

31992L0069

29.12.1992

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

L 383/113

DIREKTIVA KOMISIJE 92/69/EGS**z dne 31. julija 1992****o sedemnajsti prilagoditvi tehničnemu napredku Direktive Sveta 67/548/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi**

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ker je treba za upoštevanje tehničnega napredka znova preučiti preskusno metodo za preskus zaviranja rasti alg, ki je sedaj navedena v Prilogi k Direktivi Komisije 88/302/EGS, in ob tej priložnosti prenesti to preskusno metodo v Prilogo k Direktivi 84/449/EGS;

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 67/548/EGS z dne 27. junija 1967 o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi ⁽¹⁾, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo 92/32/EGS ⁽²⁾, ter zlasti členov 28 in 29 Direktive,

ker je ustrezno v čim večji meri zmanjšati število živali, uporabljenih za poskusne namene, v skladu z Direktivo Sveta 86/609/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov držav članic v zvezi z zaščito živali, uporabljenih za poskusne namene ⁽³⁾;

ker člen 3(1) Direktive 67/548/EGS in člen 3 Direktive Sveta 88/379/EGS z dne 7. junija 1988 o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih pripravkov ⁽⁴⁾, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo Komisije 90/492/EGS ⁽⁵⁾, določata, da se fizikalno-kemijske lastnosti, toksičnost in ekotoksičnost snovi in pripravkov določijo z metodami iz Priloge V k Direktivi 67/548/EGS;

ker so določbe te direktive v skladu z mnenjem Odbora za prilagajanje tehničnemu napredku direktiv o odpravi tehničnih ovir pri trgovanju z nevarnimi snovmi in pripravi,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

ker je besedilo Priloge V k Direktivi 67/548/EGS sedaj objavljeno v dveh delih, v Prilogi k Direktivi Komisije 84/449/EGS ⁽⁶⁾ in v Prilogi k Direktivi Komisije 88/302/EGS ⁽⁷⁾;

Člen 1

ker je treba za upoštevanje tehničnega napredka znova preučiti preskusne metode iz Priloge k Direktivi Komisije 84/449/EGS;

Priloga k Direktivi 84/449/EGS se nadomesti s Prilogo k tej direktivi.

⁽¹⁾ UL 196, 16.8.1967, str. 1.

⁽²⁾ UL L 154, 5.6.1992, str. 1.

⁽³⁾ UL L 187, 16.7.1988, str. 14.

⁽⁴⁾ UL L 275, 5.10.1990, str. 35.

⁽⁵⁾ UL L 251, 19.9.1984, str. 1.

⁽⁶⁾ UL L 133, 30.5.1988, str. 1, in UL L 136, 2.6.1988, str. 20.

⁽⁷⁾ UL L 358, 18.12.1986, str. 1.

Člen 2

Preskus zaviranja rasti alg, opisan v Prilogi k Direktivi 88/302/EGS, se črta.

Člen 3

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 30. oktobra 1993. Države članice o tem takoj obvestijo Komisijo.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklic nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi.

Način sklicevanja določijo države članice.

Člen 4

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 31. julija 1992

Za Komisijo

Karel VAN MIERT

Član Komisije

PRILOGA

Priloga k Direktivi 92/69/EGS z dne 31. julija 1992 o sedemnajsti prilagoditvi Direktive Sveta 67/548/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi tehničnemu napredku ⁽¹⁾

⁽¹⁾ UL L 383, 29.12.1992, str. 113.

KAZALO

UVOD		
DEL A:	METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI.....	262
A.1	Tališče/zmrzišče.....	262
A.2	Vrelišče.....	272
A.3	Relativna gostota.....	278
A.4	Parni tlak.....	283
A.5	Površinska napetost.....	304
A.6	Topnost v vodi.....	311
A.8	Porazdelitveni koeficient.....	320
A.9	Plamenišče.....	331
A.10	Vnetljivost (trdne snovi).....	333
A.11	Vnetljivost (plini).....	336
A.12	Vnetljivost (stik z vodo).....	338
A.13	Piroforne lastnosti trdnih snovi in tekočin.....	342
A.14	Eksplozivne lastnosti.....	344
A.15	Temperatura samovžiga (tekočine in plini).....	355
A.16	Relativna temperatura samovžiga za trdne snovi.....	356
A.17	Oksidacijske lastnosti (trdne snovi).....	359
DEL B:	METODE ZA DOLOČANJE STRUPENOSTI.....	364
Splošni uvod.....		364
B.1	Akutna strupenost (pri zaužitju).....	367
B.1 bis	Akutna strupenost (pri zaužitju) – metoda točno določenega odmerka.....	370
B.2	Akutna strupenost (pri vdihavanju).....	374
B.3	Akutna strupenost (v stiku s kožo).....	378
B.4	Akutna strupenost (draženje kože).....	381
B.5	Akutna strupenost (draženje oči).....	384
B.6	Povzročanje preobčutljivosti kože (senzibilizacija).....	388
B.7	Strupenost (pri zaužitju) pri ponavljajočem se odmerku (28 dni).....	393
B.8	Strupenost (pri vdihavanju) pri ponavljajočem se odmerku (28 dni).....	397
B.9	Strupenost (v stiku s kožo) pri ponavljajočem se odmerku (28 dni).....	401
B.10	Mutagenost (citogenetski preskus <i>in vitro</i> pri sesalcih).....	405
B.11	Mutagenost (citogenetski preskus v kostnem mozgu sesalcev <i>in vivo</i> , kromosomska analiza)....	408
B.12	Mutagenost (preskus mikronukleusov).....	411
B.13	Mutagenost (<i>Escherichia coli</i> – preskus povratne mutacije).....	414
B.14	Mutagenost (<i>Salmonella typhimurium</i> – preskus povratne mutacije).....	417

DEL C:	METODE ZA DOLOČANJE STRUPENOSTI ZA OKOLJE.....	420
C.1	Akutna strupenost za ribe.....	420
C.2	Akutna strupenost za vodne bolhe (Daphnia).....	429
C.3	Preskus zaviranja rasti alg.....	436
C.4	Biorazgradljivost: določanje dobre biorazgradljivosti.....	444
	C.4-A: Upadanje raztopljenega organskega ogljika (DOC).....	451
	C.4-B: Prilagojeni presejalni preskus OECD.....	454
	C.4-C: Preskus razvijanja ogljikovega dioksida (CO ₂).....	459
	C.4-D: Manometrična respirometrija.....	464
	C.4-E: Zaprta steklenica.....	468
	C.4-F: MITI (Ministry of International Trade and Industry – Japonska).....	473
	Priloge.....	478
C.5	Razgradnja: biokemijska potreba po kisiku.....	483
C.6	Razgradnja: kemijska potreba po kisiku.....	484
C.7	Razgradnja: abiotska razgradnja: hidroliza kot funkcija pH.....	486

UVOD

Priloga navaja preskusne metode za določanje fizikalno-kemijskih in strupenih lastnosti ter strupenih lastnosti za okolje iz Prilog VII in VIII k Direktivi 79/831/EGS. Metode temeljijo na metodah, ki jih priznavajo in priporočajo pristojna mednarodna telesa (zlasti OECD).

Kadar take metode niso bile na voljo, so bili sprejeti nacionalni standardi ali dogovorjene znanstvene metode. Na splošno je treba preskuse izvajati s snovmi, kakor so določene v Direktivi. Pozornost je treba posvetiti možnemu vplivu nečistot na rezultate preskusa.

Kadar so metode iz te priloge neprimerne za preučevanje neke lastnosti, mora prijavitelj upravičiti uporabo alternativne metode.

Preskusi in študije na živalih se izvajajo v skladu z nacionalnimi predpisi ob upoštevanju načel humanosti in mednarodnega razvoja na področju dobrega počutja živali.

Med enakovrednimi preskusnimi metodami se izbere tista, pri kateri se uporabi najmanjše število živali.

DEL A: METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI**A.1 TALIŠČE/ZMRZIŠČE****1. METODA**

Večina opisanih metod temelji na smernici za preskušanje OECD (1). Temeljna načela so navedena v virih (2) in (3).

1.1 UVOD

Opisane metode in naprave se uporabljajo za določanje tališča snovi brez kakršnih koli omejitev glede njihove stopnje čistosti.

Izbira metode je odvisna od narave preskusne snovi. Tako bo omejitveni dejavnik to, ali je snov lahko, težko ali nemogoče uprašiti.

Za nekatere snovi je primernejše določanje zmrzišča ali strdišča in standardi za te meritve so tudi vključeni v to metodo.

Kadar zaradi posebnih lastnosti snovi ni mogoče ustrezno izmeriti nobenega od navedenih parametrov, je morda primerna točka tečenja.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Tališče je opredeljeno kot temperatura, pri kateri pride do prehoda iz trdnega v tekoče agregatno stanje pri atmosferskem tlaku, in je enaka zmrzišču.

Ker fazni prehod številnih snovi poteka v temperaturnem območju, se pogosto opiše kot talilno območje.

Pretvorba enot (K v °C)

$$t = T - 273,15$$

t: Celzijeva temperatura, stopinja Celzija (°C)

T: termodinamična temperatura, kelvin (K)

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

Nekatere snovi za umerjanje so našteje v virih (4).

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Določi se temperatura (temperaturno območje) faznega prehoda iz trdnega v tekoče stanje ali iz tekočega v trdno stanje. To pomeni, da se med segrevanjem/hlajenjem vzorca preskusne snovi pri atmosferskem tlaku določita temperaturi začetne faze taljenja/zmrzovanja in končne faze taljenja/zmrzovanja. Opisanih je pet vrst metod, to so kapilarna metoda, metode z ogrevalno mizico, metode za določanje zmrzišča, metode termične analize in metoda za določanje točke tečenja (kakor je bila razvita za nafto).

V nekateri primerih je lahko pripravneje izmeriti zmrzišče namesto tališča.

1.4.1 **Kapilarna metoda**

1.4.1.1 *Naprave za merjenje tališča s tekočinsko kopeljo*

V kapilarno cevko damo majhno količino drobno zmlete snovi in jo dobro potlačimo. Cevko segrevamo skupaj s termometrom in med dejanskim taljenjem prilagodimo naraščanje temperature na manj kot približno 1 K/min. Določimo začetno in končno talilno temperaturo.

1.4.1.2 *Naprave za merjenje tališča s kovinskim blokom*

Kakor je opisano v 1.4.1.1, le da sta kapilarna cevka in termometer postavljena v ogrevan kovinski blok; opazujemo ju lahko skozi luknje v bloku.

1.4.1.3 *Fotocelična detekcija*

Vzorec v kapilarni cevki se avtomatično segreva v kovinskem valju. Skozi luknjo v valju se usmeri žarek svetlobe skozi snov na natančno umerjeno fotocelico. Optične lastnosti večine snovi se med taljenjem spremenijo, prej neprozorne postanejo prozorne. Jakost svetlobe, ki doseže fotocelico, naraste in pošlje signal za konec digitalnemu indikatorju, ki odčitava temperaturo na platinskem uporovnem termometru v grelni komori. Ta metoda ni primerna za nekatere močno obarvane snovi.

1.4.2 **Ogrevalna mizica**

1.4.2.1 *Koflerjeva ogrevalna plošča*

Za Koflerjevo ogrevalno ploščo se uporabita dva kosa kovine z različno toplotno prevodnostjo, električno ogrevana, s ploščo, zasnovano tako, da je vzdolž nje sprememba temperature skoraj linearna. Temperatura ogrevalne plošče je lahko od 283 do 573 K in se odčitava s posebno napravo, ki vključuje premično kolesce s kazalcem in jezičkom, zasnovano za posamezno ploščo. Za določanje tališča, se snov v tanki plasti nanese neposredno na površino ogrevalne plošče. V nekaj sekundah se pojavi ostra razmejitvena črta med tekočo in trdno fazo. Temperatura na razmejitveni črti se odčitava tako, da se nanjo naravna kazalec.

1.4.2.2 *Talilni mikroskop*

Za določanje tališča z zelo majhnimi količinami materiala se uporablja več mikroskopskih grelnih mizic. Pri večini grelnih mizic se temperatura meri z občutljivim termočlenom, vendar se včasih uporablja tudi živosrebrni termometer. Značilna mikroskopska aparatura z ogrevalnimi mizicami za določanje tališča ima grelni komoro, ki vsebuje kovinsko ploščo, na katero položimo vzorec na objektnem stekelcu. Na sredini kovinske plošče je luknjica, ki omogoča vstop svetlobe s kolektorja mikroskopa. Med uporabo je komora zaprta s stekleno ploščo, ki preprečuje vdor zraka v območje vzorca.

Segrevanje vzorca se uravnava z reostatom. Za zelo natančne meritve pri optično anizotropnih snoveh se lahko uporabi polarizirana svetloba.

1.4.2.3 *Metoda z meniskusom*

Ta metoda se uporablja posebej za poliamide.

Vizualno se določi temperatura, pri kateri se premakne meniskus silikonskega olja, ki je med ogrevalno mizico in krovnim stekelcem na preskusnem vzorcu poliamida.

1.4.3 **Metoda za določanje zmrzišča**

Vzorec se da v posebno epruveto, ta pa v aparaturu za določanje zmrzišča. Vzorec se ohlaja in ves čas rahlo meša in v primernih intervalih se meri temperatura. Ko je temperatura pri nekaj zaporednih odčitkih nespremenjena, se ta temperatura (popravljen z upoštevanjem napake termometra) zapiše kot zmrzišče.

Treba je preprečiti podhladitev, in sicer tako da se vzdržuje ravnotežje med trdno in tekočo fazo.

1.4.4 Termična analiza

1.4.4.1 Diferenčna termična analiza (DTA)

Pri tej tehniki se beleži razlika v temperaturi snovi in referenčnega materiala v odvisnosti od temperature, pri čemer se na snovi in na referenčnem materialu izvaja isti nadzorovani temperaturni program. Ko gre vzorec skozi fazni prehod, ki vključuje spremembo entalpije, se ta sprememba pokaže kot endotermni (tališče) ali eksotermni (zmrzišče) odmik od bazne črte zapisa temperature.

1.4.4.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Pri tej tehniki se beleži razlika v vnosu energije v snov in referenčni material v odvisnosti od temperature, pri čemer se na snovi in referenčnem materialu izvaja isti nadzorovani temperaturni program. Ta energija je energija, ki je potrebna za izenačitev temperature snovi in referenčnega materiala. Ko gre vzorec skozi fazni prehod, ki vključuje spremembo entalpije, se ta sprememba pokaže kot endotermni (tališče) ali eksotermni (zmrzišče) odmik od bazne črte zapisa toplotnega pretoka.

1.4.5 Točka tečenja

Ta metoda je bila razvita za nafto in je primerna za oljaste snovi z nizkim tališčem.

Po predhodnem segrevanju se vzorec ohlaja s točno določeno hitrostjo in v intervalih 3 K se opazujejo značilnosti tečenja. Najnižja temperatura, pri kateri se še opazi premikanje snovi, se zapiše kot točka tečenja.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Uporabnost in točnost različnih metod, ki se uporabljajo za določanje tališča/talilnega območja, sta navedeni v naslednji tabeli:

TABELA: UPORABNOST METOD

A. Kapilarne metode

Merilna metoda	Snovi, ki jih je mogoče uprašiti	Snovi, ki jih ni mogoče zlahka uprašiti	Temperaturno območje	Ocenjena točnost ⁽¹⁾	Veljavni standard
Naprave za merjenje tališča s tekočinsko kopoljo	da	le za nekatere	273 do 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Naprave za merjenje tališča s kovinskim blokom	da	le za nekatere	293 do > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Fotocelična detekcija	da	za številne z uporabo prilagoditvenih naprav	253 do 573 K	± 0,5 K	
⁽¹⁾ Odvisno od vrste instrumenta in stopnje čistosti snovi.					

B. Metode z ogrevalnimi mizicami in metode za določanje zmrzišča

Merilna metoda	Snovi, ki jih je mogoče uprašiti	Snovi, ki jih ni mogoče zlahka uprašiti	Temperaturno območje	Ocenjena točnost ⁽¹⁾	Veljavni standard
Koflerjeva ogrevalna plošča	da	ne	283 do > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Talilni mikroskop	da	le za nekatere	273 do > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Metoda z meniskusom	ne	posebej za poliamide	293 do > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Metode za določanje zmrzišča	da	da	223 do 573 K	± 0,5 K	npr. BS 4695
⁽¹⁾ Odvisno od vrste instrumenta in stopnje čistosti snovi.					

C. Termična analiza

Merilna metoda	Snovi, ki jih je mogoče uprašiti	Snovi, ki jih ni mogoče zlahka uprašiti	Temperaturno območje	Ocenjena točnost ⁽¹⁾	Veljavni standard
Diferenčna termična analiza	da	da	173 do 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferenčna dinamična kalorimetrija	da	da	173 do 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
⁽¹⁾ Odvisno od vrste instrumenta in stopnje čistosti snovi.					

D. Točka tečenja

Merilna metoda	Snovi, ki jih je mogoče uprašiti	Snovi, ki jih ni mogoče zlahka uprašiti	Temperaturno območje	Ocenjena točnost ⁽¹⁾	Veljavni standard
Točka tečenja	za nafto in oljaste snovi	za nafto in oljaste snovi	223 do 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66
⁽¹⁾ Odvisno od vrste instrumenta in stopnje čistosti snovi.					

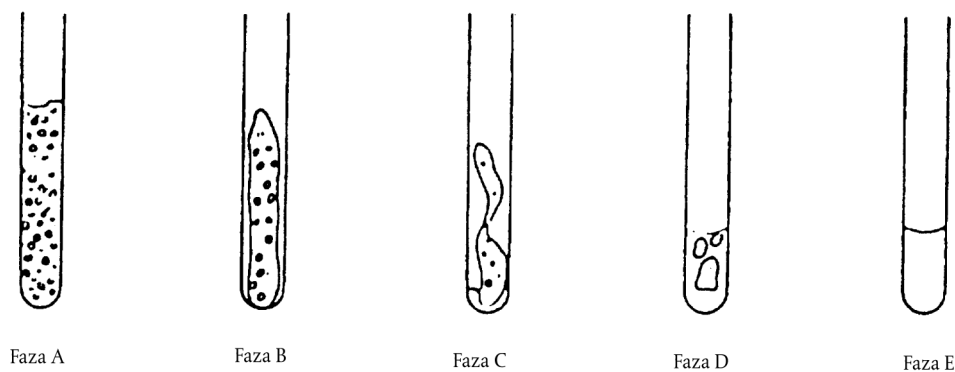
1.6 OPIS METOD

Postopki skoraj vseh preskusnih metod so opisani v mednarodnih in nacionalnih standardih (glej dodatek 1).

1.6.1 Metode s kapilarno cevko

Kadar se drobno uprašene snovi počasi segrevajo, se običajno pokažejo talilne faze s slike 1.

Slika 1

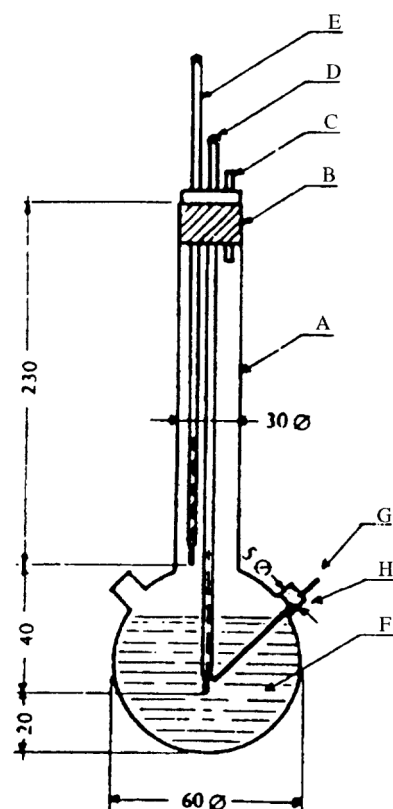


Faza A (začetek taljenja): drobne kapljice se enakomerno oprimejo notranje stene kapilarne cevke
 Faza B med vzorcem in notranjo steno se zaradi krčenja taline pojavi praznina
 Faza C skrčen vzorec se začne sesedati in utekočinjati
 Faza D na površini se oblikuje popoln meniskus, vendar znatna količina vzorca ostane trdna
 Faza E (zadnja faza taljenja): ni več nobenih trdnih delcev
 Pri določanju tališča zapišemo temperaturi na začetku taljenja in v zadnji fazi.

1.6.1.1 Naprave za merjenje tališča s tekočinsko kopeljo

Slika 2 prikazuje vrsto standardizirane steklene aparature za merjenje tališča (JIS K 0064); vse specifikacije so v milimetrih.

Slika 2



- A: Merilna posoda
- B: Zamašek
- C: Odprtina za zrak
- D: Termometer
- E: Pomožni termometer
- F: Tekočina za kopel
- G: Steklена kapilarna cevka, dolga 80 do 100 mm, z notranjim premerom $1,0 \pm 0,2$ mm in steno, debelo 0,2 do 0,3 mm
- H: Stranska cevka

Tekočina za kopel:

Izbrati je treba primerno tekočino. Izbira tekočine je odvisna od tališča, ki se določa, npr. tekoči parafin za tališča do največ 473 K, silikonsko olje za tališča do največ 573 K.

Za tališča, višja od 523 K, se lahko uporabi zmes treh delov žveplove kisline in dveh delov kalijevega sulfata (v masnem razmerju). Pri uporabi take zmesi je treba upoštevati primerne varnostne ukrepe.

Termometer:

Uporabljajo se lahko samo termometri, ki izpolnjujejo zahteve naslednjih ali njim enakovrednih standardov:

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

Postopek:

Suha snov se na drobno upraši v terilnici in da v na enem koncu zataljeno kapilaro, tako da je tesno natlačene snovi v kapilari približno 3 mm. Da bo vzorec enakomerno potlačen, je treba kapilaro z višine približno 700 mm spustiti skozi stekleno cevko navpično na urno steklo.

Napolnjena kapilarna cevka se postavi v kopel, tako da se srednji del bučke termometra z živim srebrom dotika kapilarne cevke na delu, kjer je vzorec. Običajno se kapilarna cevka vstavi v aparaturo pri temperaturi približno 10 K pod tališčem.

Tekočina kopeli se segreva tako, da temperatura narašča približno za 3 K/min. Tekočino je treba mešati. Pri približno 10 K pod pričakovanim tališčem se naraščanje temperature naravna na največ 1 K/min.

Izračun:

Tališče izračunamo na naslednji način:

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

pri čemer je:

T = popravljeno tališče v K

T_D = odčitana temperatura na termometru D v K

T_E = odčitana temperatura na termometru E v K

n = število graduacij živosrebrnega stolpca na termometru D na delu, ki gleda iz tekočine.

1.6.1.2 Naprave za merjenje tališča s kovinskim blokom

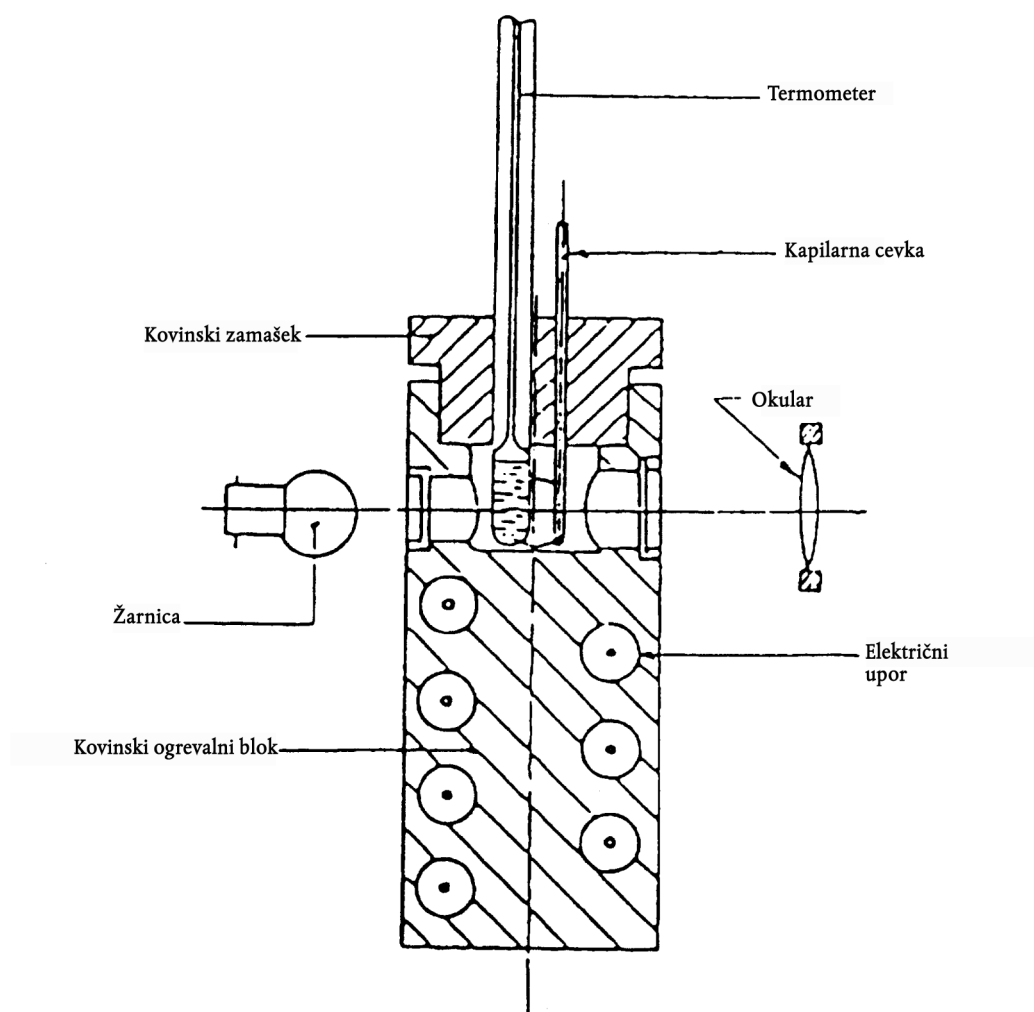
*Aparatura:**Sestavljajo jo:*

- valjast kovinski blok, katerega zgornji del je votel in predstavlja komoro (glej sliko 3),
- kovinski zamašek z dvema ali več luknjami, ki omogočajo vstavljanje cevk v kovinski blok,
- grelni sistem za kovinski blok, na primer z električnim uporom, vgrajenim v blok,
- reostat za uravnavanje dovoda energije, če se uporabi električno gretje,
- štiri okenca iz stekla, odpornega proti vročini, v stranskih stenah komore, diametralno razporejenih pravokotno drug na drugega. Pred enim od okenc je postavljen okular za opazovanje kapilarne cevke. Ostala tri okenca se uporabljajo za osvetljevanje notranjosti komore z žarnicami,
- kapilarna cevka iz stekla, odpornega proti vročini, na enem koncu zaprta (glej 1.6.1.1).

Termometer:

Glej standarde, navedene v 1.6.1.1. Lahko se uporabijo tudi termoelektrični instrumenti s primerljivo točnostjo.

Slika 3



1.6.1.3 Fotocelična detekcija

Aparatura in postopek:

Aparaturo sestavlja kovinska komora z avtomatiziranim grelnim sistemom. Tri kapilarne cevke se napolnijo v skladu z 1.6.1.1 in postavijo v grelno komoro.

Za umerjanje aparature je na voljo več linearnih naraščanj temperature in primerno naraščanje temperature se električno naravna na vnaprej določeno konstantno in linearno hitrost naraščanja. Zapisovalniki kažejo dejansko temperaturo grelne komore in temperaturo snovi v kapilarnih cevkah.

1.6.2 Ogrevalne mizice**1.6.2.1 Koflerjeva ogrevalna plošča**

Glej dodatek.

1.6.2.2 Talilni mikroskop

Glej dodatek.

1.6.2.3 Metoda z meniskusom (poliamidi)

Glej dodatek.

Hitrost segrevanja v območju tališča mora biti manjša od 1 K/min.

1.6.3 Metode za določanje zmrzišča

Glej dodatek.

1.6.4 Termična analiza**1.6.4.1 Diferenčna termična analiza**

Glej dodatek.

1.6.4.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Glej dodatek.

1.6.5 Določanje točke tečenja

Glej dodatek.

2. PODATKI

V nekaterih primerih je potreben popravek termometra.

3. POROČANJE

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- uporabljena metoda;
- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote) in predhodno prečiščevanje, če je bilo opravljeno;
- ocena točnosti.

Kot tališče se navede srednja vrednost najmanj dveh meritev, ki sta v območju predvidene točnosti (glej tabele).

Če je razlika med temperaturo na začetku taljenja in tisto v zadnji fazi taljenja znotraj meja točnosti metode, se kot tališče navede temperatura v zadnji fazi taljenja; sicer pa se navedeta obe temperaturi.

Če snov razpade ali sublimira, preden se doseže tališče, se navede temperatura, pri kateri so bile opažene te spremembe.

Navedi je treba vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

4. VIRI

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

Dodatek

Dodatne tehnične podrobnosti se lahko poiščejo na primer v naslednjih standardih.

1. Kapilarne metode

1.1 Naprave za merjenje tališča s tekočinsko kopeljo

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

1.2 Naprave za merjenje tališča s kovinskim blokom

DIN 53736	<i>Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen</i>
ISO 1218 (E)	<i>Plastics — poly amides — determination of „melting point“</i>

2. Ogrevalne mizice

2.1 Koflerjeva ogrevalna plošča

ANSI/ASTM D 3451-76	<i>Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings</i>
---------------------	---

2.2 Talilni mikroskop

DIN 53736	<i>Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.</i>
-----------	---

2.3 Metoda z meniskusom (poliamidi)

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

3. **Metode za določanje zmrzišča**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termična analiza**

4.1 Diferenčna termična analiza

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

4.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija

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

5. **Določanje točke tečenja**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils — Determination of pour point.

A.2 VRELIŠČE

1. METODA

Večina opisanih metod temelji na smernici za preskušanje OECD (1). Temeljna načela so navedena v virih (2) in (3).

1.1 UVOD

Tukaj opisane metode in naprave se lahko uporabljajo za tekoče snovi in snovi z nizkim tališčem, pod pogojem da pri njih ne pride do kemične reakcije pri temperaturah pod vreliščem (na primer avtooksidacije, prerazporeditve, razgradnje itd.). Te metode se lahko uporabljajo za čiste in nečiste tekoče snovi.

Poudarjene so metode s fotocelično detekcijo in termično analizo, ker te metode omogočajo določanje tališča in vrelišča. Poleg tega je meritve mogoče opraviti avtomatsko.

„Dinamična metoda“ ima to prednost, da se lahko uporabi tudi za določanje parnega tlaka ter da ni treba popravljati vrelišča glede na normalni tlak (101,325 kPa), ker se med merjenjem z manostatom lahko naravna normalni tlak.

Opombe:

Vpliv nečistot na določanje vrelišča je v veliki meri odvisen od narave nečistote. Kadar so v vzorcu hlapne nečistote, ki bi lahko vplivale na rezultat, se snov lahko prečisti.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Normalno vrelišče je opredeljeno kot temperatura, pri kateri je parni tlak tekočine enak 101,325 kPa.

Če se vrelišče ne meri pri normalnem atmosferskem tlaku, lahko odvisnost parnega tlaka od temperature opišemo s Clausius-Clapeyronovo enačbo:

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

pri čemer je:

p = parni tlak snovi v paskalih

ΔH_v = izparilna toplota v J mol⁻¹

R = splošna plinska konstanta = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹

T = termodinamična temperatura v K

Vrelišče se navede glede na zračni tlak med meritvijo.

Pretvorbe

Tlak (enote: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(enota „bar“ je še vedno dovoljena, vendar se ne priporoča)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 tor

(enoti „mm Hg“ in „tor“ nista dovoljeni).

1 atm = standardna atmosfera = 101 325 Pa

(enota „atm“ ni dovoljena).

Temperatura (enote: K)

$$t = T - 273,15$$

t: Celzijeva temperatura, stopinja Celzija (°C)

T: termodinamična temperatura, kelvin (K)

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

Nekatere snovi za umerjanje so našteje v metodah, navedenih v dodatku.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Pet metod za določanje vrelišča (vreliščnega območja) temelji na merjenju vrelišča, dve pa temeljita na termični analizi.

1.4.1 Določanje z uporabo ebulioskopa

Ebulioskopi so bili prvotno zasnovani za določanje molekulske mase glede na naraščajoče vrelišče, vendar so primerni tudi za natančno merjenje vrelišča. Zelo preprosta aparatura je opisana v ASTM D 1120-72 (glej dodatek). Tekočina se segrejeva v tej aparaturi v ravnotežnih pogojih pri atmosferskem tlaku, dokler ne zavre.

1.4.2 Dinamična metoda

Ta metoda vključuje merjenje temperature rekondenzacije pare z ustreznim termometrom v povratnem toku med vretjem. Tlak se pri tej metodi lahko spreminja.

1.4.3 Destilacijska metoda za vrelišče

Ta metoda vključuje destilacijo tekočine in merjenje temperature rekondenzacije pare ter določanje količine destilata.

1.4.4 Metoda po Siwoloboffu

Vzorec se segreva v cevki, potopljeni v tekočino toplotne kopeli. V cevko z vzorcem se potopi zataljena kapilara, ki v spodnjem delu vsebuje zračni mehurček.

1.4.5 Fotocelična detekcija

Po Siwoloboffovem principu se izvede avtomatsko fotoelektrično merjenje z uporabo dvigajočih se mehurčkov.

1.4.6 Diferenčna termična analiza

Pri tej tehniki se beleži razlika v temperaturi snovi in referenčnega materiala v odvisnosti od temperature, pri čemer se na snovi in na referenčnem materialu izvaja isti nadzorovani temperaturni program. Ko gre vzorec skozi fazni prehod, ki vključuje spremembo entalpije, se ta sprememba pokaže kot endotermni (vrelišče) odmik od bazne črte zapisa temperature.

1.4.7 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Pri tej tehniki se beleži razlika v vnosu energije v snov in referenčni material v odvisnosti od temperature, pri čemer se na snovi in referenčnem materialu izvaja isti nadzorovani temperaturni program. Ta energija je energija, potrebna za izenačitev temperature snovi in referenčnega materiala. Ko gre vzorec skozi fazni prehod, ki vključuje spremembo entalpije, se ta sprememba pokaže kot endotermni (vrelische) odmik od bazne črte zapisa toplotnega pretoka.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Uporabnost in točnost različnih metod, ki se uporabljajo za določanje vrelišča/vreliščnega območja, sta navedeni v tabeli 1.

TABELA 1: PRIMERJAVA METOD

Merilna metoda	Ocenjena točnost	Veljavni standard
Ebulioskop	$\pm 1,4$ K (do 373 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾ $\pm 2,5$ K (do 600 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾	ASTM D 1120-72 ⁽¹⁾
Dinamična metoda	$\pm 0,5$ K (do 600 K) ⁽²⁾	
Destilacijski proces (vreliščno območje)	$\pm 0,5$ K (do 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591 71
Po Siwoloboffu	± 2 K (do 600 K) ⁽²⁾	
Fotocelična detekcija	$\pm 0,3$ K (pri 373 K) ⁽²⁾	
Diferenčna termična kalorimetrija	$\pm 0,5$ K (do 600 K) $\pm 2,0$ K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76
Diferenčna dinamična kalorimetrija	$\pm 0,5$ K (do 600 K) $\pm 2,0$ K (do 1273 K)	ASTM E 537-76
⁽¹⁾ Ta točnost velja le za enostavne naprave, npr. tisto, opisano v ASTM D 1120-72; lahko se izboljša z bolj preciznimi ebulioskopi. ⁽²⁾ Velja le za čiste snovi. Uporabo v drugačnih razmerah je treba utemeljiti.		

1.6 OPIS METOD

Postopki nekaterih preskusnih metod so opisani v mednarodnih in nacionalnih standardih (glej dodatek).

1.6.1 Ebulioskop

Glej dodatek.

1.6.2 Dinamična metoda

Glej preskusno metodo A.4 za določanje parnega tlaka.

Zapišemo temperaturo vrelišča, ugotovljeno pri tlaku 101,325 kPa.

1.6.3 Destilacijski proces (vreliščno območje)

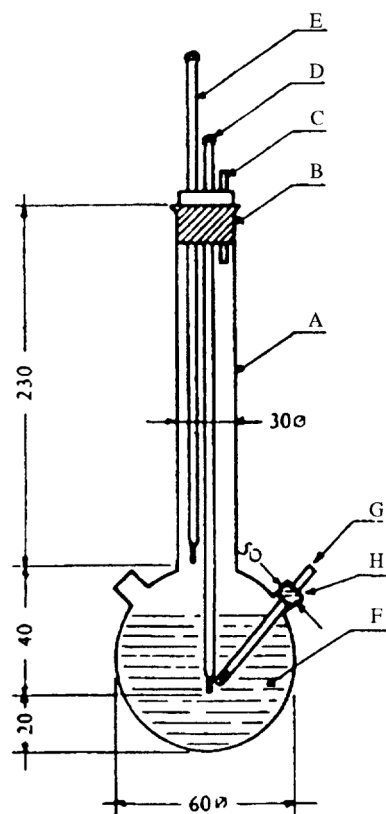
Glej dodatek.

1.6.4 Metoda po Siwoloboffu

Vzorec se segreva v aparaturi za določanje tališča, v cevki s premerom približno 5 mm (slika 1).

Slika 1 prikazuje vrsto standardizirane aparature za določanje tališča in vrelišča (JIS K 0064) (iz stekla, vse specifikacije v milimetrih).

Slika 1



- A: Merilna posoda
- B: Zamašek
- C: Odprtina za zrak
- D: Termometer
- E: Pomožni termometer
- F: Tekočina za kopel
- G: Cevka za vzorec, zunanji premer največ 5 mm; vsebuje kapilarno cevko, dolgo približno 100 mm, z notranjim premerom približno 1 mm in steno, debelo približno 0,2 do 0,3 mm
- H: Stranska cevka

Kapilarna cevka (vreliščna kapilara), stisnjena približno 1 cm nad spodnjim delom, se da v cevko za vzorec. Doda se toliko preskusne snovi, da je stisnjeni del kapilare pod površino tekočine. Cevka z vzorcem, v kateri je vreliščna kapilara, se bodisi pritrdi na termometer z elastiko bodisi fiksira s podporo s strani (glej sliko 2).

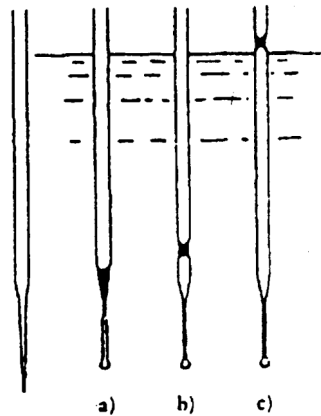
Slika 2

Princip po Siwoloboffu



Slika 3

Prilagojeni princip



Tekočina za kopel se izbere glede na vrelišče. Pri temperaturah do 573 K se lahko uporabi silikonsko olje. Tekoči parafin se lahko uporabi le do 473 K. Segrevanje tekočine kopeli mora biti sprva naravnano tako, da temperatura narašča 3 K/min. Tekočino kopeli je treba mešati. Pri približno 10 K pod pričakovanim vreliščem se segrevanje upočasni, tako da temperatura narašča manj kot 1 K/min. Ko se približujemo vrelišču, začnejo iz vreliščne kapilare hitro izhajati mehurčki.

Vrelišče je temperatura, pri kateri se ob trenutni ohladitvi ustavi izhajanje mehurčkov, tekočina v kapilari pa se začne nenadoma dvigati. Ustrezen odčitek s termometra je vrelišče snovi.

Pri prilagojenem principu (slika 3) se vrelišče določa v tališčni kapilari. Njen konec se raztegne v približno 2 cm dolgo tanko konico (a); vanjo se vsesa majhna količina vzorca. Odprti konec drobne kapilare se zatali, tako da je na koncu ostane zračni mehurček. Med segrevanjem v aparaturi za določanje tališča (b) se zračni mehurček razširi. Vrelišče sovpada s temperaturo, pri kateri zamašek iz snovi doseže nivo površine tekočine kopeli (c).

1.6.5 Fotocelična detekcija

Vzorec se segreva v kapilarni cevki znotraj segrevanega kovinskega bloka.

Skozi ustrezne luknje v bloku se usmeri svetlobni žarek skozi snov na natančno umerjeno fotocelico.

Med naraščanjem temperature vzorca iz vreliščne kapilare izhajajo posamezni mehurčki. Ko se doseže vrelišče, se količina mehurčkov zelo poveča. To povzroči spremembo v jakosti svetlobe, ki jo beleži fotocelica, kar da signal za konec indikatorju, ki odčitava temperaturo s platinskega uporovnega termometra znotraj bloka.

Ta metoda je še posebej uporabna, ker omogoča določanje vrelišča pri temperaturi, nižji od sobne, vse do 253,15 K (−20 °C) ne da bi bilo treba aparaturo kakorkoli spreminjati. Instrument moramo le položiti v hladno kopel.

1.6.6 Termična analiza

1.6.6.1 Diferenčna termična analiza

Glej dodatek.

1.6.6.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Glej dodatek.

2. PODATKI

Pri majhnih odstopanjih od normalnega tlaka (največ ± 5 kPa) se vrelišča normalizirajo na T_n po naslednji enačbi Sidneya Younga:

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

pri čemer je:

$$\Delta p = (101,325 - p) \text{ [pazi na predznak]}$$

p = izmerjeni tlak v kPa

f_T = razmerje med spremembo vrelišča in tlakom v K/kPa

T = izmerjeno vrelišče v K

T_n = vrelišče, popravljeno na normalni tlak, v K

V zgoraj navedenih mednarodnih in nacionalnih standardih so korekcijski faktorji za temperature, f_T , in enačbe za njihove približke za mnoge snovi.

Na primer, metoda DIN 53171 navaja naslednje okvirne korekcije za topila v barvah:

TABELA 2: TEMPERATURA – KOREKCIJSKI FAKTORJI f_T

Temperatura T (K)	Korekcijski faktor 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. POROČANJE

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- uporabljena metoda;
- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote) in predhodno prečiščevanje, če je bilo opravljeno;
- ocena točnosti.

Kot vrelišče se navede srednja vrednost najmanj dveh meritev, ki sta v območju predvidene točnosti (glej tabelo 1).

Navedejo se izmerjena vrelišča in njihova srednja vrednost ter tlak(i), pri katerih so bile meritve opravljene, v kPa. Tlak naj bo po možnosti blizu normalnemu atmosferskemu tlaku.

Navedi je treba vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

4. VIRI

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

Dodatek

Dodatne tehnične podrobnosti se lahko poiščejo na primer v naslednjih standardih:

1. Ebulioskop

ASTM D 1120-72

Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. Destilacijski proces (vreliščno območje)

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	Losungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. Diferenčna termična analiza in diferenčna dinamična kalorimetrija

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

A.3 RELATIVNA GOSTOTA

1. METODA

Opisane metode temeljijo na smernici za preskušanje OECD (1). Temeljna načela so navedena v viru (2).

1.1 UVOD

Opisane metode za določanje relativne gostote se uporabljajo za trdne in tekoče snovi, brez kakršnih koli omejitev glede njihove stopnje čistosti. Različne metode, ki se uporabijo, so navedene v tabeli 1.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Relativna gostota, D_4^{20} , trdnih snovi ali tekočin je razmerje med maso volumna preskusne snovi pri 20 °C in maso enakega volumna vode pri 4 °C. Relativna gostota nima enote.

Gostota snovi, ρ , je količnik njene mase, m , in volumna, V .

Gostota, ρ , se v enotah SI izrazi v kg/m^3 .

1.3 REFERENČNE SNOVI (1) (3)

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

1.4 PRINCIP METOD

Uporabljajo se štiri vrste metod.

1.4.1 Vzgonske metode**1.4.1.1 Hidrometer (za tekoče snovi)**

Dovolj točno in hitro je gostoto mogoče določiti s plavajočimi hidrometri, ki omogočajo sklepanje o gostoti tekočine glede na globino potopitve z odčitavanjem z graduirane lestvice.

1.4.1.2 Hidrostatska tehnika (za tekoče in trdne snovi)

Za določitev gostote vzorca se lahko uporabi razlika med njegovo maso, izmerjeno na zraku, in tisto, izmerjeno v primerni tekočini (npr. vodi).

V primeru trdnih snovi je izmerjena gostota reprezentativna le za uporabljeni vzorec. Pri določanju gostote tekočin, telo z znanim volumnom V , najprej stehtamo na zraku, potem pa še v tekočini.

1.4.1.3 Metoda s potopljenim telesom (za tekoče snovi) (4)

Pri tej metodi se gostota tekočine določi iz razlike med rezultati tehtanja tekočine pred in po potopitvi telesa z znanim volumnom vanjo.

1.4.2 Piknometrijske metode

Za trdne snovi ali tekočine se lahko uporabijo piknometri različnih oblik in znanih volumnov. Gostota se izračuna iz razlike med maso polnega in maso praznega piknometra ter njegovega znanega volumna.

1.4.3 Piknometar s primerjanjem zraka (za trdne snovi)

Gostota trdne snovi v kakršnikoli obliki se lahko izmeri s piknometrom s primerjanjem plina pri sobni temperaturi. Volumen snovi se izmeri na zraku ali v inertnem plinu v valju s spremenljivim umerjenim volumnom. Za izračun gostote se po končanem merjenju volumna opravi ena meritev mase.

1.4.4 Oscilacijski denzitometer (5) (6) (7)

Gostota tekočine se lahko izmeri z oscilacijskim denzitometrom. Mehanski oscilator, oblikovan kot U-cev, naj vibrira s svojo resonančno frekvenco, ki je odvisna od njegove mase. Ko se doda vzorec, se resonančna frekvenca oscilatorja spremeni. Aparaturo je treba umeriti z dvema tekočima snovema, katerih gostoti sta znani. Po možnosti se izbereta snovi, katerih gostoti pokrivata merjeno območje.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Uporabnost različnih metod za določanje relativne gostote je navedena v tabeli.

1.6 OPIS METOD

Primeri standardov, ki so vir dodatnih tehničnih podatkov, so navedeni v dodatku.

Preskusi morajo biti izvedeni pri 20 °C in vključevati najmanj dve meritvi.

2. **PODATKI**

Glej standarde.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— uporabljena metoda;

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote) in predhodno prečiščevanje, če je bilo opravljeno.

Relativna gostota, D_4^{20} , se navede, kakor je opredeljeno v 1.2, skupaj z agregatnim stanjem merjene snovi.

Navedi je treba vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

TABELA: UPORABNOST METOD

Merilna metoda	Gostota		Največja možna dinamična viskoznost	Veljavni standardi
	trdna snov	tekočina		
1.4.1.1 Hidrometer		da	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2 Hidrostatska tehnika				
(a) trdne snovi	da			ISO 1183 (A)
(b) tekočine		da	5 Pa s	ISO 901 in 758
1.4.1.3 Metoda s potopljenim telesom		da	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2 Piknometer				ISO 3507
(a) trdne snovi	da			ISO 1183(B), NF T 20-053
(b) tekočine		da	500 Pa s	ISO 758
1.4.3 Piknometer s primerjanjem zraka	da			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4 Oscilacijski denzitometer		da	5 Pa s	

4. **VIRI**

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

Dodatek

Glede dodatnih tehničnih podrobnosti so lahko v pomoč na primer naslednji standardi:

1. **VZGONSKE METODE**

1.1 Hidrometer

DIN 12790, ISO 387

Areometers general instructions

DIN 12791

*Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use**Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation**Part III: Use and test*

ISO 649-2

Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose

NF T 20-050

Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method

DIN 12793

Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 Hidrostatska tehnika

Za trdne snovi

ISO 1183

A metode: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics

NF T 20-049

Chemical products for industrial use — Determination of the density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method

ASTM-D-792

Specific gravity and density of plastics by displacement

DIN 53479

*Testing of plastics and elastomers; determination of density**Za tekoče snovi*

ISO 901

ISO 758

DIN 51757

Testing of mineral oils and related materials; determination of density

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 un ASTM D 1481-62

ASTM D 1298

Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

BS 4714

Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3 Metoda s potopljenim telesom

DIN 53217

*Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method*2. **PIKNOMETRSKE METODE**

2.1 Za tekoče snovi

ISO 3507

Pycnometers

ISO 758

Liquid chemical products; determination of density at 20 °C

DIN 12797

Gay-Lussac pycnometer (ne pārāk viskoziem negaistošiem šķidrumiem)

DIN 12798

Lipkin pycnometer (šķidrumiem, kuru kinemātiskā viskozitāte ir mazāka par $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ pie 15 °C)

DIN 12800	<i>Pyknometer nach Sprengel (šķidrūmiem skat. DIN 12798)</i>
DIN 12801	<i>Reischauer pycnometer (šķidrūmiem, kuru kinemātiskā viskozitāte ir mazāka par $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ pie 20 °C, piemērojama jo īpaši ogļūdeņražiem un and ūdens šķidrūmiem, kā arī šķidrūmiem ar augstāku with higher tvaika spiedienu, aptuveni 1 bar pie 90 °C)</i>
DIN 12806	<i>Hubbard pycnometer (visu veidu viskoziem šķidrūmiem, kuriem tvaika spiediens nav pārāk augsts, jo īpaši krāsām, lakām un bitumenam)</i>
DIN 12807	<i>Pyknometer nach Bingham (šķidrūmiem skat. DIN 12801)</i>
DIN 12808	<i>Jaulmes pycnometer (jo īpaši etanola un ūdens maisījumam)</i>
DIN 12809	<i>Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (ne pārāk viskoziem šķidrūmiem)</i>
DIN 53217	<i>Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer</i>
DIN 51757	<i>7. punkta: Testing of mineral oils and related materials; determination of density</i>
ASTM D 297	<i>15. iedaļa: Rubber products — chemical analysis</i>
ASTM D 2111	<i>Method C: Halogenated organic compounds</i>
BS 4699	<i>Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)</i>
BS 5903	<i>Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary— stoppered pycnometer method</i>
NF T 20-053	<i>Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method</i>
2.2	Za trdne snovi
ISO 1183	<i>Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics.</i>
NFT 20-053	<i>Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method</i>
DIN 19683	<i>Determination of the density of soils</i>
3.	PIKNOMETER S PRIMERJANJEM ZRAKA
DIN 55990	<i>3. daļa: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte</i>
DIN 53243	<i>Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung</i>

A.4 PARNI TLAK

1. METODA

Večina opisanih metod temelji na smernici za preskušanje OECD (1). Temeljna načela so navedena v virih (2) in (3).

1.1 UVOD

Za izvajanje tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o strukturi, tališču in vrelišču snovi.

Ni enega samega merilnega postopka, ki bi bil uporaben za celotno območje parnih tlakov. Zato se priporoča uporaba več metod za merjenje parnega tlaka od $< 10^{-4}$ do 10^5 Pa.

Nečistote običajno vplivajo na parni tlak, kolikšen pa je ta vpliv, je zelo odvisno od vrste nečistote.

Kadar so v vzorcu hlapne nečistote, ki bi lahko vplivale na rezultat, se snov lahko prečisti. Primerno je lahko tudi navesti parni tlak tehničnega materiala.

Pri nekaterih tukaj opisanih metodah se uporablja aparatura s kovinskimi deli; to je treba upoštevati pri preskušanju jedkih snovi.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Parni tlak snovi je opredeljen kot tlak nasičene pare nad trdno ali tekočo snovjo. Pri termodinamičnem ravnotežju je parni tlak čiste snovi odvisen samo od temperature.

Enota SI za tlak, ki jo je treba uporabljati, je paskal (Pa).

V preteklosti uporabljane enote, skupaj s pretvorbenimi faktorji, so:

1 tor (= 1 mm Hg)	= $1,333 \times 10^2$ Pa
1 atmosfera	= $1,013 \times 10^5$ Pa
1 bar	= 10^5 Pa

Enota SI za temperaturo je kelvin (K).

Splošna plinska konstanta R je $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Odvisnost parnega tlaka od temperature se opiše s Clausius-Clapeyronovo enačbo:

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

pri čemer je:

p = parni tlak snovi v paskalih

ΔH_v = izparilna toplota v J mol^{-1}

R = splošna plinska konstanta v $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = termodinamična temperatura v K

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

1.4 PRINCIP PRESKUSNIH METOD

Za določanje parnega tlaka je predlaganih sedem metod, ki se lahko uporabijo za različna območja parnega tlaka. Pri vsaki metodi se parni tlak določa pri različnih temperaturah. V omejenem temperaturnem območju je logaritem parnega tlaka čiste snovi linearna funkcija obratne vrednosti temperature.

1.4.1 **Dinamična metoda**

Pri dinamični metodi se meri vrelišče, ki je povezano z določenim tlakom.

Priporočeno območje:

10^3 do 10^5 Pa.

Ta metoda se priporoča tudi za določanje normalnega vrelišča in je uporabna v ta namen do 600 K.

1.4.2 **Statična metoda**

Med statičnim procesom, pri termodinamičnem ravnotežju, se pri določeni temperaturi določa parni tlak v zaprtem sistemu. Ta metoda je primerna za enokomponentne in večkomponentne trdne snovi in tekočine.

Priporočeno območje:

10 do 10^5 Pa.

Ta metoda se lahko uporabi tudi za območje od 1 do 10 Pa, pod pogojem, da smo previdni.

1.4.3 **Izoteniskop**

Ta standardizirana metoda je tudi statična metoda, vendar običajno ni primerna za večkomponentne sisteme. Dodatne informacije so na voljo v metodi ASTM D-2879-86.

Priporočeno območje:

100 do 10^5 Pa.

1.4.4 **Efuzijska metoda: Parnotlačna tehnika**

Določi se količina snovi, ki zapusti merilno celico v časovni enoti skozi odprtino znane velikosti, v takih vakuumskih pogojih, da je količina v celico vrnjene snovi zanemarljiva (npr. z merjenjem pulza na občutljivi tehnici, ki ga povzroči curek pare, ali z merjenjem izgube mase).

Priporočeno območje:

10^{-3} do 1 Pa.

1.4.5 Efuzijska metoda: Z izgubo mase ali lovljenjem pare

Ta metoda temelji na oceni mase preskusne snovi, ki v obliki pare zapusti Knudsenovo celico (4) v časovni enoti skozi mikroadprtino v pogojih ultra visokega vakuumu. Masa izhajajoče pare se lahko ugotovi tako, da se bodisi določi izguba mase celice bodisi kondenzira para pri nizki temperaturi in določi količina izhlapele snovi s kromatografsko analizo. Parni tlak se izračuna z uporabo Hertz-Knudsenovega razmerja.

Priporočeno območje:

10^{-3} do 1 Pa.

1.4.6 Metoda z nasičenjem plinov

Preko snovi se usmeri tok inertnega nosilnega plina, tako da se plin nasiti z njeno paro. Količina snovi, ki se prenese z znano količino inertnega plina, se lahko izmeri bodisi z zbiranjem v ustrezni lovnik bodisi z neposredno analitsko tehniko. Ta količina se nato uporabi za izračun parnega tlaka pri dani temperaturi.

Priporočeno območje:

10^{-4} do 1 Pa.

Ta metoda se lahko uporabi tudi za območje od 1 do 10 Pa, pod pogojem, da smo previdni.

1.4.7 Metoda z rotorjem

Pri merilniku z rotorjem je dejanski merilni element jeklena kroglica, ki lebdi v magnetnem polju in se zelo hitro vrti. Tlak plina se določi s sklepanjem glede na upočasnitev jeklene kroglice, ki je odvisna od tlaka.

Priporočeno območje:

10^{-4} do 0,5 Pa.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Različne metode določanja parnega tlaka se primerjajo glede na uporabnost, ponovljivost, obnovljivost, merilno območje in veljavne standarde. Taka primerjava je v naslednji tabeli.

MERILA KAKOVOSTI

Merilna metoda	Snovi		Ocenjena ponovljivost ⁽¹⁾	Ocenjena obnovljivost ⁽¹⁾	Priporočeno območje	Veljavni standard
	trdna snov	tekočina				
1.4.1 Dinamična metoda	nizko tališče	da	do 25 %	do 25 %	10^3 Pa do 2×10^3 Pa	—
			1 do 5 %	1 do 5 %	2×10^3 Pa do 10^5 Pa	—
1.4.2 Statična metoda	da	da	5 do 10 %	5 do 10 %	10 Pa do 10^5 Pa ⁽²⁾	NFT 20-048 (5)
1.4.3 Izoteniskop	da	da	5 do 10 %	5 do 10 %	10^2 Pa do 10^5 Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4 Efuzijska metoda, parnotlačna tehnika	da	da	5 do 20 %	do 50 %	10^{-3} do 1 Pa	NFT 20-047(6)
1.4.5 Efuzijska metoda, izguba mase	da	da	10 do 30 %	—	10^{-3} do 1 Pa	—
1.4.6 Metoda z nasičenjem plinov	da	da	10 do 30 %	do 50 %	10^{-4} Pa do 1 Pa ⁽²⁾	—
1.4.7 Metoda z rotorjem	da	da	10 do 20 %	—	10^{-4} Pa do 0,5 Pa	—

⁽¹⁾ Odvisno od stopnje čistosti

⁽²⁾ To metodo lahko uporabimo tudi za območje od 1 do 10 Pa, pod pogojem da smo previdni.

1.6 OPIS METOD

1.6.1 **Dinamično merjenje**1.6.1.1 *Aparatura*

Merilna aparatura je običajno sestavljena iz vrelna posode s pritrjenim hladilnikom iz stekla ali kovine (slika 1), opreme za merjenje temperature ter opreme za uravnavanje in merjenje tlaka. Značilna merilna aparatura na sliki je narejena iz stekla, odpornega proti vročini, in sestavljena iz petih delov:

Velika cev, delno z dvojno steno, je sestavljena iz brušene ovojne spojke, hladilnika, hladilne posode in vhodne odprtine.

Stekleni valj s Cottrellovo črpalko je nameščen v vrelnem delu cevi in ima grobo površino iz brušenega stekla, da se prepreči „sunkovito udarjanje“ med vrenjem.

Temperatura se meri z ustreznim senzorjem temperature (npr. uporovnim termometrom, termočlenom v plašču), ki se skozi primerno odprtino (npr. zunanji (moški) obris) potopi v aparaturu do merilne točke (št. 5 na sliki 1).

Aparatura se ustrezno poveže z opremo za uravnavanje in merjenje tlaka.

Bučka, ki deluje kot pufski volumen, se poveže z merilno aparaturu preko kapilarne cevke.

Vrela posoda se segreva z grelnim elementom (npr. kartušnim grelnikom), vstavljenim v stekleno aparaturu od spodaj. Potrebni grelni tok se nastavi in uravnava preko termočlena.

Potrebni vakuum med 10^2 in približno 10^5 Pa se ustvari z vakuumsko črpalko.

Uporabi se ustrezni ventil za odmerjanje zraka ali dušika za uravnavanje tlaka (merilno območje približno 10^2 do 10^5 Pa) in zračenje.

Tlak se meri z manometrom.

1.6.1.2 *Merilni postopek*

Parni tlak se meri z določanjem vrelišča vzorca pri različnih točno določenih tlakih med približno 10^3 in 10^5 Pa. Nespremenjena temperatura pri konstantnem tlaku kaže, da je bilo doseženo vrelišče. Penečih se snovi ni mogoče meriti s to metodo.

Snov se da v čisto in suho vzorčno posodo. Pri neuprašenih trdnih snoveh lahko nastanejo težave, ki pa se včasih lahko odpravijo s segrevanjem hladilnega plašča. Ko je posoda napolnjena, se aparatura zatesni pri robnici in snov razplini. Nato se nastavi najnižji želeni tlak ter vključi gretje. Hkrati se senzor temperature poveže z zapisovalnikom.

Ravnotežje je doseženo, ko se zapiše konstantno vrelišče pri konstantnem tlaku. Posebej je treba paziti, da se prepreči sunkovito udarjanje med vrenjem. Poleg tega se mora kondenzacija v hladilniku popolnoma končati. Kadar se določa parni tlak trdnih snovi z nizkim tališčem, je treba paziti, da se hladilnik ne zamaši.

Potem ko se zapiše točka ravnotežja, se nastavi višji tlak. Postopek se nadaljuje na enak način, dokler se ne doseže tlak 10^5 Pa (skupaj približno 5 do 10 merilnih točk). Za potrditev je treba ponoviti točke ravnotežja pri padajočih tlakih.

1.6.2 Statične meritve**1.6.2.1 Aparatura**

Aparaturo sestavljajo posoda za vzorec, grelni in hladilni sistem za uravnavanje temperature vzorca in naprava za merjenje temperature. Aparatura vključuje tudi instrumente za uravnavanje in merjenje tlaka. Sliki 2a in 2b prikazujeta osnovne principe metode.

Komora za vzorec (slika 2a) se na eni strani poveže z ustreznim visokovakuumskim ventilom. Na drugo stran se pritrdi U-cevka, ki vsebuje ustrezno manometrično tekočino. En krak U-cevke vodi do vakuumske črpalke, dušikove jeklenke ali prezračevalnega ventila in do manometra.

Namesto U-cevke se lahko uporabi merilnik tlaka z indikatorjem tlaka (slika 2b).

Za uravnavanje temperature vzorca se vzorčna posoda skupaj z ventilom in U-cevko ali manometrom postavi v kopel, ki se vzdržuje pri konstantni temperaturi $\pm 0,2$ K. Temperatura se meri ob zunanji steni posode z vzorcem ali v sami posodi.

Za odzračevanje naprave se uporabi vakuumska črpalka z ohlajeno pastjo na začetku toka.

Pri metodi 2a se parni tlak snovi meri posredno z ničelnim indikatorjem. Pri tem se upošteva, da se gostota tekočine v U-cevki spremeni, če se zelo spremeni temperatura.

Kot ničelni indikatorji za U-cevko so primerne naslednje tekočine, odvisno od območja tlaka in kemijskih lastnosti preskusne snovi: silikonska olja, ftalati. Preskusna snov se ne sme vidno topiti v tekočini v U-cevki ali z njo reagirati.

Za manometer se lahko uporabijo živo srebro za območje od normalnega zračnega tlaka do 10^2 Pa ter silikonska olja in ftalati pri območju pod 10^2 Pa do 10 Pa. Membranski manometri, ki se lahko segrevajo, se lahko uporabljajo tudi pod 10^{-1} Pa. Obstajajo tudi drugi merilniki tlaka, ki se lahko uporabljajo pod 10^2 Pa.

1.6.2.2 Merilni postopek

Pred merjenjem je treba sestavne dele aparature s slike 2 temeljito očistiti in posušiti.

Za metodo 2a se U-cevka napolni z izbrano tekočino, ki jo je treba pred odčitavanjem razpliniti pri zvišani temperaturi.

V aparaturo se da preskusna snov, aparaturo se zapre in temperatura dovolj zmanjša za razplinjenje. Temperatura mora biti dovolj nizka, da se zagotovi izčrpanje zraka, vendar – pri večkomponentnih sistemih – ne sme povzročiti sprememb v sestavi snovi. Če je potrebno, se z mešanjem pospeši vzpostavljanje ravnotežja.

Vzorec se lahko podhladi npr. s tekočim dušikom (pri čemer je treba paziti, da se zrak ali tekočina v črpalci ne kondenzira) ali zmesjo etanola in suhega ledu. Za meritve pri nizkih temperaturah uporabimo kopel z uravnavano temperaturo, povezano z ultra-kriostatom.

Ob odprtem ventilu nad vzorčno posodo se nekaj minut izsesava zrak. Nato se zapre ventil in zmanjša temperatura vzorca do najnižje želene ravni. Če je potrebno, se postopek razplinjevanja večkrat ponovi.

Ko se vzorec segreva, parni tlak narašča. To spremeni ravnotežje tekočine v U-cevki. Za izravnavo tega učinka, se skozi ventil v aparaturo spusti dušik ali zrak, dokler ni indikator tlaka spet na ničli. Tlak, potreben za to, se lahko odčita s preciznega manometra pri sobni temperaturi. Ta tlak ustreza parnemu tlaku snovi pri tej merilni temperaturi.

Metoda 2b je podobna, le da se parni tlak odčita neposredno.

Odvisnost parnega tlaka od temperature se določi v primernih intervalih (skupaj približno 5 do 10 merilnih točk) do zelenega maksimuma. Za preveritev je treba meritve ponoviti pri nizkih temperaturah.

Če vrednosti, dobljene pri ponovljenih meritvah, ne sovpadajo z dobljeno krivuljo za naraščajočo temperaturo, je to lahko posledica enega od naslednjih vzrokov:

1. V vzorcu je še vedno zrak (npr. snovi z veliko viskoznostjo) ali snovi z nizkim vreliščem, ki se sprostijo med segrevanjem in se lahko odstranijo z izsesavanjem po dodatnem podhlajevanju.
2. Temperatura hlajenja ni dovolj nizka. V tem primeru se za hlajenje uporabi tekoči dušik.

Pri primerih 1 in 2 je treba meritve ponoviti.

3. V preučevanem temperaturnem območju snov kemično reagira (npr. razpada, polimerizira).

1.6.3 Izoteniscope

Popoln opis te metode lahko najdemo v viru (7). Princip merilne naprave je prikazan na sliki 3. Podobno kot statična metoda iz 1.6.2 je izoteniscope primeren za preučevanje trdnih snovi ali tekočin.

V primeru tekočin sama snov služi kot tekočina v pomožnem manometru. V izoteniscope se da zadostna količina tekočine, da se napolni bučka in krajši krak manometriškega dela. Izoteniscope se pritrdi na vakuumski sistem in odzrači, nato pa napolni z dušikom. Odzračevanje in splakovanje sistema se dvakrat ponovi, da se odstrani ves kisik. Napolnjen izoteniscope se postavi v vodoraven položaj, tako da se vzorec razlije v tanko plast v vzorčni bučki in manometriškem delu (U-cev). Tlak v sistemu se zmanjša na 133 Pa in vzorec se počasi segreva, dokler ravno ne začne vreti (odstranitev raztopljenih permanentnih plinov). Izoteniscope se nato postavi tako, da se vzorec vrne v bučko in krajši krak manometra ter se oba popolnoma napolnita s tekočino. Vzdržuje se tlak, kakor pri razplinjevanju; podaljšana konica bučke z vzorcem se segreva nad majhnim plamenom, dokler se sproščene pare vzorca toliko ne razširijo, da izpodrinejo del vzorca iz zgornjega dela bučke in kraka manometra, ga potisnejo v manometriški del izoteniscope in tako ustvarijo s parami nasičen prostor brez dušika.

Izoteniscope se nato postavi v kopel s konstantno temperaturo, tlak dušika pa se naravnata tako, da je enak tlaku vzorca. Ravnotežje tlaka pokaže manometriški del izoteniscope. Ob ravnotežju je parni tlak dušika enak parnemu tlaku snovi.

Pri trdnih snoveh se odvisno od območja tlaka in temperature uporabljajo manometriške tekočine iz 1.6.2.1. Izboklina na daljšem kraku izoteniscope se napolni z razplinjeno manometriško tekočino. Potem se preskusna trdna snov da v bučko in razplini pri zvišani temperaturi. Nato se izoteniscope nagne tako, da manometriška tekočina steče v U-cevko. Parni tlak kot funkcija temperature se izmeri v skladu z 1.6.2.

1.6.4 Efuzijska metoda: Parnotlačna tehnika

1.6.4.1 Aparatura

V literaturi je opisanih več različic aparature (1). Tukaj opisana aparatura prikazuje glavni princip te metode (slika 4). Na sliki 4 so glavni sestavni deli aparature: visokovakuumska posoda iz nerjavečega jekla ali stekla, oprema za ustvarjanje in merjenje vakuumu ter vgrajeni deli za merjenje parnega tlaka na tehnici. V aparaturu so vključeni naslednji vgrajeni sestavni deli:

- uparjalna peč s prirobnico in vrtljivim dovodom. Uparjalna peč je valjasta posoda npr. iz bakra ali kemično odporne zlitine z dobro toplotno prevodnostjo. Lahko se uporabi tudi steklena posoda z bakreno oblogo. Polmer peči je približno 3 do 5 cm in višina 2 do 5 cm. Peč ima eno do tri odprtine različnih velikosti za tok pare. Peč se segreva bodisi z grelno ploščo pod njo bodisi z grelno spiralo, ovito okoli njene zunanje strani. Da se prepreči izguba toplote preko osnovne plošče, se grelnik pritrdi na osnovno ploščo s toplotno slabo prevodno kovino (nikelj-srebrovo ali krom-nikljevo jeklo), npr. nikelj-srebrova cev, pritrjena na vrtljivi dovod, če se uporabi peč z več odprtinami. Prednost take konstrukcije je, da se lahko doda bakrena palica. To omogoča hlajenje od zunaj s pomočjo hladilne kopeli,

- če ima bakreni pokrov tri odprtine različnih premerov, ki ležijo pod kotom 90° ena na drugo, se lahko zajamejo različna območja parnega tlaka v celotnem merilnem območju (premer odprtin med približno 0,30 in 4,50 mm). Velike odprtine se uporabijo za nizek parni tlak in obratno. Z vrtenjem peči se lahko nastavi želena odprtina ali vmesni položaj na tok pare (odprtina peči – zaslon – skodelica tehtnice) in tako sprosti curek molekul ali ga skozi odprtino peči preusmeri na skodelico tehtnice. Za merjenje temperature snovi se na primerno točko namesti termočlen ali uporovni termometer,
- nad zaslonom je posodica zelo občutljive mikrotehtnice (glej spodaj). Premer skodelice tehtnice je približno 30 mm. Primeren material je pozlačen aluminij,
- skodelico tehtnice obdaja valjasta medeninasta ali bakrena hladilna posoda. Odvisno od vrste tehtnice, ima odprtine za gredeljnico tehtnice in odprtino v zaslonu za curek molekul ter bi morala zagotavljati popolno kondenzacijo pare na skodelici tehtnice. Odvajanje toplote navzven omogoča npr. bakrena palica, povezana s hladilno posodo. Palica je napeljana skozi osnovno ploščo in od nje toplotno izolirana, npr. s krom-nikljevo jekleno cevjo. Palica je potopljena v tekoči dušik v Dewarjevi posodi pod osnovno ploščo ali pa tekoči dušik kroži skozi njo. Temperatura hladilne posode se tako vzdržuje pri – 120 °C. Skodelica tehtnice se hladi izključno s sevanjem in sicer ustrezno glede na preučevano območje tlaka (hlajenje približno 1 uro pred začetkom merjenja),
- tehtnica se namesti nad hladilno posodo. Ustrezne tehtnice so npr. zelo občutljiva dvokraka elektronska mikrotehtnica (8) ali zelo občutljiv instrument z vrtljivo tuljavo (glej Smernico za preskušanje OECD 104, izdano 12.5.81),
- v osnovno ploščo so vgrajeni tudi električni priključki za termočlene (ali uporovne termometre) in grelna spirale.
- v posodi se ustvari vakuum z uporabo delne vakuumske črpalke ali visokovakuumske črpalke (potreben je vakuum približno 1 do $2 \cdot 10^{-3}$ Pa, ki se doseže po 2 h črpanja). Tlak se uravnava s primernim ionizacijskim manometrom.

1.6.4.2 Merilni postopek

Posoda se napolni s preskusno snovjo in zapre s pokrovom. Zaslon in hladilna posoda se potisneta čez peč. Aparatura se zapre in vključijo se vakuumske črpalke. Končni tlak pred začetkom merjenja mora biti približno 10^{-4} Pa. Hlajenje hladilne posode se začne pri 10^{-2} Pa.

Ko se doseže potrebni vakuum, začnemo umeritveni niz pri najnižji potrebni temperaturi. Nastavi se ustrezna odprtina v pokrovu, curek pare gre skozi zaslon neposredno nad odprtino in zadene ob ohlajeno skodelico tehtnice. Skodelica tehtnice mora biti dovolj velika, da jo zadene celotni curek, usmerjen skozi zaslon. Gibalna količina parnega curka deluje kot sila na skodelico tehtnice in molekule se kondenzirajo na njeni hladni površini.

Gibalna količina in sočasna kondenzacija povzročita signal na zapisovalniku. Ovrednotenje signala da dve informaciji:

1. V opisani aparaturi se parni tlak določi neposredno iz gibalne količine na skodelici tehtnice (za to ni potreben podatek o molski masi (2)). Pri vrednotenju meritev je treba upoštevati geometrijske dejavnike, kakršna sta odprtina peči in kot molekulskega curka.
2. Hkrati se lahko izmeri masa kondenzata in iz tega izračuna hitrost izhlapevanja. Parni tlak se lahko izračuna tudi iz hitrosti izhlapevanja in molske mase po Hertzovi enačbi (2).

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

pri čemer je

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

M = molska masa (g mol^{-1})

T = temperatura (K)

R = splošna plinska konstanta ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

p = parni tlak (Pa)

Ko se doseže potrební vakuum, začnemo niz meritev pri najnižji želeni merilni temperaturi.

Za nadaljnje meritve se temperatura dviga v majhnih intervalih, dokler se ne doseže najvišja želená temperatura. Vzorec se potem spet ohladi in lahko se zapiše druga krivulja parnega tlaka. Če drugi niz meritev ne potrdi rezultatov prvega, je možno, da snov v temperaturnem območju meritev razpada.

1.6.5 Efuzijska metoda – z izgubo mase

1.6.5.1 Aparatura

Efuzijsko aparaturo sestavljajo naslednji osnovni deli:

- posoda, ki jo je mogoče termostatirati in odzračiti in v kateri so efuzijske celice,
- visokovakuumska črpalka (npr. difuzijska črpalka ali turbomolekularna črpalka) z vakuummetrom,
- past s tekočim dušikom ali suhim ledom.

Na sliki 5 je na primer prikazana električno ogrevana aluminijasta vakuumská posoda s 4 efuzijskimi celicami iz nerjavečega jekla. Folija iz nerjavečega jekla, debela približno 0,3 mm, ima efuzijsko odprtino s premerom 0,2 do 1,0 mm in je pritrjena na efuzijsko celico z navojnim pokrovom.

1.6.5.2 Merilni postopek

V vsako efuzijsko celico se da referenčna in preskusná snov, kovinska membrana z odprtino se pritrdi z navojnim pokrovom in vsaka celica se stehta do 0,1 mg točno. Celica se postavi v termostatirano aparaturo, ki se nato odzračí do tlaka, nižjega od ene desetine pričakovanega tlaka. V opredeljenih časovnih intervalih od 5 do 30 ur se v aparaturo spusti zrak in s ponovnim tehtanjem določi izguba mase efuzijskih celic.

Da se zagotovi, da na rezultate ne vplivajo hlapne nečistote, se celice ponovno tehtajo v opredeljenih časovnih intervalih, s čimer se preveri, ali je hitrost izparevanja konstantná v najmanj dveh takih intervalih.

Parni tlak p v efuzijski celici je izražen z:

$$p = \frac{m}{KA t} \sqrt{\frac{2 \pi R T}{M}}$$

pri čemer je

p = parni tlak (Pa)

m = masa snovi, ki zapusti celico v času t (kg)

t = čas (s)

A = ploščina odprtine (m^2)

K = korekcijski faktor

R = splošná plinska konstanta ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = temperatura (K)

M = molská masa (kg mol^{-1})

Korekcijski faktor K je odvisen od razmerja med dolžino in polmerom valjaste odprtine:

razmerje:	0,1	0,2	0,6	1,0	2,0
K:	0,952	0,909	0,771	0,672	0,514

Zgornja enačba se lahko zapiše:

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

pri čemer je $E = \frac{1}{KA} \sqrt{2 \pi R}$ in je konstantna za efuzijsko celico.

Konstanta efuzijske celice E se lahko določi z referenčnimi snovmi (2,9) po naslednji enačbi:

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

pri čemer je

$p(r)$ = parni tlak referenčne snovi (Pa)

$M(r)$ = molska masa referenčne snovi (kg mol^{-1})

1.6.6 Metoda z nasičenjem plina

1.6.6.1 Aparatura

Značilna aparatura za ta preskus je sestavljena iz več delov, prikazanih na sliki 6a in opisanih spodaj (1).

Inertni plin:

Nosilni plin ne sme kemijsko reagirati s preskusno snovjo. Dušik običajno zadošča za ta namen, občasno pa je treba uporabiti druge pline (10). Uporabljen plin mora biti suh (glej sliko 5, točko 4: senzor relativne vlažnosti).

Uravnavanje pretoka:

Potreben je ustrezen plinski kontrolni sistem, da se zagotovi konstanten izbrani pretok skozi saturacijsko kolono.

Pasti za zbiranje pare:

Odvisni so od značilnosti posameznega vzorca in izbrane analitske metode. Paro je treba uloviti kvantitativno in v obliki, ki omogoča poznejšo analizo. Za nekatere preskusne snovi so primerne pasti, ki vsebujejo tekočine, kot je heksan ali etilen glikol. Za druge se lahko uporabljajo trdni absorbenti.

Za določitev količine snovi, ki jo prenese znana količina nosilnega plina, se namesto lovljenja pare in poznejše analize lahko uporabijo neposredne analitske tehnike, kot je kromatografija. Lahko se izmeri tudi izguba mase vzorca.

Toplotni izmenjevalnik:

Za merjenje pri različnih temperaturah bo morda treba v sestav vključiti toplotni izmenjevalnik.

Saturacijska kolona:

Preskusna snov se iz raztopine nanese na primerno inerten nosilec. Z obloženim nosilcem se napolni saturacijska kolona, dimenzije in pretok katere morajo biti takšni, da je zagotovljeno popolno nasičenje nosilnega plina. Saturacijsko kolono je treba termostatirati. Za meritve pri temperaturah nad sobno je treba del med saturacijsko kolono in pastmi ogrevati, da se prepreči kondenzacija preskusne snovi.

Da se zmanjša prenos mase z difuzijo, se za saturacijsko kolono lahko namesti kapilara (slika 6b).

1.6.6.2 Merilni postopek

Priprava saturacijske kolone:

Raztopina preskusne snovi v zelo lahko hlapnem topilu se doda primerni količini nosilca. Dodati je treba zadostno količino preskusne snovi, da se vzdržuje nasičenost ves čas preskusa. Topilo naj popolnoma izpari na zraku ali v rotacijskem uparjalniku, nato se temeljito premešan material doda v saturacijsko kolono. Po termostatiranju vzorca se skozi aparaturo spusti suhi dušik.

Merjenje:

Pasti ali detektor za neposredno analizo se poveže z odtočno cevko kolone in zapiše se čas. Pretok se preverja na začetku in v enakomernih intervalih med preskusom z merilnikom mehurčkov (ali ves čas z merilnikom masnega pretoka).

Treba je izmeriti tlak pri izhodu iz saturatorja. To se lahko stori bodisi tako:

- (a) da se med saturator in pasti priključi merilnik tlaka (to morda ne bo primerno, ker poveča mrtvi prostor in adsorpcijsko površino); bodisi
- (b) da se določi padec tlaka v posameznem sistemu pasti kot funkcija pretoka v ločenem preskusu (to morda ne bo ustrezno za tekočinske pasti).

Čas, potreben za to, da se zbere zadostna količina preskusne snovi za različne analitske metode, se določi s predhodnimi preskusi ali ocenami. Namesto zbiranja snovi za nadaljnjo analizo se lahko uporabi neposredna kvantitativna analitska tehnika (npr. kromatografija). Pred izračunom parnega tlaka pri dani temperaturi je treba izvesti predhodne preskuse, da se določi največji pretok, ki popolnoma nasiti nosilni plin s paro snovi. To je zagotovljeno, če se nosilni plin uvaja skozi saturator dovolj počasi, tako da manjši pretok ne daje nič večjega izračunanega parnega tlaka.

Analitska metoda se določi glede na naravo preskusne snovi (npr. plinska kromatografija ali gravimetrija).

Določi se količina snovi, ki jo prenese znan volumen nosilnega plina.

1.6.6.3 Izračun parnega tlaka

Parni tlak se izračuna iz gostote pare, W/V , po enačbi:

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

pri čemer je:

p = parni tlak (Pa)

W = masa uparjene preskusne snovi (g)

V = volumen nasičenega plina (m^3)

R = splošna plinska konstanta ($J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = temperatura (K)

M = molska masa preskusne snovi ($g \text{ mol}^{-1}$)

Izmerjene volumne je treba popraviti glede na razlike v tlaku in temperaturi med merilnikom pretoka in termostatiranim saturatorjem. Če je merilnik pretoka glede na smer toka za pastjo pare, bodo morda potrebne korekcije, da se upošteva morebitna uparjena vsebina pasti(1).

1.6.7 **Rotorska metoda (8, 11, 13)**1.6.7.1 *Aparatura*

Metoda z rotorjem se lahko izvede z uporabo merilnika viskoznosti z rotorjem, prikazanega na sliki 8. Shematski prikaz postavitve preskusa kaže slika 7.

Značilno merilno aparaturo sestavljajo vrteči rotorski merilnik, postavljena v termostatisirano posodo (uravnavanje na 0,1 °C natančno). Posoda z vzorcem se postavi v termostatisirano posodo (uravnavanje na 0,01 °C natančno), vsi ostali deli sestava pa se vzdržujejo pri višji temperaturi, da se prepreči kondenzacija. Visokovakuumska črpalka se priključi na sistem preko visokovakuumskih ventilov.

Vrteči rotorski merilnik sestavlja jeklena kroglica (premera 4 do 5 mm) v cevi. Kroglica se postavi v magnetno polje in stabilizira, tako da lebdi, običajno s kombinacijo trajnih magnetov in kontrolnih tuljav.

Vrtenje kroglice povzročajo rotirajoča polja tuljave. Sprejemne tuljave, ki merijo stalno prisotno šibko lateralno magnetizacijo kroglice, omogočajo merjenje hitrosti njenega vrtenja.

1.6.7.2 *Merilni postopek*

Ko kroglica doseže določeno hitrost vrtenja $v(o)$ (običajno približno 400 vrtljajev na sekundo), se ustavi dotok energije in zaradi trenja, ki ga povzroča plin, se vrtenje upočasni.

Padeč vrtilne hitrosti se meri kot funkcija časa. Ker je trenje, ki ga povzroča lebdenje v magnetnem polju zanemarljivo v primerjavi s trenjem plina, tlak plina p opisuje enačba:

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

pri čemer je

$\bar{c}$ = povprečna hitrost plinskih molekul

r = polmer kroglice

ρ = masna gostota kroglice

σ = koeficient tangencialnega prenosa momenta ($\epsilon = 1$ za idealno krogelno površino kroglice)

t = čas

$v(t)$ = hitrost vrtenja po času t

$v(o)$ = začetna hitrost vrtenja

Ta enačba se lahko zapiše tudi na naslednji način:

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

kjer sta t_n in t_{n-1} časa, potrebna za določeno število vrtljajev N . Časovna intervala t_n in t_{n-1} si sledita in $t_n > t_{n-1}$.

Povprečna hitrost plinskih molekul c , se opiše z enačbo:

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

pri čemer je:

T = temperatura

R = splošna plinska konstanta

M = molska masa

2. PODATKI

Pri katerikoli od navedenih metod je treba parni tlak določiti pri najmanj dveh temperaturah. Za preverjanje linearnosti krivulje parnega tlaka so zaželeni najmanj tri temperature v območju od 0 do 50 °C.

3. POROČANJE

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- uporabljena metoda;
- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote) in predhodno prečiščevanje, če je bilo opravljeno;
- najmanj po dve vrednosti parnega tlaka in temperature, po možnosti v območju 0 do 50 °C;
- vsi neobdelani podatki;
- krivulja $\log p$ v odvisnosti od $1/T$;
- ocenjeni parni tlak pri 20 ali 25 °C.

Če pride do prehoda (spremembe stanja, razpada), je treba navesti naslednje podatke:

- vrsta spremembe;
- temperatura, pri kateri pride do spremembe pri atmosferskem tlaku;
- parni tlak pri 10 in 20 °C pod temperaturo prehoda in pri 10 in 20 °C nad to temperaturo (razen če gre za prehod iz trdnega v plinasto agregatno stanje).

Navesti je treba vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

4. VIRI

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

Dodatek 1

Ocenjevalna metoda

UVOD

Izračunane vrednosti parnega tlaka se lahko uporabijo:

- za izbiro primerne preskusne metode,
- za pridobitev ocene ali mejne vrednosti v primerih, kadar preskusne metode ni mogoče uporabiti zaradi tehničnih razlogov (in tudi kadar je parni tlak zelo nizek),
- v pomoč pri določanju primerov, pri katerih je opustitev merjenja upravičena, ker je verjetno, da je parni tlak pri sobni temperaturi $< 10^{-5}$ Pa.

OCENJEVALNA METODA

Parni tlak tekočin in trdnih snovi se lahko oceni z uporabo prilagojene Watsonove korelacije (a). Edini potrebni s preskusom pridobljeni podatek je normalno vrelišče. Metoda je uporabna za območje tlaka od 10^5 Pa do 10^{-5} Pa.

Podrobne informacije o metodi so navedene v „Priročniku metod za ocenjevanje kemijskih lastnosti“ (b).

RAČUNSKI POSTOPEK

V skladu z (b) se parni tlak izračuna na naslednji način:

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

pri čemer je:

T = izbrana temperatura

T_b = normalno vrelišče

P_{vb} = parni tlak pri temperaturi T

ΔH_{vb} = izparilna toplota

ΔZ_b = faktor stisljivosti (ocenjen na 0,97)

m = empirični faktor, odvisen od agregatnega stanja pri izbrani temperaturi

Nadalje

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

pri čemer je K_f empirični faktor, ki upošteva polarnost snovi. V viru (b) so navedeni faktorji K_f za več spojin.

Precej pogosto so na voljo podatki o vrelišču pri znižanem tlaku. V skladu z (b) se pri takih primerih parni tlak izračuna na naslednji način:

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

pri čemer je T_1 vrelišče pri znižanem tlaku P_1 .

POROČILO

Pri uporabi ocenjevalne metode, poročilo vključuje izčrpno dokumentacijo izračuna.

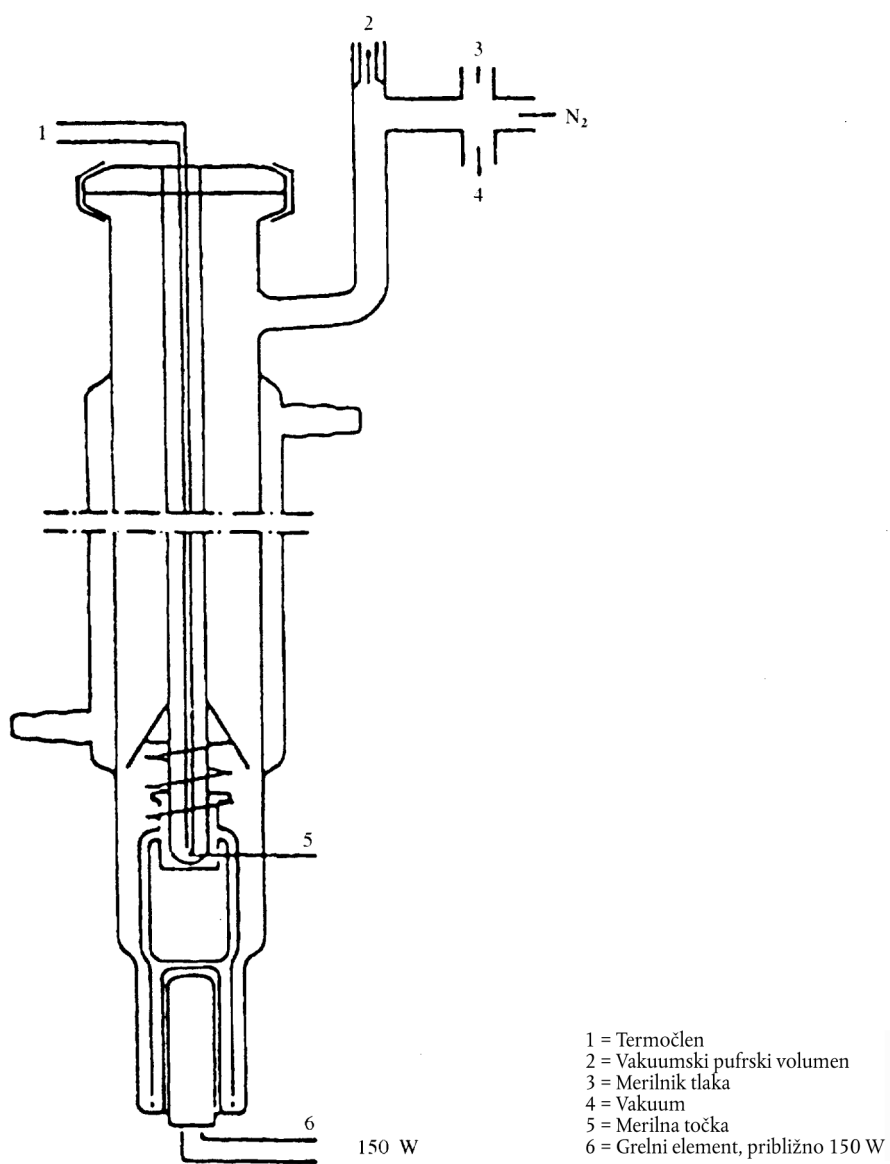
LITERATURA

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

Dodatek 2

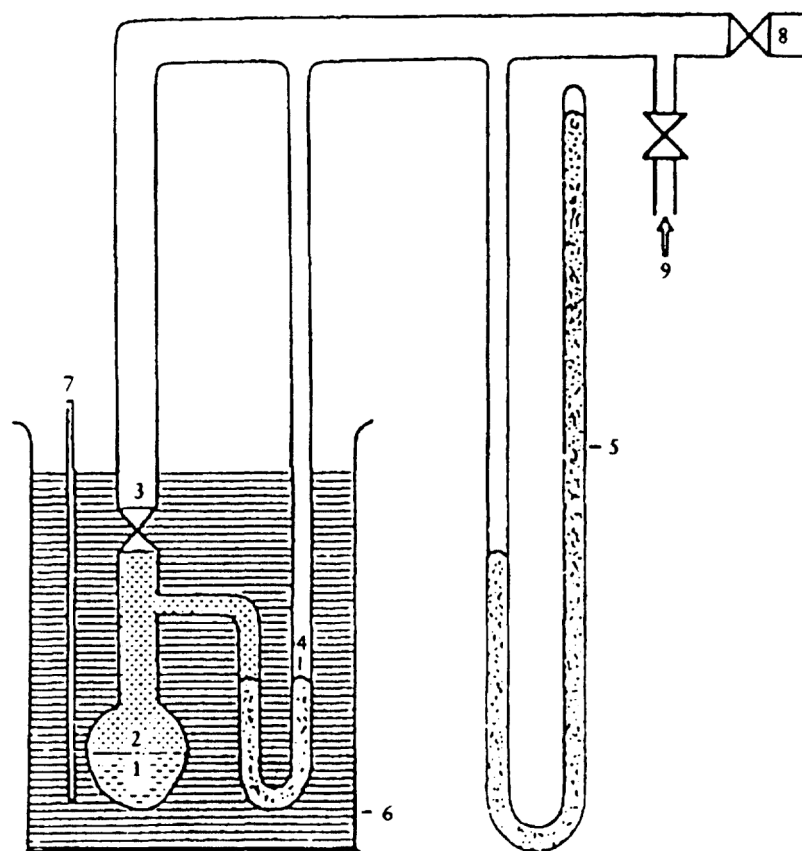
Slika 1

Aparatura za določanje krivulje parnega tlaka po dinamični metodi



Slika 2a

Aparatura za določanje krivulje parnega tlaka po statični metodi (z uporabo manometra z U-cevko)

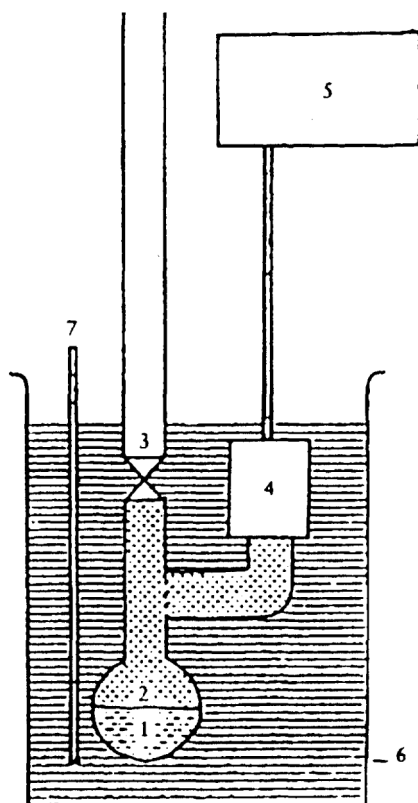


1. Preskusna snov
2. Parna faza
3. Visokovakuumski ventil
4. U-cevka (pomožni manometer)
5. Manometer

6. Temperaturna kopel
7. Naprava za merjenje temperature
8. Vod do vakuumske črpalke
9. Zračenje

Slika 2b

Aparatura za določanje krivulje parnega tlaka po statični metodi (z uporabo indikatorja tlaka)

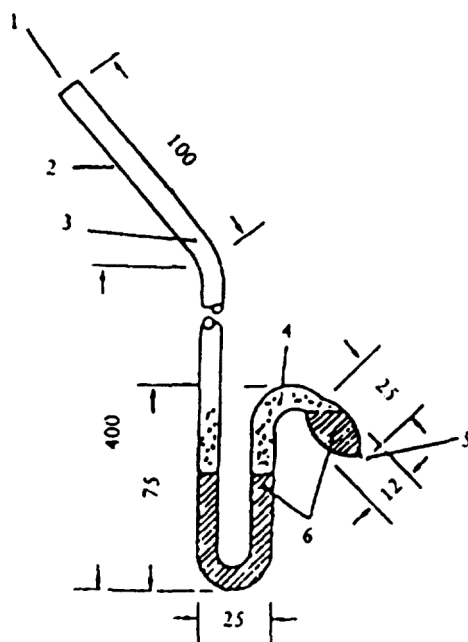


- 1. Preskusna snov
- 2. Parna faza
- 3. Visokovakuumski ventil
- 4. Merilnik tlaka

- 5. Indikator tlaka
- 6. Temperaturna kopel
- 7. Naprava za merjenje temperature

Slika 3

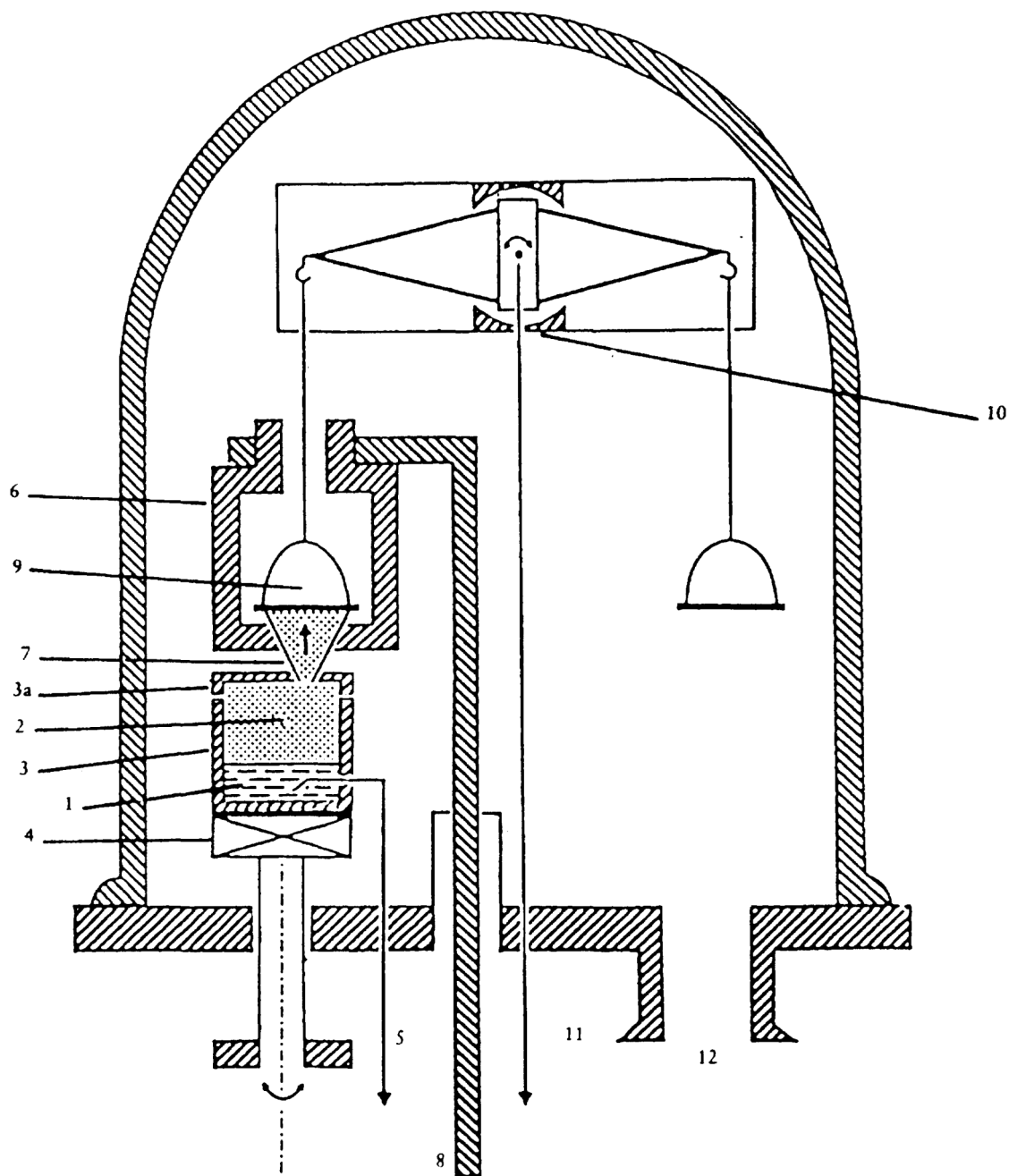
Izoteniskop (glej vir 7)



1. Vod do sistema za kontrolo in merjenje tlaka
2. Cev z zunanjim premerom 8 mm
3. Suhi dušik v tlačnem sistemu
4. Para vzorca
5. Majhna konica
6. Tekoči vzorec

Slika 4

Aparatura za določanje krivulje parnega tlaka po metodi s parnotlačno tehtnico

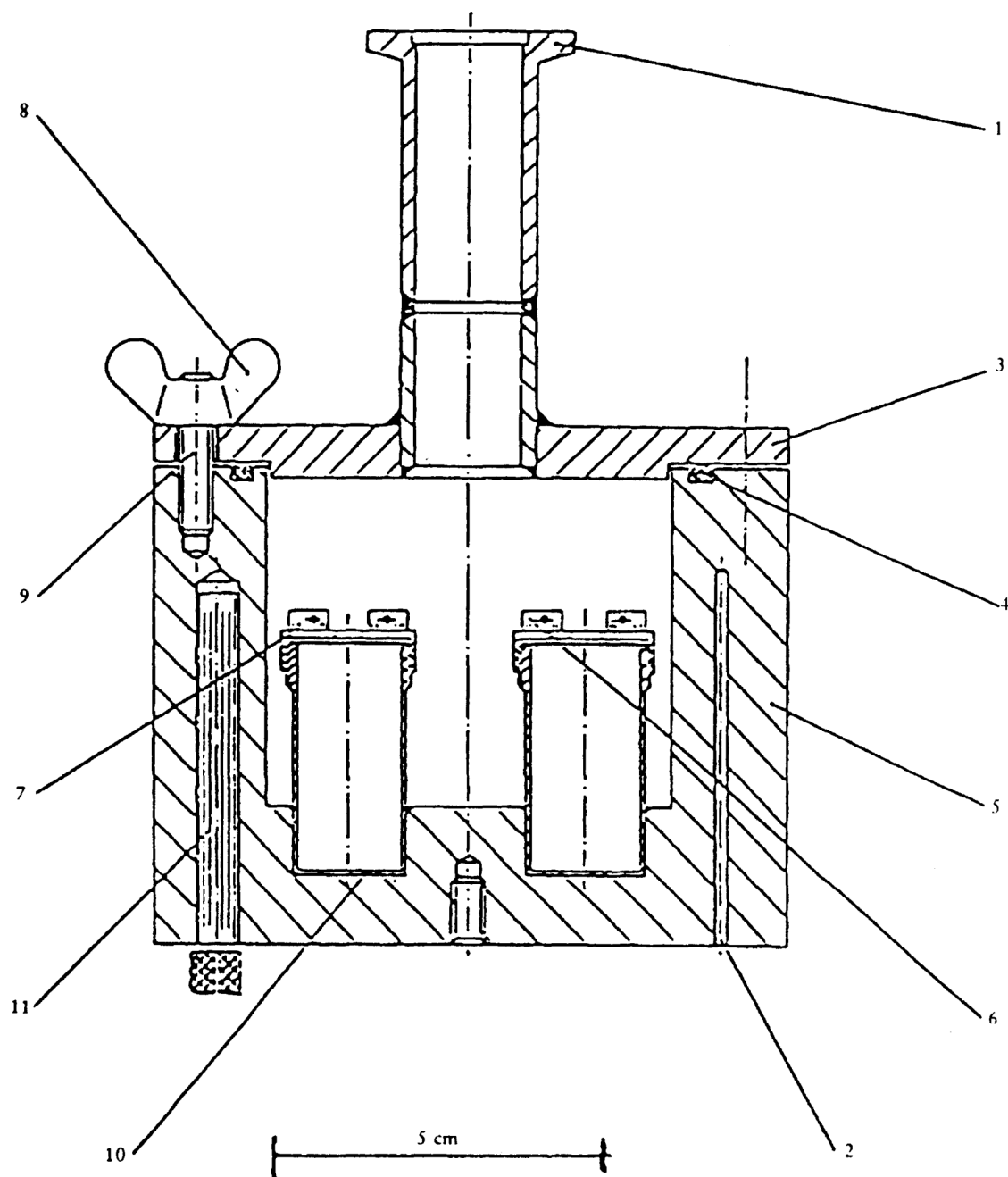


1. Preskusna snov
2. Parna faza s curkom pare
3. Uparjalna peč z vrtljivim dovodom
- 3a. Pokrov peči z odprtino
4. Ogrevanje (hlajenje) peči
5. Merjenje temperature vzorca
6. Hladilna posoda

7. Zaslon
8. Hladilna palica za hladilno posodo
9. Skodelica tehtnice
10. Mikrotehtnica
11. Povezava z zapisovalnikom
12. Vod do vakuumske črpalke

Slika 5

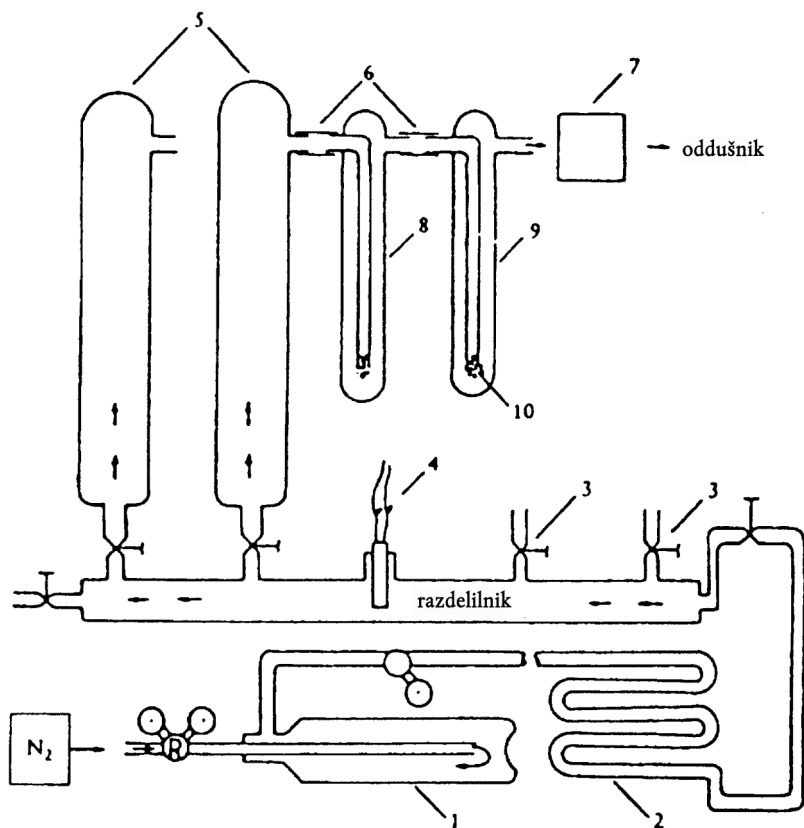
Primer aparature za uparjanje pri nizkem tlaku z efuzijsko metodo, z efuzijsko celico z volumnom 8 cm³



1. Povezava z vakuumom
2. Luknje za platinski uporovni termometer ali sisteme za merjenje in nadzorovanje temperature
3. Pokrov vakuumske posode
4. O-tesnilo
5. Aluminijasta vakuumska posoda
6. Naprava za pritrdjevanje in odstranjevanje efuzijskih celic
7. Navojni pokrov
8. Krilne matice
9. Vijaki
10. Efuzijske celice iz nerjavečega jekla
11. Grelni vložki

Slika 6a

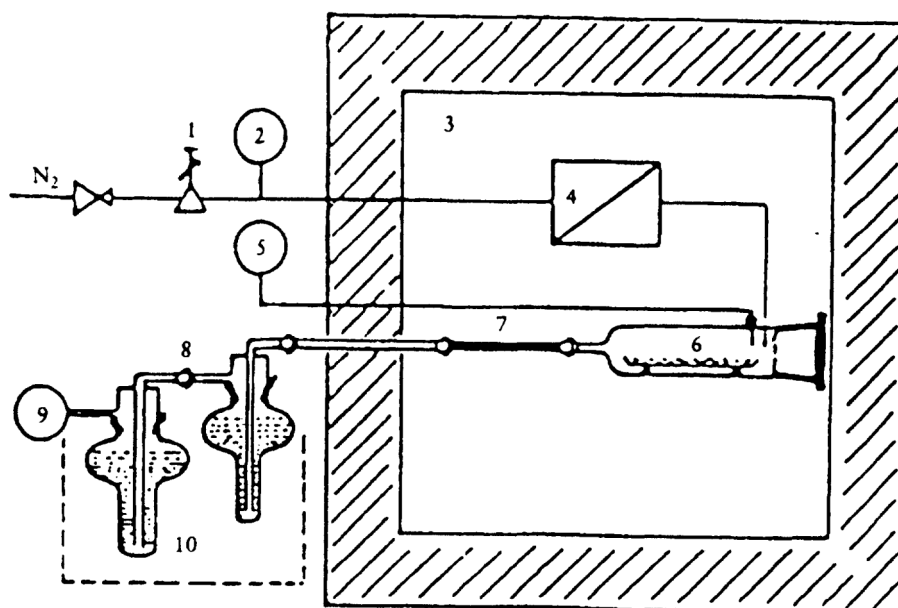
Primer pretočnega sistema za določanje parnega tlaka z metodo nasičenega plina



- 1 = Regulator pretoka
- 2 = Toplotni izmenjevalnik
- 3 = Igelni ventili
- 4 = Senzor relativne vlažnosti
- 5 = Saturacijske kolone
- 6 = PTFE spojke
- 7 = Merilnik pretoka
- 8 = Past (absorbent)
- 9 = Oljna past
- 10 = Kalcinirana cevka za ustvarjanje mehurčkov

Slika 6b

Primer sistema za določanje parnega tlaka z metodo nasičenega plina, pri katerem je za saturacijsko kolono postavljena kapilara

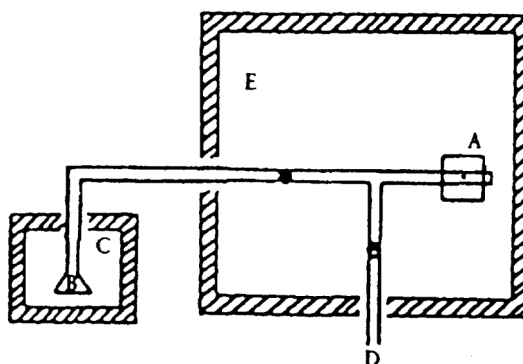


1. Merilnik toplotnega pretoka
2. Manometer
3. Termostatirana komora
4. Termostatirna tuljava za nosilni plin
5. Termometer (Pt 100)

6. Posoda za nasičenje plina
7. Kapilara
8. Absorpcijske posode
9. Plinomer
10. Ohlajena past

Slika 7

Primer postavitve preskusa za rotorsko metodo

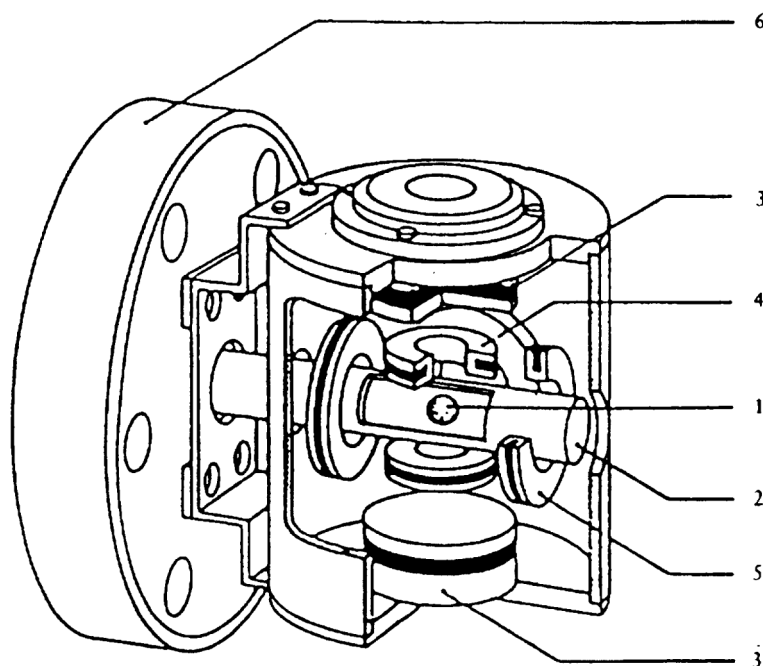


Aparatura za parni tlak

- A. Vrteči rotorski senzor
- B. Celica za vzorec
- C. Termostat
- D. Vakuumska cev (turbo črpalka)
- E. Zračni termostat

Slika 8

Primer vrtečega rotorskega merilnika



1. Kroglica
2. Odzračen cevni podaljšek 6
3. Trajni magnet (2)
4. Tuljava (2) za vertikalno stabilizacijo
5. Vzbujevalna tuljava (4)
6. Vezna prirobnica

A.5 POVRŠINSKA NAPETOST

1. METODA

Opisane metode temeljijo na smernici za preskušanje OECD (1). Temeljna načela so navedena v viru (2).

1.1 UVOD

Opisane metode se uporabljajo za merjenje površinske napetosti vodnih raztopin.

Pred izvajanjem teh preskusov je koristno imeti predhodne informacije o topnosti snovi v vodi, njeni zgradbi, hidrolitskih lastnostih in kritični koncentraciji za tvorbo micel.

Metode, ki sledijo, so uporabne za večino kemijskih snovi, brez kakršnih koli omejitev glede njihove stopnje čistosti.

Merjenje površinske napetosti z metodo tenziometra z obročkom je omejeno na vodne raztopine z dinamično viskoznostjo pod približno 200 mPa s.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Prosto površinsko entalpijo na enoto površine imenujemo površinska napetost.

Površinska napetost se navede v:

N/m (enota SI) ali

mN/m (podenota SI)

1 N/m = 10^3 din/cm

1 mN/m = din/cm v zastarelem sistemu cgs

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

Referenčne snovi, ki zajemajo široko območje površinskih napetosti, so navedene v virih 1 in 3.

1.4 PRINCIP METOD

Metode temeljijo na merjenju največje navpične sile, ki jo je treba uporabiti na zanki ali obročku v stiku s površino preiskovane tekočine v merilni posodici, da bi ga ločili od te površine, ali na ploščici, katere rob se stika s površino, da bi potegnili nastali film navzgor.

Snovi, ki so topne v vodi vsaj pri koncentraciji 1 mg/L, se preskušajo v vodni raztopini pri eni sami koncentraciji.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Natančnost teh metod je večja, kot je to običajno potrebno za okoljsko presojo.

1.6 OPIS METOD

Pripravi se raztopina snovi v destilirani vodi. Koncentracija te raztopine mora biti 90 % koncentracije nasičene raztopine te snovi v vodi; kadar ta koncentracija presega 1 g/L, se za preskušanje uporabi koncentracija 1 g/L. Snovi, katerih topnost v vodi je manjša od 1 mg/L, ni treba preskušati.

1.6.1 **Metoda s ploščico**

Glej ISO 304 in NF T 73-060 (Površinsko aktivne snovi – določanje površinske napetosti z dviganjem tekočinskih filmov).

1.6.2 **Metoda z zanko**

Glej ISO 304 in NF T 73-060 (Površinsko aktivne snovi – določanje površinske napetosti z dviganjem tekočinskih filmov).

1.6.3 **Metoda z obročkom**

Glej ISO 304 in NF T 73-060 (Površinsko aktivne snovi – določanje površinske napetosti z dviganjem tekočinskih filmov).

1.6.4 **Usklajena metoda OECD z obročkom**

1.6.4.1 *Aparatura*

Za to merjenje so primerni na trgu dostopni tenziometri. Sestavljajo jih naslednji deli:

— premična mizica za vzorec,

— sistem za merjenje sile,

— merilno telo (obroček),

— merilna posoda.

1.6.4.1.1 Premična mizica za vzorec

Premična mizica za vzorec se uporablja kot podpora za termostatirano merilno posodo, v kateri je preskusna tekočina. Skupaj s sistemom za merjenje sile je nameščena na stojalu.

1.6.4.1.2 Sistem za merjenje sile

Sistem za merjenje sile (glej sliko) je nad mizico za vzorec. Napaka pri merjenju sile ne sme presegati $\pm 10^{-6}$ N, kar ustreza meji napake $\pm 0,1$ mg pri določanju mase. Merilna skala na trgu dostopnih tenziometrov je v večini primerov umerjena v mN/m, tako da se lahko površinska napetost odčita neposredno v mN/m na 0,1 mN/m točno.

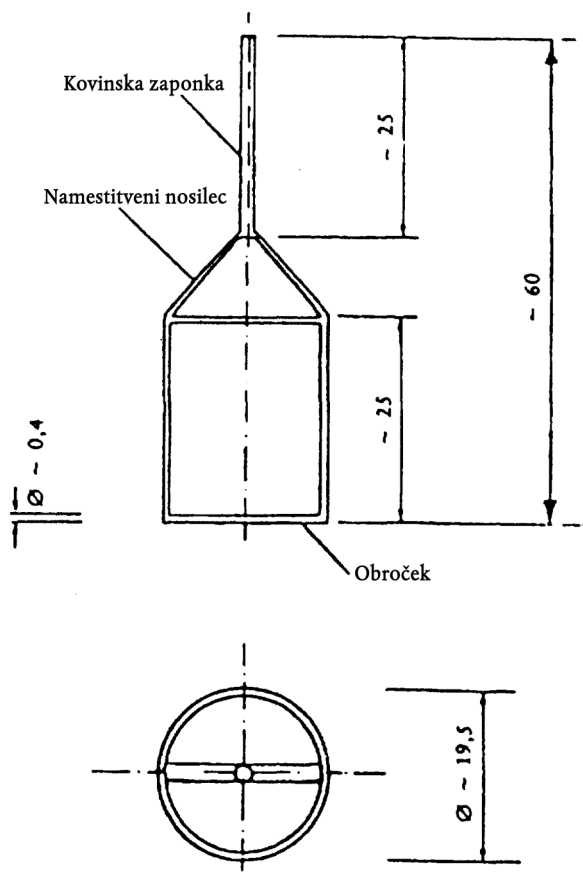
1.6.4.1.3 Merilno telo (obroček)

Obroček je običajno narejen iz platina-iridijeve žice, debele približno 0,4 mm, in s povprečnim obsegom 60 mm. Žičnati obroček visi v vodoravnem položaju s kovinske zaponke in žičnatega namestitvenega nosilca, tako da je povezan s sistemom za merjenje sile (glej sliko).

Slika

Merilno telo

(Vse dimenzije so v milimetrih)



1.6.4.1.4 Merilna posoda

Merilna posoda, v kateri je preskusna raztopina, je termostatisirana steklena posoda. Zasnovana je tako, da med merjenjem temperatura preskusne raztopine in plinske faze nad njeno površino ostane konstantna ter vzorec ne more izhlapeti. Sprejemljive so valjaste steklene posode z notranjim premerom najmanj 45 mm.

1.6.4.2 Priprava aparature

1.6.4.2.1 Čiščenje

Steklene posode se temeljito očistijo. Če je potrebno, se operejo z vročo kromžveplovno kislino in nato z gosto tekočo fosforjevo kislino (83 do 98 masnih % H_3PO_4), temeljito sperejo pod tekočo vodo in nazadnje še z dvakrat destilirano vodo do nevtralne reakcije, nato se posušijo ali splaknejo z delom preskusne tekočine.

Obroček se najprej temeljito splakne z vodo, da se odstranijo vse v vodi topne snovi, nato se za kratek čas potopi v kromžveplovno kislino, opere v dvakrat destilirani vodi do nevtralne reakcije ter na koncu na hitro segreje nad metanolnim plamenom.

Opomba:

Nečistote, ki niso topne ali razgradljive v kromžveplovni ali fosforjevi kislini, na primer silikoni, se odstranijo z ustreznim organskim topilom.

1.6.4.2.2 Umerjanje aparature

Validacija aparature obsega preverjanje ničelne točke in njeno naravno, tako da je omogočeno zanesljivo odčitavanje z instrumenta v mN/m.

Postavitev:

Aparatura se izravna, na primer s pomočjo vodne tehtnice na osnovni plošči tenziometra, z nastavitvijo izravnalnih vijakov na osnovni plošči.

Naravnava ničelne točke:

Po namestitvi obročka na aparaturu in pred potopitvijo v tekočino se tenziometer naravna na ničlo ter preveri, ali je obroček vzporeden s površino tekočine. V ta namen se površina tekočine lahko uporabi kot ogledalo.

Umeritev:

Dejansko umerjanje se lahko opravi po enem od dveh postopkov:

- (a) Z uporabo mase: postopek z uporabo jahačev z znano maso med 0,1 in 1,0 g, postavljenih na obroček. Umeritveni faktor Φ_a , s katerim je treba pomnožiti vse odčitke z instrumenta, se določi po enačbi (1):

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

pri čemer je:

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

m = masa jahača (g)

g = gravitacijski pospešek (981 cm s⁻² na morski višini)

b = povprečni obseg obročka (cm)

σ_a = odčitek tenziometra po namestitvi jahača na obroček (mN/m).

- (b) Z uporabo vode: postopek z uporabo čiste vode, katere površinska napetost pri, na primer, 23 °C je 72,3 mN/m. Ta postopek je hitrejši od masnega umerjanja, vendar vedno obstaja nevarnost, da je površinska napetost vode napačna zaradi sledov onesnaženja s površinsko aktivnimi snovmi.

Umeritveni faktor Φ_b , s katerim je treba pomnožiti vse odčitke z instrumenta, se določi po enačbi (2):

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

pri čemer je:

σ_o = površinska napetost vode, navedena v literaturi (mN/m)

σ_g = izmerjena površinska napetost vode (mN/m)

obe pri isti temperaturi.

1.6.4.3 Priprava vzorcev

Pripravijo se vodne raztopine preskusnih snovi v potrebnih koncentracijah in ne smejo vsebovati nobenih neraztopljenih snovi.

Vzdrževati je treba konstantno temperaturo ($\pm 0,5$ °C) raztopine. Ker se površinska napetost raztopine v merilni posodi spreminja s časom, se izvede več meritev ob različnih časih in izdela krivulja, ki prikazuje površinsko napetost kot funkcijo časa. Ko ni več nadaljnjih sprememb, je doseženo stanje ravnotežja.

Onesnaženje z drugimi snovmi v obliki prahu in plinov moti merjenje. Zato se delo izvaja pod zaščitnim pokrovom.

1.6.5 Preskusni pogoji

Merjenje se opravi pri približno 20 °C, ob vzdrževanju konstantne temperature $\pm 0,5$ °C.

1.6.6 Izvedba preskusa

Merjena raztopina se naliže v dobro očiščeno merilno posodo, pri čemer je treba paziti, da se ne peni, nato se merilna posoda postavi na mizico preskusne aparature. Vrh mizice z merilno posodo se dviga, dokler se obroček ne potopi pod površino merjene raztopine. Nato se vrh mizice postopoma in enakomerno spušča (s hitrostjo približno 0,5 cm/min), da bi se obroček odtrgal od površine, dokler se ne doseže največja sila. Tekoča plast, ki se drži obročka, se od njega ne sme ločiti. Po končani meritvi se obroček spet potopi pod površino in merjenja ponavljajo, dokler se ne doseže konstantna vrednost površinske napetosti. Za vsako meritev se zapiše čas, ki je minil od ulitja tekočine v merilno posodo. Vrednost se odčita pri največji sili, potrebni za odtrganje obročka od površine tekočine.

2. PODATKI

Za izračun površinske napetosti se vrednost, odčitana z aparature v mN/m, najprej pomnoži z umeritvenim faktorjem Φ_a ali Φ_b (odvisno od uporabljenega umeritvenega postopka). Dobljena vrednost je le približna in jo je treba popraviti.

Harkins in Jordan (4) sta empirično določila korekcijske faktorje za vrednosti površinske napetosti, izmerjene z metodo z obročkom, ki so odvisni od dimenzij obročka, gostote tekočine in njene površinske napetosti.

Ker je postopek določanja korekcijskega faktorja za vsako posamezno meritev iz Harkinsonovih in Jordanovih tabel dolgotrajen, se lahko za izračun površinske napetosti vodnih raztopin uporabi poenostavljeni postopek odčitavanja popravljenih vrednosti površinskih napetosti neposredno iz tabele. (Za odčitke med vrednostmi v tabeli se uporabi interpolacija.)

TABELA: POPRAVLJANJE IZMERJENE POVRŠINSKE NAPETOSTI

Le za vodne raztopine, $\rho \approx 1 \text{ g/cm}^3$

R = 9,55 mm (povprečni polmer obročka)

r = 0,185 mm (polmer žice obročka)

Izmerjena vrednost (mN/m)	Popravljen vrednost (mN/m)	
	Umeritev z maso (glej 1.6.4.2.2(a))	Umeritev z vodo (glej 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	—

Ta tabela je bila sestavljena na podlagi Harkins-Jordanovega popravka. Podobna je tabeli iz standarda DIN (DIN 53914) za vodo in vodne raztopine (gostota $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$) in velja za na trgu dostopen obroček z dimenzijami R = 9,55 mm (povprečni polmer obročka) in r = 0,185 mm (polmer žice obročka). V tabeli so popravljene vrednosti za meritve površinske napetosti, opravljene po umeritvi z utežmi ali vodo.

Druga možnost je, da se brez predhodne umeritve površinska napetost izračuna po naslednji enačbi:

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

pri čemer je:

F = sila, izmerjena z dinamometrom, tik preden film počí

R = polmer obročka

f = korekcijski faktor (1)

3. POROČANJE**3.1 POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- uporabljena metoda,
- vrsta uporabljene vode ali raztopine,
- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),
- rezultati merjenja: površinska napetost (odčitek), tako posamezni odčitki kot tudi njihova aritmetična sredina in popravljena aritmetična sredina (upoštevajoč faktor opreme in korekcijsko tabelo),
- koncentracija raztopine,
- temperatura preskusa,
- starost uporabljene raztopine; zlasti čas, pretekel od priprave do meritve raztopine,
- opis časovne odvisnosti površinske napetosti po prenosu raztopine v merilno posodo,
- informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

3.2 RAZLAGA REZULTATOV

Glede na to, da je površinska napetost destilirane vode 72,75 mN/m pri 20 °C, je treba snovi, katerih površinska napetost pri pogojih te metode je manjša od 60 mN/m, šteti za površinsko aktivne snovi.

4. VIRI

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

A.6 TOPNOST V VODI

1. METODA

Opisane metode temeljijo na smernici za preskušanje OECD (1).

1.1 UVOD

Za izvajanje tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o strukturi formuli, parnem tlaku, disociacijski konstanti in hidrolizi (kot funkciji pH) snovi.

Na voljo ni nobene posamezne metode, ki bi zajela celotno območje topnosti v vodi.

Spodaj opisani metodi zajemata celotno območje topnosti, vendar nista primerni za hlapne snovi:

- prva, imenovana „metoda z izpiranjem kolone“, se uporablja za v glavnem čiste snovi z majhno topnostjo ($< 10^{-2}$ gramov na liter), ki so stabilne v vodi,
- druga, imenovana „metoda z bučko“, se uporablja za v glavnem čiste snovi z večjo topnostjo ($> 10^{-2}$ gramov na liter), ki so stabilne v vodi.

Na topnost preskusne snovi v vodi lahko znatno vpliva prisotnost nečistot.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Topnost snovi v vodi določa masna koncentracija nasičene raztopine te snovi v vodi pri določeni temperaturi. Topnost v vodi se izrazi v enotah mase na volumen raztopine. Enota SI je kg/m^3 (lahko se uporabljajo tudi grami na liter).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Z enostavnim predhodnim preskusom je treba določiti približno količino vzorca in čas, ki sta potrebna, da se doseže koncentracija nasičenja.

1.4.1 Metoda z izpiranjem kolone

Ta metoda temelji na izpiranju preskusne snovi z vodo iz mikro-kolone, ki je napolnjena z inertnim pomožnim materialom, kot so steklene kroglice ali pesek, prevlečenim s presežkom preskusne snovi. Topnost v vodi se določi, ko je masna koncentracija eluata konstantna. To se pokaže kot konstantna raven koncentracije v odvisnosti od časa.

1.4.2 Metoda z bučko

Pri tej metodi se snov (trdne snovi je treba uprašiti) raztopi v vodi pri temperaturi, ki je nekoliko višja od temperature preskusa. Ko se doseže nasičenost, se zmes ohladi do temperature preskusa, nato se hrani pri tej temperaturi in meša, dokler se ne vzpostavi ravnotežje. Druga možnost je, da se meritev izvede neposredno pri temperaturi preskusa, če se z ustreznim vzorčenjem zagotovi, da je doseženo ravnotežje nasičenja. Nato se z ustrežno analitsko metodo določi masna koncentracija snovi v vodni raztopini, ki ne sme vsebovati nobenih neraztopljenih delcev.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

1.5.1 **Ponovljivost**

Pri metodi z izpiranjem kolone se lahko doseže ponovljivost < 30 %; pri metodi z bučko je treba doseči ponovljivost < 15 %.

1.5.2 **Občutljivost**

Ta je sicer odvisna od analitske metode, vendar se masna koncentracija lahko določi do najmanj 10^{-6} gramov na liter.

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Preskusni pogoji**

Preskus se po možnosti opravi pri $20 \pm 0,5$ °C. Če se domneva, da je topnost odvisna od temperature (> 3 % na °C), se izvede še pri dveh drugih temperaturah, najmanj 10 °C nad in pod izbrano temperaturo. V tem primeru je treba temperaturo vzdrževati na $\pm 0,1$ °C. Izbrana temperatura mora biti konstantna v vseh bistvenih delih opreme.

1.6.2 **Predhodni preskus**

Približno 0,1 g vzorca (trdne snovi je treba uprašiti) v 10 mL-merilnem valju s steklenim zamaškom se dodajajo vedno večje količine destilirane vode sobne temperature po korakih, prikazanih v spodnji tabeli:

0,1 g topen v „x“ ml vode	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Približna topnost (grami na liter)	> 1 000	1 000 do 200	200 do 100	100 do 50	50 do 10	10 do 1	< 1

Po vsakem dodatku navedene količine vode se zmes 10 minut močno stresa, nato se vizualno preveri, ali so v vzorcu prisotni neraztopljeni delci. Če po dodatku 10 mL vode vzorec ali del vzorca ostane neraztopljen, se preskus ponovi v 100 mL-merilnem valju z večjimi količinami vode. Pri manjši topnosti je lahko čas, potreben za raztopitev snovi, občutno daljši (počakati je treba najmanj 24 h). Približna topnost je navedena v tabeli pod isto količino dodane vode, pri kateri se je vzorec popolnoma raztopil. Če je snov še vedno navidez netopna, je treba počakati več kot 24 h (največ 96 h) ali pa jo je treba še dodatno razredčiti, da se ugotovi, ali je treba uporabiti metodo za določanje topnosti z izpiranjem kolone ali metodo z bučko.

1.6.3 **Metoda z izpiranjem kolone**1.6.3.1 *Nosilec, topilo in eluent*

Nosilec pri metodi z izpiranjem kolone mora biti inerten. Možna materiala sta steklene kroglice in pesek. Za nanašanje preskusne snovi na nosilec je treba uporabiti ustrezno analitsko čisto hlapno topilo. Kot eluent je treba uporabiti vodo, dvakrat destilirano v stekleni ali kremenčevi aparaturi.

Opomba:

Ne sme se uporabiti voda neposredno iz organskega ionskega izmenjevalca.

1.6.3.2 *Nanašanje na nosilec*

Približno 600 mg nosilca se stehta in prenese v 50 mL-bučko z okroglim dnom.

Ustrezna stehtana količina preskusne snovi se raztopi v izbranem topilu. Primerna količina te raztopine se doda nosilcu. Topilo mora popolnoma upareti, npr. v rotavaporju, sicer se nosilec ne nasiti z vodo zaradi porazdelitvenih učinkov na površini nosilca.

Nanašanje na nosilec lahko povzroči težave (napačne rezultate), če se preskusna snov poseda kot olje ali drugačna kristalinična faza. Take težave je treba preučiti s poskusi in o tem poročati.

Nosilec z naneseno preskusno snovjo se pusti namakati približno dve uri v približno 5 mL vode, nato se suspenzija prenese v mikrokolono. Druga možnost je, da se v mikrokolono, napolnjeno z vodo, natrese nosilec z naneseno preskusno snovjo in nato pusti približno dve uri, da se vzpostavi ravnotežje.

Preskusni postopek:

Izpiranje snovi iz nosilca se lahko izvede na enega od naslednjih dveh načinov:

- z recirkulacijsko črpalko (glej sliko 1),
- z nivojsko posodo (glej sliko 4).

1.6.3.3 *Metoda z izpiranjem kolone z recirkulacijsko črpalko*

Aparatura

Shematski prikaz značilnega sistema je predstavljen na sliki 1. Ustrezna mikrokolona je prikazana na sliki 2, čeprav je primerna kakršnakoli velikost, pod pogojem, da izpolnjuje merila glede ponovljivosti in občutljivosti. Kolona mora biti dovolj velika, da je volumen predkolone najmanj petkrat tolikšen kot volumen polnitve in da sprejme najmanj pet vzorcev. Velikost kolone se lahko tudi zmanjša, če se uporabi nadomestno topilo, ki nadomesti prvotnih pet volumnov polnitve, odstranjenih z nečistotami.

Kolono je treba povezati z recirkulacijsko črpalko, s pretočno zmogljivostjo približno 25 mL/h. Črpalka se poveže s politetrafluoroetilenskimi (PTFE) in/ali steklenimi priključki. Ko sta kolona in črpalka sestavljeni, morata omogočati vzorčenje eluenta in vzpostavljane ravnotežja v predkoloni pri atmosferskem tlaku. Material v koloni podpira majhen (5 mm) zamašek iz steklene volne, ki služi tudi za filtracijo delcev. Recirkulacijska črpalka je lahko na primer peristaltična črpalka ali membranska črpalka (treba je paziti, da material cevi ne povzroči onesnaženja in/ali absorpcije).

Merilni postopek

Tok se požene skozi kolono. Priporočljivo je, da se uporabi pretok približno 25 mL/h (to ustreza približno 10 volumnov polnitve za opisano kolono). Prvih pet (najmanj) volumnov polnitve se zavrže, da se odstranijo v vodi topne nečistote. Zatam naj vodna črpalka deluje do vzpostavitve ravnotežja, ki je opredeljeno s petimi zaporednimi vzorci, katerih koncentracije se med seboj ne razlikujejo za več kot $\pm 30\%$. Časovni intervali med temi vzorci morajo ustrezati prehodu najmanj 10 volumnov polnitve.

1.6.3.4 *Metoda z izpiranjem kolone z nivojsko posodo*

Aparatura (glej slike 4 in 3)

Nivojska posoda: Nivojska posoda se priključi s spojko iz brušenega stekla, ki je povezana s PTFE cevjo. Priporočljivo je, da se uporabi pretok približno 25 mL/h. Zberejo se zaporedne frakcije eluata in analizirajo z izbrano metodo.

Merilni postopek

Za določitev topnosti v vodi se uporabijo frakcije eluata iz srednjega območja, kjer so koncentracije konstantne ($\pm 30\%$) pri najmanj petih zaporednih frakcijah.

V obeh primerih (pri uporabi recirkulacijske črpalke ali nivojske posode) je treba opraviti drugo meritev pri polovičnem pretoku prve meritve. Če so rezultati obeh meritev skladni, je preskus zadovoljiv; če je pri manjšem pretoku navidezna topnost večja, je treba nadaljevati z razpolavljanjem pretoka, dokler ni topnost enaka pri dveh zaporednih meritvah.

V obeh primerih (pri uporabi recirkulacijske črpalke ali nivojske posode) je treba preveriti, ali frakcije vsebujejo koloidne snovi, na kar kaže prisotnost Tyndallovega efekta (razpršitev svetlobe). Prisotnost takšnih delcev razveljavi rezultate in preskus je treba ponoviti z izboljšano filtracijo v koloni.

Zapisati je treba pH vsakega vzorca. Drugo meritev je treba izvesti pri enaki temperaturi.

1.6.4 **Metoda z bučko**

1.6.4.1 *Aparatura*

Za metodo z bučko je potreben naslednji material:

- običajna laboratorijska steklovina in instrumentarij,
- naprava, primerna za mešanje raztopin pri nadzorovanih konstantnih temperaturah,
- centrifuga (po možnosti termostatisirana), če je potrebna za emulzije, in
- oprema za analitsko določanje.

1.6.4.2 *Merilni postopek*

S predhodnim preskusom se oceni količina materiala, potrebna za nasičenje želenega volumna vode. Volumen potrebne vode bo odvisen od analitske metode in območja topnosti. V tri steklene posode s steklenimi zamaški (npr. centrifugirke, bučke) se zatehta po petkrat tolikšna količina snovi, kot je bila določena zgoraj. V vsako posodo se doda izbrani volumen vode, nato se posode tesno zamašijo. Vsebina zaprtih posod se meša pri 30 °C. (Uporabi se naprava za stresanje ali mešanje, ki je zmožna delovati pri konstantni temperaturi, npr. magnetno mešanje v termostatisirani vodni kopeli). Po enem dnevu se ena od posod odstrani ter se 24 ur hrani na temperaturi preskusa in občasno pretrese, da se ponovno vzpostavi ravnotežje. Nato se vsebina posode centrifugira pri temperaturi preskusa in z ustrezno analitsko metodo se določi koncentracija preskusne snovi v bistri vodni fazi. S preostalima posodama se ravna podobno po začetnem vzpostavljanju ravnotežja pri 30 °C, ki naj traja pri eni dva in pri drugi tri dni. Če se dobljene koncentracije vsaj pri zadnjih dveh posodah ujemajo s predpisano ponovljivostjo, je preskus zadovoljiv. Če se pri posodah 1, 2 in 3 kaže težnja k naraščanju vrednosti, je treba celoten preskus ponoviti, pri čemer se uporabi daljši čas za vzpostavljanje ravnotežja.

Merilni postopek se lahko izvede tudi brez predinkubacije pri 30 °C. Da se oceni hitrost vzpostavljanja ravnotežja nasičenja, se vzorči, dokler čas mešanja nič več ne vpliva na koncentracijo preskusne raztopine.

Zapisati je treba pH vsakega vzorca.

1.6.5 **Analiza**

Za takšna določanja je zaželena uporaba analitske metode, ki je najbolj primerna za posamezno snov, ker lahko majhne količine topnih nečistot povzročijo velike napake pri izmerjeni topnosti. Primeri takšnih metod so: plinska ali tekočinska kromatografija, titracijske metode, fotometrične metode in voltmetrične metode.

2. PODATKI**2.1 METODA Z IZPIRANJEM KOLONE**

Za vsako ponovitev je treba izračunati srednjo vrednost najmanj petih zaporednih vzorcev, vzetih pri točki nasičenosti, in standardna deviacija. Rezultati se navedejo v enotah mase na volumen raztopine.

Primerjajo se srednje vrednosti, izračunane pri dveh preskusih pri različnih pretokih, in ponovljivost mora biti pod 30 %.

2.2 METODA Z BUČKO

Navesti je treba posamezne rezultate za vsako od treh bučk, nato se izračuna srednja vrednost tistih rezultatov, ki se štejejo za konstantne (ponovljivost pod 15 %), in se navede v enotah mase na volumen raztopine. Kadar je topnost zelo velika (> 100 gramov na liter) bo morda treba enote mase ponovno pretvoriti v volumnske enote z uporabo gostote.

3. POROČANJE**3.1 METODA Z IZPIRANJEM KOLONE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- rezultati predhodnega preskusa;
- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote);
- posamezne koncentracije, pretok in pH za vsak vzorec;
- srednje vrednosti in standardna deviacija za najmanj pet vzorcev, vzetih pri točki nasičenosti vsake ponovitve;
- povprečje dveh zaporednih, sprejemljivih ponovitev;
- temperatura vode med procesom nasičenja;
- uporabljena analitska metoda;
- vrsta uporabljenega nosilca;
- nanašanje na nosilec;
- uporabljeno topilo;
- dokazi o kakršnikoli kemijski nestabilnosti snovi med preskusom in uporabljena metoda;
- vse informacije, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

3.2 METODA Z BUČKO

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- rezultati predhodnega preskusa,
- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistot),
- posamezne analitske določitve in povprečje, če je bilo za eno bučko določenih več vrednosti,
- pH vsakega vzorca,

- povprečne vrednosti različnih bučk, pri katerih so bili rezultati skladni,
- temperatura preskusa,
- uporabljena analitska metoda,
- dokazi o kakršnikoli kemijski nestabilnosti snovi med preskusom in uporabljena metoda,
- vse informacije, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

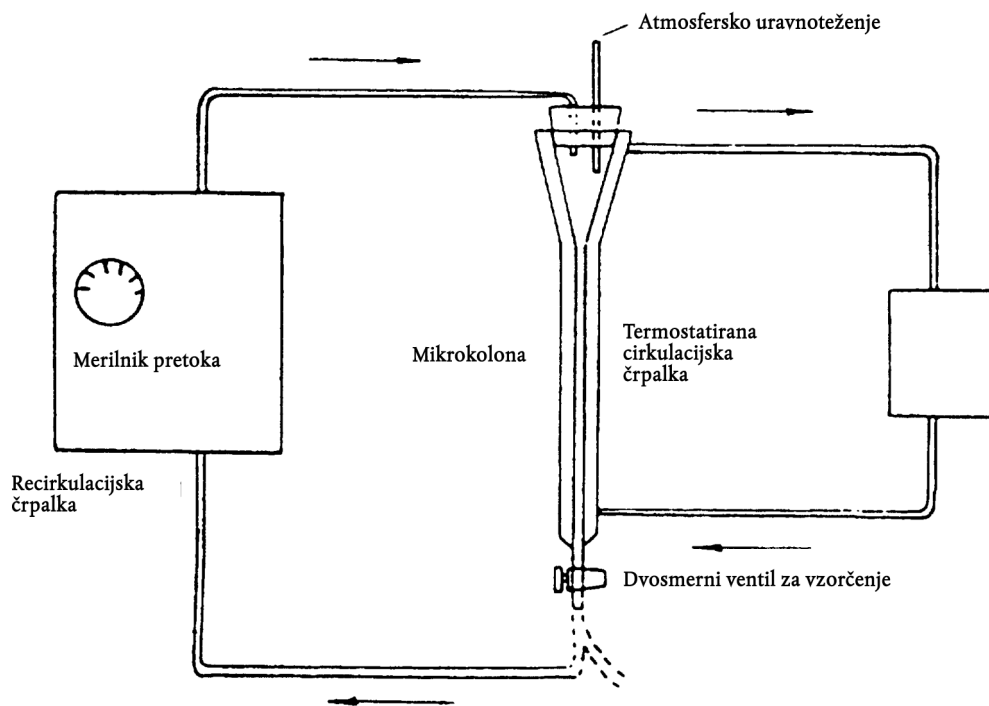
4.

VIRI

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

*Dodatek***Slika 1**

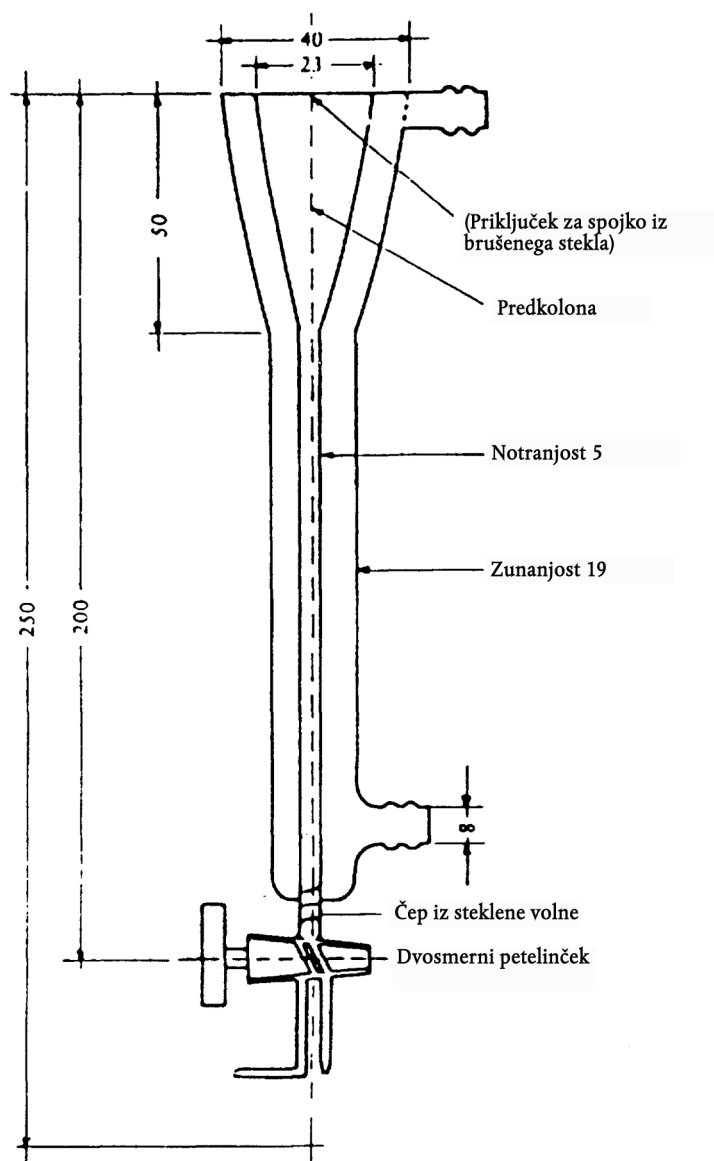
Metoda z izpiranjem kolone z recirkulacijsko črpalko



Slika 2

Značilna mikro-kolona

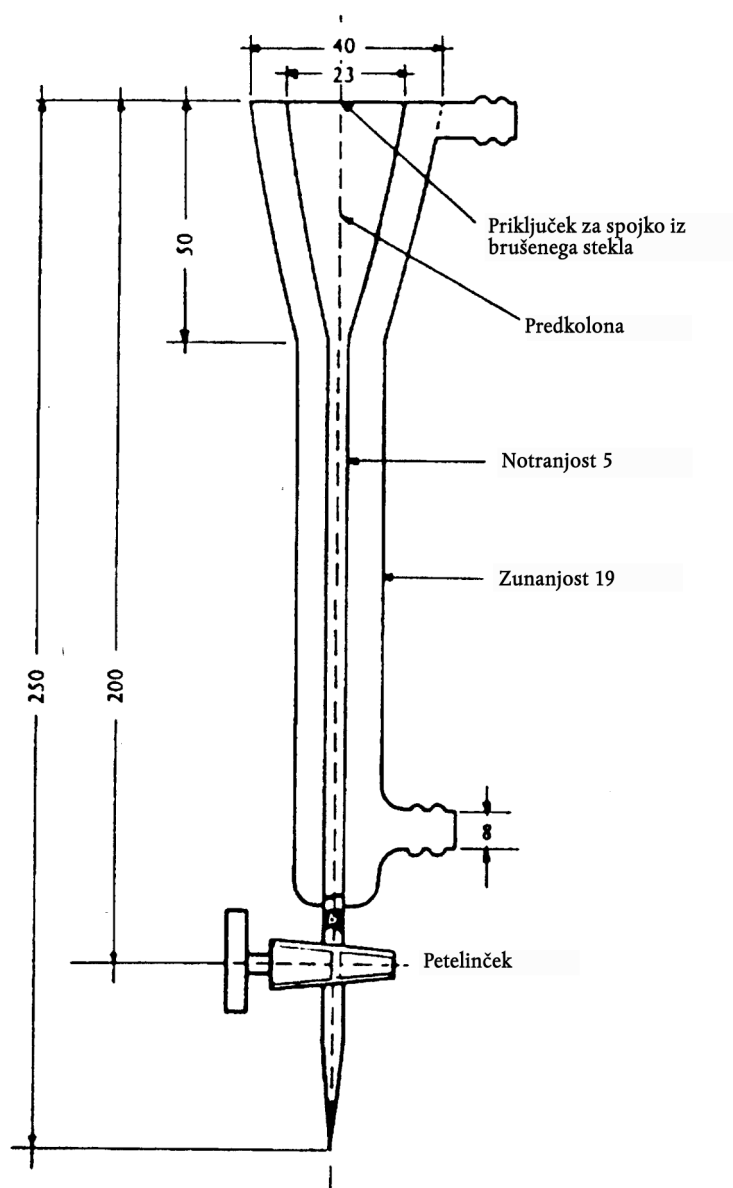
(Vse dimenzije so v milimetrih)



Slika 3

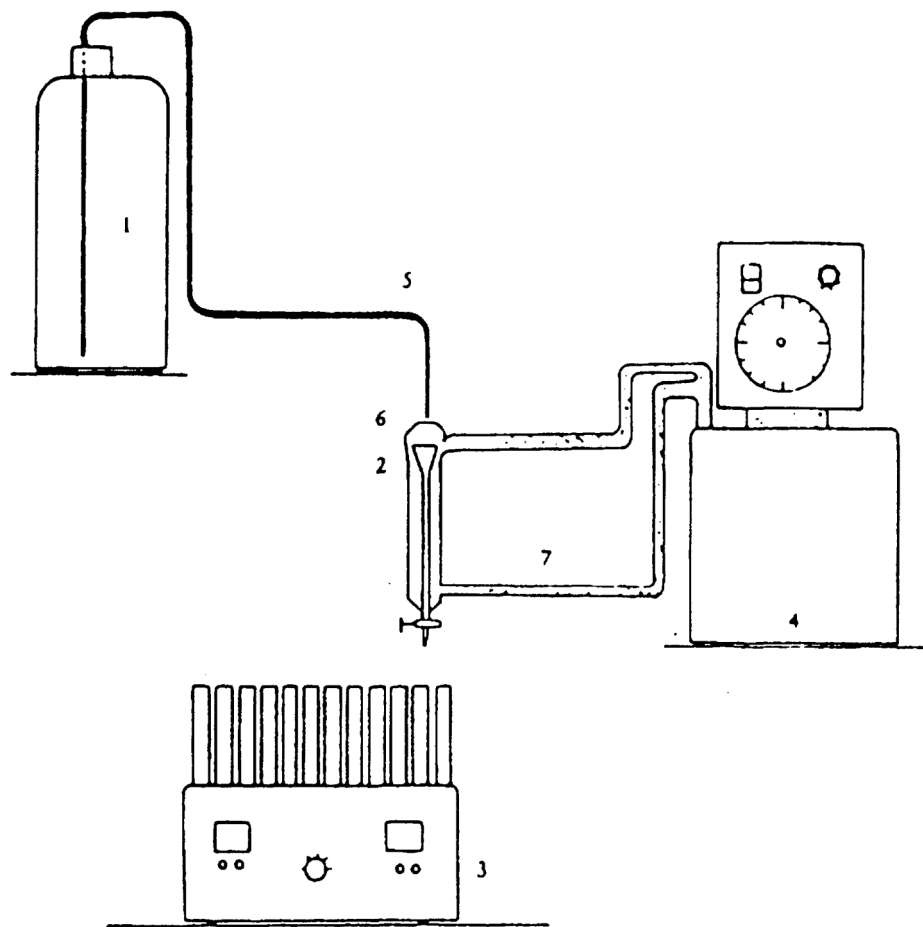
Značilna mikrokolona

(Vse dimenzije so v milimetrih)



Slika 4

Metoda z izpiranjem kolone z nivojsko posodo



- 1 = Nivojska posoda (npr. 2,5 litrska steklenica)
- 2 = Kolona (glej sliko 3)
- 3 = Zbiralnik frakcij
- 4 = Termostat
- 5 = Teflonska cev
- 6 = Spojka iz brušenega stekla
- 7 = Dovod vode (med termostatom in kolono, notranji premer: približno 8 mm)

A.8 PORAZDELITVENI KOEFICIENT

1. METODA

Opisana metoda „stresanja bučke“ temelji na smernici za preskušanje OECD (1).

1.1 UVOD

Za izvajanje tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o strukturi formuli, disociacijski konstanti, topnosti v vodi, hidrolizi, topnosti v n-oktanolu in površinski napetosti snovi.

Pri snoveh, ki tvorijo ione, je treba meritve opraviti le z njihovo neionizirano obliko (prosta kislina ali prosta baza), pridobljeno z uporabo ustreznega pufrja s pH, ki je najmanj eno enoto pod (prosta kislina) ali nad (prosta baza) pK.

Ta preskusna metoda vključuje dva ločena postopka: metodo stresanja bučke in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Prvi se uporablja, kadar je vrednost $\log P_{ow}$ (opredelitve glej spodaj) v območju od -2 do 4, in drugi, kadar je v območju od 0 do 6. Pred izvedbo katerega koli postopka, je treba pridobiti predhodno oceno porazdelitvenega koeficienta.

Metoda stresanja bučke se uporablja samo za v glavnem čiste snovi, topne v vodi in n-oktanolu. Ni uporabna za površinsko aktivne snovi (za katere je treba navesti izračunano vrednost ali oceno na podlagi topnosti v n-oktanolu in topnosti v vodi).

Metoda HPLC ni uporabna za močne kisline in baze, kovinske komplekse, površinsko aktivne snovi ali snovi, ki reagirajo z eluentom. Za te snovi je treba navesti izračunano vrednost ali oceno na podlagi topnosti v n-oktanolu in topnosti v vodi.

Metoda HPLC je manj občutljiva za prisotnost nečistot v preskusni snovi kakor metoda stresanja bučke. Vendar v nekaterih primerih lahko nečistote otežijo razlago rezultatov, ker postane določitev vrha negotova. Za zmesi, ki dajo nedoločen pas, se navedejo zgornja in spodnja meja $\log P$.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Porazdelitveni koeficient (P) je opredeljen kot razmerje ravnotežnih koncentracij (c_i) raztopljenih snovi v dvofaznem sistemu, sestavljenem iz dveh topil, ki se v glavnem ne mešata. V primeru n-oktanolu in vode:

$$P_{ow} = \frac{C_{n\text{-Oktanol}}}{C_{\text{Voda}}}$$

Porazdelitveni koeficient (P) je torej količnik dveh koncentracij in se ponavadi navede v obliki logaritma z osnovo 10 ($\log P$).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Metoda stresanja bučke

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

Metoda HPLC

Za določitev soodvisnosti med rezultati meritev s HPLC za snov in njeno vrednostjo P, je treba izdelati umeritveno krivuljo $\log P$ v odvisnosti od kromatografskih podatkov z uporabo najmanj 6 referenčnih točk. Uporabnik sam izbere primerne referenčne snovi. Kadar je le mogoče, naj ima najmanj ena referenčna snov večji in ena manjši P_{ow} kot preskusna snov. Za vrednosti $\log P$, manjše od 4, umeritev lahko temelji na podatkih, dobljenih z metodo stresanja bučke. Za vrednosti $\log P$, večje od 4, umeritev lahko temelji na validiranih podatkih iz literature, če so skladni z izračunanimi vrednostmi. Za večjo točnost je priporočljivo izbrati referenčne snovi, ki so strukturno sorodne preskusni snovi.

Na voljo so izčrpni sezname vrednosti $\log P_{pw}$ za mnoge skupine kemikalij (2)(3). Če ni podatkov o porazdelitvenih koeficientih strukturno sorodnih snovi, se lahko uporabi bolj splošna umeritev z drugimi referenčnimi snovmi.

Seznam priporočenih referenčnih snovi in njihovih vrednosti P_{ow} je v dodatku 2.

1.4 PRINCIP METODE

1.4.1 Metoda stresanja bučke

Za določitev porazdelitvenega koeficienta je treba vzpostaviti ravnotežje med vsemi medsebojno delujočimi komponentami sistema in določiti koncentraciji snovi, raztopljene v dveh fazah. Študija literature o tej temi kaže, da se v ta namen lahko uporabi več različnih tehnik, npr. temeljito mešanje dveh faz, ki mu sledi njuno ločevanje, da se ugotovi ravnotežna koncentracija preiskovane snovi.

1.4.2 Metoda HPLC

HPLC se izvaja z analitskimi kolonami, napolnjenimi z na trgu dostopno trdno fazo, ki vsebuje dolge verige ogljikovodikov (npr. C_8 , C_{18}), vezane na silicijev dioksid. Snovi, injicirane v tako kolono, potujejo vzdolž nje z različnimi hitrostmi, zaradi različne stopnje porazdelitve med mobilno fazo in stacionarno fazo ogljikovodikov. Zmesi snovi se eluirajo v vrstnem redu po hidrofobnosti, pri čemer se prve eluirajo vodotopne snovi in zadnje tiste, topne v olju, sorazmerno z njihovim porazdelitvenim koeficientom ogljikovodik/voda. To omogoča določitev razmerja med retenzijskim časom v taki koloni (z reverzno fazo) in porazdelitvenim koeficientom n-oktanol/voda. Porazdelitveni koeficient se določi s sklepanjem iz faktorja kapacitete k , opisanega z enačbo:

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

pri čemer je t_R = retenzijski čas preskusne snovi in t_0 = povprečni čas, ki ga potrebuje molekula topila, da pride skozi kolono (mrtvi čas).

Kvantitativna analiza ni potrebna, treba je določiti le elucijske čase.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

1.5.1 Ponovljivost

Metoda stresanja bučke

Da se zagotovi točnost porazdelitvenega koeficienta, je treba izvesti po dve vzporedni meritvi pri treh različnih preskusnih pogojih, pri čemer se lahko spreminjata količina navedene snovi in razmerje volumnov topil. Določene vrednosti porazdelitvenega koeficienta, izražene kot logaritmi z osnovo 10, morajo biti v območju $\pm 0,3$ log enot.

Metoda HPLC

Za povečanje zanesljivosti meritve, je treba izvesti dve vzporedni določitvi. Vrednosti $\log P$, izpeljane iz posameznih meritev, naj bodo v območju $\pm 0,1$ enot log.

1.5.2 Občutljivost

Metoda stresanja bučke

Merilno območje metode je določeno z mejo detekcije analitskega postopka. Ta bi morala omogočiti določitev vrednosti $\log P_{ow}$ v območju od -2 do 4 (občasno, kadar so izpolnjeni pogoji, se to območje lahko razširi do vrednosti $\log P_{ow} = 5$), kadar koncentracija topljenca v nobeni fazi ni večja od $0,01$ mola na liter.

Metoda HPLC

Metoda HPLC omogoča ocenjevanje porazdelitvenega koeficienta v območju $\log P_{ow}$ od 0 do 6 .

Navadno se porazdelitveni koeficient lahko oceni do ± 1 enote $\log$ vrednosti, dobljene z metodo stresanja bučke. Značilne soodvisnosti so navedene v literaturi (4)(5)(6)(7)(8). Običajno se lahko doseže večja točnost, kadar korelacijske krivulje temeljijo na strukturno sorodnih referenčnih snoveh (9).

1.5.3 Specifičnost

Metoda stresanja bučke

Nernstov porazdelitveni zakon velja samo pri konstantnih temperaturi, tlaku in pH za razredčene raztopine. Nanaša se le na čiste snovi, porazdeljene med dve čisti topili. Če se v eni ali obeh fazah istočasno pojavi več različnih topljencev, lahko to vpliva na rezultate.

Disociacija ali asociacija raztopljenih molekul lahko povzroči odstopanje od Nernstovega porazdelitvenega zakona. Na takšna odstopanja pokaže dejstvo, da postane porazdelitveni koeficient odvisen od koncentracije raztopine.

Ker ta preskusna metoda zajema več ravnotežij, se ne sme uporabljati za snovi, ki jih je mogoče ionizirati, ne da bi se upošteval popravek. Pri takšnih snoveh je treba presoditi o uporabi pufrskih raztopin namesto vode; pH pufra se mora najmanj za eno enoto pH razlikovati od pK_a snovi, pri čemer je treba upoštevati pomen tega pH za okolje.

1.6 OPIS METODE

1.6.1 Predhodna ocena porazdelitvenega koeficienta

Porazdelitveni koeficient se po možnosti oceni z računsko metodo (glej dodatek 1) ali, kadar je primerno, iz razmerja topnosti preskusne snovi v čistih topilih (10).

1.6.2 Metoda stresanja bučke

1.6.2.1 Priprava

n-Oktanol: določitev porazdelitvenega koeficienta je treba opraviti z zelo čistimi analitskimi reagenti.

Voda: treba je uporabiti vodo, destilirano ali dvakrat destilirano v stekleni ali kremenčevi aparaturi. Za snovi, ki jih je mogoče ionizirati, se uporabijo pufri, če je to upravičeno.

Opomba:

Ne sme se uporabiti voda, vzeta neposredno iz ionskega izmenjevalca.

1.6.2.1.1 Predhodno nasičenje topil

Preden se določi porazdelitveni koeficient, se topili medsebojno nasitita s stresanjem pri temperaturi preskusa. To se najlaže izvede tako, da se dve veliki standardni steklenici zelo čistega analitskega n-oktanola ali vode, v vsaki od katerih je zadostna količina drugega topila, stresata 24 ur na mehanskem stresalniku, nato se pustita stati tako dolgo, da se fazi ločita in se vzpostavi stanje nasičenosti.

1.6.2.1.2 Priprava na preskus

Celoten volumen dvofaznega sistema naj bo tolikšen, da skoraj v celoti napolni preskusno posodo. To bo pomagalo preprečiti izgubo topila zaradi izhlapevanja. Volumsko razmerje in količine snovi, ki se bodo uporabili, se določijo glede na:

- predhodno oceno porazdelitvenega koeficienta (glej zgoraj),
- najmanjšo količino preskusne snovi, potrebno za analitski postopek, in
- omejitvijo največje koncentracije v katerikoli fazi na 0,01 mola na liter.

Opravijo se trije preskusi. Pri prvem se uporabi izračunano volumsko razmerje n-oktanol/voda; pri drugem se to razmerje deli z dve; pri tretjem pa se pomnoži z dve (npr. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3 Preskusna snov

Pripravi se osnovna raztopina v n-oktanolu, predhodno nasičenem z vodo. Preden se ta osnovna raztopina uporabi za določanje porazdelitvenega koeficienta, je treba natančno določiti njeno koncentracijo. Ta raztopina se hrani v pogojih, ki zagotavljajo njeno stabilnost.

1.6.2.2 Preskusni pogoji

Temperatura preskusa mora biti konstantna (± 1 °C) in v območju med 20 in 25 °C.

1.6.2.3 Merilni postopek

1.6.2.3.1 Vzpostavitev porazdelitvenega ravnotežja

Za vsakega od preskusnih pogojev je treba pripraviti po dve preskusni posodi, ki vsebujeta potrebni, točno odmerjeni količini obeh topil ter potrebno količino osnovne raztopine.

Faze n-oktanola se merijo z volumni. Preskusne posode je treba bodisi namestiti na ustrezne stresalnike ali jih stresati ročno. Kadar se uporabljajo centrifugirke, je priporočena metoda hitro obračanje centrifugirke za 180° okrog njene prečne osi, tako da se morebitni ujeti zrak dvigne skozi obe fazi. Izkušnje so pokazale, da 50 takšnih obratov običajno zadostuje za vzpostavitev porazdelitvenega ravnotežja. Za večjo gotovost pa se priporoča 100 obratov v petih minutah.

1.6.2.3.2 Ločitev faz

Kadar je potrebno, se fazi ločita s centrifugiranjem. To se opravi z laboratorijsko centrifugo, v kateri se vzdržuje sobna temperatura, če pa se uporabi centrifuga brez termostata, se centrifugirke pustijo najmanj eno uro pred analizo pri temperaturi preskusa, da se vzpostavi ravnotežje.

1.6.2.4 Analiza

Za določitev porazdelitvenega koeficienta je treba določiti koncentracijo preskusne snovi v obeh fazah. To se lahko stori tako, da se vzame alikvot vsake izmed dveh faz iz vsake epruvete za vsak preskusni pogoj in se analizira po izbranem postopku. Izračunati je treba skupno količino snovi v obeh fazah in jo primerjati s prvotno vneseno količino snovi.

Vzorec vodne faze je treba odvzeti s postopkom, ki kar se da zmanjša tveganje, da bi se v njem pojavile sledi n-oktanola: v ta namen se lahko uporabi steklena brizga z zamenljivo iglo. Brizga se najprej delno napolni z zrakom. Ta zrak se počasi iztiska med potiskanjem igle skozi plast n-oktanola. V brizgo se vsrka primeren volumen vodne faze. Brizga se hitro potegne iz raztopine in igla se odstrani. Vsebina brizge se nato lahko uporabi kot vodni vzorec. Koncentracija v obeh ločenih fazah se po možnosti določi z metodo, ki je najbolj primerna za posamezno snov. Primeri morebitnih ustreznih analitskih metod so:

- fotometrične metode,
- plinska kromatografija,
- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.

1.6.3 Metoda HPLC

1.6.3.1 Priprava

Aparatura

Potrebujemo tekočinski kromatograf, opremljen s črpalko s stabilnim pretokom in ustreznim detektorjem. Priporoča se uporaba injektorja z injicirnimi zankami. Prisotnost polarnih skupin v stacionarni fazi lahko resno zmanjša učinkovitost kolone HPLC. Zato mora imeti stacionarne faze le minimalni odstotek polarnih skupin (11). Lahko se uporabijo na trgu dostopna polnila za mikro kolone z reverzno fazo ali že pripravljene kolone. Med injektorskim sistemom in analitsko kolono se lahko namesti predkolona.

Mobilna faza

Topilo za eluiranje se pripravi iz metanola za HPLC in vode za HPLC ter pred uporabo razplini. Izvesti je treba izokratsko izpiranje. Uporabiti je treba razmerja metanol/voda z deležem vode najmanj 25 %. Običajno je zmes metanol/voda v razmerju 3:1 (v/v) zadovoljiva za eluiranje snovi z log P 6 v eni uri pri pretoku 1 mL/min. Pri snoveh z večjo vrednostjo log P bo morda treba skrajšati elucijski čas (in elucijski čas referenčnih snovi) z zmanjšanjem polarnosti mobilne faze ali podaljšanjem kolone.

Snovi z zelo majhno topnostjo v n-oktanolu dajo pri metodi HPLC velikokrat nenormalno majhne vrednosti log P_{ow} ; vrhove takih snovi včasih spremlja fronta topila. To se verjetno zgodi zato, ker je porazdelitveni proces prepočasen, da bi dosegla ravnotežje v času, ki je običajno potreben za ločitev s HPLC. V takem primeru je lahko učinkovit način za doseglo zanesljive vrednosti zmanjšanje pretoka in/ali razmerja metanol/voda.

Preskusne in referenčne snovi morajo biti topne v mobilni fazi v zadostnih koncentracijah, da je omogočena njihova detekcija. Dodatki v zmesi metanol/voda se lahko uporabijo le izjemoma, saj spremenijo lastnosti kolone. Za kromatograme z dodatki je obvezna uporaba ločene kolone enake vrste. Če zmes metanol/voda ni primerna, se lahko uporabijo druge zmesi organsko topilo/voda, npr. etanol/voda ali acetonitril/voda.

Pri snoveh, ki disociirajo na ione, je pH eluenta zelo pomemben. Mora biti v delovnem območju pH kolone, ki je običajno med 2 in 8. Priporoča se dodajanje pufru. Preprečiti je treba obarjanje soli in razpadanje kolone, ki lahko nastane pri nekaterih zmesih organske faze in pufru. Meritve HPLC s stacionarnimi fazami z osnovo iz silicijevega dioksida in pH nad 8 niso priporočljive, saj uporaba alkalne mobilne faze lahko povzroči hitro poslabšanje učinkovitosti kolone.

Topljenci

Referenčne snovi morajo biti čim bolj čiste. Snovi, ki se bodo uporabile za preskus ali umerjanje, se po možnosti raztopijo v mobilni fazi.

Preskusni pogoji

Med merjenjem se temperatura ne sme spreminjati za več kot ± 2 K.

1.6.3.2 Merjenje

Izračun mrtvega časa t_0

Mrtvi čas t_0 se lahko določi z uporabo bodisi homolognih vrst (npr. n-alkilmetil-ketoni) bodisi z organskimi spojinami, ki se ne zadržijo v koloni (npr. tiocetna ali formamid). Za izračun mrtvega časa t_0 z uporabo homolognih vrst se injicira niz najmanj sedmih spojin homologne vrste in določijo njihovi retenzijski časi. Izriše se krivulja dobljenih retenzijskih časov $t_{r(nc+1)}$ v odvisnosti od $t_{r(nc)}$ ter določita presek, a, in naklon, b, regresijske enačbe:

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

(n_c = število ogljikovih atomov). Mrtvi čas t_0 je določen z:

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

Umeritvena krivulja

Naslednji korak je izdelava krivulje vrednosti $\log k$ v odvisnosti od $\log P$ za ustrezne referenčne snovi. V praksi to pomeni, da se hkrati injicira 5 do 10 standardnih referenčnih snovi, katerih $\log P$ je blizu pričakovanega območja, in določijo retenzijski časi, po možnosti na integratorju zapisovalniku, povezanem z detektorjem. Izračunajo se ustrezni logaritmi faktorjev kapacitete, $\log k$, in nariše se krivulja $\log k$ v odvisnosti od $\log P$, določenega z metodo stresanja bučke. Umerjanje se izvaja redno, najmanj enkrat dnevno, tako da se lahko upoštevajo morebitne spremembe v delovanju kolone.

Določanje faktorja kapacitete preskusne snovi

Preskusna snov se injicira v najmanjšo možno količino mobilne faze. Določi se retenzijski čas (z dvema vzporednima meritvama), ki omogoča izračun faktorja kapacitete k . Iz korelacijske krivulje za referenčne snovi se lahko interpolira porazdelitveni koeficient preskusne snovi. Pri zelo majhnih in zelo velikih porazdelitvenih koeficientih je potrebna ekstrapolacija. V takih primerih je treba še posebej upoštevati meje zaupanja regresijske premice.

2. PODATKI

Metoda stresanja bučke

Zanesljivost določenih vrednosti P je mogoče preskusiti s primerjanjem srednjih vrednosti vzporednih določitev s skupno srednjo vrednostjo.

3. POROČANJE

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),
- kadar metode niso uporabne (npr. pri površinsko aktivnih snoveh), je treba navesti izračunano vrednost ali oceno na podlagi topnosti v n-oktanolu in topnosti v vodi,
- vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

Za metodo stresanja bučke:

- rezultat predhodne ocene, če je bila opravljena,
- temperatura določanja,
- podatki o uporabljenih analitskih postopkih za določanje koncentracij,
- čas in hitrost centrifugiranja, če je bilo uporabljeno,
- izmerjene koncentracije v obeh fazah za vsako določitev (to pomeni, da bo v poročilu skupaj 12 koncentracij),

- masa preskusne snovi, volumen vsake faze, uporabljene v vsaki posodi, in izračunana skupna količina preskusne snovi v vsaki fazi po vzpostavitvi ravnotežja,
- izračunane vrednosti porazdelitvenega koeficienta (P) in njihova srednja vrednost za vsak sklop preskusnih pogojev ter srednja vrednost vseh določitev. Če karkoli kaže na odvisnost porazdelitvenega koeficienta od koncentracije, je to treba vključiti v poročilo,
- standardna deviacija posameznih vrednosti P od njihove srednje vrednosti,
- srednja vrednost P vseh določitev mora biti izražena tudi z logaritmom (osnova 10),
- izračunana teoretična vrednost P_{ow} , če je bila določena ali če je izmerjena vrednost $>10^4$,
- pH uporabljene vode in vodne faze med preskusom,
- če se uporabijo pufri, utemeljitev uporabe pufrov namesto vode, sestavo, koncentracijo in pH pufrov ter pH vodne faze pred in po preskusu.

Za metodo HPLC:

- rezultat predhodne ocene, če je bila opravljena,
- preskusna in referenčne snovi ter njihova čistost,
- temperaturno območje določitev,
- pH, pri katerem so bile opravljene določitve,
- podatki o analitski koloni in predkoloni, mobilni fazi ter načinu detekcije,
- podatki o retenziji in vrednosti log P iz literature za referenčne snovi, uporabljene za umerjanje,
- podatki o prilagojeni regresijski premici (log k v odvisnosti od log P),
- podatki o povprečni retenziji in interpolirana vrednost log P za preskusno snov,
- opis opreme in delovnih pogojev,
- elucijski diagrami,
- količine preskusne in referenčnih snovi, vnesene v kolono,
- mrtvi čas in kako je bil izmerjen.

4. **VIRI**

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

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

Dodatek 1

Računske/ocenjevalne metode

UVOD

Splošni uvod v računske metode, podatki in primeri so na voljo v *Priročniku metod za ocenjevanje kemijskih lastnosti* (a).

Izračunane vrednosti P_{ow} se lahko uporabijo:

- za izbiro primerne preskusne metode (območje metode stresanja bučke: $\log P_{ow}$: -2 do 4, območje HPLC: $\log P_{ow}$: 0 do 6),
- za izbiro ustreznih pogojev preskusa (npr. referenčne snovi za postopke HPLC, volumsko razmerje n-oktanol/voda za metodo stresanja bučke),
- kot notranje laboratorijsko preverjanje za odkrivanje možnih napak preskusa,
- za določitev ocene vrednosti P_{ow} , kadar preskusnih metod ni mogoče uporabiti zaradi tehničnih razlogov.

OCENJEVALNA METODA

Predhodna ocena porazdelitvenega koeficienta

Vrednost porazdelitvenega koeficienta se lahko oceni na podlagi topnosti preskusne snovi v čistih topilih:

Za to:

$$P_{ocena} = \frac{\text{nasičenje } c_{n\text{-oktanol}}}{\text{nasičenje } c_{voda}}$$

RAČUNSKÉ METODE

Princip računskih metod

Vse računske metode temeljijo na formalni fragmentaciji molekule na ustrezne podstrukture, za katere so znane zanesljive vrednosti povečanja $\log P_{ow}$. Vrednost $\log P_{ow}$ cele molekule se nato izračuna kot vsota ustreznih vrednosti za njene fragmente, kateri se prišteje vsota členov korekcije za intramolekularne interakcije.

Na voljo so sezname konstant fragmentov in členov korekcije (b)(c)(d)(e). Nekateri se redno dopolnjujejo (b).

Merila kakovosti

Na splošno se zanesljivost računske metode manjša z večjo kompleksnostjo preučevane snovi. Pri enostavnih molekulah z majhno molsko maso in eno ali dvema funkcionalnima skupinama se lahko pričakuje odstopanje za 0,1 do 0,3 enote $\log P_{ow}$ med rezultati različnih metod fragmentacije in izmerjeno vrednostjo. Pri bolj kompleksnih molekulah je območje napake lahko večje. To je odvisno od zanesljivosti in razpoložljivosti konstant fragmentov ter od zmožnosti prepoznavanja intramolekularnih interakcij (npr. vodikove vezi) in pravilne uporabe členov korekcije (manj težavno z računalniško programsko opremo CLOGP-3) (b). Pri snoveh, ki se lahko ionizirajo, je pomembno, da se pravilno upošteva naboj ali stopnja ionizacije.

Računski postopki

Hanschova π -metoda

Izvirna konstanta hidrofobnih substituentov, π , ki jo je vpeljal Fujita et al. (f), je opredeljena z:

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

pri čemer je $P_{ow}(\text{PhX})$ porazdelitveni koeficient aromatskega derivata in $P_{ow}(\text{PhH})$ porazdelitveni koeficient izhodne spojine

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

Glede na svojo opredelitev je π -metoda uporabna predvsem za aromatsko substitucijo. Pripravljene so bile tabele π -vrednosti za veliko število substituentov (b)(c)(d). Uporabljajo se za izračunavanje $\log P_{ow}$ za aromatske molekule ali podstrukture.

Rekkerjeva metoda

Po Rekkerju (g) se vrednost $\log P_{ow}$ izračuna na naslednji način:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_i (\text{členi interakcije})$$

kjer f_i predstavlja konstante za različne fragmente molekule in a_i pogostnost njihovega pojavljanja v preiskovani molekuli. Členi korekcije se lahko izrazijo kot skupni zmnožek ene same konstante C_m (tako imenovane „magične konstante“). Konstante fragmentov f_i in C_m so bile določene na podlagi seznama 1054 vrednosti P_{ow} , dobljenih s poskusi (825 spojin), z uporabo multiple regresijske analize (c)(h). Členi interakcije se določijo v skladu z določenimi pravili, opisanimi v literaturi (e)(h)(i).

Hansch-Leova metoda

Po Hanschu in Leu (c) se vrednost $\log P_{ow}$ izračuna po enačbi:

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

kjer f_i predstavlja konstante različnih fragmentov molekule, F_j člene korekcije ter a_i in b_j ustrezne pogostnosti pojavljanja. Z metodo poskusa in napake ter z izpeljavo iz vrednosti P_{ow} , dobljenih s poskusi, sta bila sestavljena seznam vrednosti za atome in skupine ter seznam členov korekcije F_j (tako imenovanih „faktorjev“). Členi korekcije so bili razvrščeni v več različnih razredov (a)(c). Upoštevanje vseh pravil in členov korekcije je sorazmerno zapleteno in dolgotrajno. Razviti so bili programski paketi (b).

Kombinirana metoda

Izračunavanje $\log P_{ow}$ kompleksnih molekul se lahko znatno izboljša, če se molekula razdeli na večje podstrukture, za katere so na voljo zanesljive vrednosti $\log P_{ow}$, bodisi iz tabel (b)(c) bodisi iz lastnih meritev. Taki fragmenti (npr. heterocikli, antrakinon, azobenzen) se nato lahko kombinirajo s Hanschovimi π -vrednostmi ali Rekkejevimi ali Leovimi konstantami fragmentov.

Opombe

- (i) Računske metode se lahko za delno ali popolnoma ionizirane snovi uporabijo le, kadar je mogoče upoštevati potrebne korekcijske faktorje.
- (ii) Če se lahko predpostavlja, da so intramolekularne vodikove vezi, je treba prišteti ustrezne člene korekcije (pribl. + 0,6 do + 1,0 enot $\log P_{ow}$) (a). Znaki prisotnosti takih vezi se lahko pridobijo iz stereo modelov ali spektroskopskih podatkov o molekuli.
- (ii) Če je možnih več tautomernih oblik, mora izračun temeljiti na najbolj verjetni obliki.
- (iv) Pozorno je treba spremljati spremembe seznamov konstant fragmentov.

Poročilo

Kadar se uporabijo računske/ocenjevalne metode, se v poročilo o preskusu, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- opis snovi (zmes, nečistote itd.),
- znaki kakršne koli možne intramolekularne vodikove vezi, disociacije, naboja in vseh drugih neobičajnih učinkov (npr. tautomerija),
- opis računske metode,
- identifikacija podatkovne baze ali vir,
- posebnosti izbire fragmentov,
- izčrpno dokumentacijo izračuna.

LITERATURA

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

Dodatek 2

Priporočene referenčne snovi za metodo HPLC

Št.	Referenčna snov	log p_{ow}	pKa
1	2-Butanon	0,3	
2	4-Acetilpiridin	0,5	
3	Anilin	0,9	
4	Acetanilid	1,0	
5	Benzilalkohol	1,1	
6	p-Metoksifenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoksiocetna kislina	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitril	1,6	
11	Fenilacetonitril	1,6	
12	4-Metilbenzil alkohol	1,6	
13	Acetofenon	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-Nitrobenzojska kislina	1,8	pKa = 3,47
16	4-Kloroanilin	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzen	1,9	
18	Cimetov alkohol	1,9	
19	Benzojska kislina	1,9	pKa = 4,19
20	p-Krezol	1,9	pKa = 10,17
21	Cinamska kislina	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anizol	2,1	
23	Metilbenzoat	2,1	
24	Benzen	2,1	
25	3-Metilbenzojska kislina	2,4	pKa = 4,27
26	4-Klorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	Trikloroetilen	2,4	
28	Atrazin	2,6	
29	Etilbenzoat	2,6	
30	2,6-Diklorobenzonitril	2,6	
31	3-Klorobenzojska kislina	2,7	pKa = 3,82
32	Toluen	2,7	
33	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Dikloroanilin	2,8	
35	Klorobenzen	2,8	
36	Alil-fenileter	2,9	
37	Bromobenzen	3,0	
38	Etilbenzen	3,2	
39	Benzofenon	3,2	
40	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Timol	3,3	
42	1,4-Diklorobenzen	3,4	
43	Difenilamin	3,4	pKa = 0,79
44	Naftalen	3,6	
45	Fenilbenzoat	3,6	
46	Izopropilbenzen	3,7	
47	2,4,6-Triklorofenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenil	4,0	
49	Benzilbenzoat	4,0	
50	2,4-Dinitro-6-sek-butilfenol	4,1	
51	1,2,4-Triklorobenzen	4,2	
52	Dodekanojska kislina	4,2	
53	Difenileter	4,2	
54	n-Butilbenzen	4,5	
55	Fenantren	4,5	
56	Fluoroanten	4,7	
57	Dibenzil	4,8	
58	2,6-Difenilpiridin	4,9	
59	Trifenilamin	5,7	
60	DDT	6,2	
Druge referenčne snovi za majhne vrednosti log P_{ow}			
1	Nikotinska kislina	- 0,07	

A.9 PLAMENIŠČE

1. METODA

1.1 UVOD

Pred izvajanjem tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o vnetljivosti snovi. Preskusni postopek se lahko uporablja za tekoče snovi, katerih hlapje je mogoče prižgati z viri vžiga. Preskusne metode, naštetje v tem besedilu, so zanesljive samo za območja plamenišč, navedena pri posameznih metodah.

Pri izbiri metode je treba upoštevati možnost kemičnih reakcij med snovjo in posodo za vzorec.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Plamenišče je najnižja temperatura, popravljena glede na tlak 101,325 kPa, pri kateri tekočina razvije hlapje, pri pogojih, opredeljenih v preskusni metodi, v takšni količini, da se v preskusni posodi tvori vnetljiva zmes hlapov in zraka.

Enote: °C

$$t = T - 273,15$$

(t v °C in T v K)

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

1.4 PRINCIP METODE

Snov se da v preskusno posodo in segreje ali ohladi do temperature preskusa v skladu s postopkom, opisanim v posamezni preskusni metodi. S poskušanjem vžiga se ugotavlja, ali vzorec vzplamti pri temperaturi preskusa ali ne.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

1.5.1 Ponovljivost

Ponovljivost se spreminja glede na območje plamenišč in uporabljeno preskusno metodo; največ 2 °C.

1.5.2 Občutljivost

Občutljivost je odvisna od uporabljene preskusne metode.

1.5.3 Specifičnost

Specifičnost nekaterih preskusnih metod je omejena na določena območja plamenišč in odvisna od podatkov o snovi (npr. velika viskoznost).

1.6 OPIS METODE

1.6.1 Priprave

Vzorec preskusne snovi se vnese v preskusno aparaturu v skladu z 1.6.3.1 in/ali 1.6.3.2.

Zaradi varnosti se priporoča, da se pri energetsko bogatih ali strupenih snoveh uporabi metoda, pri kateri je vzorec majhen, pribl. 2 cm³.

1.6.2 Preskusni pogoji

Aparaturo je treba postaviti na mesto, kjer ni prepiha, če je to v skladu z varnostjo.

1.6.3 Izvedba preskusa**1.6.3.1 Ravnotežna metoda i**

Glej ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2 Neravnotežna metoda

Aparatura Abel:

Glej BS 2000 del 170, NF M07-011, NF T66-009.

Aparatura Abel-Pensky:

Glej EN 57, DIN 51755 del 1 (za temperature od 5 do 65 °C), DIN 51755 del 2 (za temperature pod 5 °C), NF M07-036.

Aparatura Tag:

Glej ASTM D 56.

Aparatura Pensky-Martens:

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

Opombe:

Kadar je plamenišče, določeno z neravnotežno metodo iz 1.6.3.2, enako 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C ali 55 ± 2 °C, je treba to vrednost potrditi z ravnotežno metodo z uporabo iste aparature.

Za prijavo se lahko uporabijo le metode, s katerimi je mogoče določiti plamenišče.

Za določitev plamenišča viskoznih tekočin (barve, gume in podobno), ki vsebujejo topila, se lahko uporabijo samo aparature in preskusne metode, primerne za določanje plamenišča viskoznih tekočin.

Glej ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213, del 1.

2. PODATKI**3. POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),
- navesti je treba uporabljeno metodo in kakršna koli možna odstopanja,
- rezultati in vse dodatne opombe, ki so pomembne za razlago rezultatov.

4. VIRI

Jih ni.

A.10 VNETLJIVOST (TRDNE SNOVI)**1. METODA****1.1 UVOD**

Pred izvajanjem tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o morebitnih eksplozivnih lastnostih snovi.

Ta preskus je treba uporabljati samo za prašnate, granularne ali pastozne snovi.

Šteje se, da so lahko vnetljive samo snovi, katerih hitrost gorenja presega neko mejno vrednost, zato da ne bi bile mednje vključene vse snovi, ki jih je mogoče prižgati, ampak le tiste, ki gorijo hitro, ali tiste, katerih način gorenja je kakorkoli posebej nevaren.

Posebej je nevarno, če se žarenje širi preko kovinskega prahu, zaradi težav pri gašenju. Kovinski prah se šteje za lahko vnetljivega, če omogoča razširjenje žarenja po celi masi v določenem času.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Čas gorenja izražen v sekundah.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Niso določene.

1.4 PRINCIP METODE

Snov se oblikuje v neprekinjen trak ali pas prahu, dolg približno 250 mm, in opravi se predhodni presejalni preskus, da se ugotovi, ali se ob vžigu s plinskim plamenom gorenje širi s plamenom ali tlenjem. Če se v določenem času gorenje razširi čez 200 mm pasu, se opravi popoln preskus za določanje hitrosti gorenja.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Niso navedena.

1.6 OPIS METODE**1.6.1 Predhodni presejalni preskus**

Snov se oblikuje v neprekinjen trak ali pas prahu, približno 250 mm dolg, 20 mm širok in 10 mm visok, na negorljivi, neporozni in toplotno slabo prevodni osnovni plošči.

K enemu koncu pasu prahu se približa vroč plamen plinskega gorilnika (premer najmanj 5 mm), dokler se prah ne vname ali za najmanj 2 minuti (5 minut pri prahu iz kovin ali kovinskih zlitin). Zapiše se, ali se gorenje razširi vzdolž 200 mm pasu v 4 minutah preskusa (ali 40 minutah pri kovinskem prahu). Če se snov ne vname in se gorenje v 4 minutah (ali 40 minutah) trajanja preskusa ne razširi ne s plamenom ne s tlenjem vzdolž 200 mm pasu prahu, se šteje, da snov ni lahko vnetljiva, in nadaljnje preskušanje ni potrebno. Če se gorenje razširi po snovi do 200 mm dolžine pasu prahu v manj kot 4 minutah, ali manj kot 40 minutah pri kovinskem prahu, je treba izvesti spodaj opisani postopek (točka 1.6.2 in naslednje).

1.6.2 Preskus hitrosti gorenja

1.6.2.1 Priprava

Prašnate ali granularne snovi se narahlo natresejo v kalup, dolg 250 mm, s trikotnim prečnim prerezom z notranjo višino 10 mm in širino 20 mm. Na obe vzdolžni stranici kalupa je pritrjena kovinska plošča, kot stranska pregrada, ki sega 2 mm nad gornji rob trikotnega prečnega prereza (slika). Nato se kalup trikrat spusti z višine 2 cm na trdo podlago. Če je potrebno, se kalup dopolni. Nato se stranski pregradi odstraniti in presežek snovi postrga stran. Na vrh kalupa se položi plošča iz negorljivega, neporoznega in toplotno slabo prevodnega materiala, nato se cela priprava obrne za 180° in kalup odstrani.

Pastozne snovi se nanesejo na negorljivo, neporozno in toplotno slabo prevodno osnovno ploščo v obliki 250 mm dolgega valja s prečnim prerezom približno 1 cm².

1.6.2.2 Preskusni pogoji

V primeru snovi, občutljivih na vlago, je treba preskus opraviti čim prej po odstranitvi snovi iz vsebnika.

1.6.2.3 Izvedba preskusa

Kupček se namesti v digestorij, prečno na tok zraka.

Hitrost zraka mora biti zadostna, da dim ne uhaja v laboratorij, in se med preskusom ne sme spreminjati. Okrog aparature je treba namestiti zaslon, za zaščito pred prepihom.

Z vročim plamenom plinskega gorilnika (s premerom najmanj 5 mm) se prižge en konec kupčka. Ko kupček zgori do dolžine 80 mm, se izmeri hitrost gorenja naslednjih 100 mm. Preskus se izvede šestkrat, vsakokrat s čisto, hladno ploščo, razen če se že prej dobi pozitiven rezultat.

2. PODATKI

Za vrednotenje sta pomembna čas gorenja iz predhodnega presejalnega preskusa (1.6.1) in najmanjši čas gorenja v do šestih preskusih (1.6.2.3).

3. POROČANJE

3.1 POROČILO O PRESKUSU

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),
- opis preskusne snovi, njeno agregatno stanje vključno z vsebnostjo vlage,
- rezultati predhodnega presejalnega preskusa in preskusa hitrosti gorenja, če je bil opravljen,
- vse dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

3.2 RAZLAGA REZULTATA

Prašnate, granularne ali pastozne snovi se štejejo za lahko vnetljive, če je čas gorenja v katerem koli od preskusov, opravljenih v skladu s preskusnim postopkom, opisanim v 1.6.2, manj kot 45 sekund. Prah kovin ali kovinskih zlitin se šteje za lahko vnetljivega, če ga je mogoče prižgati in se plamen ali območje reakcije razširi po celotnem vzorcu v 10 minutah ali manj.

4. VIRI

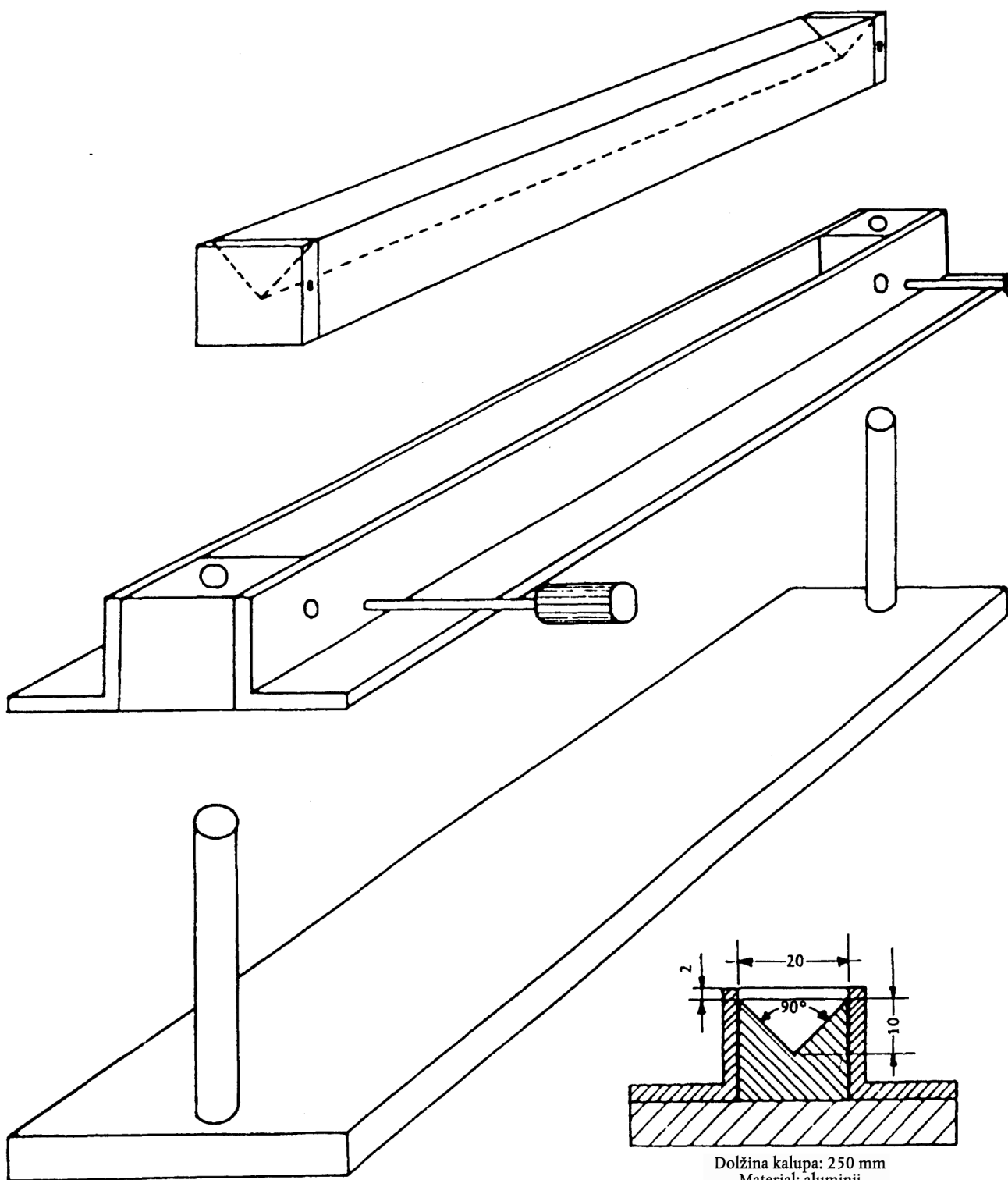
- 1) NF T 20-042 (SEPT 85). *Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.*

Dodatek

Slika

Kalup in pripomočki za pripravo kupčka

(Vse dimenzije so v milimetrih)

Dolžina kalupa: 250 mm
Material: aluminij

A.11 VNETLJIVOST (PLINI)**1. METODA****1.1 UVOD**

Ta metoda omogoča ugotavljanje, ali so plini, zmešani z zrakom, pri sobni temperaturi (ca. 20 °C) in atmosferskem tlaku vnetljivi, in če so, v katerem območju koncentracij. Zmesi preskušane plina z zrakom naraščajočih koncentracij se izpostavi električni iskri, nato se opazuje, ali pride do vžiga.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Območje vnetljivosti je območje koncentracije med spodnjo in zgornjo mejo eksplozivnosti. Zgornja in spodnja meja eksplozivnosti sta tisti meji koncentracije vnetljivega plina v zmesi z zrakom, pri katerih se plamen ne širi.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Niso določene.

1.4 PRINCIP METODE

Koncentracija plina v zraku se postopoma zvišuje in zmes se vsakokrat izpostavi električni iskri.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Niso navedena.

1.6 OPIS METODE**1.6.1 Aparatura**

Preskusna posoda je pokončni stekleni valj z notranjim premerom najmanj 50 mm in višino najmanj 300 mm. Vžigalni elektrodi sta med seboj oddaljeni 3 do 5 mm in nameščeni 60 mm nad dnom valja. Valj je opremljen z odprtino za razbremenitev tlaka. Aparaturo je treba zaščiti z zaslonom, da se omeji morebitna škoda zaradi eksplozije.

Kot vir vžiga se uporabi indukcijska iskra, ki traja 0,5 s in jo proizvede visoko napetostni transformator z izhodno napetostjo od 10 do 15 kV (največja vhodna moč 300 W). Primer primerne aparature je opisan v viru (2).

1.6.2 Preskusni pogoji

Preskus je treba izvajati pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

1.6.3 Izvedba preskusa

Z uporabo dozirne črpalke se v stekleni valj potisne znana koncentracija plina v zraku. Skozi zmes se pošlje iskra, nato se opazuje, ali se plamen loči od vira vžiga in neodvisno širi ali ne. Postopoma se povečuje koncentracija plina, vsakokrat za 1 volumnski %, do pojava vžiga, kakor je opisan zgoraj.

Če kemijska struktura plina kaže, da bi bil lahko nevnetljiv, in se lahko izračuna sestava stehiometrične zmesi z zrakom, je treba preskusiti le zmesi v območju od 10 % pod do 10 % nad stehiometrično sestavo, v intervalih po 1 %.

2. **PODATKI**

Pojav širjenja plamena je edini relevantni podatek za določitev te lastnosti.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),
- opis uporabljene aparature skupaj z dimenzijami,
- temperatura, pri kateri je bil opravljen preskus,
- preskušene koncentracije in dobljeni rezultati,
- rezultat preskusa: nevnetljiv plin ali lahko vnetljiv plin,
- če se ugotovi, da je plin nevnetljiv, je treba navesti območje koncentracij, v katerem je bil preskušen v intervalih po 1 %,
- vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov.

4. **VIRI**

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

A.12 VNETLJIVOST (STIK Z VODO)**1. METODA****1.1 UVOD**

Ta preskusna metoda se lahko uporablja za ugotavljanje, ali se zaradi reakcije snovi ob stiku z vodo ali vlažnim zrakom razvije nevarna količina plina ali plinov, ki so morda lahko vnetljivi.

Preskusna metoda se lahko uporablja za trdne in tekoče snovi. Ta metoda ni primerna za snovi, ki se v stiku z zrakom spontano vnamejo.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Lahko vnetljivo: snovi, ki v stiku z vodo ali vlažnim zrakom razvijejo nevarne količine lahko vnetljivih plinov s hitrostjo najmanj 1 liter/kg na uro.

1.3 PRINCIP METODE

Snov se preskusi v skladu s spodaj opisanim zaporedjem faz; če pri katerikoli fazi pride do vžiga, nadaljnje preskušanje ni potrebno. Če je znano, da snov z vodo ne reagira burno, se preskušanje začne s fazo 4 (1.3.4).

1.3.1 Faza 1

Preskusna snov se da v kadičko z destilirano vodo pri 20 °C, nato se zapiše, ali se razviti plin vname ali ne.

1.3.2 Faza 2

Preskusna snov se da na filtrirni papir, ki plava na površini destilirane vode pri 20 °C v posodici, nato se zapiše, ali se razviti plin vname ali ne. Edini namen filtrirnega papirja je obdržati snov na enem mestu, da se poveča verjetnost vžiga.

1.3.3 Faza 3

Preskusna snov se oblikuje v približno 2 cm visok kupček s premerom približno 3 cm. Na kupček se kane nekaj kapljic vode, nato se zapiše, ali se razviti plin vname ali ne.

1.3.4 Faza 4

Preskusna snov se zmeša z destilirano vodo pri 20 °C, nato se sedem ur v enournih presledkih meri hitrost razvijanja plina. Če je hitrost razvijanja plina po sedmih urah neenakomerna ali naraščajoča, je treba čas merjenja podaljšati na največ pet dni. Preskus se lahko prekine, če hitrost ob katerem koli času preseže 1 liter/kg na uro.

1.4 REFERENČNE SNOVI

Niso določene.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Niso navedena.

1.6 OPIS METOD

1.6.1 **Faza 1**1.6.1.1 *Preskusni pogoji*

Preskus se izvaja pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

1.6.1.2 *Izvedba preskusa*

Majhna količina (približno 2 mm v premeru) preskusne snovi se da v kadičko z destilirano vodo. Zapisati je treba, (i) ali se razvije kakršenkoli plin in (ii) ali se ta plin vname. Če se plin vname, nadaljnje preskušanje snovi ni več potrebno, saj se snov obravnava kot nevarna.

1.6.2 **Faza 2**1.6.2.1 *Aparatura*

Filtrirni papir se plosko položi na površino destilirane vode v kakršnikoli ustrezni posodi, npr. izparilnici s premerom 100 mm.

1.6.2.2 *Preskusni pogoji*

Preskus se izvaja pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

1.6.2.3 *Izvedba preskusa*

Majhna količina preskusne snovi (približno 2 mm v premeru) se da na sredino filtrirnega papirja. Zapisati je treba, (i) ali se razvije kakršenkoli plin in (ii) ali se ta plin vname. Če se plin vname, nadaljnje preskušanje snovi ni več potrebno, saj se snov obravnava kot nevarna.

1.6.3 **Faza 3**1.6.3.1 *Preskusni pogoji*

Preskus se izvaja pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

1.6.3.2 *Izvedba preskusa*

Preskusna snov se oblikuje v približno 2 cm visok in 3 cm širok kupček z jamico na vrhu. V jamico se kane nekaj kapljic vode in zapiše, (i) ali se razvije kakršenkoli plin in (ii) ali se ta plin vname. Če se plin vname, nadaljnje preskušanje snovi ni več potrebno, saj se snov obravnava kot nevarna.

1.6.4 **Faza 4**1.6.4.1 *Aparatura*

Aparatura se sestavi, kakor je prikazano na sliki.

1.6.4.2 *Preskusni pogoji*

Preveri se ali posoda s preskusno snovjo vsebuje prah < 500 µm (velikost delcev). Če prah predstavlja več kot 1 % m/m celotne količine ali če je vzorec drobljiv, je treba celotno snov pred preskušanjem zmleti v prah, da se upošteva manjšanje velikosti delcev med shranjevanjem in uporabo; sicer se snov preskuša takšna, kakršna je bila prejeta. Preskus je treba izvajati pri sobni temperaturi (pribl. 20 °C) in atmosferskem tlaku.

1.6.4.3 *Izvedba preskusa*

V lij kapalnik aparature se da 10 do 20 ml vode in v erlenmajerico 10 g snovi. Volumen razvitega plina se lahko izmeri s kakršnimi koli primernimi pripomočki. Odpre se pipica lij, da voda steče v erlenmajerico, in sproži štoparica. V obdobju sedmih ur se vsako uro se izmeri razvijanje plina. Če je v tem obdobju razvijanje plina neenakomerno ali če ob koncu tega obdobja hitrost razvijanja plina narašča, se merjenje nadaljuje do največ petih dni. Če hitrost razvijanja plina kadarkoli med merjenjem preseže 1 liter/kg na uro, se preskus lahko prekine. Ta preskus je treba izvesti trikrat.

Če kemijska identiteta plina ni znana, je treba plin analizirati. Če plin vsebuje lahko vnetljive sestavine in ni znano, ali je celotna zmes lahko vnetljiva, je treba pripraviti zmes z enako sestavo in jo preskusiti po metodi A.11.

2. **PODATKI**

Snov se šteje za nevarno, če:

- v katerikoli fazi preskusnega postopka pride do spontanega vžiga, ali
- se razvija vnetljiv plin s hitrostjo več kot 1 liter/kg snovi na uro.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),
- podrobnosti o kakršnikoli predpripravi preskusne snovi,
- rezultati preskusov (faze 1, 2, 3 in 4),
- kemijska identiteta razvitega plina,
- hitrost razvijanja plina, če se izvede faza 4 (1.6.4),
- kakršne koli dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

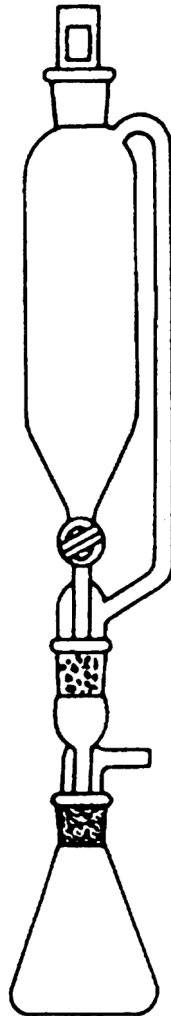
4. **VIRI**

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

Dodatek

Slika

Aparatura



A.13 PIROFORNE LASTNOSTI TRDNIH SNOVI IN TEKOČIN**1. METODA****1.1 UVOD**

Preskusni postopek se uporablja za trdne ali tekoče snovi, ki se že v majhnih količinah spontano vnamejo kmalu zatem, ko pridejo v stik z zrakom pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

V to metodo niso vključene snovi, ki morajo biti izpostavljene zraku več ur ali dni pri sobni temperaturi ali pri zvišani temperaturi, preden se vnamejo.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Šteje se, da so snovi piroforne, če se vnamejo ali povzročijo zgozlenost pri pogojih, opisanih v 1.6.

Morda bo treba preskusiti tudi samovnetljivost tekočin po metodi A.15 Temperatura samovžiga (tekočine in plini).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Niso določene.

1.4 PRINCIP METODE

Snov, naj bo trdna ali tekoča, se da v inertno posodo in za pet minut izpostavi zraku pri sobni temperaturi. Če se tekoča snov ne vname, jo absorbiramo na filtrirni papir in za pet minut izpostavimo zraku pri sobni temperaturi (pribl. 20 °C). Če se trdna snov ali tekočina vname ali če tekočina vžge ali poogleni filtrirni papir, se šteje, da je snov pirofora.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Ponovljivost: zaradi varnosti zadostuje en sam pozitiven rezultat, da se snov šteje za pirofora.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Aparatura**

V porcelanski lonček s premerom približno 10 cm se natrese približno 5 mm visok kupček diatomejske zemlje pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

Opomba:

Diatomejska zemlja ali katera koli druga primerljiva splošno dostopna inertna snov se šteje za reprezentativno prst, na katero bi se lahko v primeru nesreče razlila preskusna snov.

Za preskušanje tekočin, ki se ne vnamejo ob stiku z zrakom, če so v stiku z inertnim nosilcem, potrebujemo suh filtrirni papir.

1.6.2 Izvedba preskusa**(a) Prašnate trdne snovi**

Z višine približno 1 m se na negorljivo površino strese 1 do 2 cm³ prašnate preskusne snovi in opazuje, ali se snov vname med padanjem ali v petih minutah posedanja.

Preskus se izvede šestkrat, razen če že prej pride do vžiga.

(b) Tekočine

Približno 5 cm³ preskusne tekočine se vlije v pripravljen porcelanski lonček in opazuje, ali se tekočina vname v petih minutah.

Če v šestih preskusih ne pride do vžiga, se opravijo naslednji preskusi:

Iz brizge se na prepognjen filtrirni papir nanese 0,5 ml preskusne snovi in opazuje, ali se filtrirni papir v petih minutah od nanosa tekočine vname ali zgleni. Preskus se izvede trikrat, razen če že prej pride do vžiga.

2. PODATKI**2.1 OBDELAVA REZULTATOV**

Preskus se lahko prekine, takoj ko se v katerem koli od preskusov dobi pozitiven rezultat.

2.2 VREDNOTENJE

Če se snov vname v petih minutah po dodatku v inertno posodo in izpostavitvi zraku ali če tekoča snov povzroči pooglenitev ali vžig filtrirnega papirja v petih minutah po dodatku in izpostavitvi zraku, se šteje, da je pirofora.

3. POROČANJE

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),
- rezultati preskusov,
- kakršne koli dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

4. VIRI

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

A.14 EKSPLOZIVNE LASTNOSTI

1. METODA

1.1 UVOD

Metoda predstavlja preskusno shemo za ugotavljanje, ali trdna ali pastozna snov predstavlja nevarnost eksplozije, ko se izpostavi plamenu (toplotna občutljivost) ali udarcu ali trenju (občutljivost za mehanske dražljaje), in ali tekoča snov predstavlja nevarnost eksplozije, ko se izpostavi plamenu ali udarcu.

Metoda zajema tri dele:

- (a) preskus toplotne občutljivosti (1);
- (b) preskus mehanske občutljivosti za udarce (1);
- (c) preskus mehanske občutljivosti za trenje (1).

Metoda daje podatke za oceno verjetnosti povzročitve eksplozije s pomočjo nekaterih običajnih dražljajev. Metoda ni namenjena ugotavljanju zmožnosti snovi, da eksplodira v kakršnih koli pogojih.

Metoda je primerna za ugotavljanje, ali bo snov predstavljala nevarnost eksplozije (toplotna in mehanska občutljivost), v pogojih, določenih v direktivi. Temelji na številnih vrstah aparatur, ki se splošno uporabljajo na mednarodni ravni (1) in običajno dajejo uporabne rezultate. Priznava se, da metoda ni dokončna. Lahko se uporabi aparatura, ki je drugačna od navedene, pod pogojem da je mednarodno priznana in se rezultati lahko zadovoljivo primerjajo z rezultati, dobljenimi z navedeno aparaturo.

Preskusov ni treba izvesti, kadar je iz razpoložljivih podatkov o termodinamiki (toplota proizvodnje, toplota razgrajevanja) in/ali odsotnosti nekaterih reaktivnih skupin (2) v strukturi formuli brez vsakega dvoma razvidno, da snov ni zmožna hitre razgradnje s proizvodnjo plinov ali sproščanjem toplote (tj. snov ne predstavlja nevarnosti eksplozije). Preskus mehanske občutljivosti za trenje pri tekočinah ni potreben.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Eksplozivno:

Snovi, ki lahko eksplodirajo ob izpostavitvi plamenu ali so občutljive za udarce ali trenje v posebni aparaturi (ali so bolj mehansko občutljive kakor 1,3-dinitrobenzen v nadomestni aparaturi).

1.3 REFERENČNE SNOVI

1,3-Dinitrobenzen, tehnični, kristaliničen, presejan do velikosti delcev do 0,5 mm, za metode udarca in trenja.

Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, heksogen, ciklonit – CAS 121-82-4), rekristaliziran iz vodnega cikloheksanona, mokro presejan skozi sito z odprtinami 250 µm in zadržan na situ z odprtinami 150 µm ter posušen pri 103 ± 2 °C (4 ure) za drugi niz preskusov trenja in udarcev.

1.4 PRINCIP METODE

Za določitev varnih pogojev izvedbe treh preskusov občutljivosti so potrebni predhodni preskusi.

1.4.1 Preskusi varnosti pri ravnanju s snovjo (3)

Zaradi varnosti se pred izvedbo glavnih preskusov zelo majhni vzorci (ca. 10 mg) snovi segrevajo na odprtem s plamenom plinskega gorilnika ter izpostavijo udarcu v kakršnikoli primerni aparaturi in trenju z uporabo kladiiva in nakovala ali kakršne koli druge torne naprave. Namen preskusa je ugotoviti, ali je snov tako občutljiva in eksplozivna, da je treba predpisane preskuse občutljivosti, zlasti tiste za toplotno občutljivost, izvajati še posebej previdno, da se izvajalec preskusov ne poškoduje.

1.4.2 Toplotna občutljivost

Pri tej metodi se snov segreva v jekleni cevi, zaprti s šobnimi ploščami s spremenljivim premerom odprtine, da se določi, ali je verjetno, da bo snov eksplodirala pri intenzivni toploti in določeni zaprtosti.

1.4.3 Mehanska občutljivost (udarec)

Pri tej metodi se snov izpostavi udarcu določene mase, spuščene z določene višine.

1.4.4 Mehanska občutljivost (trenje)

Pri tej metodi se trdna ali pastozna snov izpostavi trenju med standardnimi površinami v določenih pogojih obremenitve in relativnega gibanja.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Niso navedena.

1.6. OPIS METODE

1.6.1 Toplotna občutljivost (učinek plamena)

1.6.1.1 Aparatura

Aparaturo sestavlja jeklena cev za enkratno uporabo s pripravo za zapiranje za večkratno uporabo (slika 1), nameščena v grelno in zaščitno napravo. Vsaka cev je izdelana z globokim vlečenjem iz jeklene pločevine (glej dodatek), njen notranji premer je 24 mm, dolžina 75 mm in debelina stene 0,5 mm. Na odprtem koncu cevi je prirobnica, ki omogoča zapiranje cevi s šobnim sklopom. Ta sklop sestavlja proti tlaku odporna šobna plošča z odprtino na sredini, ki je trdno pritrjena na cev z dvodelno vijačno zvezo (matica in navojni obroč). Matica in navojni obroč sta izdelana iz krom-manganovega jekla (glej dodatek), ki ne proizvaja isker do 800 °C. Šobne plošče so debele 6 mm, izdelane iz jekla, obstojnega na vročino (glej dodatek), in so na voljo z različnimi premeri odprtin.

1.6.1.2 Preskusni pogoji

Običajno se snov preskuša takšna, kakršna je bila prejeta, čeprav je v nekaterih primerih, npr. pri stisnjenih, litih ali kako drugače kondenziranih, morda treba snov pred preskušanjem zdrobiti.

Pri trdnih snoveh se masa snovi, ki se bo uporabila v vsakem preskusu, določi z dvostopenjskim predhodnim preskusom. Stehtana cev se napolni z 9 cm³ snovi, nato se snov potlači s pritiskom sile 80 N po celotnem prečnem prerezu cevi. Zaradi varnosti, ali kadar se stiskanjem lahko spremeni agregatno stanje snovi, se lahko uporabijo drugi postopki polnjenja; npr. če je snov zelo občutljiva za trenje, stiskanje ni primerno. Če je snov stisljiva, se dodajajo nove količine snovi z vsakokratnim stiskanjem, dokler ni cev napolnjena do višine 55 mm od roba. Določi se skupna masa, porabljena za napolnitev cevi do višine 55 mm od roba, nato se še dvakrat doda enaka količina snovi, ki se vsakokrat potlači s silo 80 N. Zatem se snov bodisi doda s stiskanjem bodisi odvzame, kar je potrebno, da se cev napolni do višine 15 mm od roba. Nato se izvede drugi predhodni preskus, ki se začne s stisnjeno količino, enako tretjini skupne mase, določene pri prvem predhodnem preskusu. Dodata se še dve taki količini in potlačita s silo 80 N, nato se z dodajanjem ali odvzemanjem snovi prilagodi njen nivo v cevi do višine 15 mm od roba. Pri vseh preskusih se uporabi količina trdne snovi, določena v drugem predhodnem preskusu; cev se polni v treh korakih, s tremi enako velikimi deli, pri čemer se vsak del s potrebno silo stisne do volumna 9 cm³. (To se lahko olajša z uporabo distančnih obročev.)

Tekočine in geli se nalijejo v cev do višine 60 mm, pri čemer je treba pri gelih posebej paziti, da vmes ni praznih prostorov. Na cev se od spodaj natakne navojni obroč, vstavi se ustrezna šobna plošča, nato se nanese nekaj maziva na osnovi molibdenovega disulfida in privije matica. Nujno se je treba prepričati, da nič snovi ni ujete med prirobnico in ploščo ali v navoju.

Kot gorivo se uporabi propan iz industrijske jeklenke, opremljene z regulatorjem tlaka (60 do 70 mbar), ki se dovaja skozi merilnik in preko razdelilnika enakomerno porazdeli (kar se določi z opazovanjem plamenov gorilnikov) med štiri gorilnike. Gorilniki so po preskusni komori razporejeni, kakor prikazuje slika 1. Skupna poraba vseh štirih gorilnikov je 3,2 litra propana na minuto. Lahko se uporabijo tudi drugi plini in gorilniki, vendar mora biti hitrost segrevanja taka, kot je določena na sliki 3. Pri vseh aparaturah je treba periodično preverjati hitrost segrevanja z uporabo cevi, napolnjenih z dibutilftalatom, kakor je navedeno na sliki 3.

1.6.1.3 Izvedba preskusov

V vsakem preskusu se cev segreva, dokler je ne raznese vendar ne dalj kot 5 minut. Preskus, pri katerem cev razpade na tri ali več delov, ki so v nekaterih primerih lahko med seboj povezani s tankimi trakovi kovine, kakor je prikazano na sliki 2, se ovrednoti kot preskus, pri katerem je prišlo do eksplozije. Preskus, pri katerem cev razpade na manj delov ali sploh ne razpade, se šteje kot preskus, ki ne povzroči eksplozije.

Najprej se opravi niz treh preskusov z odprtino premera 6,0 mm na šobni plošči, in če pri nobenem ni eksplozije, se izvede drugi niz treh preskusov z odprtino premera 2,0 mm na šobni plošči. Če pri nobenem nizu preskusov ne nastane eksplozija, nadaljnje preskušanje ni potrebno.

1.6.1.4 Vrednotenje

Rezultat preskusa je pozitiven, če pri katerem koli od zgoraj navedenih nizov preskusov nastane eksplozija.

1.6.2 Mehanska občutljivost (udarec)

1.6.2.1 Aparatura (slika 4)

Bistveni deli značilne aparature z udarnim kladivom so blok iz jeklene litine z osnovno ploščo, nakovalo, stebriček, vodila, udarne uteži, sprožilna naprava in priprava za vzorec. Jekleno nakovalo, 100 mm (premer) × 70 mm (višina), je privito na zgornji del jeklenega bloka, 230 mm (dolžina) × 250 mm (širina) × 200 mm (višina), z ulito osnovno ploščo, 450 mm (dolžina) × 450 mm (širina) × 60 mm (višina). Stebriček iz brezšivne vlečene jeklene cevi je nameščen v držalu, privitem na zadnjo stran jeklenega bloka. Aparatura je s štirimi vijaki pritrjena na masiven cementni blok 60 × 60 × 60 cm, tako da sta vodilni tirnici točno navpični in udarna utež prosto pade. Na voljo za uporabo sta dve uteži, 5 in 10 kg, iz masivnega jekla. Udarne glave vsake uteži je iz utrjenega jekla, 60 do 63 HRC, in ima premer najmanj 25 mm.

Vzorec se zapre v udarno pripravo, ki jo sestavljata dva valja iz masivnega jekla s skupno osjo, postavljena eden nad drugim, v votlem jeklenem valju, ki predstavlja vodilni obroč. Premer masivnih jeklenih valjev mora biti 10 (–0,003, –0,005) mm in višina 10 mm, njuna površina mora biti zloščena, robovi zaobljeni (polmer krivulje 0,5 mm), njuna trdota pa znašati 58 do 65 HRC. Zunanji premer votlega valja mora biti 16 mm, zloščene izvrtine 10 (+ 0,005, + 0,010) mm, višina pa 13 mm. Udarna priprava se sestavi na vmesnem nakovalu (premer 26 mm in višina 26 mm) iz jekla in centra z obročem, ki ima odprtine za odvajanje hlapov.

1.6.2.2 Preskusni pogoji

Volumen vzorca mora biti 40 mm³ ali ustrezen za kakršno koli nadomestno aparaturu. Trdne snovi se preskušajo v suhem stanju in pripravljene na naslednji način:

- (a) prašnate snovi se presejejo (sito z odprtinami 0,5 mm); v preskusu se uporabi vsa snov, ki se preseje skozi sito;
- (b) stisnjene, ulite ali kako drugače kondenzirane snovi se razbijejo na manjše delce in presejejo; v preskusu se uporabi presejana frakcija s premerom 0,5 do 1 mm, ki mora biti reprezentativna za izvirno snov.

Snovi, ki se običajno dobavljajo v pastozni obliki, se, kadar je mogoče, preskušajo v suhem stanju, v vsakem primeru pa po odstranitvi čim večje količine redčila. Pri preskušanju tekočih snovi se med zgornjim in spodnjim jeklenim valjem pusti razmik 1 mm.

1.6.2.3 Izvedba preskusov

Izvede se niz šestih preskusov s spuščanjem mase 10 kg z višine 0,40 m (40 J). Če pri teh šestih preskusih pri 40 J nastane eksplozija, je treba izvesti dodaten niz šestih preskusov s spuščanjem mase 5 kg z višine 0,15 m (7,5 J). V drugih napravah se vzorec primerja z izbrano referenčno snovjo po uveljavljenem postopku (npr. s tehniko dviganja in spuščanja itd.).

1.6.2.4 Vrednotenje

Šteje se, da je rezultat pozitiven, če eksplozija (vzplamenitev in/ali pokanje sta enakovredna eksploziji) nastane najmanj enkrat med katerim koli od preskusov s predpisano udarno aparaturu ali če je vzorec bolj občutljiv kot 1,3-dinitrobenzen ali RDX pri drugem preskusu z udarcem.

1.6.3 Mehanska občutljivost (trenje)

1.6.3.1 Aparatura (slika 5)

Torna aparatura je sestavljena iz osnovne plošče iz jeklene litine, na katero je postavljena torna naprava. To sestavljata nepremični porcelanast valjček in premična porcelanasta ploščica. Porcelanasta ploščica je pritrjena na drsnik, ki se premika po dveh vodilih. Drsnik je povezan z elektromotorjem preko pomikalnika, ekscentra in ustreznega menjalnika, tako da se porcelanasta ploščica enkrat samkrat premakne naprej in nazaj pod porcelanastim valjčkom za 10 mm. Porcelanast valjček se lahko obremeni z npr. 120 ali 360 newtoni.

Porcelanaste ploščice so izdelane iz belega tehničnega porcelana (hrapavost 9 do 32 µm) in imajo dimenzije 25 mm (dolžina) × 25 mm (širina) × 5 mm (višina). Porcelanast valjček, je prav tako narejen iz belega tehničnega porcelana ter je dolg 15 mm, ima premer 10 mm in hrapava zaokrožena konca s polmerom zaokroženega dela 10 mm.

1.6.3.2 Preskusni pogoji

Volumen vzorca mora biti 10 mm³ ali ustrezen za kakršno koli drugačno aparaturu.

Trdne snovi se preskušajo v suhem stanju in pripravljene na naslednji način:

- (a) prašnate snovi se presejejo (sito z odprtinami 0,5 mm); v preskusu se uporabi vsa presejana snov, ž;
- (b) stisnjene, ulite ali kako drugače kondenzirane snovi se zdrobijo na manjše delce in presejejo; v preskusu se uporabi presejana frakcija s premerom < 0,5 mm.

Snovi, ki se običajno dobavljajo v pastozni obliki, se, kadar je mogoče, preskušajo v suhem stanju. Če se snovi ne da posušiti, se pasta (po odstranitvi največje možne količine redčila) preskusi kot 0,5 mm debel, 2 mm širok in 10 mm dolg film, pripravljen s šablono.

1.6.3.3 Izvedba preskusov

Porcelanast valjček se postavi na vzorec in obremeni. Med izvajanjem preskusa morajo zareze na porcelanasti ploščici ležati prečno na smer premikanja. Paziti je treba, da valjček stoji na vzorcu, da je pod valjčkom dovolj preskusne snovi in da se ploščica pravilno premika pod valjčkom. Pri pastoznih snoveh se za nanos snovi na ploščico uporabi 0,5 mm debela šablona z odprtino 2×10 mm. Porcelanasta ploščica se mora v 0,44 sekundah premakniti 10 mm naprej in nazaj pod porcelanastim valjčkom. Vsak del površine ploščice in valjčka se sme uporabiti le enkrat; oba konca vsakega valjčka se uporabita za dva preskusa in vsaka površina ploščice za tri preskuse.

Izvede se niz šestih preskusov z obremenitvijo 360 N. Če se v teh šestih preskusih dobi pozitiven rezultat, je treba izvesti dodaten niz šestih preskusov z obremenitvijo 120 N. V drugi aparaturi se vzorec primerja z izbrano referenčno snovjo po uveljavljenem postopku (npr. s tehniko dviganja in spuščanja itd.).

1.6.3.4 Vrednotenje

Šteje se, da je rezultat pozitiven, če eksplozija (prasketanje in/ali pokanje ali vzplamenitev so enakovredni eksploziji) nastane vsaj enkrat med preskusov s predpisano tornjo aparaturo ali če izpolnjuje enakovredna merila pri drugačnem tornem preskusu.

2. PODATKI

Načeloma se šteje, da snov predstavlja nevarnost eksplozije v smislu te direktive, če preskus toplotne, udarne ali torne občutljivosti da pozitiven rezultat.

3. POROČANJE

3.1 POROČILO O PRESKUSU

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- identiteta, sestava, čistost, vsebnost vlage itd., preskusne snovi,
- agregatno stanje vzorca in ali je bil zdrobljen, zdrobljen in/ali presejan,
- opažanja med preskusi toplotne občutljivosti (npr. masa vzorca, število delov itd.),
- opažanja med preskusi mehanske občutljivosti (npr. nastajanje velikih količin dima ali popoln razpad brez pokanja, plamena, isker, prasketanja itd.),
- rezultati vsake vrste preskusov,
- če je bila uporabljena drugačna aparatura, je treba navesti znanstveno utemeljitev ter dokaze o soodvisnosti med rezultati, pridobljenimi s predpisano aparaturo, in tistimi, pridobljenimi z enakovredno aparaturo,
- kakršne koli koristne opombe, na primer sklicevanja na preskuse s podobnimi proizvodi, ki so lahko pomembne za pravilno razlago rezultatov,
- vse dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

3.2 RAZLAGA IN VREDNOTENJE REZULTATOV

V poročilu o preskusu je treba navesti tudi kakršne koli rezultate, ki se štejejo za lažne, anomalne ali nereprezentativne. Če je treba katerega od rezultatov zavreči, je treba navesti obrazložitev in rezultate kakršnega koli nadomestnega ali dopolnilnega preskušanja. Če se anomalnega rezultata ne da obrazložiti, ga je treba sprejeti takšnega, kakršen je, in ga uporabiti za ustrezno razvrstitev snovi.

4. VIRI

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

Dodatek

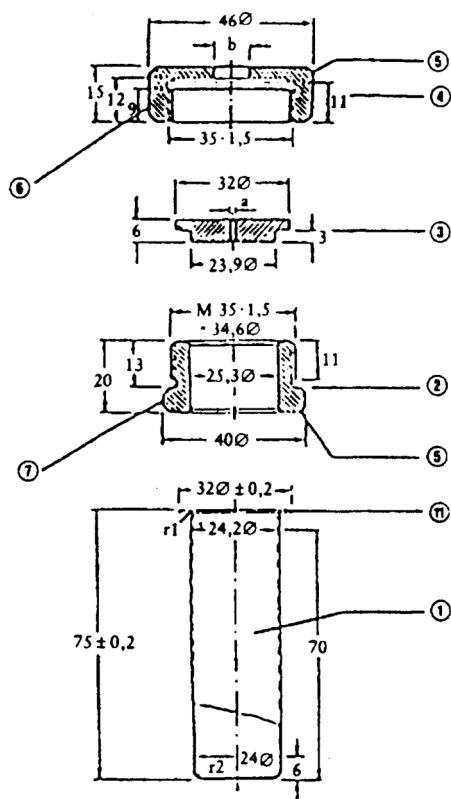
Primer specifikacije materiala za preskus toplotne občutljivosti (glej DIN 1623)

- (1) Cev: Specifikacija materiala št. 1.0336.505 g
- (2) Šobna plošča: Specifikacija materiala št. 1.4873
- (3) Navojni obroč in matica: Specifikacija materiala št. 1.3817

Slika 1

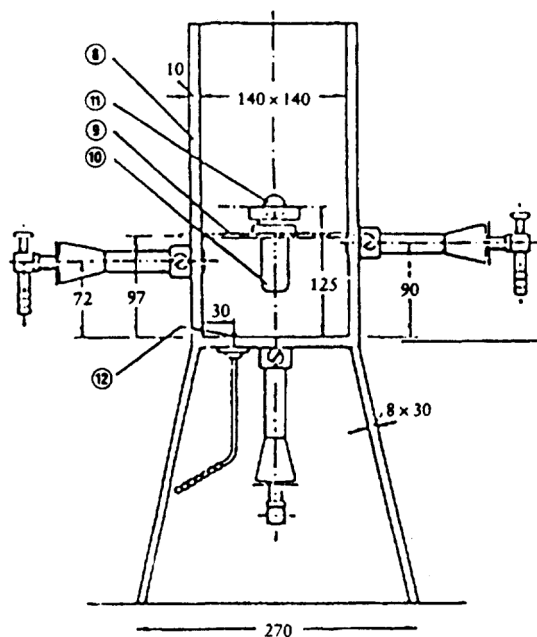
Aparatura za toplotno občutljivost

(vse dimenzije so v milimetrih)



Sl. 1a Jeklena cev in dodatki

- (1) cev
- (1a) zunanja prirobnica
- (2) navojni obroč; navoj z majhnim trenjem
- (3) šobna plošča, a = 2,0 ali 6,0 mm
- (4) matica, b = 10 mm
- (5) prirobljena površina
- (6) 2 površini za ključ št. 41



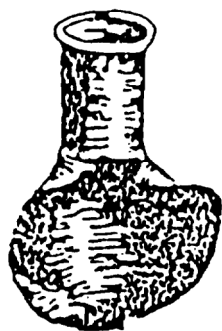
Sl. 1b Grelna in zaščitna naprava

- (7) 2 površini za ključ št. 36
- (8) škatla, odporna proti drobcem
- (9) 2 podporni palici za cev
- (10) sestavljena cev
- (11) položaj zadnjega gorilnika; drugi gorilniki so vidni
- (12) šoba za vžigalni plamen

Slika 2

Preskus toplotne občutljivosti

Primeri fragmentacije



Ni eksplozije



Ni eksplozije



Eksplozija



Eksplozija



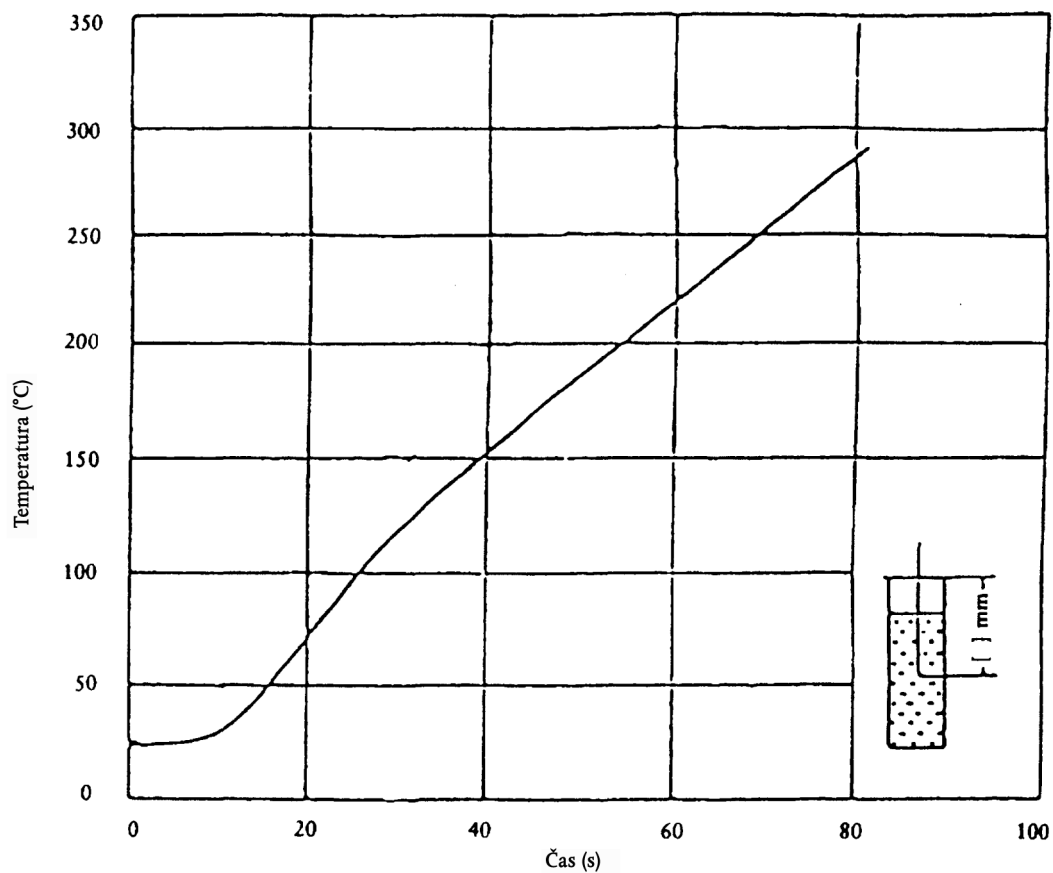
Eksplozija



Eksplozija

Slika 3

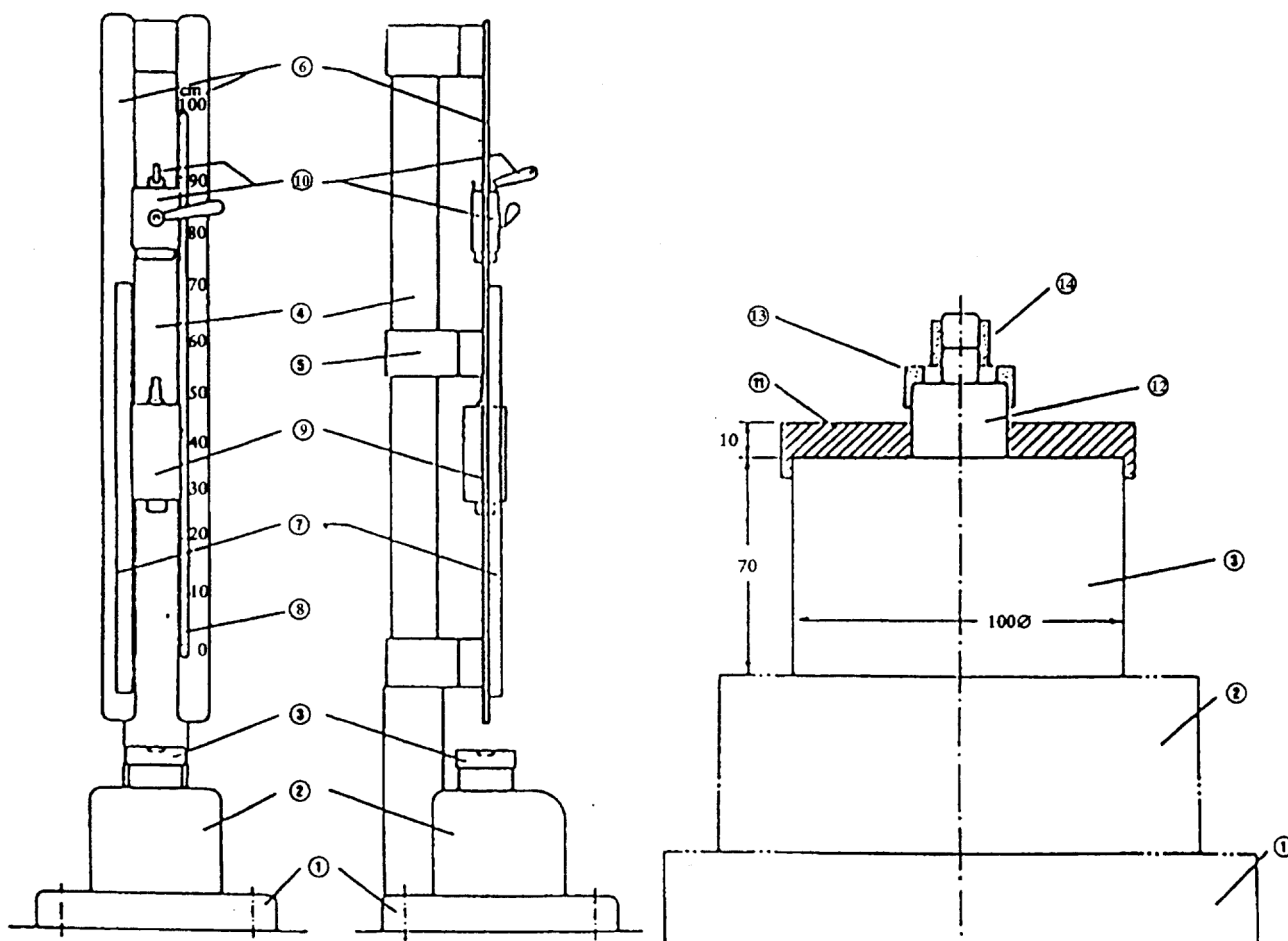
Umeritev hitrosti segrevanja pri preskusu toplotne občutljivosti



Krivulja temperatura/čas, dobljena s segrevanjem dibutilftalata (27 cm^3) v zaprti (šobna plošča 1,5 mm) cevi ob pretoku propana 3,2 litra/minuto. Temperatura se meri s termočlenom nikelj-krom s premerom 1 mm v ovoju iz nerjavečega jekla, nameščenim centralno, 43 mm pod robom cevi. V območju med 135 in 285 °C mora biti hitrost segrevanja med 185 in 215 K/minuto.

Slika 4

Aparatura za udarni preskus
(vse dimenzije so v milimetrih)



Sl. 4a Udarno kladivo, od spredaj in od strani, splošna skica

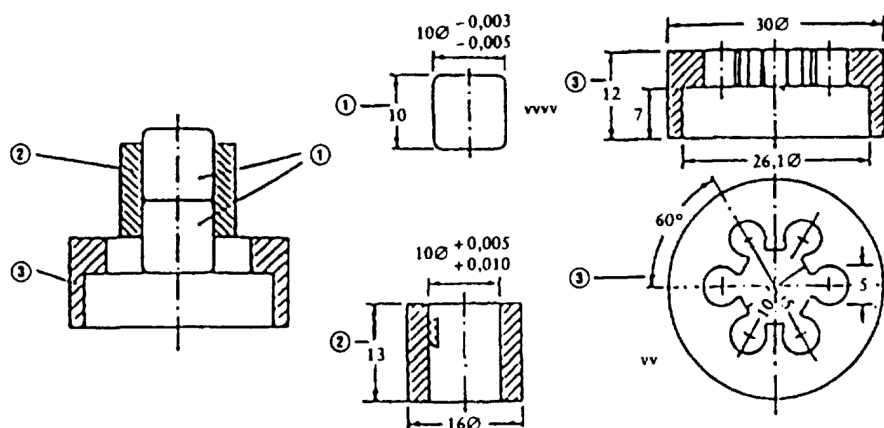
- (1) osnovna plošča, $450 \times 450 \times 60$
- (2) jeklen blok, $230 \times 250 \times 200$
- (3) nakovalo, 100 (premer) $\times$ 70
- (4) stebriček
- (5) osrednji prečni nosilec
- (6) 2 vodili
- (7) nazobčana tračnica

Sl. 4b Udarno kladivo, spodnji del

- (8) graduirana lestvica
- (9) udarno kladivo (udarna utež)
- (10) naprava za pritrdjevanje in sproščanje
- (11) centrirna plošča
- (12) vmesno nakovalo (zamenljivo), 26 (premer) $\times$ 26
- (13) centrirni obroč z odprtnicami
- (14) udarna priprava

Slika 4

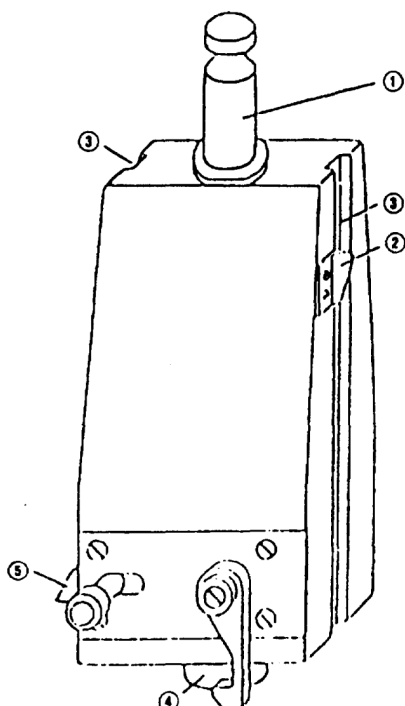
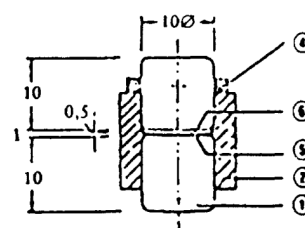
Nadaljevanje



Sl. 4c Udarna priprava za prašnate in pastozne snovi

- (1) jeklena valja
- (2) vodilni obroč za jeklena valja
- (3) centrirni obroč z odprtnicami
 - (a) vzdolžni prerez
 - (b) prečni prerez
- (4) gumijast obroč
- (5) tekoča snov (40 mm³)
- (6) prostor brez tekočine

Sl. 4d Udarna priprava za tekoče snovi

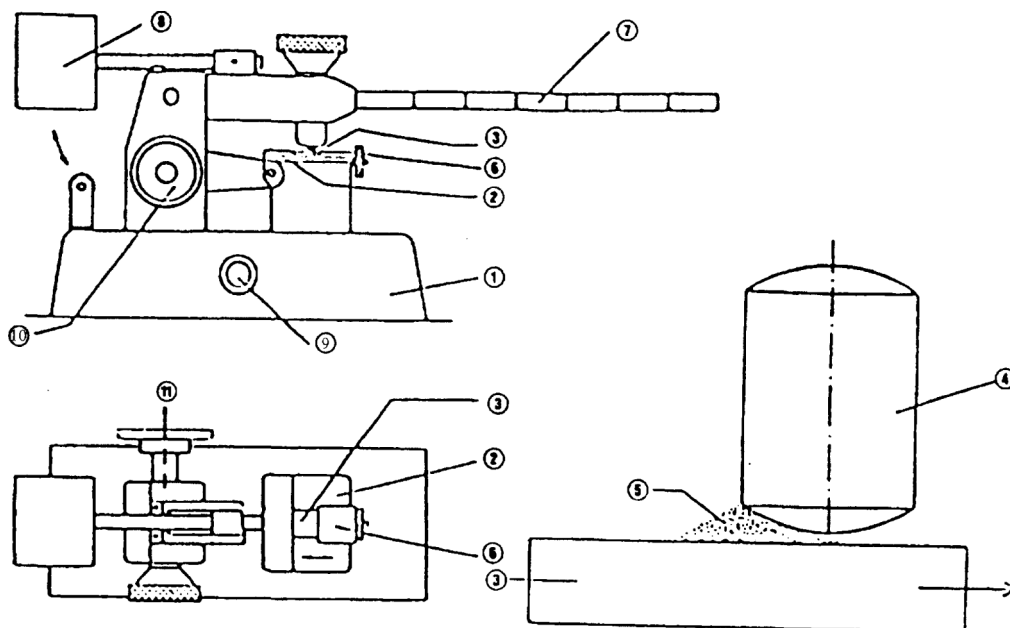


Sl. 4e Kladivo (udarna utež 5 kg)

- (1) zatič za obešanje
- (2) kazalec višine
- (3) vodilni žleb
- (4) valjasta udarna glava
- (5) priprava za zaustavitev odboja

Slika 5

Aparatura za občutljivost za trenje



Sl. 5a Torna aparatura; naris in tloris

- (1) jeklena osnovna plošča
- (2) premični drsnik
- (3) porcelanasta ploščica $25 \times 25 \times 5$ mm, pritrjena na drsnik
- (4) nepremični porcelanast valjček, 10 (premer) $\times 15$ mm
- (5) vzorec, približno 10 mm^3

Sl. 5b Začetni položaj valjčka na vzorcu

- (6) držalo za valjček
- (7) obremenitvena ročica
- (8) protiutež
- (9) stikalo
- (10) kolesce za nastavitve drsnika na začetni položaj
- (11) smer elektromotorja

A.15 TEMPERATURA SAMOVŽIGA (TEKOČINE IN PLINI)

1. METODA

1.1 UVOD

Eksplzivne snovi in snovi, ki se spontano vnamejo v stiku z zrakom pri sobni temperaturi, se ne smejo preskušati s tem preskusom. Preskusni postopek se uporablja za pline, tekočine in pare, ki se ob prisotnosti zraka lahko vnamejo na vroči površini.

Temperaturo samovžiga lahko znatno zniža prisotnost katalitskih nečistot, material površine ali večji volumen preskusne posode.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Stopnja samovnetljivosti se izraža s temperaturo samovžiga. Temperatura samovžiga je najnižja temperatura, pri kateri se preskusna snov vname, če se pomeša z zrakom v pogojih, opredeljenih v preskusni metodi.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčne snovi so našteje v standardih (glej 1.6.3). Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

1.4 PRINCIP METODE

S to metodo se določa najnižja temperatura notranje površine posode, pri kateri se plin, para ali tekočina, vbrizgana v posodo, vname.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Ponovljivost se spreminja v skladu z območjem temperatur samovžiga in uporabljeno preskusno metodo.

Občutljivost in specifičnost sta odvisni od uporabljene preskusne metode.

1.6 OPIS METODE

1.6.1 Aparatura

Aparatura je opisana v metodi iz 1.6.3.

1.6.2 Preskusni pogoji

Preskus na vzorcu preskusne snovi se izvede v skladu z metodo iz 1.6.3.

1.6.3. Izvedba preskusa

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

2. PODATKI

Zapišejo se temperatura preskusa, atmosferski tlak, uporabljena količina vzorca, čas, ki preteče do samovžiga.

3. POROČANJE

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),
- uporabljena količina vzorca, atmosferski tlak,
- uporabljena aparatura,
- rezultati meritev (temperature preskusa, rezultati v zvezi z vžigom, ustrezni časovni zamik),
- vse dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

4. VIRI

Jih ni.

A.16 RELATIVNA TEMPERATURA SAMOVŽIGA ZA TRDNE SNOVI

1. METODA

1.1 UVOD

Eksplzivne snovi in snovi, ki se spontano vnamejo v stiku z zrakom pri sobni temperaturi, se ne smejo preskušati s tem preskusom.

Namen tega preskusa je zagotoviti predhodne podatke o samovnetljivosti trdnih snovi pri povišani temperaturi.

Če se vročina, ki se razvije ob reagiranju snovi s kisikom ali eksotermni razgradnji, ne porazgubi dovolj hitro po okolici, se bo snov samosegrevala in vnela. Samovžig se torej pojavi, kadar se toplota proizvaja hitreje, kot se izgublja.

Preskusni postopek je koristen kot predhodni presejalni preskus za trdne snovi. Zaradi zapletene narave vžiga in izgorevanja trdnih snovi je treba temperaturo samovžiga, določeno v skladu s to preskusno metodo, uporabljati le za primerjanje.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Temperatura samovžiga, dobljena s to metodo, je najnižja temperatura okolja, izražena v °C, pri kateri se določen volumen snovi v določenih pogojih vname.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP METODE

Določen volumen preskusne snovi se da v peč pri sobni temperaturi; zapisuje se krivulja temperatura/čas, ki se nanaša na razmere v sredini vzorca, medtem ko se temperatura peči viša do 400 °C, ali do tališča, če je to nižje, s hitrostjo 0,5 °C/min. Pri tem preskusu se temperatura peči, pri kateri temperatura vzorca doseže 400 °C s samosegrevanjem, imenuje temperatura samovžiga.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Aparatura**1.6.1.1 *Peč*

Laboratorijska peč s temperaturnim programom (volumen približno 2 litra), opremljena s sistemom za naravno kroženje zraka in protieksplzijsko zaščito. Da se prepreči nastanek morebitne eksplozije, je treba kakršnim koli razgradnim plinom preprečiti stik z električnimi grelnimi elementi.

1.6.1.2 *Kocka iz žičnate mreže*

Kos žičnate mreže iz nerjavnega jekla z odprtini 0,045 mm se razreže v skladu z vzorcem na sliki 1. Mreža se pregane in poveže z žico v kocko brez zgornje ploskve.

1.6.1.3 *Termočlena*

Primerna termočlena.

1.6.1.4 *Zapisovalnik*

Kakršenkoli dvokanalni zapisovalnik, umerjen na 0 do 600 °C ali ustrezno napetost.

1.6.2 **Preskusni pogoji**

Snovi se preskušajo takšne, kakršne so bile prejete.

1.6.3 **Izvedba preskusa**

Kocka se napolni s preskusno snovjo, nato se narahlo stresa in polni s snovjo, dokler ni povsem polna. Kocka se nato obesi na sredino peči pri sobni temperaturi. En termočlen se namesti v sredino kocke, drugi pa med kocko in steno peči, da se beleži temperatura peči.

Temperatura se viša do 400 °C ali do tališča, če je to nižje, s hitrostjo 0,5 °C/min in med tem se ves čas zapisujeta temperaturi peči in vzorca.

Ko se snov vname, termočlen v vzorcu pokaže izjemno skokovit porast temperature nad temperaturo peči.

2. **PODATKI**

Za vrednotenje je pomembna temperatura peči, pri kateri temperatura vzorca s samosegrevanjem doseže 400 °C (glej sliko 2).

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- opis preskusne snovi,
- rezultati merjenja, vključno s krivuljo temperatura/čas,
- vse dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

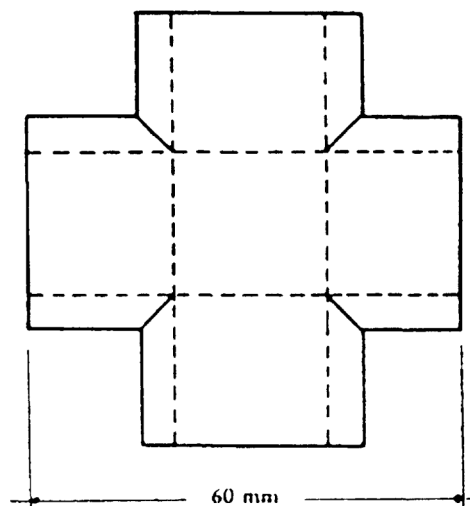
4.

VIRI

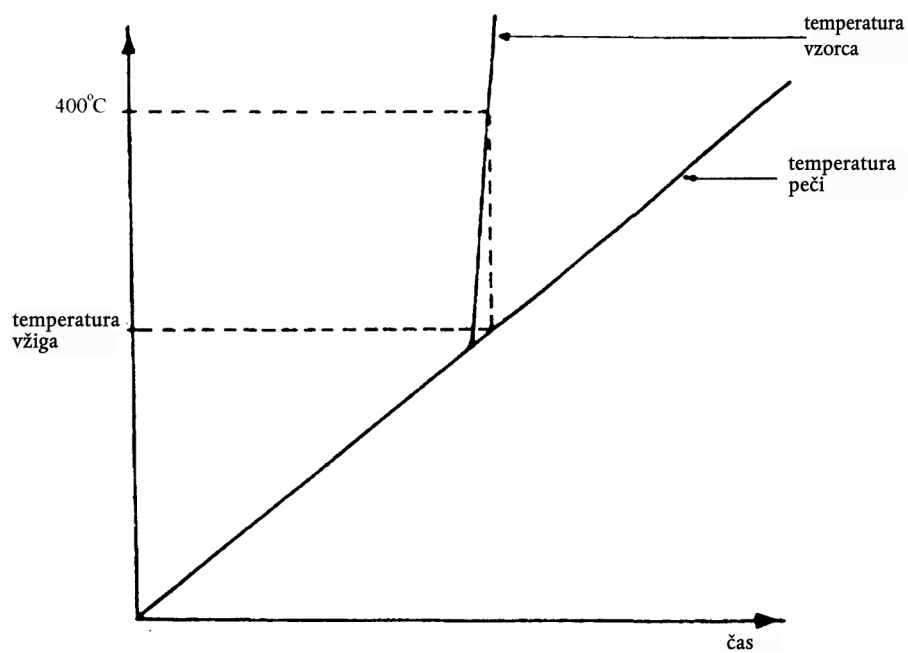
- (1) NF T 20-036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

Slika 1

Vzorec za 20 mm-preskusno kocko

**Slika 2**

Značilna krivulja temperatura/čas



A.17 OKSIDACIJSKE LASTNOSTI (TRDNE SNOVI)**1. METODA****1.1 UVOD**

Pred izvajanjem tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o vseh morebitnih eksplozivnih lastnostih snovi.

Ta preskus ni uporaben za tekočine, pline, eksplozivne ali lahko vnetljive snovi ali organske peroksidge.

Preskusa ni treba izvesti, če se na podlagi preužitve strukturne formule brez vsakršnega dvoma ugotovi, da snov ni zmožna eksotermno reagirati z gorljivo snovjo.

Treba je izvesti predhodni preskus, da se ugotovi, ali so pri izvedbi preskusa potrebni posebni varnostni ukrepi.

1.2 OPREDELITEV IN ENOTE

Čas gorenja: reakcijski čas v sekundah, v katerem reakcijsko območje prepotuje določeno razdaljo vzdolž kupčka, v skladu s postopkom iz 1.6.

Hitrost gorenja: izražena v milimetrih na sekundo.

Največja hitrost gorenja: največja vrednost izmed hitrosti gorenja, dobljenih z zmesmi, ki vsebujejo od 10 do 90 utežnih % oksidanta.

1.3 REFERENČNA SNOV

Pri preskusu in predhodnem preskusu se kot referenčna snov uporablja barijev nitrat (analitska čistost).

Referenčna zmes je zmes barijevega nitrata in uprašene celuloze, pripravljena v skladu z 1.6, ki ima največjo hitrost gorenja (običajno zmes s 60 utežnimi % barijevega nitrata).

1.4 PRINCIP METODE

Zaradi varnosti se izvede predhodni preskus. Kadar predhodni preskus jasno pokaže, da ima preskusna snov oksidacijske lastnosti, nadaljnje preskušanje ni potrebno. V nasprotnem primeru je treba s snovjo izvesti popoln preskus.

V popolnem preskusu se pripravijo zmesi iz preskusne snovi in določene gorljive snovi v različnih razmerjih. Vsaka zmes se nato oblikuje kupček, ki se na enem koncu prižge. Največja določena hitrost gorenja se primerja z največjo hitrostjo gorenja referenčne zmesi.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Če je treba snov drobiti in mešati, se za to lahko uporabi katera koli metoda, pod pogojem da razlika v največji hitrosti gorenja v šestih ločenih preskusih ne odstopa od aritmetične sredine za več kakor 10 %.

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Priprava**1.6.1.1 *Preskusna snov*

Velikost delcev v vzorcu se zmanjša do $< 0,125$ mm po naslednjem postopku: preskusna snov se preseje, preostala frakcija se zmelje in postopek se ponavlja, dokler skozi sito ni presejana vsa preskusna snov.

Uporabi se lahko katera koli metoda za mletje in presejanje, ki ustreza merilom kakovosti.

Pred pripravo zmesi se snov posuši pri 105°C do konstantne mase. Če je temperatura razgradnje preskusne snovi nižja od 105°C , je treba snov posušiti pri ustrezni nižji temperaturi.

1.6.1.2 *Gorljiva snov*

Kot gorljiva snov se uporabi uprašena celuloza. Izbrati je treba vrsto celuloze, ki se uporablja za tenkoplastno kromatografijo ali kolonsko kromatografijo. Izkazalo se je, da je primerna celuloza z več kakor 85 % vlaken z dolžino med 0,020 in 0,075 mm. Celulozni prah se preseje skozi sito z odprtinami velikosti 0,125 mm. V celem preskusu je treba uporabiti celulozo iz iste serije.

Pred pripravo zmesi se uprašena celuloza posuši pri 105°C do konstantne mase.

Če se v predhodnem preskusu uporabi žagovina, se pripravi žagovina mehkega lesa, tako da se zbere delež, presejan skozi sito z odprtinami velikosti 1,6 mm, se temeljito premeša in nato štiri ure suši pri 105°C v plasti, debeli največ 25 mm. Žagovina se ohladi in hrani v čim bolj polni nepredušno zaprti posodi do uporabe, kar naj bo po možnosti v 24 urah po sušenju.

1.6.1.3 *Vir vžiga*

Kot vir vžiga se uporabi vroč plamen plinskega gorilnika (premer najmanj 5 mm). Če se uporabi kak drug vir vžiga (npr. pri preskušanju v inertni atmosferi), ga je treba opisati v poročilu in utemeljiti njegovo uporabo.

1.6.2 **Izvedba preskusa**

Opomba:

Zmesi oksidantov in celuloze ali žagovine je treba obravnavati kot morebitno eksplozivne in z njimi ravnati z ustrežno previdnostjo.

1.6.2.1 *Predhodni preskus*

Posušena snov se temeljito zmeša s posušeno celulozo ali žagovino v razmerju 2 utežna dela preskusne snovi in 1 utežni del celuloze ali žagovine, nato se zmes oblikuje v majhen stožčast kupček z dimenzijami $3,5\text{ cm}$ (premer osnovne ploskve) $\times$ $2,5\text{ cm}$ (višina), tako da se brez tlačenja napolni stožčast kalup (npr. laboratorijski stekleni lij z zamašeno odtočno cevko).

Kupček se da na hladno, negorljivo, neporozno in toplotno slabo prevodno osnovno ploščo. Preskus je treba izvesti v digestoriju, kakor v 1.6.2.2.

Z virom vžiga se dotaknemo kupčka. Opazujeta in zapišeta se silovitost in trajanje nastale reakcije.

Če je reakcija silovita, se šteje, da je snov oksidativna.

Kadarkoli je rezultat dvomljiv, je treba izvesti spodaj opisani popolni preskusni postopek.

1.6.2.2 Popolni preskus

Pripravijo se zmesi oksidanta in celuloze, ki vsebujejo od 10 do 90 utežnih % oksidanta, vsaka za 10 % več. Pri mejnih primerih je treba uporabiti tudi vmesne koncentracije zmesi oksidanta in celuloze, da se največja hitrost gorenja določi natančneje.

S pomočjo kalupa se oblikuje kupček. Kalup je narejen iz kovine, dolg 250 mm ter ima trikotni prečni prerez z notranjo višino 10 mm in notranjo širino 20 mm. Na obe vzdolžni stranici kalupa je pritrjena kovinska plošča, kot stranska pregrada, ki sega 2 mm nad gornji rob trikotnega prečnega prereza (slika). Ta priprava se napolni z zmesjo v majhnem presežku. Kalup se enkrat spusti z višine 2 cm na trdno podlago, nato se presežek snovi postrga s ploščico v poševnem položaju. Snameta se stranski pregradi, preostali prah pa zgladi z valjčkom. Na vrh kalupa se položi osnovna plošča iz negorljivega, neporoznega in toplotno slabo prevodnega materiala, nato se cela priprava obrne za 180° in odstrani kalup.

Kupček se namesti v digestorij, prečno na tok zraka.

Hitrost odvajanja zraka mora biti zadostna, da dim ne uhaja v laboratorij, in se med preskusom ne sme spreminjati. Okrog aparature je treba namestiti zaslon, za zaščito pred prepihom.

Zaradi higroskopičnosti celuloze in nekaterih preskusnih snovi je treba preskus izvesti čim hitreje.

Prižgemo en konec kupčka, tako da se ga dotaknemo s plamenom.

Ko reakcijsko območje preide začetno razdaljo 30 mm se meri reakcijski čas prek razdalje 200 mm.

Preskus se izvede z referenčno snovjo in vsaj po enkrat z vsako od zmesi preskusne snovi in celuloze.

Če je največja hitrost gorenja znatno večja od hitrosti gorenja referenčne zmesi, se preskus lahko ustavi; sicer je treba preskus petkrat ponoviti z vsako od treh zmesi, pri katerih je bila hitrost gorenja največja.

Če se sumi, da je rezultat lažno pozitiven, je treba preskus ponoviti z inertno snovjo s podobno velikostjo delcev, kakršna je diatomejska zemlja, namesto celuloze. Druga možnost je, da se zmes preskusne snovi in celuloze z največjo hitrostjo gorenja ponovno preskusi v inertni atmosferi (vsebnost kisika < 2 % V/V).

2. **PODATKI**

Zaradi varnosti se za značilno oksidativno lastnost preskusne snovi šteje največja hitrost gorenja – ne srednja vrednost.

Za vrednotenje je pomembna največja vrednost hitrosti gorenja dane zmesi v nizu šestih preskusov.

Izdela se graf največje vrednosti hitrosti gorenja vsake zmesi v odvisnosti od koncentracije oksidanta. Iz grafa se določi največja hitrost gorenja.

Šest izmerjenih vrednosti hitrosti gorenja v enem nizu preskusov na zmesi z največjo hitrostjo gorenja se ne sme razlikovati od aritmetične sredine za več kot 10 %; sicer je treba izboljšati metodi mletja in mešanja.

Dobljena največja hitrost gorenja se primerja z največjo hitrostjo gorenja referenčne zmesi (glej 1.3).

Če se preskusi izvajajo v inertni atmosferi, se največja hitrost reakcije primerja s hitrostjo reakcije referenčne zmesi v inertni atmosferi.

3. POROČILO**3.1 POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- identiteta, sestava, čistost, vsebnost vlage itd., preskusne snovi;
- kakršna koli obdelava vzorca (npr. mletje, sušenje ...);
- v preskusih uporabljeni vir vžiga;
- rezultati meritev;
- način reagiranja (npr. hitro gorenje na površini, gorenje skozi celotno maso, kakršne koli informacije o produktih izgorevanja ...);
- vse dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov, vključno z opisom silovitosti (plamenenje, iskrenje, dimljenje, počasno tlenje itd.) in približno trajanje, ugotovljeno v predhodnih varnostnih/presajalnih preskusih za preskusno in referenčno snov;
- rezultati preskusov z inertno snovjo, če so bili izvedeni;
- rezultati preskusov v inertni atmosferi, če so bili izvedeni.

3.2 RAZLAGA REZULTATA

Šteje se, da je snov oksidativna, kadar:

- (a) je v predhodnem preskusu nastala silovita reakcija;
- (b) je v popolnem preskusu največja hitrost gorenja preskušanih zmesi večja ali enaka največji hitrosti referenčne zmesi celuloze in barijevega nitrata.

Da se izognemo lažno pozitivnim rezultatom, je treba pri razlagi rezultatov upoštevati tudi rezultate, dobljene pri preskušanju snovi, zmešane z inertnim materialom, in/ali pri preskušanju v inertni atmosferi.

4. VIRI

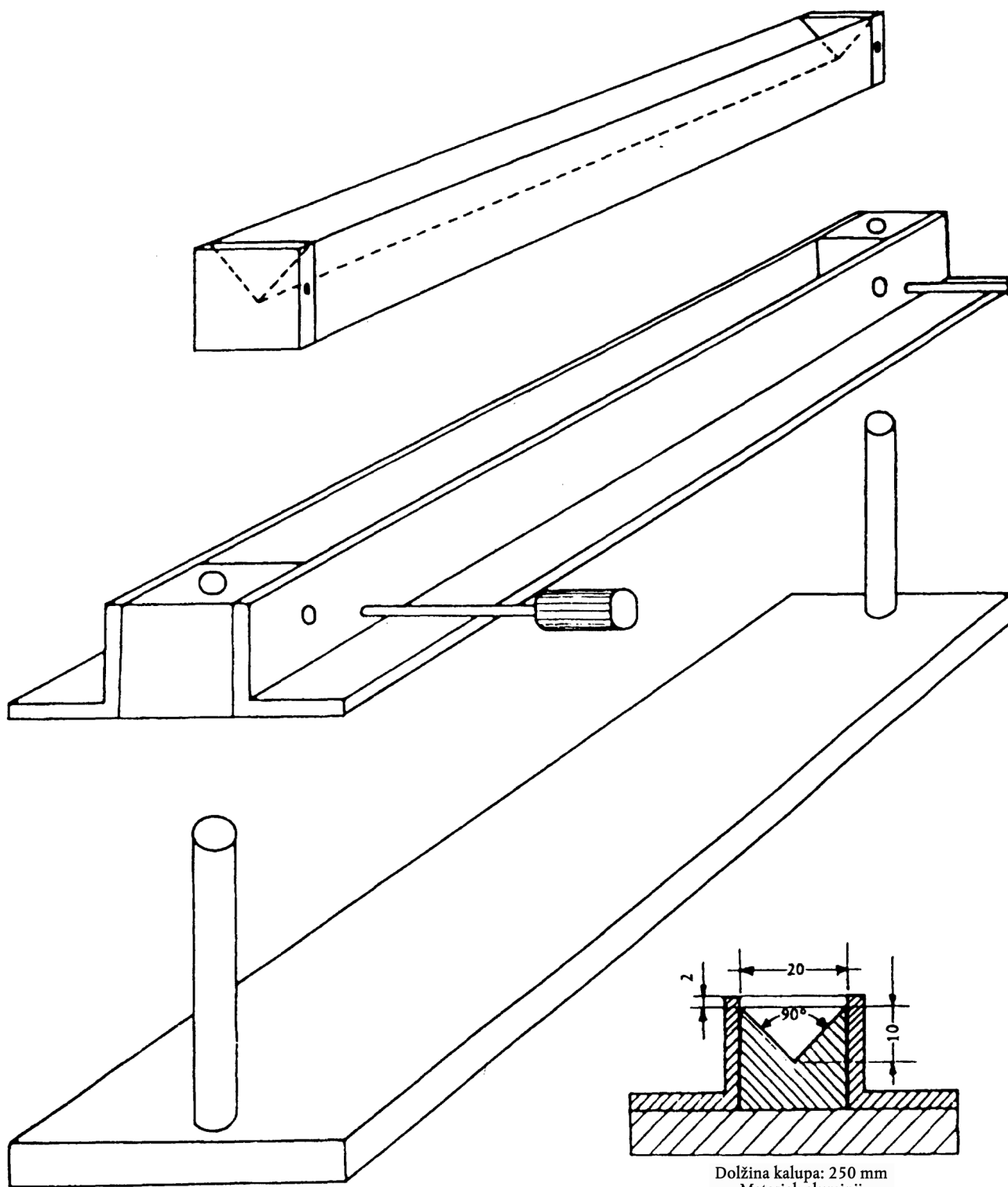
- (1) NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Dodatek

Slika

Kalup in pripomočki za pripravo kupčka

(Vse dimenzije so v milimetrih)



Dolžina kalupa: 250 mm
Material: aluminij

DEL B: METODE ZA DOLOČANJE STRUPENOSTI**SPLOŠNI UVOD: DEL B****A. UVOD**

Glej Splošni uvod.

B. OPREDELITVE POJMOV

- (i) Akutna strupenost obsega škodljive učinke, ki se pojavijo v določenem času (običajno 14 dneh) po dajanju enkratnega odmerka snovi.
- (ii) LD₅₀ (srednji smrtni odmerek) je statistično izpeljan enkratni odmerek snovi, za katerega se lahko pričakuje, da bo povzročil smrt pri 50 % živali, ki so prejele odmerek. Vrednost LD₅₀ se izrazi kot masa preskusne snovi na enoto telesne mase preskusne živali (miligrami na kilogram).
- (iii) LC₅₀ (srednja smrtna koncentracija) je statistično izpeljana koncentracija snovi, za katero se lahko pričakuje, da bo med izpostavljenostjo ali v določenem času po njej povzročila smrt pri 50 % živali, ki so bile izpostavljene za določen čas. Vrednost LC₅₀ se izrazi kot masa preskusne snovi na standardni volumen zraka (miligrami na liter).
- (iv) Raven brez škodljivega učinka je največji odmerek ali največja raven izpostavljenosti, uporabljena v preskusu, pri kateri ni opaznih znakov strupenosti.
- (v) Subakutna/subkronična strupenost obsega škodljive učinke, ki se pojavijo pri poskusnih živalih zaradi ponavljajočega se dnevnega odmerjanja snovi ali izpostavljenosti snovi za kratek čas njihove predvidene življenjske dobe.
- (vi) Največji tolerančni odmerek (MTD) je največji odmerek, ki povzroči znake strupenosti pri živalih, nima pa večjih učinkov na preživetje glede na preskus, v katerem se uporabi.
- (vii) Draženje kože je nastanek reverzibilnih vnetnih sprememb na koži po nanosu preskusne snovi.
- (viii) Draženje oči je nastanek reverzibilnih sprememb na očeh po nanosu preskusne snovi na sprednjo površino očesa.
- (ix) Povzročanje preobčutljivosti kože (senzibilizacija, alergijski kontaktni dermatitis) je imunološka kožna reakcija na snov.

Posebne opredelitve pojmov za strupenost pri vdihavanju

- aerosol je opredeljen kot delci (trdni in/ali tekoči), homogeno dispergirani v zraku
- aerodinamični premer je premer krogle z gostoto 1 (1 g cm⁻³), ki ima enako končno hitrost usedanja kot zadevni delec.
- srednji aerodinamični masni premer (MMAD) je izračunani aerodinamični premer, ki razpolovi porazdelitev velikosti delcev aerosola, kadar se meri z maso.
- geometrijska standardna deviacija (GSD) je razmerje med ocenjenima 84. in 50. percentilom in pokaže naklon krivulje kumulativne porazdelitve velikosti delcev, ob predpostavki, da je porazdelitev velikosti delcev logaritemsko normalna.

Posebne opredelitve pojmov za postopek s točno določenimi odmerki pri določanju akutne oralne strupenosti

- Očitna strupenost se nanaša na strupene učinke, opažene po dajanju preskusne snovi, ki so tako hudi, da bi dajanje naslednjega večjega odmerka lahko povzročilo smrt.
- Razlikovalni odmerek je največji od štirih točno določenih odmerkov, katerega dajanje ne bo povzročilo smrtnosti, povezane s snovjo (vključno s humanimi usmrčitvami).

C. MUTAGENOST (vključno s predhodnim presejalnim preskusom za rakotvornost)

Za predhodno presojo mutagenega potenciala snovi je treba pridobiti informacije o dveh vrstah končnih učinkov, in sicer genskih mutacijah in kromosomskih aberacijah.

Ti dve končni točki se ocenjujeta z naslednjimi preskusi:

- (i) Preskusi povzročanja genskih (točkovnih) mutacij v prokariotskih celicah, kot je *Salmonella typhimurium*; sprejemljivi so tudi preskusi z vrsto *Escherichia coli*. Izbiira med tema dvema preskusnima organizmoma je lahko odvisna od vrste preskusne snovi.
- (ii) Preskusi povzročanja kromosomskih aberacij v sesalskih celicah *in vitro*; sprejemljiv je tudi postopek *in vivo* (preskus mikronukleusov ali analiza metafaze v celicah kostnega mozga). Vendar kadar ni kontraindikacij, so metode *in vitro* mnogo bolj zaželeni.

D. VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Pri vrednotenju in razlagi rezultatov je treba upoštevati omejitve, znotraj katerih se lahko rezultati preskusov na živalih in preskusov *in vitro* neposredno ekstrapolirajo na človeka.

Kadar so na voljo dokazi o škodljivih učinkih pri človeku, so lahko pomembni za določanje možnih učinkov kemičnih snovi na ljudi.

E. REFERENČNA LITERATURA

Toksikologija je razvijajoča se eksperimentalna veja znanosti in za vsako tematiko obstaja obilica literature. Ustrezne informacije so na voljo v smernicah OECD za preskušanje kemikalij.

Dodatne opombe

Oskrba živali

Pri preskušanju strupenosti sta bistvenega pomena strog nadzor okoljskih pogojev in uporaba ustreznih postopkov za oskrbo živali.

- (i) Nastanitveni pogoji

Okoljski pogoji v prostorih ali kletkah za poskusne živali morajo biti primerni za preskusno vrsto. Za podgane, miši in morske prašičke so primerni pogoji sobna temperatura 22 ± 3 °C z relativno vlažnostjo od 30 do 70 %; za kunce mora biti temperatura 20 ± 3 °C z relativno vlažnostjo od 30 do 70 %.

Nekateri preskusni postopki so še posebej občutljivi za učinke temperature in v takih primerih se podrobnosti o ustreznih pogojih vključijo v opis preskusne metode. Pri vseh raziskavah strupenih učinkov je treba temperaturo in vlažnost zraka spremljati, zapisovati in vključiti v končno poročilo o študiji.

Pri umetni osvetlitvi bi morale biti normalno zaporedje 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Podrobnosti o vzorcu osvetlitve je treba zapisati in vključiti v končno poročilo o študiji.

Pomembno je, da se v poročilih o preskusih na živalih navedeta vrsta kletk in število živali v vsaki kletki, med izpostavljenostjo snovi in tudi v vsakem poznejšem obdobju opazovanja.

(ii) Pogoji hranjenja

Prehrana mora izpolnjevati vse prehranske zahteve preskusne vrste. Če se preskusne snovi živalim dajejo z njihovo hrano, lahko medsebojno vplivanje med snovjo in sestavino hrane zmanjša hranilno vrednost.

Možnost take reakcije je treba upoštevati pri razlagi rezultatov preskusa.

Kontaminanti v hrani, za katere je znano, da lahko vplivajo na strupenost, ne smejo biti prisotni v hrani v koncentracijah, ki lahko povzročijo motnje.

Dobro počutje živali

Pri razvijanju preskusnih metod je bilo ustrezno upoštevano dobro počutje živali. V nadaljevanju je na kratko opisanih nekaj primerov, vendar seznam ni izčrpen. Natančno besedilo in/ali pogoje je treba prebrati v besedilih metod:

- Za določanje akutne oralne strupenosti je vpeljana alternativna metoda „Postopek s točno določenimi odmerki“. Pri tem postopku specifična končna točka ni smrt. Uporabi se manj živali in povzroči manj bolečin in stresa kakor klasično določanje akutne oralne strupenosti.
- Število živali je zmanjšano na znanstveno sprejemljiv minimum: preskusi se le 5 živali istega spola na velikost odmerka pri metodah B.1 in B.3; le 10 živali (in le 5 za negativno kontrolno skupino) se uporabi za določanje senzibilizacije kože z maksimizacijskim preskusom na morskih prašičkih (metoda B.6); število živali, potrebnih za pozitivno kontrolo pri preskušanju mutagenosti *in vivo*, je tudi zmanjšano (metodi B.11 in B.12).
- Bolečina in stres živali med preskusi sta kar najbolj zmanjšana: živali, ki kažejo hude in dolgotrajne znake stresa in bolečine, bo morda treba humano usmrtiti; odmerjanja preskusnih snovi na način, za katerega je znano, da povzroča izrazito bolečino in stres zaradi jedkih ali dražilnih lastnosti, ni treba izvesti (metode B.1, B.2 in B.3).
- Uvedba mejnih preskusov omogoča, da se izognemo preskušanju z nepotrebno velikimi odmerki, ne le pri preskusih akutne strupenosti (metode B.1, B.2 in B.3), temveč tudi pri preskusih mutagenosti *in vivo* (metodi B.11 in B.12).
- Strategija preskušanja dražilnosti zdaj dopušča, da se preskus ne izvede ali da se omeji na študijo ene živali, če je na voljo dovolj znanstvenih dokazov.

Takšni znanstveni dokazi lahko temeljijo na fizikalno-kemijskih lastnostih snovi, rezultatih že opravljenih drugih preskusov ali na rezultatih validiranih preskusov *in vitro*. Če je bila na primer opravljena študija akutne strupenosti v stiku s kožo z mejnim preskusnim odmerkom snovi (metoda B.3) in ni bilo opaženo draženje kože, je lahko nadaljnje preskušanje draženja kože (metoda B.4) nepotrebno; snovi, ki so v študiji draženja kože pokazale jasne zanke jedkosti ali hudega draženja kože, ni treba nadalje preskušati na draženje oči (metoda B.5).

B.1 AKUTNA STRUPENOST (PRI ZAUŽITJU)**1. METODA****1.1 UVOD**

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITVE

Glej Splošni uvod, del B(B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se daje oralno z gavažo v stopnjevanih odmerkih več skupinam poskusnih živali, pri čemer se uporabi en odmerek na skupino. Izbrani odmerki lahko temeljijo na rezultatih preskusa za ugotavljanje območja. Nato se opazujejo učinki in smrtnost. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa tudi na preživelih živalih. Ta metoda je predvsem namenjena preiskavam na glodavskih vrstah.

Živali, ki kažejo hude in dolgotrajne znake stresa in bolečine, bo morda treba humano usmrtiti. Odmerjanja preskusnih snovi na način, za katerega je znano, da povzroča izrazito bolečino in stres zaradi jedkih ali dražilnih lastnosti, ni treba izvesti.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Priprave**

Najmanj pet dni pred začetkom preskusa se živali nastanijo v preskusnih pogojih nastanitve in hranjenja. Pred preskusom se zdrave mlade odrasle živali naključno izberejo in dodelijo tretiranim skupinam. Preskusna snov se po potrebi raztopi ali suspendira v ustreznem nosilcu. Priporoča se, da se, kadar je le mogoče, kot prva možnost izbere vodna raztopina, nato raztopina v rastlinskem olju in šele nato raztopina v drugih nosilcih ali suspenzija. Pri nevodnih nosilcih je treba poznati bistvene strupene lastnosti nosilca oziroma jih določiti pred ali med preskusom. Pri glodavcih volumen običajno ne bi smel presegati 10 ml/kg telesne mase, razen v primeru vodnih raztopin, kjer se lahko uporabi volumen 20 ml/kg. S prilagoditvijo koncentracije je treba čim bolj zmanjšati spremenljivost preskusnega volumna, tako da se zagotovi stalni volumen pri vseh velikostih odmerkov.

1.6.2 Preskusni pogoji**1.6.2.1 Poskusne živali**

Razen v primeru kontraindikacij, je podgana najprimernejša vrsta.

Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve. Ob začetku preskusa pri nobenem spolu območje nihanja mase uporabljenih živali ne sme presežati $\pm 20 \%$ ustrezne srednje vrednosti.

1.6.2.2 Število in spol

Za vsako velikost odmerka se uporabi najmanj pet glodavcev. Vsi morajo biti istega spola. Če se uporabijo samice, morajo biti nulipare in nebreje. Kadar so na voljo informacije, da je eden od spolov izrazito občutljivejši, je treba snov odmeriti živalim tega spola.

Opomba: Pri preskusih akutne strupenosti na živalih iz sistematskih skupin, višjih od glodavcev, je treba razmisliti o uporabi manjšega števila živali.

Odmerke je treba skrbno izbrati in treba si je čim bolj prizadevati, da se ne presežejo zmerno strupeni odmerki. Pri takih preskusih se je treba izogibati dajanju smrtnih odmerkov preskusne snovi.

1.6.2.3 Velikost odmerkov

Teh mora biti dovolj, najmanj tri, in biti morajo v primernih intervalih koncentracij, da pri preskusnih skupinah povzročijo niz različnih strupenih učinkov in stopenj umrljivosti. Podatki morajo zadoščati za izdelavo krivulje odmerka/odziva in, kadar je mogoče, omogočiti sprejemljivo določitev LD₅₀.

1.6.2.4 Mejni preskus

Kadar se uporabijo glodavci, se lahko izvede mejni preskus pri eni velikosti odmerka najmanj 2000 mg/kg telesne mase na skupini petih samcev in petih samic po spodaj opisanem postopku. Če se pojavi smrtnost, povezana s snovjo, bo morda potrebna popolna študija.

1.6.2.5 Obdobje opazovanja

Obdobje opazovanja mora trajati najmanj 14 dni. Vendar trajanje opazovanja ne sme biti strogo določeno. Določeno mora biti na podlagi reakcij na strupenost, hitrosti njihovega pojavljanja in dolžine obdobja okrevanja; kadar se zdi potrebno, se lahko podaljša. Čas pojava in izginotja znakov strupenosti ter čas smrti sta pomembna, zlasti če se kaže težnja časovnega zamika smrti.

1.6.3 Postopek

Živali je treba pred dajanjem preskusne snovi postiti. Pri podgani se živali pustijo brez hrane čez noč; pri živalih s hitrejšo presnovo je primernejše krajše obdobje posta; voda se ne omeji. Naslednji dan je treba živali stehitati, nato se jim z gavažo da enkratni odmerek preskusne snovi. Če odmerka ni mogoče dati naenkrat, se lahko daje po manjših delih, v obdobju, ki ni daljše od 24 ur. Po dajanju snovi se lahko živalim odtegne hrana za nadaljnje tri do štiri ure. Če se odmerek daje po delih v določenem obdobju, bo morda treba živali oskrbeti s hrano in vodo, odvisno od dolžine tega obdobja.

Po dajanju snovi se izvaja sistematično opazovanje in zapisovanje, pri čemer je treba voditi evidenco za vsako žival posebej. Prvi dan morajo biti opazovanja pogosta.

Najmanj enkrat na dan vsak delavnik je treba izvesti temeljit klinični pregled, druga opazovanja pa se izvajajo vsak dan, z ustreznimi ukrepi za zmanjševanje izgube živali v študiji, npr. z obdukcijo ali ohladitvijo poginulih živali in osamitvijo ali žrtvovanjem šibkih ali umirajočih živali. Opazovati je treba spremembe na koži in kožuhu, očeh in sluznici ter tudi v dihalih, obtočilih, avtonomnem in osrednjem živčevju, somatomotorični aktivnosti in vedenjskem vzorcu. S posebno pozornostjo je treba opazovati tremor, krče, slinjenje, diarejo, letargijo, spanje in komo. Čas smrti je treba zapisati čim bolj natančno.

Na živalih, ki poginejo med preskusom, in tistih, preživelih ob koncu preskusa, se opravi obdukcija. Zapisati je treba vse makroskopske patološke spremembe. Kjer je tako navedeno, je treba vzeti vzorec tkiva za histopatološko preiskavo.

Ocena strupenosti pri drugem spolu

Po zaključku študije na enem spolu, se snov odmeri vsaj eni skupini petih živali drugega spola, da se ugotovi, ali so živali tega spola izrazito občutljivejše za preskusno snov. V posameznih primerih je upravičena uporaba manjšega števila živali. Kadar so na voljo zadovoljive informacije, ki kažejo, da so živali preskušene spola izrazito občutljivejše, preskušanje živali drugega spola ni potrebno.

2. PODATKI

Podatke je treba povzeti v tabeli, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, čas smrti posameznih živali, število živali, ki kažejo druge znake strupenosti, opis strupenih učinkov in izsledke obdukcije. Maso posameznih živali je treba določiti in zapisati tik pred dajanjem preskusne snovi, vsak teden zatem ter ob smrti. Spremembe v masi je treba izračunati in zapisati, kadar preskusna žival preživi več kakor en dan. Živali, ki se humano usmrtijo zaradi s snovjo povezanih stresa in bolečine, se zapišejo kot s snovjo povezane smrti. LD_{50} se lahko določi s pomočjo priznane metode. Vrednotenje podatkov mora vključevati morebitno razmerje med izpostavljenostjo živali preskusni snovi ter incidenco in resnostjo vseh nepravilnosti, vključno z vedenjskimi in kliničnimi nepravilnostmi, hujšimi poškodbami, spremembami v telesni masi, smrtnostjo in kakršnimi koli drugimi strupenimi učinki.

3. POROČANJE**3.1 POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, prehrana itd.;
- preskusni pogoji;
- velikost odmerkov (z nosilcem, če je bil uporabljen, in koncentracijo);
- spol živali, ki so prejele preskusno snov;
- tabelarni prikaz podatkov o odzivu po spolu in velikosti odmerka (tj. število živali, ki so poginile ali bile usmrčene med preskusom, število živali, ki kažejo znake strupenosti, število izpostavljenih živali);
- čas smrti po odmerjanju, razlogi in merila za humano usmrtitev živali;
- vsa opažanja;
- vrednost LD_{50} za spol, na katerem je bila opravljena popolna študija, določena po 14 dneh (z navedeno metodo določanja);
- 95 % interval zaupanja za LD_{50} (kadar je to mogoče);
- krivulja odmerkov/smrtnost in naklon (če to omogoča metoda za določanje);
- izsledki obdukcije;
- kakršnikoli izsledki histopatoloških preiskav;
- rezultati kakršnih koli preskusov na drugem spolu;
- razprava o rezultatih (posebno pozornost je treba posvetiti morebitnemu učinku humanih usmrtitev med preskusom na izračunano vrednost LD_{50});
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. VIRI

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.1 bis AKUTNA STRUPENOST (PRI ZAUŽITJU) – METODA TOČNO DOLOČENEGA ODMERKA**1. METODA****1.1 UVOD**

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITVE

Glej Splošni uvod, del B(B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskus akutne oralne strupenosti nudi informacije o škodljivih učinkih, ki v kratkem času sledijo zaužitju enkratnega odmerka preskusne snovi.

Metoda točno določenega odmerka se izvede v dveh fazah.

V predhodni opazovalni študiji se zaporedno preučijo učinki različnih odmerkov, danih oralno z gavažo eni sami živali enega spola. Opazovalna študija da informacije o razmerju odmerka–strupenost, vključno z oceno najmanjšega smrtnega odmerka. Običajno se v tej prvi fazi uporabi največ pet živali.

V glavni študiji se snov da oralno z gavažo skupinam po pet samcev in pet samic, v eni od vnaprej določenih velikosti odmerka (5, 50, 500 ali 2 000 mg/kg). Na podlagi opazovalne študije se izbere odmerki, ki bo verjetno povzročil „očitno strupenost“ (glej 1.2 Opredelitev pojmov), vendar nobene smrti.

Po dajanju snovi, se opazujejo učinki.

Kadar začetna velikost odmerka povzroči očitno strupenost, vendar ne s snovjo povezane smrtnosti, nadaljnje preskušanje ni potrebno.

Kadar pri izbrani velikosti odmerka ni opaziti očitne strupenosti, je treba snov ponovno preskusiti z naslednjim večjim odmerkom. Kadar živali poginejo ali kadar je zaradi hude strupene reakcije treba živali humano usmrtiti, je treba snov ponovno preskusiti z naslednjim manjšim odmerkom.

Ta postopek omogoča določitev „razlikovalnega odmerka“ (glej 1.2 Opredelitev pojmov), to je največjega od vnaprej določenih odmerkov, ki se lahko daje, ne da bi povzročil smrtnost (vključno s humanimi usmrtitvami).

Živali, ki kažejo hude in dolgotrajne znake stresa in bolečine, bo morda treba humano usmrtiti. Odmerjanja preskusnih snovi na način, za katerega je znano, da povzroča izrazito bolečino in stres zaradi jedkih ali dražilnih lastnosti, ni treba izvesti.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Priprave****1.6.1.1 Poskusne živali**

Razen v primeru kontraindikacij, je podgana najprimernejša vrsta.

Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve. Ob začetku preskusa pri nobenem spolu območje nihanja mase uporabljenih živali ne sme presegati $\pm 20 \%$ ustrezne srednje vrednosti.

Najmanj pet dni pred začetkom preskusa se živali nastanijo v preskusnih pogojih nastanitve in hranjenja. Pred preskusom se zdrave mlade odrasle živali naključno izberejo in dodelijo opazovalni študiji in tretiranim skupinam glavne študije. V praksi bo lahko potrebna le po ena skupina za vsak spol za glavno študijo.

1.6.1.2 Priprava in dajanje odmerka

Preskusna snov se po potrebi raztopi ali suspendira v ustreznem nosilcu. Priporoča se, da se, kadar je le mogoče, kot prva možnost izbere vodna raztopina, nato raztopina v rastlinskem olju in šele nato raztopina v drugih nosilcih ali suspenzija. Pri nevodnih nosilcih je treba poznati bistvene strupene lastnosti nosilca oziroma jih določiti pred ali med preskusom. Pri glodavcih volumen običajno ne bi smel presegati 10 ml/kg telesne mase, razen v primeru vodnih raztopin, kjer se lahko uporabi volumen 20 ml/kg. S prilagoditvijo koncentracije je treba čim bolj zmanjšati spremenljivost preskusnega volumna, tako da se zagotovi stalni volumen pri vseh velikostih odmerkov.

Živali je treba pred dajanjem preskusne snovi postiti. Pri podgani se hrana odtegne čez noč; voda se ne omeji. Naslednji dan je treba živali stehtati, nato se jim z gavažo da enkratni odmerek preskusne snovi. Če odmerka ni mogoče dati naenkrat, se lahko daje po manjših delih, v obdobju, ki ni daljše od 24 ur. Po dajanju snovi se lahko živalim odtegne hrana za nadaljnje tri do štiri ure. Če se odmerek daje po delih v določenem obdobju, bo morda treba živali oskrbeti s hrano in vodo, odvisno od dolžine tega obdobja.

1.6.2 Postopek

1.6.2.1 Opazovalna študija

Preučijo se učinki različnih odmerkov pri posameznih živalih. Običajno se uporabijo samice, kadar ni informacij, da so samci občutljivejši spol. Odmerjanje je zaporedno, pri čemer se pred odmerjanjem snovi naslednji živali počaka najmanj 24 ur. Najmanj sedem dni se skrbno opazuje, ali živali kažejo znake strupenosti; če se znaki zmerne strupenosti kažejo vseh sedem dni, je treba žival opazovati še naprej, do največ sedem dodatnih dni. Izbira se med naslednjimi začetnimi velikostmi odmerkov: 5, 50, 500 in 2000 mg/kg. Če izbrana začetna velikost odmerka ne povzroči hude strupenosti in naslednji večji odmerek povzroči smrtnost, bo treba raziskati eno ali več vmesnih velikosti odmerka, kakor je primerno. Tako naj bi bilo mogoče zbrati informacije o velikostih odmerkov, ki povzročijo nekatere znake strupenosti, in najmanjšem odmerku, ki povzroči smrtnost.

Prizadevati si je treba izbrati začetni odmerek na podlagi podatkov o sorodnih snoveh. Če takih informacij ni, se predlaga, da se najprej uporabi odmerek 500 mg/kg. Če pri začetnem odmerku ni opaziti nobenih znakov strupenosti, se preuči naslednji večji odmerek. Če pri odmerku 2 000 mg/kg ni smrti, je opazovalna študija zaključena in glavna študija se izvede s to velikostjo odmerka. Če se pri začetnem odmerku (npr. 500 mg/kg) opazijo hudi učinki, zaradi katerih je potrebna humana usmrteitev, se drugi živali da naslednji manjši odmerek (npr. 50 mg/kg). Če ta žival preživi, se naslednjim živalim lahko odmerijo odmerki ustreznih vmesnih velikosti med točno določenimi odmerki. Običajno v tem postopku ni treba uporabiti več kot pet živali.

1.6.2.2 Glavna študija

Za vsako preučeno velikost odmerka je treba uporabiti najmanj 10 živali (pet samic in pet samcev). Samice morajo biti nulipare in nebreje.

Princip metode točno določenega odmerka je, da se v glavni študiji uporabijo le zmerno strupeni odmerki. Treba se je izogibati dajanju smrtnih odmerkov preskusne snovi.

Velikost odmerka, ki se bo uporabila v preskusu, se izbere izmed štirih točno določenih velikosti odmerka, to so 5, 50, 500 ali 2 000 mg/kg telesne mase. Izbrana začetna velikost odmerka mora biti taka, da verjetno povzroči očitno strupenost, vendar ne s snovjo povezane smrtnosti (vključno s humanimi usmrčitvami; naključne smrti niso vključene, morajo pa biti zapisane). Nadaljnje preskušanje ni potrebno, kadar ta velikost odmerka povzroči očitno strupenost, vendar ne s snovjo povezane smrtnosti.

Kadar dajanje izbrane velikosti odmerka ne povzroči očitne strupenosti, je treba snov ponovno preskusiti z naslednjim večjim odmerkom. Vendar je treba živali opazovati do konca obdobja opazovanja. Če je treba živali zaradi hude strupene reakcije humano usmrtiti ali če se pojavi s snovjo povezana smrtnost, je treba snov ponovno preskusiti z naslednjim manjšim odmerkom. Tudi v tem primeru je treba živali, ki jih ni treba humano usmrtiti, opazovati do konca obdobja opazovanja.

Po dajanju snovi se izvaja sistematično opazovanje in zapisovanje. Za vsako žival je treba voditi svojo evidenco.

Obdobje opazovanja mora trajati najmanj 14 dni. Vendar trajanje opazovanja ne sme biti strogo določeno. Določeno mora biti na podlagi reakcij na strupenost, hitrosti njihovega pojavljanja in dolžine obdobja okrevanja; kadar se zdi potrebno, se lahko podaljša. Čas pojava in izginotja znakov strupenosti ter čas smrti sta pomembna, zlasti če se kaže težnja časovnega zamika znakov strupenosti.

Temeljito klinično preiskavo je treba opraviti najmanj dvakrat na dan odmerjanja in nato najmanj enkrat na dan. Živali, ki očitno trpijo bolečine ali kažejo hude znake stresa, je treba humano usmrtiti. V prvih nekaj dneh po odmerjanju so potrebna dodatna opazovanja, če živali še naprej kažejo znake strupenosti. Preskus se lahko prekine, če postane očitno, da je izbrani začetni odmerek prevelik.

Opazovati je treba spremembe na koži in kožuhu, očeh in sluznici ter tudi v dihalih, obtočilih, avtonomnem in osrednjem živčevju, somatomotorični aktivnosti in vedenjskem vzorcu. S posebno pozornostjo je treba opazovati tremor, krče, slinjenje, diarejo, letargijo, spanje in komo.

Maso posameznih živali je treba določiti tik pred dajanjem preskusne snovi, vsak dan naslednje tri dni ter nato vsak teden. Živali, ki poginejo med preskusom, in tiste, prežive do konca preskusa, se stehajo in obducirajo. Zapisati je treba vse makroskopske patološke spremembe. Kadar je tako navedeno, je treba vzeti vzorec tkiva za histopatološko preiskavo.

Lahko je potrebna raziskava druge ali v izjemnih primerih tretje velikosti odmerka, odvisno od rezultatov pri prejšnji velikosti odmerka.

Kadar snov povzroči smrtnost pri 5 mg/kg telesne mase (ali kadar opazovalna študija kaže, da se bo pri tej velikosti odmerka pojavila smrtnost), bo morda treba akutno strupenost snovi dodatno raziskati.

2. **PODATKI**

Podatke opazovalne in glavne študije je treba povzeti v tabeli, ki za vsako preskušeno velikost odmerka prikazuje število živali na začetku preskusa; število živali, ki kažejo znake strupenosti; število živali, ki so bile najdene mrtve med preskusom ali so bile usmrčene zaradi humanih razlogov; opis strupenih učinkov in pri glavni študiji tudi, ali je bila opažena očitna s snovjo povezana strupenost; časovni potek vseh strupenih znakov; izsledke obdukcije. Spremembe v masi je treba izračunati in zapisati, kadar preskusna žival preživi več kakor en dan.

Živali, ki se humano usmrtijo zaradi s snovjo povezanih stresa in bolečine, se zapišejo kot s snovjo povezane smrti.

3. **POROČANJE**

3.1 **POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije za opazovalno in za glavno študijo, kakor je primerno:

— vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, prehrana itd.

— preskusni pogoji

- velikost odmerkov (z nosilcem, če je bil uporabljen, in koncentracijo)
- popolni rezultati za vse raziskane velikosti odmerkov
- tabelarni prikaz podatkov o odzivu po spolu in velikosti odmerka (npr. število uporabljenih živali; spremembe v telesni masi; kadar je primerno, število živali, ki so poginile ali so bile usmrčene med preskusom; število živali, ki kažejo znake strupenosti; vrsta, stopnja in trajanje učinkov)
- časovni potek pojavljanja znakov strupenosti in ali so bili reverzibilni
- kadar so živali poginile ali bile usmrčene, čas smrti po odmerjanju, razlogi in merila za humano usmritev živali
- izsledki obdukcije
- kakršnikoli izsledki histopatoloških preiskav
- razprava o rezultatih
- razlaga rezultatov, vključno z znaki očitne strupenosti in v preskusu določeno velikostjo razlikovalnega odmerka.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

ODMEREK	REZULTATI	RAZLAGA
5 mg/kg t. t.	Preživetje manj kot 100 %	Snovi, ki so ZELO STRUPENE.
	Preživetje 100 %; vendar očitna strupenost	Snovi, ki so STRUPENE.
	Preživetje 100 %; ni očitne strupenosti	Glej rezultate pri 50 mg/kg.
50 mg/kg t. t.	Preživetje manj kot 100 %	Snovi, ki so lahko STRUPENE ali ZELO STRUPENE. Glej rezultate pri 5 mg/kg.
	Preživetje 100 %; vendar očitna strupenost	Snovi, ki so ZDRAVJU ŠKODLJIVE.
	Preživetje 100 %; ni očitne strupenosti	Glej rezultate pri 500 mg/kg.
500 mg/kg t. t.	Preživetje manj kot 100 %	Snovi, ki so lahko STRUPENE ali ZDRAVJU ŠKODLJIVE. Glej rezultate pri 50 mg/kg.
	Preživetje 100 %; vendar očitna strupenost	Snovi, za katere se šteje, da niso značilno akutno strupene.
	Preživetje 100 %; ni očitne strupenosti	Glej rezultate pri 2000 mg/kg.
2 000 mg/kg t. t.	Preživetje manj kot 100 %	Glej rezultate pri 500 mg/kg.
	Preživetje 100 %; strupenost je ali ni očitna	Snovi, ki niso značilno akutno strupene.

Glej tudi Splošni uvod, del B(D).

4. VIRI

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.2 AKUTNA STRUPENOST (PRI VDIHAVANJU)**1. METODA****1.1 UVOD**

Koristno je imeti predhodne informacije o porazdelitvi velikosti delcev, parnem tlaku, tališču, vrelišču, plamenišču in eksplozivnosti (če je primerno) snovi.

Glej tudi Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITVE

Glej Splošni uvod, del B(B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Več skupin poskusnih živali se za določeno obdobje izpostavi preskusni snovi v stopnjevanih koncentracijah, pri čemer se uporabi ena koncentracija na skupino. Nato se opazujejo učinki in smrtnost. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa tudi na preživelih živalih.

Živali, ki kažejo hude in dolgotrajne znake stresa in bolečine, bo morda treba humano usmrtiti. Odmerjanja preskusnih snovi na način, za katerega je znano, da povzroča izrazito bolečino in stres zaradi jedkih ali hudih dražilnih lastnosti, ni treba izvesti.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Priprave**

Najmanj pet dni pred začetkom preskusa se živali nastanijo v preskusnih pogojih nastanitve in hranjenja. Pred preskusom se zdrave mlade živali naključno izberejo in dodelijo potrebnemu številu skupin. Živali ni treba izpostaviti simulirani izpostavljenosti, razen če tako določa vrsta uporabljene aparature za izpostavljanje.

Trdne preskusne snovi bo morda treba mikronizirati, da bo velikost delcev ustrezna.

Po potrebi se preskusni snovi lahko doda ustrezni nosilec, da se lažje doseže primerna koncentracija preskusne snovi v zraku, vendar je treba nato uporabiti kontrolno skupino za ta nosilec. Če se za lažje odmerjanje uporabi nosilec ali drugi dodatki, mora biti dokazano, da ne povzročajo strupenih učinkov. Če je primerno, se lahko uporabijo podatki preteklih študij.

1.6.2 Preskusni pogoji**1.6.2.1 Poskusne živali**

Razen v primeru kontraindikacij, je podgana najprimernejša vrsta. Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve. Ob začetku preskusa pri nobenem spolu območje nihanja mase uporabljenih živali ne sme presegati ± 20 % ustrezne srednje vrednosti.

1.6.2.2 Število in spol

Za vsako koncentracijo se uporabi najmanj 10 glodavcev (pet samic in pet samcev). Samice morajo biti nulipare in nebreje.

Opomba: Pri preskusih akutne strupenosti na živalih iz sistematskih skupin, višjih od glodavcev, je treba razmisliti o uporabi manjšega števila živali.

Odmerke je treba skrbno izbrati in treba si je čim bolj prizadevati, da se ne presežejo zmerno strupeni odmerki. Pri takih preskusih se je treba izogibati dajanju smrtnih odmerkov preskusne snovi.

1.6.2.3 Koncentracije izpostavljenosti

Teh mora biti dovolj, najmanj tri, in biti morajo v primernih intervalih koncentracij, da pri preskusnih skupinah povzročijo niz različnih strupenih učinkov in stopenj umrljivosti. Podatki morajo zadoščati za izdelavo krivulje smrtnosti v odvisnosti od koncentracije in, kadar je mogoče, omogočiti sprejemljivo določitev LC_{50} .

1.6.2.4 Mejni preskus

Če štiriurna izpostavljenost petih preskusnih samcev in petih samic 5 mg na liter plina ali aerosola tekoče ali trdne snovi (ali, če to zaradi fizikalnih ali kemijskih, vključno z eksplozivnimi, lastnosti preskusne snovi ni izvedljivo, največji dosegljivi koncentraciji preskusne snovi) v 14 dneh ne povzroči s snovjo povezane smrtnosti, se lahko šteje, da nadaljnje preskušanje ni potrebno.

1.6.2.5 Čas izpostavljenosti

Obdobje izpostavljenosti mora trajati štiri ure.

1.6.2.6 Oprema

Preskušanje na živalih se izvaja z opremo za vdihavanje, ki je zasnovana tako, da vzdržuje dinamični pretok zraka z najmanj 12 zamenjavami zraka na uro, da se zagotovi zadostna vsebnost kisika in enakomerna porazdelitev izpostavitvenega ozračja. Če se uporabi komora, mora biti zasnovana tako, da preskusne živali niso prenatrpane in so kar najbolj izpostavljene preskusni snovi z vdihavanjem. Splošno pravilo zagotavljanja stabilnosti ozračja v komori je, da skupni „volumen“ preskusnih živali ne sme presegati 5 % volumna preskusne komore. Lahko se uporabi nazooralno izpostavljanje, izpostavljanje samo glave ali izpostavljanje celega telesa v posamični komori; prva dva načina omogočata, da se sprejem preskusne snovi po drugih poteh čim bolj zmanjša.

1.6.2.7 Obdobje opazovanja

Obdobje opazovanja mora trajati najmanj 14 dni. Vendar trajanje obdobja opazovanja ne sme biti strogo določeno. Določeno mora biti na podlagi reakcij na strupenost, hitrosti njihovega pojavljanja in dolžine obdobja okrevanja; kadar se zdi potrebno, se lahko podaljša. Čas pojava in izginotja znakov strupenosti ter čas smrti sta pomembna, zlasti če se kaže težnja časovnega zamika smrti.

1.6.3 Postopek

Tik pred izpostavitvijo se živali stehtajo, nato se v za to določeni aparaturi izpostavijo preskusni koncentraciji za štiri ure, potem ko se je v komori vzpostavilo ravnovesje koncentracije. Čas uravnovešanja mora biti kratek. Med preskusom je treba vzdrževati temperaturo 22 ± 3 °C. V idealnih razmerah bi bilo treba relativno vlažnost vzdrževati med 30 in 70 %, vendar to v nekaterih primerih (npr. preskusi z nekaterimi aerosoli) ni izvedljivo. Vzdrževanje rahlega podtlaka v komori (≤ 5 mm vode) bo preprečilo uhajanje preskusne snovi v okolico. Med izpostavljenostjo se živalim ne dajeta ne hrana ne voda. Treba je uporabiti primerne sisteme za ustvarjanje in spremljanje preskusne atmosfere. Sistem mora zagotoviti, da se čim hitreje dosežejo stabilni pogoji izpostavljenosti. Komora mora biti zasnovana in upravljana tako, da se ohranja homogena porazdelitev preskusne atmosfere v njej.

Meriti ali spremljati je treba:

- pretok zraka (neprekinjeno).
- dejansko koncentracijo preskusne snovi, merjeno v območju dihanja najmanj trikrat med izpostavitvijo (pri nekaterih atmosferah, npr. aerosolih v velikih koncentracijah, bo morda potrebno bolj pogosto spremljanje). V obdobju izpostavljenosti se koncentracija ne sme spreminjati za več kot $\pm 15\%$ srednje vrednosti. Vendar je lahko pri nekaterih aerosolih taka stopnja nadzora nedosegljiva in je zato sprejemljiv večji razpon. Pri aerosolih je treba izvajati analizo velikosti delcev, tako pogosto kot je potrebno (najmanj enkrat na preskusno skupino).
- temperaturo in vlažnost, če je mogoče neprekinjeno.

Med izpostavitvijo in po njej se izvaja sistematično opazovanje in zapisovanje opažanj; za vsako žival je treba voditi svojo evidenco. Prvi dan morajo biti opazovanja pogosta. Najmanj enkrat na vsak delavnik je treba izvesti temeljit klinični pregled, druga opazovanja pa se izvajajo vsak dan, z ustreznimi ukrepi za zmanjševanje izgube živali v študiji, npr. z obdukcijo ali ohladitvijo poginulih živali in osamitvijo ali žrtvovanjem šibkih ali umirajočih živali.

Opazovati je treba spremembe na koži in kožuhu, očeh, sluznici, dihalih, obtočilih, avtonomnem in osrednjem živčevju ter somatomotorični aktivnosti in vedenjskem vzorcu. S posebno pozornostjo je treba opazovati dihanje, tremor, krče, slinjenje, diarejo, letargijo, spanje in komo. Čas smrti je treba zapisati čim bolj natančno. Maso posameznih živali je treba določati vsak teden po izpostavljenosti in ob smrti.

Na živalih, ki poginejo med preskusom, in tistih, preživelih ob koncu preskusa, se opravi obdukcija, pri kateri se posebna pozornost posveti vsem spremembam v zgornjem in spodnjem predelu dihalne poti. Zapisati je treba vse makroskopske patološke spremembe. Kadar je tako navedeno, je treba vzeti vzorec tkiva za histopatološko preiskavo.

2. PODATKI

Podatke je treba povzeti v tabeli, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, čas smrti posameznih živali, število živali, ki kažejo druge znake strupenosti, opis strupenih učinkov in izsledke obdukcije. Spremembe v masi je treba izračunati in zapisati, kadar preskusna žival preživi več kakor en dan. Živali, ki se humano usmrtijo zaradi s snovjo povezanih stresa in bolečine, se zapišejo kot s snovjo povezane smrti. LC_{50} je treba določiti s pomočjo priznane metode. Vrednotenje podatkov mora vključevati morebitno razmerje, med izpostavljenostjo živali preskusni snovi ter incidenco in resnostjo vseh nepravilnosti, vključno z vedenjskimi in kliničnimi nepravilnostmi, hujšimi poškodbami, spremembami v telesni masi, smrtnostjo in kakršnimi koli drugimi strupenimi učinki.

3. POROČANJE

3.1 POROČILO O PRESKUSU

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, prehrana itd.;
- preskusni pogoji: opis aparature za izpostavljanje

vključno z načrtom, vrsto, merami, virom zraka, sistemom za proizvodnjo aerosolov, metodo za klimatiziranje zraka in metodo namestitve živali v preskusni komori, če je bila uporabljena. Opisati je treba opremo za merjenje temperature, vlažnosti ter koncentracije in porazdelitve velikosti delcev aerosolov.

Podatki o izpostavitvi

Ti morajo biti zbrani v tabeli in prikazani s srednjimi vrednostmi in mero variabilnosti (npr. standardna deviacija) ter po možnosti vključevati:

- (a) pretok zraka skozi opremo za vdihavanje;
- (b) temperaturo in vlažnost zraka;

- (c) nazivne koncentracije (količnik skupne količine preskusne snovi, vnesene v opremo za vdihavanje, in volumna zraka);
- (d) vrsto nosilca, če je bil uporabljen;
- (e) dejanske koncentracije v preskusnem območju dihanja;
- (f) srednji aerodinamični masni premer (MMAD) in geometrijsko standardno deviacijo (GSD);
- (g) čas uravnovešanja koncentracije;
- (h) obdobje izpostavljenosti;
- tabelarni prikaz podatkov o odzivu po spolu in ravni izpostavljenosti (tj. število živali, ki so poginile ali bile usmrčene med preskusom; število živali, ki kažejo znake strupenosti; število izpostavljenih živali);
- čas smrti med izpostavitvijo ali po njej, razlogi in merila za humano usmrtitev živali;
- vsa opažanja;
- vrednost LC_{50} za vsak spol, določena ob koncu obdobja opazovanja (z navedeno metodo izračunavanja);
- 95 % interval zaupanja za LC_{50} (kadar je to mogoče);
- krivulja odmerka/smrti in naklon (kadar to omogoča metoda določanja);
- izsledki obdukcije;
- kakršnikoli izsledki histopatoloških preiskav;
- razprava o rezultatih (posebno pozornost je treba posvetiti morebitnemu učinku humanih usmrtitev med preskusom na izračunano vrednost LC_{50});
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. VIRI

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.3 AKUTNA STRUPENOST (V STIKU S KOŽO)**1. METODA****1.1 UVOD**

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITVE

Glej Splošni uvod, del B(B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se nanese na kožo v stopnjevanih odmerkih več skupinam poskusnih živali, pri čemer se uporabi en odmerek na skupino. Nato se opazujejo učinki in smrtnost. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa tudi na preživelih živalih.

Živali, ki kažejo hude in dolgotrajne znake stresa in bolečine, bo morda treba humano usmrtiti. Odmerjanja preskusnih snovi na način, za katerega je znano, da povzroča izrazito bolečino in stres zaradi jedkih ali dražilnih lastnosti, ni treba izvesti.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Priprave**

Najmanj pet dni pred začetkom preskusa se živali nastanijo v preskusnih kletkah v preskusnih pogojih nastanitve in hranjenja. Pred preskusom se zdrave mlade odrasle živali naključno izberejo in dodelijo tretiranim skupinam. Približno 24 ur pred preskusom je treba živalim s hrbtnega dela trupa s striženjem ali britjem odstraniti dlako. Med striženjem ali britjem dlake je treba paziti, da se koža ne odrgne, kar bi lahko spremenilo njeno prepustnost. Za nanos preskusne snovi je treba pripraviti najmanj 10 % telesne površine. Pri preskušanju trdnih snovi, ki se po potrebi lahko uprašijo, je treba preskusno snov dovolj navlažiti z vodo ali, kadar je potrebno, ustreznim nosilcem, da se zagotovi dober stik s kožo. Pri uporabi nosilca je treba upoštevati njegov vpliv na prodiranje preskusne snovi skozi kožo. Tekoče preskusne snovi se običajno uporabljajo nerazredčene.

1.6.2 Preskusni pogoji**1.6.2.1 Poskusne živali**

Uporabi se lahko odrasla podgana ali kunec. Uporabijo se lahko tudi druge vrste, vendar je treba njihovo uporabo utemeljiti. Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve. Ob začetku preskusa pri nobenem spolu območje nihanja mase uporabljenih živali ne sme presegati ± 20 % ustrezne srednje vrednosti.

1.6.2.2 Število in spol

Za vsako velikost odmerka se uporabi najmanj 5 živali. Vse morajo biti istega spola. Če se uporabijo samice, morajo biti nulipare in nebreje. Kadar so na voljo informacije, da je eden od spolov izrazito občutljivejši, je treba snov odmeriti živalim tega spola.

Opomba: Pri preskusih akutne strupenosti na živalih iz sistematskih skupin, višjih od glodavcev, je treba razmisliti o uporabi manjšega števila živali. Odmerke je treba skrbno izbrati in treba si je čim bolj prizadevati, da se ne presežejo zmerno strupeni odmerki. Pri takih preskusih se je treba izogibati dajanju smrtnih odmerkov preskusne snovi.

1.6.2.3 Velikost odmerkov

Teh mora biti dovolj, najmanj tri, in biti morajo v primernih intervalih koncentracij, da pri preskusnih skupinah povzročijo niz različnih strupenih učinkov in stopenj umrljivosti. Pri določanju velikosti odmerkov je treba upoštevati vse dražilne ali jedke učinke. Podatki morajo zadoščati za izdelavo krivulje odmerka/odziv in, kadar je mogoče, omogočiti sprejemljivo določitev LD₅₀.

1.6.2.4 Mejni preskus

Lahko se izvede mejni preskus pri eni velikosti odmerka najmanj 2000 mg/kg telesne mase na skupini 5 samcev in 5 samic po spodaj opisanem postopku. Če se pojavi smrtnost, povezana s snovjo, bo morda potrebna popolna študija.

1.6.2.5 Obdobje opazovanja

Obdobje opazovanja mora trajati najmanj 14 dni. Vendar trajanje opazovanja ne sme biti strogo določeno. Določeno mora biti na podlagi reakcij na strupenost, hitrosti njihovega pojavljanja in dolžine obdobja okrevanja; kadar se zdi potrebno, se lahko podaljša. Čas pojava in izginotja znakov strupenosti, njihovo trajanje ter čas smrti so pomembni, zlasti če se kaže težnja časovnega zamika smrti.

1.6.3 Postopek

Vsaka žival mora biti v svoji kletki. Preskusno snov je treba enakomerno nanesti na območje, ki predstavlja približno 10 % skupne telesne površine. Pri zelo strupenih snoveh je lahko površina nanosa manjša, vendar mora biti čim več površine pokrite s čim tanjšo in enakomerno plastjo.

Snov mora ostati v stiku s kožo celo 24-urno obdobje izpostavljenosti, kar se zagotovi s poroznim gaznim povojem in nedražilnim obližem. Preskusna površina mora biti dodatno ustrezno pokrita, da gazni povoj in preskusna snov ostaneta na istem mestu in se živalim prepreči zaužitje preskusne snovi. Za preprečitev zaužitja se lahko uporabijo pripomočki za omejevanje gibanja, vendar popolna imobilizacija ni priporočena metoda.

Ob koncu obdobja izpostavljenosti se ostanek preskusne snovi odstrani, kadar je to izvedljivo, z vodo ali kako drugo ustrezno metodo čiščenja kože.

Opazovanja se beležijo sistematično in sproti. Za vsako žival je treba voditi svojo evidenco. Prvi dan morajo biti opazovanja pogosta. Najmanj enkrat na vsak delavnik je treba izvesti temeljit klinični pregled, druga opazovanja pa se izvajajo vsak dan, z ustreznimi ukrepi za zmanjševanje izgube živali v študiji, npr. z obdukcijo ali ohladitvijo poginulih živali in osamitvijo ali žrtvovanjem šibkih ali umirajočih živali.

Opazovati je treba spremembe na kožuhu, tretirani koži, očeh in sluznici ter tudi v dihalih, obtočilih, avtonomnem in osrednjem živčevju, somatomotorični aktivnosti in vedenjskem vzorcu. S posebno pozornostjo je treba opazovati tremor, krče, slinjenje, diarejo, letargijo, spanje in komo. Čas smrti je treba zapisati kolikor je mogoče natančno. Na živalih, ki poginejo med preskušanjem, in tistih, preživelih ob koncu preskusa, se opravi obdukcija. Zapisati je treba vse makroskopske patološke spremembe. Kadar je tako navedeno, je treba vzeti vzorec tkiva za histopatološko preiskavo.

Ocena strupenosti pri drugem spolu

Po zaključku študije na enem spolu, se snov odmeri najmanj eni skupini 5 živali drugega spola, da se ugotovi, ali so živali tega spola izrazito občutljivejše za preskusno snov. V posameznih primerih je upravičena uporaba manjšega števila živali. Kadar so na voljo zadovoljive informacije, ki kažejo, da so živali preskušene spola izrazito občutljivejše, preskušanje živali drugega spola ni potrebno.

2. PODATKI

Podatke je treba povzeti v tabeli, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, čas smrti posameznih živali, število živali, ki kažejo druge znake strupenosti, opis strupenih učinkov in izsledke obdukcije. Maso posameznih živali je treba določiti in zapisati tik pred nanašanjem preskusne snovi, vsak teden po tem ter ob smrti; spremembe v masi je treba izračunati in zapisati, kadar preskusna žival preživi več kakor en dan. Živali, ki se humano usmrtijo zaradi s snovjo povezanih stresa in bolečine, se zapišejo kot s snovjo povezane smrti. LD_{50} je treba določiti s pomočjo priznane metode.

Vrednotenje podatkov mora vključevati vrednotenje morebitnih razmerij med izpostavljenostjo živali preskusni snovi ter incidenco in resnostjo vseh nepravilnosti, vključno z vedenjskimi in kliničnimi nepravilnostmi, hujšimi poškodbami, spremembami v telesni masi, smrtnostjo in kakršnimi koli drugimi strupenimi učinki.

3. POROČANJE**3.1 POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, prehrana itd.;
- preskusni pogoji (vključno z metodo čiščenja kože in vrsto povoja: okluzivni ali neokluzivni);
- velikost odmerkov (z nosilcem, če se uporablja, in koncentracijami);
- spol živali, ki so prejele preskusno snov;
- tabelarni prikaz podatkov o odzivu po spolu in velikosti odmerka (tj. število živali, ki so poginile ali so bile usmrčene med preskusom; število živali, ki kažejo znake strupenosti; število izpostavljenih živali);
- čas smrti po odmerjanju, razlogi in merila za humano usmrtitev živali;
- vsa opažanja;
- vrednost LD_{50} za spol, na katerem je bila opravljena popolna študija, določena po 14 dneh z navedeno metodo določanja;
- 95 % interval zaupanja za LD_{50} (kadar je to mogoče);
- krivulja odmerkov/smrtnost in naklon, kadar to omogoča metoda določanja;
- izsledki obdukcije;
- kakršnikoli izsledki histopatoloških preiskav;
- rezultati kakršnih koli preskusov na drugem spolu;
- razprava o rezultatih (posebno pozornost je treba posvetiti morebitnemu učinku humanih usmrtitev živali med preskusom na izračunano vrednost LD_{50});
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. VIRI

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.4 AKUTNA STRUPENOST (DRAŽENJE KOŽE)**1. METODA****1.1 UVOD**

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITVE

Glej Splošni uvod, del B(B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE**Začetni preudarki**

Temeljito je treba preučiti vse razpoložljive informacije o snovi, da se čim bolj omeji preskušanje snovi v pogojih, ki lahko povzročijo hude reakcije. Pri preudarjanju, ali je primerno izvesti popoln preskus ali študijo na eni živali ali pa nadaljnje preskušanje ni primerno, so koristne naslednje informacije.

- (i) Fizikalno-kemijske lastnosti in kemična reaktivnost. Močno kisle ali bazične snovi (na primer s pH 2 ali manj oziroma 11,5 ali več) morda ni treba preskušati za primarno draženje kože, če se lahko pričakujejo jedke lastnosti. Upoštevati je treba tudi bazno ali kislinsko rezervo.
- (ii) Če so na voljo prepričljivi dokazi o hudih učinkih pri dobro validiranih preskusih *in vitro*, popolni preskus morda ni potreben.
- (iii) Rezultati študij akutne strupenosti. Če je bil opravljen preskus akutne strupenosti v stiku s kožo z mejnim preskusnim odmerkom snovi (2 000 mg/kg telesne mase) in ni bilo opaženo draženje kože, je lahko nadaljnje preskušanje draženja kože nepotrebno. Prav tako ni potrebno preskušanje snovi, za katere je bilo dokazano, da so zelo strupene pri vnosu skozi kožo.

Preskusna snov se v enkratnem odmerku nanese na kožo več poskusnih živali, pri čemer je vsaka žival tudi svoja kontrola. Po določenem času se odčita in ovrednoti stopnja draženja ter podrobneje opiše za zagotovitev popolnega ovrednotenja učinkov. Opazovanja morajo trajati dovolj dolgo za popolno ovrednotenje reverzibilnosti opaženih učinkov.

Živali, ki kažejo hude in dolgotrajne znake stresa in bolečine, bo morda treba humano usmrtiti.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Priprave**

Približno 24 ur pred začetkom preskusa je treba živalim s hrbtnega dela trupa s striženjem ali britjem odstraniti dlako.

Med striženjem ali britjem dlake je treba paziti, da se koža ne odrgne. Uporabijo se lahko le živali z zdravo, nepoškodovano kožo.

Nekateri sevi kuncev imajo goste skupke dlake, ki so bolj izraženi v določenih obdobjih leta. Preskusne snovi se ne smejo nanašati na ta območja goste dlake.

Pri preskušanju trdnih snovi (ki se po potrebi lahko uprašijo) je treba preskusno snov dovolj navlažiti z vodo ali, kadar je to potrebno, ustreznim nosilcem, da se zagotovi dober stik s kožo. Pri uporabi nosilca je treba upoštevati njegov vpliv na draženje kože, ki ga povzroči preskusna snov. Tekoče preskusne snovi se običajno uporabljajo nerazredčene.

1.6.2 Preskusni pogoji

1.6.2.1 Poskusne živali

Čeprav se lahko uporablja več sesalskih vrst, je albino kunec najprimernejša.

1.6.2.2 Število živali

Če se na podlagi rezultatov presejalnega preskusa *in vitro* ali drugih dejstev sumi, da bi snov lahko povzročila nekrozo (tj. da je jedka), je treba razmisliti o preskusu na eni sami živali. Če rezultati tega preskusa ne kažejo na jedkost, je treba preskus izvesti do konca z najmanj dvema dodatnima živalma.

Za popolni preskus se uporabijo najmanj tri zdrave odrasle živali. Ne potrebujemo posebnih živali za netretirano kontrolno skupino. Morda bodo potrebne dodatne živali za razjasnitev dvoumnih odzivov.

1.6.2.3 Velikost odmerka

Razen v primeru kontraindikacij se na preskusno območje nanese 0,5 ml tekočine ali 0,5 g trdne ali poltrdne snovi. Za kontrolo preskusa se uporabijo bližnje površine netretirane kože pri vsaki živali.

1.6.2.4 Obdobje opazovanja

Trajanje obdobja opazovanja ne sme biti strogo določeno. Trajati mora dovolj dolgo, da je omogočeno popolno vrednotenje reverzibilnosti ali ireverzibilnosti opaženih učinkov, vendar običajno ni treba, da traja dlje kakor 14 dni po nanosu.

1.6.3 Postopek

Vsaka žival mora biti v svoji kletki. Preskusna snov se nanese na majhno površino (približno 6 cm²) kože in prekrije z blazinico iz gaze, ki se pritrdi z nedražilnim obližem. Pri tekočinah ali nekaterih pastoznih snoveh bo morda treba preskusno snov nanesti na blazinico iz gaze in potem to namestiti na kožo. Blazinica se z ustreznim okluzivnim ali polokluzivnim povojem ohlapno drži v stiku s kožo do konca obdobja izpostavljenosti. Živali je treba preprečiti dostop do blazinice in posledično zaužitje/vdihavanje preskusne snovi.

Ob koncu obdobja izpostavljenosti se ostanek preskusne snovi odstrani, kadar je to izvedljivo, z vodo ali ustreznim topilom, ne da bi se pri tem spremenil obstoječi odziv ali celovitost povrhnjice.

Običajno obdobje izpostavljenosti traja štiri ure.

Če se sumi, da bi snov lahko povzročila nekrozo (tj. da je jedka), je treba obdobje izpostavljenosti skrajšati (npr. na eno uro ali tri minute). Pri takem preskušanju se lahko tudi najprej uporabi le ena žival in, če tega ne izključuje akutna strupenost preskusne snovi v stiku s kožo, se lahko na to žival hkrati pritrdijo tri blazinice. Prva blazinica se odstrani po treh minutah. Če ni opaziti resne kožne reakcije, se druga blazinica odstrani po eni uri. Če v tej fazi opažanja kažejo, da je potrebna in da se lahko humano izvede štiriurna izpostavljenost, se tretja blazinica odstrani po štirih urah in določi stopnja odzivov.

V tem primeru (tj. kadar je bila možna štiriurna izpostavljenost) se preskus dokonča z uporabo najmanj dveh dodatnih živali, razen če se to šteje za nehumano (npr. če se po štiriurni izpostavljenosti opazi nekroza).

Če se opazi resna kožna reakcija (npr. nekroza) bodisi po treh minutah bodisi po eni uri, se preskus nemudoma prekine.

Določeni pogoji lahko zahtevajo daljša obdobja izpostavljenosti, npr. predvideni vzorec uporabe in izpostavljenosti pri človeku.

1.6.3.1 Opazovanje in določanje stopnje

Opazovati je treba, ali živali kažejo znake kožne rdečine (eritema) in kožne otekline (edema), ter določiti stopnjo odziva 60 minut in nato 24, 48 in 72 ur po odstranitvi blazinice. Stopnja draženja kože se določa in beleži v skladu s sistemom iz tabele 1. Morda bodo potrebna nadaljnja opazovanja, če se v 72 urah dokončno ne določi reverzibilnost. Poleg opažanj v zvezi z draženjem je treba navesti tudi popoln opis vseh hujših poškodb, kot je npr. razjed (ireverzibilno uničenje kožnega tkiva), in drugih strupenih učinkov.

Za razjasnitev dvomljivih reakcij ali odzivov, prikritih zaradi obarvanja kože s preskusno snovjo, se lahko uporabijo tehnike, kot je histopatološka preiskava ali merjenje debeline kožne gube.

2. PODATKI

Podatke je treba povzeti v tabeli, ki za vsako posamezno žival prikazuje stopnjo draženja za nastanek rdečine in otekline v celem obdobju opazovanja. Zapisati je treba vse hujše poškodbe, opis stopnje in vrste draženja, reverzibilnost ali razjedami in kakršne koli druge opažene strupene učinke.

3. POROČANJE

3.1 POROČILO O PRESKUSU

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, prehrana itd.;
- preskusni pogoji (vključno z ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi snovi, postopkom priprave in čiščenja kože in vrsto povoja: okluzivni ali polokluzivni);
- tabelarni prikaz podatkov o odzivu na draženje za vsako posamezno žival za vsako obdobje opazovanja (npr. 1, 24, 48 in 72 ur itd., po odstranitvi blazinice);
- opis vseh opaženih hujših poškodb, vključno z razjedami;
- opis stopnje in vrste opaženega draženja in kakršnikoli izsledki histopatoloških preiskav;
- opis vseh drugih strupenih učinkov poleg draženja kože;
- razprava o rezultatih;
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. VIRI

Glej Splošni uvod, del B(E).

Dodatek

TABELA: DOLOČANJE STOPNJE KOŽNE REAKCIJE

Rdečina (eritem) in tvorba krast

	Vrednost
Ni rdečine	0
Zelo rahla rdečina (komaj opazna)	1
Dobro izražena rdečina	2
Zmerna do huda rdečina	3
Huda rdečina (temno rdeča) ali tvorba krast (globinske poškodbe), ki preprečuje ocenjevanje rdečine	4

Tvorba kožne otekline (edema)

Ni otekline	0
Zelo rahla oteklina (komaj opazna)	1
Rahla oteklina (robovi območja dobro izraženi z očitno izboklino)	2
Zmerna oteklina (robovi izbočeni približno 1 mm)	3
Huda oteklina (izbočena več kot 1 mm in sega čez območje izpostavljenosti)	4

B.5 AKUTNA STRUPENOST (DRAŽENJE OČI)

1. METODA

1.1 UVOD

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITVE

Glej Splošni uvod, del B(B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Začetni preudarki

Temeljito je treba preučiti vse razpoložljive informacije o snovi, da se čim bolj omeji preskušanje snovi v pogojih, ki lahko povzročijo hude reakcije. Pri tem so lahko koristne naslednje informacije:

- (i) Fizikalno-kemijske lastnosti in kemična reaktivnost. Močno kisle ali bazične snovi, za katere se na primer lahko pričakuje, da bodo v očesu povzročile pH 2 ali manj oziroma 11,5 ali več, morda ni treba preskušati, če se lahko pričakujejo hude poškodbe. Upoštevati je treba tudi bazno ali kislinsko rezervo.

- (ii) Rezultati drugih, dobro validiranih študij; snovi, za katere je bilo dokazano, da imajo možne jedke ali močno dražilne lastnosti, se ne smejo nadalje preskušati na draženje oči, saj se predpostavlja, da bodo take snovi pri preskusu po tej metodi povzročile hude učinke na očeh.
- (iii) Rezultati študij draženja kože. Snovi, ki so pri študiji draženja kože pokazale nedvomno jedko ali hudo draženje kože, se ne smejo nadalje preskušati za draženje oči, saj se predpostavlja, da bi take snovi lahko povzročile hude učinke na očeh.

Preskusna snov se nanese v enkratnem odmerku na eno od oči vsake od več poskusnih živali; netretirano oko se uporabi za kontrolo. V določenih časovnih razmakih se ocenjuje in vrednoti stopnja draženja ter podrobneje opiše za zagotovitev popolnega ovrednotenja učinkov. Opazovanja morajo trajati dovolj dolgo, da se popolno ovrednoti reverzibilnost ali ireverzibilnost opaženih učinkov.

Živali, ki kažejo hude in dolgotrajne znake stresa in bolečine, bo morda treba humano usmrtiti.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 Priprave

V 24 urah pred začetkom preskusa se vsaki izbrani poskusni živali pregledata obe očesi. Živali, ki kažejo znake draženja oči, očesnih okvar ali predhodno obstoječe poškodbe roženice, se ne smejo uporabiti.

1.6.2 Preskusni pogoji

1.6.2.1 Poskusne živali

Čeprav so bile uporabljene različne poskusne živali, se priporoča, da se preskusi izvajajo na zdravih odraslih albino kuncih.

1.6.2.2 Število živali

Če se pričakujejo izraziti učinki, je treba razmisliti o preskusu na eni sami živali. Če rezultati takega preskusa na enem kuncu kažejo, da je snov močno dražilna (reverzibilen učinek) ali jedka (ireverzibilen učinek) za oči ob uporabi opisanega postopka, nadaljnje preskušanje za draženje oči pri naslednjih živalih morda ni potrebno. Občasno je lahko primerno nadaljnje preskušanje na dodatnih živalih za raziskovanje posebnih vidikov.

Pri vseh preskusih, razen pri preskusu na eni živali, je treba uporabiti najmanj 3 živali. Za razjasnitev dvoumnih odzivov je včasih treba uporabiti dodatne živali.

1.6.2.3 Velikost odmerka

Pri preskušanju tekočin se uporabi odmerek 0,1 ml. Pri preskušanju trdnih in pastoznih snovi ter snovi v delcih mora biti uporabljena količina enaka 0,1 ml ali približno 0,1 g (maso je treba vedno zapisati). Če je preskusna snov trdna ali granularna, jo je treba zmleti v fin prah. Volumen snovi v delcih je treba izmeriti, potem ko se narahlo stisnejo, npr. s trkanjem na merilno posodo.

Pri snoveh v razpršilnikih ali aerosolnih razpršilnikih je treba tekočino odstraniti iz posode, je zbrati 0,1 ml in jo nakapati v oko, kakor je opisano za tekočine.

1.6.2.4 Obdobje opazovanja

Trajanje obdobja opazovanja ne sme biti strogo določeno. Trajati mora dovolj dolgo, da je omogočeno vrednotenje reverzibilnosti ali ireverzibilnosti opaženih učinkov, vendar običajno ni treba, da traja dlje kakor 21 dni po vkapavanju.

1.6.3 Postopek

Vsaka žival mora biti v svoji kletki. Spodnja veka se nežno odmakne od očesnega zrkla, nato se preskusna snov nakapa v veznično vrečico enega očesa vsake živali. Veki se nato približno eno sekundo nežno držita skupaj, da preskusna snov ne izteče. Drugo, netretirano oko, je kontrolno oko.

Če se meni, da bi snov lahko povzročila nesorazmerno hude bolečine, se lahko pred vkapavanjem preskusne snovi uporabi lokalni anestetik. Vrsta, koncentracija in čas vnosa lokalnega anestetika se skrbno izberejo tako, da njegova uporaba ne bo povzročila značilne spremembe v reakciji na preskusno snov. Kontrolno oko je treba podobno anestezirati.

Oči preskusnih živali se ne smejo spirati 24 ur po vkapavanju preskusne snovi. Po 24 urah se oči lahko sperejo, če se zdi primerno.

Pri nekaterih snoveh, ki jih ta preskus prikaže kot dražilne, bodo lahko potrebni dodatni preskusi na kuncih s spiranjem kmalu po vkapavanju snovi. V teh primerih se priporoča, da se uporabijo trije kunci. Pol minute po vkapavanju se oči kuncev pol minute spirajo s takima volumnom in pretokom, ki ne povzročata poškodb.

1.6.3.1 Opazovanje in določanje stopnje

Oči je treba pregledati po 1, 24, 48 in 72 urah. Če po 72 urah ni vidnih poškodb oči, se študija lahko zaključi.

Ob dolgotrajnem draženju roženice ali drugih oblikah draženja očesa, bo morda potrebno daljše opazovanje, da se določi napredovanje poškodb in njihova reverzibilnost ali ireverzibilnost. Poleg opaženih sprememb roženice, šarenice in veznice je treba zapisati tudi vse druge opažene poškodbe in jih vključiti v poročilo. Stopnje očesne reakcije (tabela) je treba zapisati pri vsakem pregledu. (Stopnja očesnih odzivov se lahko določa na podlagi različnih razlag. Preskusnim laboratorijem in vsem, ki opravljajo in razlagajo opazovanja, so lahko v pomoč ilustrirana navodila za preskušanje draženja oči.)

Preučevanje reakcij se lahko olajša z binokularno lupo, ročno šprajsko svetilko, biomikroskopom ali drugo ustrezno napravo. Potem ko se zapišejo opažanja po 24 urah, se lahko oči nekaterih ali vseh kuncev dodatno pregledajo s pomočjo fluoresceina.

2. PODATKI

Podatke je treba povzeti v tabeli, ki za vsako posamezno žival prikazuje stopnje draženja ob določenem času opazovanja. V poročilu se navede opis stopnje in vrste draženja, prisotnost hudih poškodb in vseh drugih opaženih učinkov, poleg očesnih.

3. POROČANJE

3.1 POROČILO O PRESKUSU

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- podatki o živalih (vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, prehrana itd.);
- preskusni pogoji (vključno z ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi preskusne snovi);
- tabelarni prikaz podatkov o dražilnih/jedkih učinkih za vsako posamezno žival ob vsakem času opazovanja (npr. 1, 24, 48 in 72 ur);
- opis vseh opaženih hujših poškodb;
- opis stopnje in vrste opaženega draženja ali razjedanja, vključno s površino prizadete roženice, ter reverzibilnost;

- opis metode, uporabljene za določanje stopnje draženja po 1, 24, 48 in 72 urah (npr. ročna špranjska svetilka, biomikroskop, fluorescein);
 - opis vseh opaženih neočesnih lokalnih učinkov;
 - razprava o rezultatih;
 - razlaga rezultatov.
- 3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA
- Glej Splošni uvod, del B(D).
4. **VIRI**
- Glej Splošni uvod, del B(E).

Dodatek

DOLOČANJE STOPNJE OČESNIH POŠKODB

Roženica

Motnjava: stopnja gostote (za odčitavanje izbrana najgostejša površina)

Brez razjed ali motnjave	0
Posamična ali razpršena področja motnjave (ne le rahlo manjši normalni lesk), jasno vidne podrobnosti šarenice	1
Lahko razločljivo motno področje, podrobnosti šarenice rahlo zabrisane	2
Biserovinasta površina, podrobnosti šarenice niso vidne, velikost zenice se komaj razloči	3
Neprepustna roženica, šarenica se ne razloči	4

Šarenica

Normalna	0
Izrazito poglobljene gube, kongestija, zatekanje, zmerna hiperemija okoli roženice ali injekcija, katerikoli od teh znakov ali kombinacija katerih od njih; šarenica se še vedno odziva na svetlobo (počasen odziv je pozitiven)	1
Ni odziva na svetlobo, krvavenje, hudo uničenje (katerikoli od teh znakov ali vsi)	2

Veznica

Rdečina (se nanaša na najhujše opažene znake palpebralne in bulbarne veznice glede na kontrolno oko)

Krvne žilice normalne	0
Nekatere krvne žilice nedvomno hiperemične (injicirane)	1
Razpršeno škrlatno obarvanje, posameznih žilic ni mogoče z lahkoto razločiti	2
Razpršeno temno rdeče obarvanje	3
<i>Kemoza: veke in/ali žmurke</i>	
Ni oteklina	0
Kakršno koli otekanje nad normalnim (vključno z žmurkami)	1
Očitna oteklina z delnim izvihanjem vek	2
Oteklina, pri kateri so veke zaprte do približno polovice	3
Oteklina, pri kateri so veke več kot napol zaprte	4

B.6 POVZROČANJE PREOBČUTLJIVOSTI KOŽE (SENZIBILIZACIJA)

1. METODA

1.1 UVOD

Opombe:

Občutljivost preskusov in njihova zmožnost odkrivanja snovi, ki lahko povzročijo preobčutljivost človeške kože, sta pomembni za sistem razvrščanja z vidika zdravja ljudi.

Ni ene same preskusne metode, ki bi lahko zadovoljivo identificirala vse snovi, ki lahko povzročijo preobčutljivost človeške kože in bi bila primerna za vse snovi.

Pri izbiri preskusa je treba upoštevati dejavnike, kot so fizikalne značilnosti snovi, vključno z njeno zmožnostjo prodiranja v kožo.

Preskusi na morskih prašičkih se lahko nadalje delijo na preskuse z adjuvansom, pri katerih se alergijsko stanje okrepi z raztopitvijo ali suspendiranjem preskusne snovi v Freundovem kompletnem adjuvansu (FCA), in preskuse brez adjuvansa.

Pri preskusih z adjuvansom je verjetnost točnega napovedovanja možnega učinka snovi, da povzroči nastanek preobčutljivosti kože pri ljudeh, večja, kakor pri metodah, pri katerih se Freundov kompletni adjuvans ne uporablja, zato so bolj zaželeni.

Preskus maksimizacije na morskih prašičkih (GPMT) je splošno uporabljan preskus z adjuvansom. Čeprav se lahko za odkrivanje zmožnosti snovi, da povzroči preobčutljivost kože, uporabi več drugih metod, velja GPMT za najprimernejšo z adjuvansom.

Pri mnogih skupinah kemikalij veljajo preskusi brez adjuvansa (najbolj se priporoča Buehlerjev preskus) za manj občutljive.

V nekaterih primerih lahko obstajajo dobri razlogi za izbor Buehlerjevega preskusa z lokalnim nanosom namesto intradermalne injekcije, ki se uporablja pri preskusu maksimizacije na morskih prašičkih. Kadar se uporabi Buehlerjev preskus, je treba to znanstveno utemeljiti.

Preskus maksimizacije na morskih prašičkih (GPMT) in Buehlerjev preskus sta opisana v tej metodi. Lahko se uporabijo druge metode, pod pogojem da so dobro validirane in se navede znanstvena utemeljitev.

Ne glede na uporabljene metode je treba v rednih časovnih presledkih (vsakih šest mesecev) preverjati občutljivost seva morskih prašičkov, ki se uporablja za preskušanje povzročanja preobčutljivosti kože, in sicer z uporabo snovi, za katere je znano, da so šibki do zmerni povzročitelji preobčutljivosti ter z zadovoljivim številom dobljenih pozitivnih odzivov.

Glej tudi Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITVE

Glej Splošni uvod, del B(B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Priporočene so naslednje snovi, po potrebi razredčene, in tudi vse druge snovi, ki so bodisi znane iz literature, da povzročajo preobčutljivost ali ki sodijo v isto kemijsko skupino, kakor preskusna snov.

– p-fenilendiamin	št. CAS 106-50-3
– 2,4-dinitroklorobenzen	št. CAS 97-00-7
– kalijev dikromat	št. CAS 7778-50-9
– neomicin sulfat	št. CAS 1405-10-3
– nikljev sulfat	št. CAS 7786-81-4

1.4 PRINCIP PRESKUSNIH METOD

Po začetni izpostavljenosti preskusni snovi („uvajalnem“ obdobju) se živali približno dva tedna po zadnji uvajalni izpostavljenosti podvržejo „izzivalni“ izpostavljenosti preskusni snovi, da se ugotovi, ali je bilo povzročeno stanje preobčutljivosti. Povzročanje preobčutljivosti se določa s preučitvijo kožne reakcije na izzivalno izpostavljenost.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNIH METOD

1.6.1 Preskus maksimizacije na morskih prašičkih (GPMT)

1.6.1.1 Priprave

Zdravi mladi albino morski prašički se naključno izberejo in dodelijo tretirani in kontrolni skupini. Pred odmerjanjem se s striženjem ali britjem odstrani dlaka na območju ramen. Paziti je treba, da se ne poškoduje koža.

1.6.1.2 Preskusni pogoji

1.6.1.2.1 Poskusne živali

Uporabijo se splošno uporabljani sevi albino morskih prašičkov, ki tehtajo manj kot 500 g.

1.6.1.2.2 Število in spol

Uporabljajo se lahko samci in/ali samice. Če se uporabijo samice, morajo biti nulipare in nebreje. Uporabi se najmanj 10 živali za tretirano skupino in 5 za kontrolno skupino. Uporaba manjšega števila živali mora biti utemeljena. Pri dvoumnih rezultatih lahko histopatološka preiskava pomaga pri odločanju, ali je treba preskus ponoviti na novi skupini živali.

Kadar ni mogoče zagotovo odločiti, ali preskusna snov povzroča preobčutljivost ali ne, se priporoča preskušanje na dodatnih živalih, tako da je vse skupaj uporabljenih 20 tretiranih in 10 kontrolnih živali.

1.6.1.2.3 Velikost odmerkov

Koncentracija preskusne snovi se prilagodi na raven, ki povzroči nekaj znakov draženja kože, a jo živali v vsaki fazi induciranja dobro prenašajo.

Izzivalna koncentracija naj bo največja koncentracija, ki pri živalih, pri katerih preobčutljivosti še ni, ne povzroči nobenih znakov draženja kože.

Te koncentracije se lahko določi jo s pilotno študijo majhnega obsega (na dveh ali treh živalih).

1.6.1.2.4 Obdobje opazovanja

Med uvajalnim obdobjem se z opazovanjem preverja, ali so nastali dražilni učinki. Po izzivalni izpostavitvi, se zapišejo kožne reakcije po 24 in 48 urah od odstranitve blazinice.

1.6.1.3 Postopek

Živali se stehtajo pred začetkom in na koncu preskusa. Z območja ramen se odstrani dlaka. Postopek se deli na dve fazi:

1.6.1.3.1 Uvajanje

Dan 0 – tretirana skupina

Na območje ramen se dajo naslednji pari intradermalnih injekcij po 0,1 ml, tako da sta injekciji enega para vsaka na svoji strani sredinske črte:

- | | |
|--------------|---|
| Injekcija 1: | 0,1 ml Freundovega kompletnega adjuvansa (FCA), zmešanega z vodo ali fiziološko raztopino v razmerju 1:1, |
| Injekcija 2: | 0,1 ml preskusne snovi, po potrebi v ustreznem nosilcu, |
| Injekcija 3: | 0,1 ml preskusne snovi v FCA. |

Pri injekciji 3 se vodotopne snovi raztopijo v 0,05 ml vode in 0,05 ml nerazredčenega FCA. Če se preskušajo snovi, topne v lipidih, ali netopne snovi, se zmešajo z nerazredčenim FCA.

Pri injekciji 3 mora biti končna koncentracija preskusne snovi enaka tisti pri injekciji 2.

Injekciji 1 in 2 se dasta ena poleg druge in čim bližje glavi, medtem ko se injekcija 3 da bolj proti kavdalnemu delu preskusnega območja.

Dan 0 – kontrolna skupina

Na ista območja, kakor zgoraj, se dajo naslednji pari intradermalnih injekcij:

- | | |
|--------------|---|
| Injekcija 1: | 0,1 ml Freundovega kompletnega adjuvansa (FCA), zmešanega z vodo ali fiziološko raztopino v razmerju 1:1, |
| Injekcija 2: | 0,1 ml samega nosilca, |
| Injekcija 3: | 0,1 ml nosilca v FCA. |

Dan 6 – Kontrolne in tretirane skupine

Če snov ne draži kože, se preskusno območje ostriže in/ali obrije ter namaže z 0,5 ml 10-odstotnega natrijevega lavrilsulfata v vazelinu, da se povzroči lokalno draženje.

Dan 7 – tretirana skupina

S preskusnega območja se ponovno odstrani dlaka. Preskusna snov v ustreznem nosilcu (izbiro nosilca je treba utemeljiti; trdne snovi se fino uprašijo in zmešajo z ustreznim nosilcem; tekočine se lahko, če je to primerno, nanesejo neposredno) se porazdeli po filtrirnem papirju (2 × 4 cm), ki se položi na preskusno območje in z okluzivnim povojem drži v stiku s kožo 48 ur.

Dan 7 – kontrolna skupina

S preskusnega območja se ponovno odstrani dlaka. Na preskusno območje se na podoben način nanese zgolj nosilec in z okluzivnim povojem drži v stiku s kožo 48 ur.

1.6.1.3.2 Izzivanje preobčutljivosti

Dan 21

Z bokov tretiranih in kontrolnih živali se odstrani dlaka. Na en bok tretiranih živali se namesti blazinica ali posodica s preskusno snovjo, na drugi bok pa blazinica ali posodica zgolj z nosilcem.

Blazinice se z okluzivnim povojem držijo v stiku s kožo 24 ur.

Kontrolna skupina se izpostavi na enak način.

Dan 23 in dan 24

- 21 ur po odstranitvi blazinice se izzivana površina očisti in, če je potrebno, se z nje odstranijo dlake,
- tri ure pozneje (48 ur po začetku izzivalnega nanosa) se opazuje in zapiše kožna reakcija,
- 24 ur po tem opazovanju se izvede še eno opazovanje (72 ur) in zapišejo rezultati.

Za razjasnitev rezultatov, dobljenih pri prvem izzivanju, se približno teden dni po njej po potrebi izvede drugo izzivanje z novo kontrolno skupino za nosilec.

1.6.1.3.3 Opazovanje in določanje stopnje

Zapisati je treba vse kožne reakcije in nenavadne izsledke pri uvajanju in izzivanju ter jih navesti v poročilu.

Za razjasnitev dvomljivih reakcij ali odzivov, prikritih zaradi obarvanja kože s preskusno snovjo, se lahko uporabijo tehnike, kot je histopatološka preiskava ali merjenje debeline kožne gube.

1.6.2 Buehlerjev test

1.6.2.1 Priprave

Zdravi mladi albino morski prašički se naključno izberejo in dodelijo tretirani in kontrolni skupini. Pred odmerjanjem se s striženjem in/ali britjem odstrani dlaka na enem boku. Paziti je treba, da se ne poškoduje koža.

1.6.2.2 Preskusni pogoji

1.6.2.2.1 Poskusne živali

Uporabijo se splošno uporabljani sevi albino morskih prašičkov, ki tehtajo manj kot 500 g.

1.6.2.2.2 Število in spol

Uporabljajo se lahko samci in/ali samice. Če se uporabijo samice, morajo biti nulipare in nebreje. Uporabi se najmanj 20 živali v tretirani in najmanj 10 v kontrolni skupini. Uporaba manjšega števila živali mora biti utemeljena. Pri dvoumnih rezultatih lahko histopatološka preiskava pomaga pri odločanju, ali je treba preskus ponoviti na novi skupini živali.

1.6.2.2.3 Velikost odmerkov

Za vsako fazo uvajanja se koncentracija preskusne snovi prilagodi na najvišjo raven, ki se lahko sistemsko dobro prenaša in povzroči, pri dražilnih snoveh, blago do zmerno draženje pri večini preskusnih živali. Izzivalna koncentracija naj bo največja koncentracija, ki pri živalih, kjer preobčutljivost še ni nastala, ne povzroči nobenih znakov draženja kože. Te koncentracije se lahko določijo s študijo majhnega obsega (na dveh ali treh živalih).

1.6.2.2.4 Obdobje opazovanja

Med uvajalnim obdobjem se z opazovanjem kože preverja, ali so nastali dražilni učinki. Po izzivalni izpostavitvi, se zapišejo kožne reakcije 24 in 48 ur po odstranitvi blazinice, tj. 30 in 54 ur po začetku nanašanja.

1.6.2.3 Postopek

Živali se stehtajo pred začetkom in na koncu preskusa.

Postopek se deli na dve fazi:

1.6.2.3.1 Uvajanje

Dan 0 – tretirana skupina

Z enega boka se odstrani dlaka. Po bombažni blazinici se porazdeli 0,5 ml preskusne snovi v ustreznem nosilcu (izbiro nosilca je treba utemeljiti; tekočine se lahko, če je to primerno, nanesejo neposredno). Blazinica se namesti na preskusno območje in 6 ur drži v stiku s kožo z okluzivnim obližem ali posodico in ustreznim povojem.

Dan 0 – kontrolna skupina

Z enega boka se odstrani dlaka. Na podoben način se na preskusno območje nanese le nosilec. Blazinica se 6 ur drži v stiku s kožo z okluzivnim obližem ali posodico in ustreznim povojem.

Dan 7 in dan 14

Enak nanos, kakor na dan 0, se izvede na istem preskusnem območju (s katerega se po potrebi odstranijo dlake) na dan 7 in dan 14.

1.6.2.3.2 Izzivanje preobčutljivosti

Dan 28

Odstrani se dlaka z drugega boka tretiranih in kontrolnih živali. Na zadnji del boka tretiranih živali se pritrdi okluzivni obliž ali posodica z 0,5 ml preskusne snovi v največji ne dražilni koncentraciji. Na sprednji del boka pa se pritrdi okluzivni obliž ali posodica, ki vsebuje le nosilec.

Okluzivni obliži se s primernim povojem 6 ur držijo v stiku s kožo.

Kontrolna skupina se izpostavi na enak način.

Dan 29 in dan 30

— 21 ur po odstranitvi blazinice se izzivana površina očisti in, če je potrebno, se z nje odstranijo dlake,

— tri ure pozneje (30 ur po začetku izzivalnega nanosa) se opazuje in zapiše kožna reakcija,

— 24 ur po tem opazovanju se izvede še eno opazovanje (54 ur) in zapišejo rezultati.

1.6.2.3.3 Opazovanje in določanje stopnje

Zapisati je treba vse kožne reakcije in nenavadne izsledke pri uvajanju in izzivanju ter jih navesti v poročilu.

Za razjasnitev dvomljivih reakcij ali odzivov, prikritih zaradi obarvanja kože s preskusno snovjo, se lahko uporabijo tehnike, kot je histopatološka preiskava ali merjenje debeline kožne gube.

2. **PODATKI (GPMT in Buehlerjev preskus)**

Podatke je treba povzeti v tabeli, ki za vsako žival prikazuje kožne reakcije pri vsakem opazovanju.

3. **POROČANJE (GPMT in Buehlerjev preskus)**

3.1 POROČILO O PRESKUSU (GPMT in Buehlerjev preskus)

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— uporabljeni sev morskih prašičkov;

— preskusni pogoji, nosilec in koncentracije preskusne snovi, uporabljene za uvajanje in izzivanje;

- število, starost in spol živali;
- masa posameznih živali na začetku in na koncu preskusa;
- vsa opazovanja, opravljena na vsaki živali, vključno s sistemom določanja stopnje, če je bil uporabljen;
- razprava o rezultatih;
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA (GPMT in Buehlerjev preskus)

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. VIRI

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.7 STRUPENOST (PRI ZAUŽITJU) PRI PONAVLJAJOČEM SE ODMERKU (28 DNI)

1. METODA

1.1 UVOD

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITVE

Glej Splošni uvod, del B(B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se 28 dni dnevno oralno daje v stopnjevanih odmerkih več skupinam poskusnih živali, in sicer en odmerek na skupino. V obdobju dajanja odmerkov se živali vsakodnevno opazujejo zaradi odkrivanja znakov strupenosti. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa tudi na preživelih živalih.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 Priprave

Najmanj pet dni pred začetkom preskusa se živali nastanijo v preskusnih pogojih nastanitve in hranjenja. Pred preskusom se zdrave mlade živali naključno izberejo in dodelijo tretiranim skupinam. Preskusna snov se lahko daje s hrano, gavažo, kapsulami ali pitno vodo. Celo preskusno obdobje je treba vsem živalim dajati odmerke po isti metodi. Če se za lažje odmerjanje uporabi nosilec ali drugi dodatki, mora biti dokazano, da ne povzročajo strupenih učinkov. Če je primerno, se lahko uporabijo podatki preteklih študij.

1.6.2 Preskusni pogoji**1.6.2.1 Poskusne živali**

Razen v primeru kontraindikacij, je podgana najprimernejša vrsta. Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve mladih zdravih živali in najprimerneje je, da se odmerjanje začne še preden podgane dopolnijo šest tednov, vsekakor pa ne smejo biti starejše od osem tednov.

Ob začetku študije območje nihanja mase uporabljenih živali ne sme presegati $\pm 20\%$ ustrezne srednje vrednosti.

1.6.2.2 Število in spol

Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti najmanj 10 živali (pet samic in pet samcev). Samice morajo biti nulipare in nebreje. Če se načrtujejo žrtvovanja med študijo, je treba število povečati za število živali, predvidenih za žrtvovanje pred zaključkom študije. Poleg tega se lahko satelitska skupina 10 živali (pet živali na spol) 28 dni tretira z velikim odmerkom in se naslednjih 14 dni opazuje za ugotavljanje povratnosti, obstojnosti ali zapoznelega pojava strupenih učinkov. Uporabi se tudi satelitska skupina 10 kontrolnih živali (pet živali na spol).

1.6.2.3 Velikost odmerkov

Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerkov in eno kontrolo. Razen tretiranja s preskusno snovjo, je treba z živalmi kontrolne skupine ravnati na enak način kakor z živalmi preskusne skupine. Če se za lažje odmerjanje uporabi nosilec, se živalim kontrolne skupine nosilec odmeri na enak način kakor živalim tretirane skupine in prejeti morajo enako količino nosilca, kakor živali skupine, tretirane z največjim odmerkom. Največji odmerek naj povzroči strupene učinke, vendar nič ali malo smrtnih primerov. Najmanjši odmerek ne sme povzročiti nobenih znakov strupenosti. Če obstaja uporabna ocena izpostavljenosti človeka, jo mora najmanjši odmerek presegati. V idealnih razmerah bi srednja velikost odmerka morala povzročiti minimalne opazne strupene učinke. Če se uporabi več kot en vmesni odmerek, morajo biti intervali med velikostmi odmerkov taki, da povzročijo stopnjevanje strupenih učinkov. V skupinah, tretiranih z majhnimi in vmesnimi odmerki, ter v kontrolnih skupinah mora biti pogostnost smrtnih primerov majhna, da se omogoči smiselno ovrednotenje rezultatov.

Če se preskusna snov daje s hrano, se lahko uporabi bodisi konstantna koncentracija v hrani (ppm ali mg/kg hrane) bodisi konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali; treba je navesti izbrano možnost. Če se snov daje z gavažo, je treba odmerek dati vsak dan ob istem času, velikost odmerkov pa je treba periodično (enkrat ali dvakrat tedensko) prilagoditi tako, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali.

1.6.2.4 Mejni preskus

Če pri 28-dnevni študiji, izvedeni v skladu s spodaj opisano metodo z odmerkom 1000 mg/kg telesne mase/dan, ali z večjim odmerkom, ki ustreza možni izpostavljenosti človeka, kadar je ta znana, ni opaznih strupenih učinkov, nadaljnje preskušanje morda ne bo potrebno. Pri snoveh z majhno strupenostjo je pomembno zagotoviti, da pri dajanju s hrano količina in druge lastnosti zadevne preskusne snovi ne vplivajo na običajne prehrabne zahteve.

1.6.2.5 Obdobje opazovanja

Vse živali je treba dnevno opazovati in zapisati znake strupenosti, vključno s časom njihovega pojava, stopnjo in trajanjem. Zapisati je treba čas smrti in čas pojava ter izginotja znakov strupenosti.

1.6.3 Postopek

V idealnih razmerah se preskusna snov živalim daje sedem dni na teden 28 dni. Živali katere koli satelitske skupine, predvidene za nadaljnja opazovanja, je treba pustiti nadaljnjih 14 dni brez tretiranja, da se ugotovi povratnost ali obstojnost strupenih učinkov.

Opazovati je treba spremembe na koži in kožuhu, očeh in sluznici ter tudi v dihalih, obtočilih, avtonomnem in osrednjem živčevju, somatomotorični aktivnosti in vedenjskem vzorcu. Vsak teden je treba izmeriti porabo hrane (in porabo vode, če se preskusna snov daje s pitno vodo) in maso živali.

Živali je treba redno opazovati, da se kar najbolj prepreči izguba živali zaradi kanibalizma, avtolize tkiv ali napak pri dajanju v kletke. Ob koncu študije se na vseh preživelih živalih nesatelitskih tretiranih skupin opravi obdukcija. Umirajoče živali in živali v hudem stresu ali s hudimi bolečinami se takoj ob odkritju odstranijo iz kletk ter humano usmrtijo in obducirajo.

Ob koncu preskusnega obdobja se na vseh živalih, vključno z živalmi kontrolne skupine, opravijo naslednje preiskave:

1. hematološke preiskave, ki vključujejo najmanj določitev hematokrita, koncentracije hemoglobina, števila eritrocitov, skupnega in diferencialnega števila levkocitov in zmožnosti koagulacije;
2. klinične biokemijske preiskave krvi, ki vključujejo določanje najmanj enega parametra delovanja jeter in ledvic: alanin-aminotransferaza (prej poznana kot glutamat-piruvat-transaminaza), serumska aspartat-aminotransferaza (prej poznana kot glutamat-oksaloacetat-transaminaza), sečninski dušik, albumin, kreatinin v krvi, skupni bilirubin in skupne serumske beljakovine.

Druge določitve, ki so lahko potrebne za izdelavo ustrezne ocene strupenosti, vključujejo kalcij, fosfor, klorid, natrij, kalij, postno glukozo, lipide, hormone, ravnovesje kislina/baza, methemoglobin, aktivnost holinesteraze.

Kadar je potrebno, se za razširitev raziskave opaženih učinkov lahko uporabijo dodatne klinične biokemijske preiskave.

1.6.3.1 Makroskopska obdukcija

Na vseh živalih iz študije je treba izvesti popolno makroskopsko obdukcijo. Najmanj jetra, ledvice, nadledvične žleze in moda je treba stehtati mokre čim prej po disekciji, da se prepreči njihova dehidracija. Organe in tkiva (jetra, ledvice, vranico, moda, nadledvične žleze, srce in vse organe, ki kažejo makroskopske poškodbe ali spremembe v velikosti) je treba shraniti v ustreznem mediju za morebitno histopatološko preiskavo v prihodnosti.

1.6.3.2 Histopatološka preiskava

Pri skupini, tretirani z velikim odmerkom, in kontrolni skupini je treba opraviti histološko preiskavo na shranjenih organih in tkivih. Pri vseh skupinah, tretiranih z manjšimi odmerki, je treba preiskati organe in tkiva, ki v skupini z največjim odmerkom kažejo poškodbe, ki se lahko pripišejo preskusni snovi. Živali vseh satelitskih skupin je treba histološko preiskati s posebnim poudarkom na tistih organih in tkivih, pri katerih so bili pri drugih tretiranih skupinah ugotovljeni učinki.

2. PODATKI

Podatke je treba povzeti v tabeli, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa in število živali, ki kažejo posamezno vrsto poškodbe.

Vse opažene rezultate je treba ovrednotiti z ustrežno statistično metodo. Uporabi se lahko katera koli priznana statistična metoda.

3. POROČANJE**3.1 POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, prehrana itd.;
- preskusni pogoji;
- velikost odmerkov (vključno z nosilcem, če je bil uporabljen) in koncentracije;
- podatki o odzivu strupenosti po spolu in odmerku;
- velikost odmerka brez učinkov, kadar je možno;
- čas smrti med študijo oziroma ali so živali preživele do zaključka;
- strupeni ali drugi učinki;
- čas odkritja vsakega nenormalnega znaka in njegov nadaljnji razvoj;
- podatki o hrani in telesni masi;
- opravljeni hematološki preskusi in njihovi rezultati;
- opravljeni klinični biokemijski preskusi in njihovi rezultati;
- izsledki obdukcije;
- podroben opis vseh histopatoloških izsledkov;
- statistična obdelava rezultatov, kadar je to primerno;
- razprava o rezultatih;
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. VIRI

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.8 STRUPENOST (PRI VDIHAVANJU) PRI PONAVLJAJOČEM SE ODMERKU (28 DNI)**1. METODA****1.1 UVOD**

Koristno je imeti predhodne informacije o porazdelitvi velikosti delcev, parnem tlaku, tališču, vrelišču, plamenišču in eksplozivnosti (če je primerno) snovi.

Glej tudi Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITEV

Glej Splošni uvod, del B(B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Več skupin poskusnih živalih se 28 dni vsak dan za določeno obdobje izpostavi preskusni snovi v stopnjevanih koncentracijah, pri čemer se uporabi ena koncentracija na skupino. Če se za lažjo pripravo primerne koncentracije preskusne snovi v zraku uporabi nosilec, je treba uporabiti tudi kontrolno skupino za nosilec. V času dajanja odmerkov se živali vsakodnevno opazujejo zaradi odkrivanja znakov strupenosti. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa tudi na preživelih živalih.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Priprave**

Najmanj pet dni pred začetkom preskusa se živali nastanijo v preskusnih pogojih nastanitve in hranjenja. Pred preskusom se zdrave mlade živali naključno izberejo in dodelijo potrebnemu številu skupin. Kadar je potrebno, se preskusni snovi lahko doda ustrezni nosilec za lažjo pripravo primerne koncentracije snovi v zraku. Če se za lažje odmerjanje uporabi nosilec ali drugi dodatki, mora biti dokazano, da ne povzročajo strupenih učinkov. Če je primerno, se lahko uporabijo podatki preteklih študij.

1.6.2 Preskusni pogoji**1.6.2.1 Poskusne živali**

Razen v primeru kontraindikacij, je podgana najprimernejša vrsta. Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve mladih zdravih živali.

Ob začetku študije območje nihanja mase uporabljenih živali ne sme presegati ± 20 % ustrezne srednje vrednosti.

1.6.2.2 Število in spol

Za vsako preskusno skupino je treba uporabiti najmanj 10 živali (pet samic in pet samcev). Samice morajo biti nulipare in nebreje. Če se načrtujejo žrtvovanja med študijo, je treba število povečati za število živali, predvidenih za žrtvovanje pred zaključkom študije. Poleg tega se lahko satelitska skupina 10 živali (pet živali na spol) 28 dni tretira z odmerkom velike koncentracije in se naslednjih 14 dni opazuje za ugotavljanje povratnosti, obstojnosti ali zapoznelega pojava strupenih učinkov. Uporabi se tudi satelitska skupina 10 kontrolnih živali (pet živali na spol).

1.6.2.3 Koncentracija izpostavljenosti

Potrebne so najmanj tri koncentracije z eno kontrolo ali, če se uporabi nosilec, s kontrolo nosilca (ki ustreza koncentraciji nosilca pri največji velikosti odmerka). Razen tretiranja s preskusno snovjo, je treba z živalmi kontrolne skupine ravnati na enak način kakor z živalmi preskusnih skupin. Največja koncentracija naj povzroči strupene učinke, vendar nič ali malo smrtnih primerov. Najmanjša koncentracija ne sme povzročiti nobenih znakov strupenosti. Če obstaja uporabna ocena izpostavljenosti človeka, jo mora najmanjša koncentracija presegati. V idealnih razmerah bi vmesna koncentracija morala povzročiti minimalne opazne strupene učinke. Če se uporabi več kot ena vmesna koncentracija, morajo biti intervali med koncentracijami taki, da povzročijo stopnjevanje strupenih učinkov. V skupinah, tretiranih z majhno in srednjo koncentracijo, ter v kontrolnih skupinah naj bi bila pogostnost smrtnih primerov majhna, da se omogoči smiselno ovrednotenje rezultatov.

1.6.2.4 Čas izpostavljenosti

Dnevna izpostavljenost naj bi trajala šest ur, vendar bodo za izpolnitev posebnih zahtev morda potrebna drugačna obdobja.

1.6.2.5 Oprema

Preskušanje na živalih se izvaja z opremo za vdihavanje, ki je zasnovana tako, da vzdržuje dinamični pretok zraka z najmanj 12 zamenjavami zraka na uro, da se zagotovi zadostna vsebnost kisika in enakomerna porazdelitev izpostavitvenega ozračja. Če se uporabi komora, mora biti zasnovana tako, da preskusne živali niso prenatrpane in so kar najbolj izpostavljene preskusni snovi z vdihavanjem. Splošno pravilo zagotavljanja stabilnosti ozračja v komori je, da skupni „volumen“ preskusnih živali ne sme presegati 5 % volumna preskusne komore. Lahko se uporabi nazooralno izpostavljanje, izpostavljanje samo glave ali izpostavljanje celega telesa v posamični komori; prva dva načina kar se da zmanjšata sprejem preskusne snovi po drugih poteh.

1.6.2.6 Obdobje opazovanja

Poskusne živali je treba med celotnim obdobjem tretiranja in okrevanja dnevno opazovati, ali kažejo znake strupenosti. Zapisati je treba čas smrti in čas pojava ter izginotja znakov strupenosti.

1.6.3 Postopek

Živali se 28 dni, pet do sedem dni na teden dnevno izpostavljajo preskusni snovi. Živali katere koli satelitske skupine, predvidene za nadaljnja opazovanja, je treba pustiti nadaljnjih 14 dni brez tretiranja, da se ugotovi povratnost ali obstojnost strupenih učinkov. Med preskusom je treba vzdrževati temperaturo 22 ± 3 °C.

V idealnih razmerah bi bilo treba relativno vlažnost vzdrževati med 30 in 70 %, vendar to v nekaterih primerih (npr. preskusi z nekaterimi aerosoli) ni izvedljivo. Ohranjanje rahlega podtlaka v komori (≤ 5 mm vode) bo preprečilo uhajanje preskusne snovi v okolico. Med izpostavljenostjo se živalim ne dajeta ne hrana ne voda.

Uporabiti je treba dinamični inhalacijski sistem z ustreznim analitskim sistemom za nadzorovanje koncentracije. Za določitev primernih koncentracij izpostavljenosti se priporoča izvedba poskusnega preskusa. Pretok zraka je treba prilagoditi tako, da se zagotovijo homogeni pogoji v celi komori za izpostavljanje. Sistem mora zagotoviti, da se čim hitreje dosežejo stabilni izpostavitveni pogoji.

Meriti ali spremljati je treba:

- (a) pretok zraka (neprekinjeno);
- (b) dejansko koncentracijo preskusne snovi, merjeno v območju dihanja. V obdobju dnevne izpostavitve se koncentracija ne sme spreminjati za več kot ± 15 % srednje vrednosti. Vendar je lahko pri nekaterih aerosolih taka stopnja nadzora nedosegljiva in je zato sprejemljiv večji razpon. Ves čas študije morajo biti koncentracije od dneva do dneva kolikor je mogoče konstantne. Pri aerosolih je treba izvesti najmanj eno analizo velikosti delcev na preskusno skupino na teden;
- (c) temperaturo in vlažnost, če je mogoče neprekinjeno.

Med izpostavitvijo in po njej se izvaja sistematično opazovanje in zapisovanje opažanj; za vsako žival je treba voditi svojo evidenco. Vse živali je treba dnevno opazovati in zapisati znake strupenosti, vključno s časom njihovega pojava, stopnjo in trajanjem. Opazovati je treba spremembe na koži in kožuhi, očeh, sluznici, dihalih, obtočilih, avtonomnem in osrednjem živčevju, somatomotorični aktivnosti in vedenjskem vzorcu. Tedensko je treba izmeriti maso živali. Priporoča se tudi tedenska meritev porabe hrane. Živali je treba redno opazovati, da se prepreči izguba živali zaradi kanibalizma, avtolize tkiv ali napak pri dajanju v kletke. Ob koncu študije se na vseh preživelih živalih nesatelitskih tretiranih skupin opravi obdukcija. Umirajoče živali in živali v hudem stresu ali s hudimi bolečinami se takoj ob odkritju odstranijo iz kletk ter humano usmrtijo in obducirajo.

Ob koncu preskusa se na vseh živalih, vključno z živalmi kontrolne skupine, opravi naslednje preiskave:

- (i) hematološke preiskave, ki vključujejo najmanj določitev hematokrita, koncentracije hemoglobina, števila eritrocitov, skupnega in diferencialnega števila levkocitov in zmožnosti koagulacije;
- (ii) klinične biokemijske preiskave krvi, ki vključujejo določanje najmanj enega parametra delovanja jeter in ledvic: serumska alanin-aminotransferaza (prej poznana kot glutamat-piruvat-transaminaza), serumska aspartat-aminotransferaza (prej poznana kot glutamat-oksaloacetat-transaminaza), sečninski dušik, albumin, kreatinin v krvi, skupni bilirubin in skupne serumske beljakovine.

Druge določitve, ki so lahko potrebne za izdelavo ustrezne ocene strupenosti, vključujejo kalcij, fosfor, klorid, natrij, kalij, postno glukozo, lipide, hormone, ravnovesje kislina/baza, methemoglobin, aktivnost holinesteraze.

Kadar je potrebno, se za razširitev raziskave opaženih strupenih učinkov lahko uporabijo dodatne klinične biokemijske preiskave.

1.6.3.1 Makroskopska obdukcija

Na vseh živalih iz študije je treba izvesti popolno makroskopsko obdukcijo. Najmanj jetra, ledvice, nadledvične žleze, pljuča in moda je treba stehitati mokre čim prej po disekciji, da se prepreči njihova dehidracija. Organe in tkiva (dihala, jetra, ledvice, vranico, moda, nadledvične žleze, srce in vse organe, ki kažejo makroskopske poškodbe ali spremembe v velikosti) je treba shraniti v ustreznem mediju za morebitno histopatološko preiskavo v prihodnosti. Pljuča je treba odstraniti nepoškodovana, jih stehitati in tretirati z ustreznim fiksativom, da se ohrani njihova struktura.

1.6.3.2 Histopatološka preiskava

Pri skupini, tretirani z veliko koncentracijo, in kontrolni(-h) skupini(-ah) je treba histopatološko preiskavo opraviti na shranjenih organih in tkivih. Pri vseh skupinah, tretiranih z manjšimi odmerki, je treba preiskati organe in tkiva, ki v skupini z največjim odmerkom kažejo poškodbe, ki se lahko pripišejo preskusni snovi. Živali vseh satelitskih skupin je treba histološko preiskati s posebnim poudarkom na tistih organih in tkivih, pri katerih so bili pri drugih tretiranih skupinah ugotovljeni strupeni učinki.

2. PODATKI

Podatke je treba povzeti v tabeli, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa in število živali, ki kažejo posamezno vrsto poškodbe.

Vse opažene rezultate je treba ovrednotiti z ustrezno statistično metodo. Uporabi se lahko katera koli priznana statistična metoda.

3. **POROČANJE**

3.1 **POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, prehrana itd.;

— preskusni pogoji:

Opis aparature za izpostavljanje, vključno z načrtom, vrsto, merami, virom zraka, sistemom za proizvodnjo aerosolov, metodo klimatiziranja zraka, obdelavo izpušnega zraka in metodo namestitve živali v preskusni komori, če je bila uporabljena. Opisati je treba opremo za merjenje temperature, vlažnosti in, kadar je primerno, stabilnosti koncentracije ali porazdelitve velikosti delcev aerosolov.

Podatki o izpostavitvi:

Ti morajo biti zbrani v tabeli in prikazani s srednjimi vrednostmi in mero variabilnosti (npr. standardna deviacija) ter po možnosti vključevati:

(a) pretok zraka skozi opremo za vdihavanje;

(b) temperaturo in vlažnost zraka;

(c) nazivne koncentracije (količnik skupne količine preskusne snovi, vnesene v opremo za vdihavanje, in volumna zraka);

(d) vrsto nosilca, če je bil uporabljen;

(e) dejanske koncentracije v preskusnem območju dihanja;

(f) srednji aerodinamični masni premer (MMAD) in geometrijska standardna deviacija (GSD);

— podatki o odzivu strupenosti po spolu in koncentraciji;

— čas smrti med študijo oziroma ali so živali preživele do zaključka;

— opis strupenih ali drugih učinkov; velikost odmerka brez učinkov;

— čas odkritja vsakega nenormalnega znaka in njegov nadaljnji razvoj;

— podatki o hrani in telesni masi;

— opravljeni hematološki preskusi in rezultati;

— opravljeni klinični biokemijski preskusi in rezultati;

— izsledki obdukcije;

— podroben opis vseh histopatoloških izsledkov;

— statistična obdelava rezultatov, kadar je možno;

— razprava o rezultatih;

— razlaga rezultatov.

3.2 **VREDNOTENJE IN RAZLAGA**

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.9 STRUPENOST (V STIKU S KOŽO) PRI PONAVLJAJOČEM SE ODMERKU (28 DNI)**1. METODA****1.1 UVOD**

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITVE

Glej Splošni uvod, del B(B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se 28 dni dnevno nanaša na kožo v stopnjevanih odmerkih več skupinam poskusnih živali, in sicer en odmerek na skupino. V obdobju dajanja odmerkov se živali vsakodnevno pozorno opazujejo zaradi odkrivanja znakov strupenosti. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa tudi na preživelih živalih.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Priprave**

Najmanj pet dni pred začetkom preskusa se živali nastanijo v preskusnih pogojih nastanitve in hranjenja. Pred preskusom se zdrave mlade živali naključno izberejo in dodelijo tretiranim in kontrolnim skupinam. Tik pred začetkom preskusa se preskusnim živalim ostriže dlaka s hrbtne delu trupa. Dlaka se lahko tudi obrije, vendar je treba to opraviti 24 ur pred preskusom. Striženje ali britje je običajno treba ponavljati približno v tedenskih intervalih. Med striženjem ali britjem je treba paziti, da se koža ne odrgne. Za nanos preskusne snovi je treba pripraviti najmanj 10 % telesne površine. Pri določanju površine pripravljenega dela in velikosti nanosa je treba upoštevati maso živali. Pri preskušanju trdnih snovi, ki se po potrebi lahko uprašijo, je treba preskusno snov dovolj navlažiti z vodo ali, kadar je potrebno, ustreznim nosilcem, da se zagotovi dober stik s kožo. Tekoče preskusne snovi se običajno uporabljajo nerazredčene. Nanosi se opravljajo dnevno, pet do sedem dni na teden.

1.6.2 Preskusni pogoji**1.6.2.1 Poskusne živali**

Uporabijo se lahko odrasle podgane, kunci ali morski prašički. Uporabijo se lahko tudi druge vrste, vendar je treba njihovo uporabo utemeljiti.

Ob začetku študije območje nihanja mase uporabljenih živali ne sme presegati ± 20 % ustrezne srednje vrednosti.

1.6.2.2 Število in spol

Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti najmanj 10 živali (pet samic in pet samcev) z zdravo kožo. Samice morajo biti nulipare in nebreje. Če se načrtujejo žrtvovanja med študijo, je treba število povečati za število živali, predvidenih za žrtvovanje pred zaključkom študije. Poleg tega se lahko satelitska skupina 10 živali (pet živali na spol) 28 dni tretira z velikim odmerkom in se naslednjih 14 dni opazuje za ugotavljanje reverzibilnosti, obstojnosti ali zapoznelega pojava strupenih učinkov. Uporabi se tudi satelitska skupina 10 kontrolnih živali (pet živali na spol).

1.6.2.3 Velikost odmerkov

Potrebne so najmanj tri velikosti odmerkov z eno kontrolo ali, če se uporabi nosilec, s kontrolo nosilca. Obdobje izpostavljenosti mora trajati najmanj šest ur dnevno. Preskusno snov je treba nanašati vsak dan ob istem času, nanose pa je treba v rednih časovnih presledkih (enkrat ali dvakrat tedensko) prilagoditi tako, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali. Razen tretiranja s preskusno snovjo, je treba z živalmi kontrolne skupine ravnati na enak način kakor z živalmi preskusne skupine. Če se za lažje odmerjanje uporabi nosilec, se živalim skupine za kontrolo nosilca odmerki dajejo na enak način kakor živalim tretirane skupine in prejeti morajo enako količino, kakor živali skupine, tretirane z največjim odmerkom. Največji odmerek naj povzroči strupene učinke, vendar nič ali malo smrtnih primerov. Najmanjši odmerek ne sme povzročiti nobenih znakov strupenosti. Če obstaja uporabna ocena izpostavljenosti človeka, jo mora najmanjši odmerek presegati. V idealnih razmerah bi vmesna velikost odmerka morala povzročiti minimalne opazne strupene učinke. Če se uporabi več kot en vmesni odmerek, morajo biti intervali med velikostmi odmerkov taki, da povzročijo stopnjevanje strupenih učinkov. V skupinah, tretiranih z majhnimi in vmesnimi odmerki, ter v kontrolni skupini mora biti pogostnost smrtnih primerov majhna, da se omogoči smiselno ovrednotenje rezultatov.

Če nanos preskusne snovi povzroči hudo draženje kože, je treba koncentracije zmanjšati, zaradi česar se lahko zmanjšajo ali ne pokažejo drugi strupeni učinki pri velikih odmerkih. Če se poleg tega koža hudo poškoduje, je morda treba prekiniti študijo in začeti novo študijo z manjšimi koncentracijami.

1.6.2.4 Mejni preskus

Če pri predhodni študiji z odmerkom 1 000 mg/kg, ali z večjim odmerkom, ki ustreza možni izpostavljenosti človeka, kadar je ta znana, ni opaznih strupenih učinkov, nadaljnje preskušanje morda ne bo potrebno.

1.6.2.5 Obdobje opazovanja

Poskusne živali je treba dnevno opazovati, ali kažejo znake strupenosti. Zapisati je treba čas smrti in čas pojava ter izginotja znakov strupenosti.

1.6.3 Postopek

Vsaka žival mora biti v svoji kletki. Živali se 28 dni, v idealnih razmerah po sedem dni na teden, tretirajo s preskusno snovjo. Živali katere koli satelitske skupine, predvidene za nadaljnja opazovanja, je treba pustiti nadaljnjih 14 dni brez tretiranja, da se ugotovi povratnost ali obstojnost strupenih učinkov. Izpostavljanje mora trajati najmanj šest ur dnevno.

Preskusno snov je treba enakomerno nanesti na območje, ki predstavlja približno 10 % skupne telesne površine. Pri zelo strupenih snoveh je površina nanosa lahko manjša, vendar mora biti čim več površine pokrite s čim tanjšo in enakomerno plastjo.

Med izpostavljenostjo mora preskusna snov ostati v stiku s kožo, kar se zagotovi s poroznim gaznim povojem in nedražilnim obližem. Preskusna površina mora biti dodatno ustrezno pokrita, da gazni povoj in preskusna snov ostaneta na istem mestu in se živalim prepreči zaužitje preskusne snovi. Za preprečitev zaužitja se lahko uporabijo pripomočki za omejevanje gibanja, vendar popolna imobilizacija ni priporočena metoda. Lahko se uporabi tudi zaščitni ovrtnik.

Ob koncu obdobja izpostavljenosti se ostanek preskusne snovi odstrani, kadar je to izvedljivo, z vodo ali kako drugo ustrezno metodo čiščenja kože.

Vse živali je treba dnevno opazovati in zapisati znake strupenosti, vključno s časom njihovega pojava, stopnjo in trajanjem. Opazovati je treba spremembe na koži in kožuhi, očeh in sluznici ter tudi v dihalih, obtočilih, avtonomnem in osrednjem živčevju, somatomotorični aktivnosti in vedenjskem vzorcu. Tedensko je treba izmeriti maso živali. Priporoča se tudi tedenska meritev porabe hrane. Živali je treba redno opazovati, da se prepreči izguba živali zaradi kanibalizma, avtolize tkiv ali napak pri dajanju v kletke. Ob koncu študije se na vseh preživelih živalih nesatelitskih tretiranih skupin opravi obdukcija. Umirajoče živali in živali v hudem stresu ali s hudimi bolečinami se takoj ob odkritju odstranijo iz kletk ter humano usmrtijo in obducirajo.

Ob koncu preskusa se na vseh živalih, vključno z živalmi kontrolne skupine, opravijo naslednje preiskave:

- (1) hematološke preiskave, ki vključujejo najmanj določitev hematokrita, koncentracije hemoglobina, števila eritrocitov, skupnega in diferencialnega števila levkocitov in zmožnosti koagulacije;
- (2) klinične biokemijske preiskave krvi, ki vključujejo določanje najmanj enega parametra delovanja jeter in ledvic: serumska alanin-aminotransferaza (prej poznana kot glutamat-piruvat-transaminaza), serumska aspartat-aminotransferaza (prej poznana kot glutamat-okaloacetat-transaminaza), sečninski dušik, albumin, kreatinin v krvi, skupni bilirubin in skupne serumske beljakovine;

Druge določitve, ki so lahko potrebne za izdelavo ustrezne ocene strupenosti, vključujejo kalcij, fosfor, klorid, natrij, kalij, postno glukozo, lipide, hormone, ravnovesje kislina/baza, methemoglobin in aktivnost holinesteraze.

Kadar je potrebno, se za razširitev raziskave opaženih učinkov lahko uporabijo dodatne klinične biokemijske preiskave.

1.6.4 Makroskopska obdukcija

Na vseh živalih iz študije je treba izvesti popolno makroskopsko obdukcijo. Najmanj jetra, ledvica, nadledvične žleze in moda je treba stehitati mokre čim prej po disekciji, da se prepreči njihova dehidracija. Organe in tkiva, tj. normalno in tretirano kožo, jetra, ledvica, vranico, moda, nadledvične žleze, srce in tarčne organe (to je tiste organe, ki kažejo makroskopske poškodbe ali spremembe v velikosti), je treba shraniti v ustreznem mediju za morebitno histopatološko preiskavo v prihodnosti.

1.6.5 Histopatološka preiskava

Pri skupini, tretirani z velikim odmerkom, in kontrolni skupini je treba opraviti histološko preiskavo na shranjenih organih in tkivih. Pri vseh skupinah, tretiranih z manjšimi odmerki, je treba preiskati organe in tkiva, ki v skupini z največjim odmerkom kažejo poškodbe, ki se lahko pripišejo preskusni snovi. Živali satelitske skupine je treba histološko preiskati s posebnim poudarkom na tistih organih in tkivih, pri katerih so bili pri drugih tretiranih skupinah ugotovljeni strupeni učinki.

2. PODATKI

Podatke je treba povzeti v tabeli, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa in število živali, ki kažejo posamezno vrsto poškodbe.

Vse opažene rezultate je treba ovrednotiti z ustrezno statistično metodo. Uporabi se lahko katera koli priznana statistična metoda.

3. POROČANJE**3.1 POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- podatki o živalih (vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, prehrana itd.);
- preskusni pogoji (vključno z vrsto povoja: okluzivni ali neokluzivni);
- velikost odmerkov (vključno z nosilcem, če je bil uporabljen) in koncentracije;
- velikost odmerka brez učinkov, kadar je možno;
- podatki o strupenem odzivu po spolu in odmerku;
- čas smrti med študijo oziroma ali so živali preživele do zaključka;
- strupeni ali drugi učinki;
- čas odkritja vsakega nenormalnega znaka in njegov nadaljnji razvoj;
- podatki o hrani in telesni masi;
- opravljeni hematološki preskusi in rezultati;
- opravljeni klinični biokemijski preskusi in rezultati;
- izsledki obdukcije;
- podroben opis vseh histopatoloških izsledkov;
- statistična obdelava rezultatov, kadar je možno;
- razprava o rezultatih;
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. VIRI

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.10 MUTAGENOST (CITOGENETSKI PRESKUS „IN VITRO“ PRI SESALCIH)**1. METODA****1.1 UVOD**

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITEV

Glej Splošni uvod, del B(C).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Citogenetski preskus *in vitro* je kratkotrajen preskus mutagenosti, namenjen odkrivanju strukturnih kromosomskih aberacij v kultiviranih sesalskih celicah. Uporabijo se lahko kulture trajnih celičnih linij in tudi primarne celične kulture. Po izpostavitvi preskusnim snovem ob navzočnosti in ob odsotnosti sistema za aktivacijo presnove se celične kulture obdelajo z inhibitorji delitvenega vretena, kot je kolhicin, da se zberejo celice v metafazi podobnem stadiju mitoze (c-metafaза). Ob primernem času se celice požanjejo in izdelajo preparati kromosomov. Preparati se obarvajo, metafazne celice pa analizirajo za določitev kromosomskih nepravilnosti.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Priprave****1.6.1.1 Celice**

Uporabljajo se trajne celične linije ali primarne celične kulture, npr. celice kitajskega hrčka in človeški limfociti. Preskusne snovi se pred obdelavo celic pripravijo v gojišču ali raztopijo v ustreznih nosilcih.

1.6.1.2 Sistem za aktivacijo presnove

Celice se izpostavijo preskusni snovi ob navzočnosti in ob odsotnosti ustreznega sistema za aktivacijo presnove. Najpogosteje uporabljeni sistem je postmitohondrijska frakcija z dodanim kofaktorjem, pripravljena iz jeter glodavcev, ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo.

1.6.2 Preskusni pogoji

Število kultur:

Za vsako preskusno točko se uporabita najmanj dve vzporedni kulturi.

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcev:

Za negativno kontrolo se uporabljajo topilo (kadar topilo ni gojišče ali voda), aktivacijska zmes jetrnih encimov, aktivacijska zmes jetrnih encimov in topilo ter kontrolni vzorci brez dodatkov.

V vsak preskus se vključijo pozitivni kontrolni vzorci; kadar se za aktiviranje preskusne snovi uporabi aktivacijska zmes jetrnih encimov, se za pozitivno kontrolo uporabi snov, pri kateri je potrebna aktivacija presnove.

Velikost odmerka:

Uporabijo se najmanj trije različni odmerki preskusne snovi v razmaku najmanj enega log. Največji odmerek bi moral zavreti mitozo za približno 50 % ali pokazati kake druge znake citotoksičnosti. Če preskusna snov ni strupena, jo je treba preskusiti do meje točnosti oziroma do največje koncentracije 5 mg/l.

Pogoji kultiviranja:

Uporabijo se ustrezno gojišče za kulture in pogoji inkubacije (npr. temperatura, posode za kulture, koncentracija CO₂ in vlažnost).

1.6.3 Postopek

1.6.3.1 Priprava kultur

Trajne celične linije: Celice se proizvedejo iz založnih kultur (npr. s tripsinizacijo ali z otresanjem), nasadijo v posode za kulture ustrezno na gosto in inkubirajo pri 37 °C.

Človeški limfociti: Heparinizirana celotna kri se doda gojišču za kulture, ki vsebuje fitohemaglutinin, fetalni telečji serum in antibiotike, in se inkubira pri 37 °C.

1.6.3.2 Obdelava kultur s preskusno snovjo

(i) Obdelava brez aktivacijske zmesi jetrnih encimov

Vsaka obdelava, kadar je mogoče, zajame najmanj obdobje enega celega celičnega ciklusa, sistemi fiksiranja pa zagotovijo analizo prvih mitoz po obdelavi pri celicah, obdelanih v različnih stadijih ciklusa.

Kadar obdelava ne zajame celotnega celičnega ciklusa, se časi fiksiranja izberejo tako, da se vzorčijo celice, ki so med obdelavo v različnih stadijih celičnega ciklusa, npr. G₁, S in G₂.

Preskusna snov se doda kulturam trajnih celičnih linij, ko so v eksponentni fazi rasti. Kulture človeških limfocitov se obdelajo, ko so v polsinhronem stanju.

(ii) Obdelava ob prisotnosti aktivacijske zmesi jetrnih encimov

Pri obdelavi mora biti preskusna snov v kombinaciji z aktivacijskim sistemom prisotna čim dlje, ne da bi povzročila strupene učinke na celicah. Če zaradi strupenosti obdelava ne zajame celotnega celičnega ciklusa, se časi fiksiranja izberejo tako, da se vzorčijo celice, ki so med obdelavo v različnih stadijih celičnega ciklusa, npr. G₁, S in G₂.

Žetev celic:

Celične kulture se pred žetvijo primeren čas obdelujejo z inhibitorjem delitvenega vretena. Vsaka kultura posebej se požanje in obdela za pripravo kromosomov. Potrebni sta najmanj dve žetvi ob različnih časih. Priporoča se, da je prva žetev približno ob enem celičnem ciklusu in druga pozneje. S tem se zagotovi, da so zajeti vsi stadiji celičnega ciklusa in je upoštevan zamik celičnega ciklusa.

1.6.3.3 Priprava kromosomov

Priprava kromosomov vključuje hipotonično obdelavo celic, fiksiranje, razmaz na objektu stekelca in barvanje.

Analiza:

Najmanj 100 dobro razvitih metafaz na kulturo se analizira za določitev kromosomskih aberacij. Pred analizo se preparati označijo s kodami. V človeških limfocitih se analizirajo samo metafaze, ki vsebujejo 46 centromer.

V trajnih celičnih linijah se analizirajo samo metafaze, v katerih je število centromer enako modalnemu številu ± 2 .

Med preskusom je treba za vsako velikost odmerka določiti tudi mitotični indeks ali kak drug kazalec citotoksičnosti.

2. PODATKI

Podatki se predstavijo v obliki tabele. Za vsako obdelano in kontrolno kulturo posebej se navedejo aberacije kromatidnega tipa (presledki, prelomi, izmenjave), aberacije kromosomskega tipa (presledki, prelomi, majhne delecije, obroči, dvocentrični in policentrični kromosomi) in število nepravilnih metafaz (vključno s presledki in brez njih).

Podatki se vrednotijo z ustreznimi statističnimi metodami.

Rezultate preskusov je treba primerjati s sočasnimi negativnimi kontrolnimi vzorci.

Izvedeta se najmanj dva neodvisna preskusa. Lahko zadostuje en sam preskus, če se to lahko znanstveno utemelji. Drugega preskusa ni treba izvesti na popolnoma enak način, kakor prvega. Lahko je celo bolj primerno spremeniti nekatere pogoje preskusa, da se dobijo bolj uporabni podatki.

3. POROČANJE**3.1 POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- uporabljene celice;
- preskusni pogoji: sestava gojišča, koncentracija CO₂, temperatura inkubacije, čas inkubacije, velikost odmerkov, čas obdelave, trajanje obdelave skupaj z uporabljenim inhibitorjem delitvenega vretena in njegovo koncentracijo, vrsta uporabljene aktivacijske mešanice jetrnih encimov, pozitivni in negativni kontrolni vzorci;
- število celičnih kultur;
- število analiziranih metafaz (podatki navedeni za vsako kulturo posebej);
- mitotični indeks ali drugi kazalci citotoksičnosti;
- vrsta in število aberacij, navedena za vsako obdelano in kontrolno kulturo posebej, modalno kromosomsko število v uporabljenih trajnih celičnih linijah;
- statistično ovrednotenje;
- razprava o rezultatih;
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. VIRI

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.11 MUTAGENOST (CITOGENETSKI PRESKUS V KOSTNEM MOZGU SESALCEV „IN VIVO“, KROMOSOMSKA ANALIZA)**1. METODA****1.1 UVOD**

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITEV

Glej Splošni uvod, del B(C).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Ta citogenetski preskus *in vivo* je kratkotrajen preskus mutagenosti, namenjen odkrivanju strukturnih kromosomskih aberacij. Kromosomske aberacije se običajno ocenjujejo v prvih mitozah po tretiranju. Pri kemičnih mutagenih je večina povzročenih aberacij kromatidnega tipa.

Pri metodi se uporabljajo celice kostnega mozga sesalcev, ki se primerno izpostavijo preskusnim snovem in žrtvujejo v zaporednih intervalih. Pred žrtvovanjem se živali nadalje tretirajo z inhibitorjem delitvenega vretena, kot je kolhicin, da se zberejo celice v metafazi podobnemu stadiju mitoze (c-metafaза). Pripravijo se na zraku posušeni preparati kromosomov iz celic in se obarvajo, nato se določijo kromosomske aberacije z mikroskopsko analizo metafaz.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Priprave**

Preskusne snovi se raztopijo v fiziološki raztopini. Če so netopne, se raztopijo ali suspendirajo v ustreznih nosilcih.

Uporabijo se sveže pripravljene raztopine preskusne snovi. Če se za lažje odmerjanje uporabi nosilec, ta ne sme vplivati na preskusno snov ali povzročiti strupenih učinkov.

1.6.2 Preskusni pogoji**1.6.2.1 Poskusne živali**

Uporabijo se glodalci, kot so podgane, miši ali kitajski hrčki. Zdrave mlade odrasle živali se naključno izberejo in dodelijo tretiranim in kontrolnim skupinam.

1.6.2.2 Število in spol

Za vsako preskusno in kontrolno skupino se uporabi najmanj pet samic in pet samcev. Tako se na vsako časovno obdobje žrtvuje 10 živali na skupino, če program preskusa predvideva več časov vzorčenja po tretiranju.

Pri pozitivni kontrolni skupini zadostuje enkratno vzorčenje.

1.6.2.3 *Način dajanja*

Preskusne snovi se običajno dajo samo enkrat. Na podlagi informacij o strupenosti se lahko uporabi program ponovljenega tretiranja. Vendar se program ponovljenega tretiranja lahko uporabi samo, če preskusna snov ne pokaže citotoksičnih učinkov v kostnem mozgu. Običajen način dajanja je oralno ali z intraperitonealno injekcijo. Primerni so lahko tudi drugi načini dajanja.

1.6.2.4 *Uporaba negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcev*

Kot pozitivna kontrola se uporabi snov, za katero je znano, da povzroči kromosomske aberacije *in vivo*, v načrt vsakega preskusa pa se vključi tudi negativna (topilo) kontrolna skupina.

1.6.2.5 *Velikost odmerka*

Za osnovno zbirko podatkov se uporabi en odmerek preskusne snovi, pri čemer je to največji tolerančni odmerek ali odmerek, ki povzroči nekaj znakov citotoksičnosti (npr. delno inhibicijo mitoze).

Pri „nestrupenih“ snoveh je največji (mejni) odmerek, ki ga je treba preučiti pri dajanju enkratnega odmerka, enak 2 000 mg/kg telesne mase.

Če se uporabi program ponovljenega odmerka, je mejni odmerek 1 000 mg/kg telesne mase na dan.

Lahko se uporabijo dodatne velikosti odmerkov, če na to kažejo znanstveni razlogi.

Če se preskus uporablja kot metoda za preverjanje, je treba uporabiti najmanj dve dodatni velikosti odmerkov.

1.6.3 **Postopek**

Preskus se lahko izvede na dva načina:

- (i) Živali se enkrat tretirajo s preskusno snovjo v največjem tolerančnem odmerku. Najprej se vzorci odvzamejo 24 ur po tretiranju. Če so v tej fazi rezultati očitno pozitivni, nadaljnje vzorčenje morda ne bo potrebno. Če pa so rezultati negativni ali dvoumni, saj preskusna snov lahko vpliva na dinamiko celičnega ciklusa, se opravi še eno zgodnejše in eno poznejše vzorčenje, v ustreznih časovnih intervalih v območju od 6 do 48 ur po tretiranju.

Kadar se uporabijo dodatne velikosti odmerkov, je vzorčenje treba opraviti v posebno občutljivih intervalih ali, če ti niso poznani, 24 ur po tretiranju.

- (ii) Če podatki o farmakokinetiki in presnovi kažejo, da bi bil primeren program ponovljenega tretiranja, se lahko uporabi ponovljeno odmerjanje, vzorci pa se odvzamejo 6 in 24 ur po zadnjem tretiranju.

Priprava kostnega mozga:

Pred žrtvovanjem se živalim intraperitonealno injicira ustrezen odmerek inhibitorja delitvenega vretena, da se pridobi ustrezno število celic v c-metafazi. Kostni mozeg se odvzame iz obeh stegenic sveže usmrčenih živali z izpiranjem z izotonično raztopino. Po ustrezni hipotonični obdelavi se celice fiksirajo in nanesejo na objektna stekelca. Preparati se posušijo na zraku in nato obarvajo.

Analiza:

Pred mikroskopsko analizo se preparati označijo s kodami. Na vsako žival se analizira najmanj 50 dobro razvitih metafaz s polnim številom centromer za določitev strukturnih kromosomskih aberacij. Poleg tega se lahko določi tudi mitotični indeks za vsako žival.

2. PODATKI

Podatki se predstavijo v obliki tabele. Za vsako tretirano in kontrolno žival posebej se navedejo aberacije kromatidnega in izokromatidnega tipa (vrzeli, prelomi, izmenjave) in mitotični indeksi, kadar se določijo. Navedejo se tudi srednje vrednosti in standardne deviacije za vsako preskusno in kontrolno skupino. Podatki se ovrednotijo z ustreznimi statističnimi metodami.

3. POROČANJE**3.1 POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- vrsta, sev in starost uporabljenih živali;
- število živali vsakega spola v preskusnih in kontrolnih skupinah;
- preskusni pogoji: podroben opis programa tretiranja in vzorčenja, velikost odmerkov, trajanje tretiranja z inhibitorjem delitvenega vretena in uporabljena koncentracija inhibitorja;
- število analiziranih metafaz na žival;
- mitotični indeksi, kadar so bili določeni;
- tip in število aberacij, za vsako tretirano in kontrolno žival posebej;
- znaki strupenosti med potekom študije;
- statistično ovrednotenje;
- razprava o rezultatih;
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. VIRI

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.12 MUTAGENOST (PRESKUS MIKRONUKLEUSOV)**1. METODA****1.1 UVOD**

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITEV

Glej Splošni uvod, del B(C).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskus mikronukleusov je kratkotrajen preskus *in vivo* pri sesalcih, namenjen odkrivanju kromosomskih poškodb ali poškodb mitotičnega aparata, ki jih povzročijo kemikalije. Ta preskus temelji na povečanju števila mikronukleusov v polikromatičnih eritrocitih tretiranih živali v primerjavi s kontrolnimi živalmi.

Mikronukleusi nastanejo iz fragmentov kromosomov ali celih kromosomov, ki v mitози zaostanejo. Ko se eritroblasti razvijejo v eritrocite, se jedro izvrže, medtem ko mikronukleus lahko ostane v citoplazmi. V tem preskusu se uporabijo mladi polikromatični eritrociti iz kostnega mozga laboratorijskih sesalcev, ki so bili primerno izpostavljeni preskusnim snovem. Kostni mozeg se odvzame, pripravijo se razmazi in se obarvajo. Polikromatični eritrociti se mikroskopsko pregledajo, preštejejo se mikronukleusi in določi razmerje med polikromatičnimi in normokromatičnimi eritrociti.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Priprave**

Preskusne snovi se raztopijo v izotonični raztopini. Če so netopne, se raztopijo ali suspendirajo v ustreznih nosilcih. Če se uporabi nosilec, ne sme vplivati na preskusno snov ali povzročati strupenih učinkov. Običajno se uporabijo sveže pripravljene raztopine preskusne snovi.

1.6.2 Preskusni pogoji**1.6.2.1 Poskusne živali**

Priporočajo se miši, vendar se lahko uporabijo tudi drugi sesalci. Zdrave mlade odrasle živali se naključno izberejo in dodelijo tretiranim in kontrolnim skupinam.

1.6.2.2 Število in spol

Za vsako preskusno in kontrolno skupino se uporabi najmanj pet samic in pet samcev. Tako se na vsako časovno obdobje žrtvuje 10 živali na skupino, če program preskusa predvideva več časov vzorčenja po tretiranju. Pri pozitivni kontrolni skupini zadostuje enkratno vzorčenje.

1.6.2.3 Način dajanja

Preskusne snovi se običajno dajo samo enkrat. Na podlagi informacij o strupenosti se lahko uporabi program ponovljenega tretiranja. Vendar se program ponovljenega tretiranja lahko uporabi samo, če preskusna snov ne pokaže citotoksičnih učinkov v kostnem mozgu. Običajen način dajanja je oralno ali z intraperitonealno injekcijo. Primerni so lahko tudi drugi načini dajanja.

1.6.2.4 Uporaba negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcev

V vsakem preskusu je treba uporabiti pozitivne in negativne (topilo) kontrolne vzorce.

1.6.2.5 Velikost odmerka

Za osnovno zbirko podatkov se uporabi en odmerek preskusne snovi, pri čemer je ta odmerek največji tolerančni odmerek ali odmerek, ki povzroči nekaj znakov citotoksičnosti, npr. s spremembo razmerja med polikromatičnimi in normokromatičnimi eritrociti.

Pri „nestrupenih“ snoveh je največji (mejni) odmerek, ki ga je treba preučiti pri dajanju enkratnega odmerka, enak 2 000 mg/kg telesne mase.

Če se uporabi program ponovljenega odmerka, je mejni odmerek 1 000 mg/kg telesne mase na dan.

Lahko se uporabijo dodatne velikosti odmerkov, če na to kažejo znanstveni razlogi.

Če se preskus uporablja kot metoda za preverjanje, je treba uporabiti najmanj dve dodatni velikosti odmerkov.

1.6.3 Postopek

Preskus se lahko izvede na dva načina:

- (i) Živali se s preskusno snovjo tretirajo enkrat. Časi vzorčenja morajo sovpadati z največjim odzivom preskusa, ki se spreminja glede na preskusno snov. Zato se vzorci kostnega mozga odvzamejo najmanj dvakrat, najmanj 12 ur po tretiranju in najpozneje 48 ur po tretiranju.

Kadar se uporabijo dodatne velikosti odmerkov, je vzorčenje treba opraviti v najbolj občutljivem obdobju ali, če to ni poznano, 24 ur po tretiranju.

- (ii) Če podatki o farmakokinetiki in presnovi kažejo, da bi bil primeren program ponovljenega tretiranja, se lahko uporabi ponovljeno odmerjanje, vzorci pa se odvzamejo enkrat, najmanj 12 ur po zadnjem tretiranju.

Priprava kostnega mozga

Kostni mozeg se odvzame iz obeh stegenic sveže usmrčenih živali z izpiranjem s fetalnim telečjim serumom. Celice se sedimentirajo s centrifugiranjem, supernatant se zavrže. Na objektna stekelca se kanejo kapljice homogene celične suspenzije in pripravijo razmazi. Preparati se posušijo na zraku in nato obarvajo.

Analiza:

Pred mikroskopsko analizo se preparati označijo s kodami. Na vsako žival se pregleda najmanj 1 000 polikromatičnih eritrocitov in določi incidenca mikronukleusov.

Za vsako žival se določi razmerje med normokromatičnimi in polikromatičnimi eritrociti, tako da se prešteje skupaj 1 000 eritrocitov.

2. PODATKI

Podatki se predstavijo v obliki tabele. Za vsako preskusno in kontrolno žival posebej se navedejo število prešteti polikromatičnih eritrocitov, število polikromatičnih eritrocitov z mikronukleusi in odstotek celic z mikronukleusi, skupaj z razmerjem med normokromatičnimi in polikromatičnimi eritrociti. Navedejo se tudi srednje vrednosti in standardne deviacije za vsako preskusno in kontrolno skupino. Navedeni podatki se ovrednotijo z ustrezno statistično metodo.

3. POROČANJE**3.1 POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- vrsta, sev in starost uporabljenih živali;
- število živali vsakega spola v preskusnih in kontrolnih skupinah;
- preskusni pogoji: podroben opis programa tretiranja in vzorčenja, velikost odmerkov, podatki o strupenosti, pozitivni in negativni kontrolni vzorci;
- merila za štetje mikronukleusov;
- razmerje odmerka/učinek, kadar je to mogoče;
- znaki strupenosti med potekom študije;
- statistično ovrednotenje;
- razprava o rezultatih;
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. VIRI

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.13 MUTAGENOST (ESCHERICHIA COLI – PRESKUS POVRATNE MUTACIJE)**1. METODA****1.1 UVOD**

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITEV

Glej Splošni uvod, del B(C).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Sistem povratne mutacije za triptofan (trp) pri vrsti *Escherichia coli* je mikrobiološki preskus, pri katerem se meri povratna mutacija $trp^- \rightarrow trp^+$, ki jo povzročijo kemikalije s substitucijo baz v genomu organizma.

Bakterije se izpostavijo preskusnim snovem ob aktivaciji presnove in brez nje. Po ustreznem obdobju inkubacije na minimalnem gojišču se preštejejo kolonije povratnih mutant in primerjajo s številom spontanih povratnih mutant v neobdelani kontrolni kulturi in/ali kontrolni kulturi, obdelani s topilom.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

Za izvedbo preskusa se lahko uporabita naslednji metodi: (1) metoda predinkubacije; in (2) metoda neposredne vključitve v gojišče, pri kateri se bakterije in preskusna snov zmešajo s poltrdim gojiščem in razlijejo po površini plošče selektivnega gojišča.

1.6.1 Priprava**1.6.1.1 Bakterije**

Bakterije se gojijo pri 37 °C do pozne eksponentne ali zgodnje stacionarne faze rasti. Približna gostota celic mora biti 10^8 - 10^9 celic na mililiter.

1.6.1.2 Aktivacija presnove

Bakterije je treba izpostaviti preskusni snovi ob navzočnosti in ob odsotnosti ustreznega sistema za aktivacijo presnove. Najpogostejše uporabljani sistem je postmitohondrijska frakcija z dodanim kofaktorjem, pripravljena iz jeter glodavcev, ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo.

1.6.2 Preskusni pogoji**1.6.2.1 Preskusni sevi**

Uporabiti je treba tri seve: WP2, WP2 uvr A in WP2 uvr A pKM 101. Uporabiti je treba priznane metode priprave in shranjevanja založnih kultur. Preveriti je treba potrebe za rast in genetsko identiteto sevov, njihovo občutljivost za ultravijolično sevanje ali mitomicin C ter odpornost proti ampicilinu pri sevu WP2 uvr A pKM 101. Sevi bi morali proizvesti tudi spontane povratne mutante v pričakovanem območju pogostnosti.

1.6.2.2 Gojišča

Uporabi se primerno gojišče za izražanje in selekcijo mutant in ustrezno poltrdo gojišče.

1.6.2.3 Uporaba negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcev

Sočasno je treba izvesti kontrolo brez obdelave in kontrolo s toplom. Izvesti je treba tudi pozitivno kontrolo, zaradi dveh razlogov:

(i) Za potrditev občutljivosti bakterijskih sevov.

Za pozitivno kontrolo pri preskusih brez aktivacije presnove se lahko uporabi metil-metan-sulfonat, 4-nitrokinolin oksid ali etilnitrozosečnina.

(ii) Za zagotavljanje aktivnosti ustreznih presnovnih sistemov.

Pozitivna kontrola aktivnosti presnovnega sistema za vse seve je 2-aminoantracen. Za pozitivno kontrolo je treba uporabiti snov iz istega razreda, kakor je preskusna snov, kadar je taka snov na voljo.

1.6.2.4 Količina preskusne snovi na ploščo

Izvedejo se preskusi z najmanj petimi različnimi količinami preskusne snovi, s semilogaritetskimi intervali med ploščami. Snovi se preskušajo do meje topnosti ali strupenosti. Strupenost dokazuje zmanjšanje števila spontanov povratnih mutant, čistina na bakterijskem ozadju ali stopnja preživetja obdelanih kultur. Nestrupene snovi je treba preskušati do koncentracije 5 mg na ploščo, preden se lahko štejejo za negativne.

1.6.2.5 Pogoji inkubacije

Plošče se inkubirajo 48 do 72 ur pri 37 °C.

1.6.3 Postopek

Pri metodi neposredne vključitve v ploščo brez encimske aktivacije se snov in 0,1 ml sveže bakterijske kulture dodata 2 ml poltrdega gojišča. Pri preskusih z aktivacijo presnove se 0,5 ml aktivacijske zmesi jetrnih encimov, ki vsebuje zadostno količino postmitohondrijske frakcije, doda poltrdemu gojišču, potem ko so mu bile dodane preskusna snov in bakterije. Vsebina vsake epruvete se premeša in razlije po površini plošče selektivnega gojišča. Počaka se, da se poltrdo gojišče strdi, nato se plošče inkubirajo 48 do 72 ur pri 37 °C. Po končani inkubaciji se preštejejo kolonije povratnih mutant na ploščo.

Pri metodi predinkubacije se zmes preskusne snovi, 0,1 ml sveže bakterijske kulture in ustrezne količine aktivacijske zmesi jetrnih encimov ali enake količine pufra predinkubira, preden se dodata 2 ml poltrdega gojišča. Vsi drugi postopki so enaki kakor pri metodi vključitve v ploščo.

Pri obeh metodah se pripravijo najmanj po tri plošče na koncentracijo.

2. PODATKI

Navede se število kolonij povratnih mutant na ploščo za kontrolne in za obdelane serije. Treba je navesti število na posameznih ploščah, srednjo vrednost števila kolonij povratnih mutant na ploščo in standardno deviacijo za preskusno snov in kontrolne vzorce.

Podatke je treba ovrednotiti z ustreznimi statističnimi metodami.

Izvedeta se najmanj dva neodvisna preskusa. Drugega preskusa ni treba izvesti na popolnoma enak način, kakor prvega. Lahko je celo bolj primerno spremeniti nekatere pogoje preskusa, da se dobijo bolj uporabni podatki.

3. POROČANJE**3.1 POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- bakterije, uporabljeni sev;
- preskusni pogoji: velikost odmerkov, strupenost, sestava gojišč; postopki obdelave (predinkubacija, inkubacija); sistem za aktivacijo presnove; referenčne snovi, negativni kontrolni vzorci;
- število kolonij na posameznih ploščah, srednja vrednost števila kolonij povratnih mutant na ploščo, standardna deviacija, razmerje odmerkov/učinek, kadar je možno;
- razprava o rezultatih;
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. LITERATURA

Glej Splošni uvod, del B(E).

B.14 MUTAGENOST (SALMONELLA TYPHIMURIUM – PRESKUS POVRATNE MUTACIJE)**1. METODA****1.1 UVOD**

Glej Splošni uvod, del B(A).

1.2 OPREDELITEV

Glej Splošni uvod, del B(C).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Sistem povratne mutacije za histidin (his) pri vrsti *Salmonella typhimurium* je mikrobiološki preskus, pri katerem se meri povratna mutacija $his^- \rightarrow his^+$, ki jo povzročijo kemikalije s substitucijo baz ali premikom bralnega okvirja v genomu organizma.

Bakterije se izpostavijo preskusnim snovem ob aktivaciji presnove ali brez nje in nasadijo na ploščo minimalnega gojišča. Po ustreznem obdobju inkubacije se preštejejo kolonije povratnih mutant in primerjajo s številom spontanih povratnih mutant v neobdelani kontrolni kulturi in/ali kontrolni kulturi, obdelani s topilom.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE**1.6.1 Priprave****1.6.1.1 Bakterije**

Sveže kulture bakterij se gojijo pri 37 °C do pozne eksponentne ali zgodnje stacionarne faze rasti. Približna gostota celic mora biti 10^8 do 10^9 celic na mililiter.

1.6.1.2 Aktivacija presnove

Bakterije je treba izpostaviti preskusni snovi ob navzočnosti in ob odsotnosti ustreznega sistema za aktivacijo presnove. Najpogostejše uporabljani sistem je postmitohondrijska frakcija z dodanim kofaktorjem, pripravljena iz jeter glodavcev, ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo.

1.6.2 Preskusni pogoji**1.6.2.1 Preskusni sevi**

Uporabiti je treba najmanj štiri seve: TA 1535, TA 1537 ali TA 97, TA 98 in TA 100; lahko se uporabijo tudi drugi sevi, kot sta TA 1538 in TA 102. Uporabiti je treba priznane metode priprave in shranjevanja založnih kultur. Preveriti je treba potrebe za rast in genetsko identiteto sevov, njihovo občutljivost za ultravijolično sevanje in kristal vijolično ter njihovo odpornost proti ampicilinu. Sevi bi morali proizvesti tudi spontane povratne mutante v pričakovanem območju pogostnosti.

1.6.2.2 *Gojišča*

Uporabi se primerno selektivno gojišče in ustrezno poltrdo gojišče.

1.6.2.3 *Uporaba negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcev*

Sočasno je treba izvesti kontrolo brez obdelave in kontrolo s topilom. Izvesti je treba tudi pozitivno kontrolo, zaradi dveh razlogov:

(i) Za potrditev občutljivosti bakterijskih sevov.

Za preskuse brez aktivacije presnove se lahko uporabijo naslednje spojine:

Sev	Povratno mutacijo povzroči
TA 1535, TA 100	natrijev azid
TA 1538, TA 98, TA 97	2-nitrofluoren
TA 1537	9-aminoakridin
TA 102	kumol hidroperoksid

(ii) Za zagotavljanje aktivnosti ustreznega presnovnega sistema.

Pozitivna kontrola aktivnosti presnovnega sistema za vse seve je 2-aminoantracen. Za pozitivno kontrolo je treba uporabiti snov iz istega razreda, kakor je preskusna snov, kadar je taka snov na voljo.

1.6.2.4 *Količina preskusne snovi na ploščo*

Izvedejo se preskusi z najmanj petimi različnimi količinami preskusne snovi, s semilogaritemskimi intervali med ploščami. Snovi se preskušajo do meje topnosti ali strupenosti. Strupenost dokazuje zmanjšanje števila spontanov povratnih mutant, čistina na bakterijskem ozadju ali stopnja preživetja obdelanih kultur. Nestrupene snovi je treba preskušati do koncentracije 5 mg na ploščo, preden se lahko štejejo za negativne.

1.6.2.5 *Pogoji inkubacije*

Plošče se inkubirajo 48 do 72 ur pri 37 °C.

1.6.3 **Postopek**

Pri metodi neposredne vključitve v ploščo brez encimske aktivacije se snov in 0,1 ml sveže bakterijske kulture dodata 2 ml poltrdega gojišča. Pri preskusih z aktivacijo presnove se 0,5 ml aktivacijske zmesi jetrnih encimov, ki vsebuje zadostno količino postmitohondrijske frakcije, doda poltrdemu gojišču, potem ko so mu bile dodane preskusna snov in bakterije. Vsebina vsake epruvete se premeša in razlije po površini plošče selektivnega gojišča. Počaka se, da se poltrdo gojišče strdi, nato se plošče inkubirajo 48 do 72 ur pri 37 °C. Po končani inkubaciji se preštejejo kolonije povratnih mutant na ploščo. Pri metodi predinkubacije se zmes preskusne snovi, 0,1 ml sveže bakterijske kulture in ustrezne količine aktivacijske zmesi jetrnih encimov ali enake količine pufra predinkubira, preden se dodata 2 ml poltrdega gojišča. Vsi drugi postopki so enaki kakor pri metodi neposredne vključitve v ploščo.

Pri obeh metodah se pripravijo najmanj po tri plošče na koncentracijo.

2. **PODATKI**

Navede se število kolonij povratnih mutant na ploščo za kontrolne in za obdelane serije.

Treba je navesti število na posameznih ploščah, srednjo vrednost števila kolonij povratnih mutant na ploščo in standardna deviacija za preskusno snov in kontrolne vzorce.

Podatke je treba ovrednotiti z ustreznimi statističnimi metodami.

Izvedeta se najmanj dva neodvisna preskusa. Drugega preskusa ni treba izvesti na popolnoma enak način, kakor prvega. Lahko je celo bolj primerno spremeniti nekatere pogoje preskusa, da se dobijo bolj uporabni podatki.

3. POROČANJE**3.1 POROČILO O PRESKUSU**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- bakterije, uporabljeni sev;
- preskusni pogoji: velikost odmerkov, strupenost, sestava gojišč, postopki obdelave (predinkubacija, inkubacija), sistem aktivacije presnove, referenčne snovi, negativni kontrolni vzorci;
- število kolonij na posameznih ploščah, srednja vrednost števila kolonij povratnih mutant na ploščo, standardna deviacija, razmerje odmerkov/učinek, kadar je možno;
- razprava o rezultatih;
- razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod, del B(D).

4. LITERATURA

Glej Splošni uvod, del B(E).

DEL C: METODE ZA DOLOČANJE STRUPENOSTI ZA OKOLJE**C.1 AKUTNA STRUPENOST ZA RIBE****1. METODA****1.1 UVOD**

Namen tega preskusa je določiti akutno smrtno strupenost snovi za ribe v sladki vodi. Za pomoč pri izbiranju najbolj primerne preskusne metode (statična, polstatična ali pretočna), da se zagotovijo zadovoljivo konstantne koncentracije preskusne snovi v času preskusa, je zaželeno, da je na voljo čim več informacij o topnosti v vodi, parnem tlaku, kemični stabilnosti, disociacijski konstanti in biorazgradljivosti snovi.

Pri načrtovanju preskusa in pri razlagi rezultatov je treba upoštevati tudi dodatne informacije (na primer strukturno formulo, stopnjo čistosti, vrsto in odstotek bistvenih nečistot, prisotnost in količino dodatkov ter porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda).

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Akutna strupenost je zaznaven škodljiv učinek, ki ga v kratkem času (nekaj dneh) v organizmu povzroči izpostavljenost snovi. V tem preskusu je akutna strupenost izražena kot srednja smrtna koncentracija (LC_{50}), to je koncentracija v vodi, ki povzroči pogin 50 % rib v preskusni skupini med neprekinjeno izpostavljenostjo, katere trajanje mora biti navedeno.

Vse koncentracije preskusne snovi so navedene v masi na volumen (miligramih na liter). Lahko se izrazijo tudi v masi na maso ($mg\ kg^{-1}$).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Za dokazovanje, da se odziv preskusne vrste v laboratorijskih preskusnih pogojih ni bistveno spremenil, se lahko preskusi referenčna snov.

Za ta preskus ni določena nobena referenčna snov.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Lahko se izvede mejni preskus s 100 mg na liter, v dokaz, da je LC_{50} večji od te koncentracije.

Ribe se za 96 ur izpostavijo preskusni snovi, dodani vodi, v nizu koncentracij. Smrtni primeri se zapišejo v najmanj 24-urnih intervalih, in kadar je mogoče, se za vsak čas opazovanja izračunajo koncentracije, pri katerih pogine 50 % rib (LC_{50}).

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Merila kakovosti se uporabljajo za mejni preskus in za popolni preskus.

Ob koncu preskusa smrtnost v kontrolnih vzorcih ne sme biti večja od 10 % (oziroma ene ribe, če se uporabi manj kot deset rib).

Ves čas preskusa mora biti koncentracija raztopljenega kisika več kot 60 % nasičenosti zraka.

Ves čas preskusa se koncentracije preskusne snovi vzdržujejo v območju 80 % začetnih koncentracij.

Pri snoveh, ki se lahko topijo v preskusnem mediju in dajejo stabilne raztopine, tj. snovi, ki ne bodo znatno hlapile, se razgradile, hidrolizirale ali adsorbirale, se šteje, da je začetna koncentracija enakovredna nazivni koncentraciji. Priložijo se dokazi, da so se koncentracije vzdrževale ves čas preskusa in so bila izpolnjena merila kakovosti.

Pri snoveh, ki:

- (i) so slabo topne v preskusnem mediju, ali
- (ii) so zmožne tvoriti stabilne emulzije ali disperzije, ali
- (iii) v vodnih raztopinah niso stabilne,

se šteje, da je začetna koncentracija koncentracija, izmerjena v raztopini (ali, če to tehnično ni izvedljivo, v vodnem stolpcu) na začetku preskusa. Koncentracija se določi po vzpostavitvi ravnotežja, vendar pred vnosom preskusnih rib.

V vsakem od teh primerov, je treba opraviti dodatne meritve med preskusom, da se potrdijo dejanske koncentracije izpostavljenosti ali izpolnitev meril kakovosti.

Vrednost pH se ne sme spreminjati za več kot 1 enoto.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

Uporabijo se lahko tri vrste postopkov:

Statični preskus:

Preskus strupenosti, pri katerem ni pretoka preskusne raztopine. (Raztopine ostanejo nespremenjene ves čas preskusa.)

Polstatični preskus:

Preskus, pri katerem ni pretoka preskusne raztopine, se pa preskusna raztopina v rednih časovnih presledkih (npr. 24 ur) v celoti obnovi.

Pretočni preskus:

Preskus strupenosti, pri katerem se voda v preskusnih komorah neprestano obnavlja, pri čemer se preskusna snov prenaša z vodo, uporabljeno za obnavljanje preskusnega medija.

1.6.1 Reagenti

1.6.1.1 Raztopine preskusnih snovi

Osnovne raztopine potrebnih koncentracij se pripravijo z raztopitvijo snovi v deionizirani vodi ali vodi v skladu s točko 1.6.1.2.

Izbrane preskusne koncentracije se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Če se preskušajo velike koncentracije, se snov lahko raztopi neposredno v vodi za redčenje.

Običajno je treba snovi preskusiti le do meje topnosti. Pri nekaterih snoveh (npr. snoveh, ki so slabo topne v vodi ali imajo visok P_{ow} , ali tistih, ki v vodi tvorijo stabilne disperzije in ne pravih raztopin) je sprejemljivo izvesti preskus pri koncentraciji nad mejo topnosti, da se zagotovi doseganje največje topne/stabilne koncentracije. Pomembno pa je, da ta koncentracija ne bo motila preskusnega sistema (npr. tvorba filma na vodni površini, ki prepreči obnavljanje kisika v vodi itd.).

Pri pripravi osnovnih raztopin snovi, ki so slabo topne v vodi, ali za lažje dispergiranje teh snovi v preskusnem mediju se lahko uporabi ultrazvočno dispergiranje, organska topila, emulgatorji ali disperzijska sredstva. Kadar se uporabijo take pomožne snovi, morajo preskusne raztopine vseh koncentracij vsebovati enako količino pomožne snovi in dodatno kontrolno skupino rib je treba izpostaviti enaki koncentraciji pomožne snovi, kakor je uporabljena v preskusnih skupinah. Koncentracija takih pomožnih snovi mora biti čim manjša in v nobenem primeru ne sme preseči 100 mg na liter preskusnega medija.

Preskus je treba opraviti brez uravnavanja pH. Če obstajajo dokazi o izraziti spremembi pH, se priporoča, da se preskus ponovi z uravnanim pH in rezultati vključijo v poročilo. V tem primeru je treba pH vrednost osnovne raztopine uravnati na pH vrednost vode za redčenje, razen če obstajajo posebni razlogi, da se to ne stori. V ta namen je najbolje uporabiti HCl in NaOH. To uravnavanje pH je treba opraviti tako, da se koncentracija preskusne snovi v osnovni raztopini bistveno ne spremeni. Če uravnava povzroči kemijsko reakcijo ali obarjanje preskusne snovi, je treba o tem poročati.

1.6.1.2 Voda za vzdrževanje in razredčenje

Uporabi se lahko pitna voda (ki ni onesnažena s potencialno zdravju škodljivimi koncentracijami klora, težkih kovin ali drugih snovi), kakovostna naravna voda ali obdelana voda (glej dodatek 1). Priporoča se uporaba vode s skupno trdoto med 50 in 250 mg na liter (kot CaCO_3) in pH vrednostjo 6,0 do 8,5.

1.6.2 Aparatura

Vse aparature morajo biti izdelane iz kemijsko inertnih materialov.

- sistem za avtomatsko redčenje (za pretočni preskus),
- oksimeter,
- oprema za določanje trdote vode,
- ustrezna aparatura za uravnavanje temperature,
- pH-meter.

1.6.3 Preskusne ribe

Ribe morajo biti zdrave in brez očitnih nepravilnosti.

Uporabljeno vrsto je treba izbrati na podlagi praktičnih meril, kot so njihova razpoložljivost celo leto, lahko vzdrževanje, pripravnost za preskušanje, relativna občutljivost za kemikalije in kakršnikoli ekonomski, biološki ali ekološki dejavniki, ki so lahko pomembni. Pri izbiri vrste rib je treba upoštevati tudi potrebo po primerljivosti dobljenih podatkov in obstoječe mednarodne uskladitve (vir 1).

Seznam ribjih vrst, ki se priporočajo za ta preskus, je v dodatku 2; najbolj primerni vrsti sta cebrica in šarenka.

1.6.3.1 Vzdrževanje

Ribe naj po možnosti izvirajo iz ene same jate rib s podobno dolžino in starostjo. Ribe je treba vzdrževati najmanj 12 dni v naslednjih pogojih:

obremenitev:

ustrezna sistemu (kroženje ali pretok) in vrsti rib,

voda:

glej 1.6.1.2,

svetloba:

12 do 16 ur osvetljevanja dnevno,

koncentracija raztopljenega kisika:

najmanj 80 % nasičenosti zraka,

hranjenje:

trikrat tedensko ali vsak dan, 24 ur pred začetkom preskusa pa se hranjenje ustavi.

1.6.3.2 Smrtnost

Po 48-urnem obdobju prilagajanja se zapišejo smrtni primeri in uporabijo naslednja merila:

— več kot 10 % populacije v sedmih dneh:

celotna serija se zavrne,

— med 5 in 10 % populacije:

obdobje vzdrževanja se podaljša za sedem dni. Če ne pride do novih smrtnih primerov, je serija sprejemljiva, v nasprotnem primeru jo je treba zavrniti,

— manj kot 5 % populacije:

serija se sprejme.

1.6.4 Prilagajanje

Najmanj sedem dni pred uporabo morajo biti vse ribe izpostavljene vodi z enako kakovostjo in temperaturo, kakor se bo uporabila v preskusu.

1.6.5 Preskusni postopek

Pred dokončnim preskusom se lahko opravi preskus za ugotavljanje območja, namenjen pridobivanju informacij o območju koncentracij, ki se bodo uporabile v glavnem preskusu.

Poleg preskusnega niza se izvede ena kontrola brez preskusne snovi in, če je potrebno, tudi ena kontrola s pomožno snovjo.

Glede na fizikalne in kemijske lastnosti preskusne snovi je treba izbrati ustrezno metodo preskusa, statično, polstatično ali pretočno, tako da so izpolnjena merila kakovosti.

Ribe se izpostavijo snovi na spodaj opisani način:

— trajanje: 96 ur

— število živali: najmanj 7 na koncentracijo,

— bazeni: s primernim volumnom glede na priporočeno obremenitev,

— obremenitev: za statične in polstatične preskuse je največja priporočena obremenitev 1 g na liter; pri pretočnih sistemih je sprejemljiva tudi večja obremenitev,

— preskusna koncentracija: najmanj 5 koncentracij, ki se med seboj razlikujejo za konstantni faktor največ 2,2 in so kolikor je mogoče porazdeljene prek območja od 0 do 100-odstotne smrtnosti,

— voda: glej 1.6.1.2,

— svetloba: 12 do 16 ur osvetljevanja dnevno,

— temperatura: primerna za vrsto (dodatek 2), vendar v mejah ± 1 °C pri vsakem preskusu,

— koncentracija raztopljenega kisika: najmanj 60 % nasičenosti zraka pri izbrani temperaturi,

— hranjenje: ga ni.

Ribe se pregledajo po prvih 2 do 4 urah in nato v najmanj 24-urnih intervalih. Ribe se štejejo za mrtve, če dotik dela med predrepno in repno plavutjo ne povzroči nobene reakcije in niso opazni dihalni gibi. Mrtve ribe se odstranijo takoj, ko so opažene, in zapišejo se smrtni primeri.

Zapišejo se vse opazne nepravilnosti (npr. izguba ravnotežja, spremembe v načinu plavanja, dihanju, pigmentaciji itd.).

Dnevno je treba meriti pH, raztopljeni kisik in temperaturo.

Mejni preskus

Z uporabo postopkov, opisanih v tej preskusni metodi, se lahko izvede mejni preskus pri 100 mg na liter, v dokaz, da je LC_{50} večji od te koncentracije.

Če ima snov take lastnosti, da koncentracije 100 mg na liter ni mogoče doseči, se mejni preskus izvede s koncentracijo, enako topnosti snovi (ali največji koncentraciji, pri kateri še nastane stabilna disperzija) v uporabljenem mediju (glej tudi točko 1.6.1.1).

Mejni preskus je treba izvesti s 7 do 10 ribami, z enakim številom v kontrolni(-h) skupini(-ah). (Po binomski teoriji velja, da je pri 10 uporabljenih ribah in smrtnosti 0 verjetnost, da je LC_{50} večji od koncentracije, uporabljene v mejnem preskusu, enaka 99,9 %. Pri 7, 8, ali 9 ribah odsotnost smrtnosti pomeni najmanj 99-odstotno verjetnost, da je LC_{50} večji od uporabljene koncentracije.)

Če se pojavijo smrtni primeri, je treba izvesti popolno študijo. Če se opazijo subletalni učinki, jih je treba navesti v poročilu.

2. **PODATKI IN OCENA**

Za vsako obdobje, ko so bila zapisana opažanja (24, 48, 72 in 96 ur), se na logaritemsko-verjetnostnem papirju izdela graf odstotka smrtnosti za vsako priporočeno obdobje izpostavljanja v odvisnosti od koncentracije.

Kadar je mogoče in za vsak čas opazovanja, je treba po standardnih postopkih oceniti LC_{50} in meje zaupanja ($p = 0,05$); te vrednosti je treba zaokrožiti na eno ali največ dve značilni mesti (primeri zaokrožitve na dve mesti: 170 za 173,5; 0,13 za 0,127; 1,2 za 1,21).

Kadar je naklon krivulje koncentracija/odstotek odziva preveč strm za izračun LC_{50} , zadostuje grafična ocena te vrednosti.

Kadar dve zaporedni koncentraciji pri faktorju 2,2 povzročita samo 0 in 100 % smrtnost, ti dve vrednosti zadostujeta za prikaz območja, v katerem je LC_{50} .

Če se opazi, da ni mogoče ohraniti stabilnosti ali homogenosti preskusne snovi, je treba to navesti v poročilu in upoštevati pri razlagi rezultatov.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- informacije o preskusnih ribah (znanstveno ime, sev, dobavitelj, vse predhodne obdelave, velikost in število, uporabljena za vsako preskusno koncentracijo);
- vir in glavne kemijske lastnosti vode za redčenje (pH, trdota, temperatura);
- v primeru snovi, slabo topnih v vodi, metoda priprave osnovne in preskusnih raztopin;
- koncentracija vseh pomožnih snovi;

- seznam uporabljenih koncentracij in vse razpoložljive informacije o stabilnosti preskusne snovi v preskusni raztopini pri uporabljenih koncentracijah;
- če se opravijo kemijske analize, uporabljene metode in dobljeni rezultati;
- rezultati mejnega preskusa, če je bil opravljen;
- razlogi za izbiro uporabljenega preskusnega postopka in podatki o njem (npr. statičen, polstatičen, stopnja odmerjanja, pretok, morebitno prezračevanje, obremenitev z ribami itd.);
- opis preskusne opreme;
- režim osvetljevanja;
- koncentracija raztopljenega kisika, pH vrednost in temperatura preskusnih raztopin vsakih 24 ur;
- dokazi, da so bila izpolnjena merila kakovosti;
- tabela, ki prikazuje skupno smrtnost pri vsaki koncentraciji in pri kontroli (ali kontroli s pomožno snovjo, če je potrebno) ob vsakem priporočenem času opazovanja;
- graf koncentracija/odstotek odziva ob koncu preskusa;
- če je mogoče, vrednosti LC_{50} za vsak priporočen čas opazovanja (s 95-odstotnimi mejami zaupanja);
- uporabljeni statistični postopki za določanje vrednosti LC_{50} ;
- dobljeni rezultati, če se uporabi referenčna snov;
- največja preskusna koncentracija, ki v času preskusa ne povzroči smrti;
- najmanjša preskusna koncentracija, ki v času preskusa povzroči 100-odstotno smrtnost.

4.

VIRI

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates*.
- 2) AFNOR — *Determination of the acute toxicity of a substance to Brachydanio rerio — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985*.
- 3) AFNOR — *Determination of the acute toxicity of a substance to Salmo gairdneri — Static and Flow — Through methods — NFT 90-305 June 1985*.
- 4) ISO 7346/1./2 and/3 — *Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan — Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method*.
- 5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: *Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974*.
- 6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).
- 7) JIS K 0102, *Acute toxicity test for fish*.
- 8) NEN 6506 — *Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van Poecilia reticulata, 1980*.
- 9) Environmental Protection Agency, *Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975*.
- 10) Environmental Protection Agency, *Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978*.
- 11) Environmental Protection Agency, *Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979*.
- 12) *Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975*.

- 13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.
- 14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- 15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.
- 16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
- 17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.
- 18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.
- 19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.
- 20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

Dodatek 1

Obdelana voda

Primer ustrezne vode za redčenje

Vse kemikalije morajo biti analitsko čiste.

Voda mora biti destilirana voda dobre kakovosti ali deionizirana voda s prevodnostjo pod $5 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Aparatura za destilacijo vode ne sme vsebovati bakrenih delov.

Osnovne raztopine

CaCl ₂ ·2H ₂ O (kalcijev klorid dihidrat):	11,76 g
Raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 1 litra.	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (magnezijev sulfat heptahidrat):	4,93 g
Raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 1 litra.	
NaHCO ₃ (natrijev hidrogen karbonat):	2,59 g
Raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 1 litra.	
KCl (kalijev klorid):	0,23 g
Raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 1 litra.	

Obdelana voda za redčenje

Zmešamo po 25 ml vsake od štirih osnovnih raztopin in dopolnimo z vodo do 1 litra.

Prezračujemo, dokler koncentracija raztopljenega kisika ni enaka nasičenosti zraka.

Vrednost pH mora biti $7,8 \pm 0,2$.

Če je potrebno, pH uravnamo z NaOH (natrijevim hidroksidom) ali HCl (klorovodikovo kislino).

Tako pripravljeno vodo za redčenje pustimo približno 12 ur in je ne smemo več zračiti.

Vsota ionov Ca in Mg v tej raztopini je 2,5 mmol na liter. Razmerje ionov Ca in Mg je 4:1 ter Na in K 10:1. Skupna alkalnost te raztopine je 0,8 mmol na liter.

Nobeno odstopanje v pripravi vode za redčenje ne sme spremeniti sestave ali lastnosti vode.

Dodatek 2

Priporočene ribje vrste za preskušanje

Priporočena vrsta	Priporočeno območje temperature preskusa (°C)	Priporočena skupna dolžina preskusne živali (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton–Buchanan), navadna cebrica	20 do 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), črnoglavi pisanec	20 do 24	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), krap	20 do 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) <i>Cyprinodontidae</i> (Tomminck in Schlegel 1850), medaka	20 do 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), gupi	20 do 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758), sončni ostriž	20 do 24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988), amerikanka	12 do 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), jez	20 do 24	6,0 ± 2,0

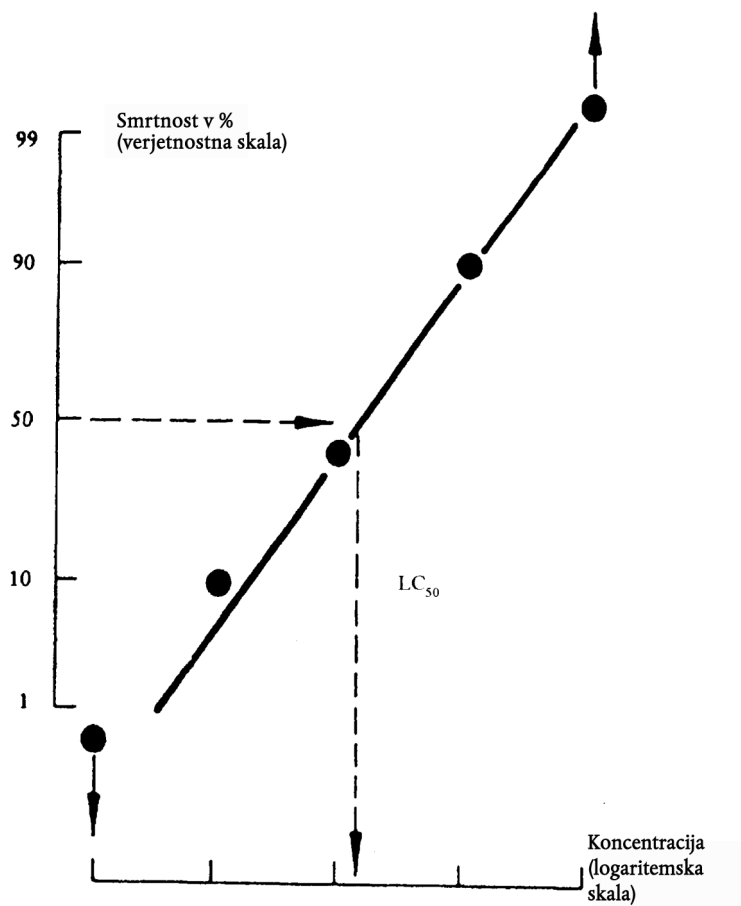
Zbiranje

Zgoraj navedene ribe se z lahkoto gojijo in/ali so obče na voljo celo leto. Lahko se razmnožujejo in gojijo bodisi v ribogojnicah bodisi v laboratoriju v pogojih, kjer se nadzorujejo bolezni in zajedavci, tako da bodo preskusne živali zdrave in znanega porekla. Te ribe so na voljo v številnih delih sveta.

Dodatek 3

Primer krivulje smrtnosti v odvisnosti od koncentracije

Primer določanja LC_{50} z uporabo logaritemskega-verjetnostnega papirja



C.2 AKUTNA STRUPENOST ZA VODNE BOLHE (*DAPHNIA*)

1. METODA

1.1 UVOD

Namen tega preskusa je določiti srednjo učinkovito koncentracijo (EC_{50}) snovi za imobilizacijo vodne bolhe (*Daphnia*) v sladki vodi. Zaželeno je, da je pred začetkom preskusa na voljo čim več informacij o topnosti v vodi, parnem tlaku, kemični stabilnosti, disociacijski konstanti in biorazgradljivosti preskusne snovi.

Pri načrtovanju preskusa in pri razlagi rezultatov je treba upoštevati tudi dodatne informacije (na primer strukturno formulo, stopnjo čistosti, vrsto in odstotek bistvenih nečistot, prisotnost in količino dodatkov ter porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda).

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Šteje se, da je zahteva direktive v zvezi z LC_{50} za vodno bolho (*Daphnia*) izpolnjena z določitvijo EC_{50} , kakor je opisana v tej preskusni metodi.

V tem preskusu je akutna strupenost izražena kot srednja učinkovita koncentracija (EC_{50}) za imobilizacijo. To je koncentracija (v smislu začetnih vrednosti), ki imobilizira 50 % vodnih bolh v preskusni skupini med neprekinjeno izpostavljenostjo, katere trajanje je treba navesti.

Imobilizacija:

Živali, ki niso zmožne plavati v 15 sekundah po rahlem stresanju preskusne posode, se štejejo za imobilne.

Vse koncentracije preskusne snovi so navedene v masi na volumen (miligramih na liter). Lahko se izrazijo tudi v masi na maso ($mg\ kg^{-1}$).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Za dokazovanje, da se občutljivost preskusne vrste v laboratorijskih preskusnih pogojih ni bistveno spremenila, se lahko preskusi referenčna snov.

V dodatku 2 so povzeti rezultati testa primerljivosti EGS s štirimi različnimi snovmi.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Lahko se izvede mejni preskus s 100 mg na liter, v dokaz, da je EC_{50} večji od te koncentracije.

Vodne bolhe (*Daphnia*) se za 48 ur izpostavijo preskusni snovi, dodani vodi, v nizu koncentracij. Če se uporabi krajši preskus, je treba to utemeljiti v poročilu.

V sicer enakih preskusnih pogojih in v ustreznem območju koncentracij je povprečna stopnja učinkov na zmožnost plavanja vodnih bolh pri različnih koncentracijah preskusne snovi različna. Pri različnih koncentracijah dobimo različne odstotke vodnih bolh, ki ob koncu preskusa ne morejo več plavati. Koncentracije, ki povzročijo 0- ali 100-odstotno imobilizacijo, se izpeljejo neposredno iz opazovanj med preskusom, medtem ko se 48-urni EC_{50} , če je le mogoče, izračuna.

Za to metodo se uporablja statični sistem, zato se preskusne raztopine med izpostavitvijo ne obnavljajo.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Merila kakovosti se uporabljajo za mejni preskus in za popolni preskus.

Ob koncu preskusa imobilizacija v kontrolnih skupinah ne sme presegati 10 %.

Vodne bolhe (*Daphnia*) v kontrolnih skupinah ne smejo biti ujete na površini vode.

Zaželeno je, da se koncentracija raztopljenega kisika v preskusnih posodah vzdržuje nad 3 mg l⁻¹ ves čas preskusa. Nikakor pa koncentracija raztopljenega kisika ne sme pasti pod 2 mg l⁻¹.

Ves čas preskusa se koncentracija preskusne snovi vzdržuje v območju 80 % začetne koncentracije.

Pri snoveh, ki se lahko topijo v preskusnem mediju in dajejo stabilne raztopine, tj. snovi, ki ne bodo znatno hlapale, se razgradile, hidrolizirale ali adsorbirale, se šteje, da je začetna koncentracija enakovredna nazivni koncentraciji. Priložijo se dokazi, da so se koncentracije vzdrževale ves čas preskusa in so bila izpolnjena merila kakovosti.

Pri snoveh, ki:

- (i) so slabo topne v preskusnem mediju, ali
- (ii) so zmožne tvoriti stabilne emulzije ali disperzije, ali
- (iii) v vodnih raztopinah niso stabilne,

se šteje, da je začetna koncentracija koncentracija, izmerjena v raztopini (ali, če to tehnično ni izvedljivo, v vodnem stolpcu) na začetku preskusa. Koncentracija se določi po vzpostavitvi ravnotežja, vendar pred vnosom preskusnih organizmov.

V vsakem od teh primerov, je treba opraviti dodatne meritve med preskusom, da se potrdijo dejanske koncentracije izpostavljenosti ali izpolnitev meril kakovosti.

Vrednost pH se ne sme spreminjati za več kot 1 enoto.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 Reagenti

1.6.1.1 Raztopine preskusnih snovi

Osnovne raztopine potrebnih koncentracij se pripravijo z raztopitvijo snovi v deionizirani vodi ali vodi v skladu s točko 1.6.1.2.

Izbrane preskusne koncentracije se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Če se preskušajo velike koncentracije, se snov lahko raztopi neposredno v vodi za redčenje.

Običajno je treba snovi preskusiti le do meje topnosti. Pri nekaterih snoveh (npr. snoveh, ki so slabo topne v vodi ali imajo visok P_{ow} , ali tistih, ki v vodi tvorijo stabilne disperzije in ne pravih raztopin) je sprejemljivo izvesti preskus pri koncentraciji nad mejo topnosti, da se zagotovi doseganje največje topne/stabilne koncentracije. Pomembno pa je, da ta koncentracija ne bo motila preskusnega sistema (npr. tvorba filma na vodni površini, ki prepreči obnavljanje kisika v vodi itd.).

Pri pripravi osnovnih raztopin snovi, ki so slabo topne v vodi, ali za lažje dispergiranje teh snovi v preskusnem mediju se lahko uporabi ultrazvočno dispergiranje, organska topila, emulgatorji ali disperzijska sredstva. Kadar se uporabijo take pomožne snovi, morajo preskusne raztopine vseh koncentracij vsebovati enako količino pomožnih snovi in dodatno kontrolno skupino vodnih bolh je treba izpostaviti enaki koncentraciji pomožne snovi, kakor je uporabljena v preskusnih skupinah. Koncentracija takih pomožnih snovi mora biti čim manjša in v nobenem primeru ne sme preseči 100 mg na liter preskusnega medija.

Preskus je treba opraviti brez uravnavanja pH. Če obstajajo dokazi o izraziti spremembi pH, se priporoča, da se preskus ponovi z uravnanim pH in rezultati vključijo v poročilo. V tem primeru je treba pH vrednost osnovne raztopine uravnati na pH vrednost vode za redčenje, razen če obstajajo posebni razlogi, da se to ne stori. V ta namen je najbolje uporabiti HCl in NaOH. To uravnavanje pH je treba opraviti tako, da se koncentracija preskusne snovi v osnovni raztopini bistveno ne spremeni. Če uravnava povzroči kemijsko reakcijo ali obarjanje preskusne snovi, je treba o tem poročati.

1.6.1.2 Preskusna voda

V tem preskusu se uporabi obdelana voda (glej dodatek 1 in vir (2): ISO 6341). Da živali pred preskusom ne bi bilo treba aklimatizirati, se priporoča, da je voda za gojenje podobne kakovosti (pH, trdota), kakor voda, uporabljena za preskus.

1.6.2 Aparatura

Uporabiti je treba običajno laboratorijsko aparaturo in opremo. Oprema, ki bo prišla v stik s preskusnimi raztopinami, naj bo po možnosti v celoti steklena:

- oksimeter (z mikroelektrodo ali drugo ustrezno opremo za merjenje raztopljenega kisika v vzorcih majhnega volumna),
- ustrezna aparatura za uravnavanje temperature,
- pH-meter,
- oprema za določanje trdote vode.

1.6.3 Preskusni organizem

Prednostna vrsta je *Daphnia magna*, lahko pa se uporabi tudi *Daphnia pulex*. Preskusne živali morajo biti na začetku preskusa stare manj kot 24 ur, laboratorijsko vzgojene, brez očitnih bolezni in poznane porekla (npr. gojenje, vsa predhodna tretiranja itd.).

1.6.4 Preskusni postopek

Pred dokončnim preskusom se lahko opravi preskus za ugotavljanje območja, namenjen pridobivanju informacij o območju koncentracij, ki se bodo uporabile v glavnem preskusu.

Poleg preskusnega niza se izvede ena kontrola brez preskusne snovi in, če je potrebno, tudi ena kontrola s pomožno snovjo.

Vodne bolhe (*Daphnia*) se izpostavijo snovi na spodaj opisan način:

- *trajanje*: po možnosti 48 ur,
- *število živali*: najmanj 20 živali na vsako preskusno koncentracijo, po možnosti razdeljenih v štiri serije po pet živali ali dve seriji po 10 živali,
- *obremenitev*: uporabiti je treba najmanj 2 ml preskusne raztopine na žival,
- *preskusna koncentracija*: preskusno raztopino je treba pripraviti neposredno pred vnosom vodnih bolh, po možnosti brez uporabe drugih topil razen vode. Koncentracije naj bodo porazdeljene v geometrijski vrsti, s faktorjem največ 2,2. Treba je preskusiti koncentracije, ki po 48 urah povzročijo imobilizacijo 0 in 100 % ter niz vmesnih stopenj imobilizacije, da se omogoči izračun EC_{50} (48 h), skupaj s kontrolnimi vzorci,
- *voda*: glej 1.6.1.2,
- *svetloba*: ciklus svetlobe in teme po izbiri,
- *temperatura*: temperatura preskusa mora biti med 18 in 22 °C, vendar konstantna v mejah ± 1 °C pri vsakem preskusu,

- *prezračevanje*: preskusne raztopine se ne smejo prezračevati s proizvajanjem mehurčkov,
- *hranjenje*: ga ni.

Ob koncu preskusa se izmerita pH in koncentracija kisika v kontrolnih in vseh preskusnih vzorcih; pH preskusnih raztopin ne smemo spreminjati.

Hlapne snovi je treba preskušati v zaprtih do vrha napolnjenih posodah, ki so dovolj velike, da ne bo primanjkovalo kisika.

Vodne bolhe se pregledajo najmanj po 24 urah izpostavljanja in še enkrat po 48 urah.

Mejni preskus

Z uporabo postopkov, opisanih v tej metodi, se lahko izvede mejni preskus s 100 mg na liter, v dokaz, da je EC_{50} večji od te koncentracije.

Če ima snov take lastnosti, da koncentracije 100 mg na liter ni mogoče doseči, se mejni preskus izvede s koncentracijo, enako topnosti snovi (ali največji koncentraciji, pri kateri še nastane stabilna disperzija) v uporabljenem mediju (glej tudi točko 1.6.1.1).

Mejni preskus je treba izvesti z 20 vodnimi bolhami, razdeljenimi v dve ali štiri serije, in enakim številom v kontrolni(-h) skupini(-ah). Če se pojavi imobilizacija, je treba izvesti popolno študijo.

2. **PODATKI IN OCENA**

Za vsako obdobje, ko so bila zapisana opažanja (24 in 48 ur), se na logaritemsko-verjetnostnem papirju izdela graf odstotka imobilizacije v odvisnosti od koncentracije.

Kadar je mogoče in za vsak čas opazovanja, je treba po standardnih postopkih oceniti EC_{50} in meje zaupanja ($p = 0,05$); te vrednosti je treba zaokrožiti na eno ali največ dve značilni mesti (primeri zaokrožitve na dve mesti: 170 za 173,5; 0,13 za 0,127; 1,2 za 1,21).

Kadar je naklon krivulje koncentracija/odstotek odziva preveč strm za izračun EC_{50} , zadostuje grafična ocena te vrednosti.

Kadar dve zaporedni koncentraciji pri faktorju 2,2 povzročita samo 0 in 100-odstotno imobilizacijo, ti dve vrednosti zadostujeta za prikaz območja, v katerem je EC_{50} .

Če se opazi, da ni mogoče ohraniti stabilnosti ali homogenosti preskusne snovi, je treba to navesti v poročilu in upoštevati pri razlagi rezultatov.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- informacije o preskusnem organizmu (znanstveno ime, sev, dobavitelj ali izvor, vse predhodne obdelave, metoda gojitve – vključno z izvorom, vrsto in količino hrane, pogostnostjo hranjenja);
- vir in glavne kemijske lastnosti vode za redčenje (pH, temperatura, trdota);
- v primeru snovi, slabo topnih v vodi, metoda priprave osnovne in preskusnih raztopin;
- koncentracija vseh pomožnih snovi;
- seznam uporabljenih koncentracij in vse razpoložljive informacije o stabilnosti preskusne snovi v preskusnih raztopinah pri uporabljenih koncentracijah;

- če se opravijo kemijske analize, uporabljene metode in dobljeni rezultati;
- rezultati mejnega preskusa, če je bil opravljen;
- opis preskusne opreme;
- režim osvetljevanja;
- koncentracija raztopljenega kisika, pH vrednost in temperatura preskusnih raztopin;
- dokazi, da so bila izpolnjena merila kakovosti;
- tabela, ki prikazuje skupno imobilizacijo pri vsaki koncentraciji in pri kontroli (ali kontroli s pomožno snovjo, če je potrebno) ob vsakem priporočenem času opazovanja (24 in 48 h);
- graf koncentracija/odstotek odziva ob koncu preskusa;
- če je mogoče, vrednosti EC_{50} za vsak priporočen čas opazovanja (s 95-odstotnimi mejami zaupanja);
- uporabljeni statistični postopki za določanje vrednosti EC_{50} ;
- če se uporabi referenčna snov, dobljeni rezultati;
- največja preskušena koncentracija, ki v času preskusa ne povzroči imobilizacije;
- najmanjša preskušena koncentracija, ki v času preskusa povzroči 100-odstotno imobilizacijo.

4.

VIRI

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guidelines 202, Decision of the Council C(81) 30 final and updates*.
- 2) *International Standard ISO, Water Quality – Determination of inhibition of mobility of Daphnia magna Straus, ISO 6341-1989*
- 3) AFNOR *Inhibition of mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera — Crustacea) NFT 90 301 (January 1983)*.
- 4) *Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.*
- 5) *DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).*
- 6) Finney, D.J. *Statistical Methods in Biological Assay*. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
- 7) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. *A simplified method of evaluating dose-effect experiments*. J. Pharmacol. and Exper. Ther., 1949, vol. 96, 99-113.
- 8) Sprague, J.B. *Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity*. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.
- 9) Sprague, J.B. *Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results*. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.
- 10) Stephan, C.E. *Methods for calculating an LC_{50}* . In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM, 1977, STP 634, 65-84.
- 11) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. *A computer program for calculating an LC_{50}* . US EPA.

Dodatek 1

Obdelana voda

Primer primerne vode za redčenje (v skladu z ISO 6341)

Vse kemikalije morajo biti analitsko čiste.

Voda mora biti destilirana voda dobre kakovosti ali deionizirana voda s prevodnostjo pod $5 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Aparatura za destilacijo vode ne sme vsebovati bakrenih delov.

Osnovne raztopine

CaCl ₂ ·2H ₂ O (kalcijev klorid dihidrat):	11,76 g
raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 1 litra	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (magnezijev sulfat heptahidrat):	4,93 g
raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 1 litra	
NaHCO ₃ (natrijev hidrogen karbonat):	2,59 g
raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 1 litra	
KCl (kalijev klorid):	0,23 g
raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 1 litra	

Obdelana voda za redčenje

Zmešamo po 25 ml vsake od štirih osnovnih raztopin in dopolnimo z vodo do 1 litra.

Prezračujemo, dokler koncentracija raztopljenega kisika ni enaka nasičenosti zraka.

Vrednost pH mora biti $7,8 \pm 0,2$.

Če je potrebno, pH uravnamo z NaOH (natrijevim hidroksidom) ali HCl (klorovodikovo kislino).

Tako pripravljeno vodo za redčenje pustimo približno 12 ur in je ni treba več zračiti.

Vsota ionov Ca in Mg v tej raztopini je 2,5 mmol na liter. Razmerje ionov Ca in Mg je 4:1 ter Na in K 10:1. Skupna alkalnost te raztopine je 0,8 mmol na liter.

Nobeno odstopanje v pripravi vode za redčenje ne sme spremeniti sestave ali lastnosti vode.

Dodatek 2

Povzetek rezultatov preskusa primerljivosti, ki ga je EGS izvedel 1978 (naveden tudi v viru 2)

Opozorilo: namen tega preskusa primerljivosti je bil določiti EC₅₀ (24 h).

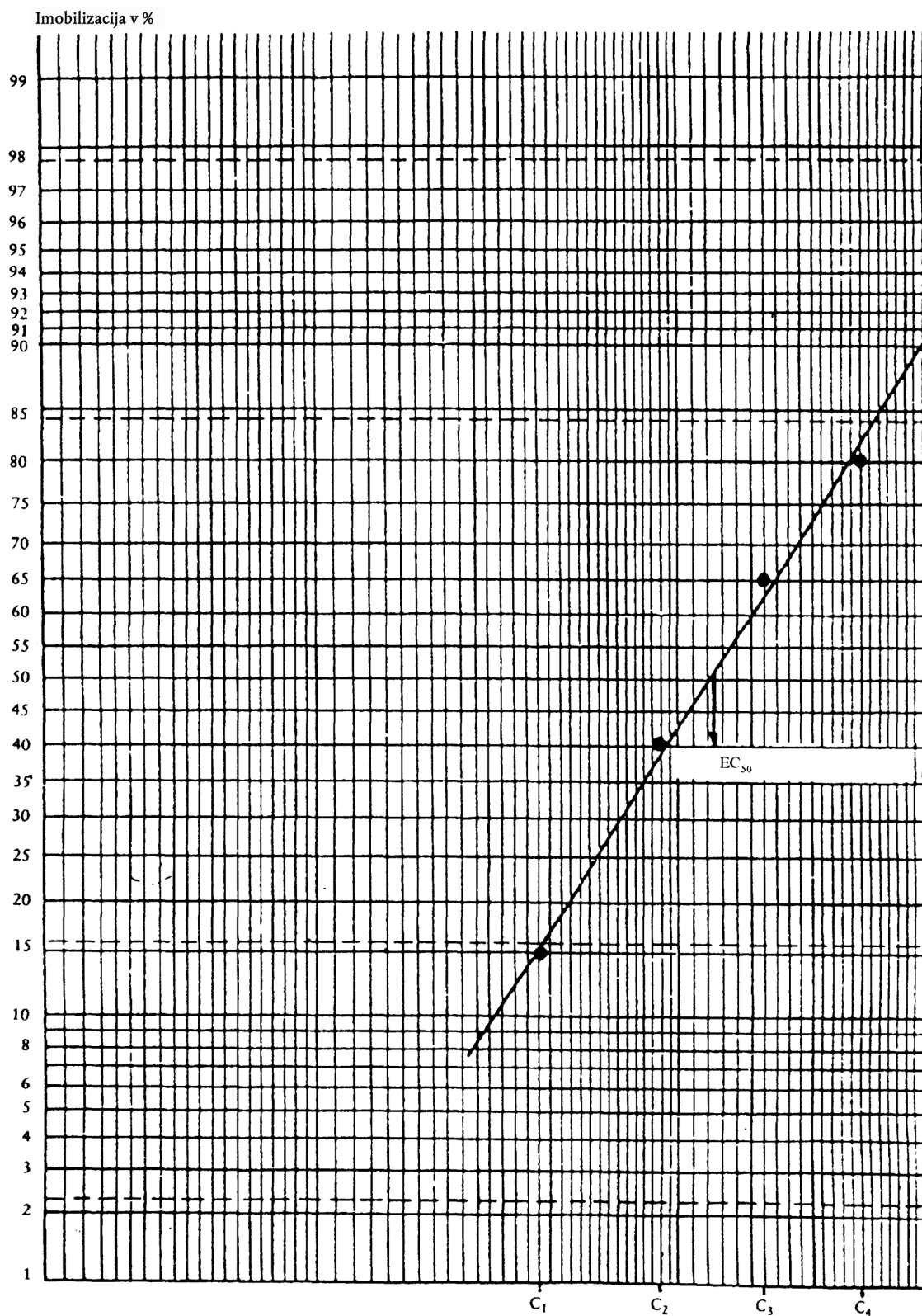
Uporabljene snovi:

- (1) Kalijev dikromat
- (2) Tetrapropilbensulfonska kislina
- (3) Tetrapropilbensulfonska kislina, natrijeva sol
- (4) Trikloro-2,4,5-fenoksiocetna kislina, kalijeve sol

Snov	Število sodelujočih laboratorijev	Število rezultatov za izražanje	EC ₅₀ 24 h mg/l srednja vrednost
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

Dodatek 3

Primer krivulje odstotka imobilizacije v odvisnosti od koncentracije

Primer določanja EC_{50} z uporabo logaritemskega-verjetnostnega papirja

C.3 PRESKUS ZAVIRANJA RASTI ALG

1. METODA

1.1 UVOD

Namen tega preskusa je določiti učinke snovi na rast enoceličnih zelenih alg. Z relativno kratkimi (72 ur) preskusi se lahko ocenijo učinki prek več generacij. Ta metoda se lahko prilagodi za uporabo več različnih vrst enoceličnih alg, pri čemer je treba v poročilu o preskusu opisati uporabljen metodo.

Ta metoda se najlažje uporabi pri vodotopnih snoveh, za katere je verjetno, da bodo v pogojih preskusa ostale v vodi.

Metoda se lahko uporabi za snovi, ki neposredno ne motijo merjenja rasti alg.

Zaželeno je, da je pred začetkom preskusa na voljo čim več informacij o topnosti v vodi, parnem tlaku, kemični stabilnosti, disociacijski konstanti in biorazgradljivosti preskusne snovi.

Pri načrtovanju preskusa in pri razlagi rezultatov je treba upoštevati tudi dodatne informacije (na primer strukturno formulo, stopnjo čistosti, vrsto in odstotek bistvenih nečistot, prisotnost in količino dodatkov ter porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda).

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Gostota celic: število celic na mililiter;

Rast: povečanje gostote celic v času preskusa;

Hitrost rasti: povečanje gostote celic na enoto časa;

EC_{50} : pri tej metodi je to tista koncentracija preskusne snovi, ki povzroči 50-odstotno zmanjšanje bodisi rasti ($E_b C_{50}$) bodisi hitrosti rasti ($E_r C_{50}$) glede na kontrolni vzorec;

NOEC (koncentracija brez opaznega učinka): pri tej metodi je to največja preskušena koncentracija, pri kateri ni opaziti pomembnega zaviranja rasti glede na kontrolni vzorec.

Vse koncentracije preskusne snovi so navedene v masi na volumen (miligramih na liter). Lahko se izrazijo tudi v masi na maso ($mg\ kg^{-1}$).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Za dokazovanje, da se občutljivost preskusne vrste v laboratorijskih preskusnih pogojih ni bistveno spremenila, se lahko preskusi referenčna snov.

Če se uporabi referenčna snov, je treba rezultate navesti v poročilu o preskusu. Kot referenčna snov se lahko uporabi kalijev dikromat, vendar njegova barva lahko vpliva na kakovost in jakost svetlobe, ki je na voljo celicam, ter na spektrofotometrično določanje, če se uporabi. Kalijev dikromat je bil uporabljen v mednarodni medlaboratorijski primerjavi (glej vir (3) in dodatek 2).

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Lahko se izvede mejni preskus s 100 mg na liter, v dokaz, da je EC_{50} večji od te koncentracije.

Kulture izbranih zelenih alg v eksponentni fazi rasti se izpostavijo različnim koncentracijam preskusne snovi za čas več generacij v natančno določenih pogojih.

Preskusne raztopine se inkubirajo 72 ur in v tem času se najmanj vsakih 24 ur izmeri gostota celic v vsaki raztopini. Določi se zaviranje rasti glede na kontrolno kulturo.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Merila kakovosti se uporabljajo za mejni preskus in za popolni preskus.

Gostota celic v kontrolnih kulturah se mora v treh dneh povečati najmanj za faktor 16.

Ves čas preskusa se koncentracije preskusne snovi vzdržujejo v mejah 80 % začetnih koncentracij.

Pri snoveh, ki se lahko topijo v preskusnem mediju in dajejo stabilne raztopine, tj. snovi, ki ne bodo znatno hlapеле, se razgradile, hidrolizirale ali adsorbirale, se šteje, da je začetna koncentracija enakovredna nazivni koncentraciji. Priložijo se dokazi, da so se koncentracije vzdrževale ves čas preskusa in so bila izpolnjena merila kakovosti.

Pri snoveh, ki:

- (i) so slabo topne v preskusnem mediju, ali
- (ii) so zmožne tvoriti stabilne emulzije ali disperzije, ali
- (iii) v vodnih raztopinah niso stabilne,

se šteje, da je začetna koncentracija koncentracija, izmerjena na začetku preskusa. Koncentracija se določi po vzpostavitvi ravnotežja.

V vsakem od teh primerov, je treba opraviti dodatne meritve med preskusom, da se potrdijo dejanske koncentracije izpostavljenosti ali izpolnitev meril kakovosti.

Znano je, da se v času preskusa v biomaso alg lahko vgradi znatna količina preskusne snovi. Zato je treba pri dokazovanju izpolnjevanja zgoraj navedenih meril kakovosti upoštevati količino snovi, vgrajene v biomaso alg, in količino snovi v raztopini (ali, če to ni tehnično izvedljivo, izmerjeno v vodnem stolpcu). Ker pa določanje koncentracije snovi v biomaso alg lahko predstavlja znatne tehnične težave, se izpolnjevanje meril kakovosti lahko dokaže s preskusom v dodatni posodi z največjo koncentracijo snovi, vendar brez alg, in merjenjem koncentracije raztopine (ali, če to ni tehnično izvedljivo, v vodnem stolpcu) na začetku in na koncu preskusa.

1.6 OPIS PRESKUSNEGA POSTOPKA

1.6.1 Reagenti

1.6.1.1 Raztopine preskusnih snovi

Osnovne raztopine potrebnih koncentracij se pripravijo z raztopitvijo snovi v deionizirani vodi ali vodi v skladu s točko 1.6.1.2.

Raztopine izbranih preskusnih koncentracij se pripravijo z dodajanjem ustreznih alikvotov predkulturam alg (glej dodatek 1). Običajno je treba snovi preskusiti le do meje topnosti. Pri nekaterih snoveh (npr. snoveh, ki so slabo topne v vodi ali imajo visok P_{ow} , ali tistih, ki v vodi tvorijo stabilne disperzije in ne pravih raztopin) je sprejemljivo izvesti preskus pri koncentraciji nad mejo topnosti, da se zagotovi doseganje največje topne/stabilne koncentracije. Pomembno pa je, da ta koncentracija ne bo motila preskusnega sistema (npr. tvorba filma na vodni površini, ki prepreči obnavljanje kisika v vodi itd.).

Pri pripravi osnovnih raztopin snovi, ki so slabo topne v vodi, ali za lažje dispergiranje teh snovi v preskusnem mediju se lahko uporabi ultrazvočno dispergiranje, organska topila, emulgatorji ali disperzijska sredstva. Kadar se uporabijo take pomožne snovi, morajo preskusne raztopine vseh koncentracij vsebovati enako količino pomožnih snovi in dodatne kontrolne kulture je treba izpostaviti enaki koncentraciji pomožne snovi, kakor je uporabljena v preskusnih kulturah. Koncentracija takih pomožnih snovi mora biti čim manjša in v nobenem primeru ne sme preseči 100 mg na liter preskusnega medija.

Preskus je treba opraviti brez uravnavanja pH. Če obstajajo dokazi o izraziti spremembi pH, se priporoča, da se preskus ponovi z uravnanim pH in rezultati vključijo v poročilo. V tem primeru je treba pH vrednost osnovne raztopine uravnati na pH vrednost vode za redčenje, razen če obstajajo posebni razlogi, da se to ne stori. V ta namen je najbolje uporabiti HCl in NaOH. To uravnavanje pH je treba opraviti tako, da se koncentracija preskusne snovi v osnovni raztopini bistveno ne spremeni. Če uravnava povzroči kemijsko reakcijo ali obarjanje preskusne snovi, je treba o tem poročati.

1.6.1.2 Preskusni medij

Voda mora biti destilirana voda dobre kakovosti ali deionizirana voda s prevodnostjo pod $5 \mu\text{Scm}^{-1}$. Aparatura za destilacijo vode ne sme vsebovati bakrenih delov.

Priporoča se naslednji medij.

Pripravo se štiri osnovne raztopine v skladu s spodnjo tabelo. Osnovne raztopine se sterilizirajo z membransko filtracijo ali avtoklaviranjem in shranijo v temi pri 4°C . Osnovna raztopina št. 4 se sterilizira le z membransko filtracijo. Te osnovne raztopine se razredčijo, tako da se doseže končna koncentracija hranil v preskusnih raztopinah.

Hranilo	Koncentracija v osnovni raztopini		Končna koncentracija v preskusni raztopini	
Osnovna raztopina 1: glavna hranila				
NH ₄ Cl	1,5	g/l	15	mg/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2	g/l	12	mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,8	g/l	18	mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5	g/l	15	mg/l
KH ₂ PO ₄	0,16	g/l	1,6	mg/l
Osnovna raztopina 2: Fe-EDTA				
FeCl ₃ .6H ₂	80	mg/l	0,08	mg/l
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	100	mg/l	0,1	mg/l
Osnovna raztopina 3: elementi v sledih				
H ₃ BO ₃	185	mg/l	0,185	mg/l
MnCl ₂ .4H ₂ O	415	mg/l	0,415	mg/l
ZnCl ₂	3	mg/l	3 × 10 ⁻³	mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,5	mg/l	1,5 × 10 ⁻³	mg/l
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,01	mg/l	10 ⁻⁵	mg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7	mg/l	7 × 10 ⁻³	mg/l
Osnovna raztopina 4: NaHCO ₃				
NaHCO ₃	50	g/l	50	mg/l

Vrednost pH medija po uravnoteženju z zrakom je približno 8.

1.6.2 **Aparatura**

- Običajna laboratorijska oprema.
- Preskusne bučke primerne volumna (npr. 250 ml-erlenmajerice so primerne za preskusne raztopine z volumnom 100 ml). Vse preskusne bučke morajo biti iz enakega materiala in enakih dimenzij.
- Inkubator za kultiviranje: omara ali komora, v kateri se lahko vzdržuje temperatura med 21 in 25 °C na ± 2 °C natančno in zagotavlja stalna enakomerna osvetlitev med 400 in 700 nm. Če so alge v kontrolnih kulturah dosegle priporočeno hitrost rasti, se lahko domneva, da so bili pogoji za rast, vključno z jakostjo svetlobe, zadovoljivi.

Pri povprečnih koncentracijah preskusnih raztopin se priporoča uporaba svetlobe jakosti med 60 in 120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (35 do 70×10^{18} fotonov $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), merjeno v območju 400 do 700 nm z ustreznim detektorjem. Pri merilnikih svetlobe, umerjenih v luksih, je sprejemljivo enakovredno območje 6 000 do 10 000 lx.

Taka jakost svetlobe se lahko doseže s štirimi do sedmimi univerzalnimi belimi (barvna temperatura približno 4 300 K) fluorescenčnimi žarnicami po 30 W na razdalji 0,35 m od kulture alg.

- Gostota celic se meri po metodi neposrednega štetja živih celic, npr. pod mikroskopom s števnimi komorami. Lahko se uporabijo tudi drugi postopki (fotometrija, turbimetrija), če so dovolj občutljivi in je dokazana zadovoljiva soodvisnost z gostoto celic.

1.6.3 **Preskusni organizmi**

Predlaga se, da se izbere taka vrsta zelenih alg, ki hitro raste in je pripravna za kultiviranje in preskušanje. Prednost imajo naslednje vrste:

- *Selenastrum capricornutum*, npr. ATCC 22662 ali CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, npr. 86.81 SAG.

Opomba:

ATCC = American Type Culture Collection (U.S.A.)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (U.K.)

SAG = Collection of algal culture (Göttingen, F.R.G.)

Če se uporabijo druge vrste, je treba v poročilu navesti sev.

1.6.4 **Preskusni postopek**

Območje koncentracij, v katerem se bodo učinki najverjetneje pojavili, se določi na podlagi rezultatov preskusov za ugotavljanje območja.

Dva parametra rasti (biomasa in hitrost rasti) lahko predstavljata zelo različni merili zaviranja rasti; v preskusu za ugotavljanje območja je treba uporabiti oba, da se zagotovi, da geometrijsko naraščanje koncentracij omogoči oceno obeh vrednosti, $E_b C_{50}$ in $E_r C_{50}$.

Začetna gostota celic

Za *Selenastrum capricornutum* in *Scenedesmus subspicatus* se priporoča, da je začetna gostota celic v preskusnih kulturah približno 10^4 celic/ml. Kadar se uporabijo druge vrste, mora biti biomasa primerljiva.

Koncentracije preskusne snovi

Za preskus se pripravi najmanj pet koncentracij v geometrijski vrsti, s faktorjem največ 2,2. Najmanjša preskušena koncentracija mora biti brez opaznega učinka na rast alg. Največja preskušena koncentracija mora rast zavreti za najmanj 50 % glede na kontrolni vzorec, po možnosti pa jo povsem ustaviti.

Ponovitve in kontrolni vzorci

Načrt preskusa mora vključevati tri ponovitve za vsako preskusno koncentracijo. Preskusijo se trije kontrolni vzorci brez preskusne snovi in, če je potrebno, tudi trije kontrolni vzorci s pomožno snovjo. Če je to utemeljeno, se načrt preskusa lahko spremeni, tako da se poveča število koncentracij in zmanjša število ponovitev na koncentracijo.

Izvedba preskusa

Preskusne kulture, ki vsebujejo zelene koncentracije preskusne snovi in zeleno količino inokuluma alg, se pripravijo tako, da se ustreznim količinam predkultur alg (glej dodatek 1) dodajo alikvoti osnovnih raztopin preskusne snovi.

Bučke s kulturo se pretresejo in postavijo v inkubator za kultiviranje. Alge se vzdržujejo v suspenziji s stresanjem, mešanjem ali uvajanjem mehurčkov zraka za boljšo izmenjavo plinov in manjše nihanje pH v preskusnih raztopinah. Kulture je treba vzdrževati pri temperaturi med 21 in 25 °C, na ± 2 °C natančno.

Gostota celic v vsaki bučki se določi najmanj 24, 48 in 72 ur po začetku preskusa. Kadar se za merjenje gostote celic uporabi metoda, ki ni neposredna števna metoda, se za določitev ozadja uporabi prefiltriran medij za alge, ki vsebuje ustrezno koncentracijo preskusne snovi.

Vrednost pH se izmeri na začetku preskusa in po 72 urah.

Vrednost pH kontrolnih vzorcev se med preskusom običajno ne bi smel spreminjati za več kot 1,5 enot.

Preskušanje hlapnih snovi

Do danes še ni splošno sprejetega načina za preskušanje hlapnih snovi. Kadar je znano, da snov rada hlapi, se lahko uporabijo zaprte bučke z več prostega prostora nad kulturo. Pri izračunavanju volumna prostega prostora v zaprtih bučkah je treba upoštevati možnost pomanjkanja CO₂. Predlagane so bile različice te metode (glej vir (4)).

Pri preskusih s hlapnimi snovmi v zaprtih sistemih je treba s poskušanjem določiti količino snovi, ki ostane v raztopini, in rezultate razlagati posebej previdno.

Mejni preskus

Z uporabo postopkov, opisanih v tej metodi, se lahko izvede mejni preskus s 100 mg na liter, v dokaz, da je EC₅₀ večji od te koncentracije.

Če ima snov take lastnosti, da koncentracije 100 mg na liter ni mogoče doseči, se mejni preskus izvede s koncentracijo, enako topnosti snovi (ali največji koncentraciji, pri kateri še nastane stabilna disperzija) v uporabljenem mediju (glej tudi točko 1.6.1.1).

Mejni preskus je treba izvesti v najmanj v treh ponovitvah in z enakim številom kontrolnih vzorcev. Pri mejnem preskusu je treba uporabiti oba parametra rasti (biomase in hitrost rasti).

Če se pri mejnem preskusu ugotovi srednje povečanje za 25 % ali več bodisi biomase bodisi hitrosti rasti glede na kontrolni vzorec, je treba izvesti popolni preskus.

2. PODATKI IN OCENA

Izmerjena gostota celic v preskusnih in kontrolnih kulturah se predstavi v tabeli, skupaj s koncentracijami preskusne snovi in časi meritev. Izdela se graf srednje vrednosti gostote celic za vsako koncentracijo preskusne snovi in za kontrolne vzorce v odvisnosti od časa (0-72 h), ki predstavlja rastno krivuljo.

Za določanje razmerja koncentracija/učinek je treba uporabiti naslednji metodi. Nekatere snovi lahko pri majhnih koncentracijah vzpodbujajo rast. Upoštevati je treba le podatke točk, ki kažejo na zaviranje od 0 do 100 %.

2.1 PRIMERJAVA POVRŠIN POD RASTNO KRIVULJO

Površina med rastno krivuljo in vodoravno premico $N = N_0$ se lahko izračuna po naslednji enačbi:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

pri čemer je

A = površina,

N_0 = število celic/ml ob času t_0 (začetek preskusa),

N_1 = izmerjeno število celic/ml ob t_1 ,

N_n = izmerjeno število celic/ml ob t_n ,

t_1 = čas prve meritve po začetku preskusa,

t_n = čas n -te meritve po začetku preskusa,

n = število meritev, opravljenih po začetku preskusa.

Odstotek zaviranja rasti celic za vsako koncentracijo preskusne snovi (I_A) se izračuna po naslednji enačbi:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

pri čemer je

A_c = površina med rastno krivuljo kontrolne kulture in vodoravno premico $N = N_0$,

A_t = površina med rastno krivuljo pri koncentraciji t in vodoravno premico $N = N_0$.

Na pollogaritmskem papirju ali pollogaritmsko-verjetnostnem papirju se označijo vrednosti I_A v odvisnosti od ustreznih koncentracij. Če se točke izrišejo na verjetnostnem papirju, se skozi točke potegne premica, bodisi s prostim očesom bodisi z izračunom regresije.

EC_{50} se določi iz regresijske premice, tako da se odčita koncentracija, enakovredna 50-odstotnem zavrtju ($I_A = 50\%$). Da se ta vrednost nedvoumno označi kot vrednost, dobljena s to metodo izračunavanja, se predlaga uporaba simbola $E_b C_{50}$. $E_b C_{50}$ je treba nujno navesti skupaj z ustreznim obdobjem izpostavljanja, npr. $E_b C_{50}$ (0-72 h).

2.2 PRIMERJAVA HITROSTI RASTI

Povprečna specifična hitrost rasti (μ) za eksponentno rastoče kulture se lahko izračuna po:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

pri čemer je t_0 čas začetka preskusa.

Povprečna specifična hitrost rasti se lahko tudi izpelje iz naklona regresijske premice grafičnega prikaza $\ln N$ v odvisnosti od časa.

Odstotek zaviranja specifične hitrosti rasti za vsako koncentracijo preskusne snovi (I_{μ}) se izračuna po naslednji enačbi:

$$I_{\mu} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

pri čemer je

μ_c = srednja specifična hitrost rasti kontrolne kulture

μ_t = srednja specifična hitrost rasti pri preskusni koncentraciji t

Izdela se graf odstotka zmanjšanja povprečne specifične hitrosti rasti pri vsaki koncentraciji preskusne snovi glede na kontrolno vrednost v odvisnosti od logaritma koncentracije. Iz tega grafa se lahko odčita EC_{50} . Da se vrednost nedvoumno označi kot EC_{50} , dobljen s to metodo, se predlaga uporaba simbola $E C_{50}$. Treba je navesti čase meritev, npr. če se vrednost nanaša na časa 0 in 72 ur, se uporabi simbol $E_r C_{50} (0-72h)$.

Opomba: specifična hitrost rasti je logaritemski izraz in majhne spremembe v hitrosti rasti lahko povzročijo velike spremembe v biomasi. Vrednosti $E_b C$ in $E_r C$ zato nista številčno primerljivi.

2.3 IZRAČUN NOEC

Koncentracija brez opaznega učinka se izračuna po ustreznem statističnem postopku za večvzorčno primerjavo (npr. analiza variance in Dunnettov test) iz vrednosti površine pod rastno krivuljo A za (glej točko 2.1) ali specifične hitrosti rasti μ (glej točko 2.2) za posamezne ponovitve.

3. POROČANJE

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- preskusna snov: kemijski identifikacijski podatki;
- preskusni organizmi: izvor, laboratorijska kultura, številka seva, metoda kultivacije;
- preskusni pogoji:
 - datuma začetka in konca preskusa ter njegovo trajanje,
 - temperatura,
 - sestava medija,
 - inkubator za kultiviranje,
 - pH raztopin na začetku in na koncu preskusa (če se pH spreminja za več kot 1,5 enote, je treba to obrazložiti),
 - uporabljena nosilec in metoda za pripravo raztopine preskusne snovi ter koncentracija nosilca v preskusnih raztopinah,
 - jakost in kakovost svetlobe,
 - preskušene koncentracije (izmerjene ali nazivne);
- rezultati:
 - gostota celic za vsako bučko ob vsaki točki merjenja in metoda merjenja gostote celic,
 - srednje vrednosti gostote celic,
 - rastne krivulje,
 - grafična predstavitev razmerja med koncentracijo in učinkom,
 - vrednosti EC in metode izračunavanja,
 - NOEC,
 - drugi opaženi učinki.

4. VIRI

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 Final*.
- 2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag 'Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge Scenedesmus subspicatus'*: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.
- 3) ISO 8692 — *Water quality — Fresh water algal growth inhibition test with Scenedesmus subspicatus and Selenastrum capricornutum*.
- 4) S.Galassi and M.Vighi — *Chemosphere*, 1981, vol.10, 1123-1126.

Dodatek 1

Primer postopka kultiviranja alg**Splošne opombe**

Namen kultiviranja po naslednjem postopku je pridobiti kulture alg za preskuse strupenosti.

Uporabiti je treba primerne metode, s katerimi se zagotovi, da se kulture alg ne okužijo z bakterijami (ISO 4833). Lahko so zaželeni aksenične kulture, vsekakor pa so nujne kulture z eno samo vrsto alg.

Vse postopke je treba izvesti v sterilnih pogojih, da se prepreči okužba z bakterijami in drugimi algami. Okužene kulture je treba zavreči.

Postopki za pridobivanje kultur alg*Priprava hranilnih raztopin (gojišče):*

Gojišče se lahko pripravi razredčitvijo koncentriranih osnovnih raztopin hranil. Za trdno gojišče se doda 0,8 % agarja. Uporabljena gojišča morajo biti sterilna. Sterilizacija z avtoklaviranjem lahko povzroči izgube NH_3 .

Založna kultura:

Založne kulture so majhne kulture alg, ki se redno prenašajo v sveža gojišča in se uporabljajo kot začetni preskusni material. Če se kulture ne uporabljajo redno, se nanesejo na poševna agarska gojišča v epruvetah. Nato se najmanj enkrat na dva meseca prenesejo na sveže gojišče.

Založne kulture se gojijo v erlenmajericah z ustreznim gojiščem (volumen približno 100 ml). Kadar se alge inkubirajo pri 20 °C ob stalni osvetlitvi, jih je treba na sveže gojišče prenesti enkrat na teden.

Med prenosom se del „stare“ kulture s sterilno pipeto prenese v erlenmajerico s svežim gojiščem, tako da je pri hitro rastoči vrsti začetna koncentracija približno 100-krat manjša, kakor v stari kulturi.

Hitrost rasti vrste se lahko določi iz rastne krivulje. Če je ta znana, se lahko oceni gostota, pri kateri je treba kulturo prenesti v novo gojišče. To je treba storiti, preden kultura doseže fazo odmiranja.

Predkultura:

Predkultura je namenjena pridobivanju količine alg, primerne za inokulacijo preskusnih kultur. Predkultura se inkubira v pogojih preskusa in uporabi, ko je še v eksponentni fazi rasti, običajno po treh dneh inkubacije. Kulture alg, ki vsebujejo deformirane ali nenormalne celice, je treba zavreči.

Dodatek 2

ISO 8692 – Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum* (Kakovost vode – Preskus zaviranja rasti sladkovodnih alg pri vrstah *Scenedesmus subspicatus* in *Selenastrum capricornutum*) navaja naslednje rezultate medlaboratorijske primerjave med 16 laboratoriji pri preskušanju kalijevega dikromata:

	Srednje vrednosti (mg/l)	Območje (mg/l)
$E_r C_{50}$ (0-72 h)	0,84	0,60 do 1,03
$E_b C_{50}$ (0-72 h)	0,53	0,20 do 0,75

C.4 DOLOČANJE „DOBRE“ BIORAZGRADLJIVOSTI

DEL I. SPLOŠNO

I.1 UVOD

Opisanih je šest preskusnih metod, ki omogočajo presejalno preskušanje snovi glede lahke biorazgradljivosti v aerobnem vodnem mediju:

- (a) Upadanje raztopljenega organskega ogljika (DOC) (Metoda C.4-A)
- (b) Prilagojeno presejanje OECD – upadanje DOC (Metoda C.4-B)
- (c) Razvijanje ogljikovega dioksida (CO₂) (prilagojeni Sturmov preskus) (Metoda C.4-C)
- (d) Manometrična respirometrija (Metoda C.4-D)
- (e) Zaprta steklenica (Metoda C.4-E)
- (f) MITI (Ministry of International Trade and Industry – Japonska) (Metoda C.4-F)

Splošne in skupne opombe za vseh šest preskusov so navedene v delu I metode. Posebnosti za posamezne metode so navedene v delih II do VII. Priloge vsebujejo opredelitve, enačbe in navodila.

Medlaboratorijska primerjava, ki jo je OECD izvedel leta 1988, je pokazala, da metode dajejo dosledne rezultate. Vendar je glede na fizikalne lastnosti preskusne snovi lahko bolj primerna ena ali druga od metod.

I.2 IZBIRA USTREZNE METODE

Za izbiro najprimernejše metode so potrebne informacije o topnosti, parnem tlaku in adsorpcijskih lastnostih snovi. Za izračun teoretičnih vrednosti in/ali preverjanje izmerjenih vrednosti parametrov, npr. TPK, TCO₂, DOC, TOC, KPK (glej prilogi I in II) je treba poznati kemično strukturo ali formulo.

Preskusne snovi, topne v vodi do najmanj 100 mg/l, se lahko preskusijo z vsemi metodami, pod pogojem da so nehlapne in neadsorptivne. Za tiste snovi, ki so slabo topne v vodi, hlapne ali adsorptivne, so primerne metode navedene v tabeli 1. Načini ravnanja s snovmi, ki so slabo topne v vodi, in hlapnimi snovmi so opisani v Prilogi III. Zmerno hlapne snovi se lahko preskušajo po metodi upadanja DOC, če je v preskusnih posodah (ki morajo biti ustrezno zaprte) dovolj prostora za plin. V tem primeru je treba izvesti abiotsko kontrolo, da se upoštevajo vse fizikalne izgube.

Tabela 1: Uporabnost preskusnih metod

Preskus	Analitska metoda	Primernost za snovi, ki so:		
		slabo topne	hlapne	adsorptivne
Upadanje DOC	Raztopljeni organski ogljik	—	—	+/-
Prilagoj. metoda OECD upadanja DOC	Raztopljeni organski ogljik	—	—	+/-
Razvijanje CO ₂	Respirometrija: razvijanje CO ₂	+	—	+
Manometrična respirometrija	Manometrična respirometrija: poraba kisika	+	+/-	+
Zaprta steklenica	Respirometrija: raztopljeni kisik	+/-	+	+
MITI	Respirometrija: poraba kisika	+	+/-	+

Za razlago dobljenih rezultatov so potrebne informacije o čistoti ali relativnih deležih glavnih sestavin preskusne snovi, zlasti kadar so rezultati nizki ali mejni.

Informacije o strupenosti preskusne snovi za bakterije (Priloga IV) so lahko uporabne za izbiro primernih preskusnih koncentracij in so lahko bistvene za pravilno razlago nizkih vrednosti biorazgradljivosti.

I.3 REFERENČNE SNOVI

Za preverjanje postopka se preskusijo referenčne snovi, ki izpolnjujejo merila za dobro biorazgradljivost, s postavitvijo primerne steklenice vzporedno z navadnimi preskusnimi vzorci.

Primerne snovi so anilin (sveže destilirani), natrijev acetat in natrijev benzoat. Te referenčne snovi se pri teh metodah vse razgradijo, tudi kadar se namerno ne doda noben inokulum.

Predlagano je bilo, da se poišče taka referenčna snov, ki je dobro biorazgradljiva, vendar potrebuje dodan inokulum. Predlagan je bil kalijev hidrogen fosfat, vendar je treba pridobiti več podatkov za to snov, preden se lahko sprejme kot referenčna snov.

Pri respirometričnih preskusih lahko snovi, ki vsebujejo dušik, vplivajo na sprejem kisika zaradi nitrifikacije (glej prilogi II in V).

I.4 PRINCIP PRESKUSNIH METOD

Raztopina ali suspenzija preskusne snovi v mineralnem mediju se inokulira in inkubira v aerobnih pogojih v temi ali razpršeni svetlobi. Količina DOC v preskusni raztopini, ki izvira iz inokuluma, mora biti čim manjša glede na količino DOC, ki izvira iz preskusne snovi. Endogena aktivnost inokuluma se preverja z vzporednim slepim preskusom z inokulumom in brez preskusne snovi, čeprav se endogena aktivnost celic v prisotnosti snovi ne bo povsem skladala s tisto v kontrolnem vzorcu. Za preverjanje postopkov pa se vzporedno izvede preskus samo z referenčno snovjo.

Na splošno se razgradnja spremlja z določanjem parametrov, kot so DOC, CO₂, proizvodnja in sprejem kisika, meritve pa se izvajajo dovolj pogosto, da je omogočena določitev začetka in konca biorazgradnje. Pri avtomatskih respirometrih je merjenje neprekinjeno. DOC se včasih meri poleg še enega parametra, vendar navadno le na začetku in na koncu preskusa. Specifične kemijske analize se lahko uporabijo za določanje primarne razgradnje preskusne snovi in koncentracije kakršnega koli vmesnega proizvoda (obvezno pri preskusu MITI).

Navadno preskus traja 28 dni. Lahko pa se zaključi pred 28. dnem, tj. takoj ko krivulja biorazgradnje doseže konstantno vrednost pri najmanj treh določitvah. Preskus se lahko tudi podaljša preko 28 dni, kadar krivulja kaže, da se je biorazgradnja začela, vendar 28. dan še ni dosegla konstantne vrednosti.

I.5 MERILA KAKOVOSTI

I.5.1 Obnovljivost

Zaradi narave biorazgradnje in mešanih populacij bakterij, ki se uporabijo kot inokulum, je treba izvesti najmanj dve vzporedni določitvi.

Splošna izkušnja je, da večja kot je koncentracija mikroorganizmov, dodanih preskusnemu mediju, manjše bodo razlike med ponovitvami. Testi primerljivosti so tudi pokazali, da so razlike med rezultati različnih laboratorijev lahko velike, vendar so pri dobro biorazgradljivih snoveh rezultati običajno kar skladni.

1.6.1 Voda za redčenje

Uporabi se deionizirana ali destilirana voda brez inhibitornih koncentracij strupenih snovi (npr. ionov Cu^{++}). Ne sme vsebovati več kot 10 % organskega ogljika, vnesenega s preskusno snovjo. Velika čistost preskusne vode je nujna za odpravo visokih vrednosti slepih vzorcev. Okužba lahko nastane zaradi vsebovanih nečistot in tudi zaradi ionsko-izmenjevalnih smol in liziranega materiala iz bakterij in alg. Za vsak niz preskusov je treba uporabiti eno samo serijo vode, predhodno preverjeno z analizo DOC. Tako preverjanje ni potrebno pri preskusu z zaprto steklenico, vendar mora biti poraba kisika vode majhna.

1.6.2 Osnovne raztopine mineralnih sestavin

Za pripravo preskusnih raztopin se pripravijo osnovne raztopine mineralnih sestavin ustreznih koncentracij. Za metodo upadanja DOC, prilagojeni sejalni preskus OECD, preskus razvijanja CO_2 , manometrično respirometrijo in preskus z zaprto steklenico se lahko uporabijo naslednje osnovne raztopine (z različnimi faktorji redčenja). Faktorji redčenja in, za preskus MITI, posebna priprava mineralnega medija so navedeni pod naslovi posameznih preskusov.

Osnovne raztopine: Pripravimo naslednje osnovne raztopine iz analitsko čistih reagentov.

(a)	Monokalijev dihidrogen ortofosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikalijev monohidrogen ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatrijev monohidrogen ortofosfat dihidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	33,40 g
	Amonijev klorid, NH_4Cl	0,50 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra. pH raztopine mora biti 7,4.	
(b)	Kalcijev klorid, brezvodni, CaCl_2	27,50 g
	ali kalcijev klorid dihidrat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	36,40 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.	
(c)	Magnezijev sulfat heptahidrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	22,50 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.	
(d)	Železov(III) klorid heksahidrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.	

Opomba: da nam te raztopine ne bo treba pripraviti tik pred uporabo, ji dodamo kapljico koncentrirane HCl ali 0,4 g natrijeve soli etilendiamintetraocetne kisline (EDTA) na liter.

1.6.3 Osnovne raztopine snovi

Kadar topnost presega 1 g/l, raztopimo 1-10 g, kakor je primerno, preskusne ali referenčne snovi v deionizirani vodi in dopolnimo do 1 litra. V nasprotnem primeru pripravimo osnovne raztopine v mineralnem mediju ali snov dodamo neposredno v mineralni medij. Ravnanje z manj topnimi snovmi je opisano v Prilogi III, vendar se za preskus MITI (metoda C.4-F) ne smejo uporabiti ne topila ne emulgatorji.

1.6.4 Inokulumi

Inokulum se lahko pridobi iz različnih virov: aktivno blato, komunalne odplake (neklorirane), površinske vode in prsti ali njihove zmesi. Kadar se za preskuse upadanja DOC, razvijanja CO_2 in manometrične respirometrije uporabi aktivno blato, mora biti odvzeto iz čistilne naprave ali laboratorijske enote, ki prejema predvsem gospodinske odplake. Ugotovljeno je bilo, da inokulumi iz drugih virov dajo bolj razpršene rezultate. Za prilagojeni presejalni preskus OECD in preskus z zaprto steklenico je potreben bolj razredčen inokulum brez kosmov in najprimernejši vir je sekundarni odtok iz čistilne naprave za gospodinske odplake ali laboratorijske enote. Inokulum za preskus MITI se pridobi iz zmesi virov in je opisan pod naslovom za ta preskus.

I.6.4.1 *Inokulum iz aktivnega blata*

Zberemo svež vzorec aktivnega blata iz prezračevalnega bazena čistilne naprave ali laboratorijske enote, ki čisti predvsem gospodinjske odplake. Odstranimo grobe delce, če je potrebno s filtriranjem skozi fino sito, in nato vzdržujemo blato aerobno.

Druga možnost je, da ga po odstranitvi grobih delcev pustimo, da se posede ali ga centrifugiramo (npr. 10 min pri 1 100 g). Supernatant zavržemo. Blato lahko speremo v mineralnem mediju. Koncentrirano blato suspendiramo v mineralnem mediju, tako da bo koncentracija neraztopljenih trdnih snovi 3-5 g/l, in prezračujemo do uporabe.

Blato je treba odvzeti iz pravilno delujoče konvencionalne čistilne naprave. Če je bilo blato odvzeto iz čistilne naprave z visoko stopnjo čiščenja ali če se domneva da vsebuje inhibitorje, ga je treba sprati. Resuspendirano blato po temeljitem mešanju pustimo, da se posede, ali ga centrifugiramo, zavržemo supernatant in sprano blato ponovno suspendiramo v dodatnem volumnu mineralnega medija. Postopek ponavljamo, dokler ne menimo, da je blato brez presežnega substrata ali inhibitorjev.

Tik pred uporabo popolnoma resuspendiranega blata ali neobdelanega blata odvajamo vzorec za določitev suhe mase neraztopljenih trdnih snovi.

Dodatna možnost je, da aktivno blato homogeniziramo (3-5 g neraztopljenih trdnih snovi/l). Blato obdelujemo z mehanskim mešalnikom 2 minuti pri srednji hitrosti. Zmešano blato naj se poseda 30 minut, če je potrebno tudi dlje, nato odlijemo tekočino, ki jo uporabimo kot inokulum v koncentraciji 10 ml/l mineralnega medija.

I.6.4.2 *Drugi viri inokuluma*

Lahko se pridobi iz sekundarnega odtoka iz čistilne naprave ali laboratorijske enote, ki prejema predvsem gospodinjske odplake. Zberemo svež vzorec in ga med prevozom vzdržujemo v aerobnem stanju. Pustimo, da se poseda 1 uro, ali ga filtriramo skozi grobi filtrirni papir in supernatant oziroma filtrat vzdržujemo v aerobnem stanju do uporabe. Na liter medija se lahko uporabi do 100 ml takega inokuluma.

Še en vir inokuluma je površinska voda. V tem primeru odvajamo vzorec ustrezne površinske vode, npr. reke, jezera, in ga vzdržujemo v aerobnem stanju do uporabe. Če je potrebno inokulum koncentriramo s filtriranjem ali centrifugiranjem.

I.6.5 **Aklimatizacija inokulumov**

Inokulumi se lahko predhodno aklimatizirajo na preskusne pogoje, ne smejo pa se prilagoditi na preskusno snov. Aklimatizacija vključuje prezračevanje aktivnega blata v mineralnem mediju ali sekundarnega odtoka 5-7 dni pri temperaturi preskusa. Aklimatizacija včasih izboljša natančnost preskusnih metod, tako da zniža vrednosti slepih vzorcev. Pri MITI aklimatizacija inokuluma ni potrebna.

I.6.6 **Abiotški kontrolni vzorci**

Kadar je potrebno, preverimo ali pride do abiotske razgradnje preskusne snovi, tako da določimo odstranitev DOC, sprejem kisika ali razvijanje ogljikovega dioksida v sterilnih kontrolnih vzorcih brez inokuluma. Steriliziramo s filtriranjem skozi membranski filter (0,2-0,45 mikrometrov) ali z dodatkom ustrezne strupene snovi v ustrezni koncentraciji. Če uporabimo membranski filter, vzorce odvajamo aseptično, da ohranimo sterilnost. Če adsorpcija preskusne snovi ni bila izključena že prej, morajo preskusi, ki merijo biorazgradnjo kot odstranitev DOC, zlasti tisti z inokulumom iz aktivnega blata, vključevati abiotski kontrolni vzorec, ki je inokuliran in zastrupljen.

I.6.7 Število steklenic

Število steklenic v značilnem preskusu je navedeno pod naslovom za posamezni preskus.

Lahko se uporabijo naslednje vrste vzorcev:

Preskusna suspenzija: vsebuje preskusno snov in inokulum

Slepi vzorec z inokulumom: vsebuje le inokulum

Vzorec za kontrolo postopka: vsebuje referenčno snov in inokulum

Abiotiski sterilni kontrolni vzorec: sterilen, vsebuje preskusno snov (glej I.6.6)

Vzorec za kontrolo adsorpcije: vsebuje preskusno snov, inokulum in sterilizacijsko sredstvo

Vzorec za kontrolo strupenosti: vsebuje preskusno snov, referenčno snov in inokulum

Določanje v preskusni suspenziji in slepem vzorcu z inokulumom mora obvezno potekati vzporedno. Priporočljivo je, da se tudi določanje v drugih vzorcih izvaja vzporedno.

To sicer ni vedno možno. Zagotovimo, da je dovolj vzorcev ali odčitkov za oceno odstotka odstranitve v 10-dnevnom oknu.

I.7 PODATKI IN OCENA

Pri izračunavanju odstotka razgradnje, D_t , se uporabijo srednje vrednosti podvojenih meritev parametra v preskusnih posodah in slepem vzorcu z inokulumom. Enačbe so navedene v spodnjih oddelkih za posamezne preskuse. Grafično se prikaže potek razgradnje in označi 10-dnevno okno. Izračunata se odstotek odstranitve ob koncu 10-dnevnega okna in vrednost ob konstantni koncentraciji ali ob koncu preskusa, kar je primerno, in navedeta v poročilu.

Pri respirometričnih preskusih lahko snovi, ki vsebujejo dušik, vplivajo na sprejem kisika zaradi nitrifikacije (glej prilogi II in V).

I.7.1 Razgradnja merjena z določanjem DOC

Odstotek razgradnje, D_t , ob vsakem vzorčenju se izračuna posebej za steklenice, ki vsebujejo preskusno snov, z uporabo srednjih vrednosti ponovljenih meritev DOC, da se lahko oceni veljavnost preskusa (glej I.5.2). Izračuna se po naslednji enačbi:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

pri čemer je:

D_t = % razgradnje ob času t ,

C_o = srednja začetna koncentracija DOC v inokuliranem mediju, ki vsebuje preskusno snov (mg DOC/l),

C_t = srednja koncentracija DOC v inokuliranem mediju, ki vsebuje preskusno snov, ob času t (mg DOC/l),

C_{bo} = srednja začetna koncentracija DOC v slepem inokuliranem mineralnem mediju (mg DOC/l),

C_{bt} = srednja koncentracija DOC v slepem inokuliranem mineralnem mediju ob času t (mg DOC/l).

Vse koncentracije se izmerijo s preskusi.

I.7.2 Razgradnja merjena s specifično analizo

Kadar so na voljo specifični analitski podatki, se primarna biorazgradnja izračuna po:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

pri čemer je:

D_t = % razgradnje ob času t , običajno 28 dni,

S_a = količina ostanka preskusne snovi v inokuliranem mediju ob koncu preskusa (mg),

S_b = količina ostanka preskusne snovi v slepem vzorcu z vodo/medijem, kateremu je bila dodana le preskusna snov (mg).

I.7.3 Abiotska razgradnja

Kadar se uporabi abiotski sterilni kontrolni vzorec, se izračuna odstotek abiotske razgradnje po enačbi:

$$\% \text{ abiotske razgradnje} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

pri čemer je

$C_{s(o)}$ = koncentracija DOC v sterilnem kontrolnem vzorcu ob dnevu 0

$C_{s(t)}$ = koncentracija DOC v sterilnem kontrolnem vzorcu ob dnevu t

I.8 POROČANJE

Poročilo o preskusu, če je možno, vsebuje naslednje podatke:

- preskusna in referenčna snov ter njuna čistota;
- preskusni pogoji;
- inokulum: vrsta in mesto(-a) vzorčenja, koncentracija in kakršna koli aklimatizacija;
- delež in vrsta industrijskih odpadkov, prisotnih v odplaki, če sta znana;
- trajanje preskusa in temperatura;
- pri slabo topnih preskusnih snoveh, uporabljena obdelava;
- uporabljena preskusna metoda; treba je navesti znanstvene razloge in obrazložitev za vsako spremembo v postopku;
- podatkovni list;
- vsi opaženi pojavi zaviranja;
- vsaka opažena abiotska razgradnja;
- specifični kemijski analitski podatki, če so na voljo;
- analitski podatki o vmesnih proizvodih, če so na voljo;
- graf odstotka razgradnje v odvisnosti od časa za preskusno in referenčno snov; jasno je treba označiti fazo prilagajanja, fazo razgradnje, 10-dnevno okno in naklon (Priloga I). Če preskus izpolnjuje merila za veljavnost, se lahko za graf uporabijo srednje vrednosti odstotka razgradnje v steklenicah s preskusno snovjo.
- odstotek odstranitve po 10-dnevnem oknu in ob doseženi konstantni koncentraciji ali ob koncu preskusa.

DEL II. PRESKUS UPADANJA DOC (Metoda C.4-A)**II.1 PRINCIP METODE**

Izmerjeni volumen inokuliranega mineralnega medija, ki vsebuje znano koncentracijo preskusne snovi (10-40 mg DOC/l) kot edinega vira organskega ogljika, se prezračuje v temi ali na razpršeni svetlobi pri 22 ± 2 °C.

Razgradnja se spremlja 28 dni prek analize DOC v pogostih presledkih. Stopnja biorazgradnje se izračuna tako, da se koncentracija odstranjenega DOC (popravljen glede na slepi vzorec z inokulumom) izrazi kot odstotek koncentracije na začetku preskusa. Stopnja primarne biorazgradnje se lahko izračuna tudi iz dopolnilne kemijske analize, izvedene na začetku in na koncu inkubacije.

II.2 OPIS METODE**II.2.1 Aparatura**

- (a) erlenmajerice, npr. 250 ml do 2 l, odvisno od volumna, potrebnega za analizo DOC;
- (b) stresalnik, primeren za erlenmajerice, bodisi z avtomatskim uravnavanjem temperature bodisi v prostoru s konstantno temperaturo in dovolj močan, da vzdržuje aerobne pogoje v vseh erlenmajericah;
- (c) filtrirna naprava z ustreznimi membranskimi filtri;
- (d) analizator DOC;
- (e) aparatura za določanje raztopljenega kisika;
- (f) centrifuga.

II.2.2 Priprava mineralnega medija

Pripravo osnovnih raztopin glej v I.6.2.

Zmešamo 10 ml raztopine (a) in 800 ml vode za redčenje, dodamo po 1 ml raztopin (b) do (d) in dopolnimo z vodo za redčenje do 1 l.

II.2.3 Priprava in aklimatizacija inokuluma

Inokulum se lahko pridobi iz različnih virov: aktivnega blata, komunalnih odpadkov, površinskih vod, prsti ali zmesi teh virov.

Glej I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 in I.6.5.

II.2.4 Priprava steklenic

Kot primer, v 2 l-erlenmajerice damo po 800 ml mineralnega medija in v posamezne erlenmajerice dodamo ustrezno količino osnovne raztopine preskusne ali referenčne snovi, da bo koncentracija snovi enakovredna 10-40 mg DOC/l. Preverimo pH vrednost in jo po potrebi uravnamo na 7,4. Erlenmajerice inokuliramo z aktivnim blatom ali inokulumom iz kakega drugega vira (glej I.6.4), tako da bo končna koncentracija neraztopljenih trdnih snovi največ 30 mg/l. Pripravimo tudi kontrolne vzorce z inokulumom v mineralnem mediju brez preskusne ali referenčne snovi.

Če je potrebno, uporabimo eno posodo za preverjanje morebitnega inhibitornega učinka preskusne snovi, tako da inokuliramo raztopino, ki vsebuje primerljivi koncentraciji preskusne in referenčne snovi v mineralnem mediju.

Če je potrebno pripravimo tudi sterilni vzorec za preverjanje, ali se preskusna snov razgrajuje abiotično, tako da uporabimo neinokulirano raztopino snovi (glej I.6.6).

Če sumimo, da se preskusna snov znatno adsorbira na steklo, blato itd., s predhodnim preskusom določimo verjetno stopnjo adsorpcije in s tem primernost preskusa za snov (glej tabelo 1). Pripravimo erlenmajerico s preskusno snovjo, inokulumom in sterilizacijskim sredstvom.

Vse erlenmajerice dopolnimo z mineralnim medijem do 1 l, premešamo in iz vsake erlenmajerice vzamemo vzorec za določitev začetne koncentracije DOC (glej Prilogo II.4). Odprtine erlenmajeric pokrijemo, npr. z aluminijasto folijo, tako da je omogočena prosta izmenjava zraka med erlenmajerico in ozračjem. Erlenmajerice postavimo v stresalnik in tako začnemo preskus.

II.2.5 Število steklenic v značilnem preskusu

Steklenici 1 in 2: Preskusna suspenzija

Steklenici 3 in 4: Slepi vzorec z inokulumom

Steklenica 5: Vzorec za kontrolo postopka

po možnosti in kadar je potrebno:

Steklenica 6: Abiotiski sterilni kontrolni vzorec

Steklenica 7: Vzorec za kontrolo adsorpcije

Steklenica 8: Vzorec za kontrolo strupenosti

Glej tudi I.6.7.

II.2.6 Izvedba preskusa

Ves čas preskusa v znanih časovnih intervalih določamo koncentracijo DOC v vsaki steklenici v podvojenih meritvah, in sicer dovolj pogosto, da lahko določimo začetek 10-dnevnega okna in odstotek odstranitve na koncu 10-dnevnega okna. Odvzamemo le najmanjši volumen preskusne suspenzije, potreben za vsako določitev.

Če je potrebno, pred vzorčenjem nadomestimo izgube zaradi izhlapevanja, tako da dodamo ustrezno količino vode za redčenje (I.6.1). Pred odvzemom vzorca medij temeljito premešamo in zagotovimo, da se material, prilepljen na steno posode, raztopi ali suspendira. Vzorce takoj po odvzemu membransko filtriramo ali centrifugiramo (glej Prilogo II.4). Filtrirane ali centrifugirane vzorce analiziramo isti dan ali pa jih shranimo pri temperaturi 2-4 °C za največ 48 ur ali pod -18 °C za daljše obdobje.

II.3 PODATKI IN POROČANJE

II.3.1 Obdelava rezultatov

Izračunamo odstotek razgradnje ob času t iz I.7.1 (Določanje DOC) in, neobvezno, iz I.7.2 (specifična analiza).

Vse rezultate zapišemo na predvidene podatkovne liste.

II.3.2 Veljavnost rezultatov

Glej I.5.2.

II.3.3 Poročanje

Glej I.8.

II.4 PODATKOVNI LIST

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRESKUS UPADANJA DOC**1. LABORATORIJ****2. DATUM ZAČETKA PRESKUSA****3. PRESKUSNA SNOV**

Ime:

Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/l kot snov

Začetna koncentracija v mediju, t_0 : ... mg/l kot snov

4. INOKULUM

Vir:

Obdelava:

Aklimatizacija, če je bila opravljena:

Koncentracija neraztopljenih trdnih snovi v reakcijski zmesi: mg/l

5. DOLOČITVE OGLJIKA

Analizator ogljika:

	Št. steklenice		DOC po n dneh (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Preskusna snov in inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, srednja vrednost $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, srednja vrednost $C_{b(t)}$					
Slepi vzorec z inokulumom in brez preskusne snovi	3	c_1					
		c_2					
		c, srednja vrednost $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, srednja vrednost $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VREDNOTENJE NEOBDELANIH PODATKOV

Št. steklenice		% razgradnje po n dneh				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Srednja vrednost ⁽¹⁾	$D = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(¹) Če je med D₁ in D₂ velika razlika, se srednja vrednost ne izračuna.

Opomba: za referenčno snov in vzorce za kontrolo strupenosti se lahko uporabi podobna oblika.

7. ABIOTSKA KONTROLA (neobvezno)

	Čas (dnevi)	
	0	t
Konc. DOC (mg/l) v sterilnih kontrolnih vzorcih	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ abiotске razgradnje} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. SPECIFIČNA KEMIJSKA ANALIZA (neobvezno)

	Količina ostanka preskusne snovi ob koncu preskusa (mg/l)	% primarne razgradnje
Sterilni kontrolni vzorec	S _b	
Inokulirani preskusni medij	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL III. PRILAGOJENI PRESEJALNI PRESKUS OECD (Metoda C.4-B)

III.1 PRINCIP METODE

Izmerjeni volumen mineralnega medija, ki vsebuje znano koncentracijo preskusne snovi (10-40 mg DOC/l) kot edinega vira organskega ogljika, se inokulira z 0,5 ml odtoka na liter medija. Zmes se prezračuje v temi ali na razpršeni svetlobi pri 22 ± 2 °C.

Razgradnja se spremlja 28 dni prek analize DOC v pogostih presledkih. Stopnja biorazgradnje se izračuna tako, da se koncentracija odstranjenega DOC (popravljen glede na slepi vzorec z inokulumom) izrazi kot odstotek koncentracije na začetku preskusa. Stopnja primarne biorazgradnje se lahko izračuna tudi iz dopolnilne kemijske analize, izvedene na začetku in na koncu inkubacije.

III.2 OPIS METODE

III.2.1 **Aparatura**

- (a) erlenmajerice, npr. 250 ml do 2 l, odvisno od volumna, potrebnega za analizo DOC;
- (b) stresalnik – primeren za erlenmajerice, bodisi z avtomatskim uravnavanjem temperature bodisi v prostoru s konstantno temperaturo in dovolj močan, da vzdržuje aerobne pogoje v vseh erlenmajericah;
- (c) filtrirna naprava z ustreznimi membranskimi filtri;
- (d) analizator DOC;
- (e) aparatura za določanje raztopljenega kisika;
- (f) centrifuga.

III.2.2 **Priprava mineralnega medija**

Pripravo osnovnih raztopin glej v I.6.2.

Zmešamo 10 ml raztopine (a) in 80 ml vode za redčenje, dodamo po 1 ml raztopin (b) do (d) in dopolnimo z vodo za redčenje do 1 litra.

Pri tej metodi se za inokulum uporabi le 0,5 ml odtoka/liter, zato bo medij morda treba okrepiti z elementi v sledeh in rastnimi faktorji. To se stori tako, da se na liter končnega medija doda po 1 ml vsake od naslednjih raztopin:

Raztopine elementov v sledeh:

Manganov sulfat tetrahidrat, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
Borova kislina, H_3BO_3	57,2 mg
Cinkov sulfat heptahidrat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
Amonijev heptamolibdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	34,7 mg
Fe-helat (FeCl_3 etilendiamin-tetra-očetna kislina)	100,0 mg

Raztopimo v vodi za redčenje in dopolnimo z vodo za redčenje do 1000 ml.

Raztopina vitaminov:

Kvasni ekstrakt	15,0 mg
-----------------	---------

Kvasni ekstrakt raztopimo v 100 vode. Steriliziramo s filtriranjem skozi 0,2-mikronsko membrano ali pripravimo sveže.

III.2.3 **Priprava in aklimatizacija inokuluma**

Inokulum se lahko pridobi iz sekundarnega odtoka iz čistilne naprave ali laboratorijske enote, ki prejema predvsem gospodinjske odplake. Glej I.6.4.2 in I.6.5.

Uporabi se 0,5 ml na liter mineralnega medija.

III.2.4 **Priprava steklenic**

Kot primer, v 2-litrski erlenmajerice damo po 800 ml mineralnega medija in v posamezne erlenmajerice dodamo ustrezno količino osnovne raztopine preskusne ali referenčne snovi, da bo koncentracija snovi enakovredna 10-40 mg DOC/liter. Preverimo pH vrednost in jo po potrebi uravnamo na 7,4. Erlenmajerice inokuliramo s komunalno odplako v koncentraciji 0,5 ml/liter (glej I.6.4.2). Pripravimo tudi kontrolne vzorce z inokulumom v mineralnem mediju brez preskusne ali referenčne snovi.

Če je potrebno, uporabimo eno posodo za preverjanje morebitnega inhibitornega učinka preskusne snovi, tako da inokuliramo raztopino, ki vsebuje primerljivi koncentraciji preskusne in referenčne snovi v mineralnem mediju. Če je potrebno pripravimo tudi sterilni vzorec za preverjanje, ali se preskusna snov razgrajuje abiotsko, tako da uporabimo neinokulirano raztopino snovi (glej I.6.6).

Če sumimo, da se preskusna snov znatno adsorbira na steklo, blato itd., s predhodnim preskusom določimo verjetno stopnjo adsorpcije in s tem primernost preskusa za snov (glej tabelo 1). Pripravimo erlenmajerico s preskusno snovjo, inokulumom in sterilizacijskim sredstvom.

Vse erlenmajerice dopolnimo z mineralnim medijem do 1 litra, premešamo in iz vsake erlenmajerice vzamemo vzorec za določitev začetne koncentracije DOC (glej Prilogo II.4). Odprtine erlenmajeric pokrijemo, npr. z aluminijasto folijo, tako da je omogočena prosta izmenjava zraka med erlenmajerico in ozračjem. Erlenmajerice postavimo v stresalnik in tako začnemo preskus.

III.2.5 Število steklenic v značilnem preskusu

Steklenici 1 in 2: Preskusna suspenzija

Steklenici 3 in 4: Slepi vzorec z inokulumom

Steklenica 5: Vzorec za kontrolo postopka

ter po možnosti in kadar je potrebno:

Steklenica 6: Abiotiski sterilni kontrolni vzorec

Steklenica 7: Vzorec za kontrolo adsorpcije

Steklenica 8: Vzorec za kontrolo strupenosti

Glej tudi I.6.7.

III.2.6 Izvedba preskusa

Ves čas preskusa v znanih časovnih intervalih določamo koncentracijo DOC v vsaki steklenici v podvojenih meritvah, in sicer dovolj pogosto, da lahko določimo začetek 10-dnevnega okna in odstotek odstranitve na koncu 10-dnevnega okna. Odvzamemo le najmanjši volumen preskusne suspenzije, potreben za vsako določitev.

Če je potrebno, pred vzorčenjem nadomestimo izgube zaradi izhlapevanja, tako da dodamo ustrezno količino vode za redčenje (I.6.1). Pred odvzemom vzorca medij temeljito premešamo in zagotovimo, da se material, prilepljen na steno posode, raztopi ali suspendira. Vzorce takoj po odvzemu membransko filtriramo ali centrifugiramo (glej Prilogo II.4). Filtrirane ali centrifugirane vzorce analiziramo isti dan ali pa jih shranimo pri temperaturi 2-4 °C za največ 48 ur ali pod -18 °C za daljše obdobje.

III.3 PODATKI IN POROČANJE

III.3.1 Obdelava rezultatov

Izračunamo odstotek razgradnje ob času t iz I.7.1 (Določanje DOC) in, neobvezno, iz I.7.2 (specifična analiza).

Vse rezultate zapišemo na predvidene podatkovne liste.

III.3.2 Veljavnost rezultatov

Glej I.5.2.

III.3.3 Poročanje

Glej I.8.

III.4

PODATKOVNI LIST

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRILAGOJENI PRESEJALNI PRESKUS OECD**1. LABORATORIJ****2. DATUM ZAČETKA PRESKUSA****3. PRESKUSNA SNOV**

Ime:

Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/l kot snov

Začetna koncentracija v mediju, t_0 : ... mg/l kot snov

4. INOKULUM

Vir:

Obdelava:

Aklimatizacija, če je bila opravljena:

Koncentracija neraztopljenih trdnih snovi v reakcijski zmesi: ... mg/l

5. DOLOČITVE OGLJIKA

Analizator ogljika:

	Št. steklenice		DOC po n dneh (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Preskusna snov in inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, srednja vrednost $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, srednja vrednost $C_{b(t)}$					
Slepi vzorec z inokulumom in brez preskusne snovi	3	c_1					
		c_2					
		c, srednja vrednost $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, srednja vrednost $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VREDNOTENJE NEOBDELANIH PODATKOV

Št. steklenice		% razgradnje po n dneh				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Srednja vrednost ⁽¹⁾	$D = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(¹) Če je med D₁ in D₂ velika razlika, se srednja vrednost ne izračuna.

Opomba: za referenčno snov in vzorce za kontrolo strupenosti se lahko uporabi podobna oblika.

7. ABIOTSKA KONTROLA (neobvezno)

	Čas (dnevi)	
	0	1
Konc. DOC (mg/l) v sterilnih kontrolnih vzorcih	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ abiotске razgradnje} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. SPECIFIČNA KEMIJSKA ANALIZA (neobvezno)

	Količina ostanka preskusne snovi ob koncu preskusa	% primarne razgradnje
Sterilni kontrolni vzorec	S _b	
Inokulirani preskusni medij	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL IV. PRESKUS RAZVIJANJA CO₂ (Metoda C.4-C)**IV.1 PRINCIP METODE**

Izmerjeni volumen inokuliranega mineralnega medija, ki vsebuje znano koncentracijo preskusne snovi (10-20 mg DOC ali TOC/l) kot edinega vira organskega ogljika, se prezračuje z uvajanjem zraka brez ogljikovega dioksida z nadzorovano hitrostjo v temi ali na razpršeni svetlobi. Razgradnja se spremlja 28 dni z določanjem proizvedenega ogljikovega dioksida, ki se ujame v barijev ali natrijev hidroksid in izmeri s titracijo preostalega hidroksida ali kot anorganski ogljik. Količina ogljikovega dioksida, proizvedenega iz preskusne snovi (popravljen glede na slepi vzorec z inokulumom), se izrazi kot odstotek TCO₂. Stopnja biorazgradnje se lahko izračuna tudi iz dopolnilne analize DOC, izvedene na začetku in na koncu inkubacije.

IV.2 OPIS METODE**IV.2.1 Aparatura**

- (a) buče, 2-5 litrov, vsaka opremljena s prezračevalno cevjo, ki sega skoraj do dna bučke, in odvodno odprtino;
- (b) magnetna mešala, kadar se preskušajo slabo topne snovi;
- (c) steklenice za absorpcijo plina;
- (d) naprava za uravnavanje in merjenje zračnega pretoka;
- (e) aparatura za izpiranje ogljikovega dioksida, za pripravo zraka brez ogljikovega dioksida; lahko pa se uporabi zmes kisika brez CO₂ in dušika brez CO₂ iz plinskih jeklenk v pravem razmerju (20 % O₂ in 80 % N₂);
- (f) naprava za določanje ogljikovega dioksida, bodisi titrimetrično ali s kako obliko analizatorja anorganskega ogljika;
- (g) naprava za membransko filtracijo (neobvezno);
- (h) analizator DOC (neobvezno).

IV.2.2 Priprava mineralnega medija

Pripravo osnovnih raztopin glej v I.6.2.

Zmešamo 10 ml raztopine (a) in 800 ml vode za redčenje, dodamo po 1 ml raztopin (b) do (d) in dopolnimo z vodo za redčenje do 1 l.

IV.2.3 Priprava in aklimatizacija inokuluma

Inokulum se lahko pridobi iz različnih virov: aktivnega blata, komunalnih odplak, površinskih vod, prsti ali zmesi teh virov.

Glej I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 in I.6.5.

IV.2.4 Priprava steklenic

Naslednji volumni in mase se na primer nanašajo na 5-litrsko steklenico, ki vsebujejo 3 l suspenzije. Če se uporabijo manjši volumni, je treba vrednosti ustrezno spremeniti, vendar hkrati zagotoviti točno merjenje nastalega ogljikovega dioksida.

V vsako 5-litrsko steklenico damo 2 400 ml mineralnega medija. Dodamo ustrezen volumen pripravljenega aktivnega blata (glej I.6.4.1 in I.6.5), da bo v končnih 3 l inokulirane zmesi koncentracija neraztopljenih trdnih snovi največ 30 mg/l.

Druga možnost je, da pripravljeno blato najprej razredčimo z mineralnim medijem, da dobimo suspenzijo 500-1 000 mg/l, nato dodamo ustrezen alikvot vsebini 5-litrške steklenice, da dobimo koncentracijo 30 mg/l; ta način zagotavlja večjo natančnost. Lahko se uporabijo drugi viri inokuluma (glej I.6.4.2).

Te inokulirane zmesi čez noč prezračujemo z zrakom brez CO₂, da iz sistema izperemo ogljikov dioksid.

V vzporedne steklenice dodamo ločeno preskusno snov in referenčno snov, kot znani volumen osnovnih raztopin, tako da bo dobljena koncentracija DOC ali TOC, ki ga prispeva dodana snov, 10 do 20 mg/l; za kontrolo inokuluma v nekaj steklenic ne dodamo snovi. Slabo topne preskusne snovi dodamo neposredno v steklenice, na podlagi mase ali volumna, ali ravnamo z njimi, kakor je opisano v Prilogi III.

Če je potrebno, uporabimo eno steklenico za preverjanje morebitnega inhibitornega učinka preskusne snovi, tako da vanjo damo preskusno in referenčno snov v koncentracijah, enakih koncentracijam v drugih steklenicah.

Če je potrebno pripravimo tudi sterilni vzorec za preverjanje, ali se preskusna snov razgrajuje abiotsko, tako da uporabimo neinokulirano raztopino snovi (glej I.6.6). Steriliziramo z dodatkom strupene snovi v primerni koncentraciji.

Suspenzije v vseh erlenmajericah dopolnimo do 3 l z mineralnim medijem, predhodno prezračevanim z zrakom brez CO₂. Po izbiri lahko vzamemo vzorce za analizo DOC (glej Prilogo II.4) in/ali specifično analizo. Na odvodne odprtine erlenmajeric priključimo absorpcijske steklenice.

Če uporabimo barijev hidroksid, na vsako 5-litrsko erlenmajerico zaporedno priključimo po tri absorpcijske steklenice s po 100 ml 0,0125 M raztopine barijevega hidroksida. V raztopini ne sme biti oborjenega sulfata in karbonata in tik pred uporabo je treba določiti njeno koncentracijo. Če uporabimo natrijev hidroksid, priključimo dva lovlnika, drugega za potrditev, da se je v prvem absorbiral ves ogljikov dioksid. Primerne so absorpcijske steklenice, opremljene z zapirali za serumske steklenice. V vsako steklenico dodamo 200 ml 0,05 M natrijevega hidroksida, kar je dovolj za absorpcijo celotne količine ogljikovega dioksida, ki se razvije pri popolni razgradnji preskusne snovi. Raztopina natrijevega hidroksida vsebuje sledi karbonatov, tudi ko je sveže pripravljena; to se popravi z odštetjem količine ogljika v slepem vzorcu.

IV.2.5 Število steklenic v značilnem preskusu

Steklenici 1 in 2: Preskusna suspenzija

Steklenici 3 in 4: Slepi vzorec z inokulumom

Steklenica 5: Vzorec za kontrolo postopka

ter po možnosti in kadar je potrebno:

Steklenica 6: Abiotski sterilni kontrolni vzorec

Steklenica 7: Vzorec za kontrolo strupenosti

Steklenica 8: Vzorec za kontrolo strupenosti

Glej tudi I.6.7.

IV.2.6 Izvedba preskusa

Preskus pričnemo s črpanjem zraka brez CO₂ skozi suspenzije s hitrostjo 30-100 ml/min. Periodično odvajamo vzorce absorbenta ogljikovega dioksida za analizo vsebnosti CO₂. Prvih deset dni je priporočljivo analize izvesti vsak drugi ali tretji dan, nato pa vsak peti dan do 28. dne, da se lahko določi 10-dnevno okno.

Osemindvajseti dan odvajamo vzorce (neobvezno) za DOC in/ali specifično analizo, izmerimo pH suspenzij in dodamo po 1 ml koncentrirane klorovodikove kisline v vsako steklenico; steklenice čez noč prezračujemo, da iz preskusnih suspenzij izženemo ves ogljikov dioksid. Devetindvajseti dan izvedemo zadnjo analizo razvitega ogljikovega dioksida.

Ob dnevih, ko merimo CO₂, odklopimo steklenici najbližji absorber z barijevim hidroksidom in raztopino hidroksida titiramo z 0,05 M HCl ob fenoltaleinu kot indikatorju. Preostale absorberje prestavimo za eno mesto bliže steklenici, na konec verige pa priključimo nov absorber s 100 ml svežega 0,0125 M barijevega hidroksida. Titiramo po potrebi, na primer, ko opazimo znatno obarjanje v prvem lovilniku in preden se obarjanje začne v drugem, ali najmanj enkrat na teden. Kadar kot absorbent uporabimo natrijev hidroksid, z brizgo odvajamo majhen vzorec (odvisno od lastnosti uporabljenega analizatorja ogljika) raztopine natrijevega hidroksida iz absorberja, ki je najbliže steklenici. Vzorec injiciramo v IC-del analizatorja ogljika za neposredno analizo razvitega ogljikovega dioksida.

Vsebinsko drugega lovilnika analiziramo šele ob koncu preskusa, da upoštevamo popravke zaradi morebitnega prehajanja ogljikovega dioksida naprej.

IV.3 PODATKI IN POROČANJE

IV.3.1 Obdelava rezultatov

Količina v absorberju ujetega CO₂, določena s titracijo, se izračuna po:

$$\text{mgCO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

pri čemer je:

V = volumen HCl, porabljen za titracijo 100 ml absorbenta (ml),

C_B = koncentracija raztopine barijevega hidroksida (M),

C_A = koncentracija raztopina klorovodikove kisline (M),

če je C_B enak 0,0125 M in C_A enak 0,05 M, se za titracijo 100 ml barijevega hidroksida porabi 50 ml, je masa CO₂:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl porabljeni pri titraciji} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

V tem primeru je torej faktor za pretvorbo pri titraciji porabljene HCl v mg CO₂ enak 1,1.

Iz ustreznih vrednosti, dobljenih pri titraciji, izračunamo maso CO₂, proizvedenega samo iz inokuluma ter iz inokuluma in preskusne snovi; razlika je masa CO₂, proizvedenega iz preskusne snovi.

Če na primer pri vzorcu z inokulumom porabimo za titracijo 48 ml ter pri vzorcu z inokulumom in preskusno snovjo 45 ml,

$$\text{CO}_2 \text{ iz inokuluma} = 1,1 \times (50-48) = 2,2 \text{ mg}$$

$$\text{CO}_2 \text{ iz inokuluma in preskusne snovi skupaj} = 1,1 \times (50-45) = 5,5 \text{ mg}$$

torej je masa CO₂, proizvedenega iz preskusne snovi, enaka 3,3 mg.

Odstotek biorazgradnje se izračuna po enačbi:

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{\text{mg proizvedenega CO}_2 \times 100}{\text{TCO}_2 \times \text{mg dodane preskusne snovi}}$$

ali

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{\text{mg proizvedenega CO}_2 \times 100}{\text{mg v preskusu dodanega TCO} \times 3,67}$$

pri čemer je 3,67 faktor pretvorbe (44/12) ogljika v ogljikov dioksid.

Odstotek razgradnje po vsakem časovnem intervalu določimo tako, da seštejemo odstotke TCO_2 , izračunane za vsak dan do dneva meritve.

Pri absorberjih z natrijevim hidroksidom, količino proizvedenega ogljikovega dioksida, izraženega kot anorganski ogljik (IC) (mg), izračunamo tako, da koncentracijo IC v absorbentu pomnožimo z volumnom absorbenta.

Odstotek razgradnje izračunamo po enačbi:

$$\% \text{TCO}_2 = \frac{\text{mg IC v preskusni steklenici} - \text{mg IC v slepem vzorcu}}{\text{mg TOC, dodanega kot preskusna snov}} \times 100$$

Odstranitev DOC (neobvezno) izračunamo, kakor je opisano v I.7. Te in vse druge rezultate zapišemo na predvidene podatkovne liste.

IV.3.2 Veljavnost rezultatov

Vsebnost IC v suspenziji preskusne snovi v mineralnem mediju mora biti na začetku preskusa manj kot 5 % TC in skupni CO_2 , razvit v slepem vzorcu z inokulumom, na koncu preskusa ne sme preseči 40 mg/l medija. Če dobljene vrednosti presežejo 70 mg CO_2 /liter, je treba kritično preveriti podatke in tehniko preskušanja.

Glej tudi I.5.2.

IV.3.3 Poročanje

Glej I.8.

IV.4 PODATKOVNI LIST

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRESKUS RAZVIJANJA OGLJIKOVEGA DIOKSIDA

1. LABORATORIJ

2. DATUM ZAČETKA PRESKUSA

3. PRESKUSNA SNOV

Ime:

Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/l kot snov

Začetna konc. v mediju: ... mg/l kot snov

Skupni C, dodan v steklenico: ... mg C

TCO_2 : mg CO_2

4. INOKULUM

Vir:

Obdelava:

Aklimatizacija, če je bila opravljena:

Koncentracija neraztopljenih trdnih snovi v reakcijski zmesi: ... mg/l

5. PROIZVODNJA OGLJIKOVEGA DIOKSIDA IN RAZGRADLJIVOST

Metoda: Ba(OH)₂/NaOH/drugo

Čas (dan)	Nastali CO ₂ preskusni vzorec (mg)		Nastali CO ₂ slepi vzorec (mg)		Nastali CO ₂ kumulativni (mg) (preskusni minus slepi vzorec, srednja vrednost)		TCO ₂ $\frac{\text{kumulativni CO}_2}{\text{TCO}_2} \times 100$		
	1	srednja vred- nost	3	srednja vred- nost	1	2	1	2	srednja vrednost
	2		4						
0									
n ₁									
n ₂									
n ₃									
28									

Opomba: za referenčno snov in vzorce za kontrolo strupenosti se lahko uporabi podobna oblika.

6. ANALIZA OGLJIKA (neobvezno)

Analizator ogljika:

Čas (dan)	Slepi vzorec mg/l	Preskusna snov mg/l
0	C _{b(o)}	C _o
28 (l)	C _{b(t)}	C _t
(l) ali ob koncu inkubacije		

$$\% \text{ odstranjenega DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. ABIOTSKA RAZGRADNJA (neobvezno)

$$\% \text{ abiotska razgradnja} = \frac{\text{CO}_2 - \text{CO}_2, \text{ proizveden v sterilni steklenici po 28 dneh (mg)}}{\text{TCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

DEL V. PRESKUS MANOMETRIČNE RESPIROMETRIJE (Metoda C.4-D)**V.1 PRINCIP METODE**

Izmerjeni volumen inokuliranega mineralnega medija, ki vsebuje znano koncentracijo preskusne snovi (100 mg preskusne snovi/l, da dobimo najmanj 50-100 mg TPK/l) kot edinega vira organskega ogljika, se do 28 dni meša v zaprti steklenici pri konstantni temperaturi (± 1 °C ali manj). Poraba kisika se določi bodisi z merjenjem količine kisika (elektrolitsko proizvedenega), potrebne za ohranjanje konstantnega volumna plina v respirometrijski steklenici, bodisi iz spremembe volumna ali tlaka (ali kombinacije obeh) v aparaturi. Razviti ogljikov dioksid se absorbira v raztopini kalijevega hidroksida ali drugega ustreznega absorbenta. Količina kisika, ki jo porabi preskusna snov (popravljen glede na sprejem pri slepem vzorcu z inokulumom, preskušnem vzporedno) se izrazi kot odstotek TPK ali KPK. Po izbiri se lahko izračunata primarna biorazgradnja iz dopolnilne specifične analize, opravljene na začetku in na koncu inkubacije, ter popolna biorazgradnja z analizo DOC.

V.2 OPIS METODE**V.2.1 Aparatura**

- (a) ustrezní respirometer;
- (b) termostat, ki vzdržuje konstantno temperaturo do ± 1 °C ali bolj natančno,
- (c) naprava za membransko filtracijo (neobvezno);
- (d) analizator ogljika (neobvezno).

V.2.2 Priprava mineralnega medija

Pripravo osnovnih raztopin glej v I.6.2.

Zmešamo 10 ml raztopine (a) in 800 ml vode za redčenje, dodamo po 1 ml raztopin (b) do (d) in dopolnimo z vodo za redčenje do 1 litra.

V.2.3 Priprava in aklimatizacija inokuluma

Inokulum se lahko pridobi iz različnih virov: aktivnega blata, komunalnih odplak, površinskih vod in prsti ali zmesi teh virov.

Glej I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 in I.6.5.

V.2.4 Priprava steklenic

Iz osnovnih raztopin pripravimo ločene serije raztopin preskusne in referenčne snovi v mineralnem mediju, ki ustrezajo koncentraciji 100 mg snovi/l (da dobimo najmanj 50-100 mg TPK/l).

TPK izračunamo na podlagi tvorbe amonijevih soli, razen če pričakujemo nitrifikacijo, takrat mora izračun temeljiti na tvorbi nitrata (glej Prilogo II.2).

Določimo pH vrednost in jo po potrebi uravnamo na $7,4 \pm 0,2$.

Slabo topne snovi se dodajo pozneje (glej spodaj).

Če bomo določali strupenost preskusne snovi, pripravimo dodatno raztopino v mineralnem mediju, ki vsebuje preskusno in referenčno snov v istih koncentracijah, kakor posamezne raztopine.

Če potrebujemo meritev fizikalno-kemijskega sprejema kisika, pripravimo raztopino preskusne snovi, navadno v koncentraciji 100 mg TPK/l, ki jo steriliziramo z dodatkom ustrezne strupene snovi (glej I.6.6).

V steklenice, najmanj po dve za vsako vrsto vzorca, damo potrebne volumne raztopin preskusne in referenčne snovi. Pripravimo dodatne steklenice z le mineralnim medijem (za kontrolo inokuluma) ter, če je potrebno, z zmesjo raztopin preskusne in referenčne snovi in s sterilno raztopino.

Če je preskusna snov slabo topna, jo dodamo v tej fazi, neposredno v steklenico, na podlagi mase ali volumna, ali ravnamo z njo, kakor je opisano v Prilogi III. V razdelke CO₂-absorberja damo kalijev hidroksid, tablete zmesi natrijevega ali kalijevega hidroksida in kalcijevega oksida ali kak drug absorbent.

V.2.5 Število steklenic v značilnem preskusu

Steklenici 1 in 2: Preskusna suspenzija

Steklenici 3 in 4: Slep vzorec z inokulumom

Steklenica 5: Vzorec za kontrolo postopka

po možnosti in kadar je potrebno:

Steklenica 6: Sterilni kontrolni vzorec

Steklenica 7: Vzorec za kontrolo strupenosti

Steklenica 8: Vzorec za kontrolo strupenosti

Glej tudi I.6.7.

V.2.6 Izvedba preskusa

Počakamo, da steklenice dosežejo želeno temperaturo, in ustrezne steklenice inokuliramo s pripravljenim aktivnim blatom ali inokulumom iz drugega vira, tako da bo koncentracija neraztopljenih trdnih snovi največ 30 mg/l. Sestavimo aparaturo, vklopimo mešalnik, preverimo nepredušnost in začnemo meriti sprejem kisika. Običajno nam ni treba storiti nič drugega, kot opraviti potrebne odčitke in dnevno preverjati, ali se vzdržujeta prava temperatura in ustrezno mešanje.

Sprejem kisika izračunamo iz vrednosti, odčitanih v rednih in pogostih intervalih po metodah, ki jih navaja proizvajalec opreme. Ob koncu inkubacije, navadno po 28 dneh, izmerimo pH vsebine steklenic, zlasti če je sprejem kisika manjši ali večji od ThOD_{NH4} (za snovi, ki vsebujejo dušik).

Če je potrebno, iz respirometriških steklenic na začetku in na koncu odvzamemo vzorce za analizo DOC ali specifično kemijsko analizo (glej Prilogo II.4). Ob prvem odvzemu zagotovimo, da je volumen preostale preskusne suspenzije v steklenici znan. Kadar kisik sprejema preskusna snov, ki vsebuje dušik, določimo povečanje koncentracije nitrita in nitrata v 28 dneh ter izračunamo popravek za kisik, porabljen pri nitrifikaciji (Priloga V).

V.3 PODATKI IN POROČANJE

V.3.1 Obdelava rezultatov

Količino kisika (mg), ki ga sprejme preskusna snov po določenem času (popravljen glede na sprejem v slepem vzorcu za kontrolo inokuluma v istem času), delimo z uporabljenim maso preskusne snovi. Tako dobimo BPK, izražen v mg kisika/mg preskusne snovi, to je

$$\text{BPK} = \frac{\text{mg sprejetega O}_2 \text{ pri preskusni snovi} - \text{mg sprejetega O}_2 \text{ pri slepem vzorcu}}{\text{mg preskusne snovi v steklenici}}$$

$$= \text{mg O}_2 \text{ na mg preskusne snovi.}$$

odstotek razgradnje izračunamo po enačbi:

$$\% \text{ biorazgradnje} = \% \text{TPK} = \frac{\text{BPK (mg O}_2\text{/mg snovi)}}{\text{TPK (mg O}_2\text{/mg snovi)}} \times 100$$

ali po enačbi:

$$\% \text{ KPK} = \frac{\text{BPK (mg O}_2\text{/mg snovi)}}{\text{KPK (mg O}_2\text{/snovi)}} \times 100$$

Opozoriti je treba, da ti dve metodi ne dasta nujno enakega rezultata; priporočena je uporaba prve metode.

Pri snoveh, ki vsebujejo dušik, uporabimo ustrezni TPK (NH_4 ali NO_3), glede na to kaj vemo ali pričakujemo glede nitrifikacije (Priloga II.2). Če pride do nitrifikacije, ki pa je nepopolna, izračunamo popravek za kisik, porabljen pri nitrifikaciji, iz sprememb v koncentraciji nitrita in nitrata (Priloga V).

Kadar določimo organski ogljik in/ali izvedemo specifično kemično analizo, odstotek razgradnje izračunamo, kakor je opisano v I.7.

Vse rezultate zapišemo na priložene podatkovne liste.

V.3.2 Veljavnost rezultatov

Sprejem kisika v slepem vzorcu z inokulumom je navadno 20-30 mg O_2 /l in ne sme biti večji od 60 mg/l v 28 dneh. Pri vrednostih nad 60 mg/l je treba kritično preveriti podatke in tehniko preskušanja. Če je pH vrednost izven območja 6-8,5 in poraba kisika pri preskusni snovi pod 60 %, je treba preskus ponoviti z manjšo koncentracijo preskusne snovi.

Glej tudi I.5.2.

V.3.3 Poročanje

Glej I.8.

V.4 PODATKOVNI LIST

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRESKUS MANOMETRIČNE RESPIROMETRIJE

1. LABORATORIJ

2. DATUM ZAČETKA PRESKUSA

3. PRESKUSNA SNOV

Ime:

Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/l

Začetna koncentracija v mediju, C_0 : ... mg/l

Volumen v preskusni steklenici (V): ... ml

TPK ali KPK: ... mg O_2 /mg preskusne snovi (NH_4 , NO_3)

4. INOKULUM

Vir:

Obdelava:

Aklimatizacija, če je bila opravljena:

Koncentracija neraztopljenih trdnih snovi v reakcijski zmesi: ... mg/l

5. SPREJEM KISIKA: BIORAZGRADLJIVOST

		Čas (dan)											
		0		7		14			21			28	
Spr. O ₂ (mg) preskusna snov	1												
	2												
	a, srednja vrednost												
Spr. O ₂ (mg) slepi vzorec	3												
	4												
	b, srednja vrednost												
Popravljeni BPK (mg)	(a ₁ -b _m)												
	(a ₂ -b _m)												
BPK na mg preskusne snovi	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												
% razgradnje $\frac{\text{BPK}}{\text{TPK}} \times 100$	D ₁ (a ₁)												
	D ₂ (a ₂)												
	Srednja vrednost ⁽¹⁾												
V = volumen medija v preskusni steklenici													

⁽¹⁾ Če je med D₁ in D₂ velika razlika, se srednja vrednost ne izračuna.

Opomba: za referenčno snov in vzorce za kontrolo strupenosti se lahko uporabi podobna oblika.

6. POPRAVEK ZA NITRIFIKACIJO (glej Prilogo V)

Dan	0	28	Razlika
(i) Koncentracija nitrata (mg N/l)			(N)
(ii) Ekvivalent kisika (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii) Koncentracija nitrita (mg N/l)			(N)
(iv) Ekvivalent kisika (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv) Skupni ekvivalent kisika	—	—	

7. ANALIZA OGLJIKA (neobvezno)

Analizator ogljika:

Čas (dan)	Slepi vzorec mg/l	Preskusna snov mg/l
0	(C _{blo})	(C _o)
28 ⁽¹⁾	(C _{blt})	(C _t)
⁽¹⁾ ali ob koncu inkubacije		

$$\% \text{ odstranjenega DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}} \right) \times 100$$

8. SPECIFIČNA ANALIZA (neobvezno)

S_b = koncentracija v fizikalno-kemijskem (sterilnem) kontrolnem vzorcu po 28 dneh

S_a = koncentracija v inokulirani steklenici po 28 dneh

$$\% \text{ biorazgradnje} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. ABIOTSKA RAZGRADNJA (neobvezno)

a = poraba kisika v sterilnih steklenicah po 28 dneh (mg)

$$\text{poraba kisika na mg preskusne snovi} = \frac{a}{C_o V}$$

(glej oddelek 1 in 3)

$$\% \text{ abiotske razgradnje} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{TPK}}$$

DEL VI. PRESKUS Z ZAPRTO STEKLENICO (Metoda C.4-E)

VI.1 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Raztopina preskusne snovi v mineralnem mediju, običajno 2-5 mg/l, se inokulira z relativno majhnim številom mikroorganizmov iz mešane populacije in hrani v do vrha napolnjenih zaprtih steklenicah v temi pri konstantni temperaturi. Razgradnja se spremlja 28 dni prek analize raztopljenega kisika. Količina kisika, ki jo porabi preskusna snov (popravljen glede na sprejem pri slepem vzorcu z inokulumom, preskušenem vzporedno), se izrazi kot odstotek TPK ali KPK.

VI.2 OPIS METODE

VI.2.1 Aparatura

- (a) BPK-steklenice s steklenimi zamaški, npr. 250-300 ml;
- (b) vodna kopel ali inkubator, za hranjenje steklenic pri konstantni temperaturi (± 1 °C ali bolj natančno) in brez svetlobe;
- (c) velike steklenice (2-5 litrov) za pripravo medijev in polnjenje BPK-steklenic;
- (d) kisikova elektroda in merilnik ali oprema in reagenti za titracijo po Winklerju.

VI.2.2 Priprava mineralnega medija

Pripravo osnovnih raztopin glej v I.6.2.

Zmešamo po 1 ml raztopin (a) do (d) in dopolnimo do 1 litra z vodo za redčenje.

VI.2.3 Priprava inokuluma

Inokulum se navadno pridobi iz sekundarnega odtoka iz čistilne naprave ali laboratorijske enote, ki prejema predvsem gospodinjne odplake. Drugi vir inokuluma je površinska voda. Navadno uporabimo od ene kapljice (0,05 ml) do 5 ml filtrata na liter medija; morda bo treba s poskusi ugotoviti najprimernejši volumen za določen odtok (glej I.6.4.2 in I.6.5).

VI.2.4 Priprava steklenic

Mineralni medij močno prezračujemo najmanj 20 minut. Vsak niz preskusov izvedemo z mineralnim medijem iz iste serije. Na splošno je medij pripravljen za uporabo po 20 h pri temperaturi preskusa. Za namene kontrole določimo koncentracijo raztopljenega kisika; vrednost mora biti približno 9 mg/l pri 20 °C. Vse postopke prenašanja in polnjenja z medijem, nasičenim z zrakom, opravimo tako, da v njem ne nastajajo mehurčki, na primer z uporabo sifonov.

Pripravimo vzoredne skupine BPK-steklenic za določanje preskusne in referenčne snovi v sočasnih preskusnih nizih. Pripravimo zadostno število BPK-steklenic, vključno s slepimi vzorci z inokulumom, da omogočimo podvojene meritve porabe kisika v želenih časovnih intervalih, npr. po 0, 7, 14, 21 in 28 dneh. Lahko bo potrebnih več steklenic, da se omogoči določitev 10-dnevnega okna.

V velike steklenice damo popolnoma prezračen mineralni medij, tako da so napolnjene do približno ene tretjine. Nato v posamezne steklenice dodamo dovolj osnovne raztopine preskusne snovi ali referenčne snovi, da je končna koncentracija snovi največ 10 mg/l. V dodatno steklenico za slepi vzorec z medijem ne dodamo nobene snovi.

Da je zagotovljeno, da aktivnost inokuluma ni omejena, koncentracija raztopljenega kisika v BPK-steklenicah ne sme pasti pod 0,5 mg/l. To omejuje koncentracijo preskusne snovi na približno 2 mg/l. Pri slabo razgradljivih snoveh in tistih z majhnim TPK, lahko uporabimo tudi 5-10 mg/l. V nekaterih primerih je priporočljivo izvesti vzoredna niza z dvema različnima koncentracijama preskusne snovi, na primer z 2 in s 5 mg/l. Navadno TPK izračunamo na podlagi tvorbe amonijevih soli, če pa pričakujemo ali vemo, da bo potekala nitrifikacija, ga izračunamo na podlagi tvorbe nitrata ($\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$; glej Prilogo II.2). Če je nitrifikacija nepopolna, vendar se pojavi, izračunamo popravke glede na spremembe v koncentraciji nitrita in nitrata, določene z analizo (glej Prilogo V).

Če bomo preučevali strupenost preskusne snovi (na primer, kadar je bila predhodno določena nizka vrednost biorazgradljivosti), potrebujemo dodaten niz steklenic.

Pripravimo še eno veliko steklenico, ki vsebuje prezračen mineralni medij (do približno ene tretjine volumna) ter preskusno in referenčno snov v končnih koncentracijah, enakih tistim v drugih velikih steklenicah.

Raztopine v velikih steklenicah inokuliramo s sekundarnim odtokom (ena kapljica ali približno 0,05 ml do 5 ml na liter) ali drugim virom, kot je rečna voda (glej I.6.4.2). Nato raztopine dopolnimo do volumna s prezračenim mineralnim medijem, preko cevi, ki sega do dna steklenice, da dosežemo ustrezno mešanje.

VI.2.5 Število steklenic v značilnem preskusu

V značilnem preskusu se uporabijo naslednje steklenice:

najmanj 10 steklenic, ki vsebujejo preskusno snov in inokulum (preskusna suspenzija),

najmanj 10 steklenic, ki vsebujejo le inokulum (slepi vzorec z inokulumom),

najmanj 10 steklenic, ki vsebujejo referenčno snov in inokulum (kontrola postopka),

in, kadar je potrebno, 6 steklenic, ki vsebujejo preskusno snov, referenčno snov in inokulum (kontrola strupenosti). Da pa bi zagotovo omogočili določitev 10-dnevnega okna, bi potrebovali še enkrat toliko steklenic.

VI.2.6 Izvedba preskusa

Vsako pripravljeno raztopino s cevjo, ki sega v spodnjo četrtino velike steklenice (ne do dna), takoj prenesemo v BPK-steklenice ustrezne skupine, tako da so vse BPK-steklenice napolnjene do vrha. Rahlo potrkamo po steklenici, da odstranimo vse zračne mehurčke. V steklenicah za čas nič takoj določimo raztopljeni kisik z metodo po Winklerju ali z elektrodo. Vsebina steklenic se lahko shrani za poznejšo analizo po Winklerju, tako da se ji doda manganov(II) sulfat in natrijev hidroksid (prvi reagent po Winklerju). Steklenice, ki vsebujejo kisik, fiksiran kot rjavi manganov(III) hidroksid, previdno zapremo in shranimo v temi pri 10-20 °C za največ 24 ur, preden nadaljujemo s postopkom po Winklerju. Preostale steklenice zamašimo, pri čemer zagotovimo, da v njih ni zračnih mehurčkov, in jih inkubiramo pri 20 °C v temi. Vsak niz mora spremljati popoln vzporedni niz za določanje slepega inokuliranega medija. V ustreznih časovnih intervalih (najmanj tedensko) 28 dnevne inkubacije odvezamo vzorce iz najmanj po dveh vzporednih steklenic na niz za določitev raztopljenega kisika.

Tedenski vzorci bi morali omogočiti oceno odstotka odstranitve v 14-dnevnem oknu, vzorčenje na 3-4 dni pa bi moralo omogočiti določitev 10-dnevnega okna, za kar je potrebnih približno dvakrat toliko steklenic.

Pri snoveh, ki vsebujejo dušik, je treba izračunati popravke za porabo kisika pri nitrifikaciji. V ta namen za določitev koncentracije raztopljenega kisika uporabimo metodo s kisikovo elektrodo in nato iz BPK-steklenice odvezamo vzorec za določitev nitrita in nitrata. Iz povečanja koncentracije nitrita in nitrata izračunamo porabljeni kisik (glej Prilogo V).

VI.3 PODATKI IN POROČANJE

VI.3.1 Obdelava rezultatov

Najprej izračunamo BPK po vsakem časovnem intervalu, tako da porabo kisika (mg O₂/l) v slepem vzorcu z inokulumom odštejemo od tiste v vzorcu s preskusno snovjo. Tako popravljeno porabo delimo s koncentracijo (mg/l) preskusne snovi, da dobimo specifični BPK, izražen kot mg kisika na mg preskusne snovi. Izračunamo odstotek biorazgradljivosti, tako da specifični BPK delimo s specifičnim TPK (izračunanim v skladu s Prilogo II.2) ali KPK (določenim z analizo, glej Prilogo II.3), tako je:

$$\text{BPK} = \frac{\text{mg sprejetega O}_2 \text{ pri preskusni} - \text{snovi mg sprejetega O}_2 \text{ pri slepem vzorcu}}{\text{mg preskusne snovi v steklenici}}$$

$$= \text{mg O}_2 \text{ na mg preskusne snovi}$$

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{(\text{BPK (mg O}_2\text{/mg preskusne snovi)})}{(\text{TPK (mg O}_2\text{/mg preskusne snovi)})}$$

ali

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{\text{BPK (mg O}_2\text{/mg preskusne snovi)}}{\text{KPK (mg O}_2\text{/mg preskusne snovi)}}$$

Opozoriti je treba, da ti dve metodi ne dasta nujno enakega rezultata; priporočena je uporaba prve metode.

Pri snoveh, ki vsebujejo dušik, uporabimo ustrezni TPK (NH₄ ali NO₃), glede na to kaj vemo ali pričakujemo glede nitrifikacije (Priloga II.2). Če pride do nitrifikacije, ki pa je nepopolna, izračunamo popravek za kisik, porabljen pri nitrifikaciji, iz sprememb v koncentraciji nitrita in nitrata (Priloga V).

VI.3.2 Veljavnost rezultatov

Poraba kisika v slepem vzorcu z inokulumom po 28 dneh ne sme preseči 1,5 mg raztopljenega kisika/l. Pri višjih vrednostih je treba preveriti preskusne tehnike. Koncentracija preostalega kisika v preskusnih steklenicah nikoli ne sme pasti pod 0,5 mg/l. Tako nizka raven kisika je primerna le, če se taka raven lahko točno določi z uporabljenno metodo za določanje raztopljenega kisika.

Glej tudi I.5.2.

VI.3.3 Poročanje

Glej I.8.

VI.4 PODATKOVNI LIST

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRESKUS Z ZAPRTO STEKLENICO

1. LABORATORIJ

2. DATUM ZAČETKA PRESKUSA

3. PRESKUSNA SNOV

Ime:

Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/l

Začetna koncentracija v steklenici: ... mg/l

TPK ali KPK: ... mg O₂/mg preskusne snovi

4. INOKULUM

Vir:

Obdelava:

Aklimatizacija, če je bila opravljena:

Koncentracija v reakcijski zmesi: ... mg/l

5. DOLOČANJE DO

Metoda: Winkler/elektroda

Analiza steklenic

Čas inkubacije (d)			DO (mg/l)			
			0	n ₁	n ₂	
Slepi vzorec (brez snovi)	1	C ₁				
	2	C ₂				
Srednja vrednost	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Preskusna snov	1	a ₁				
	2	a ₂				
Srednja vrednost	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Opomba: Za referenčno snov in vzorec za kontrolo strupenosti se lahko uporabi podobna oblika.

6. POPRAVEK ZA NITRIFIKACIJO (glej Prilogo V)

Čas inkubacije (d)	0	n ₁	n ₂	n ₃
(i) Koncentracija nitrata (mg N/l)				
(ii) Sprememba koncentracije nitrata (mg N/l)	—			
(iii) Ekvivalent kisika (mg/l)	—			
(iv) Koncentracija nitrita (mg N/l)				
(v) Sprememba koncentracije nitrita (mg N/l)	—			
(vi) Ekvivalent kisika (mg/l)	—			
(iii + vi) Skupni ekvivalent kisika (mg/l)	—			

7. PORABA DO: % RAZGRADNJE

	Poraba po n dneh (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
STEKLENICA 1: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				
STEKLENICA 2: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				
STEKLENICA 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. preskusne snovi} \times \text{TPK snovi}}$				
STEKLENICA 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. preskusne snovi} \times \text{TPK snovi}}$				
srednja vrednost $\% D^{(1)} = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(¹) Srednje vrednosti ne računamo, če je razlika med ponovitvama zelo velika.

m_{to} = vrednost v preskusni steklenici ob času 0

m_{tx} = vrednost v preskusni steklenici ob času x

m_{bo} = srednja vrednost slepega vzorca ob času 0

m_{bx} = srednja vrednost slepega vzorca ob času x

Upoštevamo tudi popravek za nitrifikacijo iz iii + vi v oddelku 6.

8. PORABA DO V SLEPEM VZORCU

Poraba kisika v slepem vzorcu: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Ta poraba je pomembna za veljavnost preskusa. Mora biti manj kot 1,5 mg/l.

DEL VII. PRESKUS M.I.T.I. (Metoda C.4-F)**VII.1 PRINCIP METODE**

V obdobju 28 dni se avtomatsko meri sprejem kisika v raztopini ali suspenziji preskusne snovi v mineralnem mediju, inokulirani s posebej gojenimi, neprilagojenimi mikroorganizmi, med stalnim mešanjem v zatemnjenem, zaprtem respirometru pri 25 ± 1 °C. Razviti ogljikov dioksid se absorbira v zmesi natrijevega in kalcijevega hidroksida. Biorazgradljivost se izrazi kot odstotek sprejema kisika (popravljenega glede na sprejem v slepem vzorcu) glede na teoretični sprejem (TPK). Lahko se izračuna tudi odstotek primarne biorazgradnje iz dopolnilne specifične kemične analize, opravljene na začetku in na koncu inkubacije, ter, neobvezno, z analizo DOC.

VII.2 OPIS METODE**VII.2.1 Aparatura**

- (a) avtomatski elektrolitski BPK-meter ali respirometer, navadno opremljen s šestimi 300 ml-steklenicami s posodicami za CO₂-absorbent;
- (b) prostor s konstantno temperaturo in/ali vodna kopel s temperaturo $25 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ ali bolj natančno;
- (c) naprava za membransko filtracijo (neobvezno);
- (d) analizator ogljika (neobvezno).

VII.2.2 Priprava mineralnega medija

Pripravimo naslednje osnovne raztopine iz analitsko čistih reagentov in vode (I.6.1):

- | | | |
|-----|---|---------|
| (a) | Monokalijev dihidrogen ortofosfat, KH ₂ PO ₄ | 8,50 g |
| | Dikalijev monohidrogen ortofosfat, K ₂ HPO ₄ | 21,75 g |
| | Dinatrijev monohidrogen ortofosfat dodekahidrat Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O | 44,60 g |
| | Amonijev klorid, NH ₄ Cl | 1,70 g |
| | Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra. | |
| | pH vrednost raztopine mora biti 7,2. | |
| (b) | Magnezijev sulfat heptahidrat, MgSO ₄ ·7 H ₂ O | 22,50 g |
| | Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra. | |
| (c) | Kalcijev klorid, brezvodni, CaCl ₂ | 27,50 g |
| | Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra. | |
| (d) | Železov(III) klorid heksahidrat, FeCl ₃ ·6 H ₂ O | 0,25 g |
| | Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra. | |

Zmešamo po 3 ml raztopine (a), (b), (c) in (d) in dopolnimo do 1 litra.

VII.2.3 Priprava inokuluma

Zberemo sveže vzorce na najmanj desetih mestih, v glavnem na območjih, kjer se uporabljajo in odvajajo različne kemikalije. Na mestih kot so čistilne naprave za komunalno ali industrijsko odpadno vodo, reke, jezera, morja, zberemo 1-litrsko vzorce blata, površinske prsti, vode itd. in jih dobro zmešamo skupaj. Odstranimo plavajoče delce in pustimo nekaj časa stati, nato uravnamo pH supernatanta na 7 ± 1 z natrijevim hidroksidom ali fosforno kislino.

Z ustreznim volumnom filtriranega supernatanta napolnimo posode za obdelavo aktivnega blata po sistemu polni-prazni in tekočino prezračujemo približno 23 1/2 h. Trideset minut po ustavitvi prezračevanja zavržemo približno eno tretjino celotnega volumna supernatanta ter preostanku dodamo enak volumen raztopine (pH 7), ki vsebuje po 0,1 % glukoze, peptona in monokalijevega ortofosfata, in nadaljujemo s prezračevanjem. Postopek ponovimo enkrat na dan. Enoto za blato je treba upravljati v skladu z dobro prakso: tekočina mora biti bistra, vzdrževati je treba konstantno temperaturo 25 ± 2 °C, pH mora biti 7 ± 1 , blato se mora dobro posedati, prezračevanje mora biti zadostno, da je zmes ves čas aerobna, prisotne morajo biti prazivali in najmanj vsake tri mesece je treba z referenčno snovjo preveriti aktivnost blata. Blata ne smemo uporabiti dokler ne preteče najmanj en mesec obdelave in ne po več kot štirih mesecih. Nato v rednih časovnih presledkih, enkrat na tri mesece, zbiramo vzorce na najmanj 10 mestih.

Za vzdrževanje enake aktivnosti svežega in starega blata zmešamo filtrirani supernatant obdelovanega aktivnega blata z enakim volumnom filtriranega supernatanta sveže zbrane mešanice iz desetih virov ter nastalo zmes kultiviramo po zgornjem postopku. Blato za inokulum odvajamo 18-24 h po polnjenju enote.

VII.2.4 Priprava steklenic

Pripravimo naslednjih šest steklenic:

Št. 1: 100 mg/l preskusne snovi v vodi za redčenje

Št. 2, 3 in 4: 100 mg/l preskusne snovi v mineralnem mediju

Št. 5: 100 mg/l referenčne snovi (npr. anilin) v mineralnem mediju

Št. 6: samo mineralni medij

Slabo topne snovi dodamo neposredno na podlagi mase ali volumna ali z njimi ravnamo, kakor je opisano v prilogi III, ne smemo pa uporabiti ne topil ne emulgatorjev. V vse steklenice damo CO₂-absorbent v za to namenjene posodice. V steklenicah št. 2, 3 in 4 uravnamo pH na 7,0.

VII.2.5 Izvedba preskusa

Steklenice št. 2, 3 in 4 (preskusne suspenzije), št. 5 (kontrola aktivnosti) in št. 6 (slepi vzorec z inokulumom) inokuliramo z majhno količino inokuluma, tako da bo koncentracija neraztopljenih trdnih snovi 30 mg/l. V steklenico št. 1, ki je namenjena abiotski kontroli, ne damo inokuluma. Sestavimo aparatur, preverimo nepredušnost, vklopimo mešalnike in začnemo meriti sprejem kisika v temi. Dnevno preverjamo temperaturo, mešalnik in kulometrični zapisovalnik sprejema kisika ter zapišemo vse spremembe barve vsebine steklenic. Z ustrežno metodo, na primer s šestmestnim grafičnim zapisovalnikom, ki izriše krivuljo BPK, neposredno odčitavamo sprejem kisika v šestih steklenicah. Ob koncu inkubacije, navadno 28 dni, izmerimo pH vsebine steklenic ter določimo koncentracijo ostanka preskusne snovi in kakršnega koli vmesnega produkta in, pri vodotopnih snoveh, koncentracijo DOC (Priloga II.4). Pri hlapnih snoveh moramo biti posebej previdni. Če pričakujemo nitrifikacijo, po možnosti določimo koncentracijo nitrata in nitrita.

VII.3 PODATKI IN POROČANJE

VII.3.1 Obdelava rezultatov

Količino kisika (mg), ki ga sprejme preskusna snov po določenem času, popravljeno glede na sprejem v slepem vzorcu za kontrolo inokuluma v istem času, delimo z uporabljenim maso preskusne snovi. Tako dobimo BPK, izražen v mg kisika/mg preskusne snovi, to je:

$$\text{BPK} = \frac{\text{mg sprejetega O}_2 \text{ pri preskusni snovi}}{\text{mg preskusne snovi v steklenici}} \text{ mg sprejetega O}_2 \text{ pri slepem vzorcu}$$

$$= \text{mg O}_2/\text{mg preskusne snovi}.$$

Odstotek biorazgradnje se izračuna po enačbi:

$$\% \text{ biorazgradnje} = \% \text{ TPK} = \frac{\text{BPK (mg O}_2\text{/mg snovi)}}{\text{TPK (mg O}_2\text{/mg snovi)}} \times 100$$

Pri zmesih izračunamo TPK iz elementarne analize, kakor pri enostavnih spojinah. Uporabimo ustrezni TPK (TPK_{NH4} ali TPK_{NO3}), glede na to ali nitrifikacije ni ali je popolna (Priloga II.2). Če pa pride do nitrifikacije, vendar je nepopolna, izračunamo popravek za kisik, porabljen pri nitrifikaciji, iz sprememb v koncentraciji nitrita in nitrata (Priloga V).

Odstotek primarne biorazgradnje izračunamo iz izgube specifične (izhodne) snovi (glej I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

Če je v steklenici št. 1, namenjeni merjenju fizikalno-kemijske odstranitve, prišlo do izgube preskusne snovi, to navedemo v poročilu in uporabimo koncentracijo preskusne snovi (S_b) po 28 dneh v tej steklenici za izračun odstotka biorazgradnje.

Kadar določamo DOC (neobvezno), izračunamo odstotek popolne biorazgradnje po enačbi:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100 \%$$

kakor je opisano v točki I.7.1. Če je v steklenici št. 1, namenjeni merjenju fizikalno-kemijske odstranitve, prišlo do izgube DOC, uporabimo koncentracijo DOC v tej steklenici za izračun odstotka biorazgradnje.

Vse rezultate zapišemo na priložene podatkovne liste.

VII.3.2 Veljavnost rezultatov

Sprejem kisika v slepem vzorcu z inokulumom je navadno 20-30 mg O₂/l in ne sme biti večji od 60 mg/l v 28 dneh. Pri vrednostih nad 60 mg/l je treba kritično preveriti podatke in tehniko preskušanja. Če je pH vrednost izven območja 6-8,5 in poraba kisika pri preskusni snovi pod 60 %, je treba preskus ponoviti z manjšo koncentracijo preskusne snovi.

Glej tudi I.5.2.

Če odstotek razgradnje anilina, izračunan iz porabe kisika, ne preseže 40 % po 7 dneh in 65 % po 14 dneh, se preskus šteje za neveljavnega.

VII.3.3 Poročanje

Glej I.8.

VII.4 PODATKOVNI LIST

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRESKUS MITI (I)

1. LABORATORIJ

2. DATUM ZAČETKA PRESKUSA

3. PRESKUSNA SNOV

Ime:

Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/l kot snov

Začetna koncentracija v mediju, C_0 : ... mg/l kot snov

Volumen reakcijske zmesi, V: ... ml

TPK: ... mg O_2 /l**4. INOKULUM**

Mesta vzorčenja blata:

- | | |
|--------|---------|
| 1) ... | 6) ... |
| 2) ... | 7) ... |
| 3) ... | 8) ... |
| 4) ... | 9) ... |
| 5) ... | 10) ... |

Koncentracija neraztopljenih trdnih snovi v aktivnem blatu po aklimatizaciji s sintetičnim blatom = ... mg/l

Volumen aktivnega blata na liter končnega medija = ... ml

Koncentracija blata v končnem mediju = ... mg/l

5. SPREJEM KISIKA: BIORAZGRADLJIVOST

Vrsta uporabljenega respirometra:

			Čas (dan)				
			0	7	14	21	28
Spr. O_2 (mg) preskusna snov	a_1						
	a_2						
	a_3						
Spr. O_2 (mg) slepi vzorec	B						
Popravljeni spr. O_2 (mg)	$(a_1 - b)$						
	$(a_2 - b)$						
	$(a_3 - b)$						
BPK na mg preskusne snovi	$\frac{(a - b)}{C_0 V}$	Steklenica 1					
		Steklenica 2					
		Steklenica 3					
% razgradnje $\frac{BPK}{TPK} \times 100$		1					
		2					
		3					
		srednja vrednost ⁽¹⁾					

Opomba: Za referenčno snov se lahko uporabi podobna oblika.

⁽¹⁾ Srednje vrednosti ne računamo, če je razlika med ponovitvama zelo velika.

6. ANALIZA OGLJIKA (neobvezno):

Analizator ogljika:

Steklenica	DOC				% odstranjenega DOC	Srednja vrednost
	Izmerjeni		Popravljeni			
Voda + preskusna snov	a				—	—
Blato + preskusna snov	b1		b1 - c			
Blato + preskusna snov	b2		b2 - c			
Blato + preskusna snov	b3		b3 - c			
Slepi kontrolni vzorec	c		—		—	—

$$\% \text{ odstranjenega DOC} : \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. PODATKI SPECIFIČNE KEMIČNE ANALIZE

	Količina ostanka preskusne snovi ob koncu preskusa	% razgradnje
Slepi preskus z vodo	S_b	
Inokulirani medij	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Izračunamo % razgradnje za steklenice a1, a2 in a3.

8. OPOMBE

Priložiti je treba krivuljo BPK v odvisnosti od časa, če je na voljo.

PRILOGA I

OKRAJŠAVE IN OPREDELITEV POJMOV

- DO: Raztopljeni kisik (mg/l) je koncentracija kisika, raztopljenega v vodnem vzorcu (dissolved oxygen).
- BPK: Biokemijska potreba po kisiku (g) je količina kisika, ki ga porabijo mikroorganizmi pri presnavljanju preskusne snovi; izražena tudi v g sprejetega kisika na g preskusne snovi. (Glej metodo C.5).
- KPK: Kemijska potreba po kisiku (g) je količina kisika, porabljenega pri oksidaciji preskusne snovi z vročim, kislim dikromatom; predstavlja mero količine prisotne oksidirajoče snovi; izražena tudi v g porabljenega kisika na g preskusne snovi. (Glej metodo C.6).
- DOC: Raztopljeni organski ogljik je organski ogljik, ki je prisoten v raztopini ali gre skozi 0,45-μm mikrometrski filter ali ostane v supernatantu po 15-minutnem centrifugiranju pri 40 000 m s⁻² (± 4 000 g) (dissolved organic carbon).
- TPK: Teoretična potreba po kisiku (mg) je skupna količina kisika, potrebna za popolno oksidacijo snovi; izračuna se iz molekulske formule (glej Prilogo II.2) in se izrazi tudi v mg kisika, potrebnega za mg preskusne snovi.
- TCO₂: Teoretični ogljikov dioksid (mg) je količina ogljikovega dioksida, izračunana iz znane ali izmerjene vsebnosti ogljika v preskusni snovi, ki se proizvede ob popolni mineralizaciji snovi; izražena tudi v mg ogljikovega dioksida, razvitega na mg preskusne snovi.
- TOC: Skupni organski ogljik vzorca je vsota organskega ogljika v raztopini in suspenziji (total organic carbon).
- IC: Anorganski ogljik (inorganic carbon).
- TC: Skupni ogljik je vsota organskega in anorganskega ogljika v vzorcu (total carbon).

Primarna biorazgradnja:

je sprememba kemične strukture snovi, ki jo povzroči biološko delovanje, zaradi česar snov zgubi posebne lastnosti.

Popolna biorazgradnja (aerobna):

je raven biorazgradnje, ki se doseže, ko mikroorganizmi povsem porabijo preskusno snov, pri čemer nastane ogljikov dioksid, voda, mineralne soli in nove mikrobne celične sestavine (biomasa).

Dobro biorazgradljivo:

je arbitrarna razvrstitev snovi, ki so prestale nekatere specifične presejalne preskuse za popolno biorazgradljivost; ker so ti preskusi dovolj strogi, se predpostavlja, da se bodo take snovi v vodnem okolju in aerobnih pogojih hitro in povsem biorazgradile.

Inherentno biorazgradljivo:

razvrstitev snovi, za katere obstajajo nedvoumni dokazi o biorazgradljivosti (primarni ali popolni) iz katerega koli priznanega preskusa biorazgradljivosti.

Možnost čiščenja:

je voljnost snovi za odstranitev med biološkim čiščenjem odpadnih vod, ne da bi to škodovalo normalnemu delovanju čistilnih procesov. Na splošno se dobro biorazgradljive snovi lahko čistijo, ne pa tudi vse inherentno biorazgradljive snovi. Lahko delujejo tudi abiotski procesi.

Čas prilagajanja (lag faza)

je pri preskusu upadanja čas, ki preteče od inokulacije do razgradnje najmanj 10 %. Čas prilagajanja je pogosto zelo spremenljiv in slabo obnovljiv.

Čas razgradnje

je čas od konca časa prilagajanja do trenutka, ko se doseže 90 % največje ravni razgradnje.

10-dnevno okno

je obdobje 10 dni, ki se začne takoj, ko se doseže 10-odstotna razgradnja.

PRILOGA II

IZRAČUN IN DOLOČITEV PRIMERNIH ZBIRNIH PARAMETROV

Ovisno od izbrane metode bodo potrebni nekateri zbirni parametri. V naslednjem oddelku je opisana izpeljava teh vrednosti. Uporaba teh parametrov je opisana v posameznih metodah.

1. **Vsebnost ogljika**

Vsebnost ogljika se izračuna iz znane ali z elementarno analizo določene elementarne sestave preskusne snovi.

2. **Teoretična potreba po kisiku (TPK)**

Teoretična potreba po kisiku (TPK) se lahko izračuna, če je znana ali je bila z elementarno analizo določena elementarna sestava. Za spojino:



brez nitrifikacije je

$$\text{TPK}_{\text{NH}_4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{\text{MW}} \text{ mg/mg}$$

ali z nitrifikacijo je

$$\text{TPK}_{\text{NO}_3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{\text{MW}} \text{ mg/mg}$$

3. **Kemijska potreba po kisiku (KPK)**

Kemijska potreba po kisiku (KPK) se določi po metodi C.6.

4. **Raztopljeni organski ogljik (DOC)**

Raztopljeni organski ogljik (DOC) je po opredelitvi organski ogljik katere koli snovi ali zmesi v vodi, ki gre skozi 0,45-mikrometrski filter.

Iz preskusnih posod vzamemo vzorce in jih takoj filtriramo v filtrirni napravi z uporabo ustreznega membranskega filtra. Prvih 20 ml (kadar uporabimo majhen filter, se ta količina lahko zmanjša) filtrata zavržemo. Za analizo ogljika obdržimo 10-20 ml, kadar injiciramo, lahko tudi manj (volumen odvisen od količine, potrebne za analizator ogljika). Koncentracija DOC se določi z analizatorjem organskega ogljika, ki lahko točno izmeri koncentracijo ogljika, enakovredno ali manjšo od 10 % začetne koncentracije DOC v preskusu.

Filtrirane vzorce, ki jih ne moremo analizirati isti dan, lahko konzerviramo tako, da jih shranimo v hladilniku pri temperaturi 2-4 °C za 48 h ali pod -18 °C za dlje časa.

Opombe:

Membranski filtri so pogosto impregnirani s površinsko aktivnimi snovmi, da postanejo hidrofilni. Tak filter lahko vsebuje več mg topnega organskega ogljika, ki moti določanje biorazgradljivosti. Površinsko aktivne snovi in druge topne organske spojine se s filtrov odstranijo tako, da se filtri trikrat po eno uro kuhajo v vreli deionizirani vodi. Filtri se nato lahko shranijo v vodi za en teden. Če se uporabijo filtrirni vložki za enkratno uporabo, je treba vsako serijo preveriti, ali ne sprošča topnega organskega ogljika.

Odvisno od vrste membranskega filtra se lahko nanj adsorbira preskusna snov. Zato je priporočljivo zagotoviti, da se preskusna snov ne zadrži na filtru.

Namesto filtracije se za določanje razlike med TOC in DOC uporabi 15-minutno *centrifugiranje* pri 40 000 m sec⁻² (4 000 g). Metoda ni zanesljiva pri začetni koncentraciji < 10 mg DOC/l, saj se bodisi ne odstranijo vse bakterije bodisi se ogljik kot del bakterijske plazme ponovno raztopi.

LITERATURA

- *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.
- Wagner, R., *Von Wasser*, 1976, vol. 46, 139.
- DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.*
- Gerike, P., *The biodegradability testing of poorly water soluble compounds*. *Chemosphere*, 1984, vol 13 (1), 169.

PRILOGA III

VREDNOTENJE BIORAZGRADLJIVOSTI SLABO TOPNIH SNOVI

Pri preskusih biorazgradljivosti s slabo topnimi snovmi, je treba posebno pozornost posvetiti naslednjim vidikom.

Homogene tekočine bodo redko povzročale težave pri vzorčenju, trdne materiale pa je priporočljivo homogenizirati z ustreznimi sredstvi, da se preprečijo napake zaradi nehomogenosti. Posebej previdni moramo biti, kadar potrebujemo reprezentativne vzorce nekaj miligramov zmesi snovi ali snovi z veliko vsebnostjo nečistot.

Lahko se uporabijo različni načini mešanja med preskusom. Biti moramo previdni, da mešanje ravno zadostuje za dispergiranje snovi, ne povzroči pa pregrevanja, prekomernega penjenja in prekomernih strižnih sil.

Lahko se uporabi emulgator, ki daje stabilne disperzije snovi. Ne sme biti strupen za bakterije in ne sme se biorazgraditi ali povzročiti penjenja v pogojih preskusa.

Za topila veljajo enaka merila, kakor za emulgatorje.

Ni priporočljivo uporabljati trdnih nosilcev za trdne preskusne snovi, so pa lahko primerni za oljaste snovi.

Kadar se uporabijo pomožne snovi, kot so emulgatorji, topila in nosilci, je treba izvesti preskus na slepem vzorcu, ki vsebuje pomožno snov.

Za preučevanje biorazgradljivosti slabo topnih snovi se lahko uporabi katerikoli od treh respirometričnih preskusov: CO₂, BPK, MITI.

LITERATURA

- de Morsier, A. et al., *Biodegradation tests for poorly soluble compounds*. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.
- Gerike, P., *The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds*. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

PRILOGA IV

VREDNOTENJE BIORAZGRADLJIVOSTI SNOVI, ZA KATERE SE SUMI, DA SO STRUPENE ZA INOKULUM

Kadar se na snovi opravi preskus dobre biorazgradljivosti in je videti, da snov ni biorazgradljiva, se priporoča naslednji postopek, če je treba razlikovati med inhibicijo in inertnostjo (Reynolds et al., 1987).

Za preskuse strupenosti in biorazgradljivosti je treba uporabiti podobne ali enake inokulume.

Za oceno strupenosti snovi, preučevanih v preskusih biorazgradljivosti, se zdi primerno uporabiti eno od metod inhibicije stopnje respiracije blata (preskus inhibicije respiracije aktivnega blata – Direktiva 88/302/EGS), BPK in/ali metod inhibicije rasti oziroma kombinacijo teh metod.

Če je treba preprečiti inhibicijo zaradi strupenosti, je priporočljivo pri preskušanju dobre biorazgradljivosti uporabiti koncentracije preskusne snovi, ki so manjše od 1/10 vrednosti EC₅₀ (ali manjše od vrednosti EC₂₀), dobljenih pri preskušanju strupenosti. Snovi z vrednostjo EC₅₀ nad 300 mg/l, verjetno ne bodo imele strupenega učinka pri preskušanju dobre biorazgradljivosti.

Vrednosti EC₅₀, manjše od 20 mg/l, bodo verjetno predstavljale resen problem pri nadaljnjem preskušanju. Treba je uporabiti majhne koncentracije preskusne snovi ter posledično uporabiti strog in občutljiv preskus z zaprtro steklenico ali material, označen s ¹⁴C. Po drugi strani lahko aklimatiziran inokulum omogoči uporabo večjih koncentracij preskusne snovi. Vendar se v tem drugem primeru izgubi specifično merilo preskusa dobre biorazgradljivosti.

LITERATURA

- Reynolds, L. et al., *Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability*. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

PRILOGA V

POPRAVEK SPREJEMA KISIKA ZARADI VPLIVA NITRIFIKACIJE

Napake zaradi neupoštevanja nitrifikacije pri določanju biorazgradljivosti z merjenjem sprejema kisika so pri preskusnih snoveh, ki ne vsebujejo N, zanemarljive (največ 5 %), tudi če se oksidacija amonijskega dušika kdaj pa kdaj pojavlja v preskusnih posodah in tistih s slepim vzorcem. Lahko pa nastanejo resne napake, kadar preskusna snov vsebuje N.

Če je prišlo do nitrifikacije, ki pa ni popolna, se opaženi sprejem kisika v reakcijski zmesi lahko popravi za količino kisika, porabljenega za oksidacijo amoniaka do nitrita in nitrata, če se določijo spremembe koncentracije nitrita in nitrata med inkubacijo, z upoštevanjem naslednjih enačb:



Torej:



Po enačbi (1) je količina kisika, ki jo 28 g dušika v amonijevem kloridu (NH_4Cl) porabi pri oksidaciji do nitrita, enaka 96 g, faktor je torej 3,43 (96/28). Po enačbi (3) pa je količina kisika, ki jo porabi 28 g dušika pri oksidaciji do nitrata, enaka 128 g, kar pomeni faktor 4,57 (128/28).

Ker sta reakciji *zaporedni*, saj potekata v ločenih in različnih bakterijskih vrstah, se koncentracija nitrita lahko poveča ali zmanjša; v drugem primeru se bo proizvedla ekvivalentna koncentracija nitrata. Količina kisika, porabljenega pri tvorbi nitrata, je torej 4,57 pomnoženo s povečanjem koncentracije nitrata, medtem ko je količina kisika, povezana z nastajanjem nitrita, enaka 3,43 pomnoženo s povečanjem koncentracije nitrita oziroma pri zmanjšanju koncentracije nitrita je izguba kisika enaka -3,43 pomnoženo s zmanjšanjem koncentracije.

To je:

$$\text{O}_2, \text{ porabljen pri tvorbi nitrata} = 4,57 \times \text{povečanje koncentracije nitrata} \quad (4)$$

in

$$\text{O}_2, \text{ porabljen pri tvorbi nitrita} = 3,43 \times \text{povečanje koncentracije nitrita} \quad (5)$$

in

$$\text{O}_2, \text{ izgubljen pri izginjanju nitrita} = -3,43 \times \text{zmanjšanje koncentracije nitrata} \quad (6)$$

Tako da je

$$\text{sprejem O}_2 \text{ zaradi nitrifikacije} = \pm 3,43 \times \text{sprememba konc. nitrita} + 4,57 \times \text{povečanje konc. nitrata} \quad (7)$$

in

$$\text{O}_2 \text{ sprejem zaradi oksidacije C} = \text{celotni opaženi sprejem} - \text{sprejem zaradi nitrifikacije} \quad (8)$$

Če se določi le skupni oksidirani N, se lahko za prvi približek šteje, da je sprejem kisika zaradi nitrifikacije enak $4,57 \times$ povečanje oksidiranega N.

Popravljen vrednost porabe kisika zaradi oksidacije C se primerja s TPK NH_3 , kakor se izračuna v Prilogi II.

C.5. RAZGRADNJA – BIOKEMIJSKA POTREBA PO KISIKU

1. METODA

1.1 UVOD

Namen te metode je izmeriti biokemijsko potrebo po kisiku (BPK) trdnih ali tekočih organskih snovi.

Podatki, pridobljeni s tem preskusom, se nanašajo na vodotopne snovi; lahko pa se, vsaj načeloma, preskušajo tudi hlapne snovi in tiste, slabo topne v vodi.

Ta metoda se uporablja samo za tiste organske preskusne snovi, ki ne zavirajo bakterij pri koncentraciji, uporabljeni pri preskusu. Če preskusna snov ni topna pri preskusni koncentraciji, bodo morda potrebni posebni ukrepi, kot je uporaba ultrazvočnega dispergiranja, da se doseže dobra disperzija preskusne snovi.

Podatki o strupenosti snovi so lahko uporabni za razlago nizkih rezultatov in za izbiro primernih preskusnih koncentracij.

1.2 OPREDELITEV IN ENOTE

BPK je opredeljen kot masa raztopljenega kisika, potrebna za biokemijsko oksidacijo določenega volumna raztopine snovi pod predpisanimi pogoji.

Rezultati se izrazijo v gramih BPK na gram preskusne snovi.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Zaželeno je uporaba ustrezne referenčne snovi za preverjanje aktivnosti inokuluma.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Vnaprej določena količina snovi, raztopljene ali dispergirane v dobro prezračenem primernem mediju, se inokulira z mikroorganizmi in inkubira v temi pri konstantni določeni temperaturi okolja.

BPK se določi iz razlike v vsebnosti raztopljenega kisika na začetku in na koncu preskusa. Preskus mora trajati najmanj pet dni in največ 28 dni.

Vzporedno je treba opraviti slepi preskus z vzorcem brez preskusne snovi.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Določitev BPK se ne šteje za veljavno določitev biorazgradljivosti snovi. Ta preskus se lahko upošteva le kot presejalni preskus.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

Pripravi se predhodna raztopina ali disperzija snovi, tako da se dobi koncentracija BPK, ki je združljiva z uporabljenimi metodami. Nato se določi BPK po katerikoli ustreznih nacionalni ali mednarodni standardizirani metodi.

2. PODATKI IN OCENA

BPK v predhodni raztopini se izračuna po izbrani normirani metodi in pretvori v grame BPK na gram preskusne snovi.

3. POROČANJE

Navede se uporabljena metoda.

Biokemijska potreba po kisiku mora biti srednja vrednost najmanj treh veljavnih meritev.

Poročati je treba o vseh informacijah in opombah, pomembnih za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot, agregatnega stanja, strupenih učinkov in notranje sestave snovi, ki bi lahko vplivale na rezultate.

Poročati je treba o uporabi dodatka za zaviranje biološke nitrifikacije.

4. VIRI

Seznam standardiziranih metod, na primer:

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.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. RAZGRADNJA – KEMIJSKA POTREBA PO KISIKU**1. METODA****1.1 UVOD**

Namen te metode je izmeriti kemijsko potrebo po kisiku (KPK) trdnih ali tekočih organskih snovi na standardni način, pod določenimi laboratorijskimi pogoji.

Za izvedbo tega preskusa in razlago dobljenih rezultatov bodo uporabne informacije o formuli snovi (npr. halogenidi, železove soli organskih spojin, organoklorove spojine).

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Kemijska potreba po kisiku je mera oksidacije snovi, izražena kot količina kisika ekvivalentna količini oksidacijskega reagenta, ki jo porabi snov pod določenimi laboratorijskimi pogoji.

Rezultat se izrazi v gramih KPK na gram preskusne snovi.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno umerjanje metode in za omogočanje primerjave rezultatov pri uporabi druge metode.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Vnaprej določena količina snovi, raztopljene ali dispergirane v vodi, se dve uri oksidira s kalijevim dikromatom v mediju s koncentrirano žveplovo kislino in s srebrovim sulfatom kot katalizatorjem pod povratnim hladilnikom. Ostanek dikromata se določi s titracijo s standardiziranim železo-amonijskim sulfatom.

Pri snoveh, ki vsebujejo klor, se doda živosrebrov sulfat (*) da se zmanjšanja motnja zaradi klorida.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Zaradi arbitrarnega načina določanja je KPK „indikator oksidacije“ in se kot tak uporablja kot praktični način merjenja organskih snovi.

Klorid lahko moti ta preskus; določanje KPK lahko motijo tudi anorganski reducenti ali oksidanti.

Nekatere ciklične spojine in mnoge hlapne spojine (npr. nižje maščobne kisline) se pri tem preskusu ne oksidirajo popolnoma.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

Pripravi se predhodna raztopina ali disperzija snovi, tako da se dobi KPK med 250 in 600 mg na liter.

Opombe:

Pri snoveh, ki so slabo topne ali se jih ne da dispergirati, se lahko zatehta količina fino uprašene snovi ali tekoče snovi, ki ustreza približno 5 mg KPK, in se da v preskusno aparaturo z vodo.

Pogosto, zlasti pri slabo topnih snoveh, je kemijsko potrebo po kisiku (KPK) bolj primerno določiti po različici metode, tj. v zaprtem sistemu z napravo za izravnavo tlaka (H. Kelkenberg, 1975). S to prilagojeno metodo se pogosto lahko uspešno kvantitativno določijo snovi, ki se s konvencionalno metodo le težka določijo – npr. očetna kislina. Vendar je v primeru piridina tudi ta metoda neuspešna. Če se koncentracija kalijevega dikromata, predpisana v viru (1), poveča na 0,25 N (0,0416 M), se lažje neposredno zatehta 5-10 mg snovi, kar je bistveno za določanje KPK slabo topnih snovi (vir (2)).

V drugih primerih se nato določi KPK po katerikoli ustrezni nacionalni ali mednarodni standardizirani metodi.

2. PODATKI IN OCENA

KPK v preskusni bučki se izračuna po izbrani normirani metodi in pretvori v grame KPK na gram preskusne snovi.

(*) Po uporabi, je treba raztopine, ki vsebujejo živosrebrove soli, primerno obdelati, da se prepreči sproščanje živega srebra v okolje.

3. **POROČANJE**

Treba je navesti uporabljeno referenčno metodo.

Kemijska potreba po kisiku mora biti srednja vrednost najmanj treh meritev. Poročati je treba o vseh informacijah in opombah, pomembnih za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot, agregatnega stanja in notranjih lastnosti snovi (če so znane), ki bi lahko vplivale na rezultate.

Treba je poročati o uporabi živosrebrovega sulfata za zmanjšanje motnje zaradi klorida.

4. **VIRI**

(1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Seznam standardiziranih metod, na primer:

NBN T 91-201: Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494: Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101: Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41: Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

C.7. ABIOTSKA RAZGRADNJA – HIDROLIZA KOT FUNKCIJA pH

1. **METODA**

Ta metoda temelji na smernici za preskušanje OECD (1).

1.1 **UVOD**

Hidroliza je pomembna reakcija, ki uravnava abiotsko razgradnjo. Ta reakcija je zlasti pomembna pri težko biorazgradljivih snoveh; lahko vpliva na obstojnost snovi v okolju.

Večina hidrolitskih reakcij je psevdo prvega reda in so zato razpolovne dobe neodvisne od koncentracije. To ponavadi omogoča ekstrapolacijo rezultatov, dobljenih pri laboratorijski koncentraciji, na okoljske pogoje.

Znanih je nekaj primerov (2), ki kažejo na zadovoljivo skladnost med rezultati, dobljenimi v čistih in naravnih vodah, za nekaj vrst kemikalij.

Za izvajanje tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o parnem tlaku snovi.

Ta metoda se uporablja samo za vodotopne snovi. Nečistote lahko vplivajo na rezultat.

Hidrolitsko obnašanje snovi se prouči pri pH vrednostih, ki se običajno pojavljajo v okolju (pH 4 do 9).

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Hidroliza je reakcija snovi RX z vodo. Ta reakcija se lahko prikaže z neto zamenjavo skupine X z OH:



Hitrost manjšanja koncentracije RX opisuje enačba:

$$\text{hitrost} = k [\text{H}_2\text{O}] \cdot [\text{RX}] \quad [2]$$

Ker količina vode znatno presega količino snovi, se ta vrsta reakcije običajno opiše kot reakcija psevdo prvega reda, pri kateri konstanto opazovane hitrosti določa razmerje:

$$k_{\text{obs}} = k \times [\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

Ta konstanta se lahko določi za eno pH vrednost in eno temperaturo, T, po enačbi:

$$k_{\text{obs}} \frac{2,303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

pri čemer je:

t = čas,

C_0 = koncentracija snovi ob času 0,

C_t = koncentracija snovi ob času t, in

2,303 = faktor pretvorbe med naravnim logaritmom in logaritmom z osnovo 10.

Koncentracije se izrazijo v gramih na liter ali molih na liter.

Enota konstante k_{obs} je (enota časa)⁻¹.

„Razpolovna doba“ $t_{1/2}$ je opredeljena kot čas, potreben za zmanjšanje koncentracije preskusne snovi za 50 %, to je:

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

Iz izrazov (4) in (5) se lahko izpelje:

$$t_{1/2} = 0,693/k_{\text{obs}} \quad [6]$$

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

Kot referenčne snovi so bile uporabljene naslednje snovi (1):

Acetilsalicilna kislina (aspirin)

O,O-dietil O-(6-metil-2-(1-metiletil)4-pirimidinil) ester tiofosforne kisline. (Dimpilat, Diazinon)

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Snov se raztopi v vodi v majhni koncentraciji; uravnavata se pH in temperatura.

Manjšanje koncentracije snovi s časom se sledi s katerim koli primernim analitskim postopkom.

Izdela se graf logaritma koncentracije v odvisnost od časa in, če je graf premica, se lahko iz njenega naklona izračuna konstanta hitrosti reakcije prvega reda (glej točko 2).

Če neposredna določitev konstante hitrosti za posamezno temperaturo ni izvedljiva, je konstanto običajno mogoče oceniti z uporabo Arrheniusovega razmerja, ki določa odvisnost konstante hitrosti od temperature. Iz linearnega grafa logaritma konstante hitrosti, določene pri ustrezni temperaturi, kot funkcije recipročne vrednosti absolutne temperature, K , je mogoče ekstrapolirati vrednost konstante hitrosti, ki je ni bilo mogoče določiti neposredno.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

V viru (2) je navedeno, da so lahko meritve konstante hitrosti hidrolize pri 13 skupinah organskih struktur zelo natančne.

Ponovljivost je odvisna zlasti od nadzorovanja pH vrednosti in temperature, nanjo pa lahko vpliva prisotnost mikroorganizmov in v posebnih primerih koncentracija raztopljenega kisika.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 Reagenti

1.6.1.1 Pufrske raztopine

Preskus se izvede pri treh vrednostih pH: 4,0, 7,0 in 9,0.

V ta namen se pripravijo pufrske raztopine iz analitsko čistih reagentov in destilirane ali deionizirane sterilne vode. Nekateri primeri pufrskih sistemov so predstavljeni v dodatku.

Uporabljeni pufrski sistem lahko vpliva na hitrost hidrolize; če obstajajo dokazi o tem, je treba uporabiti drug pufrski sistem. V viru (2) se priporoča uporaba boratnih ali acetatnih pufov namesto fosfatnih.

Če pH vrednost pufrskih raztopin pri temperaturi preskusa ni znana, se lahko določi z umerjenim pH-metrom pri izbrani temperaturi z na $\pm 0,1$ pH-enot natančno.

1.6.1.2 Preskusne raztopine

Preskusna snov se raztopi v izbranem pufru, pri čemer njena koncentracija ne sme preseči 0,01 M oziroma polovice koncentracije nasičenosti, katera koli je manjša.

Uporaba organskih topil, ki se mešajo z vodo, se priporoča samo za snovi, ki so slabo topne v vodi.

Količina topila mora biti manjša od 1 % in ne sme ovirati hidrolize.

1.6.2 **Aparatura**

Uporabijo se steklene bučke, zaprte z zamaškom, vendar je treba preprečiti zamastitev obrusa.

Če je snov ali pufrski sistem hlapen ali če se preskus izvaja pri visokih temperaturah, je bolje uporabiti hermetično ali s tesnilom zaprte epruvete in zagotoviti, da v epruveti ni praznega prostora.

1.6.3 **Analitska metoda**

Metoda mora biti specifična, da omogoči določitev preskusne snovi pri koncentracijah preskusne raztopine, in je lahko sestavljena iz kombinacije primernih analitskih tehnik.

Uporabljena analitska metoda je odvisna od lastnosti snovi in mora biti dovolj natančna in občutljiva, da zazna 10 % zmanjšanje začetne koncentracije.

1.6.4 **Preskusni pogoji**

Preskusi se izvedejo z uporabo termostatisanega zaprtega prostora ali kopeli s konstantno temperaturo nastavljeno na $\pm 0,5$ °C izbrane temperature. Temperatura se vzdržuje in meri na $\pm 0,1$ °C natančno. Z ustreznimi sredstvi se prepreči fotolitske motnje.

Pri snoveh, ki se lahko oksidirajo, bo treba odstraniti raztopljeni kisik (npr. s pet minutnim vpihavanjem dušika ali argona pred pripravo raztopine).

1.6.5 **Preskusni postopek**

1.6.5.1 *Predhodni preskus*

Pri vseh snoveh je treba izvesti predhodni preskus pri $50 \pm 0,5$ °C pri treh pH vrednostih: 4,0, 7,0 in 9,0. Izvede se zadostno število meritev, da se lahko oceni, če je, za vsako pH vrednost in pri 50 °C, razpolovna doba ($t_{1/2}$) krajša od 2,4 ure ali če se po petih dneh opazi manj kot 10 % hidrolize. (Lahko se oceni, da ti vrednosti ustrežata razpolovnim dobam krajšim od enega dne oziroma daljšim od enega leta pri pogojih, ki so bolj značilni za okolje (25 °C)).

Če predhodni preskus pokaže, da se je hidroliziralo 50 % snovi ali več v 2,4 ure pri 50 °C ali pa manj kot 10 % po petih dneh pri vsaki od treh pH vrednosti (4, 7 in 9), nadaljnje preskušanje ni potrebno.

V drugih primerih in za posamezne pH vrednosti, pri katerih ta pogoj ni bil izpolnjen, se izvede preskus 1.

1.6.5.2 *Preskus 1*

Preskus 1 se izvede pri eni temperaturi; najbolje pri $50 \pm 0,5$ °C, po možnosti v sterilnih pogojih pri tistih pH vrednostih, za katere je predhodni preskus pokazal, da je potrebno nadaljnje preskušanje.

Izbere se zadostno število vzorcev (ne manj kot štiri), da se zajame območje od 20 do 70 % hidrolize za preskušanje obnašanja psevdoprvega reda pri navedenih pH vrednostih.

Za vsako pH vrednost, pri kateri se izvede preskus 1, se določi red reakcije.

Ocena konstante hitrosti pri 25 °C:

Odločitev o nadaljnjem postopku preskusa je odvisna od tega, ali se iz preskusa 1 lahko sklepa, da je reakcija psevdo prvega reda ali ne.

Če iz preskusa 1 ni mogoče z gotovostjo sklepati, da je reakcija psevdo prvega reda, se nadaljnji preskusi izvedejo tako, kakor je opisano v preskusu 2.

Če je iz preskusa 1 mogoče z gotovostjo sklepati, da je reakcija psevdo prvega reda, se nadaljnji preskusi izvedejo tako, kakor je opisano v preskusu 3. (V posebnih okoliščinah, je konstante hitrosti pri 25 °C mogoče izračunati iz konstant pri 50 °C, iz rezultatov, dobljenih pri preskusu 1 (glej 3.2)).

1.6.5.3 Preskus 2

Ta preskus se izvede pri vsaki pH vrednosti, za katero so rezultati preskusa 1 pokazali, da je to potrebno:

- bodisi pri eni temperaturi, nižji od 40 °C,
- bodisi pri dveh temperaturah nad 50 °C, med katerima je najmanj 10 °C razlike.

Za vsako pH vrednost in temperaturo, pri kateri se izvaja preskus 2, se izbere najmanj šest podatkovnih točk v ustreznih razmakih, tako da so stopnje hidrolize v območju od 20 do 70 %.

Za eno pH vrednost in za eno temperaturo se izvedeta dve vzporedni meritvi. Kadar se preskus 2 izvaja pri dveh temperaturah nad 50 °C, je ponovitev bolje izvesti pri nižji od obeh temperatur.

Za vsako pH vrednost in temperaturo, pri kateri se izvede preskus 2, se priloži grafična ocena razpolovne dobe ($t_{1/2}$), če je to možno.

1.6.5.4 Preskus 3

Ta preskus se izvede pri vsaki pH vrednosti, za katero so rezultati preskusa 1 pokazali, da je to potrebno.

- bodisi pri eni temperaturi, nižji od 40 °C,
- bodisi pri dveh temperaturah nad 50 °C, med katerima je najmanj 10 °C razlike.

Za vsako pH vrednost in temperaturo, pri kateri se izvaja preskus 3, se izberejo tri podatkovne točke, prva ob času 0, drugo in tretjo pa, ko je stopnja hidrolize večja od 30 %; treba je izračunati konstanto k_{obs} in $t_{1/2}$.

2. PODATKI

Pri reakcijah psevdo prvega reda se vrednosti k_{obs} za vsako pH vrednost in vsako temperaturo preskusa lahko določijo iz grafa logaritmov koncentracije v odvisnosti od časa, po enačbi:

$$k_{\text{obs}} = - \text{naklon} \times 2,303 \quad [7]$$

$t_{1/2}$ se lahko izračuna tudi po enačbi [6].

Kadar je to primerno, ocenimo $k_{25\text{ }^{\circ}\text{C}}$ z uporabo Arrheniusove enačbe.

Za reakcije, ki niso psevdo prvega reda, glej 3.1.

3. **POROČILO**

3.1 POROČANJE

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

- specifikacija snovi;
- vsi rezultati, dobljeni z referenčnimi snovmi;
- princip in podrobnosti uporabljene analitske metode;
- za vsak preskus: temperatura, pH vrednost, sestava pufru in tabela vseh podatkovnih točk koncentracija/čas;
- pri reakciji psevdo prvega reda, vrednosti k_{obs} , $t_{1/2}$ in računski postopek;
- pri reakciji, ki ni psevdo prvega reda, se izdela graf logaritma koncentracije v odvisnosti od časa;
- vse informacije in ugotovitve, potrebne za razlago rezultatov.

3.2 RAZLAGA REZULTATOV

Sprejemljive vrednosti konstante hitrosti (pri 25 °C) preskusne snovi je mogoče izračunati, če že obstajajo preskusne vrednosti aktivacijske energije za homologe preskusne snovi in če se lahko logično domneva, da je aktivacijska energija preskusne snovi v istem redu velikosti.

4. **VIRI**

- (1) OECD, Pariz, 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) W. Mabey and T. Mill, 'Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions,' J. Phys. Chem. Ref. Data, 1978, vol. 7 (2), 383-415.

*Dodatek***PUFRSKE ZMESI**A. **CLARK IN LUBS**

Vrednosti pH, prikazane v tej tabeli, so bile izračunane iz meritev potenciala z uporabo Sörensenovih standardnih enačb. Dejanske pH vrednosti so za 0,04 enote večje od vrednosti v tabeli.

Sestava	pH
0,1 M kalijev hidrogen ftalat + 0,1 N HCl pri 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalata do 100 ml	3,8
0,1 M kalijev hidrogen ftalat + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalata do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalata do 100 ml	4,2
0,1 M monokalijev fosfat + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	7,2

0,1 M H_3BO_3 v 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH pri 20 °C

16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml 8,8

21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml 9,0

26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml 92

B. KOLTHOFF IN VLEESHOUWER

Sestava pH

0,1 M monokalijev citrat in 0,1 N NaOH pri 18 °C (dodamo majhne kristale timola, da preprečimo plesnenje)

2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml 3,8

9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml 4,0

16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml 4,2

C. SÖRENSEN

0,05 M boraks + 0,1 N HCl

Sestava		pH			
ml boraksa	ml HCl	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M boraks + 0,1 N NaOH

Sestava		pH			
ml boraksa	ml NaOH	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12