt; hiermee wordt het pseudo-eersteordegedrag bij de bewuste pH-waarden gecontroleerd.

Voor elke pH-waarde waarmee test nr. 1 wordt uitgevoerd, wordt de orde van de reactie vastgesteld.

Schatting van de snelheidsconstante bij  $25\text{ °C}$

Al naar gelang test nr. 1 oplevert dat de reactie pseudo-eerste orde is of niet, wordt besloten met welke test wordt verder gegaan.

Als op grond van test nr. 1 niet met zekerheid kan worden geconcludeerd dat de reactie pseudo-eerste orde is, moeten de proeven van test nr. 2 worden uitgevoerd.

Als op grond van test nr. 1 met zekerheid kan worden besloten dat de reactie een eersteordeverloop heeft, worden de proeven van test nr. 3 uitgevoerd (onder bijzondere omstandigheden is het wel eens mogelijk de snelheidsconstanten bij  $25\text{ °C}$  te berekenen uit de constanten bij  $50\text{ °C}$ , berekend aan de hand van de resultaten van test nr. 1, zie punt 3.2).

## 1.6.5.3. Test nr. 2

Deze test wordt uitgevoerd bij elke pH-waarde, waarvoor uit test nr. 1 de noodzaak bleek, en wel:

- hetzij bij één temperatuur, lager dan  $40\text{ °C}$ ;
- hetzij bij twee temperaturen, hoger dan  $50\text{ °C}$  en met een onderling verschil van ten minste  $10\text{ °C}$ .

Bij elke pH-waarde en temperatuur worden in deze test ten minste zes gespreide meetpunten genomen, zodanig dat het gebied tussen 20 en 70 % hydrolyse wordt bestreken. Voor één pH-waarde en één temperatuur wordt een bepaling in duplo uitgevoerd; wanneer deze test geschiedt bij twee temperaturen boven  $50\text{ °C}$ , wordt de duplo bij voorkeur uitgevoerd op de laagste van die twee temperaturen.

Zoveel mogelijk wordt voor elke pH en temperatuur waarbij test nr. 2 wordt uitgevoerd, een grafische schatting gegeven van de halveringstijd.

## 1.6.5.4. Test nr. 3

Deze test wordt uitgevoerd bij elke pH waarvoor uit test nr. 1 de noodzaak bleek en wel:

- hetzij bij een temperatuur, lager dan 40 °C,
- hetzij bij twee temperaturen, hoger dan 50 °C en met een onderling verschil van ten minste 10 °C.

Voor elke pH en temperatuur waarbij deze test wordt uitgevoerd, worden drie meetpunten gekozen, het eerste op het tijdstip 0, het tweede en derde bij hydrolysegraden van meer dan 30 %; vervolgens worden de constante  $k_{obs}$  en  $t_{1/2}$  berekend.

## 2. GEGEVENS

Bij een pseudo-eersteordegedrag kunnen de waarden van  $k_{obs}$  voor elke pH en temperatuur van de test worden verkregen door de logaritme van de concentratie uit te zetten tegen de tijd en gebruik makend van volgende vergelijking:

$$k_{obs} = - \text{helling} \times 2,303.$$

Vervolgens kan de  $t_{1/2}$  worden berekend met behulp van vergelijking [6].

$k_{25^\circ}$  kan in voorkomend geval worden berekend met behulp van de Arrhenius-vergelijking.

Voor niet-pseudo-eersteordegedrag zie punt 3.1.

## 3. RAPPORT

## 3.1. Testverslag

In het testverslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens voorkomen:

- specificatie van de stof;
- resultaten verkregen met referentiestoffen;
- principe en bijzonderheden van de gebruikte analysemethode(n);
- voor elke test: temperatuur, pH-waarde, buffersamenstelling en een tabel met alle concentraties en tijden;
- voor pseudo-eersteordereacties: de waarden van  $k_{obs}$  en  $t_{1/2}$  en de berekeningswijze;
- voor niet-pseudo-eersteordereacties: grafische weergave van de logaritme van de concentratie uitgezet tegen de tijd;
- alle inlichtingen en opmerkingen die voor de interpretatie van de resultaten van belang zijn.

## 3.2. Interpretatie van de resultaten

Soms is het mogelijk een redelijk betrouwbare berekening van de snelheidsconstante (bij 25 °C) van de teststof te maken, mits er reeds experimentele waarden van de activeringsenergie bestaan voor homologen van de teststof en mits redelijkerwijs kan worden aangenomen dat de activeringsenergie van de teststof ongeveer dezelfde grootte heeft.



## 4. REFERENTIES

- (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.

*Aanhangsel***BUFFERMENGSELS****A. CLARK EN LUBS**

De pH-waarden in deze tabellen zijn berekend uit potentiaalmetingen met behulp van de standaardvergelijkingen van Sørensen (1909). De werkelijke pH-waarden liggen 0,04 eenheid hoger dan de opgegeven waarden.

**Samenstelling**

	<i>pH</i>
0,1 M kaliumwaterstofftalaat + 0,1 N HCl bij 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalaat tot 100 ml	3,8
0,1 M kaliumwaterstofftalaat + 0,1 N NaOH bij 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalaat tot 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalaat tot 100 ml	4,2
0,1 M monokaliumfosfaat + 0,1 N NaOH bij 20 °C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	7,2
0,1 M boorzuur in 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH bij 20 °C	
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	9,2

**B. KOLTHOFF EN VLEESCHOUWER****Samenstelling**

	<i>pH</i>
0,1 M monokaliumcitraat + 0,1 N NaOH bij 18 °C (kristalletje thymol of een paar mg kwikjodide toevoegen om schimmelgroei te voorkomen)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	4,2

## C. SÖRENSEN

0,05 M borax + 0,1 N HCl

Samenstelling		pH			
		Sörensen 18 °C	Walbum		
ml borax	ml HCl		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

Samenstelling		pH			
		Sörensen 18 °C	Walbum		
ml borax	ml NaOH		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