

31992L0069

29.12.1992

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 383/113

DYREKTYWA KOMISJI nr 92/69/EWG**z dnia 31 lipca 1992 r.****dostosowująca po raz siedemnasty do postępu technicznego dyrektywę 67/548/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji i etykietowania substancji niebezpiecznych**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady 67/548/EWG, z dnia 27 czerwca 1967 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych ⁽¹⁾, ostatnio zmienioną dyrektywą 92/32/EWG ⁽²⁾, w szczególności jej art. 28 i 29,

a także mając na uwadze, co następuje:

artykuł 3 ust. 1 dyrektywy 67/548/EWG i art. 3 dyrektywy Rady 88/379/EWG z dnia 7 czerwca 1988 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych Państw Członkowskich odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania preparatów niebezpiecznych ⁽³⁾, ostatnio zmienionej dyrektywą Komisji 90/492/EWG ⁽⁴⁾, przewidują, że określanie właściwości fizykochemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów jest wykonywane według metod przewidzianych w załączniku V do dyrektywy 67/548/EWG;

tekst załącznika V do dyrektywy 67/548/EWG jest obecnie opublikowany w dwóch częściach, które są odpowiednio Załącznikiem do dyrektywy Komisji 84/449/EWG ⁽⁵⁾ i Załącznikiem do dyrektywy Komisji 88/302/EWG ⁽⁶⁾;

w celu uwzględniania postępu technicznego, konieczna jest zmiana metod prób znajdujących się w Załączniku do dyrektywy Komisji 84/449/EWG;

w celu uwzględniania rozwoju technicznego, konieczna jest także zmiana metody przewidzianej dla próby blokady wzrostu alg, znajdującej się obecnie w Załączniku do dyrektywy Komisji 88/302/EWG a przy tej okazji, przeniesienie tej metody próby do Załącznika do dyrektywy 84/449/EWG;

właściwe jest zmniejszenie do minimum liczby zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych, zgodnie z dyrektywą Rady 86/609/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych Państw Członkowskich dotyczących ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych ⁽⁷⁾;

przepisy niniejszej dyrektywy są zgodne z opinią Komitetu ds. Dostosowania do Postępu Technicznego Dyrektyw Dotyczących Usunięcia Barrier Technicznych w Handlu Substancjami i Preparatami Niebezpiecznymi,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

⁽¹⁾ Dz.U. 196 z 16.8.1967, str. 1.⁽²⁾ Dz.U. L 154 z 5.6.1992, str. 1.⁽³⁾ Dz.U. L 187 z 16.7.1988, str. 14.⁽⁴⁾ Dz.U. L 275 z 5.10.1990, str. 35.⁽⁵⁾ Dz.U. L 251 z 19.9.1984, str. 1.⁽⁶⁾ Dz.U. L 133 z 30.5.1988, str. 1; oraz Dz.U. L 136 z 2.6.1988, str. 20.

Załącznik do dyrektywy 84/449/EWG zostaje zastąpiony Załącznikiem do niniejszej dyrektywy.

⁽⁷⁾ Dz.U. L 358 z 18.12.1986, str. 1.

Artykuł 2

Metodę dla próby blokady wzrostu alg, wymienioną w Załączniku do dyrektywy 88/302/EWG uchyla się.

Artykuł 3

Państwa Członkowskie wprowadzą w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy najpóźniej do dnia 30 października 1993 r. i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

Przepisy przyjęte przez Państwa Członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji.

Metody dokonywania takiego odniesienia określone są przez Państwa Członkowskie.

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 31 lipca 1992 r.

W imieniu Komisji

Karel VAN MIERT

Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK

Załącznik do dyrektywy Komisji 92/69/EWG z dnia 31 lipca 1992 r. dostosowującej po raz siedemnasty do postępu technicznego dyrektywę Rady 67/548/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Dz.U. L 383 z 29.12.1992, str. 113.

SPIS TREŚCI
WPROWADZENIE

CZĘŚĆ A:	METODY USTALANIA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNYCH.....	262
A.1.	Temperatura topnienia/krzepnięcia.....	262
A.2.	Temperatura wrzenia.....	272
A.3.	Gęstość względna.....	278
A.4.	Prężność pary.....	283
A.5.	Napięcie powierzchniowe.....	304
A.6.	Rozpuszczalność w wodzie.....	311
A.8.	Współczynnik podziału.....	320
A.9.	Temperatura zapłonu.....	331
A.10.	Zapalność (ciała stałe).....	333
A.11.	Zapalność (gazy).....	336
A.12.	Zapalność (w kontakcie z wodą).....	338
A.13.	Właściwości piroforyczne ciał stałych i cieczy.....	342
A.14.	Właściwości wybuchowe.....	344
A.15.	Temperatura samozapłonu (ciecze i gazy).....	355
A.16.	Względna temperatura samozapłonu dla ciał stałych.....	356
A.17.	Właściwości utleniające (ciała stałe).....	359
CZĘŚĆ B:	METODY USTALANIA TOKSYCZNOŚCI.....	364
	Ogólne wprowadzenie.....	364
B.1.	Toksyczność ostra (doustna).....	367
B.1 bis	Toksyczność ostra (doustna) – Metoda ustalonej dawki.....	370
B.2.	Toksyczność ostra (inhalacyjna).....	374
B.3.	Toksyczność ostra (dermalna).....	378
B.4.	Toksyczność ostra (drażniąca skórę).....	381
B.5.	Toksyczność ostra (drażniąca oczy).....	384
B.6.	Działanie uczulające na skórę.....	388
B.7.	Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (doustna).....	393
B.8.	Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (inhalacyjna).....	397
B.9.	Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (dermalna).....	401
B.10.	Mutagenność (badanie cytogenetyczne <i>in vitro</i> u ssaków).....	405
B.11.	Mutagenność (badanie cytogenetyczne szpiku kostnego <i>in vivo</i> u ssaków, analiza chromosomalna).....	408
B.12.	Mutagenność (badanie mikrojądrowe).....	411
B.13.	Mutagenność (<i>Escherichia coli</i> – oznaczanie mutacji wstecznej).....	414
B. 14.	Mutagenność (<i>Salmonella typhimurium</i> – oznaczanie mutacji wstecznej).....	417

CZĘŚĆ C:	METODY USTALANIA EKOTOKSYCZNOŚCI.....	420
C.1.	Toksyczność ostra dla ryb.....	420
C.2.	Toksyczność ostra dla rozwielitki.....	429
C.3.	Badanie inhibicji glonów.....	436
C.4.	Oznaczanie biodegradowalności.....	444
	C.4-A: Rozpuszczalny węgiel organiczny (DOC) metoda „die-away”.....	453
	C.4-B: Zmodyfikowane badanie przesiewowe OECD.....	457
	C.4-C: Wydzielanie ditlenku węgla (CO ₂).....	462
	C.4-D: Respirometria manometryczna.....	466
	C.4-E: Metoda „zamkniętej butli”.....	468
	C.4-F: M.I.T.I. (Ministerstwo Handlu Międzynarodowego I Przemysłu – Japonia).....	473
	Załączniki.....	478
C.5.	Degradacja – zapotrzebowanie biochemiczne na tlen.....	483
C.6.	Degradacja – zapotrzebowanie chemiczne na tlen.....	484
C.7.	Degradacja – degradacja abiotyczna: hydroliza jako funkcja pH.....	486

WPROWADZENIE

Niniejszy Załącznik ustanawia metody badania służące do oznaczania właściwości fizyko-chemicznych, toksykologicznych i ekotoksykologicznych, wymienionych w załącznikach VII i VIII do dyrektywy 79/831/EWG. Metody te opierają się na metodach uznanych i zalecanych przez właściwe organy międzynarodowe (w szczególności OECD).

W przypadku gdy takie metody nie były dostępne, przyjęto normy krajowe lub metody ustalone na podstawie uzgodnień naukowych. Ogólnie, badania powinny być wykonywane z substancjami określonymi zgodnie z dyrektywą. Należy zwracać uwagę na możliwy wpływ zanieczyszczeń na wyniki badań.

W przypadku gdy metody podane w niniejszym Załączniku nie mają zastosowania do badania niektórych właściwości, podmiot zgłaszający musi uzasadnić stosowane metody alternatywne.

Analizy i badania na zwierzętach są prowadzone zgodnie z przepisami krajowymi i biorą pod uwagę zasady humanitarne i osiągnięcia międzynarodowe w dziedzinie ochrony zwierząt.

Śród równoważnych metod badań należy wybrać metodę, która wymaga wykorzystania jak najmniejszej liczby zwierząt.

CZĘŚĆ A: METODY USTALANIA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNYCH**A.1. TEMPERATURA TOPNIENIA/KRZEPNIĘCIA****1. METODA**

Większość opisanych metod oparto na wytycznych OECD dotyczących badań (1). Podstawowe zasady podano w (2) i (3).

1.1. WPROWADZENIE

Opisane metody i urządzenia powinny być stosowane do ustalania temperatury topnienia substancji, bez ograniczeń związanych z ich stopniem czystości.

Wybór metody zależy od charakteru badanej substancji. W konsekwencji, czynnikiem ograniczającym będzie to, czy substancja łatwo, z trudnością, czy też wcale nie poddaje się sproszkowaniu.

W przypadku niektórych substancji bardziej właściwe jest oznaczanie temperatury zamarzania lub krzepnięcia, przy czym w wytycznych uwzględniono także normy dla tych oznaczeń.

Jeżeli z powodu szczególnych właściwości substancji żaden z powyższych parametrów nie może być zmierzony w sposób konwencjonalny, może być stosowne określenie temperatury płynięcia.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Temperaturę topnienia definiuje się jako temperaturę, w której przejście fazowe ze stanu stałego do stanu ciekłego zachodzi pod ciśnieniem atmosferycznym i niniejsza temperatura idealnie odpowiada temperaturze krzepnięcia.

Ponieważ przechodzenie z jednego stanu skupienia do drugiego w przypadku wielu substancji zachodzi w szerokim zakresie temperatury, często opisuje się go jako zakres temperatury topnienia.

Jednostki konwersji (ze stopni K na °C)

$$t = T - 273,15$$

t: temperatura Celsjusza, stopień Celsjusza (°C)

T: temperatura termodynamiczna, stopień Kelwina (K)

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

Niektóre substancje kalibracyjne wymieniono w pozycji bibliograficznej (4).

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Temperatura (zakres temperatur) przejścia fazowego ze stanu stałego do stanu ciekłego lub ze stanu ciekłego w stan stały jest ustalona. W praktyce podczas podgrzewania/schładzania próbki substancji badanej pod ciśnieniem atmosferycznym ustalane są temperatury etapu początkowego topnienia/krzepnięcia i końcowego etapu topnienia/krzepnięcia. Opisano pięć rodzajów metod, mianowicie metodę kapilarną, metody ze stolikami grzewczymi, ustalanie temperatur krzepnięcia, metody analiz termicznych, i ustalanie temperatury płynięcia (według rozwiniętych opracowań dla olejów naftowych).

W niektórych przypadkach, wygodniejsze jest zmierzenie temperatury krzepnięcia, w miejsce temperatury topnienia.

1.4.1. **Metoda kapilarna**

1.4.1.1. *Przyrządy do oznaczania temperatury topnienia z łąnią cieczową*

Niewielką ilość drobno zmielonej substancji umieszcza się w rurce kapilarnej i ciasno upakuje. Rurkę podgrzewa się łącznie z termometrem, regulując wzrost temperatury w ten sposób, aby wynosił mniej niż 1 K/min w trakcie topnienia. Oznacza się początkową i końcową temperaturę topnienia.

1.4.1.2. *Przyrządy do oznaczania temperatury topnienia z blokiem metalu*

Zgodnie z opisem w ppkt. 1.4.1.1, z tym że rurka kapilarna i termometr są umieszczone w podgrzewanym bloku metalu, przy czym można je obserwować przez znajdujące się w nim otwory.

1.4.1.3. *Wykrywanie przy pomocy komórki fotoelektrycznej*

Próbka w rurce kapilarnej jest automatycznie podgrzewana w cylindrze metalowym. Wiązka światła jest automatycznie kierowana przez substancję, poprzez dziurę w cylindrze, do precyzyjnie skalibrowanej komórki fotoelektrycznej. Właściwości optyczne większości substancji zmieniają się z nieprzezroczystych na przezroczyste podczas topnienia. Natężenie światła docierającego do komórki fotoelektrycznej zwiększa się, w wyniku czego wysyłany jest sygnał zatrzymania do cyfrowego wskaźnika odczytującego temperaturę z platynowego termometru oporowego umieszczonego w komorze grzejnej. Metoda ta nie ma zastosowania do niektórych intensywnie zabarwionych substancji.

1.4.2. **Płyty grzewcze**

1.4.2.1. *Płyta grzewcza Koflera*

W metodzie płyty grzewczej Koflera wykorzystuje się dwa kawałki metalu o różnym przewodnictwie cieplnym, podgrzewane elektrycznie, przy czym stolik jest zaprojektowany w taki sposób, aby gradient temperatury był prawie liniowy wzdłuż jego długości. Temperatura rozgrzanej płyty może dochodzić od 283 do 573 K, przy czym odczytywana jest ona przy pomocy specjalnego urządzenia do odczytywania temperatury, składającego się z suwaka ze wskaźnikiem i kłapki przeznaczonej dla odpowiedniego stolika. W celu ustalenia temperatury topnienia, substancję umieszcza się cienką warstwą bezpośrednio na powierzchni gorącej płyty. W ciągu kilku sekund pokazuje się ostra linia oddzielająca ciecz od fazy stałej. Temperaturę na wysokości linii dzielącej odczytuje się przez ustawienie wskaźnika w taki sposób, aby spoczywał na tej linii.

1.4.2.2. *Mikroskop do badania topnienia*

Szeręg mikroskopowych płyt grzewczych wykorzystuje się do ustalania temperatury przy użyciu bardzo małych ilości materiału. W większości płyt grzewczych temperaturę mierzy się przy pomocy czułego termoogniwa, jednak czasem wykorzystywane są także termometry rtęciowe. Typowy przyrząd mikroskopowy do oznaczania temperatury topnienia metodą podgrzewania płyty jest wyposażony w komorę grzewczą, która zawiera płytkę metalową, na której umieszczana jest próbka na szkiełku. W środku płytki metalowej znajduje się otwór, przez który wchodzi światło z lusterka oświetlającego mikroskopu. W trakcie użycia, komora jest zamknięta przez szklaną płytę w celu odcięcia powietrza od obszaru próbki.

Podgrzewanie próbki jest regulowane za pomocą reostatu. Dla bardzo precyzyjnych pomiarów dla substancji optycznie anizotropowych, stosuje się światło spolaryzowane.

1.4.2.3. *Metoda menisku*

Metodę tę wykorzystuje się głównie w odniesieniu do poliamidów.

W sposób wizualny oznacza się temperaturę, przy której zachodzi przemieszczenie menisku oleju silikonowego, zawartego między płytą grzewczą i szklaną przykrywką opartą na próbce badanego poliamidu.

1.4.3. **Metoda oznaczania temperatury krzepnięcia**

Próbkę umieszcza się w specjalnej probówce i umieszcza w przyrządzie dla oznaczania temperatury krzepnięcia. Próbka jest delikatnie i ciągle mieszana w trakcie chłodzenia, a temperatura jest mierzona w odpowiednich przedziałach. Gdy tylko temperatura pozostaje na stałym poziomie podczas kilku kolejnych odczytów (skorygowanych o błąd termometru), zapisuje się ją jako temperaturę krzepnięcia.

Należy zapobiegać szybkiemu schładzaniu przez utrzymywanie równowagi między fazą stałą i fazą ciekłą.

1.4.4. Analiza termiczna

1.4.4.1 Różnicowa analiza termiczna (DTA)

Niniejsza technika rejestruje różnicę w temperaturach między daną substancją i materiałem odniesienia w funkcji temperatury, w trakcie poddawania danej substancji i materiału odniesienia temu samemu programowi kontrolowania temperatury. W momencie gdy próbka ulega przemianom pociągającej zmianę entalpii, zmiana ta jest wskazywana przez odchylenie endotermiczne (topnienie) lub egzotermiczne (krzepnięcie) od linii bazowej zapisu temperatury.

1.4.4.2 Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Niniejsza technika rejestruje różnicę w energii pobranej przez daną substancję i materiał odniesienia, w funkcji temperatury, w trakcie poddawania danej substancji i materiału odniesienia temu samemu programowi kontrolowania temperatury. Niniejsza energia jest energią konieczną do osiągnięcia zerowej różnicy temperatury między daną substancją a materiałem odniesienia. W momencie, gdy próbka ulega przemianom pociągającej zmianę entalpii, zmiana ta jest wskazywana przez odchylenie endotermiczne (topnienie) lub egzotermiczne (krzepnięcie) od linii bazowej zapisu przepływu ciepła.

1.4.5. Temperatura płynięcia

Niniejsza metoda została opracowana dla olejów naftowych i jest właściwa do zastosowania dla substancji olejowych o niskich temperaturach topnienia.

Po ogrzaniu wstępnym, próbka jest chłodzona z właściwą szybkością i badane są w odstępach co 3 K charakterystyki przepływu. Najniższa temperatura, przy której jest obserwowany ruch substancji jest odczytywana jako temperatura płynięcia.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Stosowalność i dokładność różnych metod wykorzystywanych do oznaczania temperatury topnienia/zakres temperatur topnienia przedstawiono w poniższej tabeli:

TABELA: STOSOWALNOŚĆ METOD

A. Metody kapilarne

Metoda pomiaru	Substancje łatwo proszkowalne	Substancje trudno proszkowalne	Zakres temperatury	Założona dokładność ⁽¹⁾	Istniejąca norma
Przyrządy do pomiaru temperatury topnienia z łąznią cieczo- wą	tak	Tylko niektóre	273 do 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Przyrządy do pomiaru temperatury topnienia z blokiem metalu	tak	Tylko niektóre	293 do >573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Wykrywanie przy pomocy komórki fotoelektrycznej	tak	Poszczególne z zastosowaniem urządzeń	253 do 573 K	± 0,5 K	
⁽¹⁾ W zależności od typu przyrządu i stopnia czystości substancji.					

B. Metody temperaturowe i schładzania

Metoda pomiaru	Substancje łatwo proszkowalne	Substancje trudno proszkowalne	Zakres temperatury	Założona dokładność ⁽¹⁾	Istniejąca norma
Płyta grzewcza Koflera	tak	nie	283 do >573K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Mikroskop do badania topnienia	tak	Tylko niektóre	273 do >573K	± 0,5 K	DIN 53736
Metoda menisku	Nie	Specyficzna dla poliamidów	293 do >573K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Metody badania temperatur krzepnięcia	Tak	tak	223 do 573 K	± 0,5 K	np. BS 4695
⁽¹⁾ W zależności od typu przyrządu i stopnia czystości substancji.					

C. Analizy termiczne

Metoda pomiaru	Substancje łatwo proszkowalne	Substancje trudno proszkowalne	Zakres temperatury	Założona dokładność ⁽¹⁾	Istniejąca norma
Różnicowa analiza termiczna	tak	tak	173 do 1273K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Różnicowa kalorymetria skaningowa	tak	tak	173 do 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
⁽¹⁾ W zależności od typu przyrządu i stopnia czystości substancji.					

D. Temperatura płynięcia

Metoda pomiaru	Substancje łatwo proszkowalne	Substancje trudno proszkowalne	Zakres temperatury	Założona dokładność ⁽¹⁾	Istniejąca norma
Temperatura płynięcia	Dla olejów naftowych i substancji oleistych	Dla olejów naftowych i substancji oleistych	223 do 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66
⁽¹⁾ W zależności od typu przyrządu i stopnia czystości substancji.					

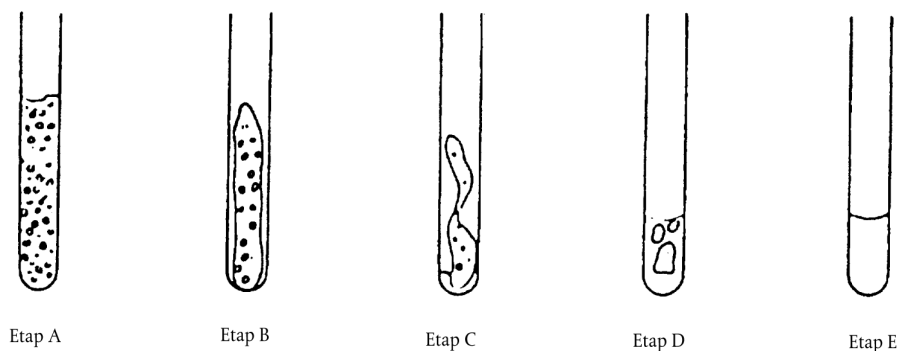
1.6. OPIS METOD

Procedury przeprowadzenia oznaczeń według prawie wszystkich metod opisano w normach międzynarodowych i krajowych (patrz: dodatek 1).

1.6.1. Metody z wykorzystaniem rurki kapilarnej

Drobno sproszkowane substancje poddawane powolnemu wzrostowi temperatury, zwykle wykazują etapy topnienia przedstawione na rys. 1.

Rysunek 1



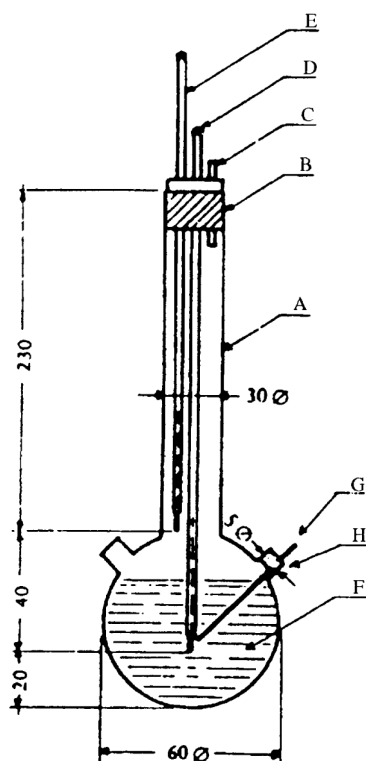
- Etap A (Początek topnienia): drobne kropelki przylegają jednorodnie do wewnętrznej ściany rurki kapilarnej.
- Etap B pokazuje się przerwa między próbką i ścianą wewnętrzną ze względu na kurczenie się topionej substancji.
- Etap C skurczona próbka zaczyna zapadać się w dół i upłynnia się.
- Etap D na powierzchni tworzy się pełny menisk, jednak dostrzegalna ilość próbki pozostaje w stanie stałym.
- Etap E (Końcowy etap topnienia): brak cząstek stałych.

W trakcie ustalania temperatury topnienia odnotowuje się temperatury na początku topnienia i na etapie końcowym.

1.6.1.1. Przyrząd do badania temperatury topnienia z łaźnią cieczową

Na rysunku 2 przedstawiono rodzaj znormalizowanego przyrządu do badania temperatury topnienia wykonanego ze szkła (JIS K 0064); wszystkie wymiary podano w milimetrach.

Rysunek 2



- A: Naczynie pomiarowe
 B: Korek
 C: Odpowietrzenie
 D: Termometr
 E: Termometr pomocniczy
 F: Łaźnia cieczowa
 G: Rurka kapilarna szklana, długości 80 do 100 mm, średnicy wewnętrznej $1,0 \pm 0,2$ mm, grubość ścianki 0,2 do 0,3 mm
 H: Rurka boczna

Łaźnia cieczowa:

Należy wybrać odpowiednią ciecz. Wybór cieczy zależy od temperatury topnienia, która ma być oznaczona, na przykład ciekła parafina dla temperatur topnienia nie wyższych od 473 K, olej silikonowy dla temperatur topnienia nie wyższych niż 573 K.

Dla temperatur topnienia powyżej 523 K, można wykorzystać mieszaninę składającą się z trzech części kwasu siarkowego i dwóch części siarczanu potasu (wagowo). Należy podjąć stosowne środki ostrożności przy stosowaniu mieszaniny takiej jak niniejsza.

Termometr:

Należy używać wyłącznie termometrów spełniających wymagania następujących norm lub norm równoważnych:

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

Procedura:

Suchą substancję należy drobno sproszkować w moździerzu i wprowadzić do rurki kapilarnej zatopionej na końcu, tak aby poziom napęnienia wynosił około 3 mm po ciasnym upakowaniu. Aby uzyskać jednolicie upakowaną próbkę, należy spuścić rurkę kapilarną z wysokości około 700 mm przez rurkę szklaną, pionowo na szkiełko zegarkowe.

Napełnioną rurkę kapilarną umieszcza się w łaźni tak, by środkowa część rtęciowej bańki termometru stykała się z rurką kapilarną w części, w której umieszczona jest próbka. Zwykle rurkę kapilarną wprowadza się do przyrządu o temperaturze o około 10 K niższej od temperatury topnienia.

Ciecz łaźni jest podgrzewana w ten sposób, aby temperatura rosła o około 3 K/min. Ciecz należy mieszać. Przy około 10 K poniżej oczekiwanej temperatury topnienia, szybkość przyrostu temperatury ustawia się na maksimum 1 K/min.

Obliczenie:

Temperaturę topnienia oblicza się na podstawie następującego wzoru:

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

gdzie:

T = skorygowana temperatura topnienia w stopniach K

T_D = odczyt temperatury z termometru D w stopniach K

T_E = odczyt temperatury z termometru E w stopniach K

n = liczba kresek podziałki słupka rtęci na termometrze D przy rurce wyjściowej.

1.6.1.2. Przyrządy do pomiaru temperatury topnienia z metalowym blokiem

Przyrząd:

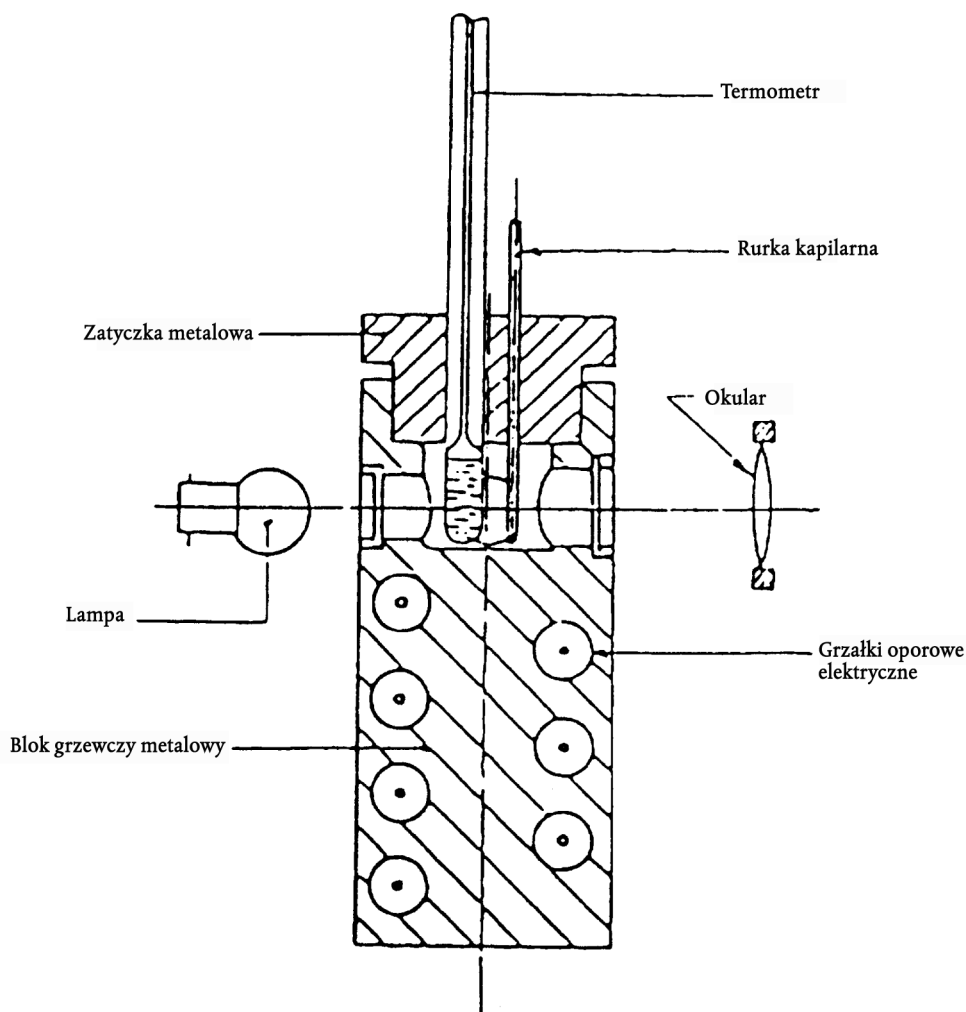
Składa się z:

- cylindrycznego bloku metalowego, którego górna część jest wydrążona i tworzy komorę (patrz: rysunek 3),
- zatyczki metalowej z dwiema lub większą liczbą dziur, która pozwala na montowanie próbek na bloku metalowym,
- systemu grzejnego do podgrzewania bloku metalowego, wyposażonego na przykład w grzałki oporowe elektryczne zamknięte w bloku,
- do regulacji zasilania, jeżeli stosowane jest podgrzewanie elektryczne,
- czterech okienek ze szkła żaroodpornego na poprzecznych ścianach komory, zorientowanych pod kątem prostym względem siebie. Przed każdym z okienek zamontowany jest okular do obserwacji rurki kapilarnej. Pozostałe trzy okienka są wykorzystywane do oświetlania wnętrza zamknięcia przy pomocy lamp,
- rurki kapilarnej ze szkła żaroodpornego, zamkniętej na jednym końcu (patrz: ppkt 1.6.1.1).

Termometr:

Patrz normy wspomniane w ppkt. 1.6.1.1. Stosuje się także termoelektryczne przyrządy pomiarowe o porównywalnej dokładności.

Rysunek 3



1.6.1.3. Wykrywanie przy pomocy komórki fotoelektrycznej

Przyrząd i procedura:

Przyrząd składa się z komory metalowej z automatycznym systemem grzewczym. Trzy rurki kapilarne są napełniane zgodnie z ppkt. 1.6.1.1 i umieszczane w piecu.

Możliwych jest kilka liniowych ustawień narastania temperatury w celu skalibrowania przyrządu, przy czym właściwy wzrost temperatury jest regulowany elektrycznie na z góry określoną stałą i szybkość liniową. Rejestratory pokazują rzeczywistą temperaturę pieca i temperaturę substancji w rurkach kapilarnych.

1.6.2. Płyty grzewcze**1.6.2.1. Płyta grzewcza Koflera**

Patrz: Dodatek.

1.6.2.2. Mikroskop do badania topnienia

Patrz: Dodatek.

1.6.2.3. Metoda menisku (poliamidy)

Patrz: Dodatek.

Szybkość grzania w obrębie temperatury topnienia powinna być mniejsza niż 1 K/min.

1.6.3. Metody oznaczania temperatury krzepnięcia

Patrz: Dodatek.

1.6.4. Analiza termiczna**1.6.4.1. Różnicowa analiza termiczna**

Patrz: Dodatek.

1.6.4.2. Różnicowa kalorymetria skaningowa

Patrz: Dodatek.

1.6.5. Oznaczanie temperatury płynięcia

Patrz: Dodatek.

2. DANE

W niektórych przypadkach konieczna jest korekcja termometru.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- zastosowana metoda,
- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia) i wstępny etap oczyszczenia, jeśli wykonano,
- ocena dokładności.

Jako temperaturę topnienia przedstawia się średnią z co najmniej dwóch pomiarów znajdujących się w granicach oszacowanej dokładności pomiarowej (patrz tabele).

Jeżeli różnica między temperaturą na początku i na końcowym etapie topnienia znajduje się w granicach dokładności metody, za temperaturę topnienia przyjmuje się temperaturę na końcowym etapie topnienia; w innym przypadku podaje się obie temperatury.

Jeżeli substancja przed osiągnięciem temperatury topnienia rozkłada się lub sublimuje, podawana jest temperatura, w której obserwowane są te efekty.

Należy podać wszystkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników, w szczególności w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu skupienia substancji.

4. **LITERATURA**

- (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

W celu uzyskania dodatkowych szczegółów technicznych, można zapoznać się na przykład z następującymi normami:

1. **Metody kapilarne**

1.1. Urządzenia do pomiaru temperatury topnienia z łaźnią cieczową

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

1.2. Urządzenia do pomiaru temperatury topnienia z blokiem metalowym

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

2. **Płyty grzewcze**

2.1. Płyta grzewcza Koflera

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

2.2. Mikroskop do badania topnienia

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

2.3. Metoda menisku (dla poliamidów)

ISO 1218 (E)	Plastics - polyamides - determination of „melting point”
ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection, moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion” Méthode du ménisque

3. Metody ustalania temperatury krzepnięcia

BS 4633	Method for 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 determination of the freezing point

4. Analiza termiczna**4.1. Różnicowa analiza termiczna**

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. Różnicowa kalorymetria skaningowa

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. Oznaczanie temperatury płynięcia

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 freezing temperature of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils - Determination of pour point.

A.2. TEMPERATURA WRZENIA

1. METODA

Większość opisanych metod oparto na wytycznych OECD dotyczących badań (1). Podstawowe zasady podano w (2) i (3).

1.1. WPROWADZENIE

Urządzenia i metody tutaj opisane stosuje się do cieczy i nisko topliwych substancji, pod warunkiem że nie ulegają one reakcji chemicznej poniżej ich temperatury wrzenia (jak na przykład: samoutlenienie, wtórnemu przekształceniu, rozkładowi i tak dalej). Metody te mogą być stosowane do czystych i zanieczyszczonych ciekłych substancji.

Kładzie się nacisk na metody wykorzystujące wykrywanie za pomocą komórki fotoelektrycznej i analizę termiczną, ponieważ metody te pozwalają na oznaczenie zarówno temperatury topnienia jak i temperatury wrzenia. Ponadto, pomiary mogą być wykonywane w sposób automatyczny.

„Metoda dynamiczna” ma tę zaletę, że można ją także wykorzystywać do oznaczenia ciśnienia pary i nie jest konieczna korekcja temperatury wrzenia do ciśnienia normalnego (101,325 kPa), gdyż można regulować ciśnienie normalne podczas pomiaru.

Uwagi:

Wpływ zanieczyszczeń na oznaczanie temperatury wrzenia w dużym stopniu zależy od charakteru zanieczyszczenia. Jeżeli w próbce znajdują się lotne zanieczyszczenia mogące wpływać na wyniki, badaną substancję należy oczyścić.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Temperatura wrzenia normalna jest zdefiniowana jako temperatura, przy której prężność pary cieczy wynosi 101,325 kPa.

Jeżeli temperatura wrzenia nie jest mierzona w normalnym ciśnieniu atmosferycznym, zależność prężności pary od temperatury opisuje się równaniem Clausiusa - Clapeyrona:

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

gdzie:

p = prężność pary substancji w paskalach

ΔH_v = jej ciepło parowania w J mol⁻¹

R = uniwersalna molowa stała gazowa = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹

T = temperatura termodynamiczna w stopniach K

Temperatura wrzenia jest ustalona w odniesieniu do ciśnienia otoczenia w czasie trwania pomiaru.

Konwersje

Ciśnienie (jednostki: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(jednostka „bar” jest wciąż dozwolona, ale nie jest zalecana)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(jednostki „mm Hg” i „Torr” nie są dozwolone).

1 atm = standardowa atmosfera = 101 325 Pa

(jednostka „atm” jest niedozwolona).

Temperatura (jednostki: K)

$$t = T - 273,15$$

t: temperatura Celsjusza, stopień Celsjusza (°C)

T: temperatura termodynamiczna, Kelwin (K)

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

Niektóre substancje kalibracyjne wymieniono w opisach metod wymienionych w Dodatku.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Pięć metod ustalania temperatury wrzenia (zakresu wrzenia) jest oparte na pomiarze temperatury wrzenia, dwie inne oparte są o analizę termiczną.

1.4.1. Wyznaczanie za pomocą ebulliometru

Ebulliometry zostały pierwotnie opracowane w celu oznaczania masy cząsteczkowej poprzez podwyższanie temperatury wrzenia, jednak nadają się także do dokładnych pomiarów tej temperatury. Bardzo prosty przyrząd opisano w ASTM D 1120-72 (patrz Dodatek). Ciecz jest podgrzewana w tym przyrządzie w warunkach równowagi, pod ciśnieniem atmosferycznym, do wrzenia.

1.4.2. Metoda dynamiczne

Metoda ta obejmuje pomiar temperatury ponownej kondensacji pary przy pomocy właściwego termometru w wykroplinach podczas wrzenia. Podczas stosowania tej metody ciśnienie może być zmienne.

1.4.3. Metoda destylacji dla wyznaczania temperatury wrzenia

Metoda ta obejmuje destylację cieczy i pomiar temperatury ponownej kondensacji pary oraz oznaczenie ilości destylatu.

1.4.4. Metoda według Siwolobowa

Próbkę podgrzewa się w probówce, która jest zanurzona w cieczy w gorącej łaźni. W probówce zanurzona jest z kolei zatopiona na końcu rurka kapilarna, zawierająca pęcherzyk powietrza w dolnej części.

1.4.5. Wykrywanie przy pomocy komórki fotoelektrycznej

Zgodnie z zasadą według Siwolobowa, wykonuje się automatyczny pomiar fotoelektryczny z wykorzystaniem unoszących się pęcherzyków.

1.4.6. Różnicowa analiza termiczna

Niniejsza technika rejestruje różnicę w temperaturach między substancją i materiałem odniesienia jako funkcję temperatury, gdy substancja oraz materiał odniesienia podlegają temu samemu programowi kontrolowania temperatury. W momencie gdy próbka podlega przejściu pociągającym za sobą zmianę entalpii, zmiana ta jest wskazywana przez endotermiczne odchylenie(wrzenie) od linii bazowej zapisu temperatury.

1.4.7. Różnicowa kalorymetria skaningowa

Niniejsza technika rejestruje różnicę w energii pobranej przez substancję oraz materiał odniesienia, jako funkcję temperatury, gdy substancja oraz materiał odniesienia podlegają temu samemu programowi kontrolowania temperatury. Niniejsza energia jest energią konieczną do ustalenia zerowej różnicy temperatury między substancją i materiałem odniesienia. W momencie gdy próbka podlega przejściu pociągającym za sobą zmianę entalpii, zmiana ta jest wskazywana przez endotermiczne odchylenie(wrzenie) od linii bazowej zapisu przepływu ciepła.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Zastosowanie i dokładność różnych metod wykorzystywanych do ustalania temperatury wrzenia/zakres temperatury wrzenia, przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1: PORÓWNANIE METOD

Metoda pomiaru	Założona dokładność	Istniejąca norma
Ebuliometr	± 1.4 K (do 373 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ± 2.5 K (do 600 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾	ASTM D 1120-72 ⁽¹⁾
Metody dynamiczne	$\pm 0,5$ K (do 600 K) ⁽²⁾	
Proces destylacji (zakres wrzenia)	$\pm 0,5$ K (do 600K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS4591/71
Według Siwolobowa	± 2 K (do 600 K) ⁽²⁾	
Wykrywanie za pomocą komórk fotoelektrycznej	$\pm 0,3$ K (przy 373 K) ⁽²⁾	
Różnicowa kalorymetria termiczna	$\pm 0,5$ K (do 600 K) $\pm 2,0$ K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76
Różnicowa kalorymetria skaningowa.	$\pm 0,5$ K (do 600 K) $\pm 2,0$ K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76
⁽¹⁾ Niniejsza dokładność obowiązuje tylko dla prostego urządzenia jak na przykład opisano w ASTM D 1120-72; można ją poprawić bardziej złożonymi urządzeniami ebuliometru. ⁽²⁾ Ważna jedynie dla czystych substancji. Użycie w innych okolicznościach powinno być uzasadnione.		

1.6. OPIS METOD

Procedury dotyczące niektórych metod badania opisano w normach międzynarodowych i krajowych (patrz dodatek).

1.6.1. Ebuliometr

Patrz: Dodatek.

1.6.2. Metoda dynamiczna

Patrz: metoda badania A.4. dla oznaczania prężności pary.

Odnotowuje się temperaturę wrzenia stwierdzoną pod przyłożonym ciśnieniem 101,325 kPa.

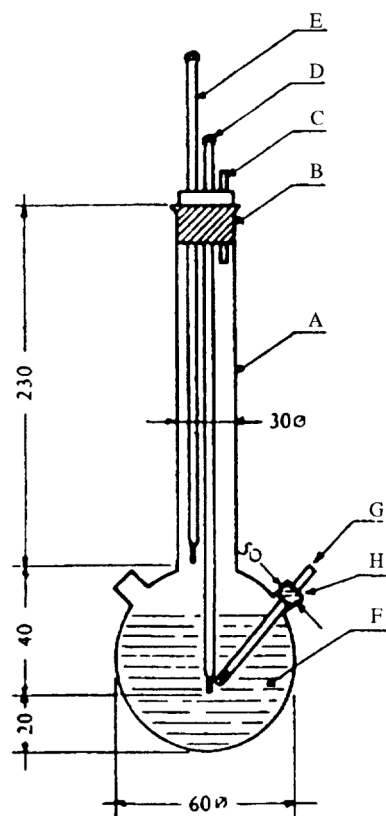
1.6.3. Proces destylacji (zakres wrzenia)

Patrz: Dodatek.

1.6.4. **Metoda według Siwolobowa**

Próbka jest podgrzewana w przyrządzie do oznaczania temperatury topnienia w probówce o średnicy około 5. mm (rysunek 1).

Rysunek 1 pokazuje rodzaj znormalizowanego przyrządu do badania temperatury topnienia i wrzenia (JIS K 0064) (wykonanego ze szkła, wszystkie wymiary w milimetrach).

Rysunek 1

- A: Naczynie pomiarowe
- B: Korek
- C: Odpowietrzenie
- D: Termometr
- E: Termometr pomocniczy
- F: Łaźnia cieczowa
- G: Probówka do próbek, średnica zewn. maks. 5 mm; Zawierająca rurkę kapilarną długą na około 100 mm, średnica wewnętrzna około 1 mm i grubości ścianek około 0,2 do 0,3 mm
- H: Rurka boczna

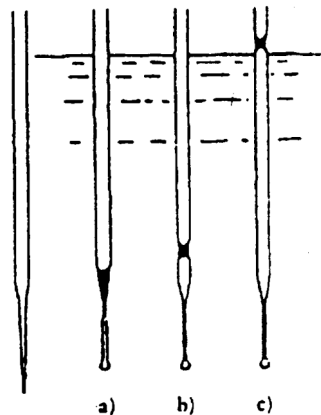
Rurkę kapilarną (kapilara do badania wrzenia), zatopioną na wysokości około 1 cm powyżej dolnego końca, umieszcza się w probówce. Badaną substancję wprowadza się w ten sposób, aby zatopiony odcinek kapilary znalazł się poniżej powierzchni cieczy. Probówkę zawierającą kapilarę albo przymocowuje się do termometru przy pomocy taśmy gumowej albo umocowuje z boku na wsporniku (patrz rysunek 2).

Rysunek 2

Zasada według Siwolobowa

**Rysunek 3**

Zmodyfikowana zasada



Ciecz do łaźni należy wybrać w zależności od temperatury wrzenia. Przy temperaturach do 573 K, stosuje się olej silikonowy. Ciekła parafina jest stosowana tylko do 473 K. Początkowo grzanie łaźni cieczowej ustawia się na wzrost temperatury 3 K/min. Ciecz łaźni musi być mieszana. W temperaturze około 10 K poniżej spodziewanej temperatury wrzenia szybkość wzrostu temperatury ustawia się na maksimum 1 K/min. Przy zbliżaniu się do temperatury wrzenia z wrzącej zawartości kapilary zaczynają unosić się pęcherzyki.

Temperatura wrzenia to temperatura, w której przy chwilowym schłodzeniu łańcuszek pęcherzyków przestaje powstawać i ciecz w kapilarze nagle zaczyna się unosić. Odpowiadający temu odczyt temperatury to temperatura wrzenia substancji.

W zmodyfikowanej zasadzie pomiaru (rysunek 3) temperatura wrzenia jest oznaczana w kapilarze od ustalania temperatury topnienia. Jest ona wyciągnięta do przewężenia o długości około 2 cm (a) i zassana jest w niej mała ilość próbki. Otwarty koniec cienkiej kapilary jest zamknięty poprzez obtopienie w taki sposób, że na jej końcu znajduje się mały pęcherzyk powietrza. Podczas ogrzewania w aparacie do ustalania temperatury topnienia (b), pęcherzyk powietrza rozszerza się. Temperaturze wrzenia odpowiada taka temperatura, przy której zatyczka z substancji badanej osiąga poziom powierzchni cieczy łaźni (c).

1.6.5. Wykrywanie za pomocą komórki fotoelektrycznej

Próbka jest ogrzewana w rurce kapilarnej umieszczonej wewnątrz podgrzewanego bloku metalowego.

Wiązka światła przechodzi, poprzez odpowiednie otwory w bloku, poprzez badaną substancję na precyzyjnie skalibrowaną komórkę fotoelektryczną.

W czasie wzrostu temperatury próbki, pojedyncze pęcherzyki powietrza pojawiają się w kapilarze. Gdy osiągnięta jest temperatura wrzenia ilość pęcherzyków gwałtownie wzrasta. Powoduje to zmianę intensywności światła, rejestrowanego przez komórkę fotoelektryczną i powoduje wysłanie sygnału zatrzymania do wskaźnika odczytującego temperaturę z platynowego termometru rezystancyjnego umieszczonego w bloku.

Niniejsza metoda jest szczególnie użyteczna, gdyż pozwala na oznaczania poniżej temperatury pokojowej do 253,15 K (-20 °C) bez żadnych zmian w przyrządzie. Przyrząd umieszcza się jedynie w łaźni chłodzącej.

1.6.6. Analiza termiczna

1.6.6.1. Różnicowa analiza termiczna

Patrz: Dodatek.

1.6.6.2. Różnicowa kalorymetria skaningowa

Patrz: Dodatek.

2. DANE

Przy niewielkich odchyleniach od ciśnienia normalnego (maksimum ± 5 kPa) temperaturę wrzenia normalizuje się do T_n na podstawie następującego wzoru równania Sidneya - Younga:

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

gdzie:

Δp = (101,325 - p) [uwaga na znak]

p = pomiar ciśnienia w kPa

f_T = szybkość zmian temperatury wrzenia z ciśnieniem w K/kPa

T = zmierzona temperatura wrzenia w K

T_n = temperatura wrzenia skorygowana do ciśnienia normalnego w K

Współczynniki korekcji temperatury, f_T , i wzory na ich przybliżone obliczanie zawarto we wspomnianych wyżej normach międzynarodowych i krajowych dla wielu substancji.

Na przykład w metodzie DIN 53171 wymieniono następujące, przybliżone poprawki dla rozpuszczalników zawartych w farbach:

TABELA 2: TEMPERATURA - WSPÓŁCZYNNIKI KOREKCJI f_T

Temperatura T (K)	Współczynnik korekcji 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. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- zastosowana metoda,
- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia) i wstępny etap oczyszczenia, jeśli wykonano
- ocena dokładności.

Średnią co najmniej dwóch pomiarów znajdujących się w zakresie oszacowanej dokładności (patrz tabela 1) przedstawia się jako temperaturę wrzenia.

Należy podać zmierzone temperatury wrzenia i ich średnią, a także ciśnienie (ciśnienia), w którym (których) były wykonywane pomiary, w kPa. Najkorzystniej jest, gdy ciśnienie jest zbliżone do normalnego ciśnienia atmosferycznego.

Należy podać wszystkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników, w szczególności w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu skupienia substancji.

4. LITERATURA

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

Dodatek

W celu uzyskania dodatkowych szczegółów technicznych, można zapoznać się na przykład z następującymi normami:

1. Ebulliometr

ASTM D 1120-72

Standard test method for boiling point of engine anti - freezes

2. Proces destylacji (zakres wrzenia)

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 determination of distillation characteristics
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation:détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. Różnicowa analiza termiczna i różnicowa kalorymetria skaningowa

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 GĘSTOŚĆ WZGLĘDNA

1. METODA

Większość opisanych metod oparto na wytycznych OECD dotyczących badań (1). Podstawowe zasady podano w (2) i (3).

1.1. WPROWADZENIE

Opisane metody oznaczania gęstości względnej stosują się do substancji stałych i płynnych, bez ograniczeń związanych z ich stopniem czystości. Różne metody możliwe do zastosowania wymieniono w tabeli 1.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Gęstość względna, D_4^{20} ciał stałych lub cieczy jest stosunkiem między masą objętości badanej substancji, ustaloną w 20 °C, oraz masą tej samej objętości wody, ustaloną w 4 °C. Gęstość względna jest bezwymiarowa.

Gęstość, ρ , substancji jest ilorazem masy, m , i jej objętości, v .

Gęstość, ρ , w układzie jednostek SI jest dana w kg/m^3 .

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA (1) (3)

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

1.4. ZASADA METOD

Stosowane są cztery klasy metod.

1.4.1. Metody wyporu hydrostatycznego**1.4.1.1. Areometr (dla substancji ciekłych)**

Wystarczająco dokładne i szybkie oznaczenia gęstości można uzyskać przy użyciu areometrów pływających, które pozwalają na obliczenie gęstości cieczy na podstawie głębokości zanurzenia, przez odczyt na skali z podziałką.

1.4.1.2. Waga hydrostatyczna (dla substancji płynnych i stałych)

Różnica między wagą badanej próbki zmierzona w powietrzu i w odpowiedniej cieczy (na przykład w wodzie) wykorzystuje się do oznaczenia jej gęstości.

W przypadku ciał stałych zmierzona gęstość jest charakterystyczna jedynie dla określonej, zastosowanej próbki. W przypadku oznaczania gęstości cieczy, ich ilość o znanej objętości, v , waży się najpierw w powietrzu, a potem w cieczy.

1.4.1.3. Metoda zanurzeniowa (dla substancji ciekłych) (4)

Metoda ta polega na oznaczaniu gęstości cieczy na podstawie różnicy między wynikami zważenia cieczy przed i po zanurzeniu w nim ciała o znanej objętości.

1.4.2. Metody piknometryczne

W przypadku ciał stałych lub cieczy można się posłużyć piknometrami o różnych kształtach i o znanych wymiarach. Gęstość oblicza się na podstawie różnicy masy między napełnionym i pustym piknometrem oraz jego znanej objętości.

1.4.3. Piknometr wykonujący pomiar porównawczy w powietrzu (dla ciał stałych)

Gęstość ciała stałego w dowolnej formie można zmierzyć w temperaturze pokojowej przy użyciu piknometru wykonującego pomiary porównawcze w gazie. Objętość substancji mierzy się w powietrzu lub w gazie obojętnym w cylindrze o zmiennej, wykalibrowanej objętości. Dla obliczenia gęstości wykonuje się jeden pomiar masy po zakończeniu pomiaru objętości.

1.4.4. Densytmeter oscylacyjny (5) (6) (7)

Gęstość cieczy można zmierzyć przy pomocy densytometru oscylacyjnego. Mechaniczny oscylator skonstruowany w postaci U - rurki, drga w częstotliwości rezonansowej zależnej od jego masy. Wprowadzenie badanej próbki zmienia częstotliwość rezonansową oscylatora. Przyrząd należy skalibrować przy użyciu dwóch substancji płynnych o znanej gęstości. Najkorzystniej, aby substancje te wybrać tak, aby ich gęstości były bliskie zakresowi, który ma być mierzony.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Zastosowania poszczególnych metod wykorzystywanych do oznaczania gęstości względnej wymieniono w tabeli.

1.6. OPIS METOD

W Dodatku załączono normy podane jako przykłady, z którymi należy się zapoznać w celu uzyskania informacji o dodatkowych szczegółach technicznych.

Badania należy przeprowadzać w temperaturze 20 °C, przy czym konieczne jest wykonanie co najmniej dwóch pomiarów.

2. **DANE**

Patrz: normy.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- zastosowana metoda,
- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia) i wstępny etap oczyszczania, jeśli wykonano.

Gęstość względną, D_4^{20} , należy podawać w sposób określony w ppkt. 1.2, łącznie ze stanem skupienia mierzonej substancji.

Należy podać wszystkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników, w szczególności w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu skupienia substancji.

TABELA: ZASTOSOWANIE METOD

Metoda pomiaru	Gęstość		Maksymalna możliwa lepkość dynamiczna	Istniejące normy
	Ciało stałe	Ciecz		
1.4.1.1. Areometr		tak	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Waga hydrostatyczna				
a) ciała stałe	tak			ISO 1183 (A)
b) ciecze		tak	5 Pa s	ISO 901 i 758
1.4.1.3. Metoda zanurzeniowa		tak	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknometr				ISO 3507
a) ciała stałe	.			tak ISO 1183(B), NF T 20-053
b) ciecze		tak	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Piknometr wykonujący pomiar porównawczy w powietrzu	tak			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Densytmeter oscylacyjny		tak	5 Pa s	

4. **LITERATURA**

- (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

Dla uzyskania dodatkowych szczegółów technicznych można zapoznać się na przykład z następującymi normami:

1. **METODY WYPORU HYDROSTATYCZNEGO**

1.1. Areometr

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; 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 – aerometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Waga hydrostatyczna

Dla substancji stałych

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and specific gravity of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use - Determination of 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

Dla substancji ciekłych

ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Metoda zanurzeniowa

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

2. **METODY PIKNOMETRYCZNE**

2.1. Dla substancji ciekłych

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

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

A.4. PRĘŻNOŚĆ PARY

1. METODA

Większość opisanych metod oparto na wytycznych OECD dotyczących badań (1). Podstawowe zasady podano w (2) i (3).

1.1. WPROWADZENIE

Do przeprowadzenia tego oznaczenia przydatne jest posiadanie wstępnych informacji na temat budowy, temperatury topnienia i temperatury wrzenia substancji.

Nie istnieje procedura pojedynczego pomiaru dająca się zastosować do całego zakresu prężności par. Dlatego zalecane jest kilka metod stosowanych do pomiaru prężności par w zakresie od $< 10^{-4}$ do 10^5 Pa.

Zanieczyszczenia zwykle wpływają na prężność pary do pewnego stopnia, zależącego głównie od rodzaju zanieczyszczenia.

Jeżeli w próbce znajdują się zanieczyszczenia lotne, które mogą wpływać na wynik, substancję należy oczyścić. Może być także właściwe powołanie się na prężność pary materiału czystości technicznej.

Kilka opisanych tu metod wykorzystuje przyrząd składający się z metalowych części, co należy rozważyć przy badaniu substancji powodujących korozję.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Prężność pary substancji określa się jako ciśnienie nasycenia ponad substancją w stanie stałym lub płynnym. W stanie równowagi termodynamicznej prężność pary czystej substancji jest funkcją jedynie temperatury.

Jednostką ciśnienia układu SI, którą należy stosować jest paskal (Pa).

Jednostki, które stosowano w przeszłości, łącznie z ich współczynnikami konwersji:

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

Jednostką temperatury w układzie SI jest Kelwin (K).

Uniwersalna molowa stała gazowa R wynosi $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

Temperaturowa zależność prężności pary jest opisana równaniem Clausiusa - Clapeyrona:

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

gdzie:

p = prężność pary substancji w paskalach

ΔH_v = jej ciepło parowania w J mol^{-1}

R = uniwersalna molowa stała gazowa w $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = temperatura termodynamiczna w K

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

1.4. ZASADA METOD BADAŃ

Do oznaczania prężności pary, proponuje się siedem metod, które można stosować przy różnych zakresach prężności pary. W przypadku każdej metody, prężność pary określa się w różnych temperaturach. W ograniczonym zakresie temperatur, logarytm prężności pary czystej substancji jest liniową funkcją odwrotności temperatury.

1.4.1. Metoda dynamiczna

Przy użyciu metody dynamicznej dokonuje się pomiaru temperatury wrzenia, która odpowiada określone-mu ciśnieniu.

Zalecany zakres:

10^3 do 10^5 Pa.

Niniejsza metoda jest także zalecana do oznaczania normalnej temperatury wrzenia i jest użyteczna w tym celu do 600 K.

1.4.2. Metoda statyczna

W procesie statycznym w punkcie równowagi termodynamicznej oznacza się prężność pary ustaloną w zamkniętym układzie, w określonej temperaturze. Metoda ta jest właściwa dla jednoskładnikowych i wieloskładnikowych ciał stałych i cieczy.

Zalecany zakres:

10^3 do 10^5 Pa.

Stosując należyłą uwagę, niniejszą metodę można zastosować także w zakresie 1 do 10 Pa.

1.4.3. Izoteniskop

Ta znormalizowana metoda jest także metodą statyczną, jednak na ogół nie jest właściwa dla układów wieloskładnikowych. Dodatkowe informacje są dostępne w metodzie ASTM D-2879-86.

Zalecany zakres:

od 100 do 10^5 Pa.

1.4.4. Metoda efuzji: Waga do oceny prężności pary

Ustala się ilość substancji opuszczającej komórkę w jednostce czasu przez szczelinę o znanym rozmiarze, w warunkach próżni, w ten sposób, że powrót substancji do komórki jest nieznaczny (np. przez pomiar pulsu generowanego na czułej wadze przez strumień pary lub przez pomiar utraty masy).

Zalecany zakres:

10^{-3} do 1 Pa.

1.4.5. Metoda efuzji: pomiar poprzez utratę masy lub przez pułapkowanie oparów

Metoda oparta jest na oznaczeniu masy badanej substancji ulatniającej się na jednostkę czasu z komórki Knudsen (4) w postaci oparów przez mikrootwór w warunkach wysokiej próżni. Masę oparów które uległy efuzji uzyskuje się albo przez oznaczenie utraty masy komórki albo przez kondensację oparów w niskiej temperaturze i oznaczenie ilości ulotnionej substancji za pomocą analizy chromatograficznej. Prężność pary jest obliczana za pomocą zależności Hertza - Knudsen.

Zalecany zakres:

10^{-3} do 1 Pa.

1.4.6. Metoda nasycenia gazem

Strumień obojętnego gazu nośnikowego jest przepuszczany nad substancją, w taki sposób że powoduje to nasycenie jego parą. Ilość przeniesionego materiału przez znaną ilość gazu nośnikowego mierzy się albo przez zbieranie go w odpowiedniej pułapce lub impulsową techniką analityczną. Jest to następnie stosowane do obliczenia prężności pary w danej temperaturze.

Zalecany zakres:

10^{-4} do 1 Pa.

Stosując należyta uwagę, niniejszą metodę można zastosować także w zakresie 1 do 10 Pa.

1.4.7. Metoda wirującego rotora

W mierniku wirującego rotora, rzeczywistym elementem pomiarowym jest mała stalowa kula zawieszona w polu magnetycznym, obracająca się z dużą szybkością. Ciśnienie gazu jest wyprowadzane z zależnego od ciśnienia, spadku szybkości stalowej kuli.

Zalecany zakres:

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

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Porównano poszczególne metody oznaczania prężności pary pod względem ich zastosowania, powtarzalności, odtwarzalności, zakresu pomiaru, istnienia norm. Porównanie to przedstawiono w tabeli poniżej.

KRYTERIA JAKOŚCI

Metoda pomiarowa	Substancje		Szacowana powtarzalność ⁽¹⁾	Szacowana odtwarzalność ⁽¹⁾	Zalecany zakres	Istniejące normy
	stałe	ciekłe				
1.4.1. Metoda dynamiczna	niskotopliwe	tak	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. Metoda statyczna	tak	tak	5 do 10%	5 do 10%	10 Pa do 10^5 Pa ⁽²⁾	NFT 20-048 (5)
1.4.3. Izoteniscope	tak	tak	5 do 10%	5 do 10%	10^2 Pa do 10^5 Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4. Metoda efuzji wagi oceny sprężystości pary	tak	tak	5 do 20%	do 50%	10^{-3} Pa do 1 Pa	NFT 20-047 (6)
1.4.5. Metoda efuzji utraty masy	tak	tak	10 do 30%	—	10^{-3} Pa do 1 Pa	—
1.4.6. Metoda nasycenia gazem	tak	tak	10 do 30%	do 50%	10^{-4} Pa do 1 Pa ²	—
1.4.7. Metoda wirującego rotora	tak	tak	10 do 20%	—	10^{-4} Pa do 0,5 Pa	—

⁽¹⁾ Zależna od stopnia czystości.

⁽²⁾ Stosując należyta uwagę, niniejszą metodę można zastosować także w zakresie 1 do 10 Pa.

1.6. OPIS METOD

1.6.1. **Pomiar dynamiczny**1.6.1.1. *Przyrząd*

Zwykle, przyrząd pomiarowy składa się z naczynia do gotowania z dołączoną chłodnicą wykonaną ze szkła lub metalu (rysunek 1), urządzenia do pomiaru temperatury i urządzenia do regulowania i pomiaru ciśnienia. Typowy przyrząd pomiarowy pokazany na rysunku jest wykonany z żaroodpornego szkła i składa się z pięciu części:

Duża, częściowo dwuścienna rura składa się ze złącza szlifowanego z płaszczem, chłodnicy, naczynia chłodzącego i otworu wlotowego.

Do części rury, w której odbywa się wrzenie, dołączony jest szklany cylinder z „pompką” Cottrella, który ma nierówną powierzchnię tłuczonego szkła w celu uniknięcia burzliwości w procesie wrzenia.

Temperatura jest mierzona odpowiednim czujnikiem temperatury (na przykład termometrem oporowym, szczelnym termooogniwem) umieszczonym w aparacie w punkcie pomiaru (nr 5, rysunek 1) za pomocą odpowiedniego wlotu (na przykład złączem szlifowym).

Wykonane są niezbędne połączenia do regulacji ciśnienia i oprzyrządowania pomiarowego.

Bańka, która działa jako objętość buforowa, jest połączona z przyrządem pomiarowym poprzez rurkę kapilarną.

Naczynie przeznaczone do wrzenia jest ogrzewane za pomocą elementu grzewczego (na przykład grzałką) włożonej do szklanego przyrządu od dołu. Wymagany prąd grzania jest ustawiany i regulowany poprzez termooogniwo.

Konieczna próżnia w zakresie między 10^2 Pa i około 10^5 Pa jest wytwarzana za pomocą pompy próżniowej.

Stosuje się odpowiedni zawór do liczników powietrza lub azotu dla regulacji ciśnienia (zakres pomiarowy około 10^2 do 10^5 Pa) oraz wentylację.

Ciśnienie jest mierzone za pomocą manometru.

1.6.1.2. *Procedura pomiarowa*

Prężność pary jest mierzona przez ustalenie temperatury wrzenia próbki przy różnych określonych ciśnieniach między prawie 10^3 a 10^5 Pa. Ustalona temperatura pod stałym ciśnieniem wskazuje że uzyskano temperaturę wrzenia. Metoda ta nie jest użyteczna do pomiaru ciśnienia pary substancji, które się pienia.

Substancję jest umieszczona w czystym, suchym naczyniu do próbek. Można się natknąć na problemy z niesproszkowanymi ciałami stałymi, lecz czasem można je rozwiązać przez podgrzanie płaszcza chłodzącego. Po napełnieniu naczynia przyrząd jest uszczelniany na kołnierzu i odgazowuje się substancję. Następnie ustawia się najniższe pożądane ciśnienie i włącza układ grzewczy. W tym samym czasie, czujnik temperatury jest podłączany do rejestratora.

Stan równowagi jest osiągany gdy rejestruje się stałą temperaturę wrzenia przy stałym ciśnieniu. Należy zwrócić szczególną uwagę by zapobiec wrzeniu burzliwemu podczas wrzenia. Dodatkowo, musi zachodzić całkowita kondensacja w chłodnicy. Przy oznaczaniu prężności pary niskotopliwych ciał stałych, należy zwrócić uwagę na uniknięcie zablokowania skraplacza.

Po zapisaniu parametrów punktu równowagi ustawia się wyższe ciśnienie. Proces kontynuuje się w ten sposób do osiągnięcia ciśnienia 10^5 Pa (ogółem od około 5 do 10 punktów pomiarowych). W ramach sprawdzenia można powtórzyć oznaczanie punktów równowagi w trakcie obniżania ciśnienia.

1.6.2. Pomiar statyczny**1.6.2.1. Przyrząd**

Przyrząd zawiera naczynie na próbkę, system grzewczy i chłodzący do regulacji temperatury próbki i pomiaru temperatury. Przyrząd zawiera również przyrządy do ustawiania i pomiaru ciśnienia. Rysunki 2a i 2b obrazują zastosowane podstawowe zasady.

Komora próbki (rysunek 2a) jest podłączona z jednej strony odpowiednim zaworem dla wysokiej próżni. U - rurka zawierająca odpowiednią ciecz manometryczną jest dołączona z drugiej strony. Jeden z końców rozgałęzienia U - rurki odcina pompę próżniową, cylinder azotu lub zawór wentylacji oraz manometr.

Zamiast U - rurki można zastosować manometr ze wskaźnikiem ciśnienia (rysunek 2b).

W celu regulacji temperatury próbki, umieszcza się naczynie próbki wraz z zaworem i U - rurką lub manometrem w łaźni, w której utrzymywana jest stała temperatura z dokładnością $\pm 0,2$ K. Pomiary temperatury są prowadzone na zewnętrznej ścianie naczynia zawierającego próbkę lub w samym naczyniu.

Pompa próżniowa z pułapką chłodzącą opary jest używana do odpowietrzania przyrządu.

W metodzie 2a prężność pary substancji jest mierzona pośrednio stosując wskaźnik zera. Wynika to z wzięcia pod uwagę faktu, że gęstość płynu w U-rurce zmienia się przy znacznej zmianie temperatury.

W zależności od zakresu ciśnień oraz chemicznego zachowania się badanej substancji, następujące płyny są odpowiednie do użycia jako wskaźniki zera dla U - rurki: płyny silikonowe, ftalany. Badana substancja nie może w znaczący sposób rozpuszczać się lub reagować z płynem U - rurki.

W zakresie normalnego ciśnienia do 10^2 Pa, do manometru stosuje się rtęć, podczas gdy płyny silikonowe i ftalany są odpowiednie do użycia poniżej 10^2 Pa w dół do 10 Pa. Manometry pojemnościowe o podgrzewanej membranie mogą być używane nawet do poniżej 10^{-1} Pa. Istnieją również czujniki ciśnienia które mogą być stosowane poniżej 10^2 Pa.

1.6.2.2. Procedura pomiarowa

Przed pomiarami, wszystkie podzespoły przyrządu pokazanego na rysunku 2 muszą być gruntownie oczyszczone i wysuszone.

W metodzie 2a, napełnić U - rurkę wybranym płynem, który musi być odgazowany w podwyższonej temperaturze przed rozpoczęciem odczytów.

Badaną substancję umieszcza się w przyrządzie, który jest następnie zamykany i zmniejsza się wystarczająco temperaturę w celu odgazowania. Temperatura musi być wystarczająco niska dla zapewnienia usunięcia powietrza, ale w przypadku wielokrotnego systemu składników, nie może powodować zmiany składu materiału. Równowaga, jeżeli zachodzi potrzeba, może być uzyskana znacznie szybciej przy pomocy mieszania.

Próbkę można przechłodzić za pomocą ciekłego azotu (uważać by zapobiec kondensacji powietrza lub płynu pompy) lub mieszaniny etanolu i suchego lodu. Przy pomiarach niskotemperaturowych używać łaźni z regulowaną temperaturą podłączonej do ultrakriomatu.

Otwarcie zaworu nad naczyniem z próbką powoduje włączenie na kilka minut ssania w celu usunięcia powietrza. Następnie zamyka się zawór i zmniejsza temperaturę próbki do najniższego żadanego poziomu. O ile zachodzi taka konieczność, proces odgazowania musi być powtórzony kilka razy.

Gdy próbka jest podgrzewana to prężność pary wzrasta. Zmienia to równowagę cieczy w U-rurce. Celem kompensacji tego zjawiska, azot jest podawany do przyrządu poprzez zawór do momentu, gdy wskaźnik ciśnienia płynu ponownie osiągnie zero. Ciśnienie wymagane do tego jest odczytywane precyzyjnym manometrem w temperaturze pokojowej. Niniejsze ciśnienie odpowiada prężności pary substancji w określonej temperaturze pomiaru.

Metoda 2b jest podobna lecz prężność pary jest odczytywana bezpośrednio.

Zależność temperaturowa prężności pary jest oznaczana w odpowiednio małych przedziałach (około 5 do 10 punktów pomiarowych całego zakresu) do pożądanego maksimum. Sprawdzeniem jest powtórzenie odczytów niskotemperaturowych.

Jeżeli wartości z powtórzonych odczytów nie pokrywają się z krzywą uzyskaną dla wzrostu temperatury, może być to spowodowane jedną z następujących przyczyn:

1. Próbką wciąż zawiera powietrze (na przykład materiały o wysokiej lepkości) lub niskowrzące substancje, które jest/są uwalniane w trakcie ogrzewania i mogą być usunięte przez odpompowanie po przechłodzeniu.
2. Temperatura chłodzenia nie jest wystarczająco niska. W tym przypadku jako środek chłodzący jest używany ciekły azot.

O ile zachodzi przyczyna 1 lub 2, pomiary muszą być powtórzone.

3. Substancja ulega reakcji chemicznej w badanym zakresie temperatur (na przykład rozkładowi, polimeryzacji).

1.6.3. Izoteniskop

Pełny opis tej metody można znaleźć w pozycji 7 literatury. Zasadę działania urządzenia pomiarowego pokazano na rysunku 3. Podobnie jak w przypadku metody statycznej opisanej w ppkt. 1.6.2, izoteniskop nadaje się do badań ciał stałych lub cieczy.

W przypadku cieczy sama substancja pełni rolę cieczy, którym napełniony jest pomocniczy manometr. Ilość cieczy, wystarczająca do napełnienia kolby i krótkiego odgałęzienia sekcji manometru, jest umieszczana w izoteniskopie. Izoteniskop podłącza się do systemu próżniowego i odpompowuje, a następnie napełnia się go azotem. Odpompowanie i czyszczenie systemu jest powtarzane dwukrotnie w celu usunięcia resztkowego tlenu. Napełniony izoteniskop umieszcza się w pozycji poziomej, tak by próbka rozpuściła się cienką warstwą w naczyniu próbki i sekcji manometru (część U). Ciśnienie systemu zmniejsza się do 133 Pa i podgrzewa delikatnie próbkę do rozpoczęcia wrzenia (usunięcie rozpuszczonych związków). Następnie umieszcza się izoteniskop tak, że próbka powraca do naczynia i krótszego odgałęzienia manometru, tak by były całkowicie wypełnione cieczą. Ciśnienie utrzymuje się takie jak dla odgazowania; wyciągnięta końcówka naczynia próbki jest podgrzewana małym płomieniem do czasu gdy uwalniane opary próbki rozszerzą się wystarczająco do wyparcia części próbki z górnej części kolby i ramienia manometru do sekcji manometru izoteniskopu, tworząc wypełnioną parami, wolną od azotu przestrzeń.

Izoteniskop jest następnie umieszczany w łaźni o stałej temperaturze, a ciśnienie azotu ustawia się do momentu wyrównania go z ciśnieniem próbki. Równowaga ciśnień jest wskazywana przez sekcję manometryczną izoteniskopu. W punkcie równowagi, prężność pary azotu jest równa prężności pary substancji.

W przypadku ciał stałych, stosowane ciecze manometryczne w zależności od zakresu i temperatury podano w ppkt. 1.6.2.1. Odgazowaną cieczą manometryczną napełnia się wybrzuszenie na dłuższym ramieniu izoteniskopu. Następnie ciało stałe, które ma być badane jest umieszczane w naczyniu i jest odgazowywane w podwyższonej temperaturze. Po tym izoteniskop jest nachylany tak, by ciecz manometryczna mogła przepłynąć do U - rurki. Pomiar prężności pary w funkcji temperatury jest wykonywany zgodnie z ppkt. 1.6.2.

1.6.4. Metoda efuzji: waga do oceny prężności pary

1.6.4.1. Przyrząd

Różne wersje przyrządów opisano w literaturze (1). Przyrząd opisany tutaj obejmuje przedstawienie ogólnej zasady (rysunek 4). Rysunek 4 pokazuje główne części przyrządu, zawierającego naczynie do wysokiej próżni ze stali nierdzewnej lub szkła, osprzęt do wytwarzania i pomiaru próżni i wbudowane podzespoły do pomiaru prężności pary w równowadze. W przyrządzie znajdują się wbudowane następujące podzespoły:

- wyparka z kołnierzem i obrotowym wlotem. Wyparka jest cylindrycznym naczyniem, wykonanym na przykład z miedzi, lub ze stopu chemicznie odpornego o dobrym termicznym przewodnictwie. Można również użyć szklane naczynie z miedzianą ścianką. Wyparka posiada średnicę około 3 do 5 cm i jest wysoka na 2 do 5 cm. Znajdują się w niej od jednego do trzech otworów o różnych wymiarach dla strumienia pary. Wyparka jest podgrzewana albo płytą grzejną od spodu, albo spiralą grzejną dookoła powierzchni zewnętrznej. Aby zapobiec rozpraszaniu ciepła do płyty dennej, grzejnik jest podłączony do płyty dennej poprzez metal o niskim przewodnictwie cieplnym (stal nikłowo-srebrna lub chromo-niklowa), na przykład przez rurkę nikłowo-srebrną połączoną z obrotowym wlotem, jeśli używa się wyparki o kilku otworach. Takie rozmieszczenie umożliwia wprowadzenie prętów miedzianych, co pozwala na chłodzenie zewnętrzne za pomocą łaźni chłodzącej,

- jeżeli wieko miedziane wyparki posiada trzy otwory o różnych średnicach, rozmieszczonych co 90°, można objąć różne zakresy prężności pary z całkowitego zakresu pomiarowego (otwory o średnicy między około 0,30 i 4,50 mm). Duże otwory są stosowane do niskiej prężności pary i odwrotnie. Przez obracanie wyparki można ustawić pożądany otwór lub pozycję pośrednią w strumieniu cząsteczek (otwór wyparki - osłona - szala wagi) uwalnianych lub odchylanych przez otwór wyparki na szalę wagi. W celu pomiaru temperatury substancji, umieszcza się termooogniwo lub termometr oporowy w stosownym punkcie,
- powyżej osłony znajduje się przedłużenie szalki wagi dla mikrowagi o wysokiej czułości (patrz poniżej). Szala wagi posiada średnicę około 30 mm. Odpowiednim materiałem jest aluminium pokryte złotem,
- szala wagi jest otoczona przez cylindryczną, wykonaną z brązu lub miedzi, skrzynkę chłodniczą. W zależności od typu wagi, posiada ona otwory dla belki wagi i osłonięty otwór dla strumienia cząsteczek i powinna gwarantować całkowitą kondensację par na szalce wagi. Rozpraszanie ciepła na zewnątrz jest zapewnione na przykład przez pręt miedziany połączony ze skrzynką chłodniczą. Pręt jest przeprowadzony przez płytę denną i termicznie od niej odizolowany, na przykład za pomocą rury ze stali chromoniklowej. Pręt jest zanurzony w naczyniu Dewara zawierającym ciekły azot pod płytą denną, bądź ciekły azot cyrkuluje przez pręt. Skrzynka chłodnicza jest utrzymywana w temperaturze około -120 °C. Szala wagi jest chłodzona wyłącznie przez promieniowanie, co jest zadawalające dla zakresu ciśnień stosowanych do badań (chłodzenie około jednej godziny przed rozpoczęciem pomiarów),
- waga jest umieszczana powyżej skrzynki chłodniczej. Odpowiednimi wagami są na przykład wysoko-czułe, 2-ramienne elektroniczne mikrowagi (8) lub wysokoczuły przyrząd z ruchomą cewką (patrz wytyczne OECD dotyczące badań 104, wydanie z 12.05.81),
- płyta denną zawiera również elektryczne połączenia dla termooogniwi (lub termometrów oporowych) oraz węzownicę grzejną,
- próżnia jest wytwarzana w naczyniu za pomocą pompy podciśnieniowej lub pompy wysokiej próżni (wymagana jest próżnia około 1 do 2 10^{-3} Pa, uzyskiwana po 2 godzinach pompowania). Ciśnienie reguluje się stosownym manometrem jonizacyjnym.

1.6.4.2. Procedura pomiarowa

Naczynie napełnia się badaną substancją i zamyka pokrywę. Osłona i skrzynka chłodnicza są przesunięte w poprzek wyparki. Przyrząd zamyka się i włącza pompy próżniowe. Ciśnienie końcowe przed rozpoczęciem pomiarów powinno być około 10^{-4} Pa. Chłodzenie skrzynki chłodniczej rozpoczyna się przy 10^{-3} Pa.

Po uzyskaniu żądanej próżni, rozpoczyna się serie kalibracji od najniższej wymaganej temperatury. Ustawia się odpowiedni otwór w pokrywie, strumień par przechodzi przez osłonę bezpośrednio powyżej otworu i uderza w ochłodzoną szalę wagi. Szala wagi musi być wystarczająco duża dla zapewnienia, że całkowity strumień przechodzący przez osłonę uderzy w nią. Pęd strumienia par działa jako siła na szalę wagi i cząsteczki kondensują się na jej ochłodzonej powierzchni.

Pęd i równoczesna kondensacja wytwarzają sygnał na rejestratorze. Ocena sygnałów dostarcza dwóch rodzajów informacji:

1. W przyrządzie opisanym tutaj prężność pary jest oznaczana bezpośrednio z pędu na szali wagi (nie jest konieczna do tego znajomość masy cząsteczkowej (2)). Należy wziąć pod uwagę czynniki geometryczne takie jak otwór wyparki i kąt strumienia cząsteczek przy ocenie odczytów.
2. W tym samym czasie można zmierzyć masę kondensatu i obliczyć z niej szybkość parowania. Prężność pary można także obliczyć z szybkości parowania i masę cząsteczkową stosując równanie Hertza (2).

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

gdzie:

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

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

T = temperatura (K)

R = uniwersalna molowa stała gazowa ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

p = prężność pary (Pa)

Po uzyskaniu niezbędnej próżni rozpoczyna się wykonywanie serii pomiarów przy najniższej pożądanej temperaturze pomiarowej.

Dla dalszych pomiarów, zwiększa się temperaturę małymi przedziałami do momentu uzyskania maksymalnej pożądanej wartości temperatury. Próbkę następnie jest ponownie schładzana i można dokonać zapisu drugiej krzywej ciśnienia pary. Jeżeli w drugiej serii nie uda się potwierdzić wyników pierwszej, możliwe jest, że substancja może ulegać rozkładowi w zakresie temperatur w których wykonuje się pomiar.

1.6.5. **Metoda efuzji - przez utratę masy**

1.6.5.1. *Przyrząd*

Przyrząd efuzyjny składa się z następujących podstawowych części:

- zbiornik, który może być termostatowany i odpompowywany, w którym umieszczone są komórki efuzyjne,
- pompa wysokiej próżni (np. pompa dyfuzyjna lub turbomolekularna) z próżniomierzem,
- pułapka, wykorzystująca skroplony azot lub suchy lód.

Elektrycznie podgrzewany, aluminiowy zbiornik próżniowy z 4 komórkami efuzyjnymi ze stali nierdzewnej przedstawiono przykładowo na rysunku 5. Folia ze stali nierdzewnej grubości około 0,3 mm posiada otwór efuzyjny o średnicy od 0,2 do 1,0 mm i jest połączona z komórką efuzyjną gwintowaną pokrywą.

1.6.5.2. *Procedura pomiarowa*

Substancjami, badaną i odniesienia napełniono każdą komórkę efuzyjną, metalowa membrana z otworem jest zabezpieczona gwintowaną pokrywą, a każda komórka jest ważona z dokładnością 0,1 mg. Komórkę umieszcza się w termostatowanym przyrządzie, który jest następnie odpompowywany do jednej dziesiątej oczekiwanego ciśnienia. W określonych odstępach czasowych z zakresu od 5 do 30 godzin, wpuszcza się do przyrządu powietrze, i określa się utratę masy komórki efuzyjnej przez ponowne ważenie.

W celu zapewnienia, że wyniki nie są zakłócone przez zanieczyszczenia lotne, komórka jest ponownie ważona w określonych odstępach czasowych, celem sprawdzenia czy szybkość parowania jest stała w co najmniej dwóch takich odstępach czasowych.

Prężność pary p w komórce efuzyjnej jest dana przez:

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

gdzie:

p = prężność pary (Pa)

m = masa substancji opuszczającej komórkę w ciągu czasu t (kg)

t = czas (s)

A = powierzchnia otworu (m^2)

K = współczynnik korekcji

R = uniwersalna stała gazowa ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = temperatura (K)

M = masa cząsteczkowa (kg mol^{-1})

Współczynnik korekcji K zależy od stosunku długości do promienia otworu cylindrycznego:

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

Powyższe równanie może być zapisane:

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

gdzie $E = \frac{1}{KA} \sqrt{2 \pi R}$ jest stałą komórki efuzyjnej

Niniejsza stała komórki efuzyjnej może być oznaczona przy pomocy substancji odniesienia (2,9), używając następującego równania:

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

gdzie:

$p(r)$ = ciśnienie pary substancji odniesienia (Pa)

$M(r)$ = masa cząsteczkowa substancji odniesienia (kg mol^{-1})

1.6.6. Metoda nasycenia gazem

1.6.6.1. Przyrząd

Typowy przyrząd stosowany do wykonywania tego badania składa się z szeregu elementów podanych na rysunku 6a i opisanych poniżej (1).

Gaz obojętny:

Gaz nośnikowy nie może wchodzić w reakcje chemiczne z substancją badaną. Na ogół do tego celu wystarcza azot, jednak czasem mogą być wymagane inne gazy (10). Zastosowany gaz musi być suchy (patrz rysunek 6a, pozycja 4: czujnik wilgotności względnej).

Kontrola przepływu:

Wymagany jest odpowiedni system kontroli przepływu gazu, aby zapewnić stały i odpowiednio dobrany przepływ przez kolumnę saturatora.

Pułapki do zbierania pary:

Zależą one od charakterystyki określonej próbki oraz wybranej metody analizy. Pary powinny być zbierane w sposób ilościowy, w postaci umożliwiającej późniejszą analizę. Do niektórych badanych substancji nadają się pułapki zawierające ciecze, takie jak heksan lub glikol etylenowy. W przypadku innych mogą być stosowane odpowiednie absorbenty w stałym stanie skupienia.

Jako alternatywa dla pułapkowania par i dalszych analiz, można zastosować techniki analityczne transportowe, takie jak chromatografia, do oznaczania ilościowego ilości materiału przeniesionego przez znaną ilość gazu nośnikowego. Następnie mierzona jest utrata masy badanej próbki.

Wymiennik ciepła:

W celu wykonywania pomiarów w różnych temperaturach może być konieczne włączenie do zestawu wymiennika ciepła.

Kolumna saturatora:

Badana substancja jest osadzana z roztworu na odpowiedni obojętny nośnik. Powleczonym nośnikiem jest wypełniana kolumna saturatora, której wymiary i szybkość przepływu powinny być takie, aby zapewnić pełne nasycenie gazu nośnikowego. Kolumna saturatora musi być termostatowana. Przy pomiarach powyżej temperatury pokojowej, obszar między kolumną saturatora i pułapkami musi być podgrzewany, aby zapobiec kondensacji badanej substancji.

W celu zmniejszenia masy przenoszonej wskutek dyfuzji, należy umieścić kapilarę za kolumną saturatora (rysunek 6b).

1.6.6.2. Procedura pomiarowa

Przygotowanie kolumny saturatora:

Do odpowiedniej ilości nośnika dodaje się roztwór substancji badanej w wysoce lotnym rozpuszczalniku. Należy dodać wystarczającą ilość substancji badanej do utrzymania nasycenia przez cały czas trwania badania. Rozpuszczalnik ulega całkowitemu odparowaniu w powietrzu lub w obrotowym przyrządzie wyparnym, a starannie zmieszany materiał jest dodawany do kolumny saturatora. Po termostatycznym ustaleniu temperatury próbki przez przyrząd przepuszcza się suchy azot.

Pomiar:

Pułapki lub impulsowy wskaźnik są przyłączone do linii wycieku kolumny i zapisywanego czasu. Sprawdza się szybkość przepływu na początku i w regularnych odstępach czasu w trakcie eksperymentu, przy użyciu licznika pęcherzyków (lub w sposób ciągły przy użyciu przepływomierza masowego).

Należy wykonywać pomiary ciśnienia u wylotu do saturatora. Można to wykonać albo:

- a) przez włączenie miernika ciśnienia pomiędzy saturator i pułapki (może być to niezadawalające ponieważ powoduje to wzrost martwej przestrzeni i powierzchni adsorbującej); lub
- b) ustalenie spadków ciśnienia w określonym układzie pułapek jako funkcji przepływu w oddzielnym eksperymencie (metoda ta może nie sprawdzać się zbyt dobrze w przypadku pułapek płynnych).

Czas wymagany do zebrania ilości substancji badanej niezbędnej dla różnych metod analitycznych zostaje ustalony we wstępnych seriach badań lub szacunkowo. Alternatywą dla zbierania substancji do dalszej analizy, jest ilościowa technika analityczna impulsowa (np. chromatografia). Przed obliczeniem prężności pary w określonej temperaturze należy przeprowadzić wstępne serie badań w celu ustalenia maksymalnego przepływu, który doprowadzi do pełnego nasycenia gazu nośnikowego parami substancji. Jest to gwarantowane, jeżeli gaz nośnikowy przepuści się przez saturator wystarczająco powoli, tak aby obniżenie szybkości nie powodowało już zwiększenia obliczonej prężności pary.

Określona metoda analityczna zostaje ustalona w zależności od charakteru badanej substancji (np. chromatografia gazowa lub grawimetria).

Oznacza się ilość substancji transportowaną przez znaną objętość gazu nośnikowego.

1.6.6.3. Obliczenie prężności pary

Prężność pary oblicza się na podstawie gęstości pary, W/V , przy użyciu następującego wzoru:

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

gdzie:

p = prężność pary (Pa)

W = masa odparowanej substancji badanej (g)

V = objętość nasyconego gazu (m^3)

R = uniwersalna molowa stała gazowa ($J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = temperatura (K)

M = masa molowa badanej substancji ($g \text{ mol}^{-1}$)

Zmierzone objętości należy skorygować względem różnic ciśnienia i temperatury między przepływomierzem i termostatowanym saturatorem. Jeżeli przepływomierz jest zlokalizowany w kierunku z prądem od pułapki pary, mogą być niezbędne poprawki w celu uwzględnienia wszelkich odparowanych składników pułapki (1).

1.6.7. **Metoda wirującego rotora (8, 11, 13)**1.6.7.1. *Przyrząd*

Technika wirującego rotora jest wykonywana poprzez użycie miernika lepkości z wirującym rotorem jak pokazano na rysunku 8. Schematyczny szkic doświadczalnego ustawienia pokazano na rysunku 7.

Przyrząd pomiarowy typowo składa się z głowicy pomiarowej wirującego rotora, umieszczonej w termostатовanej obudowie (regulowanej z dokładnością w zakresie 0,1 °C), pojemnika próbki umieszczonego w termostатовanej obudowie (regulacja z dokładnością w zakresie 0,01 °C), oraz wszystkich innych części do ustawienia, które utrzymywane są w wyższej temperaturze by zapobiec kondensacji. Pompa wysokiej próżni jest włączona do systemu za pomocą zaworów wysokiej próżni.

Głowica pomiarowa wirującego rotora składa się ze stalowej kuli (o średnicy 4 do 5 mm) w rurze. Kula jest zawieszona i stabilizowana w polu magnetycznym, głównie za pomocą kombinacji stałych pól magnetycznych i cewek sterujących.

Kula jest wprowadzana w wirowanie polami obrotowymi wytwarzanymi przez cewki. Cewki czujnikowe, mierzące zawsze obecne poprzeczne niskie namagnesowanie kuli, pozwalają na mierzenie szybkości wirowania.

1.6.7.2. *Procedura pomiarowa*

Gdy kula osiąga daną szybkość obrotową $v(o)$ (zwykle około 400 obrotów na sekundę), dalsze pobudzanie jest wstrzymywane i zachodzi zmniejszanie szybkości z powodu tarcia gazu.

Spadek szybkości obrotowej jest mierzony w funkcji czasu. Ponieważ tarcie spowodowane zawieszeniem magnetycznym jest mało istotne w porównaniu z tarcie gazu, ciśnienie gazu p jest dane przez:

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

gdzie

$\bar{c}$ = średnia szybkość cząsteczek gazu

r = promień kuli

ρ = gęstość kuli

σ = współczynnik przeniesienia stycznego pędu ($\epsilon = 1$ dla idealnie sferycznej powierzchni kuli)

t = czas

$v(t)$ = szybkość obrotowa po czasie t

$v(o)$ = początkowa szybkość obrotowa

zatem równanie można zapisać także:

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

gdzie t_n, t_{n-1} są czasami wymaganymi dla danej liczby N obrotów. Te przedziały czasowe t_n i t_{n-1} następują jeden po drugim, oraz $t_n > t_{n-1}$

Średnia szybkość cząsteczki gazu $\bar{c}$ jest dana przez:

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

gdzie:

T = temperatura

R = uniwersalna molowa stała gazowa

M = masa molowa

2. DANE

Ciśnienie pary obliczone zgodnie z dowolną z poprzednio opisanych metod należy określić dla co najmniej dwóch temperatur. Najkorzystniejsze jest wykonanie trzech lub większej liczby pomiarów w amplitudzie od 0 do 50 °C w celu sprawdzenia liniowości krzywej zmian prężności pary.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- zastosowana metoda,
- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia) i wstępny etap oczyszczenia, jeśli wykonano
- co najmniej dwie wartości prężność pary i temperatury, najlepiej z zakresu 0 do 50 °C,
- wszystkie dane pierwotne,
- krzywa zależności $\log p$ od $1/T$,
- oszacowanie prężności pary w 20 lub 25 °C.

Jeżeli obserwowane jest przejście (zmiana stanu skupienia, rozkład), należy odnotować następujące informacje:

- charakter zmiany,
- temperatura, w której dochodzi do zmiany pod ciśnieniem atmosferycznym,
- prężność pary w temperaturze o 10 i 20 °C niższej od temperatury przejścia oraz w temperaturze wyższej o 10 i 20 °C od tej temperatury (chyba że przejście następuje ze stanu stałego do gazowego).

Należy podać wszystkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników, w szczególności w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu skupienia substancji.

4. LITERATURA

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

Metoda szacowania

WPROWADZENIE

Obliczone wartości prężności pary stosuje się:

- w celu zdecydowania, która z metod doświadczalnych jest odpowiednia,
- w celu dostarczenia oszacowania lub granicznej wartości w przypadkach, gdy metoda doświadczalna nie może być zastosowana z powodu przyczyn technicznych (włączając te przypadki gdzie prężność pary jest bardzo niska),
- do pomocy w identyfikacji tych przypadków, gdzie pominięcie pomiarów doświadczalnych jest uzasadnione ponieważ prężność pary wynosi prawdopodobnie $< 10^{-5}$ Pa w temperaturze otoczenia.

METODA SZACOWANIA

Prężność pary cieczy i ciał stałych można oszacować poprzez użycie zmodyfikowanej korelacji Watsona (a). Jedyną tylko wymaganą daną doświadczalną jest temperatura wrzenia w warunkach normalnych. Metoda ma zastosowanie w zakresie ciśnień od 10^5 Pa do 10^{-5} Pa.

Szczegółowe informacje na temat metody podano w „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (b).

PROCEDURA OBLICZENIA

Zgodnie z pozycją (b) prężność pary jest obliczana jak następuje:

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

gdzie:

T = temperatura będąca przedmiotem zainteresowania

T_b = temperatura wrzenia w warunkach normalnych

P_{vp} = prężność pary w temperaturze T

ΔH_{vb} = ciepło parowania

ΔZ_b = współczynnik ściśliwości (oszacowany na 0,97)

m = empiryczny współczynnik zależny od stanu fizycznego w temperaturze będącej przedmiotem zainteresowania

Dalej:

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

gdzie K_F jest współczynnikiem empirycznym biorącym pod uwagę polarność substancji. Dla kilku rodzajów związków, współczynniki K_F są zamieszczone w (b).

Całkiem często są dostępne dane w których podano temperaturę wrzenia pod zredukowanym ciśnieniem. W takim przypadku, zgodnie z (b), prężność pary oblicza się w następujący sposób:

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

gdzie T_1 jest temperaturą wrzenia pod zredukowanym ciśnieniem P_1 .

SPRAWOZDANIE

Jeżeli zastosowano metodę szacowania, sprawozdanie powinno zawierać obszerną dokumentację obliczeń.

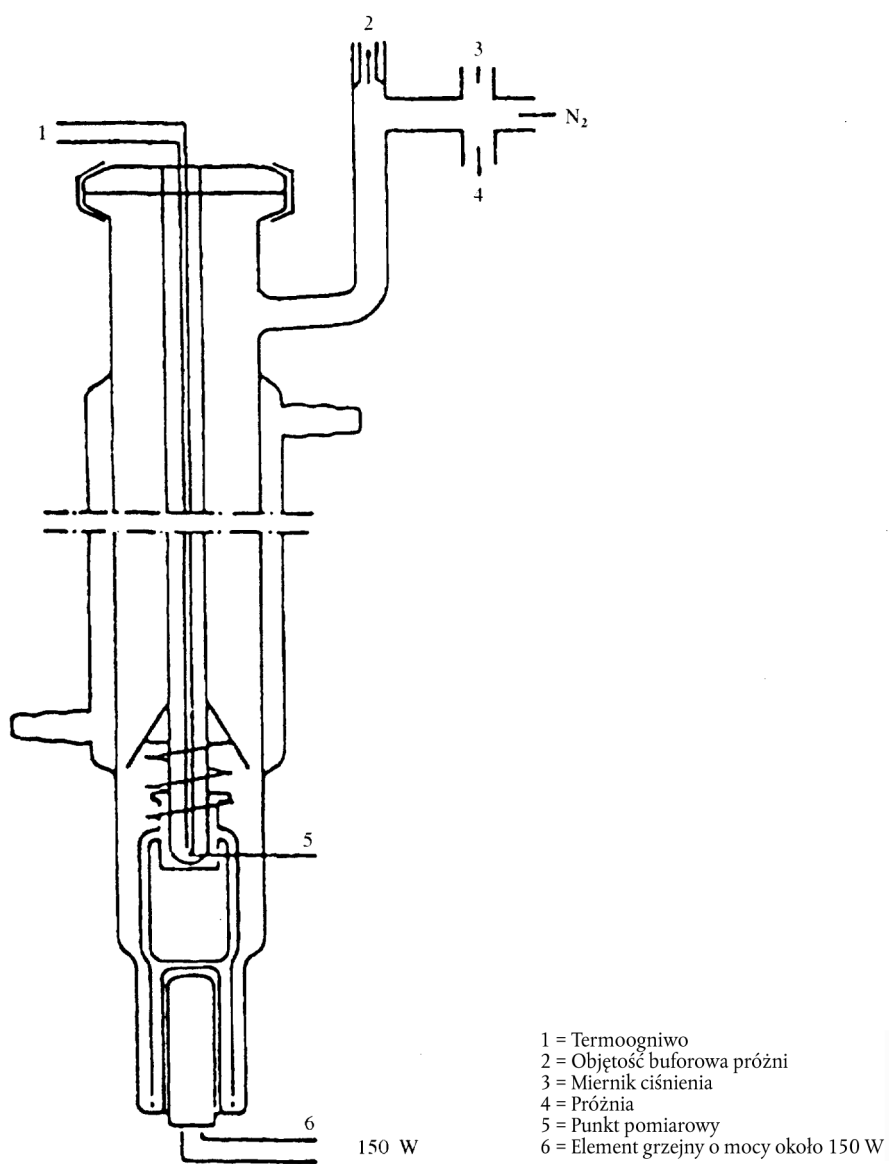
LITERATURA

- (a) K.M. Watson, md. 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

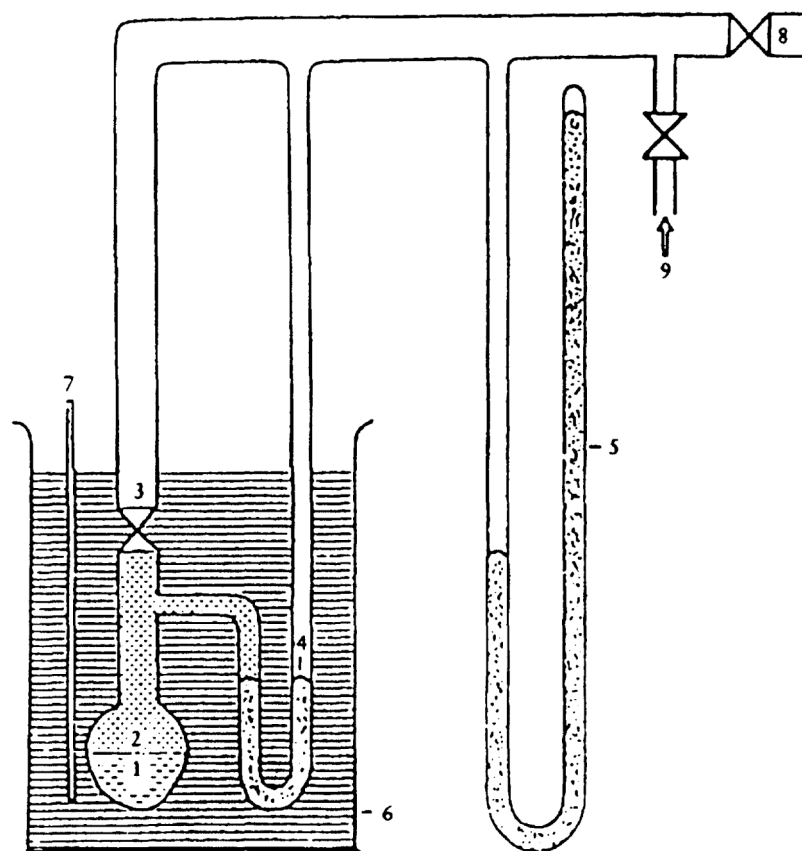
Rysunek 1

Przyrząd do wyznaczania krzywej prężności pary zgodnie z metodą dynamiczną



Rysunek 2a

Przyrząd dla wyznaczania krzywej prężności pary zgodnie z metodą statyczną (z użyciem manometru w postaci U - rurki)

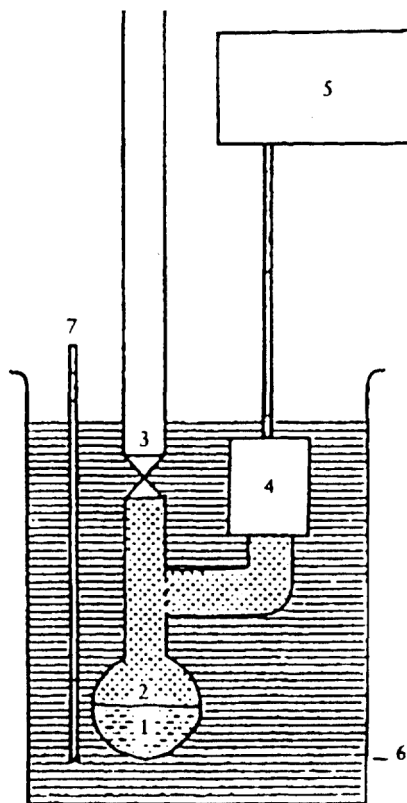


1. Substancja badana
2. Faza pary
3. Zawór wysokiej próżni
4. U - rurka (manometr pomocniczy)
5. Manometr

6. Łaźnia temperaturowa
7. Przyrząd pomiaru temperatury
8. Do pompy próżniowej
9. Wentylacja

Rysunek 2b

Przyrząd dla wyznaczania krzywej prężności pary zgodnie z metodą statyczną (z użyciem wskaźnika ciśnienia)

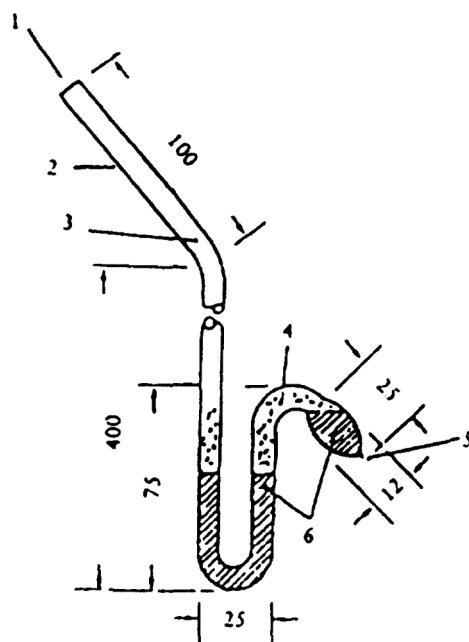


1. Substancja badana
2. Faza pary
3. Zawór wysokiej próżni
4. Miernik ciśnienia

5. Wskaźnik ciśnienia
6. Łaźnia temperaturowa
7. Przyrząd pomiaru temperatury

Rysunek 3

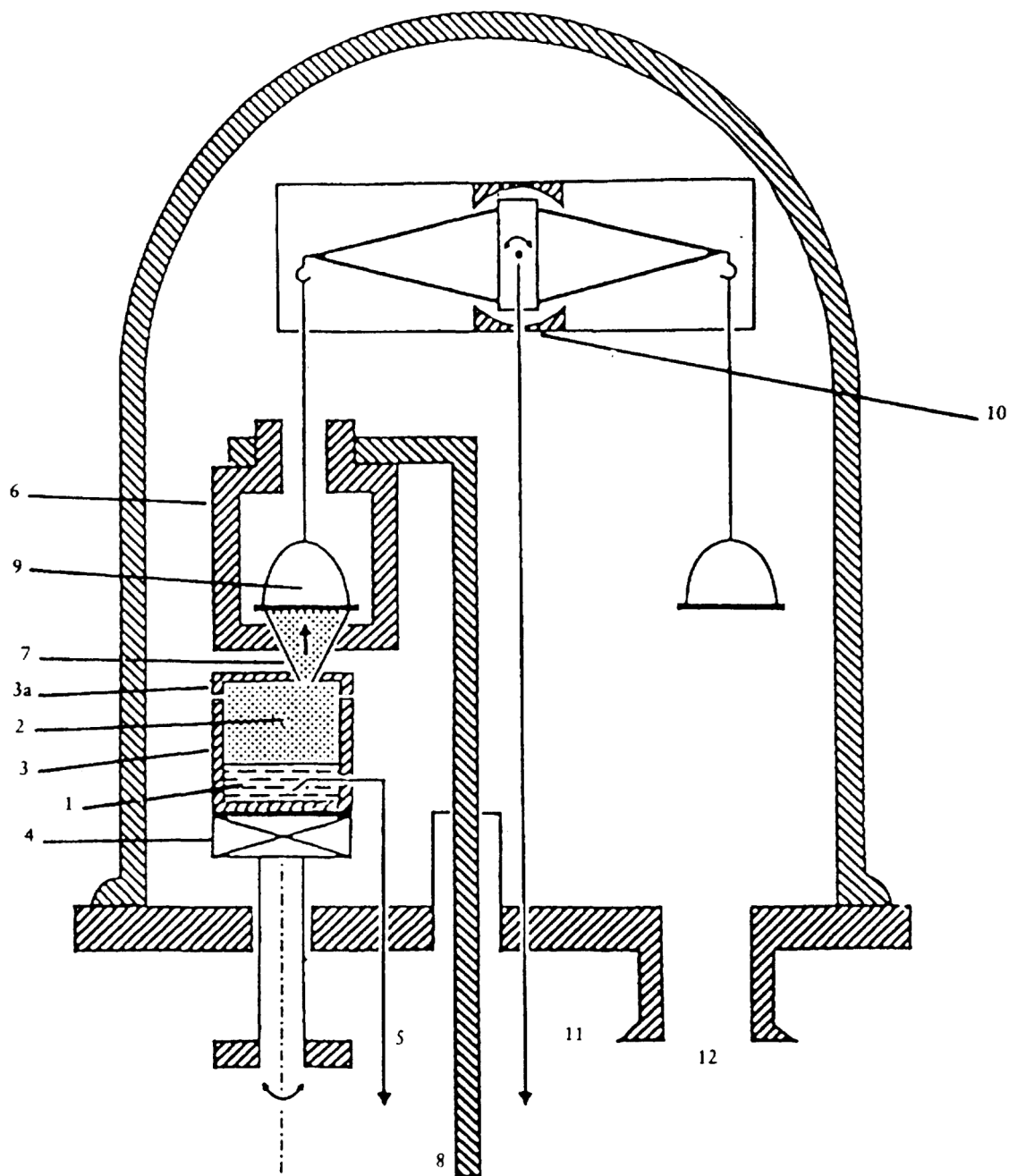
Izoteniskop (patrz pozycja literatury 7)



1. Do systemu sterowania ciśnienia i pomiarowego
2. Rura 8 mm OD
3. Suchy azot do systemu ciśnieniowego
4. Pary próbki
5. Mała końcówka
6. Próbką ciepla

Rysunek 4

Przyrząd dla wyznaczania krzywej prężności pary zgodnie z metodą wagową

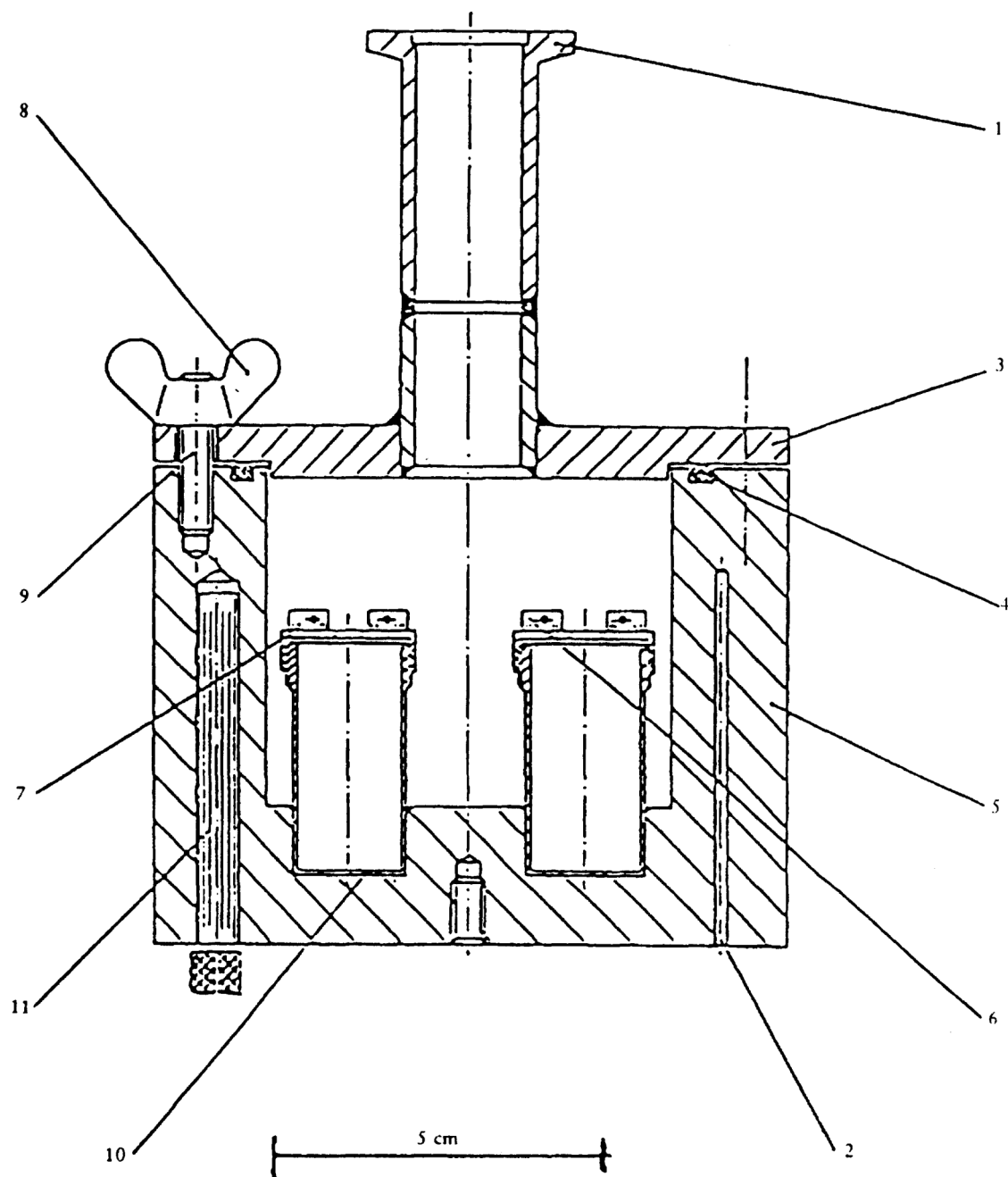


1. Badana substancja
2. Faza pary ze strumieniem pary
3. Wyparka z obrotowym wlotem
- 3a. Pokrywa wyparki z otworem
4. Podgrzewanie wyparki (chłodzenie)
5. Pomiar temperatury próbki
6. Skrzynka chłodnicza

7. Osłona
8. Pręt chłodzący do skrzynki chłodniczej
9. Szala wagi
10. Mikrowaga
11. Do rejestratora
12. Do pompy wysokiej próżni

Rysunek 5

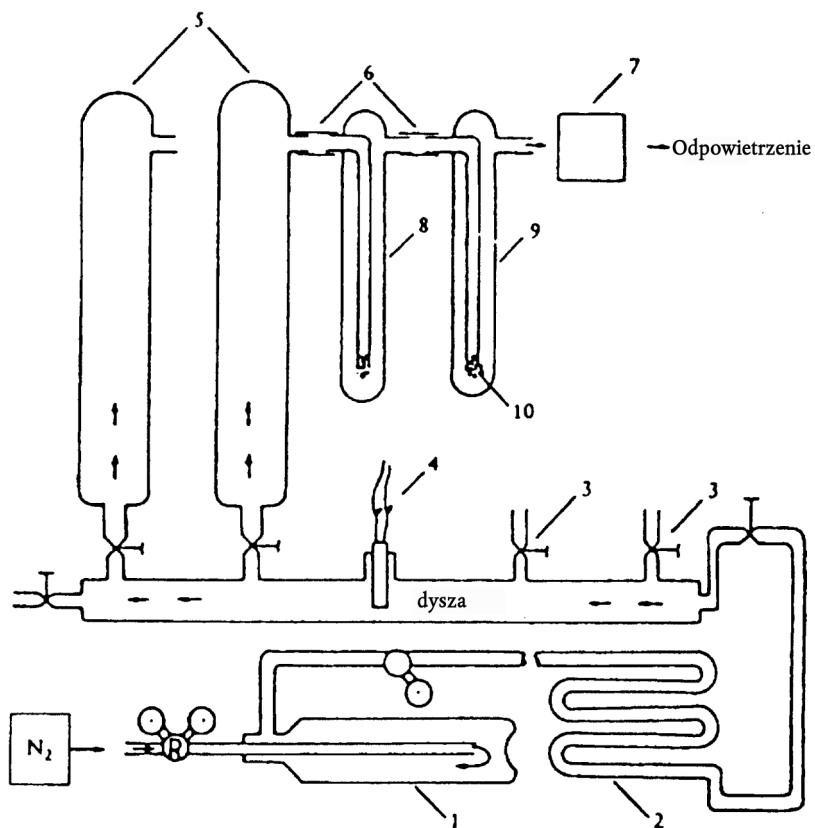
Przykład przyrządu do odparowania w niskim ciśnieniu metodą efuzji, z komórką efuzyjną o objętości 8 cm³



1. Połączenie z próżnią
2. Gniazda dla platynowego termometru oporowego lub pomiaru i sterowania temperaturą (2)
3. Pokrywa zbiornika próżniowego
4. O-ring
5. Aluminiowy zbiornik próżniowy
6. Przyrząd do instalacji i wyjmowania komórek efuzyjnych
7. Gwintowana pokrywa
8. Nakrętki motylkowe (6)
9. Śruby (6)
10. Komórki efuzyjne ze stali nierdzewnej
11. Wkłady grzałek (6)

Rysunek 6a

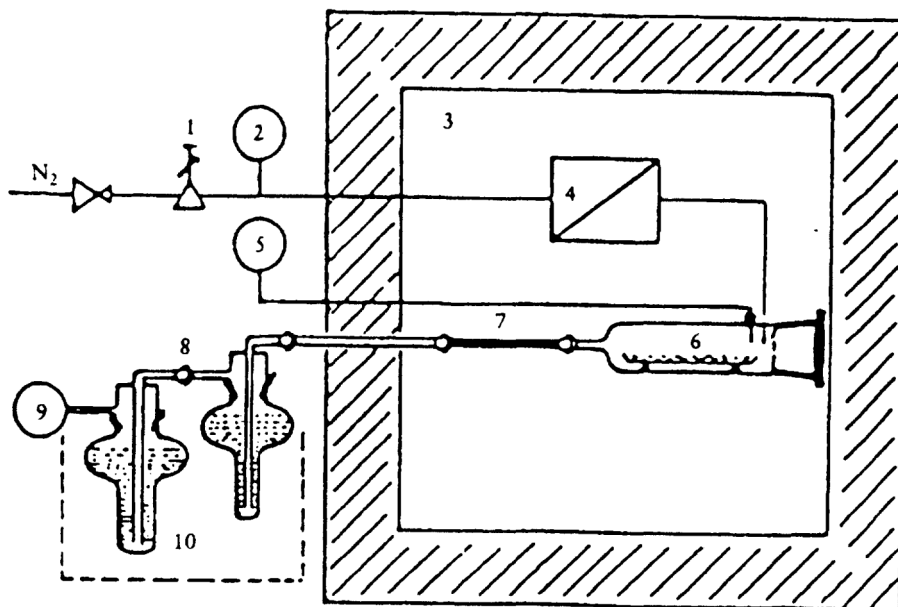
Przykład systemu przepływu do oznaczania prężności pary metodą saturacji gazem



- 1 = Regulator przepływu
- 2 = Wymiennik ciepła
- 3 = Zawory igłowe
- 4 = Czujnik względnej wilgotności
- 5 = Kolumny saturacyjne
- 6 = Złącza PTFE
- 7 = Miernik przepływu
- 8 = Pułapka (absorber)
- 9 = Łapacz oleju
- 10 = Barboter

Rysunek 6b

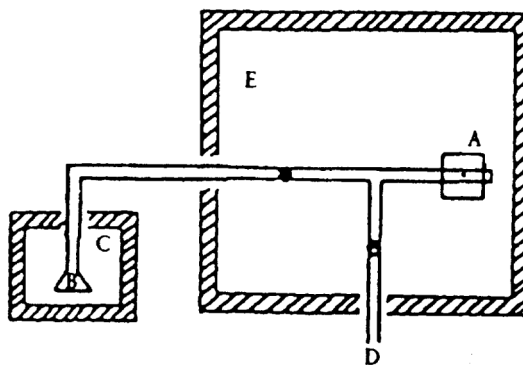
Przykład systemu do oznaczania prężności pary metodą saturacji gazem, z kapilarą umieszczoną za komorą saturacji



- | | |
|--|---------------------------|
| 1. Miernik przepływu masy termicznej | 6. Komora nasycania gazem |
| 2. Manometr | 7. Kapilara |
| 3. Komora sterowana temperaturowo | 8. Naczynia absorpcyjne |
| 4. Termostatowana wężywnica dla gazu nośny | 9. Miernik gazu |
| 5. Termometr (pt 100) | 10. Zimna pułapka |

Rysunek 7

Przykład doświadczalnego zestawu dla metody wirującego rotora

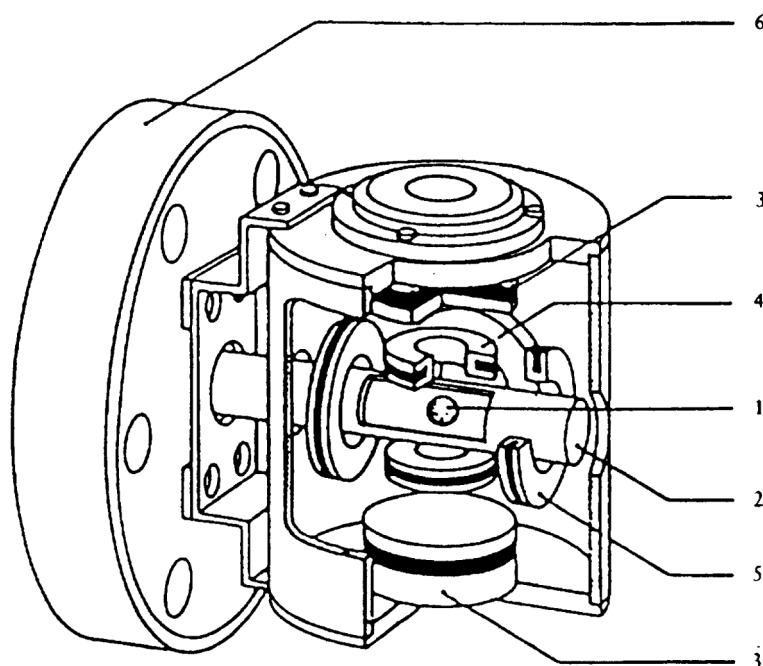


Przyrząd do pomiaru prężności pary

- A. głowica czujnika wirującego rotora;
 B. komórka próbki;
 C. termostat;
 D. linia próżni (pompa turbinowa);
 E. powietrzny termostat.

Rysunek 8

Przykład głowicy pomiarowej wirującego rotora



1. Kula
2. Przedłużenie płytowe do odpompowania poprzez 6
3. Stałe magnesy (2)
4. Cewki stabilizacji pionowej (2)
5. Cewki napędowe (4)
6. Kołnierz łączący

A.5. NAPIĘCIE POWIERZCHNIOWE

1. METODA

Większość opisanych metod oparto na wytycznych OECD dotyczących badań (1). Podstawowe zasady podano w lit. 2).

1.1. WPROWADZENIE

Opisywane metody są stosowane do pomiarów napięcia powierzchniowego roztworów wodnych.

Przed przeprowadzeniem tych badań dobrze jest mieć wstępne informacje na temat rozpuszczalności w wodzie, budowy, właściwości hydrolitycznych i stężenia krytycznego dla tworzenia się micelli substancji.

Poniższe metody można stosować w odniesieniu do większości substancji chemicznych, bez jakichkolwiek ograniczeń związanych z ich stopniem czystości.

Pomiar napięcia powierzchniowego metodą tensjometru pierścieniowego jest zastrzeżony wyłącznie dla roztworów wodnych o lepkości dynamicznej mniejszej niż około 200 mPa s.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Jako napięcie powierzchniowe określa się entalpię wolnej powierzchni na jednostkę pola powierzchni.

Napięcie powierzchniowe jest podawane jako:

N/rn (układ SI) lub

mN/m (układ SI)

1 N/m = 10^3 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyna/cm w nieważnym systemie CGS

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

Substancje odniesienia, które obejmują szeroki zakres napięć powierzchniowych, podano w pozycjach 1 i 3 literatury.

1.4. ZASADA METOD

Metody te opierają się na pomiarach maksymalnej siły, jaką trzeba wywierać pionowo na mieszadło lub pierścien w kontakcie z powierzchnią badanej cieczy umieszczonej w naczyniu miarowym, aby oddzielić ją od tej powierzchni, bądź też na płytce, której krawędź wchodzi w kontakt z powierzchnią, aby pociągnąć do góry utworzoną błonkę.

Substancje o rozpuszczalności w wodzie przynajmniej w stężeniu 1 mg/l badane są w roztworach wodnych w pojedynczych stężeniach.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Metody te zapewniają większą precyzję niż wymagana na ogół do ocen przy przeglądach środowiskowych.

1.6. OPIS METOD

Roztwór substancji przygotowuje się w wodzie destylowanej. Stężenie tego roztworu powinno wynosić 90% rozpuszczalności nasycenia w wodzie, jeżeli to stężenie przekracza 1 g/l, do badania stosuje się stężenie 1 g/l. Nie podlegają badaniu substancje, których rozpuszczalność w wodzie jest mniejsza niż 1 mg/l.

1.6.1. **Metoda płytkowa**

Patrz: ISO 304 i NF T 73-060 (Surface active agents - determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Metoda zawieszki**

Patrz: ISO 304 and NF T 73-060 (Surface active agents - determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Metoda pierścieniowa**

Patrz: ISO 304 and NF T 73-060 (Surface active agents - determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **Zharmonizowana metoda pierścieniowa OECD**

1.6.4.1. *Przyrząd*

Do tego pomiaru można wykorzystać dostępne w handlu tensjometry. Składają się one z następujących elementów:

— ruchomy stół próbki,

— system pomiaru siły,

— ciało pomiarowe(pierścień)

— naczynie pomiarowe.

1.6.4.1.1. Ruchomy stół próbkki

Ruchomy stół z próbką jest wykorzystywany jako wspornik dla naczynia pomiarowego z kontrolowaną temperaturą, w którym znajduje się badana ciecz. Razem z układem do pomiaru siły stół ten jest montowany na stojaku.

1.6.4.1.2. System pomiaru siły

Układ do pomiaru siły (patrz rysunek) mieści się ponad stołem z próbką. Błąd pomiaru siły nie może przekraczać $\pm 10^{-6}$ N, co odpowiada granicy błędu wynoszącej $\pm 0,1$ mg w przypadku pomiaru masy. W większości przypadków skalę pomiarową dostępnych na rynku tensjometrów kalibruje się w mN/m, tak aby napięcie powierzchniowe można było odczytywać bezpośrednio w mN/m, z dokładnością do 0,1 mN/m.

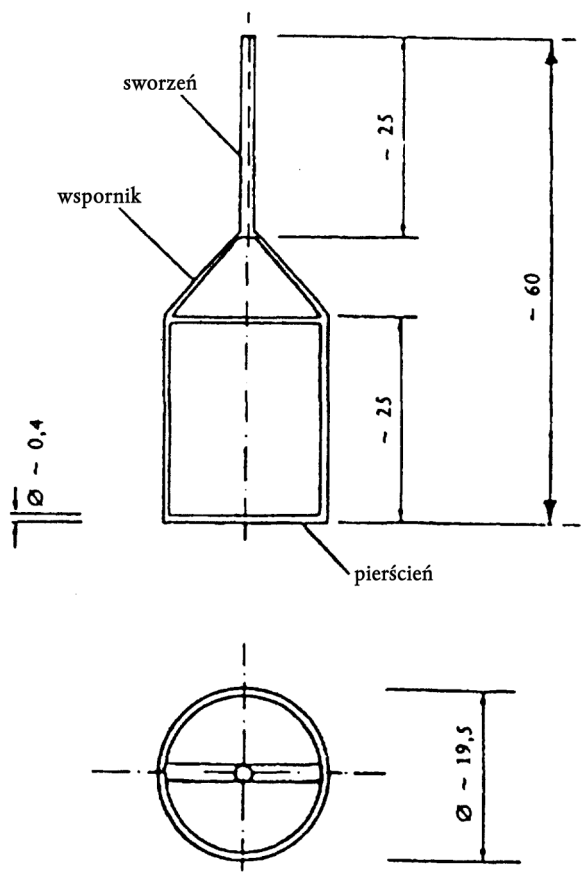
1.6.4.1.3. Ciało pomiarowe (pierścień)

Pierścień na ogół jest wykonany z drutu platynowo - irydowego o grubości około 0,4 mm i średnim obwodzie 60 mm. Pierścień drutu zwiesza się horyzontalnie z metalowego sworznia i drucianego wspornika, tak aby stworzyć połączenie z układem do pomiaru siły (patrz rysunek).

Rysunek

Ciało pomiarowe

(Wszystkie wymiary wyrażone w milimetrach)



1.6.4.1.4. Naczynie pomiarowe

Naczynie pomiarowe z badanym roztworem musi być naczyniem szklanym z kontrolowaną temperaturą. Musi być tak zaprojektowane, aby w trakcie pomiaru temperatura roztworu badanego i fazy gazowej nad jego powierzchnią pozostały stałe, a próbka nie mogła wyparować. Dopuszczalne są cylindryczne, szklane naczynia o średnicy wewnętrznej nie mniejszej niż 45 mm.

1.6.4.2. Przygotowanie przyrządu

1.6.4.2.1. Czyszczenie

Szklane naczynia muszą być starannie oczyszczone. W razie potrzeby należy je przepłukać gorącym kwasem chromowo - siarkowym, a następnie kwasem fosforowym o konsystencji syropu (od 83 do 98% wagowo H_3PO_4), potem starannie przepłukać pod wodą z kranu, a wreszcie umyć dwukrotnie destylowaną wodą do uzyskania reakcji obojętnej, a na końcu wysuszyć lub przepłukać częścią płynnej próbki mierzanej.

Pierścień należy najpierw starannie opłukać w wodzie w celu usunięcia wszelkich substancji rozpuszczalnych w tej cieczy, następnie na krótki czas zanurzyć w kwasie chromowo - siarkowym, później umyć dwukrotnie destylowaną wodą do uzyskania reakcji obojętnej, a na końcu krótko podgrzać nad płomieniem metanolowym.

Uwaga:

Zanieczyszczenia substancjami, które nie ulegają rozpuszczeniu ani zniszczeniu wskutek oddziaływania kwasu chromo-siarkowego lub fosforowego, takimi jak silikony, należy usunąć przy pomocy odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego.

1.6.4.2.2. Kalibracja przyrządu

Weryfikacja przyrządu polega na sprawdzeniu punktu zerowego i takim jego wyregulowaniu, aby wskazania instrumentu pozwalały na niezawodne oznaczenia w mN/m.

Montaż:

Przyrząd musi być wypoziomowany, na przykład przy pomocy poziomnicy alkoholowej u podstawy tensjometru, przez wyregulowanie śrub poziomujących u podstawy.

Ustawienie punktu zero:

Po zamontowaniu pierścienia na przyrządzie, przed jego zanurzeniem w cieczy, wskazania tensjometru należy wyregulować do zera i sprawdzić, czy pierścień jest ustawiony równolegle do powierzchni cieczy. W tym celu powierzchnię cieczy można wykorzystać jako lustro.

Kalibracje:

Kalibrację przy pomocy rzeczywistego badania można dokonać przy pomocy jednej z dwóch procedur:

- a) używając masę: procedura wykorzystująca koniki wagi o znanej masie od 0,1 do 1,0 g umieszczane na pierścieniu. Współczynnik kalibracyjny Φ_a , przez który należy pomnożyć wszystkie wskazania instrumentu, należy ustalić według następującego wzoru (1):

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

gdzie:

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

m = masa konika wagi (g)

g = przyspieszenie grawitacyjne (981 cm/sek² na wysokości poziomu morza)

b = średni obwód pierścienia (cm)

σ = odczyt tensjometru po umieszczeniu konika na pierścieniu (mN/m).

- b) używając wodę: procedura stosująca czystą wodę, której napięcie powierzchniowe, przy na przykład 23 °C jest równe 72,3 mN/m. Niniejsza procedura jest wykonywana szybciej niż kalibracja wagowa, lecz występuje przy niej zawsze niebezpieczeństwo, że napięcie powierzchniowe wody jest zafałszowane śladowymi zanieczyszczeniami związków powierzchniowo-czynnych.

Współczynnik kalibracyjny Φ_b , przez który należy pomnożyć wszystkie wskazania instrumentu, należy ustalić według następującego wzoru (2):

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

gdzie:

σ_o = cytowana w literaturze wartość napięcia powierzchniowego wody (mN/m)

σ_g = zmierzona wartość napięcia powierzchniowego wody (mN/m)

obie w tej samej temperaturze.

1.6.4.3. Przygotowanie próbek

Należy sporządzić roztwory wodne badanych substancji, używając odpowiednich stężeń w wodzie. Nie mogą one zawierać substancji w stanie nierozpuszczonym.

Roztwór należy utrzymywać w stałej temperaturze ($\pm 0,5$ °C). Ponieważ napięcie powierzchniowe roztworu w naczyniu pomiarowym zmienia się w czasie, należy wykonać kilka pomiarów w różnych momentach i nakreślić krzywą pokazującą napięcie powierzchniowe w funkcji czasu. Brak jakichkolwiek dalszych zmian oznacza, że osiągnięto stan równowagi.

Zanieczyszczenie pyłami i gazami innych substancji przeszkadza w pomiarze. Dlatego badanie musi być prowadzone pod przykrywą ochronną.

1.6.5. Warunki badania

Pomiar należy przeprowadzić w temperaturze około 20 °C, która musi być kontrolowana w ten sposób, aby utrzymywała się w zakresie $\pm 0,5$ °C.

1.6.6. Wykonanie badania

Roztwory do pomiaru należy wprowadzić do starannie wyczyszczonego naczynia pomiarowego, dokładając wszelkich starań, aby uniknąć wytwarzania piany, a następnie naczynie umieszcza się na stoliku przyrządu do badań. Błat stolika z naczyniem pomiarowym należy unieść do momentu zanurzenia pierścienia poniżej powierzchni roztworu badanego. Następnie blat stolika opuszcza się stopniowo i równo (z szybkością około 0,5 cm/min), tak aby oddzielić pierścień od powierzchni, do momentu osiągnięcia maksymalnej siły. Warstwa cieczy dołączona do pierścienia nie może się od niego oddzielić. Po wykonaniu pomiarów pierścień należy ponownie zanurzyć poniżej powierzchni i powtórzyć pomiary, aż zostanie osiągnięta stała wartość napięcia powierzchniowego. W przypadku każdego oznaczenia należy zapisać czas od przeniesienia roztworu do naczynia pomiarowego. Odczyty należy wykonywać przy maksymalnej sile potrzebnej do oderwania pierścienia od powierzchni cieczy.

2. DANE

W celu obliczenia napięcia powierzchniowego wartość odczytaną w mN/m na przyrządzie należy na początku pomnożyć przez współczynnik kalibracyjny Φ_a lub Φ_b (zależnie od zastosowanej procedury kalibracyjnej). Da to wartość jedynie przybliżoną, dlatego wymaga korekcji.

Harkins i Jordan (4) empirycznie ustalili współczynniki korekcji dla wartości napięcia powierzchniowego zmierzonych metodą pierścienia. Zależą one od wymiarów pierścienia, gęstości cieczy i napięcia powierzchniowego tej ostatniej.

Ponieważ ustalanie współczynnika korekcji dla każdego kolejnego pomiaru na podstawie tabel Harkinsa i Jordana jest pracochłonne, do obliczenia napięcia powierzchniowego roztworów wodnych można wykorzystać procedurę uproszczoną wykonywania odczytów skorygowanych wartości napięcia powierzchniowego bezpośrednio z tabeli. (W przypadku gdy odczytane wartości znajdują się między tymi, które podano w tabeli, należy zastosować interpolację.)

TABELA: KOREKCJA ZMIERZONEGO NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO

Tylko dla roztworów wodnych, $p = 1 \text{ g/cm}^3$

$R = 9,55 \text{ mm}$ (średni promień pierścienia)

$r = 0,185 \text{ mm}$ (promień drutu pierścienia)

Wartość doświadczalna (mN/m)	Wartość skorygowana (mN/m)	
	Kalibracja wagowa (patrz 1.6.4.2.2(a))	Kalibracja wodą (patrz 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	—

Niniejsza tabela została zestawiona na podstawie poprawki Harkinsa - Jordana. Jest ona zbliżona do tej w normie (DIN 53914) dla wody i roztworów wodnych (gęstość $p = 1 \text{ g/cm}^3$) i dla dostępnych w handlu pierścieni o wymiarach $R = 9,55 \text{ mm}$ (średni promień pierścienia) i $r = 0,185 \text{ mm}$ (promień drutu pierścienia). W tabeli podano skorygowane wartości pomiarów napięcia powierzchniowego wykonanych po kalibracji odważnikowej lub przy pomocy wody.

Alternatywnie, bez poprzednio opisanej kalibracji, napięcie powierzchniowe można obliczyć na podstawie następującego wzoru:

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

gdzie:

F = siła zmierzona dynamometrem przy zerwaniu błonki

R = promień pierścienia

f = współczynnik korekcji (1)

3. **SPORZĄDZENIE SPRAWOZDANIA**

3.1. Sprawozdanie z badania

Sprawozdanie z badania zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- zastosowana metoda,
- rodzaj zastosowanej wody lub zastosowanego roztworu,
- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),
- wyniki pomiaru: napięcie powierzchniowe (odczyt), z podaniem zarówno poszczególnych odczytów, jak i ich średniej arytmetycznej oraz skorygowanej średniej (z wzięciem pod uwagę współczynnika przyrządu i tabeli korekcji),
- stężenie roztworu,
- temperatura badania,
- wiek zastosowanego roztworu; w szczególności czas od przygotowania do zmierzenia właściwości roztworu,
- opis zależności napięcia powierzchniowego od czasu po przeniesieniu roztworu do naczynia pomiarowego,
- należy podać wszystkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników, w szczególności w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu skupienia substancji.

3.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Zważywszy że destylowana woda posiada napięcie powierzchniowe 72,75 mN/m w 20 °C, substancje wykazujące napięcie powierzchniowe niższe niż 60 mN/m zgodnie z warunkami niniejszej metody należy uznać za materiały będące powierzchniowo czynnymi.

4. **LITERATURA**

- (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 ROZPUSZCZALNOŚĆ W WODZIE

1. METODA

Opisane metody są oparte na wytycznych OECD dotyczących badań (1).

1.1. WPROWADZENIE

Do przeprowadzenia tego badania przydatne jest posiadanie wstępnych informacji na temat wzoru strukturalnego, ciśnienia pary, stałej dysocjacji i hydrolizy (jako funkcji pH) substancji.

Nie ma pojedynczej metody, która objęłaby cały zakres rozpuszczalności w wodzie.

Dwie metody badań opisane poniżej obejmują cały zakres rozpuszczalności, lecz nie stosuje się ich do substancji lotnych

- jedna z nich dotyczy zasadniczo czystych substancji o niskiej rozpuszczalności ($< 10^{-2}$ gramy na litr) które są stabilne w wodzie; określa się ją jako „metodę wymywania kolumnowego”,
- druga dotyczy zasadniczo czystych substancji o wyższej rozpuszczalności ($> 10^{-2}$ gramy na litr), które są stabilne w wodzie; określa się ją jako „metodę kolby”

Na rozpuszczalność w wodzie badanej substancji w sposób istotny może wpłynąć obecność zanieczyszczeń.

1.2. DEFINICJA I JEDNOSTKI

Rozpuszczalność w wodzie substancji podaje się jako stężenie substancji w wodzie przy nasyceniu masowym w określonej temperaturze. Wartość tę określa się w jednostkach masy na objętość roztworu. Jednostką w układzie SI jest kg/m^3 (można także stosować gram na litr).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

W prostym badaniu wstępnym należy ustalić przybliżoną ilość próbki i czas niezbędny do uzyskania stężenia nasycenia masowego.

1.4.1. Metoda wymywania kolumnowego

Niniejsza metoda jest oparta na wymywaniu wodą substancji badanej z mikrokolumny wypełnionej obojętnym materiałem nośnika, takim jak pręty szklane lub piasek, pokrytych nadmiarem badanej substancji. Rozpuszczalność w wodzie ustala się, gdy stężenie masowe eluatu jest stałe. Przejawia się to wystąpieniem plateau stężenia w funkcji czasu.

1.4.2. Metoda kolby

W ramach zastosowania tej metody substancja (ciała stałe muszą zostać sproszkowane) jest rozpuszczana w wodzie w temperaturze nieco wyższej od temperatury badania. Po uzyskaniu nasycenia mieszaninę schładza się i utrzymuje w temperaturze badania, mieszając ją, jeżeli jest to potrzebne do uzyskania stanu równowagi. Alternatywnie, pomiar może być wykonywany bezpośrednio w badanej temperaturze, jeżeli jest zapewniony przez właściwe pobieranie próbek tak by uzyskać równowagę nasycenia. Następnie oznacza się stężenie masowe substancji w roztworze wodnym, który nie może zawierać żadnych nierozpuszczonych cząstek, przy pomocy odpowiedniej metody analitycznej.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

1.5.1. Powtarzalność

Dla metody wymywania kolumny, < 30% jest osiągalne; dla metody kolby, < 15% powinno być obserwowane.

1.5.2. Czułość

Zależy ona od metody analizy, lecz oznaczenie stężenia masowego do 10 gram na litr może być uzyskane.

1.6. OPIS METODY

1.6.1. Warunki badania

Najkorzystniej jest przeprowadzić badanie w temperaturze $20 \pm 0,5$ °C. Jeżeli podejrzewa się istnienie zależności rozpuszczalności od temperatury (> 3% na °C), należy także zastosować dwie inne wartości temperatury, o co najmniej 10 °C wyższe i niższe od początkowo wybranej temperatury. W takim przypadku należy kontrolować temperaturę w granicach $\pm 0,1$ °C. Wybrana temperatura powinna być utrzymywana na stałym poziomie we wszystkich istotnych częściach sprzętu.

1.6.2. Badanie wstępne

Do około 0,1 g próbki (substancje stałe należy sproszkować) w zamkniętym korkiem szklanym cylindrze miarowym o pojemności 10 ml dodaje się wzrastające ilości wody destylowanej w temperaturze pokojowej, wykonując kolejne etapy pokazane w poniższej tabeli:

0,1 g rozpuszczone w 'x' ml wody	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Przybliżona rozpuszczalność (gramy na litr)	>1 000	1 000 do 200	200 do 100	100 do 50	50 do 10	10 do 1	< 1

Po każdym dodaniu wskazanej ilości wody mieszaninę wstrząsa się energicznie przez 10 minut i kontroluje wzrokowo pod kątem jakichkolwiek nierozpuszczalnych części próbki. Jeżeli po dodaniu 10 ml wody, próbka lub jej część pozostają nierozpuszczone, doświadczenie należy powtórzyć w 100 ml cylindrze miarowym z większą objętością wody. Przy niskiej rozpuszczalności czas wymagany do rozpuszczenia substancji musi być znacząco dłuższy (co najmniej 24 h). Przybliżoną rozpuszczalność podano w tabeli pod taką objętością dodanej wody, w jakiej dochodzi do pełnego rozpuszczenia próbki. Jeżeli substancja jest wciąż nierozpuszczalna, należy zastosować dłuższy czas niż 24 godziny (maksymalnie 96 godzin), lub należy podjąć dalsze rozcieńczanie celem ustalenia czy może być użyta metoda ustalania rozpuszczalności przez wymywanie kolumnowe, czy metoda kolby.

1.6.3. Metoda wymywania kolumnowego

1.6.3.1. Materiał nośnikowy, rozpuszczalnik i eluent

Materiał nośnikowy stosowany w metodzie wymywania kolumnowego powinien być obojętny. Materiałami, które można zastosować, są szklane pręty i krzemionka. Należy zastosować odpowiedni, lotny rozpuszczalnik o jakości odczynnika analitycznego do naniesienia substancji badanej na materiał nośnikowy. Jako eluent należy użyć podwójnie destylowaną w szklanym lub kwarcowym przyrządzie wodę.

Uwaga:

Nie można stosować wody pochodzącej bezpośrednio z wymiennika jonowego.

1.6.3.2. Załadowywanie materiału nośnikowego

Odwaga się około 600 mg materiału nośnikowego i przenosi do kolby okrągłodennej o pojemności 50 ml.

Odpowiednią, odważoną ilość substancji badanej rozpuszcza się w wybranym rozpuszczalniku. Właściwą ilość niniejszego roztworu dodaje się do materiału nośnikowego. Rozpuszczalnik musi zostać całkowicie odparowany, np. w obrotowym przyrządzie wyparnym; w innym razie nie zostanie uzyskane nasycenie wodą nośnika ze względu na zjawiska podziału na powierzchni materiału nośnikowego.

Załadowanie materiału nośnikowego może stwarzać problemy (błędne wyniki), jeżeli substancja badana ulega osadzeniu jako olej lub w innej fazie krystalicznej. Problem ten należy przebadać doświadczalnie i wykonać szczegółowe sprawozdanie.

Załadowany materiał nośnikowy pozostawia się do nasączenia wodą na około dwie godziny w około 5 ml wody, a następnie dodawany jest on do mikrokolumny. Alternatywnie do mikrokolumny można wysypać suchy, załadowany materiał nośnikowy, a następnie wypełnić mikrokolumnę wodą i całość pozostawić do uzyskania stanu równowagi na około dwie godziny.

Procedura badania

Wymywanie substancji z materiału nośnikowego można uzyskać jedną z dwóch metod:

- przy pomocy pompy recyrkulacyjnej (patrz rysunek 1),
- przy pomocy naczynia poziomującego (patrz rysunek 4).

1.6.3.3. Metoda wymywania kolumnowego z pompą recyrkulacyjną

Przyrząd

Schematyczne rozmieszczenie typowego systemu przedstawiona na rysunku 1. Odpowiednia mikrokolumna jest pokazana na rysunku 2, dopuszczalny jest również każdy rozmiar zapewniający spełnienie kryteriów powtarzalności i czułości. Kolumna musi zapewnić przestrzeń słupa cieczy równą co najmniej pięciu objętości wypełnienia wodą i powinna być zdolna do utrzymania minimum pięciu próbek. Alternatywnie jej wymiar może być zmniejszony, jeżeli użyty zostanie gotowy rozpuszczalnik zamieniający początkowe pięć objętości wypełnienia usuniętych wraz z zanieczyszczeniami.

Kolumnę należy podłączyć do pompy recyrkulacyjnej zdolnej do kontrolowanego wydatku około 25 ml/godz. Pompę podłącza się przy pomocy połączeń z politetrafluoroetylenem (P.T.F.E.) i/lub szklanych. Kolumna i pompa po złożeniu powinny mieć wyposażenie umożliwiające pobieranie próbek odcieku i powinny wyrównywać przestrzeń czołową pod ciśnieniem atmosferycznym. Materiał wypełniający kolumnę musi być podtrzymywany małą (5 mm) zatyczką z waty szklanej, która służy także do odfiltrowywania cząstek. Pompa recyrkulacyjna może być na przykład pompą perystaltyczną (należy uważać, aby nie doszło do zanieczyszczenia i/lub adsorpcji na materiale rury) lub membranową.

Procedura pomiarowa

Uruchamia się przepływ przez kolumnę. Zalecane jest stosowanie szybkości przepływu około 25 ml/godz. (odpowiada to 10 wypełnieniom złoża na godzinę dla opisanej tu kolumny). Objętość pierwszych pięciu wypełnień (minimum) odrzuca się w celu usunięcia zanieczyszczeń rozpuszczalnych w wodzie. Następnie uruchamia się pompę recyrkulacyjną, aż do uzyskania równowagi, którą definiuje się jako pięć kolejnych próbek, których stężenie nie różni się o więcej niż $\pm 30\%$ w sposób losowy. Probki te powinny zostać od siebie oddzielone w odstępach czasowych odpowiadających przejściu eluentu w ilości co najmniej 10 wypełnień złoża.

1.6.3.4. Metoda wymywania kolumnowego z naczyniem poziomującym

Przyrząd (patrz rysunki 4 i 3)

Naczynie poziomujące: Podłączenie do naczynia poziomującego wykonuje się przy użyciu szlifowanego złącza szklanego podłączonego przez rurkę z PTFE. Zaleca się stosowanie szybkości przepływu około 25 ml/hr. Kolejne wymywane frakcje należy zebrać i wykonać analizę wybraną metodą.

Procedura pomiarowa

Do ustalenia rozpuszczalności w wodzie wykorzystuje się frakcje ze środkowego zakresu odcieku, gdzie stężenia są stałe ($\pm 30\%$) w co najmniej pięciu kolejnych frakcjach.

W obu przypadkach (stosując pompę recyrkulacyjną lub naczynie poziomujące), drugą serię wykonuje się przy połowie szybkości przepływu pierwszej. Jeżeli wyniki obu serii są zgodne, badanie jest zadowalające; jeżeli istnieje większa pozorna rozpuszczalność przy niższej prędkości przepływu, wtedy znowu należy stosować zmniejszenie tej prędkości o połowę, aż dwie kolejne serie dadzą taką samą rozpuszczalność.

W obu przypadkach (przy użyciu pompy recyrkulacyjnej lub naczynia poziomującego) należy skontrolować frakcje pod kątem obecności substancji koloidalnej przez sprawdzenie, czy nie występuje efekt Tyndalla (rozproszenie światła). Obecność takich cząstek czyni wyniki nieważnymi i badanie należy powtórzyć, poprawiając działanie filtrujące kolumny.

Należy odnotowywać pH każdej próbki. Drugą serię oznaczeń należy przeprowadzić w tej samej temperaturze.

1.6.4. **Metoda kolby**

1.6.4.1. *Przyrząd*

Do zastosowania metody kolby potrzebne są następujące materiały:

- zwykłe, laboratoryjne wyroby szklane i instrumenty,
- urządzenie służące do mieszania roztworów w kontrolowanej, stałej temperaturze,
- wirówka (najlepiej termostatowana), o ile jest potrzebna w przypadku emulsji, oraz
- urządzenia do oznaczeń analitycznych.

1.6.4.2. *Procedura pomiarowa*

Na podstawie badania wstępnego szacuje się ilość materiału niezbędną do nasycenia pożądanej objętości wody. Wymagana ilość wody będzie zależać od metody analitycznej i zakresu rozpuszczalności. Do każdego z trzech naczyń wyposażonych w korki szklane (np. probówek wirówkowych, kolb) odważa się po około pięciokrotności wyżej ustalonej ilości materiału. Wybraną objętość wody dodaje się do każdego naczynia, po czym naczynia należy szczelnie zakorkować. Zamknięte naczynia wytrząsa się następnie w temperaturze 30 °C. (Należy użyć wytrząsarki lub mieszarki, która może działać w stałej temperaturze, np. magnetyczne mieszanie w łaźni wodnej z temperaturą kontrolowaną termostatycznie). Po jednym dniu jedno z naczyń jest usuwane i pozostawione do ustalenia się nowej równowagi przez 24 godziny w temperaturze badania, przy czym od czasu do czasu należy je wstrząsnąć. Zawartość naczynia poddaje się następnie wirowaniu w temperaturze badania i oznacza stężenie klarownej fazy wodnej przy pomocy odpowiedniej metody analitycznej. Pozostałe dwie kolby traktuje się podobnie po początkowym ustaleniu równowagi w temperaturze 30 °C przez, odpowiednio, dwa i trzy dni. Jeżeli wyniki oznaczenia stężenia w co najmniej ostatnich dwóch naczyniach cechują się wymaganą odtwarzalnością, badanie należy uznać za zadowalające. Całe badanie należy powtórzyć, stosując dłuższe okresy ustalania równowagi, jeżeli wyniki dla naczyń 1, 2 i 3 wykazują tendencję do wzrastających wartości.

Procedura pomiarowa może być również wykonana bez wstępnej inkubacji w 30 °C. W celu oceny szybkości ustalania się równowagi nasycenia, pobierane są próbki do chwili, gdy czas mieszania nie wywiera już wpływu na stężenie badanego roztworu.

Należy odnotowywać pH każdej próbki.

1.6.5. **Analiza**

Dla tych oznaczeń najkorzystniejsza jest metoda analityczna specyficzna dla substancji, gdyż małe ilości rozpuszczalnych zanieczyszczeń mogą spowodować duże błędy wyników pomiarów rozpuszczalności. Przykładami takich metod są: chromatografia gazowa lub cieczowa, metody miareczkowania, metody fotometryczne, metody woltametryczne.

2. DANE**2.1. METODA WYMYWANIA KOLUMNOWEGO**

Dla każdej serii należy obliczyć średnią wartość dla co najmniej pięciu kolejnych próbek pobranych z plateau nasycenia, podobnie jak odchylenie standardowe. Wyniki należy podać w jednostkach masy na objętość roztworu.

Średnie obliczone w dwóch badaniach przy różnych przepływach są porównywane i powinny mieć powtarzalność mniejszą niż 30%.

2.2. METODA KOLBY

Należy podać poszczególne wyniki dla każdej z trzech kolb i powinny być one uznane za stałe (powtarzalność mniejsza niż 15%), należy je uśrednić i podać w jednostkach masy na objętość roztworu. Może to wymagać przeliczenia jednostek masy na jednostki objętości, za pomocą gęstości, gdy rozpuszczalność jest bardzo duża (> 100 gramów na litr).

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**3.1. METODA WYMYWANIA KOLUMNOWEGO**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- wyniki badania wstępnego,
- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),
- poszczególne stężenia, prędkości przepływu i pH każdej próbki,
- średnie i odchylenia standardowe dla co najmniej pięciu próbek z plateau nasycenia dla każdej serii,
- średnia z dwóch kolejnych, możliwych do przyjęcia serii,
- temperatura wody w czasie procesu nasycania,
- zastosowana metoda analityczna,
- charakter zastosowanego materiału nośnikowego,
- załadowanie materiału nośnikowego,
- zastosowany rozpuszczalnik,
- dowody niestabilności chemicznej substancji w trakcie badania oraz zastosowana metoda,
- wszystkie informacje stosowne dla interpretacji wyników, szczególnie w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu fizycznego substancji.

3.2. METODA KOLBY

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- wyniki badania wstępnego,
- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),
- poszczególne oznaczenia analityczne i ich średnia, w przypadku gdy więcej niż jedna wartość była oznaczana dla każdej kolby,
- pH każdej próbki,

- średnia wartości dla poszczególnych kolb, które były zgodne,
- temperatura badania,
- zastosowana metoda analityczna,
- dowody niestabilności chemicznej substancji w trakcie badania oraz zastosowana metoda,
- wszystkie informacje stosowne dla interpretacji wyników, szczególnie w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu fizycznego substancji.

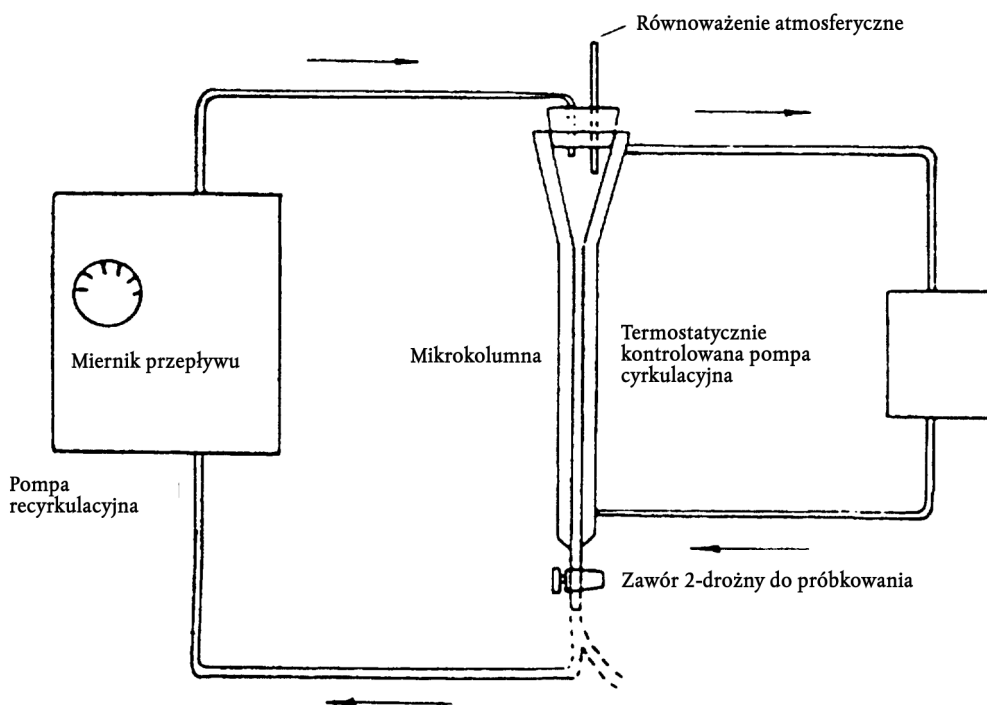
4.

LITERATURA

- (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***Rysunek 1**

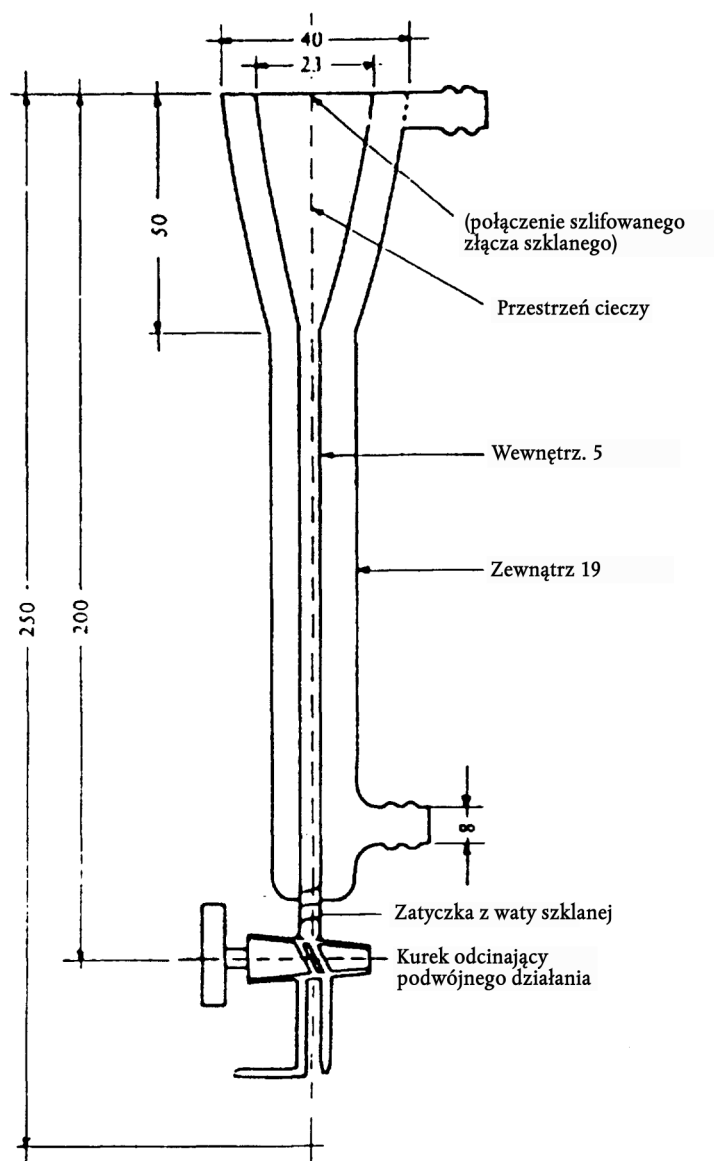
Metoda wymywania kolumnowego z pompą recyrkulacyjną



Rysunek 2

Typowa mikrokolumna

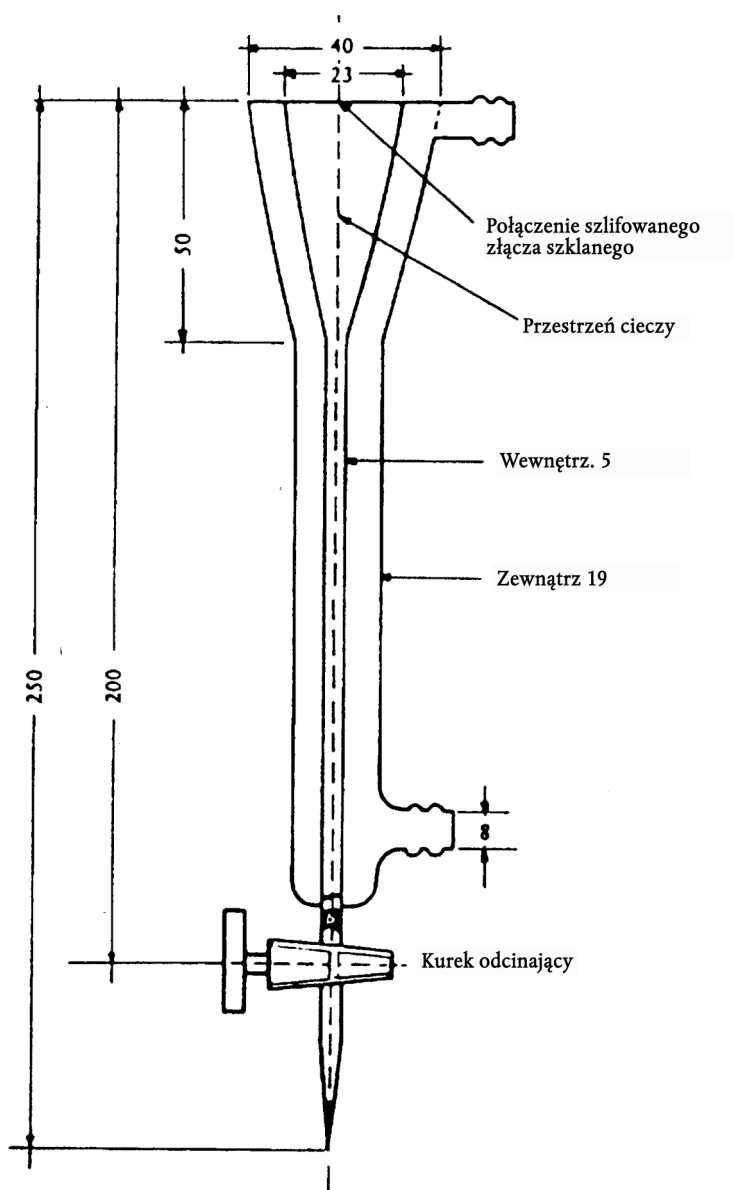
(wszystkie wymiary w milimetrach)



Rysunek 3

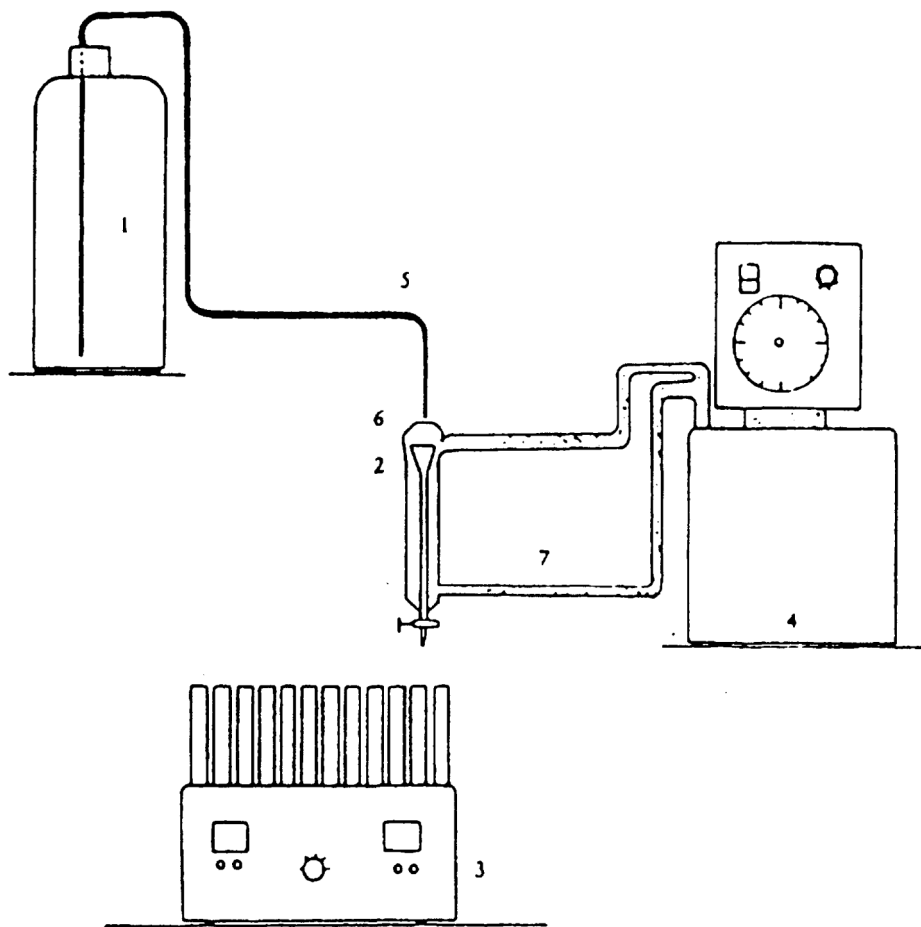
Typowa mikrokolumna

(wszystkie wymiary w milimetrach)



Rysunek 4

Metoda wmywania kolumnowego z naczyniem poziomującym



1 = Naczynie poziomujące (np. 2,5 litrowa kolba)

2 = Kolumna (patrz rysunek 3)

3 = Kolektor frakcji

4 = Termostat

5 = Teflonowe rurki

6 = Szlifowane złącze szklane

7 = Linia wodna (pomiędzy termostatem i kolumną, średnica wewnętrzna: około 8 mm)

A.8. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU

1. METODA

Opisana metoda „wstrząsania kolby” jest oparta na wytycznych OECD dotyczących badań (1).

1.1. WPROWADZENIE

Dla wykonania niniejszego badania korzystne jest posiadanie informacji wstępnych dotyczących wzoru strukturalnego, stałej dysocjacji, rozpuszczalności w wodzie, hydrolizy, rozpuszczalności w n-oktanolu i napięcia powierzchniowego substancji.

Pomiary na substancjach ulegających jonizacji powinny być wykonane tylko na ich niezjonizowanej postaci (wolny kwas lub wolna zasada) uzyskanych przez użycie właściwego buforu o pH co najmniej jedną jednostkę mniejszą (wolny kwas) lub większą (wolna zasada) od pK.

Niniejsza metoda badania zawiera dwie oddzielne procedury: metoda wstrząsania kolby i chromatografii cieczowej wysokiej wydajności (HPLC). Pierwszą stosuje się gdy wartość $\log P_{ow}$ (patrz definicje poniżej) wypada w zakresie - 2 do 4, drugą w zakresie 0 do 6. Przed przeprowadzeniem procedury doświadczalnej, należy wstępnie uzyskać oszacowanie współczynnika podziału.

Metodę wstrząsania kolby stosuje się jedynie do zasadniczo czystych substancji rozpuszczalnych w wodzie i n-oktanolu. Nie stosuje się jej do materiałów powierzchniowo-czynnych (dla takich należy podać wartość obliczoną lub oszacowaną opartą na rozpuszczalności danej substancji w n-oktanolu i w wodzie).

Metody HPLC nie stosuje się dla silnych kwasów i zasad, związków kompleksowych metali, materiałów powierzchniowo-czynnych lub substancji, które reagują z rozpuszczalnikiem wymywającym. Dla takich materiałów należy podać wartość obliczoną lub oszacowaną opartą na rozpuszczalności danej substancji w n-oktanolu i w wodzie.

Metoda HPLC jest mniej czuła na obecność zanieczyszczeń w badanym związku niż metoda wstrząsania kolby. Pomimo tego, zanieczyszczenia w niektórych przypadkach mogą czynić interpretację wyników trudną, ponieważ wyznaczenie piku jest niepewne. Dla mieszanin dających nieczytelne pasmo, należy ustalić górną i dolną granicę $\log P$.

1.2. DEFINICJA I JEDNOSTKI

Współczynnik podziału (P) definiuje się jako stosunek stężeń równowagi (c) substancji rozpuszczonej w układzie dwufazowym, składającym się z dwóch zasadniczo niemieszających się ze sobą rozpuszczalników. W przypadku n-oktanolu i wody:

$$P_{ow} = \frac{C_{n-oknanol}}{C_{wody}}$$

Dlatego współczynnik podziału (P) jest ilorzem dwóch stężeń, przy czym na ogół podaje się go w postaci jego logarytmu o podstawie 10 ($\log P$).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Metoda wstrząsania kolby

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

Metoda HPLC

W celu skorelowania danych zmierzonych metodą HPLC danego związku z jego wartością P, należy ustalić krzywą kalibracji $\log P$ w zależności od danych chromatograficznych używając co najmniej 6 punktów odniesienia. Jest zadaniem użytkownika wybór właściwych substancji odniesienia. W każdym przypadku, gdy będzie możliwe, co najmniej jedna substancja odniesienia powinna posiadać P_{ow} powyżej tego dla substancji badanej, a druga powinna posiadać P_{ow} poniżej substancji badanej. Dla wartości $\log P$ mniejszej niż 4, kalibracja musi być oparta o dane uzyskane metodą wstrząsania kolby. Dla wartości $\log P$ większej od 4, kalibracja powinna być oparta na ważnych wartościach literaturowych, jeżeli są one zgodne z wartościami wyliczonymi. Celem uzyskania lepszej dokładności, zalecane jest wybór takich substancji odniesienia, które są strukturalnie zbliżone do badanej substancji.

Rozszerzone wykazu wartości $\log P_{ow}$ dla wielu grup związków chemicznych są dostępne w pozycjach (2)(3) literatury. Jeżeli dane współczynnika podziału strukturalnie zbliżonych związków nie są dostępne, należy zastosować bardziej ogólną kalibrację, ustaloną w oparciu o inne związki odniesienia.

Wykaz zalecanych substancji odniesienia i ich wartości P_{ow} , podano w dodatku 2.

1.4. ZASADA METODY

1.4.1. **Metoda wstrząsania kolby**

W celu ustalenia współczynnika podziału należy uzyskać równowagę między wszystkimi wchodzącymi w interakcje składnikami układu, przy czym należy ustalić stężenie substancji rozpuszczonych w dwóch fazach. Studia w zakresie literatury na ten temat wskazują, że możliwe jest użycie kilku różnych technik dla rozwiązania niniejszego problemu, to jest poprzez zmieszanie dwóch faz oraz kolejno ich rozdzielenie w celu ustalenia stężenia równowagi badanej substancji.

1.4.2. **Metoda HPLC**

HPLC jest wykonywana na kolumnach analitycznych wypełnionych handlowo dostępną fazą stałą zawierającą długo łańcuchowe węglowodory (np. C_8 , C_{18}) chemicznie związane na krzemionce. Związki chemiczne wstrzyknięte do takiej kolumny przesuwają się w niej z różnymi szybkościami z powodu różnych stopni ich podziału między fazą ruchomą oraz węglowodorową fazą stacjonarną. Mieszaniny związków chemicznych są wymywane w kolejności ich hydrofobowości, pierwsze wymywane są związki chemiczne rozpuszczalne w wodzie, a na końcu związki chemiczne rozpuszczalne w olejach, proporcjonalnie do ich współczynnika podziału między węglowodory oraz wodę. Umożliwia to uzyskanie zależności między czasem retencji na takiej kolumnie (odwrócona faza) i ustalenie współczynnika podziału n-oktanol/woda. Współczynnik podziału jest wyprowadzany ze współczynnika objętości k , podanego wyrażeniem:

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

w której, t_R = czas retencji badanej substancji, t_0 = średni czas przejścia cząsteczek rozpuszczalnika przez kolumnę (czas martwy).

Nie są wymagane analizy ilościowe a konieczne jest tylko oznaczenie czasu wymywania.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

1.5.1. **Powtarzalność**

Metoda wstrząsania kolby

W celu zapewnienia precyzji współczynnika podziału należy przeprowadzić dwukrotne oznaczenia w trzech różnych warunkach badania, przy czym można zmieniać ilość oznaczanej substancji oraz stosunek objętości rozpuszczalników. Ustalone wartości współczynnika podziału wyrażone jako ich wspólne logarytmy powinny zawierać się w przedziale $\pm 0,3$ jednostek logarytmicznych.

Metoda HPLC

W celu zwiększenia poziomu ufności pomiaru, należy wykonać podwójne oznaczenia. Wartości $\log P$ wyprowadzone z poszczególnych pomiarów powinny mieścić się w zakresie $\pm 0,1$ jednostek logarytmicznych.

1.5.2. Czułość*Metoda wstrząsania kolby*

Zakres pomiarowy metody ustala się na podstawie granicy wykrywalności procedury analitycznej. Powinno to pozwalać na ocenę wartości $\log P_{ow}$ w zakresie -2 do 4 (wyjątkowo gdy zezwalają warunki, niniejszy zakres może być rozszerzony do $\log P_{ow}$ do 5) gdy stężenie rozpuszczenia w jednej z faz jest nie większe niż 0,01 mola na litr.

Metoda HPLC

Metoda HPLC umożliwia ocenę współczynnika podziału w zakresie $\log P_{ow}$ od 0 do 6.

Zwykle, współczynnik podziału danego związku może być oszacowany z dokładnością w obrębie zakresu ± 1 jednostki logarytmicznej wartości uzyskanej z metody wstrząsania kolby. Typowe korelacje można znaleźć w pozycjach (4)(5)(6)(7)(8) literatury. Wyższą dokładność można zwykle uzyskać, gdy krzywe korelacji są oparte na strukturalnie zbliżonych związkach odniesienia (9).

1.5.3. Specyficzność*Metoda wstrząsania kolby*

Prawo podziału Nernsta obowiązuje jedynie w warunkach stałej temperatury, stałego ciśnienia i stałego pH, w przypadku rozcieńczonych roztworów. W sposób ścisły dotyczy czystej substancji zdyspergowanej między dwoma czystymi rozpuszczalnikami. Istnienie kilku różnych substancji rozpuszczonych w jednej lub dwóch fazach może wpłynąć na uzyskane wyniki.

Zjawiska dysocjacji lub asocjacji rozpuszczonych cząsteczek prowadzą do odchyień od prawa podziału Nernsta. Na takie odchylenia wskazuje fakt, że współczynnik podziału staje się zależny od stężenia roztworu.

Ze względu na szereg różnych badanych stanów równowagi, ta metoda badania nie powinna być stosowana w odniesieniu do związków ulegających jonizacji bez zastosowania korekcji. Należy rozważyć użycie roztworów buforowych w miejsce wody dla takich związków; pH buforu powinno różnić się najmniej o jedną jednostkę pH od pKa substancji i być w zgodności z pH badanego środowiska.

1.6. OPIS METODY**1.6.1. Wstępna ocena współczynnika podziału**

Bardziej wskazana jest ocena współczynnika podziału za pomocą metody obliczeniowej (patrz dodatek 1), lub jeśli stosowne, ze stosunków rozpuszczalności badanej substancji w czystych rozpuszczalnikach (10).

1.6.2. Metoda wstrząsania kolby**1.6.2.1. Przygotowanie**

n-oktanol: oznaczenie współczynnika podziału należy wykonać przy użyciu odczynnika jakości analitycznej o wysokiej czystości.

Woda: należy użyć wody destylowanej lub dwa razy destylowanej z przyrządu szklanego lub kwarcowego. Jeżeli jest uzasadnione, dla związków ulegających jonizacji, należy użyć roztworów buforowych w miejsce wody.

Uwaga:

Nie można stosować wody pochodzącej bezpośrednio z wymiennika jonowego.

1.6.2.1.1. Wstępne nasycenie rozpuszczalników

Przed ustaleniem współczynnika podziału wykonuje się wzajemne nasycenie faz układu rozpuszczalników przez wytrząsanie w temperaturze prowadzenia eksperymentu. Aby to uzyskać, wygodnie jest zastosować wytrząsanie dwóch dużych butli magazynowych z n-oktanołem lub wodą wysokiej czystości do analiz z wystarczającą ilością drugiego rozpuszczalnika, przez 24 godziny, na mechanicznej wytrząsarce, a następnie odstawienie ich na okres tak długi, aby doszło do rozdzielenia faz i uzyskania stanu nasycenia.

1.6.2.1.2. Przygotowanie do badania

Cała objętość układu dwufazowego powinna prawie wypełniać naczynie do badania. Pomoże to w niedopuszczeniu do utraty materiału z powodu jego ulatniania się. Stosunek objętościowy i ilości substancji, które należy zastosować, ustala się na podstawie następujących informacji:

- wstępna ocena współczynnika podziału (patrz powyżej),
- minimalna ilość substancji badanej wymagana do procedury analitycznej oraz
- ograniczenie maksymalnego stężenia w każdej z faz do 0,01 mola na litr.

Przeprowadza się trzy badania. W pierwszym używa się wyliczonej wielkości stosunku n-oktanolu do wody; w drugim ten stosunek dzieli się przez dwa; i w trzecim stosunek ten mnoży się przez dwa (np. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Substancja badana

Roztwór podstawowy przygotowuje się w n-oktanolu wstępnie nasyconym wodą. Stężenie takiego roztworu podstawowego musi być precyzyjnie oznaczone, przed użyciem go w oznaczaniu współczynnika podziału. Roztwór ten powinien być przechowywany w warunkach zapewniających jego stabilność.

1.6.2.2. Warunki badania

Powinna być utrzymywana stała temperatura badania (± 1 °C) i mieścić się w zakresie od 20 do 25 °C.

1.6.2.3. Procedura pomiarowa

1.6.2.3.1. Ustalenie równowagi podziału

Dla każdego z warunków badania należy przygotować po dwa naczynia do badań zawierające wymagane, dokładnie odmierzone ilości obu rozpuszczalników, łącznie z niezbędną ilością roztworu podstawowego.

Fazy n-oktanolu powinny być mierzone objętościowo. Naczynia do badania należy albo ustawić na odpowiedniej wytrząsarce albo wytrząsać w ręce. Przy zastosowaniu wirowania probówki, zalecaną metodą jest obrócić szybko probówkę o około 180° względem jej poprzecznej osi, tak by nie doprowadzić do jakiegokolwiek wzrostu ilości powietrza w obu fazach. Doświadczenie pokazało, że 50 takich obrotów jest zwykle wystarczające dla ustalenia równowagi podziału. Dla pewności zaleca się 100 obrotów w ciągu pięciu minut.

1.6.2.3.2. Rozdzielenie faz

Jeżeli jest konieczne w celu rozdzielenia faz, należy zastosować wirowanie mieszaniny. Do tego celu należy użyć wirówki laboratoryjnej utrzymywanej w temperaturze pokojowej, bądź też, w razie wykorzystywania wirówki o niekontrolowanej temperaturze, należy zapewnić uzyskanie ponownego stanu równowagi probówek do wirówki w temperaturze badania na co najmniej jedną godzinę przed analizą.

1.6.2.4. Analiza

W celu oznaczenia współczynnika podziału konieczne jest ustalenie stężenia substancji badanej w obu fazach. Można tego dokonać przez pobranie podwielokrotności każdej z obu faz z każdej z probówek dla każdego warunków badania i poddanie tych podwielokrotności analizie ich przy użyciu wybranej procedury. Należy obliczyć całkowitą ilość substancji obecnej w obu fazach i porównać ją z ilością pierwotnie wprowadzonej substancji.

Należy pobrać próbki fazy wodnej przy użyciu procedury zmniejszającej do minimum ryzyko pobrania śladów n-oktanolu: do pobrania próbki fazy wodnej można użyć szklanej strzykawki z wyjmowaną igłą. Strzykawka powinna zostać na początku częściowo wypełniona powietrzem. Należy delikatnie wypchnąć powietrze, wprowadzając igłę przez warstwę n-oktanolu. Pobiera się odpowiednią objętość fazy wodnej do strzykawki. Następnie strzykawkę szybko wyjmuje się z roztworu i odłącza igłę. Zawartość strzykawki można wykorzystać jako próbkę fazy wodnej. Najkorzystniej jest ustalić stężenie w dwóch rozdzielonych fazach przy użyciu metody specyficznej dla substancji. Przykładami właściwych metod analitycznych są:

- metody fotometryczne,
- chromatografia gazowa,
- wysokosprawna chromatografia cieczowa.

1.6.3. Metoda HPLC

1.6.3.1. Przygotowanie

Przyrząd

Wymagany jest chromatograf cieczowy, wyposażony w bez impulsową pompę i odpowiednie urządzenie do wykrywania. Zalecane jest użycie zaworu wtryskowego z obiegiem wtrysku. Obecność grup polarnych w fazie stacjonarnej może poważnie zakłócić działanie kolumny HPLC. Zatem fazy stacjonarne powinny posiadać minimalną zawartość grup polarnych (11). Można stosować dostępne w handlu mikrocząsteczkowe wypełnienia dla fazy odwróconej lub gotowe wypełnione kolumny. Kolumna ochronna powinna być umieszczona między systemem wtrysku a kolumną analityczną.

Faza ruchoma

Do przygotowania rozpuszczalnika wymywającego, odgazowywanego przed użyciem, używa się metanolu oraz wody o czystości HPLC. Wykorzystuje się elucję izokratyczną. Należy zastosować stosunki metanol/-woda o minimalnej zawartości wody 25%. Mieszanina metanol-woda o typowym stosunku 3:1 (obj.) jest zadawalająca do wymywania związków o $\log p$ 6 w ciągu jednej godziny, przy szybkości przepływu 1 ml/mm. Dla związków o wysokim $\log P$ it może być konieczne skrócenie czasu elucji (oraz związków odniesienia) poprzez zmniejszenie polarności fazy ruchomej lub długości kolumny.

Substancje o bardzo niskiej rozpuszczalności w n-oktanolu wykazują tendencję do dawania nienormalnie niskich wartości $\log P_0$ przy metodzie HPLC; piki takich związków czasem towarzyszą czołu rozpuszczalnika. Zjawisko to jest prawdopodobnie związane z faktem, że proces podziału jest za powolny do uzyskania równowagi w czasie brany pod uwagę przy zwykłym rozdzielaniu metodą HPLC. Zmniejszenie szybkości przepływu i/lub obniżenie stosunku metanol/woda może być zatem w tym przypadku skuteczne do osiągnięcia rzeczywistej wartości.

Związki badane i odniesienia muszą być rozpuszczalne w fazie ruchomej w stężeniach wystarczających do umożliwienia ich wykrycia. Tylko w wyjątkowych przypadkach można zastosować dodatki do mieszaniny metanol/woda, ponieważ dodatki zmieniają właściwości kolumny. Dla chromatogramów z dodatkami obowiązkowe jest użycie oddzielnej kolumny tego samego typu. Jeśli układ metanol-woda nie jest odpowiedni, można użyć innych mieszanin organicznych rozpuszczalników, na przykład etanol-woda lub acetonitryl - woda.

Wartość pH eluentu jest krytyczna dla związków ulegających jonizacji. Powinno być ono w obrębie zakresu roboczego pH kolumny, które zwykle wynosi między 2 i 8. Zalecane jest buforowanie. Należy zachować ostrożność, aby nie dopuścić do wytrącania się soli i zniszczenia kolumny, co zachodzi dla niektórych mieszanin faza organiczna/bufor. Pomiar HPLC faz stacjonarnych opartych na krzemionce powyżej pH 8 nie są polecane, gdyż użycie zasadowej fazy ruchomej powoduje gwałtowne pogorszenie się wydajności kolumny.

Substancje rozpuszczone

Związki odniesienia powinny być o najwyższej dostępnej czystości. Związki używane do celów badania lub kalibracji są rozpuszczone, o ile to możliwe, w fazie ruchomej.

Warunki badania

Temperatura w trakcie wykonywania pomiarów nie może zmieniać się więcej niż ± 2 K.

1.6.3.2. Pomiar

Obliczenie czasu martwego t_0

Czas martwy t_0 ustala się albo przez zastosowanie szeregów homologicznych (np. n-alkilometyloketonów) albo nieustalonych związków organicznych (np. tiomocznik lub formamid). Dla obliczenia czasu martwego t_0 z użyciem szeregów homologicznych, zestaw co najmniej siedmiu reprezentantów szeregu jest wtryskiwany i oznacza się poszczególne czasy retencji. Wstępne czasy retencji $t_{r(n_c + 1)}$ są wykreslane w funkcji $t_{r(n)}$, oraz punkt przecięcia a oraz nachylenie b równania regresji:

$$T_{r(n_c + 1)} = a + b \cdot t_{r(n_c)}$$

są ustalane (n_c = ilość atomów węgla). Czas martwy t_0 jest zatem dany przez:

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

Krzywa kalibracji

Następnym krokiem jest sporządzenie wykresu korelacji wartości $\log k$ w zależności od $\log P$ dla właściwych związków odniesienia. W praktyce, zestaw między 5 a 10 standardowych związków odniesienia, których $\log P$ jest wokół oczekiwanego zakresu jest kolejno wtryskiwany i oznaczane są czasy retencji, najkorzystniej przez integrator rejestrujący podłączony do systemu detekcji. Odpowiadające logarytmy masowych stosunków podziałów, $\log k$, są wyliczane i wykreslane w funkcji $\log P$ ustalonego metodą wstrząsania kolby. Kalibracja jest prowadzona w regularnych odstępach czasu, co najmniej raz dziennie, tak aby możliwe zmiany wydajności kolumny mogły być akceptowane.

Oznaczanie masowego stosunku podziału badanej substancji

Badana substancja jest wtryskiwana do tak małej ilości fazy ruchomej jak to możliwe. Oznacza się czas retencji (podwójnie), pozwalający na obliczenie masowego stosunku podziału k . Z wykresu korelacji związków odniesienia, można interpolować współczynnik podziału badanej substancji. Dla bardzo niskich oraz dla bardzo wysokich współczynników podziału, konieczna jest ekstrapolacja. W tych przypadkach należy zwrócić szczególną uwagę na granice ufności linii regresji.

2. DANE

Metoda wstrząsania kolby

Niezawodność ustalonych wartości P można sprawdzić przez porównanie średnich wyników dwukrotnych oznaczeń ze średnią wszystkich wyników.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),
- tam gdzie metody nie nadają się do zastosowania (np. dla materiałów powierzchniowo czynnych), należy przedstawić obliczoną lub oszacowaną wartość w oparciu o poszczególne rozpuszczalności w n-oktanolu i wodzie.
- Należy podać wszystkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników, w szczególności w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu skupienia substancji.

Dla metody wstrząsania kolby:

- wynik wstępnej oceny, o ile wykonano,
- temperatura oznaczania,
- dane na temat procedur analitycznych zastosowanych do oznaczenia stężeń.
- czas i szybkość wirowania, o ile zastosowano,
- zmierzone stężenia w obu fazach dla każdego oznaczenia (co oznacza że całkowita liczba 12 stężeń znajdzie się w sprawozdaniu),

- waga substancji badanej, objętość każdej fazy zastosowanej w każdym naczyniu oraz całkowita obliczona objętość substancji badanej obecnej w każdej z faz po uzyskaniu stanu równowagi.
- należy podać obliczone wartości współczynnika podziału (P) oraz średniej dla każdego zestawu warunków badania, podobnie jak średnie z wszystkich oznaczeń. W przypadku gdy istnieją dane przemawiające za zależnością współczynnika podziału od stężenia, należy to odnotować w sprawozdaniu.
- należy podać odchylenia standardowe poszczególnych wartości P ponad ich średnią,
- średnie wartości P uzyskane na podstawie wszystkich oznaczeń należy także podać jako ich logarytm (o podstawie 10).
- teoretyczne obliczenie P_{ow} gdy wartość ta została oznaczona lub gdy zmierzona wartość jest $> 10^4$,
- pH używanej wody oraz fazy wodnej w czasie trwania eksperymentu,
- jeżeli używane są bufony, należy podać uzasadnienie dla ich użycia w miejsce wody, skład, stężenia i pH buforów, pH fazy wodnej przed i po eksperymencie.

Dla metody HPLC:

- wynik wstępnej oceny, o ile wykonano,
- substancje badane i odniesienia, oraz ich czystość,
- zakres temperatury oznaczeń,
- pH przy którym wykonano oznaczenia,
- szczegóły kolumn analitycznej i ochronnej, fazy ruchomej i środków detekcji,
- dane retencji oraz literaturowe wartości $\log P$ dla związków odniesienia użytych w kalibracji,
- szczegóły dopasowania linii regresji ($\log k$ w zależności od $\log P$),
- dane średniej retencji i interpolowana wartość $\log P$ badanego związku,
- opis wyposażenia i warunki pracy,
- profile wymywania,
- ilość badań oraz substancje odniesienia substancji wprowadzonych do kolumny,
- czas martwy i sposób jego pomiaru.

4. **LITERATURA**

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.
- (3) $\log P$ and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) - Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.
- (4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-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 Laboratoriumpraxis (edited by E.Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band III, 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 Aktivitat 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. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

Dodatek 1

Metody obliczenia/szacowania

WPROWADZENIE

Ogólne wprowadzenie do metod obliczeniowych, dane i przykłady są przedstawione w pozycji „*Handbook of Chemical Property Estimation Methods*” (a).

Stosuje się obliczoną wartość P_{ow} :

- w celu zadecydowania która z metod doświadczalnych jest właściwa (zakres metody wstrząsania kolby: $\log P_{ow}$: -2 do 4, zakres metody HPLC: $\log P_{ow}$: 0 do 6),
- do wyboru właściwych warunków badania (np. substancji odniesienia dla procedur HPLC, stosunek objętości n-oktanolu do wody dla metody wytrząsania kolby),
- jako wewnętrzne laboratoryjne sprawdzenie możliwych błędów doświadczalnych,
- dla uzyskania oszacowanej P_{ow} w przypadkach, gdy z przyczyn technicznych metody doświadczalne nie mogą być zastosowane.

METODA SZACOWANIA

Wstępne oszacowanie współczynnika podziału

Wartość współczynnika podziału może być oszacowana stosując rozpuszczalności badanej substancji w czystych rozpuszczalnikach:

Do tego:

$$P_{szacowanie} = \frac{\text{nasycenie}_{n\text{-oktanol}}}{\text{nasycenie}_{woda}}$$

METODY OBLICZEŃ

Zasada metod obliczeniowych

Wszystkie metody obliczeniowe są oparte o formalną fragmentację cząsteczki na odpowiednie podstruktury dla których pewne przyrosty $\log P_{ow}$ są znane. $\log P_{ow}$ całej cząsteczki jest następnie obliczany jako suma wartości odpowiadając jej fragmentom plus suma składników korekcji dla oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych.

Wykaz stałych fragmentów i składników korekcji są dostępne w pozycjach (b)(c)(d)(e) literatury. Niektóre są regularnie aktualizowane (b).

Kryteria jakości

Ogólnie, wiarygodność metod obliczeniowych obniża się ze wzrostem złożoności badanych związków. W przypadku prostych cząsteczek o niskiej masie cząsteczkowej i jednej lub dwu grupach funkcyjnych, można oczekiwać odchylenia od 0,1 do 0,3 jednostek $\log P_{ow}$ między wynikami różnych metod fragmentaryzacji i wartościami pomierzonymi. W przypadku bardziej złożonych cząsteczek margines błędu może być większy. Zależy to od rzetelności i dostępności stałych fragmentu, jak również zdolności rozpoznania oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych (np. wiązania wodorowe) i poprawności użycia składników korekcji (oprócz problemów z oprogramowaniem komputerowym CLOGP-3) (b). W przypadku związków zjonizowanych ważne jest właściwe rozważenie ładunku lub stopnia jonizacji.

Procedury obliczeń

π -Metoda Hanscha

Oryginalna stała podstawienia hydrofobowego, wprowadzona przez Fujita i współpracowników (f) jest zdefiniowana jako:

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

gdzie $P_{ow}(\text{PhX})$ jest współczynnikiem podziału pochodnej aromatycznej, a $P_{ow}(\text{PhH})$ związku macierzystego

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

Zgodnie z tą definicją n-metoda stosowana jest głównie dla podstawienia aromatycznego. n-wartości dla większej liczby podstawników zostało stabelaryzowane w pozycjach (b)(c)(d) literatury. Są one stosowane dla obliczeń $\log P_{ow}$ cząsteczek aromatycznych lub podstruktur.

Metoda Rekkera

Zgodnie z Rekkerem (g), wartość $\log P_{ow}$ jest obliczana jak następuje:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_i \text{Warunki oddziaływania}$$

gdzie f_i reprezentuje różne stałe fragmentów cząsteczki, natomiast a_i , częstotliwość ich występowania w badanej cząsteczce. Składniki korekcji mogą być wyrażone jako całkowita wielokrotność pojedynczej stałej C_m (tak zwana „stała magiczna”). Stałe fragmentu f_i i C_m zostały ustalone z wykazu 1 054 doświadczalnych wartości P_{ow} (825 związków) poprzez wielokrotną analizę regresyjną (c)(h). Ustalenie składników oddziaływań przeprowadzono zgodnie z zestawem zasad opisanych w pozycjach (e)(h)(i) literatury.

Metoda Hansch-Leo

Zgodnie z Hansch i Leo (c), wartość $\log P_{ow}$ jest obliczana z:

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

gdzie f_i przedstawia różne stałe fragmentu cząsteczkowego, F_j składniki korekcji oraz a_i , b_j odpowiadające częstotliwości występowania. Wyprowadzony z doświadczalnych wartości P_{ow} , wykaz atomowych i fragmentów grup wartości, oraz wykaz składników korekcji F_j (tak zwanych „współczynników”) zostały ustalone metodą prób i błędów. Składniki korekcji zostały uporządkowane w kilka różnych klas (a)(c). Wzięcie pod uwagę wszystkich zasad i składników korekcji jest względnie skomplikowane i zużywające czas. Opracowano pakiet oprogramowania (b).

Metoda połączona

Obliczenie $\log P_{ow}$ złożonych cząsteczek może być znacząco poprawione, jeżeli cząsteczka zostanie rozcięta w większe podstruktury dla których godne zaufania wartości $\log P_{ow}$ są dostępne, albo z tabeli z pozycji (b)(c) albo z własnych pomiarów. Takie fragmenty (np. heterocykle, antrachinon, azobenzen) mogą być zatem połączone z wartościami π Hanscha lub ze stałymi fragmentów Rekkera lub Leo.

Uwagi:

- (i) Metody obliczeniowe mogą być stosowane tylko do częściowo lub całkowicie zjonizowanych związków, gdzie możliwe jest branie pod uwagę koniecznych współczynników korekcji.
- (ii) Jeżeli można założyć wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, odpowiadające składniki korekcji (od około + 0,6 do + 1,0 $\log P_{ow}$ jednostek) muszą być dodane (a). Wskazania obecności takich wiązań można uzyskać z przestrzennych modeli lub danych spektroskopowych cząsteczki.
- (iii) Jeżeli jest możliwe występowanie kilku postaci tautomerycznych, podstawą do obliczeń powinna być najbardziej prawdopodobna postać.
- (iv) Należy starannie prowadzić weryfikację wykazu stałych dla fragmentów.

Sprawozdanie

Jeżeli stosuje się metody obliczenia/oceny, raport z badań powinien, o ile to możliwe, zawierać następujące informacje:

- opis substancji (mieszanina, zanieczyszczenia, itp.),
- wskazanie wszystkich możliwych wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, dysocjacji, ładunku i wszystkich innych niezwykłych oddziaływań (np. tautomeria),
- opis metody obliczenia,
- identyfikacja lub zasób bazy danych,
- cechy wyróżniające wyboru fragmentów,
- pełna dokumentacja obliczenia.

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, Pharmacology 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.

Dodatek 2

Zalecane substancje odniesienia dla metody HPLC

Nr	substancja odniesienia	log P _{ow}	pKa
1	2-butanon	0,3	
2	4-acetylopirydyna	0,5	
3	anilina	0,9	
4	acetanilid	1,0	
5	alkohol benzylowy	1,1	
6	p-metoksyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	kwasy fenoksyoctowe	1,4	pKa = 3,12
8	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitryl	1,6	
11	fenyloacetonitryl	1,6	
12	alkohol 4-metylobenzylowy	1,6	
13	acetofenon	1,7	
14	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	kwasy 3-nitrobenzoesowe	1,8	pKa = 3,47
16	4-chloroanilina	1,8	pKa = 4,15
17	nitrobenzen	1,9	
18	alkohol cynamonowy	1,9	
19	kwasy benzoesowe	1,9	pKa = 4,19
20	p-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	kwasy cynamonowe	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	anizol	2,1	
23	benzoesan metylu	2,1	
24	benzen	2,1	
25	kwasy 3-metylobenzoesowe	2,4	pKa = 4,27
26	4-chlorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	trichloroetylen	2,4	
28	atrazyna	2,6	
29	benzoesan etylu	2,6	
30	2,6-dichlorobenzonitryl	2,6	
31	kwasy 3-chlorobenzoesowe	2,7	pKa = 3,82
32	toluen	2,7	
33	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dichloroanilina	2,8	
35	chlorobenzen	2,8	
36	allilofenyloeter	2,9	
37	bromobenzen	3,0	
38	etylobenzen	3,2	
39	benzofenon	3,2	
40	4-fenylofenol	3,2	pKa = 9,54
41	tymol	3,3	
42	1,4-dichlorobenzen	3,4	
43	difenyloamina	3,4	pKa = 0,79
44	naftalen	3,6	
45	benzoesan fenylu	3,6	
46	izopropylobenzen	3,7	
47	2,4,6-trichlorofenol	3,7	pKa = 6
48	bifenyl	4,0	
49	benzoesan benzylu	4,0	
50	2,4-dinitro-6-sec-butylofenol	4,1	
51	1,2,4-trichlorobenzen	4,2	
52	kwasy dodekanowe	4,2	
53	difenyloeter	4,2	
54	n-butylobenzen	4,5	
55	fenantren	4,5	
56	fluoranten	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6-difenylopirydyna	4,9	
59	trifenyloamina	5,7	
60	DDT	6,2	
Inne substancje odniesienia o niskim log P _{ow}			
1	kwasy nikotynowe	-0,07	

A.9. TEMPERATURA ZAPŁONU

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Jest użyteczne posiadanie wstępnych informacji na temat zapalności substancji przed przeprowadzeniem niniejszego badania. Procedura badania jest odpowiednia dla ciekłych substancji, które mogą być zapalone źródłem zapłonu. Metody badania zamieszczone w niniejszym tekście są godne zaufania tylko dla zakresów zapłonu, które są wyszczególnione w pojedynczych metodach.

Przy wyborze stosowanej metody należy rozważyć możliwość chemicznych reakcji substancją a uchwytem próbki.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Temperatura zapłonu jest najniższą temperaturą, skorygowaną do ciśnienia 101,325 kPa, w której ciecz wydziela pary, w warunkach określonych w metodzie badania, w takiej ilości, że wytwarzana jest mieszanina palna para/powietrze w naczyniu badawczym.

Jednostki: °C

$$t = T - 273,15$$

(t w °C i T w °K)

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

1.4. ZASADA METODY

Substancja jest umieszczana w naczyniu badawczym i podgrzewana lub chłodzona to temperatury badania zgodnej z procedurą opisaną w indywidualnej metodzie badania. Próby zapłonu są przeprowadzane w celu stwierdzenia, czy lub nie próbka zapłonie w temperaturze badania.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

1.5.1. Powtarzalność

Powtarzalność zmienia się zgodnie z zakresem temperatury zapłonu i zastosowanej metody badania; maksymalnie 2 °C.

1.5.2. Czułość

Czułość zależy od zastosowanej metody badania.

1.5.3. Specyficzność

Specyficzność niektórych metod badania jest ograniczona do niektórych amplitud temperatury zapłonu i zależy od cech samej substancji (np. wysoka lepkość).

1.6. OPIS METODY

1.6.1. Przygotowania

Próbka badanej substancji jest umieszczana w przyrządzie badawczym zgodnie z 1.6.3.1 i/lub 1.6.3.2.

Dla bezpieczeństwa zalecane jest, by w metodzie używać próbki o małej liczności. Około 2 cm³ stosuje się dla substancji wysokoenergetycznych lub toksycznych.

1.6.2. Warunki badania

Przyrząd powinien, tak dalece jak jest to zgodne z bezpieczeństwem, być umieszczony w pozycji wolnej od przeciągów powietrza.

1.6.3. Przeprowadzenie badania**1.6.3.1. Metoda równowagi**

Patrz: ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. Metoda nierównowagi

Przyrząd Abela:

Patrz: BS 2000 część 170, NF M07-011, NF T66-009.

Przyrząd Abel-Pensky:

Patrz: EN 57, DIN 51755 część 1 (dla temperatur od 5 do 65 °C), DIN 51755 część 2 (dla temperatur poniżej 5 °C), NF M07-036.

Przyrząd Tag:

Patrz: ASTM D 56.

Przyrząd Pensky-Martens:

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

Uwagi:

Jeżeli temperatura zapłonu, oznaczona metoda nierównowagi, według 1.6.3.2., wynosi 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C lub 55 ± 2 °C, należy je potwierdzić metodą równowagi, stosując ten sam przyrząd.

Tylko te metody, które podają temperaturę jako temperaturę zapłonu, stosuje się do zgłoszenia.

Dla oznaczenia temperatury zapłonu lepkich cieczy (farby, gumy oraz podobne) zawierających rozpuszczalniki, można używać tylko przyrządów i metod badań stosownych dla oznaczania temperatury zapłonu cieczy lepkich.

Patrz: ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 część 1.

2. DANE**3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),
- stwierdzenie zastosowania danej metody, jak również o wszystkich możliwych odchyleniach,
- wynikach i wszystkich dodatkowych uwagach dotyczących interpretacji wyników.

4. LITERATURA

Brak.

A.10. ZAPALNOŚĆ (CIAŁA STAŁE)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Dla przeprowadzenia badania przydatne jest posiadanie wstępnych informacji na temat ewentualnych właściwości wybuchowych substancji.

Niniejsze badanie należy stosować jedynie do substancji sproszkowanych, ziarnistych i pastopodobnych.

Aby nie uwzględniać wszystkich substancji, które można zapalić, a tylko te które palą się szybko lub te, których zachowanie się przy spalaniu jest z jakichkolwiek względów szczególnie niebezpieczne, jedynie substancje, których szybkość spalania przekracza pewne wartości graniczne, uważa się za wysoce łatwopalne.

Jest szczególnie niebezpieczne, jeżeli inkandescencja rozchodzi się poprzez proszek metalu, z powodu trudności z ugaszeniem ognia. Proszki metali należy uznać za wysoce łatwopalne, jeżeli podtrzymują one rozszerzanie inkandescencji w masie w czasie określonego czasu.

1.2. DEFINICJA I JEDNOSTKI

Czas spalania jest wyrażony w sekundach.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie wyszczególniono.

1.4. ZASADA METODY

Substancja jest formowana w nieprzerwaną wstęgę lub proszkową smugę o długości około 250 mm i przeprowadza się wstępne badanie klasyfikacyjne do określenia, czy zachodzi zapłon przez płomień gazu, rozprzestrzenianie przez przypalanie płomieniem lub tlenie się. Jeżeli zachodzi rozprzestrzenianie ponad 200 mm w sformowanym materiale w obrębie określonego czasu, przeprowadzany jest program pełnego badania w celu określenia szybkości spalania.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Nie ustalono.

1.6. OPIS METODY**1.6.1. Wstępne badanie klasyfikacyjne**

Substancja jest formowana w nieprzerwaną wstęgę lub proszkową smugę o długości około 250 mm, 20 mm szerokości i 10 mm wysokości na niepalnej, nieporowatej płycie bazowej o niskim przewodnictwie ciepła.

Gorącym płomieniem palnika gazowego (minimalna średnica 5 mm), działa się na jeden z końców smugi proszku do momentu zapalenia się proszku lub przez maksimum 2 minuty (5 minut dla proszków metali lub stopów metali). Należy zanotować czy spalanie rozchodzi wzdłuż 200 mm smugi w obrębie czasu badania 4 minut (lub 40 minut dla proszków metali). Jeżeli substancja nie zapala się i nie podtrzymuje spalania albo przez spalanie z płomieniem lub z tleniem się wzdłuż 200 mm smugi proszku w obrębie czasu 4 minut (lub 40 minut) czasu trwania badania, wtedy substancji nie uważa się za wysoce łatwopalną i dalsze badania nie są wymagane. Jeżeli substancja podtrzymuje spalanie się smugi proszku długości 200 mm w czasie mniejszym od 4 minut, lub mniejszym od 40 minut dla proszków metali, należy przeprowadzić procedurę niżej opisaną (ppkt 1.6.2. i następne).

1.6.2. Badanie szybkości spalania**1.6.2.1. Przygotowanie**

Sproszkowanymi lub ziarnistymi substancjami swobodnie napełnia się formę długą na 250 mm, o trójkątnym przekroju wewnętrznej wysokości 10 mm i szerokości 20 mm. Z obu stron formy, w kierunku wzdłużnym, montuje się dwie metalowe płyty z ograniczeniami poprzecznymi, które wystają 2 mm poza górną krawędź obszaru przekroju trójkątnego (rysunek). Formę zrzuca się następnie trzykrotnie z wysokości 2 cm na twardą powierzchnię. W razie potrzeby napełnia się wtedy formę ponownie. Poprzeczne ograniczenia są następnie zdejmowane, i zeszkrobuje nadmiar substancji. Płytę bazową, niepalną, nieporowatą i o niskim przewodnictwie cieplnym, umieszcza się na górze formy, przyrząd odwraca się i zdejmuje formę.

Substancjami pastopodobnymi powleka się w postaci liny o długości 250 mm i przekroju około 1 cm², niepalną, nieporowatą i o niskim przewodnictwie cieplnym płytę bazową.

1.6.2.2. Warunki badania

W przypadku substancji wrażliwych na wilgoć badanie należy przeprowadzić jak najszybciej po ich wyjęciu z pojemnika.

1.6.2.3. Przeprowadzenie badania

Ustawić stos w kierunku prostopadłym do ciągu powietrza w szafie wyciągowej.

Szybkość przepływu powietrza powinna być wystarczająca do zapobieżenia przedostaniu się dymu do laboratorium i nie powinna być zmieniana w trakcie badania. Wokół przyrządu należy ustawić ekran chroniący przed ciągiem powietrza.

Stosuje się gorący płomień z palnika gazowego (minimalna średnica 5 mm) do zapalenia z jednego końca stosu. Gdy stos spali się na długości 80 mm, na następnych 100 mm mierzy się szybkość spalania. Badanie przeprowadza się sześć razy, używając za każdym razem czystą, chłodną płytę, niezależnie od wcześniej obserwowanego pozytywnego wyniku.

2. DANE

Istotne z punktu widzenia oceny są czas spalania z wstępnego badania klasyfikacyjnego (1.6.1.) i najkrótszy z sześciu zbadanych (1.6.2.3) czas spalania.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),
- opis substancji badanej i jej stanu fizycznego, w tym zawartości wilgoci,
- wyniki z wstępnego badania klasyfikacyjnego i z badania szybkości spalania jeśli przeprowadzono,
- wszelkie dodatkowe uwagi istotne dla interpretacji wyników.

3.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Sproszkowane, ziarniste lub pastopodobne substancje są uważane za wysoce łatwopalne, jeżeli czas spalania w jakimkolwiek badaniu przeprowadzonym zgodnie z procedurą opisaną w 1.6.2 jest mniejszy niż 45 sekund. Proszki metali lub stopów metali, uważa się za wysoce łatwopalne jeżeli zapalają się i płomień lub strefa reakcji rozszerza się w całej próbce w czasie 10 minut lub mniejszym.

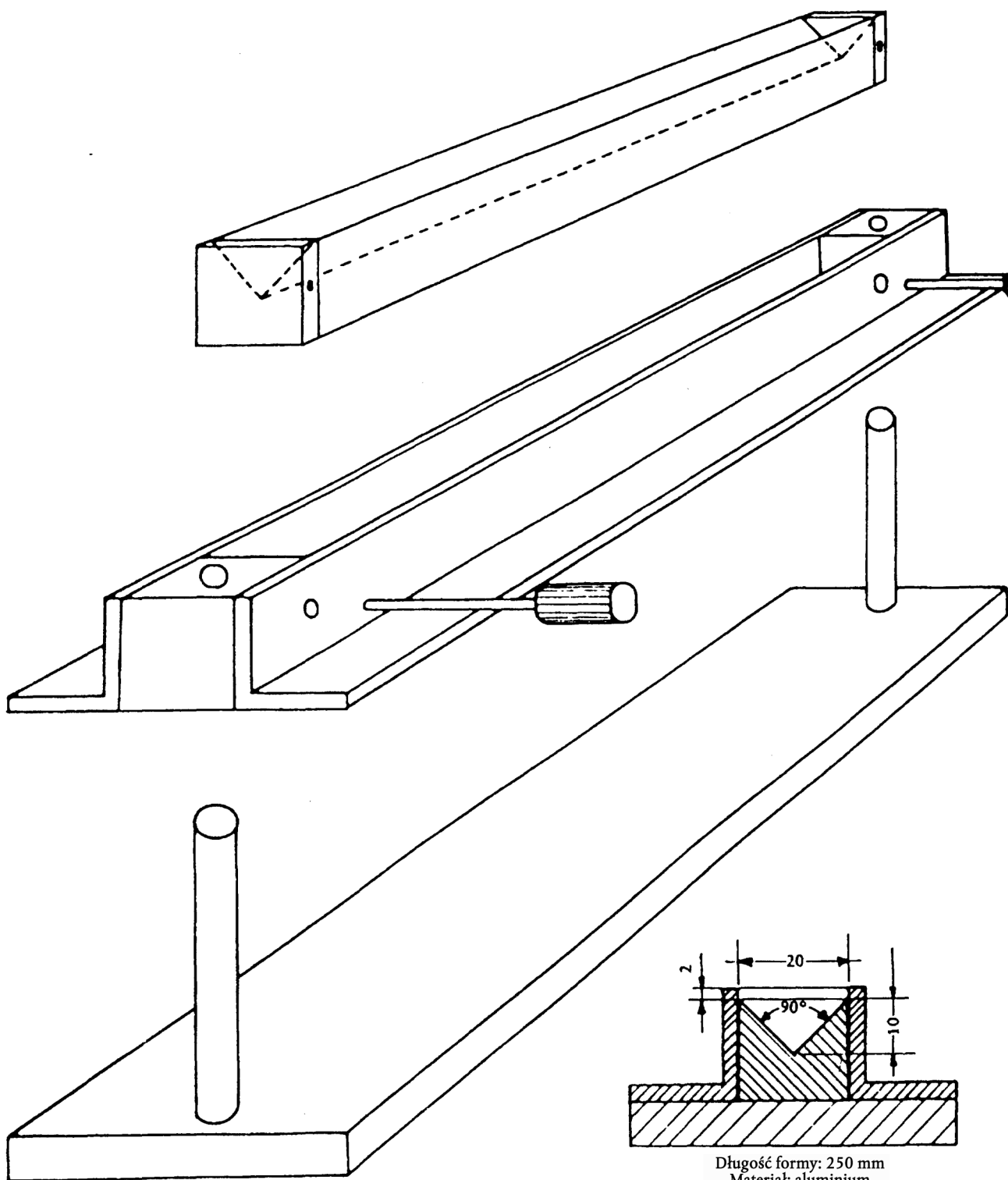
4. LITERATURA

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

Dodatek

Rysunek

Forma i akcesoria do przygotowania stosu
(wszystkie wymiary w milimetrach)



A.11. ZAPALNOŚĆ (GAZY)

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Niniejsza metoda pozwala na oznaczenie czy gazy zmieszane z powietrzem w temperaturze pokojowej (około 20 °C) i pod ciśnieniem atmosferycznym są palne, a jeśli tak, to w jakim zakresie stężeń. Mieszaniny badanego gazu z powietrzem we wzrastającym stężeniu poddaje się działaniu iskry elektrycznej i obserwuje się, czy dochodzi do zapłonu.

1.2. DEFINICJA I JEDNOSTKI

Zakres palności to zakres stężenia między dolną i górną granicą wybuchowości. Dolna i górna granica wybuchowości to granice stężenia palnego gazu zmieszanego z powietrzem, przy których nie dochodzi do propagacji płomienia.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie wyszczególniono.

1.4. ZASADA METODY

Stężenie gazu w powietrzu zwiększa się w kolejnych etapach, przy czym na każdym etapie mieszaninę tę poddaje się działaniu iskry elektrycznej.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Nie ustalono.

1.6. OPIS METODY

1.6.1. Przyrząd

Naczynie do badania to prosty cylinder szklany o minimalnej średnicy wewnętrznej wynoszącej 50 mm i minimalnej wysokości 300 mm. Elektrody zapłonowe są umieszczone w odległości 3 do 5 mm od siebie, 60 mm ponad dnem cylindra. Cylinder jest wyposażony w otwór dekompresyjny. Przyrząd musi być osłonięty w taki sposób, aby ograniczyć wszelkie szkody związane z ewentualnym wybuchem.

Iskra o stałej indukcji o czasie trwania 0,5 sek., generowana z wysokonapięciowego transformatora o napięciu wyjściowym od 10 do 15 kV (maksymalna moc zasilająca 300 W), stosowana jest jako źródło zapłonu. Przykład odpowiedniego przyrządu opisano w pozycji (2) literatury.

1.6.2. Warunki badania

Badanie należy wykonać w temperaturze pokojowej (około 20 °C).

1.6.3. Przeprowadzenie badania

Przy użyciu pomp dozujących do szklanego cylindra wprowadza się znane stężenia gazu w powietrzu. Przez mieszaninę przepuszcza się iskry i obserwuje się, czy od źródła zapłonu oddzieli się płomień i czy będzie on ulegać niezależnej propagacji. Stężenie gazu zmienia się etapowo o 1% obj., aż dojdzie do zapłonu w sposób opisany powyżej.

Jeżeli budowa chemiczna gazu wskazuje, że może on być niepalny, a skład mieszaniny stechiometrycznej z powietrzem może być obliczony, należy zbadać tylko mieszaniny w zakresie 10% poniżej składu stechiometrycznego oraz 10% powyżej tego składu, w krokach co 1%.

2. **DANE**

Jedyną istotną informacją dla ustalenia omawianej właściwości jest informacja na temat propagacji płomienia.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),
- opis zastosowanego przyrządu, z podaniem wymiarów
- temperatura w której wykonano badanie,
- stężenia badane i uzyskane wyniki,
- wynik badania: gaz niepalny lub gaz wysoce łatwopalny,
- jeżeli ustalono, że gaz jest niepalny, należy wtedy potwierdzić zakres stężenia w którym badano go w odstępach co 1%,
- należy przedstawić wszelkie informacje i uwagi istotne dla interpretacji wyników.

4. **LITERATURA**

- (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. ZAPALNOŚĆ (W KONTAKCIE Z WODĄ)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Niniejszą metodę badania można wykorzystywać do ustalenia, czy reakcja substancji z wodą prowadzi do tworzenia się niebezpiecznych ilości gazu lub gazów, które mogą być wysoce łatwopalne.

Metodę badania można stosować w odniesieniu zarówno do ciał stałych, jak i cieczy. Metoda ta nie ma zastosowania do substancji, które ulegają spontanicznemu zapłonowi w kontakcie z powietrzem.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Wysoce łatwopalny: Substancje i preparaty, które, w kontakcie z wodą lub wilgotnym powietrzem, uwalniają wysoce łatwopalne gazy w niebezpiecznych ilościach z minimalną szybkością 1 litra/kg na godzinę.

1.3. ZASADA METODY

Substancję bada się w wieloetapowej sekwencji opisanej poniżej; gdy dojdzie do zapłonu na dowolnym z etapów, kontynuowanie badania nie jest potrzebne. Jeżeli wiadomo, że substancja nie reaguje gwałtownie z wodą, należy postępować zgodnie z etapem 4 (1.3.4).

1.3.1. Etap 1

Substancję badaną umieszcza się w rynience z wodą destylowaną w temperaturze 20 °C i zapisuje się, czy uwolniony gaz zapali się, czy nie.

1.3.2. Etap 2

Substancję badaną umieszcza się na bibule filtracyjnej pływającej na powierzchni naczynia zawierającego wodę destylowaną w temperaturze 20 °C, po czym zapisuje się, czy uwolniony gaz zapali się, czy nie. Rolą bibuły filtracyjnej jest jedynie utrzymywanie substancji w jednym miejscu, tak aby zwiększyć szanse na uzyskanie zapłonu.

1.3.3. Etap 3

Z substancji badanej tworzy się stos o wysokości około 2 cm i średnicy 3 cm. Do stosu dodaje się kilka kropli wody i zapisuje się, czy dochodzi do zapalenia się uwolnionego gazu, czy nie.

1.3.4. Etap 4

Substancję badaną miesza się z wodą destylowaną w temperaturze 20 °C, po czym mierzy się szybkość uwalniania gazu w czasie siedmiu godzin w odstępach jednogodzinnych. Jeżeli oznaczana szybkość uwalniania wykazuje niesystematyczne wahania lub wzrasta po siedmiu godzinach, czas pomiaru należy wydłużyć do maksimum pięciu dni. Badanie można przerwać, gdy mierzona szybkość w dowolnym momencie przekroczy 1 litr/kg na godzinę.

1.4. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie wyszczególniono.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Nie ustalono.

1.6 OPIS METOD

1.6.1. **Etap 1**1.6.1.1. *Warunki badania*

Badanie wykonywane jest w temperaturze pokojowej (około 20 °C).

1.6.1.2. *Wykonanie badania*

Niewielką ilość (o średnicy około 2 mm) substancji badanej należy umieścić w rynience zawierającej wodę destylowaną. Należy zapisać, czy (i) uwalnia się jakikolwiek gaz oraz czy (ii) dochodzi do zapalenia się gazu. W przypadku gdy dochodzi do zapalenia się gazu, nie są potrzebne dalsze badania substancji, gdyż substancję taką uważa się za niebezpieczną.

1.6.2. **Etap 2**1.6.2.1. *Przyrząd*

Na powierzchni wody destylowanej w dowolnym, właściwym naczyniu, np. w parownicy o średnicy 100 mm, kładzie się płasko bibułę filtracyjną.

1.6.2.2. *Warunki badania*

Badanie wykonywane jest w temperaturze pokojowej (około 20 °C).

1.6.2.3. *Przeprowadzenie badania*

Niewielką ilość substancji badanej (o średnicy około 2 mm) umieszcza się na środku bibuły filtracyjnej. Należy zapisać, czy (i) uwalnia się jakikolwiek gaz oraz czy (ii) dochodzi do zapalenia się gazu. W przypadku gdy dochodzi do zapalenia się gazu, nie są potrzebne dalsze badania substancji, gdyż substancję taką uważa się za niebezpieczną.

1.6.3. **Etap 3**1.6.3.1. *Warunki badania*

Badanie wykonywane jest w temperaturze pokojowej (około 20 °C).

1.6.3.2. *Przeprowadzenie badania*

Z substancji badanej należy zrobić stos o wysokości około 2 cm i średnicy 3 cm, z wrębem u góry. Do wgłębienia dodaje się kilka kropli wody i zapisuje się, czy (i) uwalnia się jakikolwiek gaz oraz czy (ii) dochodzi do zapalenia się gazu. W przypadku gdy dochodzi do zapalenia się gazu, nie są potrzebne dalsze badania substancji, gdyż substancję taką uważa się za niebezpieczną.

1.6.4. **Etap 4**1.6.4.1. *Przyrząd*

Przyrząd jest ustawiony jak pokazano na rysunku.

1.6.4.2. *Warunki badania*

Sprawdzić pojemnik substancji badanej na jakikolwiek proszek < 500 µm (wielkość ziarna). Jeżeli proszek tworzy więcej niż 1% wagowo całości, lub jeżeli próbka jest krucha, wtedy całą substancję należy zmielić na proszek przed badaniem dla umożliwienia zmniejszenia wielkości ziarna w czasie przechowywania i posługiwania się nią; w innych przypadkach bada się substancję taką, jak otrzymano. Badanie należy wykonać w temperaturze pokojowej (około 20 °C) i pod ciśnieniem atmosferycznym.

1.6.4.3. Przeprowadzenie badania

10 do 20 ml wody umieszcza się we wkraplaczu przyrządu, a 10 g substancji umieszcza się w kolbie stożkowej. Objętość uwalnianego się gazu można zmierzyć dowolną, właściwą metodą. Otwiera się kurek wkraplacza w celu wypuszczenia wody do kolby stożkowej i uruchamia się stoper. Wydzielanie gazu mierzone jest co godzinę w trakcie okresu siedmiu godzin. Jeżeli w ciągu tego okresu czasu, wydzielanie gazu jest nierówne, lub pod koniec tego okresu, szybkość wydzielania gazu wzrasta, wtedy pomiary należy kontynuować do pięciu dni. Jeżeli w dowolnym momencie pomiaru, szybkość wydzielania gazu przekracza 1 litr/kg na godzinę, należy przerwać badanie. Badanie należy przeprowadzić trzykrotnie.

Jeżeli nie jest znana chemiczna tożsamość gazu, należy go poddać analizie. Jeżeli gaz zawiera wysoce łatwopalne składniki i nie wiadomo, czy mieszanina jest wysoce łatwopalna, należy przygotować mieszaninę o takim samym składzie i poddać badaniu przy użyciu metody A. 11.

2. DANE

Substancja jest uważana za niebezpieczną jeżeli:

- samozapłon ma miejsce na każdym etapie procedury badania,
- lub
- występuje wydzielanie gazu palnego o szybkości większej niż 1 litr/kg substancji na godzinę.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),
- szczegóły każdego wstępnego przygotowania badanej substancji,
- wyniki badań (etapy 1, 2, 3 i 4),
- tożsamość chemiczna wydzielanego gazu,
- szybkość wydzielania gazu, jeżeli przeprowadzono etap 4 (1.6.4),
- wszystkie dodatkowe uwagi stosowne do interpretacji wyników.

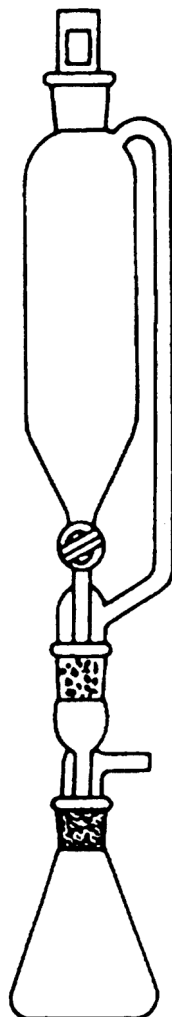
4. LITERATURA

- (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

Rysunek

Przyrząd



A.13. WŁAŚCIWOŚCI PIROFORYCZNE CIAŁ STAŁYCH I CIECZY

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Procedura badań ma zastosowanie do stałych lub ciekłych substancji, które w małych ilościach, samorzutnie zapalają się w krótkim czasie po wejściu z powietrzem w temperaturze pokojowej (około 20 °C).

Substancje, które wymagają wystawienia na powietrze na okres godzin lub dni w temperaturze pokojowej lub w podwyższonej temperaturze, zanim zajdzie zapłon nie są objęte niniejszą metodą badania.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Substancje uważa się za posiadające właściwości piroforyczne jeżeli zapalają się lub ulegają zwęglaniu zgodnie z warunkami opisanymi w 1.6.

Samozapalność cieczy może wymagać również zbadania za pomocą metody A.15 Temperatura samozapłonu (ciecze i gazy).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie wyszczególniono.

1.4. ZASADA METODY

Substancja, czy w postaci ciała stałego czy cieczy, jest dodawana do obojętnego nośnika i poddawana kontaktowi z powietrzem w temperaturze otoczenia na okres pięciu minut. Jeżeli substancje nie zapalają się, absorbuje się je na bibule filtracyjnej i wystawia na powietrze w temperaturze otoczenia (około 20 °C) na czas pięciu minut. Jeżeli ciało stałe lub ciecz zapala się, lub ciecz zapala się lub zwęglą bibulę filtracyjną, wtedy substancję uważa się za piroforyczną.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Powtarzalność: ze względów istotnych dla bezpieczeństwa, pojedynczy pozytywny wynik jest wystarczający do uznania substancji za piroforyczną.

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. Przyrząd

Tygiel porcelanowy o średnicy około 10 cm napelnia się ziemią okrzemkową do wysokości około 5 mm w temperaturze pokojowej.

Uwaga:

Ziemię okrzemkową lub dowolną inną porównywalną, obojętną substancję, która jest powszechnie dostępna, bierze się jako reprezentacyjną dla gleby, na którą badana substancja może się uwolnić w razie wypadku.

Do badania cieczy, które nie zapalają się w kontakcie z powietrzem, gdy poddaje się je kontaktowi z obojętnym nośnikiem, wymagana jest sucha bibuła filtracyjna.

1.6.2. Przeprowadzenie badania**a) Sproszkowane ciała stałe**

Od 1 do 2 cm³ badanej substancji w proszku sypie się z wysokości około 1 m na niepalną powierzchnię i obserwuje się, czy substancja ta ulegnie zapaleniu podczas spadania lub w ciągu pięciu minut od opadnięcia.

Badanie przeprowadza się sześć razy, niezależnie od wystąpienia zapalenia się.

b) Ciecze

Okolo 5 cm³ badanej cieczy wlewa się do przygotowanego tygla porcelanowego i obserwuje się, czy substancja zapali się w ciągu pięciu minut.

Jeżeli w sześciu badaniach nie nastąpi zapłon, należy przeprowadzić następujące badania:

0,5 ml badanej próbki za pomocą strzykawki przenosi się na wgniecioną bibułę filtracyjną i obserwuje się czy nastąpi zapalenie się lub zwęglenie bibuły filtracyjnej w czasie pięciu minut po naniesieniu cieczy. Niezależnie od tego, czy zachodzi zapalenie się lub zwęglenie, badanie przeprowadza się trzy razy.

2. DANE**2.1. OPRACOWANIE WYNIKÓW**

Wykonywania badań można zaprzestać, gdy tylko w jednym z nich uzyska się dodatni wynik.

2.2. OCENA

Jeżeli substancja zapala się w czasie pięciu minut od dodania obojętnego nośnika i wystawienia na powietrze, lub ciekła substancja zwęglą lub zapala bibułę filtracyjną w czasie pięciu minut po naniesieniu i wystawieniu na powietrze, jest uważana za piroforyczną.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),
- wyniki badań,
- wszystkie dodatkowe uwagi dotyczące interpretacji wyników.

4. LITERATURA

- (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. WŁAŚCIWOŚCI WYBUCHOWE**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Metoda dostarcza schematu badania do określenia czy ciało stałe lub substancja pastopodobna przedstawia niebezpieczeństwo wybuchu, gdy poddaje się ją działaniu płomienia (wrażliwość cieplna), lub uderzeniu lub tarcia (wrażliwość na bodźce mechaniczne), i czy ciekła substancja przedstawia niebezpieczeństwo wybuchu, gdy podda się ją działaniu płomienia lub uderzeniu.

Metoda składa się z trzech części:

- a) badanie wrażliwości cieplnej (1);
- b) badanie wrażliwości mechanicznej na uderzenia (1);
- c) badanie wrażliwości mechanicznej na tarcie (1).

Metoda pozwala uzyskać dane pozwalające na ocenę prawdopodobieństwa zainicjowania wybuchu przy pomocy niektórych powszechnie występujących bodźców. Metoda nie jest przeznaczona do stwierdzenia czy substancja jest zdolna do wybuchu w każdych warunkach.

Metoda jest właściwa do określenia czy substancja może przedstawiać niebezpieczeństwo wybuchu (wrażliwość cieplna i mechaniczna) w szczególnych warunkach określonych w dyrektywie. Jest oparta o pewną ilość typów przyrządów, które są szeroko międzynarodowo stosowane (1) i które zwykle dają w pełni znaczące wyniki. Uznane jest, że metoda nie jest ostateczna. Można stosować alternatywne przyrządy do tych celów, zapewniając że są znane międzynarodowo i wyniki mogą być stosownie skorelowane z tymi z wymaganych przyrządów.

Nie ma potrzeby przeprowadzania badań, gdy dostępne są informacje termodynamiczne (np. ciepło tworzenia, ciepło rozkładu) i/lub nieobecne są pewne reaktywne grupy (2) we wzorze strukturalnym, ustanawiające poza wszelkimi wątpliwościami, że substancja jest niezdolna do gwałtownego rozkładu z wydzielaniem gazów lub uwolnieniem ciepła (to jest, materiał nie przedstawia żadnego ryzyka wybuchu). Badanie wrażliwości mechanicznej w odniesieniu do tarcia nie jest wymagane dla cieczy.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Materiały wybuchowe:

Substancje które wybuchają pod działaniem płomienia lub które są wrażliwe na uderzenie lub tarcie w wymaganych przyrządach (lub bardziej wrażliwe mechanicznie niż 1,3-dinitrobenzen w alternatywnym przyrządzie).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

1,3-dinitrobenzen, techniczny, krystaliczny, przesiany przez sito 0,5 mm, dla metod tarcia i uderzenia.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazyna (RDX, heksogen, cyklonit - CAS 121-82-4), rekrystalizowany z wodnego cykloheksanonu, przesiewany na mokro przez sito 250 mikrometrów (μm) i zatrzymywany na sicie 150 μm oraz suszony w $103 \pm 2^\circ\text{C}$ (przez 4 godziny) do drugiej serii badań na tarcie i uderzenia.

1.4. ZASADA METODY

Badania wstępne są konieczne dla ustalenia bezpiecznych warunków przeprowadzenia trzech badań wrażliwości.

1.4.1. Badania bezpiecznego postępowania z substancją (3)

Ze względów bezpieczeństwa, przed przeprowadzeniem głównych badań, bardzo małe próbki (około 10 mg) substancji są poddawane ogrzaniu bez zamknięcia w płomieniu gazu, wstrząsowi w dogodnym przyrządzie i tarcu przez użycie młotka i kowadła lub jakiegokolwiek maszyny ciernej. Celem jest stwierdzenie, czy substancja jest tak wrażliwa i wybuchowa, że przepisane badania wrażliwości, szczególnie wrażliwość cieplna, powinny być prowadzone ze specjalnymi środkami bezpieczeństwa, by zapobiec zranieniu operatora.

1.4.2. Wrażliwość cieplna

Metoda obejmuje podgrzewanie substancji w stalowej rurze, zamkniętej kryzami z otworami o różnej średnicy, dla określenia czy substancja jest podatna na wybuch w warunkach intensywnego ogrzewania pod określonym przykryciem.

1.4.3. Wrażliwość mechaniczna (uderzenie)

Metoda obejmuje poddawanie substancji uderzeniu spowodowanemu przez zrzucenie określonej masy z określonej wysokości.

1.4.4. Wrażliwość mechaniczna (tarcie)

Metoda obejmuje poddawanie ciała stałego lub substancji pastopodobnych tarcu między znormalizowanymi powierzchniami w określonych warunkach obciążenia i ruchu względnego.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Nie ustalono.

1.6. OPIS METODY**1.6.1. Wrażliwość cieplna (działanie płomienia)****1.6.1.1. Przyrząd**

Przyrząd składa się z nienadającej się do ponownego zastosowania rury stalowej z zamknięciami wielokrotnego użytku (rysunek 1), zainstalowanej w urządzeniu do podgrzewania i zabezpieczającym. Każda rura jest wykonana z arkusza stali głęboko tłoczonej (patrz Dodatek) i posiada wewnętrzną średnicę 24 mm, długość 75 mm i grubość ścianek 0,5 mm. Rury są kołnierzowane na otwartych końcach dla umożliwienia ich zamknięcia przez zestaw płyty kryzowej. Składa się on z odpornej na ciśnienie płyty kryzy, z centralnie położonym otworem, przykręconej mocno do rury za pomocą dwuczęściowych złącz śrubowych (nakrętka i gwintowany pierścień). Nakrętka i gwintowany pierścień są wykonane ze stali chromomanganowej (patrz Dodatek), beziskrowej do temperatury 800 °C. Kryzy są grubości 6 mm, wykonane ze stali żaroodpornej (patrz dodatek), i są dostępne w zakresie różnych średnic otworów.

1.6.1.2. Warunki badania

Zwykle substancje są badane tak jak je otrzymano, chociaż w niektórych przypadkach, na przykład gdy są sprasowane, odlewane lub w inny sposób skondensowane, może być konieczne badanie substancji po skruszeniu.

Dla ciał stałych, masa materiału użytego w każdym badaniu, jest określana w dwuetapowej procedurze przebiegu próbnego. Wytarowana rura jest napełniana 9 cm³ substancji i substancja jest ubijana siłą 80 N przyłożoną w poprzek całkowitego przekroju rury. Z powodów bezpieczeństwa lub w przypadkach, gdzie postać fizyczna próbki zmienia się przez ściśnięcie, można użyć inną procedurę napełniania; przykładowo, gdy substancja jest bardzo wrażliwa na tarcie, wtedy ubijanie nie jest odpowiednie. Jeżeli materiał jest ściśliwy, wtedy dodaje się go więcej i ubija do momentu wypełnienia rury do 55 mm od góry. Całkowita masa użyta do wypełnienia rury do poziomu 55 mm jest określona i dodaje się następnie dwie dodatkowe porcje, każda ubijana z siłą 80N. Następnie materiał jest albo dodawany z ubijaniem, albo wyjmowany, w zależności od wymagań, celem pozostawienia rury wypełnionej do poziomu 15 mm od góry. Wykonuje się drugi przebieg próbny, rozpoczynając z ubitą ilością trzeciej masy całkowitej znalezionej w pierwszym etapie przebiegu próbnego. Do tych przyrostów dodaje się dwa więcej z ubijaniem o sile 80N i poziomem substancji w rurze ustawionym na 15 mm od góry, poprzez dodawanie lub ujmowanie materiału zgodnie z wymaganiem. Ilość ciała stałego ustalona w drugim etapie przebiegu próbnego jest stosowana do każdej próby. Napełnianie przeprowadzono w trzech równych ilościach, każdej ściśniętej do 9 cm³ z konieczną siłą (można to uprościć przez zastosowanie pierścieni dystansowych).

Ciecze i żele są ładowane do rury na wysokość 60 mm zwracając szczególną uwagę na żele, by zapobiec tworzeniu się pustych przestrzeni. Gwintowany pierścień jest wsuwany w rurę od dołu, umieszcza się stosowną płytę kryzową i dokręca nakrętkę po nasmarowaniu małą ilością smaru na bazie disiarczku molibdenu. Jest podstawową zasadą sprawdzenie, czy nie uwięziono substancji między kołnierzem i płytą, lub w gwincie.

Podgrzewanie jest prowadzone za pomocą propanu pobieranego z butli przemysłowej, wyposażonej w zawór regulacyjny ciśnienia (60 do 70 mbar), poprzez miernik i równomiernie rozprowadzany (co wskazuje wizualna obserwacja płomieni z palników) poprzez dysze do czterech palników. Palniki są umieszczone dookoła komory badawczej jak pokazano na rysunku 1. Cztery palniki posiadają łączne zużycie około 3.2 litra propanu na minutę. Można zastosować alternatywne gazy palne i palniki, ale szybkość ogrzewania musi być jak wyspecyfikowano na rysunku 3. Dla wszystkich przyrządów szybkość ogrzewania musi być okresowo sprawdzana używając rury wypełnione ftalanem dibutyłu jak wskazano na rysunku 3.

1.6.1.3. Przeprowadzenie badania

Każde badanie jest przeprowadzane do momentu albo rozerwania rury, albo ogrzania w czasie pięciu minut. Badanie, wynikiem którego jest fragmentacja rury na trzy lub więcej części, które w niektórych przypadkach mogą być połączone jedną do drugiej wąskimi tasiemkami metalu jak pokazano na rysunku 2, ocenia się jako dające wybuch. Badanie wynikiem którego jest mniej fragmentów lub wcale, jest uważane jako niedające wybuchu.

Wpierw wykonuje się serie trzech badań z płytą kryzową o średnicy 6,0 mm, jeśli nie uzyska się wybuchów, przeprowadza się drugą serię trzech badań z płytą kryzową o średnicy 2,0 mm. Jeżeli wybuch zachodzi w jednej z dwóch serii badań, niewymagane są następne badania.

1.6.1.4. Ocena

Wynik badania jest uważany za pozytywny, jeżeli wybuch zachodzi w jednej z dwóch powyższych serii badań.

1.6.2. Wrażliwość mechaniczna (uderzenie)

1.6.2.1. Przyrząd (rysunek 4)

Podstawowe części przyrządu spadowego młota są wykonane z bloku ze staliwa z podstawą, kowadła, kolumny, prowadnic, bijaków, mechanizmu zwalniającego i uchwytu próbki. Kowadło stalowe 100 mm (średnica) × 70 mm (wysokość) jest przykręcone do góry bloku stalowego 230 mm (długość) × 250 mm (szerokość) × 200 mm (wysokość) z podstawą staliwną 450 mm (długość) × 450 mm (szerokość) × 60 mm (wysokość). Kolumna wykonana z bezszwowej ciągnionej rury stalowej, jest zabezpieczona w uchwycie przykręconym do tylnej ściany bloku stalowego. Cztery śruby mocują przyrząd do stałego betonowego bloku 60 × 60 × 60 cm w taki sposób, że szyny prowadnicy są całkowicie pionowe i bijak opada swobodnie. Stosownymi do użycia są bijaki 5 oraz 10 kg, wykonane z stali uspokojonej. Głowica uderzeniowa każdego bijaka jest z utwardzonej stali HRC 60 do 63, i posiada minimalną średnicę 25 mm.

Próbka podlegająca badaniu jest zawarta w przyrządzie uderzeniowym składającym się z dwóch współosiowych cylindrów ze stali uspokojonej, jeden powyżej drugiego, w wydrążonym stalowym pierścieniu prowadzącym. Cylindry ze stali uspokojonej powinny posiadać średnicę 10 (- 0,003, - 0,005) mm i wysokość 10 mm oraz posiadać polerowane powierzchnie, zaokrąglone krawędzie (promień krzywizny 0,5 mm) i twardość HRC 58 do 65. Drażony cylinder musi posiadać zewnętrzną średnicę 16 mm, polerowany otwór wiertniczy 10 (+ 0,005, + 0,010) mm i wysokość 13 mm. Przyrząd uderzeniowy jest wyposażony w pośrednie kowadło (średnica 26 mm i 26 mm wysokość) wykonane ze stali i centrowane pierścieniem z otworami, pozwalającymi na ucieczkę dymów.

1.6.2.2. Warunki badania

Objętość próbki powinna wynosić 40 mm³, lub objętość właściwą dla dowolnego alternatywnego przyrządu. Stałe substancje powinny być badane w stanie suchym i przygotowywane jak następuje:

- a) sproszkowane substancje należy przesiać (wielkość oczek sita: 0,5 mm); do badania wykorzystuje się całą ilość substancji, która przeszła przez sito;
- b) sprasowane, odlewane lub w inny sposób skondensowane substancje są kruszone w małe kawałki i przesiewane; przesiane frakcje średnicy od 0,5 do 1 mm są używane do badania i muszą być reprezentatywne dla substancji oryginalnej.

Substancje zwykle dostarczane jako pasty, powinny być badane w stanie suchym, tam gdzie to możliwe, lub w każdym razie, po usunięciu maksymalnie możliwej ilości rozpuszczalnika. Ciekłe substancje są badane ze szczeliną 1mm między dolnym i górnym stalowym cylindrem.

1.6.2.3. Przeprowadzenie badań

Przeprowadza się serię sześciu badań, spuszczając masę 10 kg z wysokości 0,40 m (40 J). Jeżeli w trakcie sześciu badań przy 40 J uzyska się wybuch, należy wykonać serię dalszych sześciu badań, spuszczając masę 5 kg z 0,15 m (7,5 J). W innym przyrządzie, próbka jest porównywana z wybraną substancją odniesienia, stosując ustaloną procedurę (np. technikę w górę-w dół itd.).

1.6.2.4. Ocena

Wynik badania uważa się za pozytywny jeżeli zachodzi wybuch (zapalenie się gwałtownym płomieniem jest równoważne wybuchowi i przedstawiane w sprawozdaniu) Przynajmniej raz we wszystkich badaniach z określonym przyrządem uderzeniowym lub próbka jest bardziej wrażliwa niż 1,3-dinitrobenzen lub RDX w alternatywnym badaniu na uderzenie.

1.6.3. Wrażliwość mechaniczna (tarcie)

1.6.3.1. Przyrząd (rysunek 5)

Przyrząd do tarcia składa się z płyty bazowej stalowej na której zamocowany jest przyrząd tarcia. Składa się on z umocowanych porcelanowych prętów i ruchomej porcelanowej płyty. Płyta porcelanowa jest umieszczona w wózku poruszającym się w dwóch prowadnicach. Wózek jest dołączony do silnika elektrycznego poprzez korbówód, krzywkę mimośrodową i odpowiednią przekładnię, tak że porcelanowa płyta przesuwa się tylko raz, w tył i naprzód poniżej porcelanowego pręta w odległości 10 mm. Pręt porcelanowy może być obciążony przykładowo 120 lub 360 N.

Płaska porcelanowa płyta jest wykonana z porcelany technicznej (chropowatość 9 do 32 µm) i posiada wymiary 25 mm (długość) × 25 mm (szerokość) × 5 mm (wysokość). Cylindryczny pręt porcelanowy jest również wykonany z białej technicznej porcelany i ma długość 15 mm, średnicę 10 mm oraz schropowaną końcową powierzchnię sferyczną o promieniu krzywizny 10 mm.

1.6.3.2. Warunki badania

Objętość próbki powinna wynosić 10 mm³ lub objętość odpowiednią dla każdego przyrządu alternatywnego.

Stałe substancje powinny być badane w stanie suchym i przygotowywane jak następuje:

- a) sproszkowane substancje należy przesiać (wielkość oczek sita: 0,5 mm); do badania wykorzystuje się całą ilość substancji, która przeszła przez sito;
- b) sprasowane, odlewane lub w inny sposób skondensowane substancje są kruszone w małe kawałki i przesiewane; do badań używane są przesiane frakcje średnicy mniejszej od 0,5 mm.

Substancje zwykle dostarczane jako pasty, powinny być badane w stanie suchym, tam gdzie to możliwe. Jeżeli substancja nie może być przygotowana w stanie suchym, pasta (po usunięciu maksymalnie możliwej ilości rozpuszczalnika) jest badana jako warstwa 0,5 mm grubości, 2 mm szerokości, 10 mm długości, przygotowana przy użyciu szablonu.

1.6.3.3. Przeprowadzenie badań

Pręt porcelanowy jest położony na badaną próbkę i obciążany. Podczas przeprowadzania badania ślady gąbki na płytce porcelanowej muszą być położone poprzecznie w stosunku do kierunku ruchu. Należy uważać, aby pręt spoczywał na próbce, aby wystarczająco dużo materiału badanego znajdowało się pod prętem i aby płytka poruszała się prawidłowo pod prętem. Dla substancji w postaci past, do nanoszenia substancji na płytę stosuje się szablon o grubości 0,5 mm ze szczeliną 2×10 mm. Porcelanowa płyta przesuwa się o 10 mm wprzód i do tyłu pod porcelanowym prętem w czasie 0,44 sekundy. Każda część powierzchni płyty i pręta używana jest tylko raz; dwa końce każdego pręta służą dla dwóch prób, a dwie powierzchnie płyty służą, każda do trzech prób.

Serię sześciu badań przeprowadza się z obciążeniem 360 N. Jeżeli uzyskuje się pozytywne zdarzenie w czasie trwania tych sześciu badań, następną serię sześciu badań należy wykonać z obciążeniem 120 N. W innych przyrządach, próbka jest porównywana z wybraną substancją odniesienia, stosując ustaloną procedurę (np. technikę „w górę-w dół”, itp.).

1.6.3.4. Ocena

Wynik badania jest uważany za pozytywny, jeżeli zaszedł wybuch (zapalenie się gwałtownym płomieniem jest równoważne wybuchowi i przedstawiane w sprawozdaniu) przynajmniej raz w jakimkolwiek z badań przy użyciu wyspecyfikowanego przyrządu do tarcia lub odpowiada kryteriom równoważności w alternatywnym badaniu przez tarcie.

2. DANE

W zasadzie, w sensie dyrektywy, substancja jest uważana za przedstawiającą niebezpieczeństwo wybuchu, jeżeli uzyskano pozytywny wynik w badaniach wrażliwości na ciepło, uderzenie i tarcie.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- tożsamość, skład, czystość, zawartość wilgoci itd., badanej substancji,
- postać fizyczna próbki i czy lub nie była kruszona, rozdrabniana i/lub przesiewana,
- obserwacje z czasu trwania badań wrażliwości cieplnej (np. masa próbki, ilość fragmentów itp.),
- obserwacje z czasu trwania badań wrażliwości mechanicznej (np. tworzenie znacznych ilości dymu lub całkowity rozkład bez detonacji, płomienie, iskry, detonacja, gwałtowne zapalenie itp.),
- wyniki każdego rodzaju badania,
- w przypadku gdy wykorzystano alternatywny przyrząd, należy podać uzasadnienie naukowe oraz dowody na korelację między wynikami uzyskanymi przy pomocy podanego przyrządu i przyrządu równoważnego,
- wszelkie użyteczne uwagi, takie jak odniesienie do badań produktów podobnych, które mogą być istotne dla prawidłowej interpretacji wyników.
- wszelkie dodatkowe uwagi istotne dla interpretacji wyników.

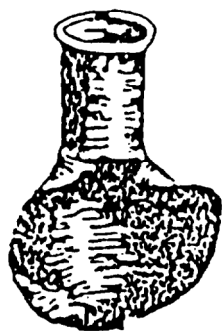
3.2. INTERPRETACJA I OCENA WYNIKÓW

W sprawozdaniu z badań należy podać wszelkie wyniki uznane za fałszywe, stanowiące anomalię lub niereprezentatywne. W przypadku gdyby którykolwiek z wyników powinien zostać odrzucony, należy podać wszelkie alternatywne lub dodatkowe badania. Pomimo wytłumaczenia anomalnych wyników, muszą być zaakceptowane ich wartość nominalne i zastosowane do zgodnej z nimi klasyfikacji substancji.

Rysunek 2

Badanie wrażliwości cieplnej

Przykłady fragmentacji



Bez wybuchu



Bez wybuchu



wybuch



wybuch



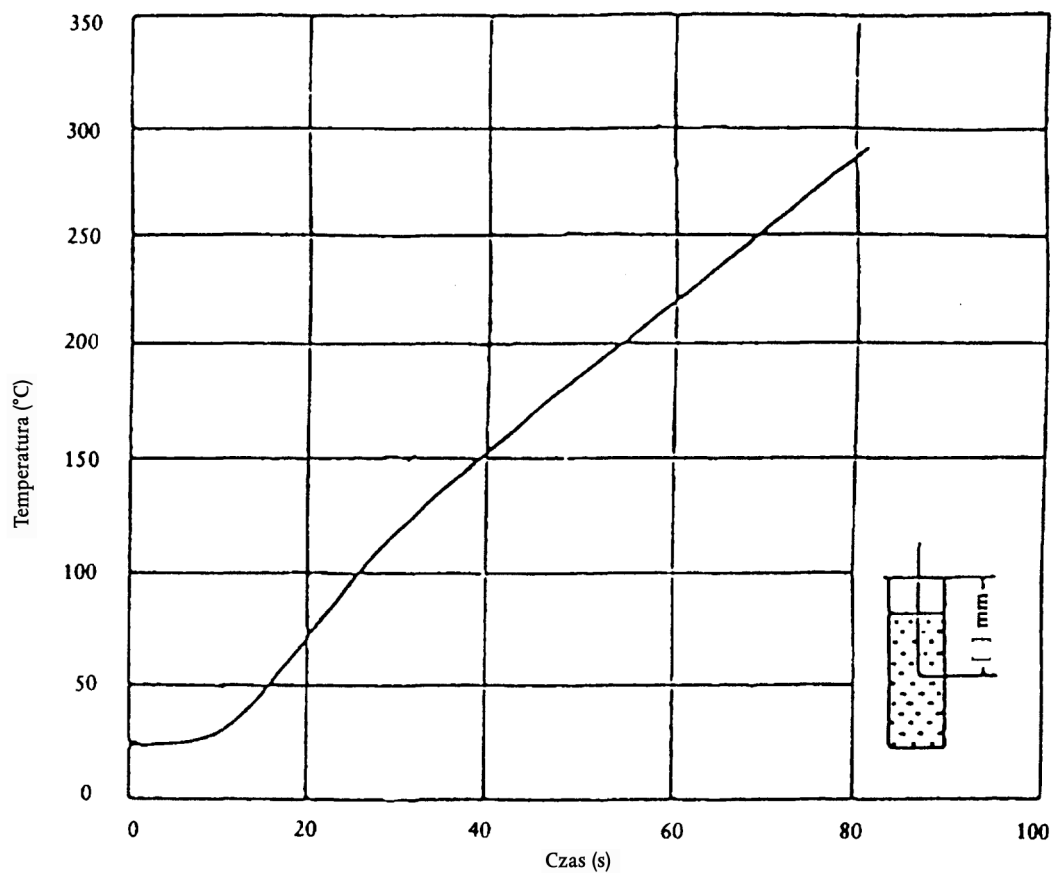
wybuch



wybuch

Rysunek 3

Kalibracja szybkości podgrzewania dla badania wrażliwości cieplnej

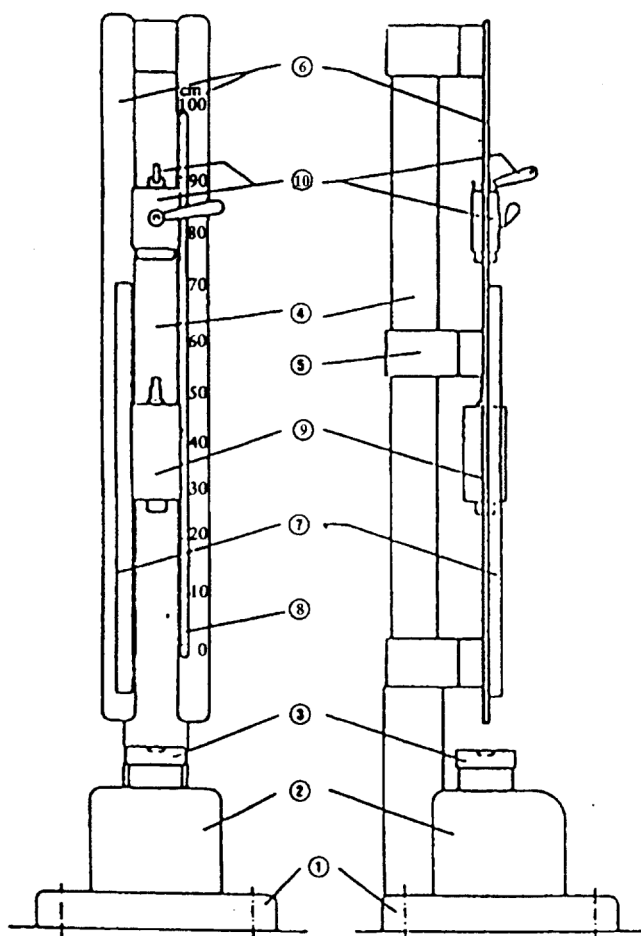


Krzywa temperatura/czas uzyskana przy podgrzewaniu ftalanu dibutyłu (27 cm³) w zamkniętej rurze (1,5 mm płyta kryzowa) przy użyciu szybkości przepływu propanu 3,2 litra/minutę. Temperaturę pomierzono termooogniwem chromel/alumel w osłonie ze stali nierdzewnej średnicy 1mm, umieszczonego centrycznie 43 mm poniżej obrzeża rury. Szybkość grzania między 135 °C i 285 °C powinna wynosić między 185 i 215 K/minutę.

Rysunek 4

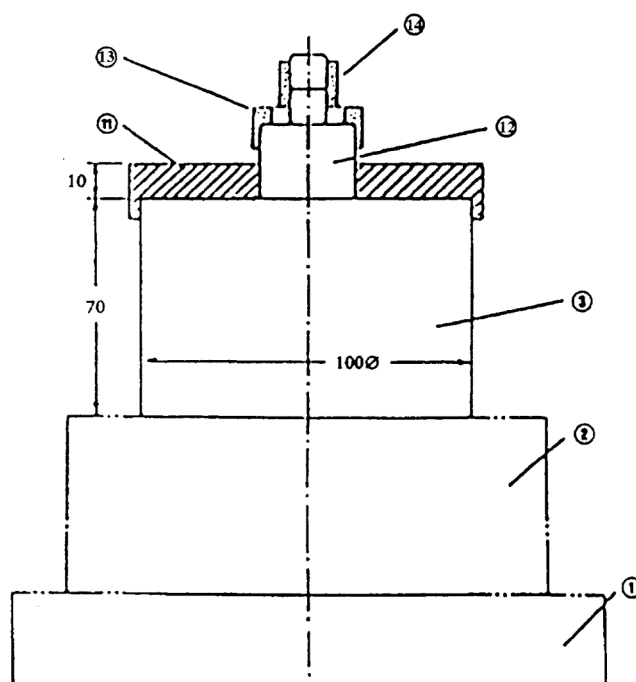
Przyrząd do badania wrażliwości na uderzenie

(wszystkie wymiary w mm)



Rys. 4a Młot spadowy, widok ogólny z przodu i z boku

- (1) podstawa, 450 × 450 × 60
- (2) blok stalowy, 230 × 250 × 200
- (3) kowadło, 100 średnica × 70
- (4) kolumna
- (5) poprzecznicę średnia
- (6) 2 prowadnice
- (7) stojak zębany

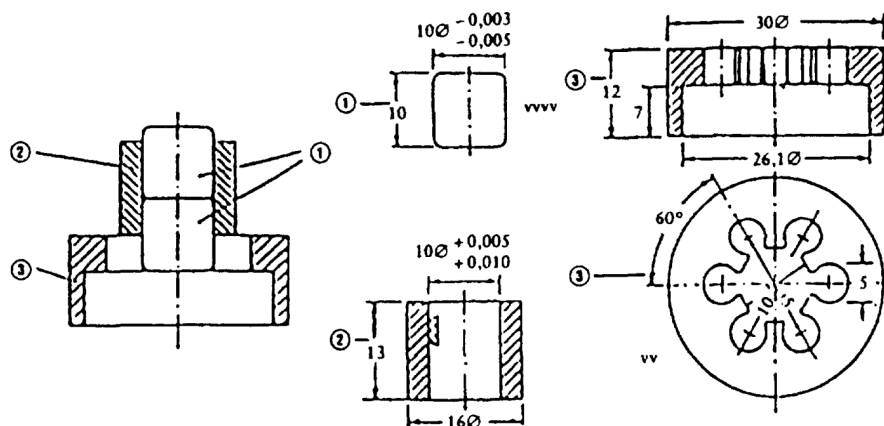


Rys. 4b Młot spadowy, część dolna

- (8) skalowana podziałka
- (9) młot spadowy (masa spadająca)
- (10) mechanizm utrzymujący i zwalnający
- (11) płyta ustalająca
- (12) kowadło pośrednie (wymienne), 26 średnica × 26
- (13) pierścień ustalający z kryzami
- (14) przyrząd uderzeniowy

Rysunek 4

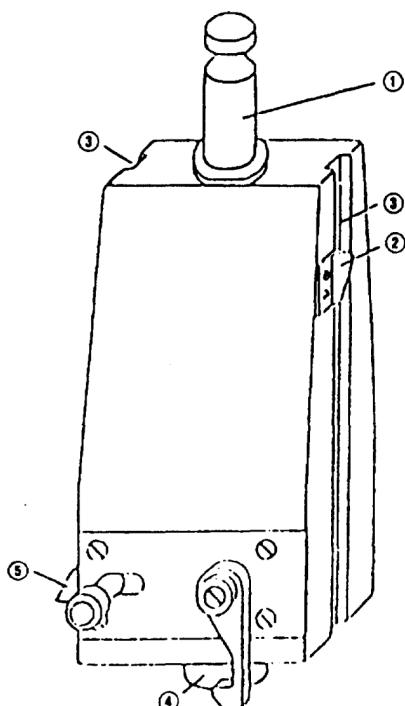
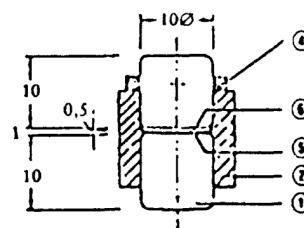
Ciąg dalszy



Rys. 4c Przyrząd uderzeniowy dla substancji w postaci sproszkowanej lub pastopodobnej

- (1) cylindry stalowe
- (2) pierścien prowadzący dla cylindrów stalowych
- (3) pierścien ustalający z kryzami
 - (a) przekrój pionowy
 - (b) rzut poziomy
- (4) pierścien gumowy
- (5) substancja ciekła (40 mm³)
- (6) przestrzeń wolna od cieczy

Rys. 4d Przyrząd uderzeniowy dla substancji ciekłych

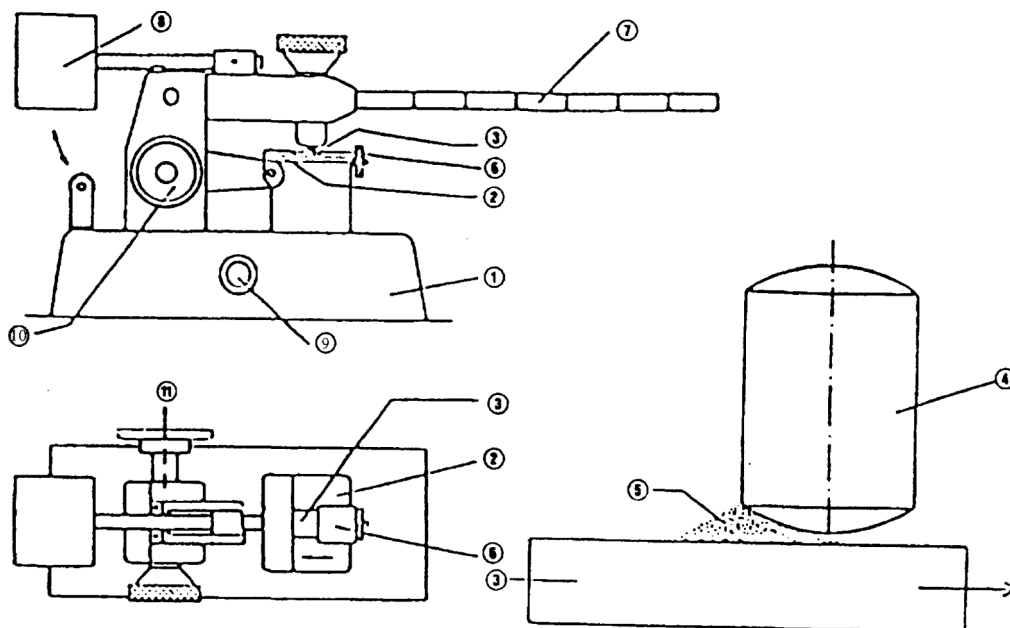


Rys. 4e Młot (masa spadająca 5 kg)

- (1) zawieszony czop
- (2) znacznik wysokości
- (3) rowek ustalający
- (4) cylindryczna głowica uderzeniowa
- (5) zaczep odboju

Rysunek 5

Przyrząd do badania wrażliwości na tarcie



Rys. 5a Przyrząd tarcia; rzut pionowy i widok z góry

Rys. 5b Położenie początkowe pręta na próbce

- 1) stalowa podstawa
- 2) ruchomy wózek
- 3) płyta porcelanowa, $25 \times 25 \times 5$ mm, umocowana na wózku
- 4) umocowany pręt porcelanowy, średnica 10×15 mm
- 5) badana próbka, około 10 mm^3

- (6) uchwyt pręta
- (7) ramię obciążające
- (8) przeciwwaga
- (9) włącznik
- (10) koło dla ustawienia wózka w pozycję startową
- (11) w kierunku elektrycznego silnika napędowego

A.15. TEMPERATURA SAMOZAPŁONU (CIECZE I GAZY)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Badaniu temu należy poddać substancje wybuchowe i substancje ulegające samoistnemu zapaleniu w kontakcie z powietrzem w temperaturze otoczenia. Procedura badania nadaje się do stosowania dla gazów, cieczy i par, które w obecności powietrza mogą zapalić się od gorącej powierzchni.

Temperatura samozapłonu może ulec znacznemu zmniejszeniu w obecności zanieczyszczeń katalitycznych, przez powierzchnię materiału lub większą objętość naczynia do badania.

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Stopień samozapalności jest wyrażony w warunkach temperatury samozapłonu. Temperatura ta to najniższa temperatura, w której badana substancja zapali się po zmieszaniu jej z powietrzem w warunkach podanych w opisie metody badania.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Substancje odniesienia zacytowano w normach (patrz 1.6.3). Powinny one służyć głównie do sprawdzenia od czasu do czasu zdolności metody i umożliwiać porównanie z wynikami uzyskanymi innymi metodami.

1.4. ZASADA METODY

Metoda wyznacza minimalną temperaturę powierzchni wewnętrznej obudowy, która powoduje zapalenie się gazu, pary lub cieczy wtrysniętej do obudowy.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Powtarzalność zmienia się w zależności zakresu temperatur samozapłonu i zastosowanej metody badania.

Czułość i specyficzność zależą od zastosowanej metody badania.

1.6. OPIS METODY**1.6.1. Przyrząd**

Przyrząd jest opisany w metodzie podanej w 1.6.3.

1.6.2. Warunki badania

Badanie próbki substancji badanej przeprowadza się zgodnie z metodą określoną w 1.6.3.

1.6.3. Przeprowadzenie badania

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

2. DANE

Zapisać temperaturę badania, ciśnienie atmosferyczne, ilość wykorzystanej próbki, odstęp czasowy do uzyskania zapłonu.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- precyzyjna specyfikacja substancji (tożsamość i zanieczyszczenia),
- ilość użytej próbki, ciśnienie atmosferyczne,
- zastosowany przyrząd,
- wyniki pomiarów (temperatury badania, wyniki dotyczące zapłonu, odpowiednie opóźnienia),
- wszelkie dodatkowe uwagi istotne dla interpretacji wyników.

4. **LITERATURA**

Brak.

A.16. WZGLĘDNA TEMPERATURA SAMOZAPŁONU DLA CIAŁ STAŁYCH

1. **METODA**

1.1. **WPROWADZENIE**

Badaniu temu nie należy poddawać substancji wybuchowych i substancji ulegających samoistnemu zapaleniu w kontakcie z powietrzem w temperaturze otoczenia.

Celem niniejszego badania jest przedstawienie wstępnych informacji na temat samozapłonu substancji stałych w podwyższonych temperaturach.

W przypadku, gdy temperatura powstała albo w reakcji substancji z tlenem lub podczas rozkładu egzotermicznego nie zostaje wystarczająco szybko utracona do otoczenia, dochodzi do samopodgrzania, co z kolei prowadzi do samozapłonu. Do samozapłonu dochodzi więc wtedy, gdy szybkość wytwarzania ciepła przekracza szybkość jego utraty.

Procedura badania jest przydatna jako wstępne badanie klasyfikacyjne substancji stałych. Ze względu na złożony charakter zapłonu i spalania się ciał stałych, temperatura samozapłonu ustalona przy użyciu tej metody badania powinna być wykorzystywana wyłącznie do celów porównawczych.

1.2. **DEFINICJE I JEDNOSTKI**

Temperatura samozapłonu uzyskana przy użyciu tej metody to minimalna temperatura otoczenia wyrażona w °C, w której pewna objętość substancji będzie ulegać zapaleniu w określonych warunkach.

1.3. **SUBSTANCJE ODNIESIENIA**

Brak.

1.4. **ZASADA METODY**

Pewna ilość substancji do badań jest umieszczana w piecu w temperaturze pokojowej; krzywa temperatura/czas wiążąca warunki w środku próbki jest rejestrowana do momentu, gdy temperatura pieca wzrośnie do 400 °C, lub do temperatury topnienia, jeśli jest niższa, z szybkością 0,5 °C /min. Do celu niniejszego badania, temperatura pieca w której temperatura próbki osiągnie 400 °C przez samopodgrzanie jest zwana temperaturą samozapłonu.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY

1.6.1. **Przyrząd**

1.6.1.1. *Piec*

Piec laboratoryjny (o objętości około 2 litrów) z programatorem temperatury wyposażony w obieg naturalnego powietrza i zawór przeciwybuchowy. W celu zapobieżenia ewentualnemu ryzyku wybuchu, wszystkie gazy pochodzące z rozkładu nie mogą wejść w kontakt z elementami ogrzewania elektrycznego.

1.6.1.2. *Kostka z siatki drucianej*

Kawałek drucianej siatki stalowej o otworach oczek 0,045 mm należy wyciąć zgodnie z szablonem przedstawionym na rysunku 1. Siatkę składa się i zabezpiecza drutem u góry otwartego kubka.

1.6.1.3. *Termoogniwa*

Odpowiednie termoogniwa

1.6.1.4. *Rejestrator*

Dowolny rejestrator dwukanałowy, wykalibrowany od 0 do 600 °C lub o odpowiednim napięciu.

1.6.2. **Warunki badania**

Substancje są badane w stanie otrzymanym.

1.6.3. **Przeprowadzenie badania**

Kostkę napełnia się badaną substancją i łagodnie uklepuje, dodając substancję, aż kostka będzie całkowicie wypełniona. Następnie próbkę zawiesza się pośrodku pieca w temperaturze pokojowej. Jedno termoogniwo umieszcza się pośrodku kostki, a drugie między kostką i ścianą pieca w celu zapisywania temperatury w piecu.

Prowadzi się ciągły zapis temperatury pieca i próbki podczas podwyższania temperatury pieca do 400 °C lub do temperatury topnienia substancji stałej, jeżeli ta ostatnia jest niższa, z szybkością 0,5 °C/min.

Gdy substancja się zapali, termoogniwo w próbce pokaże bardzo ostry wzrost temperatury powyżej temperatury w piecu.

2. **DANE**

Temperatura pieca przy której temperatura próbki osiąga 400 °C przez samopodgrzanie jest stosowana do obliczeń (patrz rysunek 2).

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— opis badanej substancji,

— wyniki pomiarów, włącznie z krzywą zależności temperatura/czas,

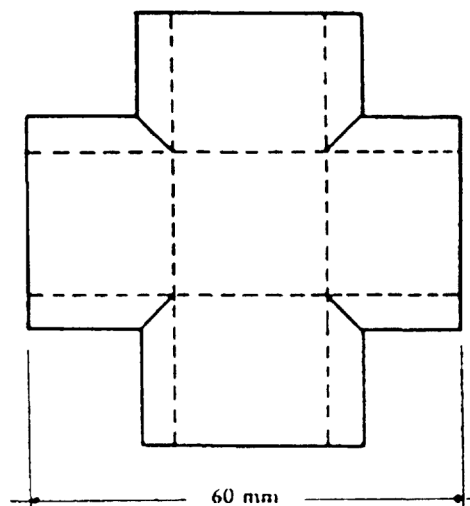
— wszelkie dodatkowe uwagi istotne dla interpretacji wyników.

4. LITERATURA

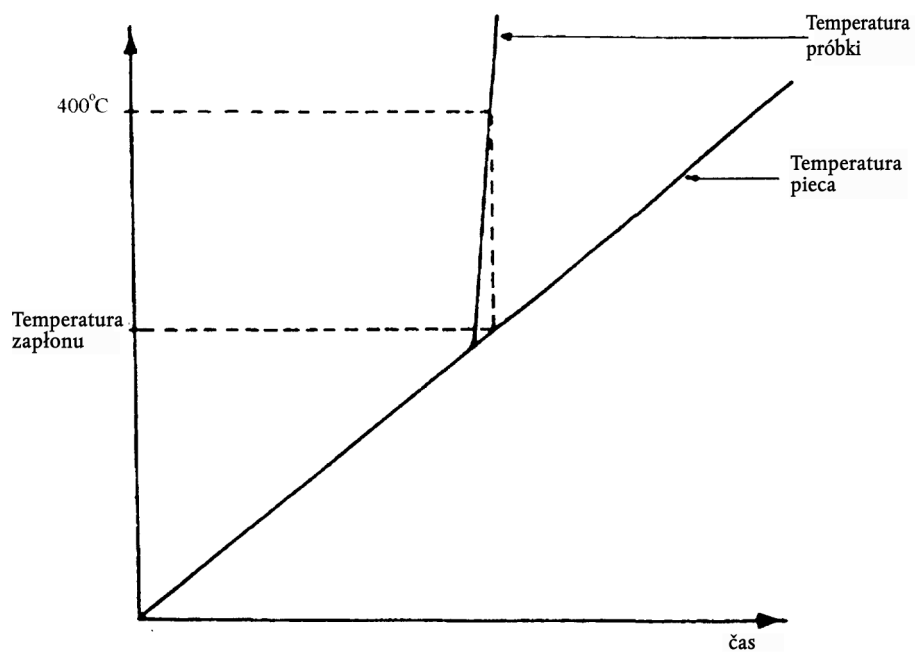
- (1) NF T 20-036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

Rysunek 1

Szablon kostki do badań 20 mm

**Rysunek 2**

Typowa krzywa temperatura/czas



A.17. WŁAŚCIWOŚCI UTLENIAJĄCE (CIAŁA STAŁE)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Do przeprowadzenia badania przydatne jest posiadanie wstępnych informacji na temat ewentualnych właściwości wybuchowych substancji.

Niniejsze badanie nie jest przeznaczone dla cieczy, gazów, substancji wysoce łatwopalnych i wybuchowych lub nadtlenków organicznych.

Niniejsze badanie nie musi być prowadzone, gdy analiza wzoru strukturalnego chemicznego ustala ponad wszelkie wątpliwości, że substancja jest niezdolna do egzotermicznego reagowania z materiałem palnym.

W celu upewnienia się, czy badanie nie powinno być przeprowadzone z zastosowaniem szczególnych środków ostrożności, należy wykonać badanie wstępne.

1.2. DEFINICJA I JEDNOSTKI

Czas spalania: czas reakcji, w sekundach, jaki zabiera strefie reakcyjnej przejście wzdłuż stosu, zgodnie z procedurą określoną w 1.6.

Szybkość spalania: wyrażana w milimetrach na sekundę.

Maksymalna szybkość spalania: największe wartości szybkości spalania uzyskane w przypadku mieszanin zawierających od 10 do 90% wagowych utleniacza.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Azotan baru (czystości analitycznej) jest używany jako substancja odniesienia w próbie właściwej i w badaniu wstępnym.

Mieszaniną odniesienia jest ta mieszanina azotanu baru ze sproszkowaną celulozą, przygotowana zgodnie z ppkt 1.6, która charakteryzuje się maksymalną szybkością spalania (zazwyczaj mieszanina z 60% azotanem baru wagowo).

1.4. ZASADA METODY

Dla zachowania bezpieczeństwa przeprowadza się badanie wstępne. Nie wymaga się prowadzenia dalszych badań, gdy wstępne badanie wyraźnie wskazuje, że badana substancja posiada właściwości utleniające. Jeżeli to nie jest ten przypadek, substancja musi być przedmiotem pełnego badania.

W pełnym badaniu substancję badaną i określoną substancję palną należy mieszać z różną szybkością. Z każdej mieszaniny formuje się następnie stos, który jest zapalany z jednej strony. Maksymalną ustaloną szybkość spalania porównuje się z maksymalną szybkością spalania mieszaniny odniesienia.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

W razie potrzeby można zastosować dowolną metodę mielenia i mieszania, o ile różnica maksymalnej szybkości spalania w sześciu oddzielnych badaniach będzie odbiegać od wartości średniej arytmetycznej o nie więcej niż 10%.

1.6. OPIS METODY

1.6.1. Przygotowanie

1.6.1.1. Substancja badana

Zmniejszyć wielkość ziarna badanej próbki do wielkości ziarna $< 0,125$ mm stosując następującą procedurę: przesiać badaną substancję, rozdrobnić pozostałą frakcję, powtarzać procedurę do momentu, gdy cała porcja do badań przejdzie przez sito.

Można zastosować dowolną metodę mielenia lub przesiewania spełniającą kryteria jakościowe.

Przed przygotowaniem mieszaniny substancję suszy się w temperaturze $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, do uzyskania stałej masy. W przypadku rozkładu badanej substancji w temperaturze poniżej $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ substancję tę należy wysuszyć w odpowiedniej, niższej temperaturze.

1.6.1.2. Substancja palna

Jako substancję palną wykorzystuje się sproszkowaną celulozę. Celuloza powinna być rodzaju stosowanego w chromatografii cienkowarstwowej lub chromatografii kolumnowej. Odpowiednim sprawdzonym typem jest celuloza z więcej niż 80% włókien o długości między 0,020 i 0,075 mm. Proszek celulozy jest przesiewany przez sito o wymiarze oczka 0,125 mm. Poprzez całe badanie stosuje się tę samą partię celulozy.

Przed przygotowaniem mieszaniny, sproszkowana celuloza jest suszona w $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ do chwili uzyskania stałej masy.

Jeżeli w badaniu wstępnym stosowana jest mączka drzewna, należy przygotować mączkę drzewną z miękkiego drewna, poprzez zebranie porcji, która przechodzi oczko siatki 1,6 mm, energicznie wymieszać, a następnie suszyć w $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez cztery w warstwie nie grubszej niż 25 mm. Ochłodzić i przechowywać w hermetycznym pojemniku, w pełni wypełnionym jak to praktycznie wymagane, najlepiej w obrębie czasu 24 godzin od wysuszenia.

1.6.1.3. Źródło zapłonu

Jako źródła zapłonu należy użyć gorącego płomienia gazowego palnika (średnicy minimum 5 mm). Jeżeli stosuje się inne źródło zapłonu (np. przy badaniu w atmosferze obojętnej), należy przedstawić w sprawozdaniu opis i uzasadnienie.

1.6.2. Przeprowadzenie badania

Uwaga:

Mieszaniny utleniaczy z celulozą lub mączką drzewną muszą być traktowane jako potencjalnie wybuchowe i należy obchodzić się z nimi z należytą ostrożnością.

1.6.2.1. Badanie wstępne

Wysuszona substancja jest wymieszana z wysuszoną celulozą lub mączką drzewną w proporcjach 2 części substancji badanej na 1 część celulozy lub mączki drzewnej wagowo, po czym z mieszaniny kształtuje się mały, stożkowaty stos o wymiarach $3,5\text{ cm}$ (średnica podstawy) $\times$ $2,5\text{ cm}$ (wysokość) przez napełnienie, bez ubijania, stożkowatej formy (np. szklanego lejka laboratoryjnego z zatkaną szyjką).

Stos umieszcza się na chłodnej, niepalnej, nieporowatej płycie bazowej o niskim przewodnictwie cieplnym. Badanie należy przeprowadzić w szafie wyciągowej, tak jak opisano w 1.6.2.2.

Źródło zapłonu wchodzi w kontakt ze stożkiem. Należy zaobserwować i zapisać intensywność i czas trwania ostatecznej reakcji.

Substancja jest uważana za utleniającą jeżeli reakcja zachodzi gwałtownie.

W każdym przypadku, gdy wynik można poddać w wątpliwość, konieczne jest przeprowadzenie pełnej serii badań opisanych powyżej.

1.6.2.2. *Badanie impulsowe*

Przygotować kolejne porcje mieszaniny utleniacza/celulozy zawierające od 10 do 90% wagowych części utleniacza w odstępach co 10%. Dla granicznych przypadków, należy użyć mieszanin pośrednich utleniacz/celuloza, dla uzyskania maksymalnej szybkości spalania bardziej precyzyjnie.

Należy uformować stos przy pomocy formy. Forma jest wykonana z metalu, ma długość 250 mm i trójkątny przekrój, przy czym jej wewnętrzna wysokość wynosi 10 mm, a wewnętrzna szerokość - 20 mm. Po obu stronach formy w kierunku wzdłużnym montuje się dwie blaszki jako ograniczenia poprzeczne wystające na 2 mm poza górną krawędź trójkątnego przekroju (rysunek). Niniejszy układ jest luźno napełniany lekkim nadmiarem mieszaniny. Po jednokrotnym upuszczeniu formy z wysokości 2 cm na twardą powierzchnię pozostały nadmiar substancji należy zeszkrobać przy pomocy skośnie ustawionego arkusza. Następnie ograniczenia poprzeczne należy usunąć i wygładzić pozostały proszek przy pomocy wałka. Następnie na górze formy umieszcza się niepalną, nieporowatą o niskim przewodnictwie cieplnym, płytę bazową, odwraca przyrząd i zdejmuje formę.

Ustawić stos w kierunku prostopadłym do ciągu powietrza w szafie wyciągowej.

Szybkość przepływu powietrza powinna być wystarczająca do zapobieżenia przedostaniu się dymu do laboratorium i nie powinna być zmieniana w trakcie badania. Wokół przyrządu należy ustawić ekran chroniący przed ciągiem powietrza.

Ze względu na higroskopijność celulozy i badanych substancji, badanie należy przeprowadzić jak najszybciej.

Zapalić jeden z końców stosu przez dotknięcie płomieniem.

Zmierzyć czas reakcji na odległości 200 mm po tym jak strefa reakcji rozprzestrzeni się z początkowej odległości 30 mm.

Badanie przeprowadza się z substancją odniesienia i przynajmniej raz dla każdego z zakresów mieszanin badanej substancji z celulozą.

Jeżeli maksymalna szybkość spalania okazuje się być znacząco większa niż ta z mieszaniny odniesienia, badanie należy wstrzymać; poza tym badanie musi być powtarzane pięć razy dla każdej z trzech mieszanin dających największą szybkość spalania.

Jeżeli wynik podejrzewany jest o nieprawdziwie pozytywny, należy powtórzyć badanie stosując obojętną substancję o podobnej wielkości ziarna, taką jak diatomit w miejsce celulozy. Alternatywnie mieszanina badana substancja/celuloza o największej szybkości spalania powinna być ponownie zbadana w obojętnej atmosferze (< 2% wagowych zawartości tlenu).

2. **DANE**

Ze względów bezpieczeństwa maksymalna szybkość spalania - nie jej wartość średnia - musi być uważana za charakterystyczną właściwością utleniającą substancji badanej.

Istotne znaczenie dla oceny ma najwyższa wartość szybkości spalania w serii sześciu badań danej mieszaniny.

Sporządzić wykres najwyższej wartości szybkości spalania dla każdej mieszaniny w zależności od stężenia utleniacza. Z wykresu należy wziąć maksymalną szybkość spalania.

Sześć zmierzonych wartości szybkości spalania w obrębie serii uzyskanej z mieszaniną z maksymalną szybkością spalania nie może odbiegać od wartości średniej arytmetycznej o więcej niż 10%; w innym przypadku należy poprawić metody mielenia i mieszania.

Należy porównać maksymalną uzyskaną szybkość spalania z maksymalną szybkością spalania mieszaniny odniesienia (patrz: 1.3).

Jeżeli badania przeprowadzono w obojętnej atmosferze, maksymalną szybkość reakcji porównuje się z tą z mieszaniny odniesienia w atmosferze obojętnej.

3. SPRAWOZDANIE**3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- tożsamość, skład, czystość, zawartość wilgoci i tym podobne dane badanej substancji;
- wszelkie procesy przetwarzania, którym była poddawana próbka badana (np. mielenie, suszenie,...),
- źródło zapłonu używane w badaniach;
- wyniki pomiarów;
- sposób zachodzenia reakcji (np. błyskawiczne spalanie na powierzchni, spalanie w całej masie, wszelkie informacje dotyczące produktów spalania,...),
- wszelkie dodatkowe uwagi istotne dla interpretacji wyników, włącznie z opisem intensywności reakcji (płomienie, iskry, dymy, powolne tlenie się itp.) oraz przybliżony czas trwania uzyskany we wstępnym badaniu ze względów bezpieczeństwa/klasyfikacyjnym w przypadku zarówno substancji badanej, jak i substancji odniesienia.
- wyniki badań substancji obojętnej, jeśli stosowano;
- wyniki z badań w obojętnej atmosferze, jeśli stosowano.

3.2. INTERPRETACJA WYNIKU

Substancja jest uważana za substancję utleniającą gdy:

- a) we wstępnym badaniu zachodzi gwałtowna reakcja;
- b) w pełnym badaniu, maksymalna szybkość spalania badanych mieszanin jest wyższa lub równa maksymalnej szybkości spalania mieszaniny odniesienia z celulozy i azotanu baru.

W celu zapobieżenia wynikom nieprawdziwie pozytywnym, wyniki uzyskane przy badaniu substancji zmieszanej z materiałem obojętnym i/lub przy badaniu w atmosferze obojętnej muszą być także rozważone przy interpretacji wyników.

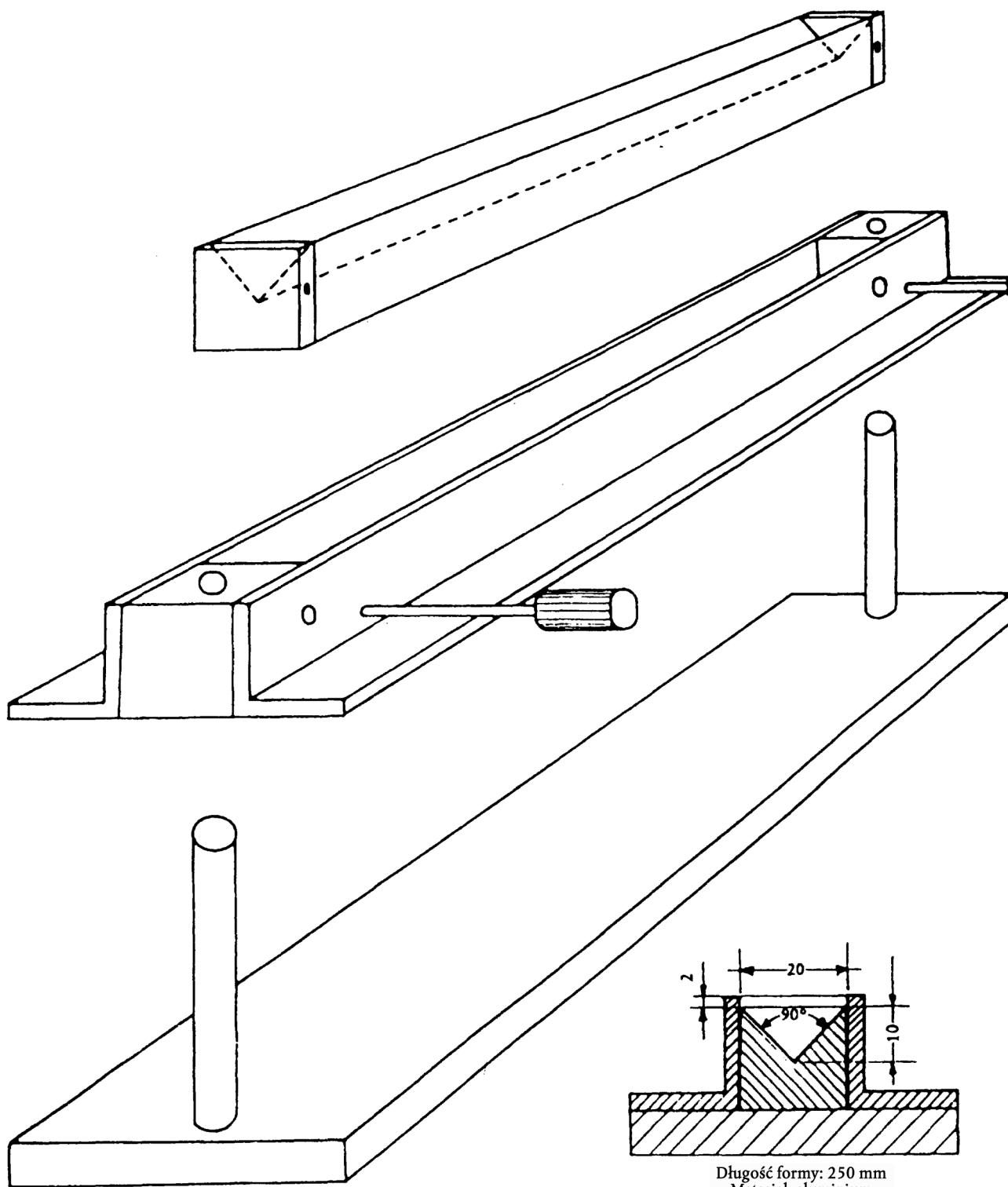
4. LITERATURA

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

Dodatek

Rysunek

Forma i akcesoria do przygotowania stosu
(wszystkie wymiary w milimetrach)



CZĘŚĆ B: METODY USTALANIA TOKSYCZNOŚCI

OGÓLNE WPROWADZENIE: CZĘŚĆ B

A. WPROWADZENIE

Patrz: Ogólne wprowadzenie.

B. DEFINICJE

- (i) **Ostra toksyczność** obejmuje niekorzystne skutki występujące w danym czasie (zwykle 14 dni) po podaniu jednorazowej dawki substancji.
- (ii) **LD₅₀** (mediana dawki śmiertelnej) jest obliczoną metodami statystycznymi pojedynczą dawką substancji, co do której można się spodziewać, że spowoduje zgon 50% otrzymujących ją zwierząt. Wartość LD50 wyraża się w jednostkach masy badanej substancji na jednostkę masy zwierzęcia doświadczalnego (w miligramach na kilogram).
- (iii) **LC₅₀** (mediana stężenia śmiertelnego) jest obliczonym metodami statystycznymi stężeniem substancji, co do którego można się spodziewać, że spowoduje zgon w trakcie ekspozycji lub po ustalonym czasie od ekspozycji u 50% zwierząt narażonych na substancję przez określony czas. Wartość LC50 jest wyrażana jako masa substancji badanej na wzorcową objętość powietrza (miligramy na litr).
- (iv) **Poziom niepowodujący działań niepożądanych** to maksymalna dawka lub poziom ekspozycji stosowane w badaniu, które nie dają rejestrowalnych oznak toksyczności.
- (v) **Toksyczność podostra/Toksyczność podchroniczna** obejmuje działania niepożądane, do których dochodzi u zwierząt doświadczalnych w wyniku wielokrotnego, codziennego dawkowania lub narażenia na związek chemiczny przez krótką część ich przewidywanej długości życia.
- (vi) **Maksymalna dawka tolerowana (MTD)** jest najwyższym poziomem dawki wywołującym u badanych zwierząt oznaki toksyczności bez znaczącego wpływu na przeżycie odnoszące się do badania, w którym jest użyta.
- (vii) **Drażnienie skóry** polega na wywoływaniu odwracalnych zmian zapalnych skóry po zastosowaniu substancji badanej.
- (viii) **Drażnienie oka** polega na wywoływaniu odwracalnych zmian zapalnych oczu po nałożeniu substancji badanej na przednią powierzchnię gałki ocznej.
- (ix) **Działania uczulające na skórę** (uczuleniowe kontaktowe zapalenie skóry) jest immunologiczną, skórną reakcją na substancję.

Specyficzne definicje dla toksyczności inhalacyjnej:

- **aerozol** jest zdefiniowany jako cząsteczki (ciało stałe i/lub ciecz) jednorodnie rozproszone w powietrzu
- **średnica aerodynamiczna** to średnica kuli jednostki gęstości (1 g/cm³) posiadającej tę samą końcową szybkość osadzania jak omawiana cząstka.
- **średnica aerodynamiczna średniej masy (MMAD)** jest wyliczoną średnicą aerodynamiczną, która dzieli rozkład granulometryczny aerozolu na pół przy pomiarze masowym.
- **geometryczne odchylenie standardowe (GSD)** jest stosunkiem wyznaczonych 84 percentyli do 50 percentyli i wskazuje nachylenie krzywej skumulowanego rozkładu wielkości ziarna, powodując że rozkład wielkości jest logarytmiczno-normalny.

Specyficzne definicje dla procedury ustalonej dawki w ustalaniu ostrej toksyczności doustnej:

- **Wyraźne działanie toksyczne** odnosi się do objawów działania toksycznego widocznych po podaniu badanej substancji, które są na tyle poważne, że podanie następnej wyższej wielkości dawki może spowodować śmierć.
- **Dawka różnicująca** jest najwyższą z czterech ustalonych wielkości dawek, która może być podawana bez powodowania zgonów związanych z substancją chemiczną (włączając zgony ludzi).

C. MUTAGENNOŚĆ (włącznie z badaniami przed-klasyfikacyjnymi rakotwórczości)

W celu dokonania wstępnej oceny potencjału mutagennego substancji, konieczne jest uzyskanie informacji na temat dwóch kategorii punktów końcowych, a mianowicie mutacji genowych i aberracji chromosomalnych.

Te dwa punkty końcowe ocenia się przy użyciu następujących badań:

- (i) Badania wywoływania mutacji genowych (punktowych) w komórkach prokariotycznych, takich jak komórki bakterii *Salmonella typhimurium*; możliwe do przyjęcia są także badania z wykorzystaniem *Escherichia coli*. Wybór między tymi dwoma badanymi organizmami może zależeć od charakteru badanego związku chemicznego.
- (ii) Badania wywoływania aberracji chromosomalnych w komórkach ssaków hodowanych *in vitro*; możliwa do przyjęcia jest także procedura *in vivo* (badanie mikrojądrowe lub metafazalna analiza komórek szpiku kostnego). Jednakże, w razie braku jakichkolwiek przeciwwskazań metody *in vitro* są usilnie zalecane.

D. OCENA I INTERPRETACJA

Istnieją ograniczenia co do zakresu, w jakim wyniki badań przeprowadzonych na zwierzętach i *in vitro* można bezpośrednio ekstrapolować na ludzi. Należy o tym pamiętać przy ocenie i interpretacji badań.

Tam gdzie to jest dostępne, dowody działania niepożądanego u ludzi powinny mieć związek z ustalaniem potencjalnego działania substancji chemicznych na ludzką populację.

E. LITERATURA

Toksykologia jest rozwijającą się nauką eksperymentalną, w związku z czym istnieje bardzo obszerna literatura na każdy temat. Istotne informacje można znaleźć w wytycznych OECD dotyczących badań.

Uwagi dodatkowe:

Opieka nad zwierzętami

W badaniu toksyczności podstawowe znaczenie ma ścisła kontrola warunków środowiska i wykorzystanie właściwych technik opieki nad zwierzętami.

i) Warunki przetrzymywania

Warunki środowiska w pomieszczeniach lub zamknięciach, w których przebywa zwierzę doświadczalne, powinny być właściwe dla badanych gatunków. W przypadku szczurów, myszy i świnek morskich właściwe warunki to temperatura pokojowa wynosząca 22 ± 3 °C i wilgotność względna od 30 do 70%; w przypadku królików temperatura powinna wynosić 20 ± 3 °C, a wilgotność względna od 30 do 70%.

Niektóre techniki eksperymentalne są szczególnie wrażliwe na wpływ temperatury. W takich przypadkach szczegółowe dane na temat właściwych warunków podano w opisie metody badania. W przypadku wszystkich badań skutków toksycznych należy prowadzić monitorowanie i zapisywanie temperatury i wilgotności. Dane te należy podać w sprawozdaniu końcowym z badania.

W przypadku wykorzystania sztucznego oświetlenia należy zachować zazwyczaj sekwencję 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Dane na temat wzorca oświetlenia należy zapisywać i włączyć do sprawozdania końcowego z badania.

W sprawozdaniach z badań na zwierzętach ważne jest podanie wykorzystanych rodzajów klatek oraz liczby zwierząt przebywających w każdej klatce podczas ekspozycji na związek chemiczny oraz w późniejszych okresach obserwacji.

ii) Warunki karmienia

Dieta powinna zaspokajać wszystkie potrzeby pokarmowe badanych gatunków. W przypadku gdy substancje badane podaje się zwierzętom z pokarmem, może dochodzić do zmniejszenia wartości odżywczej tego ostatniego wskutek interakcji między substancją i składnikami pożywienia.

Możliwość takiej reakcji należy wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników badań.

W diecie nie mogą być obecne w istotnym stężeniu zanieczyszczenia, o których wiadomo, że wpływają na toksyczność.

Dobrostan zwierząt

Opracowując szczegółowo metody badania, odpowiednio rozważono dobrostan zwierząt. Kilka przykładów skrótowo podano poniżej, ale niniejszy wykaz nie jest wyczerpujący. Dokładny sposób sformułowania i/lub warunki powinny być odczytane w tekście metod:

- Dla ustalenia ostrej toksyczności doustnej, wprowadzono metodę alternatywną „procedurę ustalonej dawki”. Niniejsza procedura nie wykorzystuje śmierci jako specyficznego punktu docelowego. Wykorzystuje ona niewielką ilość zwierząt i owocuje zmniejszeniem bólu i stanu zagrożenia, w stosunku do klasycznego ustalania ostrej toksyczności doustnej.
- Liczba wykorzystywanych zwierząt jest zredukowana do naukowo dopuszczalnego minimum: na poziom dawki, tylko 5 zwierząt o tej samej płci jest badanych do celów metod B.1 i B.3; tylko 10 zwierząt (i tylko 5 w negatywnej grupie kontrolnej) jest używanych przy określaniu działania uczulającego na skórę za pomocą badania maksymalizacji na śwince morskiej (metoda B.6); liczba zwierząt potrzebna do kontroli pozytywnej przy badaniu mutagenności *in vivo* jest również obniżona (metody B.11 i B.12)
- Ból i cierpienie zwierząt podczas badania są minimalizowane: Może wystąpić konieczność humanitarnego zabicia zwierząt przejawiających ostre i trwałe oznaki cierpienia i bólu; dawkowanie badanych substancji w sposób, o którym wiadomo, że powoduje wyraźny ból i cierpienie z powodu właściwości żrących i drażniących, nie musi być przeprowadzane (metody B.1, B.2 i B.3).
- Unika się badania z użyciem nieodpowiednio wysokich dawek, przez wprowadzenie badań granicznych, nie tylko w badaniach ostrej toksyczności (metody B.1, B.2 i B.3) ale także w badaniach *in vivo* mutagenności (metody B.11 i B.12).
- Strategia badania podrażnienia zezwala obecnie na niewykonanie badania, lub jego zredukowanie do badania pojedynczego zwierzęcia, w przypadku gdy mogą być dostarczone wystarczające naukowe dowody.

Takie naukowe dowody mogą być oparte na właściwościach fizyko-chemicznych substancji, na wynikach innych badań już przeprowadzonych, lub dobrze uzasadnionych wynikach badań *in vitro*. Przykładowo, jeżeli zostało przeprowadzone badanie ostrej toksyczności dermalnej przy dawce badania granicznego (metoda B.3), i nie zaobserwowano żadnego podrażnienia skóry, dalsze badanie dotyczące podrażnienia skóry (metoda B.4) może być niepotrzebne; materiały, które wykazywały wyraźne działanie żrące i ostre podrażnienie skóry w badaniu podrażnienia skóry (metoda B.4) nie powinny być dalej badane w zakresie podrażnienia oka (metoda B.5).

B.1 TOKSYCZNOŚĆ OSTRA (DOUSTNA)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJE

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Substancja badana jest podawana doustnie przez zgłębnik żołądkowy w stopniowanych dawkach kilku grupom zwierząt doświadczalnych, po jednej dawce na grupę. Wybór dawek jest oparty na wynikach zakresu ustaleń badania. Następnie obserwuje się skutki podania substancji i zgony. Zwierzęta, które zdechną w trakcie badania, i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok. Metoda ta jest ukierunkowana przede wszystkim na badania na gatunkach gryzoni.

Zwierzęta wykazujące ciężkie i trwałe oznaki stanu zagrożenia i bólu mogą wymagać humanitarnego uśmiercenia. Dozowanie badanych substancji w sposób znany z powodowania znaczącego bólu i stanu zagrożenia z powodu właściwości żrących lub drażniących nie może być przeprowadzane.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA**1.6.1. Przygotowania**

Zwierzęta muszą być trzymane w doświadczalnych warunkach pobytu i karmienia przez co najmniej pięć dni przed przeprowadzeniem badania. Przed przeprowadzeniem badania zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta są wybierane losowo i przydzielane do poszczególnych grup otrzymujących substancję. W razie potrzeby badaną substancję rozpuszcza się lub sporządza jej zawiesinę w odpowiednim podłożu. Zaleca się, aby w miarę możliwości najpierw rozważyć wykorzystanie roztworu wodnego, następnie roztworu w oleju roślinnym, a następnie ewentualnych roztworów w innych podłożach, bądź też zawiesiny. W przypadku podłoży innych niż wodne musi być znana charakterystyka ich toksyczności istotna dla badania, bądź też taką charakterystykę należy określić przed badaniem lub w trakcie jego wykonywania. U szczurów w zwykłych warunkach objętość nie powinna przekraczać 10 ml/kg masy ciała, z wyjątkiem roztworów wodnych, w którym to przypadku można zastosować ilość 20 ml/kg. Zmienność badanej objętości można zmniejszyć do minimum przez takie dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość wszystkich wielkości dawek.

1.6.2. Warunki badania**1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne**

O ile nie ma przeciwwskazań, preferowanym gatunkiem jest szczur.

Należy wykorzystywać powszechnie stosowane szczepy laboratoryjne. Dla każdej płci, na początku badania zakres zmienności wagowej użytych zwierząt nie powinien przekraczać $\pm 20\%$ właściwej wartości średniej.

1.6.2.2. *Liczba i płeć*

Po co najmniej pięć gryzoni jest używanych dla każdej wielkości dawki. Powinny być one wszystkie jednakowej płci. Jeżeli stosuje się samice, powinny być one nieródkami i nie mogą być w ciąży. Jeżeli dostępna jest informacja wskazująca, że dana płeć jest znacząco bardziej czuła, należy użyć do dawkowania zwierząt tej płci.

Uwaga: W badaniach ostrej toksyczności u zwierząt wyższego rzędu niż gryzonie, należy rozważyć użycie mniejszej ilości.

Dawki muszą być starannie wybrane oraz należy dołożyć wszelkich starań by nie przekraczać dawek średniej toksyczności. Należy unikać podawania w takich badaniach dawek śmiertelnych substancji badanej.

1.6.2.3. *Wielkość dawki*

Powinno się zapewnić odpowiednią ich liczbę - co najmniej trzy - przy czym należy zachować odpowiednie odstępy między nimi, tak aby uzyskać grupy badane różniące się istotnie efektami toksycznymi i stopniem śmiertelności. Dane powinny być wystarczające do opracowania krzywej reakcja/dawka oraz, o ile to będzie możliwe, do ustalenia w możliwy do przyjęcia sposób wartości LD_{50} .

1.6.2.4. *Badanie graniczne*

Jeżeli używane są gryzonie, przeprowadza się badanie graniczne przy jednej wielkości dawki, przynajmniej 2 000 mg/kg masy ciała, w grupie składającej się z pięciu samców i pięciu samic stosując procedurę powyżej opisaną. Jeżeli zachodzi związek śmiertelności z badaną substancją, należy rozważyć wykonanie pełnego badania.

1.6.2.5. *Okres obserwacji*

Okres obserwacji powinien wynosić co najmniej 14 dni. Jednakże nie powinien on być sztywno ustalony. Powinien zależeć od reakcji toksycznych, szybkości ich pojawiania się oraz okresu powrotu do zdrowia po ich wystąpieniu; w związku z tym można go wydłużyć, jeżeli uzna się to za konieczne. Ważny jest czas, po jakim pojawiają się i znikają objawy toksyczności oraz czas zgonu, w szczególności gdy istnieje tendencja do opóźnionych zgonów.

1.6.3 **Procedura**

Przed podaniem substancji zwierzęta powinny pozostawać na czczo. W przypadku szczura nie należy go karmić przez noc. W przypadku zwierząt o szybszej przemianie metabolicznej krótszy okres utrzymywania na czczo jest właściwy; nie ogranicza się podawania wody. Następnego dnia, zwierzęta powinny być zważone i następnie podaje się im badaną substancję przez zgłębnik w dawce pojedynczej. Jeżeli podanie pojedynczej dawki nie jest możliwe, można ją podać w mniejszych częściach w okresie nieprzekraczającym 24 godzin. Po podaniu substancji można wstrzymać się z podawaniem karmy przez następne trzy do czterech godzin. W przypadku gdy dawka jest podawana w częściach w ciągu pewnego okresu czasu może być niezbędne zapewnienie zwierzętom karmy i wody, zależnie od długości tego okresu.

Po podaniu substancji przeprowadza się systematyczną obserwację i zapisuje jej wyniki. Należy wykonywać oddzielne zapisy dla każdego zwierzęcia. Obserwacja powinna być częsta w ciągu pierwszego dnia.

Staranne badanie kliniczne należy przeprowadzać co najmniej raz każdego dnia roboczego. Inne obserwacje należy przeprowadzać codziennie, podejmując odpowiednie działania mające na celu zmniejszenie do minimum utraty zwierząt podczas badania, np. sekcję zwłok lub zamrażanie tych zwierząt, które zostaną znalezione martwe, oraz izolację lub usypianie zwierząt słabych lub śmiertelnie chorych. Obserwacje powinny obejmować zmiany w skórze i sierści, oczach i śluzówce, jak również układach: oddechowym, krążenia, autonomicznym i centralnym nerwowym oraz wzorców aktywności somatomotorycznej i wzorca zachowania. Szczególną uwagę należy zwrócić na obserwację drżeń, drgawek, zwiększonego wydzielania śliny, biegunki, stanów zwiększonej senności, snu i śpiączki. Należy jak najprecyzyjniej odnotować termin zgonu.

Zwierzęta, które padły w trakcie badania, i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok. Należy odnotować wszelkie makroskopowe zmiany patologiczne. O ile jest to wskazane, należy pobrać wycinki tkanek do badania histopatologicznego.

Ocena toksyczności dla innej płci

Po zakończeniu badań dla jednej płci, przeprowadza się dawkowanie na przynajmniej jednej grupie pięciu zwierząt płci przeciwnej, w celu ustalenia czy zwierzęta tej płci nie są znacząco bardziej wrażliwe na substancję badaną. Użycie mniejszej ilości zwierząt musi być uzasadnione w indywidualnych okolicznościach. Jeżeli dostępna jest stosowna informacja pokazująca że zwierzęta badanej płci są znacznie bardziej wrażliwe, drugą płć można pominąć.

2. DANE

Dane należy przedstawić w skrócie w formie tabelarycznej, z podaniem - dla każdej badanej grupy - liczby zwierząt na początku badania, terminów zgonu poszczególnych zwierząt, liczby zwierząt wykazujących inne objawy toksyczności, opisu efektów toksycznych i wyniku sekcji zwłok. Należy określić masę ciała poszczególnych zwierząt i zapisać ją tuż przed podaniem badanej substancji, a później co tydzień i w momencie zgonu. Należy obliczać zmiany masy ciała i zapisywać je, gdy zwierzę przeżyje więcej niż jedną dobę. Zwierzęta humanitarnie zabite z powodu bólu i zagrożenia związanego z daną substancją są zapisywane jako uśmiercone w związku z substancją. Można ustalić LD_{50} przy użyciu uznanej metody. Ocena danych powinna objąć istnienie ewentualnej współzależności między ekspozycją zwierząt na substancję badaną a częstością i ciężkością wszelkich zaburzeń, włącznie z zaburzeniami zachowania i klinicznymi, zmianami makroskopowymi, zmianami masy ciała, śmiertelnością i wszelkimi innymi efektami toksycznymi.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, dieta itp.,
- warunki badania,
- wielkości dawek (wraz z podłożem, o ile jest stosowane, i stężeniami),
- płć zwierząt poddanych dawkowaniu,
- tabelaryczne przedstawienie danych reakcji toksycznej w rozbiciu na płcie i wielkość dawki (to jest liczba padłych zwierząt lub zabitych w czasie trwania badania, liczba zwierząt wykazujących oznaki działania toksycznego, liczba zwierząt poddanych ekspozycji),
- czas zgonu po dawkowaniu, przyczyny i kryteria przyjęte przy humanitarnym zabijaniu zwierząt,
- wszystkie obserwacje,
- Wartość LD_{50} dla płci poddanej pełnym badaniom ustalonym na 14 dni (wraz z określoną metodą oznaczania),
- 95% przedział ufności dla LD_{50} (o ile można go przedstawić),
- krzywa dawka/śmiertelność i jej nachylenie (o ile metoda oznaczania pozwala na ustalenie tych danych),
- wyniki sekcji zwłok,
- wszelkie wyniki badań histopatologicznych,
- wyniki wszystkich badań płci przeciwnej,
- omówienie wyników (należy zwrócić szczególną uwagę, że humanitarne zabicie zwierząt w czasie trwania badania wpływa na obliczoną wartość LD_{50}),
- interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. LITERATURA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.1 bis TOKSYCZNOŚĆ OSTRA (DOUSTNA) – METODA USTALONEJ DAWKI**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJE

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Badanie ostrej toksyczności doustnej dostarcza informacji na temat działań niepożądanych, które mogą wystąpić w trakcie krótkiego okresu czasu po spożyciu pojedynczej dawki badanej substancji.

Metoda ustalonej dawki jest przeprowadzana w dwóch etapach.

W wstępnym badaniu rozpoznawczym, przeprowadza się w sposób sekwencyjny badanie skutku różnych dawek podawanych doustnie przez zgłębnik pojedynczym zwierzętom jednej płci. Badanie rozpoznawcze dostarcza informacji na temat zależności dawka-toksyczność, włączając ocenę minimalnej dawki śmiertelnej. Zwykle na niniejszym etapie nie stosuje się więcej niż pięć zwierząt.

W badaniu głównym, substancja jest podawana doustnie przez zgłębnik grupie zwierząt (pięć samic i pięć samców) w jednej z wstępnie ustalonych wielkości dawek (5, 50, 500 lub 2 000 mg/kg). Zastosowana dawka pochodzi z badania rozpoznawczego i jest tą, która prawdopodobnie wytworzy „wyraźne działanie toksyczne” (patrz 1.2. definicje), ale nie spowoduje śmierci.

Po podaniu substancji prowadzone są obserwacje skutków.

Jeżeli wybrana początkowa wielkość dawki daje wyraźne działanie toksyczne, lecz nie daje śmiertelności związanej z substancją, dalsze badanie nie jest wymagane.

Gdy nie widać wyraźnego działania toksycznego przy wybranej wielkości dawki, należy substancję poddać ponownemu badaniu przy następnej większej wielkości dawki. Jeżeli zwierzęta padły, lub gdy poważna reakcja toksyczna wymagała humanitarnego zabicia zwierząt, substancję należy ponownie przebadać przy niższej wielkości dawki.

Niniejsza procedura pozwala na identyfikację „dawki różnicującej” (patrz 1.2. definicje), która jest najwyższą z wstępnie ustalonych wielkości dawek które mogą być podane bez spowodowania śmiertelności (włączając humanitarne uśmiercenia).

Zwierzęta wykazujące ciężkie i trwałe oznaki stanu zagrożenia i bólu mogą wymagać humanitarnego uśmiercenia. Dozowanie badanych substancji na drodze znanej z powodowania znaczącego bólu i stanów zagrożenia, z powodu właściwości żrących lub drażniących, nie może być przeprowadzane.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA**1.6.1. Przygotowania****1.6.1.1. Zwierzęta doświadczalne**

O ile nie ma przeciwwskazań, preferowanym gatunkiem jest szczur.

Należy wykorzystywać powszechnie stosowane szczepy laboratoryjne. Dla każdej płci, na początku badania, zakres różnic wagi stosowanych zwierząt nie powinien przekraczać $\pm 20\%$ właściwej wartości średniej.

Zwierzęta muszą być trzymane w doświadczalnych warunkach pobytu i karmienia przez co najmniej pięć dni przed przeprowadzeniem badania. Przed badaniem, zdrowe młode dorosłe zwierzęta są wybierane losowo i przydzielane do grup rozpoznawczych i głównych poddawanych ekspozycji. W praktyce, tylko jedna grupa każdej płci jest potrzebna do badania głównego.

1.6.1.2. Przygotowanie dawek i ich podawanie

W razie potrzeby badaną substancję rozpuszcza się lub sporządza jej zawiesinę w odpowiednim podłożu. Zaleca się, aby w miarę możliwości najpierw rozważyć wykorzystanie roztworu wodnego, następnie roztworu w oleju roślinnym, a następnie ewentualnych roztworów w innych podłożach, bądź też zawiesiny. W przypadku podłoży innych niż wodne musi być znana charakterystyka ich toksyczności istotna dla badania, bądź też taką charakterystykę należy określić przed badaniem lub w trakcie jego wykonywania. U szczurów w zwykłych warunkach objętość nie powinna przekraczać 10 ml/kg masy ciała, z wyjątkiem roztworów wodnych, w którym to przypadku można zastosować ilość 20 ml/kg. Zmienność badanej objętości można zmniejszyć do minimum przez takie dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość wszystkich wielkości dawek.

Przed podaniem substancji zwierzęta powinny pozostawać na czczo. W przypadku szczura, pokarm powinien być odstawiony poprzedniego wieczoru; wody nie ogranicza się. Następnego dnia, zwierzęta należy zważyć i podać substancję badaną przez zgłębnik, w dawce pojedynczej. Jeżeli podanie pojedynczej dawki nie jest możliwe, można ją podać w mniejszych częściach w okresie nieprzekraczającym 24 godzin. Po podaniu substancji można wstrzymać się z podawaniem karmy przez następne trzy do czterech godzin. W przypadku gdy dawka jest podawana w częściach w ciągu pewnego okresu czasu może być niezbędne zapewnienie zwierzętom karmy i wody, zależnie od długości tego okresu.

1.6.2. Procedura

1.6.2.1. Badanie rozpoznawcze

Działanie różnych dawek bada się na pojedynczych zwierzętach. W przypadku braku informacji wskazujących, że samice są bardziej wrażliwą płcią, zwykle stosowane są samice. Dawkowanie stosowane jest sekwencyjnie, dopuszczając odstęp co najmniej 24 godziny przed podaniem dawki następnemu zwierzęciu. Wszystkie zwierzęta są starannie obserwowane na oznaki działania toksycznego przez co najmniej siedem dni; jeżeli oznaki umiarkowanej toksyczności utrzymują się siódmego dnia, zwierzę należy obserwować przez dodatkowe siedem dni. Pod uwagę są brane następujące początkowe wielkości dawek: 5, 50, 500 i 2 000 mg/kg. Jeżeli wybrana początkowa dawka nie powoduje poważnych objawów toksyczności, a następna wyższa dawka powoduje śmiertelność, wtedy konieczne jest zbadanie stosownej jednej lub więcej dawek pośrednich. W niniejszy sposób jest możliwe zbudowanie informacji o wielkości dawki (-ek) powodującej (-ych) takie same oznaki działania toksycznego i minimalnej wielkości dawki, która powoduje śmiertelność.

Należy dołożyć starań do wybrania dawki początkowej stosując znane fakty z pokrewnych substancji chemicznych. Przy braku tego typu informacji, sugerowane jest użycie w pierwszym przypadku dawki 500 mg/kg. Jeżeli nie obserwowano oznak działania toksycznego po podaniu dawki początkowej, wtedy bada się następną wyższą wielkość dawki. Gdy nie pojawiła się śmiertelność przy dawce 2 000 mg/kg, badanie rozpoznawcze jest zakończone i należy przeprowadzić badanie główne przy niniejszej wielkości dawki. Jeżeli zaobserwowano poważne skutki, wymagające humanitarnego zabijania, po podaniu dawki początkowej (np. 500 mg/kg), innemu zwierzęciu podaje się następną niższą dawkę (np. 50 mg/kg). Jeżeli zwierzę to przeżyje, następnym zwierzętom należy podać odpowiednią dawkę pośrednią, z między ustalonych wielkości dawek. Zwykle nie oczekuje się użycia w niniejszej procedurze, więcej niż pięciu zwierząt.

1.6.2.2. Badanie główne

Co najmniej 10 zwierząt (pięć samic i pięć samców) należy użyć dla każdej badanej wielkości dawki. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży.

Jest zasadą metody ustalonej dawki że w badaniu głównym stosuje się tylko pośrednie dawki toksyczne. Należy unikać podawania śmiertelnych dawek badanej substancji.

Wielkość dawki używana w badaniu musi być wybrana jako jedna z czterech ustalonych wielkości dawek, mianowicie 5, 50, 500 lub 2 000 mg/kg masy ciała. Wybrana początkowa wielkość dawki powinna być taką by mogła powodować wyraźne działanie toksyczne, lecz nie śmiertelność związaną z substancją (włączając humanitarne uśmiercanie; przypadkowe zgony nie są dołączane, lecz powinny być zapisywane). Nie jest konieczne dalsze badanie jeżeli ta wielkość dawki powoduje wyraźne działanie toksyczne, lecz nie powoduje śmiertelności związanej z substancją.

Jeżeli podanie wybranej wielkości dawki nie powoduje wyraźnego działania toksycznego, substancję należy ponownie przebadać przy następnej wyższej wielkości dawki. Zwierzęta, jednakże, należy trzymać pod obserwacją do momentu zakończenia okresu obserwacji. Gdy poważna reakcja toksyczna wymaga humanitarnego uśmiercenia zwierząt lub występuje śmiertelność związana z substancją, należy substancję ponownie przebadać przy następnej niższej wielkości dawki. Ponownie, zwierzęta które nie wymagały humanitarnego uśmiercenia, należy utrzymywać pod obserwacją do momentu zakończenia pełnego okresu obserwacji.

Po podaniu dawek, systematycznie wykonywane są i zapisywane obserwacje. Należy prowadzić oddzielne zapisy dla każdego zwierzęcia.

Okres obserwacji powinien wynosić co najmniej 14 dni. Jednakże nie powinien on być sztywno ustalony. Powinien zależeć od reakcji toksycznych, szybkości ich pojawiania się oraz okresu powrotu do zdrowia po ich wystąpieniu; w związku z tym można go wydłużyć, jeżeli uzna się to za konieczne. Ważny jest czas, po jakim pojawiają się i znikają objawy toksyczności oraz czas zgonu, w szczególności gdy istnieje tendencja do opóźnionych zgonów.

Staranne badania kliniczne powinny być wykonywane przynajmniej dwa razy dziennie w dniu podania dawki i co najmniej raz każdego następnego dnia. Zwierzęta wykazujące oczywiste oznaki bólu i poważne objawy zagrożenia należy humanitarnie uśmiercić. Konieczne są dodatkowe obserwacje w czasie trwania pierwszych pięciu dni po podaniu dawki, jeżeli zwierzęta w dalszym ciągu okazują objawy działania toksycznego. Badanie może być zakończone, jeżeli staje się jasne, że początkowa wielkość wybranej dawki była za wysoka.

Obserwacje powinny obejmować zmiany w skórze i sierści, oczach i śluzówce, jak również układach: oddechowym, krążenia, autonomicznym i centralnym nerwowym oraz wzorców aktywności somatomotorycznej i wzorca zachowania. Szczególną uwagę należy zwrócić na obserwacje drżeń, drgawek, zwiększonego wydzielania śliny, biegunki, stanów zwiększonej senności, snu i śpiączki.

Wagę poszczególnych zwierząt należy ustalić na krótko przed podaniem badanej substancji, codziennie przez następne trzy dni a następnie tygodniowo. Zwierzęta padłe w trakcie badania i te które przeżyły do końca badania, są ważone i poddawane sekcji zwłok. Należy odnotować wszelkie makroskopowe zmiany patologiczne. O ile jest to wskazane, należy pobrać wycinki tkanek do badania histopatologicznego.

Badania drugiej, a w wyjątkowych okolicznościach, trzeciej wielkości dawki mogą być wymagane, w zależności od wyników wielkości dawki poprzedzającej.

W przypadku w którym substancja powoduje śmiertelność przy dawce 5 mg/kg masy ciała (lub tam gdzie badanie rozpoznawcze wskazują śmiertelność przy tej wielkości dawki) wymagają dalszego zbadania toksyczności ostrej substancji.

2. DANE

Dane z obu badań, rozpoznawczego i głównego powinny być zestawione w postaci tabelarycznej, pokazując dla każdej badanej wielkości dawki, liczbę zwierząt na początku badania; liczbę zwierząt wykazujących oznaki działania toksycznego; liczbę zwierząt padłych w czasie trwania badania lub zabitych z przyczyn humanitarnych; opis działania toksycznego i, dla badania głównego, czy obserwowano wyraźne działanie toksyczne związane z substancją; przebieg czasowy wszystkich działań toksycznych; ustalenia z sekcji zwłok. Należy obliczać zmiany masy ciała i zapisywać je, gdy zwierzę przeżyje więcej niż jedną dobę.

Zwierzęta które zostały humanitarnie zabite z powodów bólu i zagrożenia związanych z substancją są zapisywane jako zgony związane z substancją.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania powinno w miarę możliwości zawierać następujące informacje, zarówno dla badania rozpoznawczego jak i głównego:

— gatunek, szczerp, źródło, warunki środowiska, dieta itp.,

— warunki badania

- wielkości dawek (wraz z podłożem, o ile jest stosowane, i stężeniami),
- pełne wyniki dla wszystkich badanych wielkości dawek,
- tabelaryczne przedstawienie danych reakcji toksycznej w rozbiciu na płcie i wielkość dawki (to jest liczba użytych zwierząt; zmiany w wadze ciała; gdzie stosowne, ilość padłych zwierząt lub zabitych w czasie trwania badania, liczba zwierząt wykazujących oznaki działania toksycznego; rodzaj, stopień ciężkości i czas trwania działania)
- czas pojawienia się oznak działania toksycznego i czy były odwracalne
- o ile zwierzęta padły lub zostały zabite, czas zgonu po dawkowaniu, przyczyny i kryteria przyjęte przy humanitarnym zabijaniu zwierząt
- ustalenia z sekcji zwłok
- wszelkie wyniki histopatologiczne.
- omówienie wyników,
- interpretacja wyników, włączając oznaki wyraźnego działania toksycznego i wielkość dawki różniującej określonej w badaniu.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

DAWKA	WYNIKI	INTERPRETACJA
5 mg/kg masy ciała	Poniżej 100% przeżycia	Związki, które są BARDZO TOKSYCZNE
	100% przeżycia; lecz wyraźne działanie toksyczne	Związki, które są TOKSYCZNE.
	100% przeżycia; brak wyraźnego działania toksycznego	Patrz: wyniki przy 50 mg/kg.
50 mg/kg masy ciała	Poniżej 100% przeżycia	Związki, które mogą być TOKSYCZNE lub BARDZO TOKSYCZNE. Patrz: wyniki przy 5 mg/kg.
	100% przeżycia; lecz wyraźne działanie toksyczne	Związki, które są SZKODLIWE
	100% przeżycia; brak wyraźnego działania toksycznego	Patrz wyniki przy 500 mg/kg.
500 mg/kg masy ciała	Poniżej 100% przeżycia	Związki, które mogą być TOKSYCZNE lub SZKODLIWE. Patrz wyniki przy 50 mg/kg.
	100% przeżycia; lecz wyraźne działanie toksyczne	Związki, które nie posiadają znaczącej toksyczności ostrej.
	100% przeżycia; brak wyraźnego działania toksycznego	Patrz wyniki przy 2 000 mg/kg.
2 000 mg/kg masy ciała	Poniżej 100% przeżycia	Patrz wyniki przy 500 mg/kg.
	100% przeżycia; z lub bez wyraźnego działania toksyczne	Związki, które nie posiadają znaczącej toksyczności ostrej.

Patrz także: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. LITERATURA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.2. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA (INHALACYJNA)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Jest użyteczne posiadanie wstępnych informacji na temat rozkładu wielkości ziarna, prężności pary, temperatury topnienia, temperatury wrzenia, temperatury zapłonu w wybuchowości (o ile dotyczy) substancji.

Patrz także Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJE

Patrz Wprowadzenie ogólne część B (B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Kilka grup zwierząt doświadczalnych poddaje się ekspozycji przez określony okres czasu na substancję badaną w stopniowanych stężeniach, po jednym stężeniu na grupę. Następnie przeprowadza się obserwację skutków podania substancji i zgonów. Zwierzęta, które padną w trakcie badania, i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok.

Zwierzęta wykazujące ciężkie i trwałe oznaki stanu zagrożenia i bólu mogą wymagać humanitarnego uśmiercenia. Dozowanie badanych substancji w sposób znany z powodowania znaczącego bólu i stanu zagrożenia z powodu właściwości żrących lub poważnie drażniących nie może być przeprowadzane.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA**1.6.1. Przygotowania**

Zwierzęta muszą być trzymane w doświadczalnych warunkach pobytu i karmienia przez co najmniej pięć dni przed przeprowadzeniem badania. Przed przeprowadzeniem badania zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta są wybierane losowo i przydzielane do wymaganej liczby grup otrzymujących substancję. Nie muszą być poddawane symulowanej ekspozycji, chyba że jest to wskazane z powodu wykorzystania określonego przyrządu zapewniającego ekspozycję.

Badane substancje w postaci ciała stałego wymagają mikronizacji w celu uzyskania właściwego wymiaru cząstki.

W miarę potrzeby do badanej substancji można dodać odpowiednie podłoże, aby można było zapewnić właściwe stężenie tej substancji w powietrzu - w takim przypadku należy zastosować grupę kontrolną, która będzie otrzymywać samo podłoże. W razie wykorzystania podłoża lub innych substancji pomocniczych w celu ułatwienia dawkowania, musi być wiadomo, że nie wykazują one działania toksycznego. O ile będzie to właściwe, można wykorzystać dane historyczne.

1.6.2. Warunki badania**1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne**

O ile nie ma przeciwwskazań, preferowanym gatunkiem jest szczur. Należy wykorzystywać powszechnie stosowane szczepy laboratoryjne. Dla każdej płci, na początku badania, zakres zmian wagi używanych zwierząt nie może przekraczać $\pm 20\%$ właściwej wartości średniej.

1.6.2.2. Liczba i płeć

Wykorzystuje się po co najmniej 10 gryzoni (pięć samic i pięciu samców) w przypadku każdego poziomu dawkowania. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży.

Uwaga:

W badaniach ostrej toksyczności u zwierząt wyższego rzędu niż gryzonie, należy rozważyć użycie mniejszej ilości. Dawki muszą być starannie wybrane oraz należy dołożyć wszelkich starań by nie przekraczać dawek średniej toksyczności. Należy unikać podawania w takich badaniach dawek śmiertelnych substancji badanej.

1.6.2.3. Stężenia ekspozycyjne

Powinno się zapewnić odpowiednią liczbę wartości tych stężeń - co najmniej trzy - przy czym należy zachować odpowiednie odstępy między nimi, tak aby uzyskać grupy badane różniące się istotnie efektami toksycznymi i stopniem śmiertelności. Dane powinny wystarczyć do nakreślenia krzywej zależności między stężeniem a śmiertelnością oraz w miarę możliwości powinny zapewnić możliwe do przyjęcia obliczenie LC_{50} .

1.6.2.4. Badanie graniczne

Jeżeli ekspozycja zwierząt badanych (pięć samic i pięć samców) gazem o stężeniu 5 mg na litr, lub aerozolem cieczy lub substancją stałą (lub, gdy to drugie nie jest możliwe z powodów właściwości fizycznych lub chemicznych, włączając właściwości wybuchowe substancji badanej, maksymalne osiągalne stężenie) powoduje, po czterech godzinach ekspozycji, brak śmiertelności związanej z substancją w okresie 14 dni, dalsze badanie nie jest uważane za konieczne.

1.6.2.5. Czas ekspozycji

Okres czasu ekspozycji powinien być cztery godziny.

1.6.2.6. Wyposażenie

Zwierzęta należy poddać badaniu przy użyciu przyrządów do inhalacji zapewniających przepływ dynamiczny powietrza co najmniej 12 wymian na godzinę, aby zapewnić odpowiednią zawartość tlenu i równomierną dystrybucję powietrza ekspozycji. W przypadku wykorzystania komory należy ją tak zaprojektować, aby zmniejszyć do minimum stłoczenie zwierząt badanych i zwiększyć do maksimum ich ekspozycję drogą inhalacyjną na substancję badaną. Z reguły, aby zapewnić stabilność powietrza w komorze, całkowita „objętość” zwierząt badanych nie powinna przekraczać 5% objętości komory do badań. Można zastosować ekspozycję doustno-nosową, ekspozycję jedynie głowy lub ekspozycję całego ciała w pojedynczych komorach, przy czym te pierwsze dwa sposoby pomogą w zminimalizowaniu przechodzenia substancji badanej do organizmu innymi drogami.

1.6.2.7. Okres obserwacji

Okres obserwacji powinien wynosić co najmniej 14 dni. Jednakże nie powinien on być sztywno ustalony. Powinien zależeć od reakcji toksycznych, szybkości ich pojawiania się oraz okresu powrotu do zdrowia po ich wystąpieniu; w związku z tym można go wydłużyć, jeżeli uzna się to za konieczne. Ważny jest czas, po jakim pojawiają się i znikają objawy toksyczności oraz czas zgonu, w szczególności gdy istnieje tendencja do opóźnionych zgonów.

1.6.3. Procedura

Tuż przed ekspozycją zwierzęta waży się, a następnie podaje ekspozycji na stężenie badane w wyznaczonej aparaturze przez minimalny okres czterech godzin, po zapewnieniu równowagi stężenia substancji w komorze. Czas do uzyskania równowagi powinien być krótki. Temperatura przeprowadzania badania powinna być utrzymywana na poziomie 22 ± 3 °C. Idealnie wilgotność względną należy utrzymywać w przedziale między 30 i 70%, jednak w niektórych przypadkach (np. badania niektórych aerozoli) może to nie być możliwe ze względów praktycznych. Utrzymanie lekkiego podciśnienia wewnątrz komory (& ge; 5 mm słupa wody) zapobiega wyciekowi substancji badanej do otaczającego obszaru. W trakcie ekspozycji należy zaprzestać podawania zwierzętom karmy i wody. Należy użyć układów generacji i monitorowania powietrza stosowanego do badań. Układ powinien zapewnić jak najszybsze uzyskanie stabilnych warunków ekspozycji. Komora musi być zaprojektowana i działać w taki sposób, by utrzymywać jednorodny rozkład badanego powietrza w jej obrębie.

Należy prowadzić pomiary lub monitorować:

- szybkość przepływu powietrza (w sposób ciągły).
- rzeczywiste stężenie substancji badanej mierzone w obszarze wdychania co najmniej trzy razy w czasie trwania ekspozycji (niektóre atmosfery, na przykład aerozole o wysokich stężeniach mogą wymagać częstszej kontroli) W czasie trwania okresu ekspozycji, stężenie nie powinno zmieniać się więcej niż $\pm 15\%$ od wartości średniej. W przypadku niektórych aerozoli ten poziom kontroli może być niemożliwy do uzyskania, przy czym dopuszczalny jest wtedy szerszy zakres. Dla aerozoli należy przeprowadzić analizę wielkości cząsteczki (co najmniej raz na badaną grupę).
- temperaturę i wilgotność, o ile możliwe, w sposób ciągły.

W trakcie ekspozycji i po jej zakończeniu należy prowadzić systematyczne obserwacje, zapisując ich wyniki; należy prowadzić oddzielne zapisy dla każdego zwierzęcia. Obserwacja powinna być częsta w ciągu pierwszego dnia. Staranne badanie kliniczne należy przeprowadzać co najmniej raz każdego dnia roboczego, inne obserwacje należy przeprowadzać codziennie, podejmując odpowiednie działania mające na celu zmniejszenie do minimum straty zwierząt podczas badania, np. sekcję zwłok lub zamrażanie tych zwierząt, które zostaną znalezione martwe, oraz izolację lub usypianie zwierząt słabych lub śmiertelnie chorych.

Obserwacje powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych oraz zmiany układu oddechowego, krążenia, autonomicznego i ośrodkowego układu nerwowego, jak też wzorców aktywności somatomotorycznej i wzorca zachowania. Szczególną uwagę należy zwrócić na obserwacje drżeń, drgawek, zwiększonego wydzielania śliny, biegunki, stanów zwiększonej senności, snu i śpiączki. Należy jak najprecyzyjniej odnotować termin zgonu. Masy ciała poszczególnych zwierząt należy ustalać co tydzień po ekspozycji oraz w momencie zgonu.

Zwierzęta, które zdechną w trakcie badania i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok, ze szczególnym zwróceniem uwagi na wszelkie zmiany w obrębie górnych i dolnych dróg oddechowych. Należy odnotować wszelkie makroskopowe zmiany patologiczne. O ile jest to wskazane, należy pobrać wycinki tkanek do badania histopatologicznego.

2. DANE

Dane należy przedstawić w skrócie w formie tabelarycznej, z podaniem - dla każdej badanej grupy - liczby zwierząt na początku badania, terminów zgonu poszczególnych zwierząt, liczby zwierząt wykazujących inne objawy toksyczności, opisu efektów toksycznych i wyniku sekcji zwłok. Należy obliczać zmiany masy ciała i zapisywać je, gdy przeżycie przekroczy jedną dobę. Zwierzęta, które zostały humanitarnie uśmiercone z powodów związanych z substancją stanów zagrożenia i bólu, są zapisywane jako zgony związane z substancją. Należy ustalić LC_{50} przy użyciu uznanej metody. Ocena danych powinna objąć istnienie ewentualnej współzależności między ekspozycją zwierząt na substancję badaną i częstością i ciężkością wszelkich zaburzeń, włącznie z zaburzeniami zachowania i klinicznymi, zmianami makroskopowymi, zmianami masy ciała, umieralnością i wszelkimi innymi efektami toksycznymi.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, dieta itp.,
- warunki badania: opis przyrządu do ekspozycji

włączając konstrukcję, typ, wymiary, źródło powietrza, układ wytwarzania aerozoli, metody klimatyzacji powietrza i metoda przetrzymywania zwierząt w komorze badawczej, gdy jest używana. Należy opisać wyposażenie do pomiaru temperatury, wilgotności, stężenia aerozolu i rozkładu wielkości ziaren.

Dane ekspozycji

Powinny być przedstawione w formie tabeli, z podaniem wartości średniej i miary zmienności (np. odchylenia standardowego) i powinny, jeśli możliwe, zawierać:

- a) szybkości przepływu powietrza przez urządzenia do inhalacji;
- b) temperaturę i wilgotność powietrza;

- c) nominalne stężenia (całkowita ilość badanej substancji dostarczona do wyposażenia inhalacyjnego, podzielona przez objętość powietrza);
- d) rodzaj podłoża, o ile jest wykorzystane;
- e) rzeczywiste stężenie w badawczej strefie wdychania;
- f) średnica aerodynamiczna średniej masy (MMAD) i geometryczne standardowe odchylenie (GSD);
- g) czas równoważenia;
- h) okres ekspozycji;
- zestawienie tabelaryczne danych reakcji toksycznej z uwagi na płęć i poziom ekspozycji (to jest liczba zwierząt padłych lub uśmierconych w czasie trwania badania; liczba zwierząt wykazujących oznaki działania toksycznego; liczba zwierząt poddanych ekspozycji);
- czas śmierci w czasie trwania lub po ekspozycji, przyczyny i kryteria przyjęte przy humanitarnym zabijaniu zwierząt;
- wszystkie obserwacje;
- LC_{50} dla każdej płci, ustalona pod koniec okresu obserwacji (z podaniem metody obliczeń),
- 95% poziom ufności dla LC_{50} (gdzie może być to dostarczone);
- krzywa zależności umieralności od dawki i jej nachylenie (o ile metoda oznaczania pozwala na ustalenie tych danych),
- wyniki sekcji zwłok;
- wszystkie dane histopatologiczne;
- omówienie wyników (należy zwrócić szczególną uwagę, że humanitarne zabicie zwierząt w czasie trwania badania wpływa na obliczoną wartość LC_{50});
- interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. **LITERATURA**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.3. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA (DERMALNA)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Substancję badaną nakłada się na skórę w stopniowanych dawkach kilku grupom zwierząt doświadczalnych, po jednej dawce na grupę. Następnie obserwuje się skutki podania substancji i zgony. Zwierzęta, które zdechną w trakcie badania, i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok.

Zwierzęta wykazujące ciężkie i trwałe oznaki stanu zagrożenia i bólu mogą wymagać humanitarnego uśmiercenia. Dozowanie badanych substancji na drodze znanej z powodowania znaczącego bólu i stany zagrożenia z powodu właściwości żrących lub drażniących nie może być przeprowadzane.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA**1.6.1. Przygotowania**

Zwierzęta muszą być trzymane w doświadczalnych warunkach pobytu i karmienia przez co najmniej pięć dni przed przeprowadzeniem badania. Przed przeprowadzeniem badania zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta są wybierane losowo i przydzielane do poszczególnych grup otrzymujących substancję. Na około 24 godziny przed przeprowadzeniem badania należy usunąć sierść z grzbietowej powierzchni tułowia zwierząt przez przycięcie lub ogolenie. Podczas przycinania lub golenia sierści należy uważać, aby nie uszkodzić skóry, gdyż mogłoby to zmienić jej przepuszczalność. Nie mniej niż 10% powierzchni ciała powinno być wolne do zastosowania substancji badanej. W przypadku badania ciał stałych, które powinny zostać sproszkowane, o ile jest to właściwe, substancja badana powinna zostać wystarczająco zwilżona wodą lub w razie konieczności odpowiednim podłożem zapewniającym dobry kontakt ze skórą. W przypadku wykorzystania podłoża należy uwzględnić jego wpływ na penetrację substancji badanej przez skórę. Płynne substancje badane stosuje się na ogół w stanie nierozcieńczonym.

1.6.2. Warunki badania**1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne**

Można wykorzystać dorosłe szczury lub króliki. Można również wykorzystać inne gatunki, jednak wymaga to uzasadnienia. Należy wykorzystywać powszechnie stosowane szczepy laboratoryjne. Dla każdej płci, na początku badania zakres zmienności wagowej użytych zwierząt nie powinien przekraczać $\pm 20\%$ właściwej wartości średniej.

1.6.2.2. Liczba i płeć

Co najmniej pięć zwierząt jest używanych dla każdej wielkości dawki. Powinny być one wszystkie jednakowej płci. Jeżeli stosuje się samice, powinny być one nieródkami i nie mogą być w ciąży. Jeżeli dostępna jest informacja wskazująca, że dana płeć jest znacząco bardziej czuła, należy użyć do dawkowania zwierząt tej płci.

Uwaga: W badaniach ostrej toksyczności u zwierząt wyższego rzędu niż gryzonie, należy rozważyć użycie mniejszej ilości. Dawki muszą być starannie wybrane oraz należy dołożyć wszelkich starań by nie przekraczać dawek średniej toksyczności. Należy unikać podawania w takich badaniach dawek śmiertelnych substancji badanej.

1.6.2.3. Poziomy dawkowania

Powinno się zapewnić odpowiednią liczbę, co najmniej trzy, przy czym należy zachować odpowiednie odstępy między nimi, tak aby uzyskać grupy badane różniące się istotnie efektami toksycznymi i umieralnością. Przy podejmowaniu decyzji co do wielkości dawek należy uwzględnić wszelkie działania drażniące i żrące. Dane powinny być wystarczające do opracowania krzywej zależności odpowiedzi od dawki oraz, o ile to będzie możliwe, do ustalenia w możliwy do przyjęcia sposób wartości LD_{50} .

1.6.2.4. Badanie graniczne

Przeprowadza się badanie graniczne przy jednej wielkości dawki, przynajmniej 2 000 mg/kg masy ciała, w grupie składającej się z pięciu samców i pięciu samic stosując procedurę powyżej opisaną. Jeżeli zachodzi związek śmiertelności z badaną substancją, należy rozważyć wykonanie pełnego badania.

1.6.2.5. Okres obserwacji

Okres obserwacji powinien wynosić co najmniej 14 dni. Jednakże nie powinien on być sztywno ustalony. Powinien zależeć od reakcji toksycznych, szybkości ich pojawiania się oraz okresu powrotu do zdrowia po ich wystąpieniu; w związku z tym można go wydłużyć, jeżeli uzna się to za konieczne. Ważny jest czas, po jakim pojawiają się i znikają objawy toksyczności oraz czas zgonu, zwłaszcza gdy istnieje tendencja do opóźnionych zgonów.

1.6.3. Procedura

Zwierzęta powinny być trzymane w oddzielnych klatkach. Substancja badana powinna zostać nałożona w sposób równomierny na obszar równy około 10% całkowitej powierzchni ciała. W przypadku substancji wysoce toksycznych można je nanieść na mniejszą powierzchnię, jednak należy dążyć do tego, aby pokryć jak największy obszar jak najcieńszą i jak najbardziej równomierną warstwą badanego związku.

Substancje badane powinny być utrzymywane w kontakcie ze skórą dzięki zastosowaniu porowatego opatrunku z gazy i niedrażniącej taśmy w trakcie ekspozycji zapewnianej przez 24 godziny. Miejsce badania należy dodatkowo przykryć w taki sposób, aby utrzymać opatrunek z gazy i substancję badaną i zapewnić, aby zwierzęta nie mogły zjeść tej ostatniej. W celu zapobieżenia spożyciu substancji badanej można uwiązać zwierzę, jednak pełna immobilizacja nie jest zalecaną metodą.

Pod koniec okresu ekspozycji należy usunąć resztki badanej substancji, w miarę możliwości stosując wodę lub jakieś inne, właściwe metody oczyszczania skóry.

Obserwacje należy odnotowywać w sposób systematyczny, w miarę ich zbierania. Należy prowadzić oddzielne zapisy dla każdego zwierzęcia. Obserwacja powinna być częsta w ciągu pierwszego dnia. Staranne badanie kliniczne należy przeprowadzać co najmniej raz każdego dnia roboczego. Inne obserwacje należy przeprowadzać codziennie, podejmując odpowiednie działania mające na celu zmniejszenie do minimum utraty zwierząt podczas badania, np. sekcję zwłok lub zamrażanie tych zwierząt, które zostaną znalezione martwe, oraz izolację lub usypianie zwierząt słabych lub śmiertelnie chorych.

Obserwacje przy klatce zwierzęcia powinny obejmować zmiany sierści, traktowanej substancją skóry, oczu i błon śluzowych oraz zmiany układu oddechowego, krążenia, autonomicznego i ośrodkowego układu nerwowego, jak też wzorców aktywności somatomotorycznej i wzorca zachowania. Szczególną uwagę należy zwrócić na obserwacje drżeń, drgawek, zwiększonego wydzielania śliny, biegunki, stanów zwiększonej senności, snu i śpiączki. Należy jak najprecyzyjniej odnotować termin zgonu. Zwierzęta, które zdechną w trakcie badania, i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok. Należy odnotować wszelkie makroskopowe zmiany patologiczne. O ile jest to wskazane, należy pobrać wycinki tkanek do badania histopatologicznego.

Ocena toksyczności dla innej płci

Po zakończeniu badań jednej płci, przeprowadza się dawkowanie na przynajmniej jednej grupie pięciu zwierząt płci przeciwnej, w celu ustalenia czy zwierzęta tej płci nie są znacząco bardziej wrażliwe na substancję badaną. Użycie mniejszej ilości zwierząt musi być uzasadnione w indywidualnych okolicznościach. Jeżeli dostępna jest stosowna informacja pokazująca, że zwierzęta badanej płci są znacznie bardziej wrażliwe, drugą płć można pominąć.

2. DANE

Dane należy przedstawić w skrócie w formie tabelarycznej, z podaniem - dla każdej badanej grupy - liczby zwierząt na początku badania, terminów zgonu poszczególnych zwierząt, liczby zwierząt wykazujących inne objawy toksyczności, opisu efektów toksycznych i wyniku sekcji zwłok. Należy określić masę ciała poszczególnych zwierząt i zapisać ją tuż przed podaniem badanej substancji, a później co tydzień i w momencie zgonu. Należy obliczać zmiany masy ciała i zapisywać je, gdy zwierzę przeżyje więcej niż jedną dobę. Zwierzęta humanitarnie zabite z powodu bólu i zagrożenia związanego z daną substancją są zapisywane jako uśmiercone w związku z substancją. Można ustalić LD_{50} przy użyciu uznanej metody.

Ocena danych powinna objąć istnienie ewentualnej współzależności pomiędzy ekspozycją zwierząt na substancję badaną a częstością i ciężkością wszelkich zaburzeń, włącznie z zaburzeniami zachowania i klinicznymi, zmianami makroskopowymi, zmianami masy ciała, umieralnością i wszelkimi innymi efektami toksycznymi.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, dieta itp.;
- warunki badania (włączając metodę oczyszczania skóry i typ opatrunku: okluzyjny lub nieokluzyjny);
- wielkości dawek (wraz z podłożem, o ile jest wykorzystane, i stężeniami);
- płć zwierząt poddanych dawkowaniu;
- tabelaryczne przedstawienie danych reakcji toksycznej w rozbiciu na płcie i wielkość dawki (to jest liczba padłych zwierząt lub zabitych w czasie trwania badania, liczba zwierząt wykazujących oznaki działania toksycznego, liczba zwierząt poddanych ekspozycji),
- czas zgonu po dawkowaniu, przyczyny i kryteria przyjęte przy humanitarnym zabijaniu zwierząt;
- wszystkie obserwacje;
- wartość LD_{50} dla płci poddanej pełnym badaniom ustalonym na 14 dni (wraz z określoną metodą oznaczania);
- 95% przedział ufności dla LD_{50} (o ile można go przedstawić);
- krzywa zależności umieralności od dawki i jej nachylenie (o ile metoda oznaczania pozwala na ustalenie tych danych),
- wyniki sekcji zwłok;
- wszelkie wyniki badań histopatologicznych;
- wyniki wszystkich badań płci przeciwnej;
- omówienie wyników (należy zwrócić szczególną uwagę, że humanitarne zabicie zwierząt w czasie trwania badania wpływa na obliczoną wartość LD_{50});
- interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. LITERATURA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.4. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA (DRAŻNIĄCA SKÓRĘ)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA***Wstępne rozważania***

Staranne rozważania muszą być podane w stosunku do wszelkich dostępnych informacji na temat danej substancji w celu zminimalizowania badań substancji w warunkach prawdopodobnie powodujących poważne reakcje. Następujące informacje mogą być użyteczne, gdy rozważa się czy stosowne jest zakończenie badania, wykonanie badania na pojedynczych zwierzętach, czy też niewykonywanie następnych badań.

- (i) Właściwości fizyko - chemiczne i reaktywność chemiczna. Substancje silnie kwasowe lub alkaliczne (na przykład, wykazujące pH = 2 lub mniej lub 11,5 lub więcej) mogą nie wymagać zasadniczego badania drażnienia skóry, jeżeli można oczekiwać właściwości żrących. Należy również wziąć pod uwagę rezerwę alkaliczną i kwasową.
- (ii) Jeżeli dostępne są przekonywujące dowody poważnego działania w dobrze uzasadnionych naukowo badaniach *in vitro*, całkowite badanie nie musi być wymagane.
- (iii) Wyniki z badań ostrej toksyczności. Jeżeli przeprowadzono badanie ostrej toksyczności dermalnej z substancją w badaniu granicznym o wielkość dawki (2 000 mg/kg masy ciała), i nie obserwowano podrażnienia skóry, dalsze badanie drażnienia skóry jest niekonieczne. Dodatkowo, badanie materiałów, które wykazały wysoką toksyczność dermalną jest zbędne.

Badana substancja jest nakładana w pojedynczej dawce na skórę kilku zwierząt doświadczalnych, przy czym każde zwierzę pełni w stosunku do siebie rolę zwierzęcia kontrolnego. Sprawdza się i klasyfikuje w punktach stopień podrażnienia po upływie określonego okresu czasu i sporządza się dokładniejszy opis stwierdzonych zmian, aby zapewnić pełną ocenę skutków podania substancji. Czas trwania obserwacji powinien być na tyle długi, aby umożliwić pełną ocenę odwracalności zaobserwowanych efektów.

Zwierzęta wykazujące ciężkie i trwałe oznaki stanu zagrożenia i bólu mogą wymagać humanitarnego uśmiercenia.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA**1.6.1. Przygotowania**

Na około 24 godziny przed przeprowadzeniem badania należy usunąć sierść z grzbietowej powierzchni tułowia zwierząt przez przycięcie lub ogolenie.

Podczas przycinania lub golenia sierści należy uważać, aby nie uszkodzić skóry. Do badania można wykorzystać jedynie zwierzęta ze zdrową, nieuszkodzoną skórą.

Niektóre szczepy królików posiadają gęste wysepki sierści, które są bardziej wystające w pewnych porach roku. Substancje badane nie powinny być nakładane na te obszary porostu gęstej sierści.

Podczas badania ciał stałych (które w razie potrzeby można sproszkować) substancja badana powinna zostać wystarczająco zwilżona wodą lub w razie konieczności odpowiednim podłożem zapewniającym dobry kontakt ze skórą. W przypadku wykorzystania podłoża należy uwzględnić jego wpływ na penetrację skóry przez substancję badaną. Płynne substancje badane stosuje się na ogół w stanie nierozcieńczonym.

1.6.2. Warunki badania

1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne

Chociaż można wykorzystywać kilka gatunków ssaków, preferowanym gatunkiem jest królik albinos.

1.6.2.2. Liczba zwierząt

Jeśli z wyników badań klasyfikacyjnych *in vitro* lub innych rozważań, zachodzi podejrzenie, może powodować nekrozę (czyli jest żrąca), należy rozważyć badanie na pojedynczych zwierzętach. Jeżeli wyniki niniejszego badania nie wykazują działania żrącego, badanie należy ukończyć, używając dodatkowo przynajmniej dwóch zwierząt.

Dla zakończenia badania używa się co najmniej trzech zdrowych dorosłych zwierząt. Nie są wymagane oddzielne zwierzęta do niepoddawanej ekspozycji grupy kontrolnej. Mogą być potrzebne dodatkowe zwierzęta w celu wyjaśnienia niejednoznacznych odpowiedzi.

1.6.2.3. Wielkość dawki

O ile nie ma przeciwwskazań, 0,5 ml płynnej lub 0,5 g stałej lub półstałej substancji nakłada się na miejsce badania. Kontrolę podczas badania stanowią przylegające obszary skóry, niepoddanej działaniu substancji, u każdego zwierzęcia.

1.6.2.4. Okres obserwacji

Okres obserwacji nie powinien on być sztywno ustalony. Powinien być wystarczająco długi, aby w pełni ocenić odwracalność lub nieodwracalność obserwowanych działań, jednak na ogół nie powinien przekraczać 14 dni od zastosowania substancji.

1.6.3. Procedura

Zwierzęta powinny być trzymane w oddzielnych klatkach. Substancja badana powinna zostać nałożona na małą powierzchnię (około 6 cm²) skóry i przykryta płatkami gazy przytrzymywanej na miejscu przy pomocy niedrażniącej taśmy. W przypadku cieczy i niektórych past może być konieczne nałożenie substancji badanej na gazę, a następnie na skórę. Gaza powinna być utrzymywana w luźnym kontakcie ze skórą przy pomocy odpowiedniego, półokluzyjnego opatrunku przez cały czas ekspozycji. Należy uniemożliwić zwierzęciu dostęp do opatrunku i związane z tym spożycie lub inhalację substancji badanej.

Pod koniec okresu ekspozycji należy usunąć resztki badanej substancji, w miarę możliwości stosując wodę lub inny, właściwy rozpuszczalnik, tak aby nie zmienić istniejącego odczynu i nie uszkodzić naskórka.

Czas trwania ekspozycji zwykle wynosi cztery godziny.

Jeżeli podejrzewa się, że substancja może powodować nekrozę (czyli jest żrąca), czas trwania ekspozycji należy zmniejszyć (np. do jednej godziny lub trzech minut). Takie badanie może także wykorzystywać pojedyncze zwierzę w pierwszym przypadku, jeśli nie uniemożliwi tego ostra toksyczność dermalna badanego związku, można zastosować równocześnie trzy gazy dla tego zwierzęcia. Pierwsza gaza jest usuwana po trzech minutach. Jeżeli nie obserwuje się poważnej reakcji skórnej, drugą gazę usuwa się po godzinie. Jeśli obserwacje na tym etapie wskazują, że konieczna jest czterogodzinna ekspozycja i może być humanitarnie przeprowadzona, trzecia gaza jest usuwana po czterech godzinach i reakcje ocenia punktowo.

W niniejszym przypadku (to jest gdy była możliwa czterogodzinna ekspozycja), badanie należy ukończyć używając co najmniej dwóch dodatkowych zwierząt, chociaż nie wydaje się humanitarne tak robić (np. jeśli zaobserwowano nekrozę po czterogodzinnej ekspozycji).

Jeżeli obserwuje się poważną reakcję skórą (np. nekrozę), czy po trzech minutach, czy też po czterech godzinach, badanie niezwłocznie się przerywa.

W niektórych warunkach może być wskazane zastosowanie dłuższego czasu ekspozycji, np. w związku ze spodziewanym wzorcem stosowania substancji przez ludzi i ekspozycji na nią ludzi.

1.6.3.1. Obserwacje i ocena punktowa

Zwierzęta należy obserwować pod kątem pojawienia się rumienia i obrzęku. Reakcje należy oceniać w punktach po upływie 60 minut, a następnie po upływie 24, 48 i 72 godzin po zdjęciu opatrunku. Podrażnienie skóry jest oceniane punktowo i zapisywane zgodnie z systemem podanym w tabeli 1. Mogą być potrzebne dalsze uwagi, jeżeli nie ustali się pełna odwracalność w obrębie czasu 72 godzin. Poza obserwacją podrażnienia należy przedstawić pełny opis wszelkich ciężkich zmian, takich jak zmiany w wyniku działania żrącego (nieodwracalne zniszczenie tkanki skóry) i innych efektów toksycznych.

Techniki takie jak badania histopatologiczne lub pomiary grubości fałdy skórnej mogą być stosowane do wyjaśniania wątpliwych reakcji lub odpowiedzi zamaskowanych przez zabarwienie skóry substancją badaną.

2. DANE

Dane należy przedstawić w skrócie w formie tabelarycznej, z podaniem - dla każdego badanego zwierzęcia - oceny punktowej podrażnienia pod względem zaczerwienienia i obrzęku w całym okresie obserwacji. Należy odnotować wszelkie poważne zmiany, podać opis stopnia i charakteru podrażnienia, wskazać na odwracalność lub działanie żrące i opisać wszelkie inne zaobserwowane efekty toksyczne.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, dieta itp.;
- warunki badania (włączając odnośne właściwości fizyko - chemiczne substancji chemicznej, technikę przygotowania skóry, metodę oczyszczania skóry i typ opatrunku: okluzyjny lub półokluzyjny;
- tabelaryczne przedstawienie danych na temat podrażnienia wywołanego u każdego ze zwierząt w każdym momencie dokonywania obserwacji (np. po 1, 24, 48 i 72 godzinach itp. od zdjęcia opatrunku);
- opis wszelkich ciężkich zmian, które zaobserwowano, włącznie ze zmianami związanymi ze żrącym działaniem substancji;
- opis stopnia i charakteru zaobserwowanego podrażnienia oraz wszelkich wykrytych zmian histopatologicznych;
- opis wszelkich efektów toksycznych innych niż wpływ drażniący na skórę;
- omówienie wyników;
- interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. LITERATURA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

Dodatek

TABELA: OCENA PUNKTOWA REAKCJI SKÓRNEJ

Tworzenie rumienia i strupa

	Wartość
Bez rumienia	0
Bardzo nieznaczny rumień (ledwo dostrzegalny)	1
Wyraźnie określony rumień	2
Średni do ciężkiego rumień	3
Poważny rumień (zaczerwienienie koloru buraczanego) lub tworzenie strupa (uszkodzenie w głąb) przeszkadza w odczycie rumienia	4

Tworzenie obrzęku

Bez obrzęku	0
Bardzo nieznaczny obrzęk (ledwo dostrzegalny)	1
Nieznaczny obrzęk (brzeży obszaru dobrze zdefiniowane przez określony wzrost)	2
Średni obrzęk (brzeży podniesione około 1 mm)	3

B.5. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA (DRAŻNIĄCA OCZY)

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Wstępne rozważania

Wymagane jest podjęcie starannych rozważań nad wszystkimi dostępnymi informacjami na temat substancji w celu zminimalizowania badań substancji, w takich warunkach, które prawdopodobnie powodują poważne reakcje. Następujące informacje są użyteczne w tym względzie.

- i) Właściwości fizyko - chemiczne i reaktywność chemiczna. Substancje silnie kwasowe lub alkaliczne, na przykład, dla których oczekuje się skutku działania na oczy, przy pH = 2 lub mniejszym, oraz pH = 11,5 lub większym, nie muszą wymagać badania, jeżeli są oczekiwane poważne uszkodzenia. Należy wziąć również pod uwagę kwasową lub alkaliczną rezerwę.

- ii) Wyniki z dobrze uzasadnionych badań alternatywnych; substancje, które wykazały posiadanie potencjalnych właściwości żrących lub poważnie drażniących nie powinny być dalej badane na drażnienie oczu, gdyż można założyć, że te substancje spowodują poważne skutki dla oczu w badaniu stosującym tę metodę.
- iii) Wyniki z badań drażnienia skóry. Materiały, które wykazały określone zdolności działania żrącego lub poważnie drażniącego w badaniach podrażnienia skóry, nie powinny być badane dalej na zdolność podrażnienia oczu, gdyż założono, że takie substancje spowodują poważne skutki dla skóry.

Badana substancja jest wprowadzana w pojedynczej dawce do jednego oka u każdego z kilku zwierząt doświadczalnych; drugie oko pełni rolę kontroli. Sprawdza się i klasyfikuje w punktach stopień podrażnienia po upływie określonego okresu czasu i sporządza się dokładniejszy opis stwierdzonych zmian, aby zapewnić pełną ocenę skutków podania substancji. Czas trwania obserwacji powinien być na tyle długi, aby umożliwić pełną ocenę odwracalności zaobserwowanych efektów.

Zwierzęta wykazujące ciężkie i trwałe oznaki stanu zagrożenia i bólu mogą wymagać humanitarnego uśmiercenia.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. Przygotowania

W ciągu 24 godzin przed rozpoczęciem badania należy przeprowadzić badanie obojga oczu każdego zwierzęcia doświadczalnego. Nie należy wykorzystywać zwierząt z objawami podrażnienia oczu, uszkodzeniami gałki ocznej lub istniejącym uszkodzeniem rogówki.

1.6.2. Warunki badania

1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne

Chociaż wykorzystywano różne gatunki zwierząt doświadczalnych, zaleca się wykonywanie badań na zdrowych, dorosłych królikach albinosach.

1.6.2.2. Liczba zwierząt

Jeżeli przewiduje się znaczące skutki, należy rozważyć badanie pojedynczego zwierzęcia. Jeżeli wyniki niniejszego badania przeprowadzonego na jednym króliku, sugerują że substancja powoduje poważne podrażnienie (działanie odwracalne) lub żrące (działanie nieodwracalne) dla oczu przy użyciu opisanej procedury, dalsze badanie na podrażnienia oczne u kolejnych zwierząt, mogą nie wymagać przeprowadzenia. Czasem, dalsze badania na dodatkowych zwierzętach mogą być potrzebne w celu wyjaśnienia specyficznych aspektów.

W innych przypadkach niż ten z badaniem pojedynczego zwierzęcia, należy użyć co najmniej 3 zwierzęta. Dodatkowe zwierzęta mogą być wymagane do wyjaśnienia niejednoznacznych reakcji.

1.6.2.3. Wielkość dawki

Przy badaniu cieczy stosuje się dawkę 0,1 ml. W badaniach ciał stałych, past i szczególnych substancji, używana ilość powinna mieć objętość 0,1 ml, lub wagę około 0,1 g (należy zawsze zapisać wagę). W przypadku gdy badana substancja jest ciałem stałym lub granuletem, należy go zemleć na drobnoziarnisty pył. Należy zmierzyć objętość cząstek po ich łagodnym ubiciu, np. przez przyklepanie pojemnika miarowego.

Dla substancji zawartych w opryskiwaczach lub aerozoli w pojemnikach ciśnieniowych, należy odpędzić ciecz, zebrać 0,1 ml i wkropić do oczu w sposób opisany dla cieczy.

1.6.2.4. Okres obserwacji

Okres obserwacji nie powinien on być sztywno ustalony. Powinien być wystarczająco długi, aby w pełni ocenić odwracalność lub nieodwracalność obserwowanych działań, jednak na ogół nie powinien przekraczać 21 dni od wprowadzenia substancji

1.6.3. Procedura

Zwierzęta powinny być trzymane w oddzielnych klatkach. Substancja badana powinna zostać wprowadzona do worka spojówkowego jednego oka każdego zwierzęcia po łagodnym odchyleniu dolnej powieki od gałki ocznej. Następnie powieki łagodnie przytrzymuje się zamknięte przez mniej więcej jedną sekundę, aby zapobiec utracie materiału. Drugie oko, którego nie poddaje się działaniu substancji, pełni rolę kontroli.

Jeżeli uważa się, że substancja może powodować nadmierny ból można zastosować znieczulenie miejscowe przed podaniem badanej substancji. Typ, stężenie, czas podawania miejscowego znieczulenia muszą być starannie wybrane dla zapewnienia, że nie spowodują one znaczących różnic w reakcji na substancję badaną. Oko kontrolne musi być znieczulone w podobny sposób.

Oczy badanych zwierząt nie powinny być przemywane przez 24 godziny od wkroplenia substancji badanej. Po 24 godzinach można użyć produktu do przemywania oczu, o ile zostanie to uznane za właściwe.

Dla kilku substancji, które okazały się drażniące w niniejszym badaniu, zaleca się dodatkowe badania na królikach, których oczy przemyto wkrótce po wkropleniu substancji. W tych przypadkach zaleca się do tego celu wykorzystanie trzech królików. Pół minuty po wkropleniu, oczy królików są przemywane przez pół minuty, stosując taką objętość i szybkość przepływu, które nie powodują zranienia oczu.

1.6.3.1. Obserwacja i ocena punktowa

Oczy powinny być badane po 1, 24, 48 i 72 godzinach. Jeżeli nie ma dowodów uszkodzeń ocznych po 72 godzinie, badanie można zakończyć.

Przedłużona obserwacja może być konieczna w razie utrzymujących się zmian rogówki lub podrażnienia oczu, w celu ustalenia postępu zmian i ich odwracalności lub nieodwracalności. Poza obserwacją rogówki, tęczęwki i spojówki, należy odnotować i przedstawić wszelkie inne zauważone zmiany. Należy zapisać punktowe oceny reakcji ze strony oczu (tabela) po każdym badaniu. (Klasyfikacja reakcji oczu jest różnie interpretowana. Jako narzędzie wspomagające laboratoria badawcze oraz osoby biorące udział w prowadzeniu i interpretacji obserwacji można wykorzystać ilustrowany poradnik na temat działania drażniącego na oczy.)

Badanie reakcji można ułatwić przez zastosowanie dwuokularowej lupy, ręcznej lampy szczelinowej, biomikroskopu lub innych, odpowiednich urządzeń. Po zanotowaniu wyników obserwacji po 24 godzinach można przeprowadzić dalsze badania oczu wszystkich królików przy użyciu fluoresceiny.

2. DANE

Dane należy przedstawić w skrócie w formie tabelarycznej, z podaniem - dla każdego badanego zwierzęcia - oceny punktowej podrażnienia w całym okresie obserwacji. Należy przedstawić opis stopnia i charakteru podrażnienia oraz odnotować obecność poważnych zmian i wszelkich zaobserwowanych efektów innych niż oczne, które zaobserwowano.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- dane zwierzęcia (gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, dieta itp.);
- warunki badania (włącznie z istotnymi właściwościami fizyko - chemicznymi substancji badanej);
- tabelaryczne przedstawienie danych na temat podrażnienia wywołanego u każdego ze zwierząt w każdym momencie dokonywania obserwacji (np. po 1, 24, 48 i 72 godzinach);
- opis wszelkich stwierdzonych poważnych uszkodzeń;
- narracyjny opis stopnia i istoty obserwowanego podrażnienia lub działania żrącego, włączając obszar obejmujący rogówkę, oraz odwracalność;

- opis metody zastosowanej do oceny punktowej podrażnienia po 1, 24, 48 i 72 godzinach (np. ręczna lampa szczelinowa, biomikroskop, fluoresceina);
- opis wszelkich działań miejscowych innych niż działania na oczy;
- omówienie wyników;
- interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. LITERATURA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

Dodatek

OCENA PUNKTOWA USZKODZEŃ OCZNYCH

Rogówka

Zmętnienie: stopień gęstości (w ocenie bierze się pod uwagę najgęstszy obszar)

Brak owrzodzenia lub zmętnienia	0
Rozsiane lub rozlane obszary zmętnienia (inne niż niewielkie zmatowienie prawidłowego połysku), szczegóły rysunku tęczówki są wyraźnie widoczne	1
Łatwo odróżnialna część przezroczysta, szczegóły rysunku rogówki są nieco zasłonięte	2
Obszar perłowy, nie są widoczne szczegóły rysunku rogówki, wielkość źrenicy jest ledwo widoczna ..	3
Mętna rogówka, nie widać tęczówki z powodu zmętnienia	4

Tęczówka

Normalne	0
Znacznie pogłębione fałdy, przekrwienie, obrzęk, umiarkowane przekrwienie wokół rogówki lub nastrzyknięcie, dowolne z tych objawów lub połączenie kilku z nich, tęczówka ciągle reaguje na światło (choć ewentualna reakcja może być zwolniona)	1
Brak reakcji na światło, krwawienie, makroskopowe uszkodzenia (dowolne z tych objawów lub wszystkie te objawy)	2

Spojówki

Przekrwienie (odnosi się do większości poważnych reakcji powiekowych i opuszki spojówki w porównaniu z okiem kontrolnym)

Naczynia krwionośne normalne	0
Niektóre naczynia krwionośne zdecydowanie przekrwione (nastrzyknięcie)	1
Rozsiane, kolor karmazynowy, pojedyncze naczynia niełatwo rozróżnialne	2
Rozsiane, kolor czerwieni wołowiny	3
<i>Obrzęk spojówki: powieki i/lub błona mrużna</i>	
Brak obrzęku	0
Każdy obrzęk ponad normalny (włączając błonę mrużną)	1
Oczywisty obrzęk z częściowym wycięciem powiek	2
Obrzęk z powiekami półprzymkniętymi	3

B.6. DZIAŁANIE UCZULAJĄCE NA SKÓRĘ**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Uwagi:

Czułość i zdolność badań do wykrywania potencjalnych czynników uczulających ludzką skórę uważa się za ważne w systemie klasyfikacji toksyczności odnoszącej się do zdrowia publicznego.

Nie istnieje pojedyncza metoda badawcza, która byłaby w stanie należycie zidentyfikować wszystkie substancje o potencjalnym działaniu uczulającym wobec ludzkiej skóry, istotna dla wszystkich substancji.

Czynniki, takie jak fizyczne charakterystyki substancji, w tym jej zdolność do wnikania w skórę, muszą być wzięte pod uwagę przy wyborze badania.

Badania z wykorzystaniem świnek morskich można podzielić na badania adiuwantowe, w których stan uczulenia nasila się przez rozpuszczenie lub zawieszenie badanej substancji w kompletnym adiuwancie Freund (FCA), oraz badania nieadiuwantowe.

Badania ze środkiem wspomagającym mogą być bardziej precyzyjne w przewidywaniu prawdopodobnego działania substancji prowadzącego do działań uczulających na skórę u ludzi niż metody niestosujące kompletnego środka wspomagającego Freund i są zatem metodami preferowanymi.

Badanie maksymalizacji na świnkach morskich (GPMT) jest szeroko stosowanym badaniem adiuwantowym. Pomimo iż kilka innych metod może być wykorzystanych w celu wykrycia potencjału substancji do wywołania reakcji uczulającej na skórę, GPMT uważa się za preferowaną technikę wspomagającą.

W przypadku wielu kategorii związków chemicznych, testy niewspomagane (preferowane jest badanie Buehlera) uważa się za mniej czułe.

W niektórych przypadkach mogą istnieć słuszne powody wyboru badania Buehlera, wymagającego aplikowania miejscowego zamiast iniekcji śródskórnej, wykorzystywanej w teście maksymalizacyjnym świnki morskiej. W przypadku stosowania badania Buehlera powinno być podane naukowe uzasadnienie.

Badanie maksymalizacyjne świnki morskiej (GPMT) i badanie Buehlera są opisane w niniejszej metodzie. Inne metody mogą być stosowane pod warunkiem, że są potwierdzone i podane jest naukowe uzasadnienie.

Niezależnie od zastosowanej metody, należy sprawdzić wrażliwość wykorzystanego szczepu świnek morskich na działanie uczulające na skórę w regularnych odstępach czasu (co sześć miesięcy) przy użyciu znanych związków o silnych i umiarkowanie silnych właściwościach uczulających.

Patrz także Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Zalecane są następujące substancje, rozcieńczone jeżeli to konieczne, jak również wszystkie inne znane substancje uczulające, albo z literatury albo należące do grupy substancji przebadanych.

- p-fenylenodiamina	CAS Nr 106-50-3
- 2,4-dinitrochlorobenzen	CAS Nr 97-00-7
- dichromian potasu	CAS Nr 7778-50-9
- siarczan neomycyny	CAS Nr 1405-10-3
- siarczan niklu	CAS Nr 7786-81-4

1.4. ZASADA METOD BADAŃ

Po początkowej ekspozycji na substancję badaną (okresie „indukcji”) zwierzęta poddaje się - po dwóch tygodniach od ostatniej ekspozycji indukcyjnej – ekspozycji „prowokacyjnej” na substancję badaną w celu ustalenia, czy został wywołany stan nadwrażliwości. Istnienie stanu uczulenia potwierdza się przez zbadanie reakcji skóry na ekspozycję prowokacyjną.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADAŃ

1.6.1. **Badanie maksymalizacyjne świnek morskich (GPMT)**1.6.1.1. *Przygotowania*

Zdrowe, młode świnki morskie albinos są losowo wybierane i przydzielane do grup poddawanych dawkowaniu oraz do grup kontrolnych. Przed rozpoczęciem dawkowania usuwa się włosy z rejonu łopatki przez przycięcie lub zgolenie. Należy uważać, aby nie uszkodzić skóry.

1.6.1.2. *Warunki badania*1.6.1.2.1. *Zwierzęta doświadczalne*

Powszechnie używane szczepy laboratoryjne świnek morskich albinos są stosowane, ważące poniżej 500 g.

1.6.1.2.2. *Liczba i płeć*

Samce i/lub samice zwierząt mogą być wykorzystane. Jeżeli stosuje się samice, powinny być one nieródkami i nie mogą być w ciąży. Stosuje się minimalnie 10 zwierząt w grupie traktowanej i co najmniej 5 w grupie kontrolnej. Wykorzystanie mniejszej liczby zwierząt wymaga uzasadnienia. W przypadku niejednoznacznych wyników, badania histopatologiczne pomagają w decyzji czy należy powtórzyć badanie, stosując inny zestaw zwierząt.

Gdy nie jest możliwe ostateczne skonkludowanie, czy substancja badana jest lub nieuczulająca, zaleca się badanie dodatkowych zwierząt w ilości całkowitej co najmniej 20 badanych i 10 kontrolnych.

1.6.1.2.3. *Wielkości dawek*

Stężenie substancji badanej jest regulowane do poziomu tworzącego objawy podrażnienia skóry, ale takiego, który jest dobrze znoszony przez zwierzęta na każdym etapie indukcji.

Stężenie prowokacji musi być maksymalne niepowodujące objawów podrażnienia skóry u zwierząt niepoddanych uczulanii.

Stężenia te można ustalić w badaniu pilotażowym przeprowadzonym na małą skalę (na grupie dwójga-trojga zwierząt).

1.6.1.2.4. *Okres obserwacji*

W czasie trwania okresu czasu indukcji, obserwacje są przeprowadzane celem sprawdzenia możliwych działań drażniących. Po ekspozycji prowokacyjnej, reakcje skórne są notowane po 24 i 48 godzinach po zdjęciu opatrunku.

1.6.1.3. *Procedura*

Zwierzęta waży się przed rozpoczęciem badania i pod koniec jego realizacji. Okolicę łopatki oczyszcza się z sierści. Procedura przebiega w dwóch etapach:

1.6.1.3.1. Indukcja

Dzień 0 – grupa otrzymująca substancję badaną

Następujące pary wstrzyknień śródskórnych, każde 0,1 ml, są wykonywane w obszar grzbietowy, tak by jedno z każdej pary było po każdej stronie linii środkowej ciała:

Zastrzyk 1:	0,1 ml kompletnego adiuwantu Freund'a (FCA) zmieszanego z wodą lub roztworem fizjologicznym 1:1,
Zastrzyk 2:	0,1 ml badanej substancji, gdy konieczne w odpowiednim podłożu,
Zastrzyk 3:	0,1 ml substancji badanej w FCA.

W zastrzyku 3, substancje rozpuszczalne w wodzie są rozpuszczone w 0,05 ml wody i 0,05 ml nierozcieńczonego FCA. Jeżeli bada się substancje rozpuszczalne w tłuszczach lub substancje nierozpuszczalne, miesza się je z nierozcieńczonym FCA.

W zastrzyku 3, końcowe stężenie substancji badanej musi być równe temu z zastrzyku 2.

Zastrzyki 1 i 2 podaje się blisko siebie i jak najbliżej głowy, podczas gdy 3 zastrzyk podaje się w kierunku części ogonowej poddawanej badaniu okolicy.

Dzień 0 – grupa kontrolna

Następujące pary zastrzyków śródskórnych podaje się w tych samych miejscach, jak powyżej:

Zastrzyk 1:	0,1 ml adiuwantu (FCA) zmieszanego z wodą lub roztworem soli fizjologicznej 1:1,
Zastrzyk 2:	0,1 ml samego podłoża,
Zastrzyk 3:	0,1 ml podłoża w FCA.

Dzień 6 – Grupy kontrolne i traktowane

Jeżeli substancja nie jest środkiem drażniącym skórę, obszar badania, po wycięciu lub ogoleniu sierści jest malowany 0,5 ml 10% laurylosiarczanu sodu w wazelinie celem, celem utworzenia lokalnego podrażnienia.

Dzień 7 - grupa traktowana

Obszar badania jest ponownie oczyszczany z sierści. Substancja badana w odpowiednim podłożu (wybór podłoża należy uzasadnić; ciała stałe są drobno proszkowane i włączane w odpowiednie podłoże; ciecz, jeśli są odpowiednie można stosować bezpośrednio) jest наносzona na bibułę filtracyjną (2 x 4 cm) i nakładana na badany obszar i utrzymywana w kontakcie opatrunkiem okluzyjnym przez 48 godzin.

Dzień 7 – grupa kontrolna

Okolica skóry poddawana badaniu jest ponownie oczyszczana z sierści. Nakładane jest tylko podłoże, w podobny sposób na powierzchnię badaną i utrzymywany w kontakcie za pomocą szczelnego opatrunku przez 48 godzin.

1.6.1.3.2. Badanie prowokacyjne

Dzień 21

Boki zwierząt otrzymujących substancję badaną i zwierząt w grupie kontrolnej oczyszcza się z sierści. Plaster lub komora zawierające substancję badaną nakłada się na jeden bok traktowanego zwierzęcia, natomiast plaster lub komorę tylko z podłożem na drugi bok.

Plastry są utrzymywane w kontakcie za pomocą szczelnego opatrunku przez 24 godziny.

Grupa kontrolna jest poddawana ekspozycji w identyczny sposób.

Dzień 23 i 24

- 21 godzin po zdjęciu plastra, obszar prowokowany jest oczyszczany i odsłaniany, o ile konieczne z sierści,
- po trzech godzinach (po 48 godzinach od rozpoczęcia badania prowokacyjnego) przeprowadza się obserwację reakcji skórnej i odnotowuje jej wyniki,
- po 24 godzinach od tej obserwacji przeprowadza się drugą obserwację (po 72 godzinach) i notuje jej wyniki.

Aby wyjaśnić wyniki uzyskane podczas pierwszego badania prowokacyjnego, należy rozważyć przeprowadzenie drugiego badania prowokacyjnego, w razie potrzeby z nową grupą kontrolną otrzymującą podłoże, po upływie około jednego tygodnia od pierwszego badania.

1.6.1.3.3. Obserwacja i ocena punktowa

Należy zapisać i zgłosić wszelkie reakcje skórne i wszelkie odbiegające od normy zmiany i objawy będące konsekwencją procedury indukcyjnej i prowokacyjnej.

Techniki takie jak badania histopatologiczne lub pomiar grubości fałdy skórnej stosuje się do wyjaśnienia wątpliwych reakcji lub objawów maskowanych przez zabarwienie skóry substancją badaną.

1.6.2. Badanie Buehlera

1.6.2.1. Przygotowania

Zdrowe, młode świnki morskie albinos są wybierane losowo i przydzielane do grup poddawanych dawkowaniu oraz do grup kontrolnych. Przed rozpoczęciem dawkowania usuwa się włosy z rejonu łopatki przez przycięcie lub zgolenie. Należy uważać, aby nie uszkodzić skóry.

1.6.2.2. Warunki badania

1.6.2.2.1. Zwierzęta doświadczalne

Powszechnie używane szczepy laboratoryjne świnek morskich albinos, ważących mniej niż 500 g.

1.6.2.2.2. Liczba i płeć

Samce i/lub samice zwierząt mogą być wykorzystane. Jeżeli stosuje się samice, powinny być one nieródkami i nie mogą być w ciąży. Stosuje się co najmniej 20 zwierząt w grupie traktowanej i co najmniej 10 w grupie kontrolnej. Wykorzystanie mniejszej liczby zwierząt wymaga uzasadnienia. W przypadku niejednoznacznych wyników, badania histopatologiczne pomagają w decyzji czy należy powtórzyć badanie, stosując inny zestaw zwierząt.

1.6.2.2.3. Wielkości dawek

Dla każdego etapu indukcyjnego, stężenie substancji badanej jest regulowane do najwyższego poziomu, który jest systematycznie dobrze tolerowany i który dla substancji drażniących, powoduje słabe do średniego podrażnienia u większości badanych zwierząt. Stężenie prowokacji musi być maksymalne niepowodujące objawów podrażnienia skóry u zwierząt niepoddanych uczulaniu. Stężenia te można ustalić w badaniu pilotażowym przeprowadzonym na małą skalę (na grupie dwojga-trojga zwierząt).

1.6.2.2.4. Okres obserwacji

W czasie trwania okresu czasu indukcji, obserwacje są przeprowadzane celem sprawdzenia możliwych działań drażniących. Po ekspozycji prowokacyjnej, reakcje skórne są notowane po 24 i 48 godzinach po zdjęciu opatrunku, to jest 30 i 54 godziny od rozpoczęcia nakładania.

1.6.2.3. Procedura

Zwierzęta waży się przed rozpoczęciem badania i pod koniec jego realizacji

Procedura przebiega w dwóch etapach:

1.6.2.3.1. Indukcja

Dzień 0 – grupa otrzymująca substancję badaną

Jeden bok jest oczyszczany z sierści. 0,5 ml substancji badanej w odpowiednim podłożu (wybór podłoża należy uzasadnić; ciecze, jeśli są odpowiednie można stosować bezpośrednio) jest наносzona na bawełnianą podkładkę. Jest ona nakładana na badany obszar i utrzymywana w kontakcie ze skórą opatrunkiem okluzyjnym lub komorą i stosownym zawinięciem przez 6 godzin.

Dzień 0 – grupa kontrolna

Jeden bok jest oczyszczany z sierści. Nakłada się w podobny sposób tylko podłoże na badany obszar. Jest ono utrzymywane w kontakcie ze skórą opatrunkiem okluzyjnym lub komorą i stosownym zawinięciem przez 6 godzin.

Dzień 7 i 14

Przeprowadza się takie samo nakładanie jak w dniu 0 na ten sam obszar badany (jeśli konieczne oczyszczony z sierści) w dniu 7 oraz dniu 14.

1.6.2.3.2. Badanie prowokacyjne

Dzień 28

Drugi bok zwierząt traktowanych i kontrolnych jest oczyszczany z sierści. Nakłada się okluzyjny opatrunek lub komorę zawierający 0,5 ml substancji badanej, o maksymalnym niedrażniącym stężeniu na tył boku traktowanych zwierząt. Okluzyjny opatrunek lub komorę tylko z podłożem nakłada się także z przodu boku.

Plastry utrzymuje się w kontakcie ze skórą dzięki zastosowaniu odpowiedniego opatrunku przez 6 godziny.

Grupa kontrolna jest poddawana ekspozycji w identyczny sposób.

Dzień 29 i 30

- 21 godzin po zdjęciu opatrunku obszar prowokacji jest czyszczony i pozbawiany sierści o ile konieczne,
- po trzech godzinach (po 30 godzinach od rozpoczęcia badania prowokacyjnego) przeprowadza się obserwację reakcji skórnej i odnotowuje jej wyniki,
- po 24 godzinach od tej obserwacji przeprowadza się drugą obserwację (po 54 godzinach) i notuje jej wyniki.

1.6.2.3.3. Obserwacje i ocena punktowa

Należy zapisać i zgłosić wszelkie reakcje skórne i wszelkie odbiegające od normy zmiany i objawy będące konsekwencją procedury indukcyjnej i prowokacyjnej.

Techniki takie jak badania histopatologiczne lub pomiary grubości fałdy skórnej mogą być stosowane do wyjaśniania wątpliwych reakcji lub odpowiedzi zamaskowanych przez zabarwienie skóry substancją badaną.

2. **DANE (badanie GPMT i Buehlera)**

Dane należy przedstawić w skrócie w formie tabelarycznej, z opisem – w przypadku każdego zwierzęcia – reakcji skórnych zaobserwowanych podczas każdej obserwacji.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA (badanie GPMT i Buehlera)**3.1. **SPRAWOZDANIE Z BADANIA (badanie GPMT i Buehlera)**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- wykorzystana rasa świnki morskiej;
- warunki badania, podłoże i stężenie substancji badanych stosowanych dla badań indukcyjnych oraz prowokacyjnych;

- liczba, wiek i płeć zwierząt;
- masy ciała poszczególnych zwierząt na początku badania i po jego zakończeniu;
- opis wyników każdej z przeprowadzonych obserwacji u każdego ze zwierząt, włącznie z systemem oceny punktowej, o ile jest stosowany;
- omówienie wyników;
- interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA (badanie GPMT i Buehlera)

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. **LITERATURA**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.7. TOKSYCZNOŚĆ POWTARZANEJ (28 DNI) DAWKI (DOUSTNA)

1. **METODA**

1.1. WPROWADZENIE

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJE

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Substancję badaną podaje się doustnie, codziennie, w stopniowanych dawkach, kilku grupom zwierząt doświadczalnych, po jednej dawce na grupę przez okres 28 dni. W okresie podawania prowadzi się obserwację zwierząt w celu wykrycia wszelkich objawów toksyczności. Zwierzęta, które zdechną w trakcie badania, i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. **Przygotowania**

Zwierzęta muszą być trzymane w doświadczalnych warunkach pobytu i karmienia przez co najmniej pięć dni przed przeprowadzeniem badania. Przed przeprowadzeniem badania zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta są wybierane losowo i przydzielane do poszczególnych grup poddanych działaniu substancji. Substancje badane można podawać z dietą, przez zgłębnik, w kapsułkach lub w wodzie do picia. Wszystkie zwierzęta powinny otrzymywać dawkę tą samą metodą w czasie trwania całego okresu doświadczalnego. W razie wykorzystania podłoża lub innych substancji pomocniczych w celu ułatwienia dawkowania, musi być wiadomo, że nie wykazują one działania toksycznego. O ile będzie to właściwe, można wykorzystać dane historyczne.

1.6.2. Warunki badania**1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne**

O ile nie ma przeciwwskazań, preferowanym gatunkiem jest szczur. Należy wykorzystać powszechnie stosowane szczepy laboratoryjne młodych, zdrowych zwierząt. Najlepiej jest rozpocząć podawanie substancji, przed ukończeniem przez szczury sześciu tygodni życia, przy czym bezwzględnie nie mogą one mieć więcej niż osiem tygodni.

Na początku badania zmienność masy ciała zastosowanych zwierząt nie powinna przekraczać $\pm 20\%$ odpowiedniej wartości średniej.

1.6.2.2. Liczba i płeć

Należy wykorzystać po co najmniej 10 zwierząt (pięć samic i pięciu samców) w przypadku każdego poziomu dawkowania. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. Jeżeli planuje się uśmiercanie zwierząt w międzyczasie, ogólna ich liczba powinna być zwiększona o liczbę zwierząt zaplanowanych do uśmiercenia przed zakończeniem badania. Dodatkowo, grupa satelicka 10 zwierząt (pięć zwierząt każdej płci) może być poddana działaniu wysokiego poziomu dawki przez 28 dni i obserwowana, przez 14 dni po dawkowaniu, pod kątem odwracalności, trwałości, i opóźnionego wystąpienia objawów zatrucia. Jest także stosowana grupa satelicka 10 zwierząt kontrolnych (pięć zwierząt każdej płci).

1.6.2.3. Poziomy dawkowania

Należy zastosować co najmniej trzy wielkości dawek i kontrolę. Z wyjątkiem podawania substancji badanej, zwierzęta w grupie kontrolnej powinny być traktowane w taki sam sposób, jak zwierzęta w grupach badanych. W przypadku stosowania podłoża w celu ułatwienia dawkowania, u zwierząt kontrolnych należy stosować samo to podłoże w taki sam sposób, jak w grupach otrzymujących substancję badaną. Powinny one otrzymywać taką samą ilość podłoża jak stosowana w grupie otrzymującej najwyższą dawkę. Najwyższa dawka powinna być tak dobrana, aby wywierała działanie toksyczne, jednak nie prowadziła do zgonów lub prowadziła do jedynie niewielu zgonów. Najniższa dawka nie powinna dawać żadnych dowodów toksyczności. W przypadku gdy istnieje możliwa do wykorzystania, oszacowana wielkość ekspozycji u ludzi, najniższy poziom dawkowania powinien ją przewyższać. W idealnej sytuacji pośredni poziom dawkowania powinien prowadzić do uzyskania minimalnych dostrzegalnych efektów toksycznych. W przypadku gdy zostanie wykorzystana więcej niż jedna dawka pośrednia, wielkości dawek powinny być tak rozstawione, aby uzyskać stopniowanie działań toksycznych. W grupach otrzymujących niskie i pośrednie dawki oraz w grupach kontrolnych częstość występowania zgonów powinna być niska, aby umożliwić znaczącą ocenę wyników.

W przypadku gdy substancja badana jest podawana z dietą, można zastosować albo stałe stężenie w karmie (w ppm lub mg/kg karmy) albo stały poziom dawkowania w przeliczeniu na masę ciała zwierzęcia; jeżeli zastosuje się metodę alternatywną, należy o niej poinformować. W przypadku podawania substancji przez zgłębnik dawkowanie należy wykonywać o podobnej porze każdego dnia, przy czym wielkości dawek należy tak dostosowywać w odpowiednich odstępach czasu (co tydzień lub co dwa tygodnie), aby utrzymać stałą wielkość dawki w przeliczeniu na masę ciała zwierzęcia.

1.6.2.4. Badanie graniczne

W przypadku gdy w trwającym 28 dni badaniu prowadzonym w opisany powyżej sposób przy poziomie dawkowania 1 000 mg/kg masy ciała/dobę lub przy wyższym poziomie dawkowania mającym związek z możliwą ekspozycją u ludzi, o ile taki poziom jest znany, nie zostaną uzyskane żadne dowody na toksyczny wpływ substancji, można uznać, że dalsze badania nie są potrzebne. W przypadku substancji o niskiej toksyczności ważne jest zapewnienie, aby ilości i inne właściwości substancji badanej podawanej w diecie nie zaburzały prawidłowych potrzeb pokarmowych.

1.6.2.5. Okres obserwacji

Wszystkie zwierzęta należy obserwować codziennie, zapisując informacje na temat objawów toksyczności, włącznie z czasem ich pojawienia się, stopniem nasilenia i czasem trwania. Należy zapisać czas zgonu zwierzęcia i czas pojawienia się i ustąpienia objawów toksyczności.

1.6.3. Procedura

W idealnej sytuacji zwierzętom należy podawać substancję badaną przez siedem dni w tygodniu przez okres 28 dni. Zwierzęta w grupie satelickiej, w której planuje się późniejszą obserwację, powinny zostać przetrzymane przez następnych 14 dni bez podawania im substancji w celu stwierdzenia ustępowania lub utrzymywania się działań toksycznych.

Obserwacje zwierzęcia powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych oraz zmiany układu oddechowego, krążenia, autonomicznego i ośrodkowego układu nerwowego, jak też wzorców aktywności somatomotorycznej i wzorców zachowania. Co tydzień należy przeprowadzać pomiary spożycia karmy (i spożycia wody, gdy substancja badana jest podawana z wodą do picia) oraz ważyć zwierzęta.

Regularna obserwacja zwierząt jest niezbędna do tego, aby w możliwym zakresie nie stracić zwierząt badanych z takich przyczyn, jak kanibalizm, autoliza tkanek lub przemieszczenie. Pod koniec okresu badania wszystkie osobniki, które przeżyły w grupach innych niż satelicka, poddaje się sekcji zwłok. Zwierzęta konające oraz zwierzęta przejawiające ostre cierpienie i ból powinny być usuwane, gdy zostanie to zauważone, humanitarnie zabite i poddane sekcji zwłok.

Następujące badania należy wykonać pod koniec okresu badania u wszystkich zwierząt, włącznie z osobnikami w grupie kontrolnej:

1. badania hematologiczne, w tym co najmniej hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów, liczba leukocytów z rozmazem i oznaczenie parametrów krzepnięcia;
2. kliniczna biochemia krwi zawierająca co najmniej jeden parametr funkcji wątroby i nerek: aktywność aminotransferazy alaninowej (uprzednio nazywanej transferazą glutaminianowo-pirogronową), aktywność aminotransferazy asparaginianowej (uprzednio nazywanej transferazą glutaminianowo-szczawiooctową) w surowicy, stężenie azotu mocznikowego, albumin, kreatyniny we krwi, całkowite stężenie bilirubiny i całkowite stężenie białka w surowicy.

Do innych oznaczeń, które mogą okazać się niezbędne do odpowiedniej oceny toksykologicznej, należą oznaczenia stężenia wapnia, fosforu, chlorków, sodu, potasu, glukozy na czczo, lipidogram, stężenia hormonów i oznaczenia równowagi kwasowo-zasadowej, stężenia methemoglobiny oraz aktywności cholinesterazy.

W razie potrzeby można zastosować dodatkowe oznaczenia biochemiczne, aby rozszerzyć badania przyczyn zaobserwowanych działań toksycznych.

1.6.3.1. Pełne badanie patomorfologiczne

Wszystkie zwierzęta objęte badaniem powinny zostać poddane pełnemu makroskopowemu badaniu patomorfologicznemu. Należy zważyć wątrobę, nerki, nadnercza i jądra w stanie wilgotnym, najszybciej, jak to będzie możliwe po rozcięciu zwłok, aby uniknąć wysuszenia. Narządy i tkanki (wątrobę, nerki, śledzionę, nadnercza i serce, jak też wszelkie narządy wykazujące makroskopowe zmiany patologiczne lub o nieprawidłowych wymiarach) należy zakonserwować w odpowiednim środku w celu przeprowadzenia ewentualnych, przyszłych badań histopatologicznych.

1.6.3.2. Badania histopatologiczne

W grupie otrzymującej najwyższą dawkę i w grupie kontrolnej należy wykonać badanie histologiczne zakonserwowanych narządów i tkanek. We wszystkich grupach otrzymujących niższe dawki należy przeprowadzić badanie tych narządów i tkanek, w których stwierdzono zmiany przypisywane badanej substancji przy zastosowaniu najwyższych dawek. Należy również przeprowadzić badanie histologiczne zwierząt we wszelkich grupach satelickich, ze szczególnym naciskiem na te narządy i tkanki, w których stwierdzono skutki podania substancji w innych badanych grupach.

2. DANE

Dane należy przedstawić w skrócie w formie tabelarycznej, z podaniem - dla każdej badanej grupy - liczby zwierząt na początku badania oraz liczby zwierząt z każdym rodzajem zmiany

Wszystkie zaobserwowane zmiany należy ocenić przy pomocy właściwej metody statystycznej. Można zastosować dowolną, uznaną metodę statystyczną

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

3.1. **SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, dieta itp.;
- warunki badania;
- wielkości dawek (włączając podłoże, o ile jest wykorzystane) i stężenia;
- dane na temat reakcji toksycznej w rozbiciu na płcie i dawki;
- poziom niewywierający działania, o ile to możliwe;
- czas zgonu w trakcie badania lub fakt, że zwierzęta przeżyły do jego zakończenia;
- działania toksyczne lub inne;
- czas zaobserwowania każdego nieprawidłowego objawu i późniejszy przebieg zmian tego objawu;
- dane na temat karmy i masy ciała;
- zastosowane badania hematologiczne i wszystkie ich wyniki;
- zastosowane laboratoryjne badania biochemiczne i wszystkie ich wyniki;
- wyniki sekcji zwłok;
- szczegółowy opis wszystkich wyników histopatologicznych;
- o ile właściwe, statystyczna obróbka wyników;
- omówienie wyników;
- interpretacja wyników.

3.2. **OCENA I INTERPRETACJA**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. **LITERATURA**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.8. TOKSYCZNOŚĆ POWTARZANEJ (28 DNI) DAWKI (INHALACYJNA)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Przydatne jest posiadanie wstępnych informacji na temat rozkładu wielkości cząstek, prężności pary, temperatury topnienia, temperatury wrzenia, temperatury zapłonu i wybuchowości (o ile stosowalne) substancji badanej.

Patrz także: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Kilka grup zwierząt doświadczalnych poddaje się ekspozycji przez określony okres czasu na substancję badaną w stopniowanych stężeniach, po jednym stężeniu na grupę, przez 28 dni. W przypadku gdy zastosuje się podłoże w celu zapewnienia właściwego stężenia substancji badanej w powietrzu, należy zastosować grupę kontrolną otrzymującą wyłącznie takie podłoże. W okresie podawania prowadzi się obserwację zwierząt w celu wykrycia wszelkich objawów toksyczności. Zwierzęta, które padną w trakcie badania, i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA**1.6.1. Przygotowania**

Zwierzęta muszą być trzymane w doświadczalnych warunkach pobytu i karmienia przez co najmniej pięć dni przed przeprowadzeniem badania. Przed przeprowadzeniem badania zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta są wybierane losowo i przydzielane do wymaganej liczby grup. W razie potrzeby do badanej substancji można dodać odpowiednie podłoże, aby można było zapewnić właściwe stężenie tej substancji w powietrzu. W razie zastosowania podłoża lub innych substancji pomocniczych w celu ułatwienia dawkowania musi być wiadomo, że nie wykazują one działań toksycznego. O ile będzie to właściwe, można wykorzystać dane historyczne.

1.6.2. Warunki badania**1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne**

O ile nie ma przeciwwskazań, preferowanym gatunkiem jest szczur. Należy wykorzystać powszechnie stosowane szczepy laboratoryjne młodych, zdrowych zwierząt.

Na początku badania zmienność masy ciała zastosowanych zwierząt nie powinna przekraczać $\pm 20\%$ odpowiedniej wartości średniej.

1.6.2.2. Liczba i płeć

Wykorzystuje się po co najmniej 10 zwierząt (pięć samic i pięciu samców) w każdej grupie badanej. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. Jeżeli planuje się uśmiercanie zwierząt w międzyczasie, ogólna ich liczba powinna być zwiększona o liczbę zwierząt zaplanowanych do uśmiercenia przed zakończeniem badania. Ponadto satelicka grupa 10 zwierząt (po pięć zwierząt każdej płci) może otrzymywać większą dawkę przez 28 dni i można prowadzić w niej obserwację pod kątem odwracalności, utrzymywania się i opóźnionego pojawiania się efektów toksycznych przez 14 dni od zastosowania substancji. Jest także stosowana grupa satelicka 10 zwierząt kontrolnych (pięć zwierząt każdej płci).

1.6.2.3. Stężenie ekspozycyjne

Konieczne jest zapewnienie co najmniej trzech stężeń, wraz z kontrolą i kontrolą otrzymującą podłoże (w stężeniu odpowiadającym stężeniu podłożu przy najwyższym poziomie dawkowania substancji), o ile to ostatnie jest stosowane. Z wyjątkiem podawania substancji badanej, zwierzęta w grupie kontrolnej powinny być traktowane w taki sam sposób, jak zwierzęta w grupach badanych. Najwyższe stężenie powinno być tak dobrane, aby wywierało działanie toksyczne, jednak nie prowadziło do zgonów lub prowadziło do jedynie niewielu zgonów. Najniższe stężenie nie powinno dawać żadnych objawów toksyczności. W przypadku gdy istnieje możliwość wykorzystania, oszacowana wielkość ekspozycji u ludzi, najniższe stężenie powinno ją przewyższać. W idealnej sytuacji pośrednie stężenie powinno prowadzić do uzyskania minimalnych dostrzegalnych efektów toksycznych. W przypadku gdy zostanie wykorzystane więcej niż jedno stężenie pośrednie, wielkości stężeń powinny być tak rozstawione, aby uzyskać stopniowanie działań toksycznych. W grupach otrzymujących niskie i pośrednie stężenia oraz w grupach kontrolnych częstość występowania zgonów powinna być niska, aby umożliwić znaczącą ocenę wyników.

1.6.2.4. Czas ekspozycji

Czas codziennej ekspozycji powinien wynosić sześć godzin, jednak mogą być potrzebne inne okresy, aby spełnić szczególne wymagania.

1.6.2.5. Wyposażenie

Zwierzęta należy poddać badaniu przy użyciu przyrządów do inhalacji zapewniających przepływ dynamiczny powietrza co najmniej 12 wymian na godzinę, aby zapewnić odpowiednią zawartość tlenu i równomierną dystrybucję powietrza ekspozycji. W przypadku zastosowania komory należy ją tak zaprojektować, aby zmniejszyć do minimum tłoczenie zwierząt badanych i zwiększyć do maksimum ich ekspozycję drogą inhalacyjną na substancję badaną. Z reguły, aby zapewnić stabilność powietrza w komorze, całkowita „objętość” zwierząt badanych nie powinna przekraczać 5% objętości komory do badań. Można zastosować ekspozycję ustno-nosową, ekspozycję jedynie głowy lub ekspozycję całego ciała w pojedynczych komorach, przy czym te pierwsze dwa sposoby pomogą w zminimalizowaniu przechodzenia substancji badanej do organizmu innymi drogami.

1.6.2.6. Okres obserwacji

Zwierzęta doświadczalne należy obserwować codziennie pod kątem występowania objawów toksyczności w całym okresie otrzymywania substancji i zdrowienia. Należy zapisać czas zgonu zwierzęcia i czas pojawienia się i ustąpienia objawów toksyczności.

1.6.3. Procedura

Zwierzęta poddaje się działaniu substancji badanej codziennie, przez pięć do siedmiu dni w tygodniu, przez okres 28 dni. Zwierzęta we wszelkich grupach satelickich, u których planuje się obserwację po zakończeniu eksperymentu, należy przetrzymać przez następnych 14 dni bez podawania im substancji, aby wykryć ustępowanie lub utrzymywanie się efektów toksycznych. Temperatura przeprowadzania badania powinna być utrzymywana na poziomie 22 ± 3 °C.

Wilgotność względną należy utrzymywać najlepiej w przedziale pomiędzy 30 a 70%, jednak w niektórych przypadkach (np. badania aerozoli) może to nie być możliwe ze względów praktycznych. Utrzymywanie lekkiego podciśnienia w komorze (≤ 5 mm słupa wody) zapobiega wyciekowi substancji badanej do otaczającego obszaru. W trakcie ekspozycji należy zaprzestać podawania zwierzętom karmy i wody.

Należy stosować dynamiczny układ inhalacyjny z odpowiednim analitycznym systemem regulacji stężenia. Zalecane jest przeprowadzenie badania próbnego w celu ustalenia właściwych stężeń ekspozycji. Szybkość przepływu powietrza należy tak wyregulować, aby warunki w całej komorze były jednorodne. Układ powinien zapewnić jak najszybsze uzyskanie stabilnych warunków ekspozycji.

Należy prowadzić pomiary lub monitorować następujące:

- a) szybkość przepływu powietrza (w sposób ciągły);
- b) rzeczywiste stężenie substancji badanej mierzone w strefie oddechowej. W okresie ekspozycji stężenie nie powinno się zmieniać o więcej niż $\pm 15\%$ wartości średniej. W przypadku niektórych aerozoli ten poziom kontroli może być niemożliwy do uzyskania, przy czym dopuszczalny jest wtedy szerszy zakres. W trakcie całego badania stężenia w kolejnych dniach powinny być utrzymywane na poziomie na tyle niezmiennym, na ile to będzie praktycznie możliwe. Dla aerozoli, należy wykonać cotygodniowo co najmniej jedną analizę wielkości cząsteczek dla badanej grupy;
- c) temperaturę oraz wilgotność, o ile możliwe w sposób ciągły.

W trakcie ekspozycji i po jej zakończeniu należy prowadzić systematyczne obserwacje, zapisując ich wyniki; należy prowadzić oddzielne zapisy dla każdego zwierzęcia. Wszystkie zwierzęta należy obserwować codziennie i odnotowywać występujące u nich objawy toksyczności, włącznie z czasem ich pojawienia się, stopniem ich ciężkości i czasem trwania. Obserwacje powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych oraz zmiany układu oddechowego, krążenia, autonomicznego i ośrodkowego układu nerwowego, jak też wzorców aktywności somatomotorycznej i wzorca zachowania. Co tydzień należy ważyć zwierzęta. Zaleca się także przeprowadzanie cotygodniowych pomiarów wielkości spożycia karmy. Regularna obserwacja zwierząt jest niezbędna do tego, aby w możliwym zakresie nie stracić zwierząt badanych z takich przyczyn, jak kanibalizm, autoliza tkanek lub przemieszczenie. Pod koniec okresu badania wszystkie osobniki, które przeżyły w grupach innych niż satelicka, poddaje się sekcji zwłok. Zwierzęta konające oraz zwierzęta przejawiające ostre cierpienie i ból powinny być usuwane, gdy zostanie to zauważone, humanitarnie zabite i poddane sekcji zwłok.

Następujące badania należy wykonać pod koniec okresu badania u wszystkich zwierząt, włącznie z osobnikami w grupie kontrolnej:

- i) badania hematologiczne, w tym co najmniej hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów, liczba leukocytów z rozmazem i oznaczenie parametrów krzepnięcia;
- ii) laboratoryjne badania biochemiczne, włączając co najmniej jeden parametr funkcyjny wątroby i nerek: aktywność aminotransferazy alaninowej (uprzednio nazywanej transferazą glutaminianowo-pirogronową), aktywność aminotransferazy asparaginianowej (uprzednio nazywanej transferazą glutaminianowo-szczawiooctową) w surowicy, stężenie azotu mocznikowego, albumin, kreatyniny we krwi, całkowite stężenie bilirubiny i całkowite stężenie białka w surowicy.

Do innych oznaczeń, które mogą okazać się niezbędne do odpowiedniej oceny toksykologicznej, należą oznaczenia stężenia wapnia, fosforu, chlorków, sodu, potasu, glukozy na czczo, lipidogram, stężenia hormonów i oznaczenia równowagi kwasowo-zasadowej, stężenia methemoglobiny oraz aktywności cholinesterazy.

W razie potrzeby można zastosować dodatkowe oznaczenia biochemiczne, aby rozszerzyć badania przyczyn zaobserwowanych działań toksycznych.

1.6.3.1. Pełne badanie patomorfologiczne

Wszystkie zwierzęta objęte badaniem powinny zostać poddane pełnemu makroskopowemu badaniu patomorfologicznemu. Co najmniej wątroba, nerki, nadnercza, płuca i organy badane należy zważyć w stanie wilgotnym tak szybko jak to możliwe po wycięciu, aby zapobiec wysuszeniu. Narządy i tkanki (wątrobę, nerki, śledzionę, nadnercza i serce, jak też wszelkie narządy wykazujące makroskopowe zmiany patologiczne lub o nieprawidłowych wymiarach) należy zakonserwować w odpowiednim środku w celu przeprowadzenia ewentualnych, przyszłych badań histopatologicznych. Płuca należy usunąć w stanie nienaruszonym, zważyć i zakonserwować w odpowiedniej substancji utrwalającej dla zapewnienia utrzymania ich struktury.

1.6.3.2. Badania histopatologiczne

W grupie otrzymującej najwyższe stężenie i w grupie kontrolnej (grupach kontrolnych) należy wykonać badania histologiczne zakonserwowanych narządów i tkanek. We wszystkich grupach otrzymujących niższe dawki należy przeprowadzić badanie tych narządów i tkanek, w których stwierdzono zmiany przypisywane badanej substancji przy zastosowaniu najwyższych dawek. Należy również przeprowadzić badania histologiczne zwierząt we wszelkich grupach satelickich, ze szczególnym naciskiem na te narządy i tkanki, w których stwierdzono skutki podania substancji w innych badanych grupach.

2. DANE

Dane należy przedstawić w skrócie w formie tabelarycznej, z podaniem - dla każdej badanej grupy - liczby zwierząt na początku badania oraz liczby zwierząt z każdym rodzajem zmiany.

Wszystkie zaobserwowane wyniki należy ocenić przy pomocy właściwej metody statystycznej. Można zastosować dowolną, uznaną metodę statystyczną.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

— gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, dieta itp.;

— warunki badania:

Opis urządzenia użytego do zapewnienia ekspozycji włącznie z jego konstrukcją, rodzajem, wymiarami, źródłem powietrza, systemem generowania cząstek i aerozoli, metodą klimatyzacji i metodą trzymania zwierząt w komorze do badań w razie jej wykorzystania. Należy opisać urządzenia zastosowane do pomiaru temperatury, wilgotności i, gdzie sytuacja tego wymaga, stabilności stężenia i rozkładu wielkości cząstek w aerozolu.

Dane ekspozycji:

Powinny być przedstawione w formie tabeli, z podaniem wartości średniej i miary zmienności (np. odchylenia standardowego) i powinny, o ile to możliwe zawierać:

- a) szybkość przepływu powietrza przez urządzenia do inhalacji;
- b) temperatura i wilgotność powietrza;
- c) nominalne stężenia (całkowita ilość badanej substancji wprowadzona do urządzeń inhalacyjnych, podzielona przez objętość powietrza);
- d) rodzaj podłoża, o ile jest wykorzystane;
- e) rzeczywiste stężenia w badawczym obszarze oddychania;
- f) średnica aerodynamiczna masy średniej (MMAD) i geometryczne standardowe odchylenie (GSD);

— dane reakcji toksycznej w rozbiu na płcie i stężenia;

— czas zgonu w trakcie badania lub fakt, że zwierzęta przeżyły do jego zakończenia;

— opis działań toksycznych i innych; poziom niewywierający działania;

— czas zaobserwowania każdego nieprawidłowego objawu i późniejszy przebieg;

— dane na temat karmy i masy ciała;

— zastosowane badania hematologiczne i ich wyniki;

— zastosowane laboratoryjne badania biochemiczne i ich wyniki;

— wyniki sekcji zwłok;

— szczegółowy opis wszystkich wyników histopatologicznych;

— o ile to możliwe, statystyczna obróbka wyników;

— omówienie wyników;

— interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. LITERATURA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.9. TOKSYCZNOŚĆ POWTARZANEJ (28 DNI) DAWKI (DERMALNA)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJE

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (B).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Substancję badaną podaje się na skórę w stopniowanych dawkach kilku grupom zwierząt doświadczalnych, po jednej dawce na grupę przez okres 28 dni. W okresie podawania prowadzi się codzienną obserwację zwierząt w celu wykrycia objawów toksyczności. Zwierzęta, które zdechną w trakcie badania, i te, które przeżyją po jego zakończeniu, poddaje się sekcji zwłok.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA**1.6.1. Przygotowania**

Zwierzęta muszą być trzymane w doświadczalnych warunkach pobytu i karmienia przez co najmniej pięć dni przed przeprowadzeniem badania. Przed przeprowadzeniem badania zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta są wybierane losowo i przydzielane do poszczególnych grup poddanych działaniu substancji i kontrolnych. Na krótko przed rozpoczęciem eksperymentu należy usunąć sierść z grzbietowej powierzchni tułowia zwierząt przez przycięcie lub ogolenie. Można zastosować ogolenie, jednak należy je przeprowadzić na około 24 godziny przed rozpoczęciem badania. Na ogół konieczne jest powtarzanie przycinania lub golenia sierści w odstępach około jednego tygodnia. Podczas przycinania lub golenia sierści należy uważać, aby nie uszkodzić skóry. Nie mniej niż 10% powierzchni ciała powinno być wolne w celu zastosowania substancji badanej. Przy podejmowaniu decyzji o wielkości powierzchni ciała, jaką należy oczyścić, oraz o rozmiarach pokrycia tej powierzchni substancją należy uwzględnić masę ciała zwierzęcia. Przy badaniu ciała stałego, które można sproszkować gdy to stosowne, substancja badana powinna być wystarczająco nawilżona wodą lub, w miarę potrzeby, stosownym podłożem dla zapewnienia dobrego kontaktu ze skórą. Płynne substancje badane stosuje się na ogół w stanie nierozcieńczonym. Substancję stosuje się codziennie przez pięć do siedmiu dni w tygodniu.

1.6.2. Warunki badania**1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne**

Można wykorzystać dorosłe szczury, króliki lub świnki morskie. Można stosować inne gatunki, lecz ich użycie wymaga uzasadnienia.

Na początku badania zmienność masy ciała zastosowanych zwierząt nie powinna przekraczać $\pm 20\%$ odpowiedniej wartości średniej.

1.6.2.2. Liczba i płeć

Wykorzystuje się co najmniej 10 zwierząt (pięć samic i pięciu samców) ze zdrową, nienaruszoną skórą w przypadku każdego poziomu dawkowania. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. Jeżeli planuje się uśmiercanie zwierząt w międzyczasie, ogólna ich liczba powinna być zwiększona o liczbę zwierząt zaplanowanych do uśmiercenia przed zakończeniem badania. Dodatkowo, grupa satelicka 10 zwierząt (pięć zwierząt każdej płci) może być poddana działaniu wysokiego poziomu dawki przez 28 dni i obserwowana, przez 14 dni po dawkowaniu, pod kątem odwracalności, trwałości, i opóźnionego wystąpienia objawów zatrucia. Jest także stosowana grupa satelicka 10 zwierząt kontrolnych (pięć zwierząt każdej płci).

1.6.2.3. Wielkości dawek

Należy zastosować co najmniej trzy wielkości dawek z grupą kontrolną lub grupą kontrolną otrzymującą podłoże, o ile to ostatnie jest stosowane. Czas ekspozycji powinien wynosić co najmniej sześć godzin na dobę. Substancję badaną należy podawać o podobnej porze każdego dnia, przy czym wielkości dawek należy tak dostosowywać w odpowiednich odstępach czasu (co tydzień lub co dwa tygodnie), aby utrzymać stałą wielkość dawki w przeliczeniu na masę ciała zwierzęcia. Z wyjątkiem zastosowania substancji badanej, ze zwierzętami grupy kontrolnej powinno się obchodzić w sposób identyczny, jak z podmiotami grupy badanej. W przypadku stosowania podłoża w celu ułatwienia dawkowania, u zwierząt kontrolnych otrzymujących podłoże należy stosować samo to podłoże w taki sam sposób, jak w grupach otrzymujących substancję badaną, w takiej samej dawce, jak stosowana w grupie otrzymującej najwyższą dawkę. Najwyższa dawka powinna być tak dobrana, aby wywierała działanie toksyczne, jednak nie prowadziła do zgonów lub prowadziła do jedynie niewielu zgonów. Najniższa dawka nie powinna dawać żadnych objawów toksyczności. W przypadku gdy istnieje możliwość do wykorzystania, oszacowana wielkość ekspozycji u ludzi, najniższy poziom dawkowania powinien ją przewyższać. W idealnej sytuacji pośredni poziom dawkowania powinien prowadzić do uzyskania minimalnych dostrzegalnych efektów toksycznych. W przypadku gdy zostanie wykorzystana więcej niż jedna dawka pośrednia, wielkości dawek powinny być tak rozstawione, aby uzyskać stopniowanie działań toksycznych. W grupach otrzymujących niskie i pośrednie dawki oraz w grupach kontrolnych częstość występowania zgonów powinna być niska, aby umożliwić znaczącą ocenę wyników.

W przypadku gdy zastosowanie substancji badanej wiąże się z ciężkim działaniem drażniącym na skórę, stężenia należy zmniejszyć, przy czym może to spowodować zmniejszenie pojawiania się lub brak innych skutków toksycznych przy najwyższym poziomie dawkowania. Ponadto w przypadku znacznego uszkodzenia skóry może być konieczne przerwanie badania i podjęcie nowego eksperymentu z zastosowaniem niższych stężeń.

1.6.2.4. Czas ekspozycji

W przypadku gdy w badaniu wstępnym z zastosowaniem dawki 1 000 mg/kg lub wyższej, odpowiadającej potencjalnej ekspozycji u ludzi, o ile taki poziom jest znany, nie zostaną stwierdzone żadne efekty toksyczne, można uznać, że dalsze badania nie są potrzebne.

1.6.2.5. Okres obserwacji

Zwierzęta doświadczalne należy obserwować codziennie pod kątem występowania objawów toksyczności. Należy zapisać czas zgonu zwierzęcia i czas pojawienia się i ustąpienia objawów toksyczności.

1.6.3. Procedura

Zwierzęta powinny być trzymane w oddzielnych klatkach. W idealnej sytuacji podaje się im substancję badaną przez siedem dni w tygodniu przez okres 28 dni. Zwierzęta w grupach satelickich, w których planuje się późniejszą obserwację, powinny zostać przetrzymane przez następnych 14 dni bez podawania im substancji w celu stwierdzenia ustępowania lub utrzymywania się działań toksycznych. Czas ekspozycji powinien wynosić co najmniej sześć godzin na dobę.

Substancja badana powinna zostać nałożona w sposób równomierny na obszar równy około 10% całkowitej powierzchni ciała. W przypadku substancji wysoce toksycznych można je nanieść na mniejszą powierzchnię, jednak należy dążyć do tego, aby pokryć jak największy obszar jak najcieńszą i jak najbardziej równomierną warstwą badanego związku.

W trakcie ekspozycji substancja badana jest utrzymywana w kontakcie ze skórą dzięki zastosowaniu porowatego opatrunku z gazy i niedrażniącej taśmy. Miejsce badania należy dodatkowo przykryć w taki sposób, aby utrzymać opatrunek z gazy i substancję badaną i zapewnić, aby zwierzęta nie mogły zjeść tej ostatniej. W celu zapobieżenia spożyciu substancji badanej można uwiązać zwierzę, jednak pełna immobilizacja nie jest zalecaną metodą. Jako alternatywę można zastosować „kołnierzykowy przyrząd zabezpieczający”.

Pod koniec okresu ekspozycji należy usunąć resztki badanej substancji, w miarę możliwości stosując wodę lub jakieś inne, właściwe metody oczyszczania skóry.

Wszystkie zwierzęta należy obserwować codziennie i odnotowywać występujące u nich objawy toksyczności, włącznie z czasem ich pojawienia się, stopniem ich ciężkości i czasem trwania. Obserwacje przy klatce zwierzęcia powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych oraz zmiany układu oddechowego, krążenia, autonomicznego i ośrodkowego układu nerwowego, jak też wzorców aktywności somatomotorycznej i wzorca zachowania. Co tydzień należy ważyć zwierzęta. Zaleca się także przeprowadzanie cotygodniowych pomiarów wielkości spożycia karmy. Regularna obserwacja zwierząt jest niezbędna do tego, aby w możliwym zakresie nie stracić zwierząt badanych z takich przyczyn, jak kanibalizm, autoliza tkanek lub przemieszczenie. Pod koniec okresu badania wszystkie osobniki, które przeżyły w grupach innych niż satelicka, poddaje się sekcji zwłok. Zwierzęta konające oraz zwierzęta przejawiające ostre cierpienie i ból powinny być usuwane, gdy zostanie to zauważone, humanitarnie zabite i poddane sekcji zwłok.

Następujące badania należy wykonać pod koniec okresu badania u wszystkich zwierząt, włącznie z osobnikami w grupie kontrolnej:

- 1) badania hematologiczne, w tym co najmniej hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów, liczba leukocytów z rozmazem i oznaczenie parametrów krzepnięcia;
- 2) laboratoryjne badania biochemiczne krwi zawierające co najmniej jeden parametr funkcji wątroby i nerek: aktywność aminotransferazy alaninowej (uprzednio nazywanej transferazą glutaminianowo-pirogronową) w surowicy, aktywność aminotransferazy asparaginianowej (uprzednio nazywanej transferazą glutaminianowo-szczawiooctową) w surowicy, stężenie azotu mocznikowego, albumin, kreatyniny we krwi, całkowite stężenie bilirubiny i całkowite stężenie białka w surowicy.

Do innych oznaczeń, które mogą okazać się niezbędne do odpowiedniej oceny toksykologicznej, należą oznaczenia stężenia wapnia, fosforu, chlorków, sodu, potasu, glukozy na czczo, lipidogram, stężenia hormonów i oznaczenia równowagi kwasowo- zasadowej, stężenia methemoglobiny oraz aktywności cholinesterazy.

W razie potrzeby można zastosować dodatkowe oznaczenia biochemiczne, aby rozszerzyć badania zaobserwowanych działań toksycznych.

1.6.4. Pełne badanie patomorfologiczne

Wszystkie zwierzęta objęte badaniem powinny zostać poddane pełnemu makroskopowemu badaniu patomorfologicznemu. Należy zważyć wątrobę, nerki, nadnercza i jądra w stanie wilgotnym, najszybciej, jak to będzie możliwe po rozcięciu zwłok, aby uniknąć wysuszenia. Narządy i tkanki, tj. prawidłową i poddawaną ekspozycji na substancję skórę, wątrobę, nerki i narządy docelowe (czyli narządy wykazujące makroskopowe zmiany patologiczne lub o nieprawidłowych wymiarach) należy zakonserwować w odpowiednim środku w celu przeprowadzenia ewentualnych, przyszłych badań histopatologicznych.

1.6.5. Badania histopatologiczne

W grupie otrzymującej najwyższą dawkę i w grupie kontrolnej należy wykonać badanie histologiczne zakonserwowanych narządów i tkanek. We wszystkich grupach otrzymujących niższe dawki należy przeprowadzić badanie tych narządów i tkanek, w których stwierdzono zmiany przypisywane badanej substancji przy zastosowaniu najwyższych dawek. Należy również przeprowadzić badanie histologiczne zwierząt w grupie satelickiej, ze szczególnym naciskiem na te narządy i tkanki, w których stwierdzono skutki podania substancji w innych badanych grupach.

2. DANE

Dane należy przedstawić w skrócie w formie tabelarycznej, z podaniem - dla każdej badanej grupy - liczby zwierząt na początku badania oraz liczby zwierząt z każdym rodzajem zmiany patologicznej.

Wszystkie zaobserwowane zmiany należy ocenić przy pomocy właściwej metody statystycznej. Można zastosować dowolną, uznaną metodę statystyczną.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

3.1. **SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- dane zwierząt (gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, dieta itp.);
- warunki badania (włączając typ opatrunku: okluzyjny lub nieokluzyjny);
- wielkości dawek (włączając podłoże, o ile jest wykorzystane,) i stężenia;
- poziom niewywierający działania, o ile to możliwe;
- dane reakcji toksycznej w rozbiu na płci i dawki;
- czas zgonu w trakcie badania lub fakt, że zwierzęta przeżyły do jego zakończenia;
- działania toksyczne lub inne;
- czas zaobserwowania każdego nieprawidłowego objawu i późniejszy przebieg zmian;
- dane na temat karmy i masy ciała;
- zastosowane badania hematologiczne i ich wyniki;
- zastosowane laboratoryjne badania biochemiczne i ich wyniki;
- wyniki sekcji zwłok;
- szczegółowy opis wszystkich wyników histopatologicznych;
- gdzie to możliwe, statystyczna obróbka wyników;
- omówienie wyników;
- interpretacja wyników.

3.2. **OCENA I INTERPRETACJA**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. **LITERATURA**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.10. MUTAGENNOŚĆ (BADANIE CYTOGENETYCZNE „IN VITRO” U SSAKÓW)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (C).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Badanie cytogenetyczne *in vitro* jest krótkoterminowym badaniem mutagenności polegającym na wykrywaniu strukturalnych aberracji chromosomalnych w hodowlanych komórkach ssaków. Do jego przeprowadzenia mogą służyć kultury ustanowionych linii komórkowych lub kultury komórek pierwotnych. Po ekspozycji na badane substancje chemiczne z lub bez właściwego systemu aktywacji, kultury komórek są poddawane traktowaniu inhibitorami wrzecion podziałowych takich jak kolchicina dla skumulowania komórek w fazie metafazopodobnej mitozy (c-metafaza). Komórki pobiera się w odpowiednim czasie i sporządza preparaty chromosomów. Preparaty barwi się i przeprowadza analizę komórek w metafazie pod kątem anomalii chromosomalnych.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA**1.6.1. Przygotowania****1.6.1.1. Komórki**

Wykorzystuje się kultury ustanowionych linii komórkowych lub kultury komórek pierwotnych, np. komórek chomika chińskiego i ludzkich limfocytów. Badane substancje chemiczne przygotowuje się w podłożu hodowlanym lub rozpuszcza we właściwym podłożu przed potraktowaniem nimi komórek.

1.6.1.2. System aktywacji metabolicznej

Komórki należy eksponować na substancję badaną zarówno w obecności jak i bez odpowiedniego systemu aktywacji. Najbardziej powszechnym używanym systemem jest frakcja postmitochondrialna suplementowanego kofaktora przygotowana z wątroby gryzoni poddawanych działaniu środków enzymoindukcyjnych.

1.6.2. Warunki badania

Liczba kultur:

W przypadku każdego punktu doświadczalnego wykorzystuje się co najmniej po dwie kultury.

Stosowanie kontroli ujemnych i dodatnich:

Jako kontrole ujemne wykorzystuje się rozpuszczalnik (jeżeli nie stanowi on podłoża hodowlanego i nie jest wodą), mieszaninę aktywacyjną enzymów wątrobowych, mieszaninę aktywacyjną enzymów wątrobowych z dodanym rozpuszczalnikiem, jak też niepoddawane działaniu substancji komórki kontrolne.

W każdym eksperymencie wykorzystuje się dodatnią kontrolę; gdy stosowana jest mieszanina aktywacyjna enzymów wątrobowych w celu aktywacji badanego związku chemicznego, jako kontroli dodatniej należy użyć związku, co do którego wiadomo, że wymaga aktywacji metabolicznej.

Wielkość dawki:

Stosuje się co najmniej trzy dawki badanego związku z zakresu jednostki logarytmicznej dawki. Najwyższa dawka powinna hamować aktywność mitotyczną o około 50% lub wykazywać kilka innych wskazań cytotoksyczności. Jeżeli substancja badana nie jest toksyczna, powinna być ona przebadana aż do granicy rozpuszczalności, lub do maksymalnego stężenia 5mg/ml.

Warunki utrzymywania kultur

Wykorzystuje się odpowiednie podłoże hodowlane i odpowiednie warunki inkubacji (np. temperatura, stosowane naczynia hodowlane, stężenia CO₂ i wilgotność).

1.6.3. **Procedura**

1.6.3.1. *Przygotowanie kultur*

Ustalone linie komórkowe: Komórki uzyskuje się z kultury podstawowej (np. przez trypsynizację lub przez wytrząsanie), posiewa w naczyniach hodowlanych z odpowiednią gęstością i inkubuje w temperaturze 37 °C.

Limfocyty ludzkie: Heparynizowaną krew pełną dodaje się do podłoża hodowlanego zawierającego fitohemaglutyninę, surowicę płodu cielęcego i antybiotyki, a następnie inkubuje w temperaturze 37 °C.

1.6.3.2. *Traktowanie kultur badanym związkiem*

i) Traktowanie bez mieszaniny aktywacyjnej enzymu wątrobowego

Wszystkie przypadki poddawania działaniu badanego związku obejmują okres jednego pełnego cyklu komórkowego i schematy utrwalania zapewniają analizę pierwszych występujących po stosowaniu związku mitoz komórek, które poddawano jego działaniu w różnych fazach cyklu.

W przypadku gdy czas poddawania działaniu badanego związku nie obejmuje całego cyklu komórkowego, wybiera się kilka różnych okresów utrwalania dla komórek próbki znajdujących się w różnych fazach omawianego cyklu w tym czasie, tj. w fazach G₁, S i G₂.

Badany związek chemiczny dodaje się do kultury ustanowionych linii komórkowych, gdy znajdują się one w wykładniczej fazie wzrostu. Kultury ludzkich limfocytów poddaje się działaniu tego związku, gdy znajdują się one w stanie w połowie zsynchronizowanym.

ii) Poddawanie działaniu badanego związku z mieszaniną aktywacyjną enzymów wątrobowych

Podczas poddawania działaniu, badany związek w połączeniu z układem aktywacyjnym powinien być obecny przez tak długi czas, jak tylko jest to możliwe bez wywierania działania toksycznego na komórki. Jeżeli z przyczyn toksyczności niniejsze traktowanie nie pokrywa długości całego cyklu komórkowego, czasy utrwalania wybierane są do komórek próbnych będących w różnych etapach cyklu komórkowego w czasie trwania traktowania, to jest G₁, S i G₂.

Pobieranie komórek:

Kultury komórek traktowane są właściwym inhibitorem wrzeczona przez właściwy czas przed zbieraniem kultury bakterii. Każdą kulturę pobiera się oddzielnie i oddzielnie przygotowuje z nich preparat chromosomów. Wymagane są co najmniej dwa czasy zbioru kultur bakterii. Zaleca się, by jeden wynosił około jednego cyklu komórkowego, a drugi był późniejszy. Stosuje się to dla zapewnienia, że wszystkie etapy cyklu komórkowego są objęte i pozwala na opóźnienie cyklu komórkowego.

1.6.3.3. *Przygotowanie chromosomów*

Przygotowanie chromosomów obejmuje poddanie komórek działaniu roztworu hipotonicznego, utrwalenie, rozprowadzenie na szkiełkach przedmiotowych i zabarwienie.

Analiza:

Co najmniej 100 dobrze rozłożonych metafaz na kulturę poddaje się analizie pod kątem aberracji chromosomalnych. Przed analizą należy zakodować szkiełka przedmiotowe. W przypadku ludzkich limfocytów poddaje się analizie jedynie metafazy zawierające 46 centromerów.

W przypadku ustanowionych linii komórkowych analizuje się jedynie metafazy zawierające liczbę modalną ± 2 centromery.

W trakcie trwania badania dla każdej wielkości dawki, należy dodatkowo ocenić indeks mitotyczny lub, gdy to stosowne, niektóre inne wskazania cytotoksyczności.

2. DANE

Dane przedstawia się w formie tabelarycznej. Oddzielnie dla każdej kultury poddawanej działaniu badanego związku i stanowiącej kontrolę, podaje się aberracje chromatydowe (przerwy, pęknięcia, wymiany), chromosomalne (przerwy, pęknięcia, drobne chromosomy, pierścienie, dwa centromery, kilka centromerów) oraz liczbę nieprawidłowych metafaz (włącznie z przerwami i bez nich).

Dane poddaje się ocenie przy użyciu właściwych metod statystycznych.

Wyniki badań należy porównać z równoczesną kontrolą ujemną.

Przeprowadza się co najmniej dwa niezależne doświadczenia. Jednakże, o ile jest to naukowo uzasadnione, może być wystarczające wykonanie pojedynczego doświadczenia. Nie jest konieczne przeprowadzenie drugiego doświadczenia w sposób identyczny jak doświadczenie początkowe. Faktycznie może być korzystne zmienienie pewnych warunków badania celem uzyskania bardziej użytecznych danych.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- użyte komórki;
- warunki badania: skład podłoża, stężenie CO₂, temperatura inkubacji, czas inkubacji, wielkości dawek, czas poddawania działaniu, czas stosowania i stężenie użytego inhibitora podziałowego, rodzaj użytej mieszaniny aktywacyjnej enzymów wątrobowych, kontrole dodatnie i ujemne;
- liczba kultur komórkowych;
- liczba przeanalizowanych metafaz (dane podawane oddzielnie dla każdej kultury);
- indeks mitotyczny lub inne wskazanie cytotoksyczności;
- rodzaj i liczba aberracji, podane oddzielnie dla każdej kultury traktowanej związkiem i stanowiącej kontrolę, modalna liczba chromosomów w wykorzystanych ustanowionych liniach komórkowych;
- ocena statystyczna;
- omówienie wyników;
- interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. LITERATURA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.11. MUTAGENNOŚĆ (BADANIE CYTOGENETYCZNE SZPIKU KOSTNEGO „IN VIVO” U SSAKÓW, ANALIZA CHROMOSOMALNA)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (C).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Badanie cytogenetyczne *in vivo* jest krótkoterminowym badaniem mutagenności polegającym na wykrywaniu strukturalnych aberracji chromosomalnych. Oceny tych aberracji dokonuje się na ogół podczas pierwszych mitoz następujących po zastosowaniu badanego związku. W przypadku mutagenów chemicznych większość wywołanych aberracji jest typu chromatydowego.

W metodzie wykorzystuje się komórki szpiku kostnego ssaków poddawanych ekspozycji na badane związki chemiczne właściwymi drogami i uśmiercanych w kolejnych odstępach czasu. Przed uśmierceniem zwierzęta są ponadto poddane działaniu inhibitora podziałowego, takiego jak kolchicina, aby doprowadzić do nagromadzenia się komórek w metafazalnej fazie mitozy (metafaza c). Sporządza się suszone na powietrzu preparaty chromosomów uzyskanych z komórek, które barwi się i poddaje analizie mikroskopowej metafazy pod kątem aberracji chromosomalnych.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA**1.6.1. Przygotowania**

Badane związki chemiczne rozpuszcza się w soli fizjologicznej. Jeżeli są one nierozpuszczalne, rozpuszcza się je lub zawiesza we właściwych podłożach.

Stosuje się świeżo przygotowane roztwory badanego związku. W razie wykorzystania podłoża w celu ułatwienia dawkowania, nie może ono wchodzić w interakcje z badanym związkiem ani wywierać działania toksycznego.

1.6.2. Warunki badania**1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne**

Wykorzystuje się gatunki gryzoni, takie jak szczury, myszy lub chomiki chińskie. Zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta przydziela się w sposób losowy do grup poddanych działaniu badanej substancji i grup kontrolnych.

1.6.2.2. Liczba i płeć

Wykorzystuje się co najmniej po pięć samic i samców w każdej grupie doświadczalnej i kontrolnej. W związku z tym po 10 zwierząt będzie uśmiercane w okresie czasu w grupie, jeżeli w programie eksperymentu jest przewidzianych kilka okresów badania po podaniu substancji.

Dla dodatknej grupy kontrolnej wystarczające jest badanie wyrwykowe jednostopniowe.

1.6.2.3. *Drogi podawania*

Badane związki należy na ogół podawać jedynie raz. O ile uzasadniają to informacje toksykologiczne, można zastosować powtarzane podawanie substancji. Jednakże można je zastosować jedynie wtedy, gdy badany związek nie wywiera działania cytotoksycznego na szpik kostny. Zwykle stosowane drogi podania to droga doustna i zastrzyk dootrzewnowy. Właściwe mogą być też inne drogi podania.

1.6.2.4. *Stosowanie dodatnich i ujemnych kontroli*

Jako kontrolę dodatnią stosuje się związek ze stwierdzoną zdolnością do wywoływania aberracji chromosomalnych *in vivo*. Schemat każdego eksperymentu obejmuje też ujemną grupę kontrolną (otrzymującą rozpuszczalnik).

1.6.2.5. *Wielkość dawki*

W przypadku podstawowego zestawu wykorzystuje się jedną dawkę badanego związku, przy czym jest to maksymalna dawka tolerowana lub dawka wywołująca pewne objawy cytotoksyczności (np. częściowe zahamowanie mitozy).

Dla związków „nietoksycznych”, maksymalna (graniczna) dawka, którą należy zbadać po podaniu dawki pojedynczej, jest 2 000 mg/kg masy ciała.

Jeżeli stosuje się metodę powtarzanej dawki, dawka graniczna wynosi 1 000 mg/kg masy ciała na dzień.

Mogą zostać zastosowane dodatkowe wielkości dawek, gdy jest to uzasadnione względami naukowymi.

Jeżeli badanie wykorzystuje się jako metodę weryfikacji, należy użyć co najmniej dwóch dodatkowych wielkości dawek.

1.6.3. **Procedura**

Badanie można wykonać na dwa sposoby:

- i) Zwierzęta otrzymują badany związek raz, w najwyższej tolerowanej dawce. przede wszystkim, próbki pobierane są 24 godziny po traktowaniu. Jeżeli wyniki na tym etapie są jednoznacznie pozytywne, dalsze pobieranie próbek nie jest konieczne. Jednakże jeżeli wyniki są negatywne lub niejednoznaczne, ponieważ kinetyka cyklu komórkowego mogła być zakłócona badaniem chemicznym, stosuje się jeden wcześniejszy i jeden późniejszy przedział czasu pobierania próbek odpowiednio rozmieszczony w obrębie zakresu czasowego od sześciu do 48 godzin.

W przypadku zastosowania dodatkowych wielkości dawek próbki należy pobierać w szczególnie wrażliwych odstępach czasu, a jeżeli nie są one znane, po 24 godzinach od podania substancji.

- ii) W przypadku gdy informacje farmakokinetyczne i metaboliczne wskazują na to, że właściwe byłoby zastosowanie schematu wielodawkowego, można zastosować taki schemat, przy czym próbki należy pobrać po sześciu i po 24 godzinach od ostatniego podania.

Przygotowanie szpiku kostnego:

Przed uśpieniem, zwierzęta poddaje się wstrzyknięciu dootrzewnowo właściwej dawki inhibitora wrzeczion w celu uzyskania stosownej liczby komórek w metafazie-c. Szpik kostny jest uzyskiwany z obu kości udowych świeżo zabitych zwierząt przez wypłukanie roztworem izotonicznym. Po odpowiednim potraktowaniu roztworem hipotonicznym komórki się utrwała, a następnie rozprowadza na szkiełkach przedmiotowych. Po wysuszeniu na powietrzu szkiełka te należy zabarwić.

Analiza:

Szkiełka przedmiotowe koduje się przed przeprowadzeniem analizy mikroskopowej. W przypadku każdego zwierzęcia poddaje się analizie co najmniej 50 dobrze rozłożonych metafaz z pełną liczbą centromerów, pod kątem strukturalnych aberracji chromosomalnych. Dodatkowo w przypadku każdego zwierzęcia można ustalić indeksy mitotyczne.

2. DANE

Dane przedstawia się w formie tabelarycznej. Oddzielnie dla każdego zwierzęcia poddawanego działaniu związku i wchodzącego w skład grupy kontrolnej podaje się informacje na temat aberracji chromatydowych i izochromatydowych (przerwy, pęknięcia, wymiany) oraz indeksów mitotycznych, o ile tylko zostaną obliczone. Podaje się także wartości średnie i odchylenia standardowe dla każdej grupy doświadczalnej i kontrolnej. Dane poddaje się ocenie przy użyciu właściwych metod statystycznych.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- gatunek, szczep i wiek zastosowanych zwierząt;
- liczba zwierząt każdej płci w grupach doświadczalnych i kontrolnych;
- warunki badania: szczegółowy opis schematu podawania substancji i pobierania próbek, informacje na temat wielkości dawek, czas trwania czas stosowania i stężenie użytego inhibitora podziałowego;
- liczba metafaz przeanalizowanych u każdego zwierzęcia;
- indeksy mitotyczne, o ile zostały ustalone;
- rodzaj i liczba aberracji, podane oddzielnie dla każdego zwierzęcia poddanego działaniu substancji i stanowiącego kontrolę;
- oznaki działania toksycznego w trakcie trwania badań;
- ocena statystyczna;
- omówienie wyników;
- interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. LITERATURA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.12. MUTAGENNOŚĆ (BADANIE MIKROJĄDROWE)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (C).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Badanie mikrojądrowe jest krótkoterminowym badaniem przeprowadzanym na ssakach *in vivo* w celu wykrycia uszkodzenia chromosomów lub uszkodzenia przyrządu mitotycznego przez związki chemiczne. Postawą tego oznaczenia jest wzrost liczby mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych u zwierząt otrzymujących badany związek w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

Mikrojądra tworzą się z fragmentów chromosomów lub całych chromosomów opóźnionych w mitozie. Podczas przekształcania erytroblastów w erytrocyty główne jądro ulega wydaleniu, podczas gdy mikrojądro może pozostać w cytoplazmie. W badaniu tym wykorzystuje się młode, wielobarwliwe erytrocyty w szpiku kostnym ssaków laboratoryjnych, które zostały poddane ekspozycji na badane substancje właściwymi drogami. Szpik kostny pobiera się i sporządza rozmazy, które następnie się barwi. Przeprowadza się zliczanie pod mikroskopem liczby erytrocytów polichromatycznych pod kątem zawartości mikrojąder, po czym oblicza się stosunek liczby erytrocytów polichromatycznych do monochromatycznych.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA**1.6.1. Przygotowania**

Badane substancje są rozpuszczane w roztworze izotonicznym. Jeżeli są one nierozpuszczalne, rozpuszcza się je lub zawiesza we właściwych podłożach. W razie wykorzystania podłoża nie może ono wchodzić w interakcje z badanym związkiem chemicznym ani wywierać działania toksycznego. Na ogół stosuje się świeżo przygotowane roztwory badanego związku.

1.6.2. Warunki badania**1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne**

Zaleca się wykorzystanie myszy, jednak mogą zostać wykorzystane także inne ssaki. Zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta przydziela się w sposób losowy do grup poddanych działaniu badanej substancji i grup kontrolnych.

1.6.2.2. Liczba i płeć

Wykorzystuje się co najmniej po pięć samic i samców w każdej grupie doświadczalnej i kontrolnej. W związku z tym po 10 zwierząt będzie uśmiercane w okresie czasu w grupie, jeżeli w programie eksperymentu jest przewidzianych kilka okresów badania po podaniu substancji. Dla dodatknej grupy kontrolnej, czas badania wrywkowe jednostopniowego jest wystarczający.

1.6.2.3. Drogi podawania

Badane związki należy na ogół podawać jedynie raz. O ile uzasadniają to informacje toksykologiczne, można zastosować powtarzane podawanie substancji. Jednakże można je zastosować jedynie wtedy, gdy badany związek nie wywiera działania cytotoksycznego na szpik kostny. Zwykle stosowane drogi podania to droga doustna i zastrzyk dootrzewnowy. Właściwe mogą być też inne drogi podania.

1.6.2.4. Stosowanie dodatnich i ujemnych kontroli

W każdym eksperymencie należy zastosować zarówno dodatnie, jak i ujemne (rozpuszczalnik) kontrole.

1.6.2.5. Wielkość dawki

W przypadku podstawowego zestawu stosuje się jedną dawkę badanego związku, przy czym powinna to być maksymalna dawka tolerowana lub dawka wywołująca pewne objawy cytotoksyczności, np. zmianę stosunku erytrocytów polichromatycznych do normochromatycznych.

Dla związków „nietoksycznych”, maksymalna dawka (graniczna) która wymaga zbadania po podaniu dawki pojedynczej wynosi 2 000 mg/kg masy ciała.

Jeżeli stosuje się procedurę powtarzanej dawki, dawka graniczna wynosi 1 000 mg/kg masy ciała dziennie.

Mogą zostać zastosowane dodatkowe wielkości dawek, gdy jest to uzasadnione względami naukowymi.

Jeżeli badanie wykorzystuje się jako metodę weryfikacji, należy użyć co najmniej dwóch dodatkowych wielkości dawek.

1.6.3. Procedura

Badanie można wykonać na dwa sposoby:

- i) Zwierzętom podaje się jednorazowo badaną substancję. Pobieranie próbek powinno nastąpić w momencie maksymalnej reakcji na badanie, przy czym czas jego wystąpienia jest różny w przypadku różnych związków. Dlatego, próbki szpiku kostnego są pobierane co najmniej dwa razy na początku, nie wcześniej niż 12 godzin po podaniu substancji, ale nie później niż 48 godzin.

W przypadku zastosowania dodatkowych wielkości dawek próbki należy pobierać w okresie maksymalnej wrażliwości, a jeżeli nie jest on znany, po 24 godzinach od podania substancji.

- ii) Jeżeli informacje farmakokinetyczne i metaboliczne wskazują na użycie metody powtarzanej dawki, należy ją zastosować, a próbki powinny być pobrane raz, nie wcześniej niż 12 godzin po ostatnim podaniu.

Przygotowanie szpiku kostnego:

Szpik kostny uzyskuje się z obu kości udowych świeżo zabitych zwierząt, przez przepłukanie tych kości roztworem izotonicznym. Komórki sprowadza się do osadu metodą wirowania i odrzucenia cieczy nad osadu. Krople jednorodnej zawiesiny komórkowej nakłada się na szkiełka przedmiotowe i rozsmarowuje. Po wysuszeniu na powietrzu szkiełka te należy zabarwić.

Analiza:

Szkiełka przedmiotowe koduje się przed przeprowadzeniem analizy mikroskopowej. Przeprowadza się ocenę punktową co najmniej 1 000 polichromatycznych erytrocytów u każdego zwierzęcia pod kątem występowania w nich mikrojąder.

Stosunek erytrocytów normochromatycznych do polichromatycznych ustala się dla każdego zwierzęcia na podstawie zliczenia ogółem 1 000 erytrocytów.

2. **DANE**

Dane przedstawia się w formie tabelarycznej. W ten sposób liczba ocenionych punktowo polichromatycznych erytrocytów, liczba polichromatycznych erytrocytów z mikrojądrami, i procent komórek jądrzastych są umieszczone oddzielnie dla każdego zwierzęcia doświadczalnego i kontrolnego, jak również stosunek erytrocytów normochromatycznych do polichromatycznych. Podaje się także wartości średnie i odchylenia standardowe dla każdej grupy doświadczalnej i kontrolnej. Wymienione dane poddaje się ocenie przy użyciu właściwych metod statystycznych.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

3.1. **SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- gatunek, szczerp i wiek zastosowanych zwierząt;
- liczba zwierząt każdej płci w badaniach kontroli eksperymentów i kontroli;
- warunki badania: szczegółowy opis schematu podawania substancji i harmonogramu pobierania próbek, wielkości dawek, danych na temat toksyczności, ujemnych i dodatnich grup kontrolnych;
- kryteria obliczania mikrojąder;
- o ile to możliwe, współzależność skutku od dawki;
- oznaki działania toksycznego w czasie trwania przebiegu badania;
- ocena statystyczna;
- omówienie wyników;
- interpretacja wyników.

3.2. **OCENA I INTERPRETACJA**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. **LITERATURA**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.13. MUTAGENNOŚĆ (*ESCHERICHIA COLI* – OZNACZENIE MUTACJI WSTECZNEJ)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (C).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADY METODY BADANIA

System do badania rewersji tryptofanowej (*trp*) u bakterii *Escherichia coli* jest badaniem mikrobiologicznym polegającym na pomiarze rewersji (mutacji powrotnych) $trp^- \rightarrow trp^+$ wskutek zastosowania związków chemicznych powodujących zmiany genomu organizmu.

Bakterie poddaje się ekspozycji na badane związki chemiczne z aktywacją metaboliczną lub bez. Po odpowiednim okresie inkubacji w minimalnym podłożu zlicza się kolonie z rewersjami i porównuje tę liczbę z liczbą spontanicznych rewersji w hodowlach niepoddanych działaniu badanej substancji i/lub kulturach poddanych działaniu rozpuszczalnika, stanowiących kontrolę.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA

Do przeprowadzenia badania można zastosować następujące metody: 1) metoda wstępnej inkubacji oraz 2) metoda bezpośredniego wprowadzenia, w ramach której bakterie i substancję badaną miesza się w powierzchniowym agarze i wylewa na powierzchnię wybiórczej płytki agarowej.

1.6.1. Przygotowanie**1.6.1.1. Bakterie**

Bakterie hoduje się w temperaturze 37 °C do późnej wykładniczej lub wczesnej spoczynkowej fazy wzrostu. Przybliżona gęstość komórek powinna być 10^8 - 10^9 komórek na mililitr.

1.6.1.2. Aktywacja metaboliczna

Bakterie należy poddać ekspozycji na substancję badaną, zarówno w obecności jak i bez odpowiedniego systemu aktywacji metabolicznej. Najbardziej powszechnie używanym systemem jest kofaktor suplementowany frakcją postmitochondrialną przygotowaną z wątroby gryzoni traktowanych środkami indukującymi enzymy.

1.6.2. Warunki badania**1.6.2.1. Badane szczepy**

Należy użyć trzech szczepów, WP2, WP2 uvr A i WP2 uvr A pKM 101. Stosuje się uznane metody przygotowania i przechowywania kultur podstawowych. Należy sprawdzić wymagania wzrostu i genetycznej tożsamości szczepów, ich wrażliwość na światło ultrafioletowe lub mitomycynę C i odporność na ampicylinę w szczepie WP2 uvr A pKM 101. W szczepach powinny także się pojawiać spontaniczne rewertanty z oczekiwanym zakresem częstotliwości.

1.6.2.2. Pożywki

Stosuje się każde właściwe podłoże dla ekspresji i selekcji mutantów, z odpowiednią, powierzchniową warstwą agaru.

1.6.2.3. Stosowanie dodatnich i ujemnych kontroli

Należy przeprowadzić równoczesne kontrole bez poddawania działaniu substancji i kontrole z rozpuszczalnikiem. Kontrole dodatnie należy zapewnić w dwóch celach:

(i) W celu potwierdzenia wrażliwości szczepów bakteryjnych.

Jako kontrole dodatnie bez aktywacji metabolicznej można wykorzystać metanosulfonian metylu, tlenek 4-nitrochinoliny lub etylnitrozomocznik.

(ii) Aby zapewnić aktywność właściwych układów metabolizujących.

Dodatnią kontrolą aktywności jednego układu metabolizującego dla wszystkich szczepów jest 2-aminoantracen. O ile jest dostępna, można wykorzystać dodatnią kontrolę z tej samej klasy chemicznej, co związek chemiczny poddawany badaniu.

1.6.2.4. Ilość substancji badanej na płytkę

Badaniu poddaje się co najmniej pięć różnych ilości badanego związku chemicznego, z półlogarytmicznymi odstępami pomiędzy płytkami. Substancje bada się do granicy ich rozpuszczalności lub toksyczności. Toksyczność wykazuje się na podstawie zmniejszenia liczby spontanicznych rewertantów, zniknięcia bakterii tła, lub na podstawie stopnia przeżycia potraktowanych substancją kultury. Substancje nietoksyczne należy poddać badaniu do stężenia 5 mg na płytkę, zanim uzna się je za ujemne w tym badaniu.

1.6.2.5. Warunki inkubacji

Płytki inkubuje się przez 48 do 72 godzin w temperaturze 37 °C.

1.6.3. Procedura

W przypadku metody bezpośredniego naniesienia na płytkę bez aktywacji enzymatycznej, związek chemiczny i 0,1 ml świeżej kultury bakteryjnej dodaje się do 2 ml nawarstwanego agaru. W przypadku badań z aktywacją metaboliczną do wierzchniej warstwy agaru dodaje się 0,5 ml mieszaniny aktywacyjnej enzymów wątrobowych zawierającej odpowiednią ilość frakcji przesączu z nadmitochondriów, po dodaniu badanego związku chemicznego i bakterii. Zawartość każdej próbówki miesza się i wylewa na powierzchnię wybiórczej płytki agarowej. Nawarstwiony agar pozostawia się do zestalenia i płytki inkubuje się w temperaturze 37 °C przez 48 do 72 godzin. Pod koniec okresu inkubacji wykonuje się liczenie kolonii rewertantów na płytkę.

W przypadku metody inkubacji wstępnej mieszaninę badanego związku chemicznego, 0,1 ml świeżej kultury bakteryjnej i odpowiednią ilość mieszaniny aktywacyjnej enzymów wątrobowych lub taką samą ilość roztworu buforowego inkubuje się wstępnie przed dodaniem 2 ml powierzchniowego agaru. Wszystkie inne procedury są takie same, jak w przypadku metody bezpośredniego naniesienia na płytkę.

Wszystkie płytki w przypadku obu metod sporządza się co najmniej w trzech egzemplarzach.

2. DANE

Przedstawia się liczby kolonii rewertantów na płytkę zarówno w przypadku serii kontrolnych, jak i traktowanych substancją. Należy podać liczby kolonii na poszczególnych płytkach, średnią liczbę kolonii rewertantów na płytkę oraz odchylenia standardowe dla badanego związku chemicznego i kontroli.

Dane należy ocenić przy użyciu właściwych metod statystycznych.

Przeprowadza się przynajmniej dwa niezależne doświadczenia. Nie jest konieczne przeprowadzenie drugiego w identyczny sposób do doświadczenia początkowego. Faktycznie bardziej zalecane jest zmienienie pewnych warunków badań w celu uzyskania bardziej użytecznych danych.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**3.1. SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- bakterie, użyte szczepy;
- warunki badania: wielkości dawek, toksyczność, skład podłoża; procedury traktowania (preinkubacji, inkubacji); system aktywacji metabolicznej; substancje odniesienia; kontrole ujemne;
- liczby kolonii na poszczególnych płytkach, średnia liczba kolonii rewertantów na płytkę, odchylenie standardowe, o ile to możliwe – związek między wielkością dawki i efektem;
- omówienie wyników;
- interpretacja wyników.

3.2. OCENA I INTERPRETACJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. LITERATURA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

B.14. MUTAGENNOŚĆ (SALMONELLA TYPHIMURIUM – OZNACZENIE MUTACJI WSTECZNEJ)**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (A).

1.2. DEFINICJA

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (C).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Brak.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

System rewersji histydynowej (his) *Salmonella typhimurium* jest badaniem mikrobiologicznym, który mierzy liczbę rewersji (mutacji powrotnych) his⁻ → his⁺ w wyniku zadziałania związków chemicznych powodujących substytucje zasad lub mutacje przesunięcia fazy odczytu w genomie omawianego organizmu.

Bakterie poddaje się działaniu badanego związku chemicznego z aktywacją metaboliczną i bez, po czym posiewa je na minimalnej pożywce. Po odpowiednim okresie inkubacji liczy się kolonie rewertantów i porównuje z liczbą spontanicznych rewertantów w hodowlach niepoddanych działaniu substancji i/lub kontrolnych hodowlach z rozpuszczalnikiem.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Brak.

1.6. OPIS METODY BADANIA**1.6.1. Przygotowania****1.6.1.1. Bakterie**

Świeże bakterie hoduje się w temperaturze 37 °C do późnej wykładniczej lub wczesnej spoczynkowej fazy wzrostu. Przybliżona gęstość komórek powinna wynosić od 10⁸ do 10⁹ komórek na mililitr.

1.6.1.2. Aktywacja metaboliczna

Bakterie należy poddać ekspozycji na substancję badaną, zarówno w obecności jak i bez odpowiedniego systemu aktywacji metabolicznej. Najbardziej powszechnie używanym systemem jest kofaktor suplementowany frakcją postmitochondrialną przygotowaną z wątroby gryzoni traktowanych środkami indukującymi enzymy.

1.6.2. Warunki badania**1.6.2.1. Badane szczepy**

Należy użyć co najmniej czterech szczepów, TA 1535, TA 1537 lub TA 97, TA 98 i TA 100; inne szczepy, takie jak TA 1538 i TA 102 można użyć dodatkowo. Stosuje się uznane metody przygotowania i przechowywania kultur podstawowych. Należy sprawdzić wymagania wzrostowe i tożsamość genetyczną szczepów, ich wrażliwość na promieniowanie UV i fiolet krystaliczny, jak też oporność na ampicylinę. W szczepach powinny także się pojawiać spontaniczne rewertanty z oczekiwanym zakresem częstotliwości.

1.6.2.2. Pożywki

Wykorzystuje się właściwą pożywkę selektywną z odpowiednią powierzchniową warstwą agaru.

1.6.2.3. Stosowanie dodatnich i ujemnych kontroli

Należy przeprowadzić równoczesne kontrole bez poddawania działaniu substancji i kontrole z rozpuszczalnikiem. Kontrole dodatnie należy zapewnić w dwóch celach:

(i) W celu potwierdzenia wrażliwości szczepów bakteryjnych.

Do badań bez aktywacji metabolicznej można wykorzystać następujące związki:

Szczepy	Rewertanty szczepów z
TA 1535, TA 100	azydek sodu
TA 1538, TA 98, TA 97	2- nitrofluoren
TA 1537	9-aminoakrydyna
TA 102	wodoronadtlenek kumenu

(ii) Aby zapewnić aktywność właściwego układu metabolizującego.

Dodatnią kontrolą aktywności jednego układu metabolizującego dla wszystkich szczepów jest 2-aminoantracen. O ile jest dostępna, można użyć dodatnią kontrolę z tej samej klasy chemicznej, co związek chemiczny poddawany badaniu.

1.6.2.4. Ilość substancji badanej na płytkę

Badaniu poddaje się co najmniej pięć różnych ilości badanego związku chemicznego, z półlogarytmicznymi odstępami pomiędzy płytkami. Substancje bada się do granicy ich rozpuszczalności lub toksyczności. Toksyczność wykazuje się na podstawie zmniejszenia liczby spontanicznych rewertantów, zniknięcia bakterii tła, lub na podstawie stopnia przeżycia potraktowanych substancją kultury. Substancje nietoksyczne należy poddać badaniu do stężenia 5 mg na płytkę, zanim uzna się je za ujemne w tym badaniu.

1.6.2.5. Warunki inkubacji

Płytki inkubuje się przez 48 do 72 godzin w temperaturze 37 °C.

1.6.3. Procedura

W przypadku metody bezpośredniego naniesienia na płytkę bez aktywacji enzymatycznej, związek chemiczny i 0,1 ml świeżej kultury bakteryjnej dodaje się do 2 ml nawarstwiającego agaru. W przypadku badań z aktywacją metaboliczną do wierzchniej warstwy agaru dodaje się 0,5 ml mieszaniny aktywacyjnej enzymów wątrobowych zawierającej odpowiednią ilość frakcji przesączu z nad mitochondriów, po dodaniu badanego związku chemicznego i bakterii. Zawartość każdej probówki miesza się i wylewa na powierzchnię wybiórczej płytki agarowej. Nawarstwiony agar pozostawia się do zestalenia i płytki inkubuje się w temperaturze 37 °C przez czas od 48 do 72 godzin. Pod koniec okresu inkubacji wykonuje się liczenie kolonii rewertantów na płytkę. W przypadku metody inkubacji wstępnej mieszaninę badanego związku chemicznego, 0,1 ml świeżej kultury bakteryjnej i odpowiednią ilość mieszaniny aktywacyjnej enzymów wątrobowych lub taką samą ilość roztworu buforowego inkubuje się wstępnie przed dodaniem 2 ml powierzchniowego agaru. Wszystkie inne procedury są takie same, jak w przypadku metody bezpośredniego naniesienia na płytkę.

Wszystkie płytki w przypadku obu metod sporządza się co najmniej w trzech egzemplarzach.

2. DANE

Przedstawia się liczby koloni rewertantów na płytkę zarówno w przypadku serii kontrolnych, jak i poddanych działaniu substancji.

Należy podać liczby kolonii na poszczególnych płytkach, średnią liczbę kolonii rewertantów na płytkę oraz odchylenia standardowe dla badanego związku chemicznego i kontroli.

Dane należy ocenić przy użyciu właściwych metod statystycznych.

Przeprowadza się przynajmniej dwa niezależne doświadczenia. Nie jest konieczne przeprowadzenie drugiego w identyczny sposób do doświadczenia początkowego. Faktycznie bardziej zalecane jest zmienienie pewnych warunków badań w celu uzyskania bardziej użytecznych danych.

3. **SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

3.1. **SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- bakterie, użyte szczepy;
- warunki badania: wielkości dawki, toksyczność, skład nośnika, procedury traktowania (preinkubacja, inkubacja) systemu aktywacji matabolicznej, substancje odniesienia, kontrole ujemne;
- liczby kolonii na poszczególnych płytkach, średnia liczba kolonii rewertantów na płytkę, odchylenie standardowe, o ile to możliwe – związek między wielkością dawki i efektem,;
- omówienie wyników;
- interpretacja wyników.

3.2. **OCENA I INTERPRETACJA**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (D).

4. **LITERATURA**

Patrz: Wprowadzenie ogólne część B (E).

CZĘŚĆ C: METODY USTALANIA EKOTOKSYCZNOŚCI**C.1. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA DLA RYB****1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Celem niniejszego badania jest ustalenie ostrej toksyczności śmiertelnej substancji dla ryb w wodach słodkich. Pożądane jest posiadanie, w możliwym zakresie, informacji na temat rozpuszczalności w wodzie, ciśnienia pary, stabilności chemicznej, stałych dysocjacji i rozkładu biologicznego substancji badanej, co pomoże w wybraniu najwłaściwszej metody badania (statycznej, półstatycznej lub przepływowej), tak aby zapewnić zadowalające, stałe stężenia substancji badanej w czasie wykonywania badania.

Przy planowaniu i interpretacji wyników badania należy także wziąć pod uwagę dodatkowe informacje (np. wzór strukturalny, stopień czystości, charakter i zawartość procentowa istotnych zanieczyszczeń, obecność i ilość substancji pomocniczych oraz współczynnik podziału n-oktanol/woda).

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Toksyczność ostra to rozpoznawalne działanie niepożądane na organizm w ciągu krótkiego okresu ekspozycji (rzędu dni) na substancję. W niniejszym badaniu toksyczność ostrą wyraża się jako medianę stężenia śmiertelnego (LC_{50}), tj. stężenie w wodzie, które powoduje śmierć 50% badanego stada ryb podczas okresu stałej ekspozycji, który musi zostać podany.

Wszystkie stężenia substancji badanej podano jako waga na objętość (miligramy na litr). Mogą być również wyrażone jako stosunek wagi do wagi (mg/kg).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Substancję odniesienia można zbadać w celu zademonstrowania, że w warunkach laboratoryjnego badania, reakcja badanych gatunków nie zmieniła się znacząco.

Dla niniejszego badania nie wyszczególniono żadnych substancji odniesienia.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Badanie graniczne można przeprowadzić przy 100 mg na litr w celu zademonstrowania że LC_{50} jest większy niż to stężenie.

Ryby są poddawane ekspozycji na substancję badaną dodaną do wody w danym zakresie stężeń na okres 96 godzin. Odnotowuje się liczby zgonów w odstępach co najmniej 24-godzinnych i oblicza się stężenia uśmiercające 50% ryb (LC_{50}) w każdym momencie obserwacji, o ile to możliwe.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Kryteria jakościowe należy odnieść do badania granicznego, jak również do pełnej metody badania.

Śmiertelność w grupach kontrolnych nie może przekraczać 10% (lub jednej ryby, o ile stosuje się mniej niż 10) na koniec badania.

Stężenie rozpuszczonego tlenu musi być wyższe niż 60% wartości nasycenia powietrzem przez cały czas.

Stężenia substancji badanej powinny być utrzymywane do 80% wstępnych stężeń poprzez czas trwania badania.

Dla substancji łatwo rozpuszczalnych w podłożu badanym, roztwory podatne na stabilność, to jest te które nie wykazują żadnego znacznego stopnia ulatniania, rozkładu, hydrolizy lub absorpcji, początkowe stężenie uważane jest za równoważne nominalnemu stężeniu. Należy przedstawić dowody, że utrzymano stężenia poprzez całe badanie i spełniono kryteria jakościowe.

Dla substancji które są:

- (i) słabo rozpuszczalne w podłożu badawczym, lub
- (ii) zdolne do tworzenia stabilnych emulsji lub zawiesin, lub
- (iii) nie stabilne w roztworach wodnych,

początkowe stężenie musi być pobrane jako zmierzone stężenie w roztworze (lub, jeśli to technicznie niemożliwe, zmieszone w słupie wody) na początku badania. Stężenie należy oznaczyć po okresie równowagi, lecz przed wprowadzeniem badanych ryb.

W każdym z tych przypadków, muszą być prowadzone dalsze pomiary w czasie trwania badania dla potwierdzenia rzeczywistych stężeń ekspozycji lub spełnienia kryteriów jakościowych.

pH nie może się zmieniać więcej niż jedną jednostkę.

1.6. OPIS METODY BADANIA

Można zastosować trzy rodzaje procedury:

Badanie statyczne:

Badanie toksyczności, w którym nie zachodzi przepływ badanego roztworu. (Roztwory pozostają bez zmian w trakcie całego badania.)

Badanie półstatyczne:

Badanie bez przepływu roztworu, jednak z regularnymi odnowieniami roztworów badanych z tej samej serii po wydłużonych odstępach czasu (np. co 24 godziny).

Badanie przepływowe:

Badanie toksyczności, w którym wodę stale się odnawia w komorach badawczych, przy czym badany związek chemiczny jest transportowany z wodą wykorzystywaną do odnowy podłoża badawczego.

1.6.1. Odczynniki

1.6.1.1. Roztwory substancji badanych

Przygotowuje się roztwory podstawowe o wymaganej mocy przez rozpuszczenie substancji w wodzie dejonizowanej lub w wodzie przygotowanej według opisu w ppkt. 1.6.1.2.

Wybrane stężenia badane przygotowuje się przez rozcieńczanie roztworu podstawowego. W przypadku badania wysokich stężeń substancję można rozpuścić bezpośrednio w wodzie do rozcieńczania.

Substancje zwykle należy badać tylko do granicy rozpuszczalności. Dla niektórych substancji (na przykład dla substancji posiadających niską rozpuszczalność w wodzie, lub o wyższym P_{ow} lub tych tworzących raczej stabilne zawiesiny niż roztwory rzeczywiste w wodzie), jest dopuszczalne stężenie badania powyżej granicy rozpuszczalności celem zapewnienia, że uzyskano maksymalne stężenie rozpuszczenia/stabilności. Jest ważne jednakże, żeby to stężenie w żaden sposób nie zakłócało systemu badania (np. warstwa substancji na powierzchni wody zapobiegająca utlenianiu wody, itp.).

Stosuje się ultradźwiękowe rozpraszanie, rozpuszczalniki organiczne, emulsyfikatory lub dyspergatory jako środki do przygotowania roztworów podstawowych substancji o niskiej rozpuszczalności lub w celu ułatwienia rozproszenia tych substancji w podłożu badawczym. Jeżeli stosuje się takie substancje pomocnicze, wszystkie badane stężenia muszą zawierać tę samą ilość substancji pomocniczej, oraz dodatkowa grupa kontrolna ryb powinna być poddana ekspozycji przy tym samym stężeniu substancji pomocniczej, które użyto w badanych seriach. Stężenie takich substancji należy zminimalizować, lecz w żadnym przypadku nie może przekraczać 100 mg na litr w podłożu badawczym.

Badanie należy przeprowadzić bez regulacji pH. Jeżeli istnieją oznaki zaznaczonej zmiany pH, doradza się powtórzenie badania z odpowiednim dostosowaniem jego wartości i przedstawienie uzyskanych wtedy wyników. W takim przypadku wartość pH roztworu podstawowego należy doprowadzić do pH wody do rozcieńczenia, chyba że istnieją powody, dla których nie należy tego robić. HCl i NaOH są zalecane w tym celu. Regulację pH należy przeprowadzić w taki sposób, aby nie zmienić w istotnym stopniu stężenia substancji badanej w roztworze podstawowym. W przypadku gdyby zaszła reakcja chemiczna lub doszło do fizycznego wytrącania się osadu badanego związku z powodu ustawiania pH, należy podać ten fakt.

1.6.1.2. *Woda hodowlana i woda do rozcieńczania*

Można zastosować wodę do picia z sieci wodociągowej (niezanieczyszczoną przez chlor, metale ciężkie lub inne substancje w niebezpiecznym stężeniu), dobrej jakości woda zwykła lub woda odtworzona (patrz: woda o całkowitej twardości pomiędzy 10 i 250 mg na litr (jako CaCO_3) i o pH 6,0-8,5 jest zalecana.

1.6.2. **Przyrząd**

Wszystkie elementy przyrządu muszą być wykonane z materiału obojętnego chemicznie.

- automatyczny układ rozcieńczający (do badania przepływowego),
- miernik tlenu,
- wyposażenia do oznaczania twardości wody,
- odpowiednie urządzenia do regulacji temperatury,
- miernik pH.

1.6.3. **Badane ryby**

Ryby powinny być zdrowe i wolne od jakichkolwiek widocznych wad rozwojowych.

Stosowane gatunki należy wybrać na podstawie kryteriów praktycznych, takich jak stała dostępność w ciągu roku, łatwość utrzymania, dogodność badania, względną wrażliwość na substancje chemiczne i wszystkie czynniki ekonomiczne, biologiczne lub środowiskowe mające posiadające jakiekolwiek znaczenie. Przy doborze gatunków ryb musi zrodzić się również przemyślenie potrzeby porównywalności uzyskanych danych do istniejących uznanych danych międzynarodowych (pozycja 1).

Wykaz zalecanych gatunków ryb do przeprowadzenia niniejszego badania podano w dodatku 2; najlepszymi gatunkami są pstrąg tęczowy i danio przegowany.

1.6.3.1. *Hodowla*

Najkorzystniej, aby stosowane w badaniu ryby pochodziły z pojedynczego stada o podobnej długości i wieku. Należy je hodować przez co najmniej 12 dni w następujących warunkach:

napętnienie:

właściwe dla systemu (recyrkulacyjnego lub przepływowego) i gatunku ryb,

woda:

patrz 1.6.1.2,

światło:

12 do 16 godzin naświetlenia dziennie,

stężenie rozpuszczonego tlenu:

co najmniej 80% wartości nasycenia powietrzem,

karmienie:

trzy razy tygodniowo lub codziennie, przerwać 24 godzin przed rozpoczęciem badania.

1.6.3.2. Śmiertelność

Po 48-godzinnym okresie przyzwyczajania odnotowuje się śmiertelność i stosuje następujące kryteria:

— większa niż 10% populacji w ciągu siedmiu dni:

odrzuć całe stado,

— pomiędzy 5 i 10% populacji:

okres hodowli kontynuuje się przez następnych siedem dni. Jeżeli nie stwierdzi się dodatkowych zgonów, stado można zaakceptować; w przeciwnym razie należy je odrzucić,

— poniżej 5% populacji:

stado można zaakceptować.

1.6.4. Adaptacja

Wszystkie ryby muszą pozostawać w kontakcie z wodą o jakości i temperaturze odpowiadającej wodzie wykorzystywanej w badaniu przez co najmniej siedem dni przed ich zastosowaniem.

1.6.5. Procedura badania

Badanie ostateczne można poprzedzić przeprowadzeniem badania służącego wyznaczeniu zakresu stężeń, aby uzyskać informacje na temat zakresu stężeń, który zostanie wykorzystany w zasadniczym badaniu.

Dodatkowo do badanych serii przeprowadza się również badanie jednej grupy kontrolnej bez badanej substancji i jeśli stosowne, jednej grupy kontrolnej dla substancji pomocniczej.

Zależnie od właściwości fizycznych i chemicznych badanego związku należy wybrać badanie statyczne, półstatyczne lub przepływowe, tak aby zapewnić spełnienie kryteriów jakościowych.

Ryby poddaje się ekspozycji na substancję w sposób opisany poniżej:

— czas trwania: 96 godzin

— liczba zwierząt: co najmniej 7 na stężenie,

— zbiorniki: o odpowiedniej pojemności w relacji do zalecanego napełnienia,

— napełnienie: zaleca się maksymalne napełnienie 1 g na litr w przypadku badań statycznych i półstatycznych; w przypadku systemów przepływowych można zaakceptować większe napełnienie,

— stężenie badania: co najmniej pięć stężeń różniących się stałym czynnikiem nieprzekraczającym 2,2 i tak dalece jak to możliwe, rozpiętości zakresu śmiertelności od 0 do 100%,

— woda: patrz 1.6.1.2,

— oświetlenie: 12 do 16 godzin dziennie,

— temperatura: właściwa dla gatunków (dodatek 2), jednak utrzymana w granicach ± 1 °C w przypadku każdego z badań,

— stężenie rozpuszczonego tlenu: nie mniej niż 60% wartości nasycenia powietrzem w wybranej temperaturze,

— karmienie: żadne.

Ryby kontroluje się po upływie pierwszych 2 do 4 godzin, a następnie w odstępach co najmniej 24-godzinnych. Uważa się je za martwe, gdy dotknięcie nasady ogona nie prowadzi do reakcji i nie widać ruchów oddechowych. Martwe ryby usuwa się podczas obserwacji i odnotowuje liczbę zgonów.

Dokumentuje się wszelkie widoczne nieprawidłowości (np. utratę równowagi, zmiany zachowania podczas pływania, zmiany czynności oddechowej, pigmentacji itp.).

Należy wykonywać codzienne pomiary pH, rozpuszczonego tlenu i temperatury.

Badanie graniczne

Stosując procedury opisane w niniejszej metodzie badania, przeprowadza się badanie graniczne przy stężeniu 100 mg na litr w celu pokazania że LC_{50} jest większy niż dla danego stężenia.

Jeżeli natura badanej substancji jest taka, że nie można uzyskać stężenia 100 mg na litr w wodzie, badanie graniczne należy przeprowadzić w stężeniu równym rozpuszczalności substancji (lub w maksymalnym stężeniu tworzącym stabilną zawiesinę) w użytym podłożu (patrz także ppkt. 1.6.1.1.).

Badanie graniczne należy przeprowadzić stosując 7 do 10 ryb, wraz z tą samą liczbą w kontroli(-ach). Teoria rozkładu dwumianowego pokazuje, że gdy stosuje się 10 ryb o śmiertelności równej zero, to jest 99,9% pewności, że LC_{50} jest większy niż stężenie użyte w badaniu granicznym. Dla 7, 8 lub 9 ryb, brak śmiertelności daje co najmniej 99% pewności, że LC_{50} jest większy niż użyte stężenie.

Jeżeli występuje śmiertelność, należy przeprowadzić pełne badanie. Jeżeli obserwowane są działania subletalne, powinny być zapisywane.

2. DANE I OCENA

Dla każdego okresu czasu, gdzie zapisywano obserwacje (24, 48, 72 i 96 godzin), należy wykreślić procent śmiertelności dla każdego zalecanego okresu czasu ekspozycji w stosunku do stężenia na papierze logarytm- prawdopodobieństwo.

Jeżeli to możliwe, dla każdego czasu obserwacji, należy oszacować LC_{50} i granice ufności ($p = 0,05$) stosując standardowe procedury; wartości te należy zaokrąglić do jedności, lub najwyżej do dwóch znaczących cyfr (przykłady zaokrąglania: 170 dla 173,5; 0,13 dla 0,127; 1,2 dla 1,21).

W przypadkach gdy kąt nachylenia krzywej zależności stężenia od odpowiedzi procentowej jest zbyt stromy, aby było możliwe obliczenie LC_{50} , wystarczy graficzna ocena szacunkowa tej wartości.

W przypadku gdy kolejne dwa stężenia w stosunku 2,2 dają jedynie umieralność 0 i 100%, wystarczają one do wskazania zakresu, w którym znajduje się LC_{50} .

W razie zaobserwowania, że nie da się utrzymać stabilności lub jednorodności substancji badanej, należy to zgłosić i wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- informacje na temat użytych do badania ryb (nazwa naukowa, szczep, dostawca, wszelkie wcześniejsze kontakty z innymi substancjami, rozmiary i liczba wykorzystana w przypadku każdego badanego stężenia);
- źródło wody do rozcieńczenia i jej najważniejsze parametry chemiczne (pH, twardość, temperatura);
- w przypadku substancji o niskiej rozpuszczalności w wodzie, metoda przygotowania roztworu podstawowego i badanego;
- stężenie wszelkich substancji pomocniczych;

- wykaz zastosowanych stężeń i wszelkie dostępne informacje na temat stabilności w danych stężeniach badanego związku chemicznego w roztworze badanym;
- jeśli przeprowadzono analizy chemiczne, zastosowane metody i uzyskane wyniki;
- wyniki badania granicznego, jeśli przeprowadzono;
- uzasadnienie wyboru i szczegółowe dane na temat zastosowanej procedury badania (np. badanie statyczne, półstatyczne, szybkość dawkowania, szybkość przepływu, czy stosowano napowietrzanie, napełnienie rybami itp.);
- opis urządzeń;
- reżim oświetlenia;
- stężenia rozpuszczonego tlenu, wartości pH i temperatury roztworów badanych co 24 godziny;
- dowody spełnienia kryteriów jakościowych;
- tabelę pokazującą śmiertelność skumulowaną przy każdym stężeniu i dla roztworów kontrolnych (oraz kontrolnych z substancją pomocniczą, jeśli wymagane) przy każdym z zalecanych czasów obserwacji;
- wykres zależności stężenia od odpowiedzi procentowej pod koniec badania;
- jeżeli możliwe, wartości LC_{50} w każdym z zalecanych czasów obserwacji (o granicach ufności 95%);
- procedury statystyczne wykorzystywane do ustalania wartości LC_{50} ;
- uzyskane wyniki jeżeli zastosowano substancje odniesienia;
- najwyższe stężenie badane niepowodujące zgonów w czasie trwania badania;
- najniższe stężenie badane powodujące 100% zgonów w czasie trwania badania.

4. LITERATURA

- (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

Woda po regeneracji

Przykład właściwej wody rozcieńczającej

Wszystkie związki chemiczne muszą być czystości analitycznej.

Woda powinna być wodą destylowaną dobrej jakości, lub wodą dejonizowaną o przewodnictwie elektrycznym poniżej 5 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$.

Przyrząd do destylacji wody nie może zawierać jakichkolwiek części miedzianych.

Roztwory podstawowe

CaCl ₂ · 2H ₂ O (diwodny chlorek wapnia):	11,76 g
Rozpuścić, dopełnić wodą do jednego litra.	
MgSO ₄ · 7H ₂ O (heptawodny siarczan magnezu):	4,93 g
Rozpuścić, dopełnić wodą do jednego litra.	
NaHCO ₃ (wodorowęglan sodu):	2,59 g
Rozpuścić, dopełnić wodą do jednego litra.	
KCl (chlorek potasu):	0,23 g
Rozpuścić, dopełnić wodą do jednego litra.	

Regenerowana woda do rozcieńczania

Zmieszać po 25 ml każdego z czterech roztworów podstawowych i uzupełnić wodą do 1 litra.

Napowietrzać, aż stężenie rozpuszczonego tlenu osiągnie wartość nasycenia powietrzem.

Wartość pH powinna wynosić 7,8 ± 0,2.

W razie potrzeby należy wyregulować pH przy użyciu NaOH (wodorotlenku sodowego) lub HCl (kwasu solnego).

Tak przygotowaną wodę do rozcieńczania odstawia się na około 12 godzin, przy czym nie należy jej dalej napowietrzać.

Suma zawartości jonów Ca i Mg w tym roztworze wynosi 2,5 mmola na litr. Stosunek jonów Ca:Mg wynosi 4:1 i jonów Na:K wynosi 10:1. Całkowita zasadowość niniejszego roztworu jest 8 mmol na litr.

Wszelkie odchylenia w przygotowaniu wody do rozcieńczania nie mogą zmieniać jej składu ani właściwości.

Dodatek 2

Gatunki ryb zalecane do przeprowadzania badań

Zalecane gatunki	Zalecany zakres temperatur (° C)	Zalecana całkowita długość badanych zwierząt (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio pręgowany	20 do 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	20 do 24	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Karp zwykły	20 do 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schiegel 1850) Ryżówka	20 do 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Gupik	20 do 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Okoń błękitnoskrzeli	20 do 24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Pstrąg tęczowy	12 do 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Jaż	20 do 24	6,0 ± 2,0

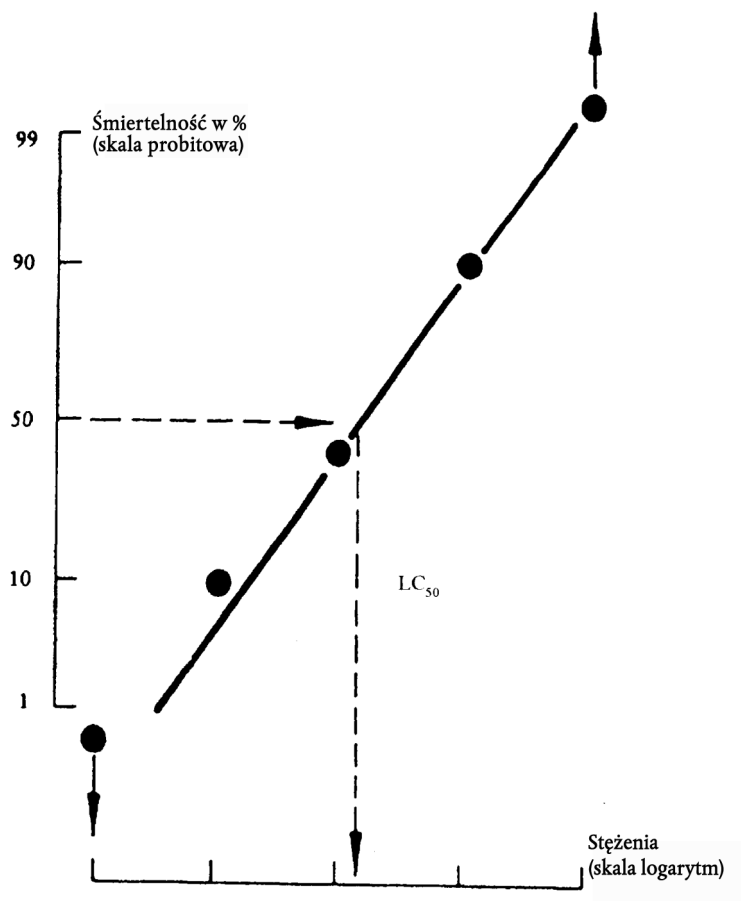
Zbiór

Wymienione poniżej ryby są łatwe w hodowli i szeroko dostępne w ciągu całego roku. Nadają się one do hodowli i rozmnażania albo w gospodarstwach rybnych, albo w laboratoriach, w warunkach chroniących je od chorób i pasożytów. Ryby te dostępne są w wielu miejscach na świecie.

Dodatek 3

Przykład stężenia: procent śmiertelności

Przykład oznaczenia LC_{50} z użyciem papieru log-probit (logarytm-prawdopodobieństwo)



C.2. TOKSYCZNOŚĆ OSTRA DLA ROZWIELITKI

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Celem niniejszego badania jest oznaczenie mediany skutecznego stężenia immobilizacji (unieruchomienia) (EC_{50}) substancji w odniesieniu do rozwielitek w wodzie słodkiej. Przed przystąpieniem do badania pożądane jest posiadanie, w możliwym zakresie, informacji na temat rozpuszczalności w wodzie, ciśnienia pary, stabilności chemicznej, stałych dysocjacji i rozkładu biologicznego substancji badanej.

Przy planowaniu i interpretacji wyników badania należy także wziąć pod uwagę dodatkowe informacje (np. wzór strukturalny, stopień czystości, charakter i zawartość procentowa istotnych zanieczyszczeń, obecność i ilość substancji pomocniczych oraz współczynnik podziału n-oktanol/woda).

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Uważa się, że oznaczenie EC_{50} w sposób podany w opisie niniejszej metody badania spełnia wymagania dyrektywy dotyczące LC_{50} u rozwielitek.

W tym badaniu toksyczność ostrą wyraża się jako medianę stężenia skutecznego (EC_{50}) wywołującego immobilizację. Jest to stężenie, w warunkach wartości początkowych, które immobilizuje 50% rozwielitek w badanej kąpieli w obrębie stałego okresu ekspozycji, który musi być ustalony.

Immobilizacja:

Te zwierzęta, które nie są w stanie pływać przez 15 sekund po łagodnym potrząśnięciu zbiornika badawczego są uznane za unieruchomione.

Wszystkie stężenia substancji badanej są podane wagowo do objętości (miligramy na litr). Mogą być również wyrażone jako waga do wagi (mg/kg^{-1}).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Można przeprowadzić badanie substancji odniesienia w celu wykazania, że reakcja badanych gatunków nie ulega istotnej zmianie w laboratoryjnych warunkach badania.

Podsumowanie wyników EWG próby pierścieniowej, stosującej różne substancje, podano w dodatku 2.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Można przeprowadzić badanie graniczne przy 100 mg na litr w celu zademonstrowania, że EC_{50} jest większe od stężenia.

Rozwielitki są ekspozowane na substancje badane dodane do wody w danym zakresie stężeń przez 48 godzin. Jeżeli stosowane jest krótsze badanie, należy podać w sprawozdaniu z badań uzasadnienie.

W identycznych pod innymi względami warunkach badania oraz w odpowiednim zakresie stężeń substancji badanej odmienne stężenia takiej substancji wywierają różnego stopnia wpływ na zdolność rozwielitek do pływania. Odmienne stężenia powodują, że różne odsetki rozwielitek mogą nie być już w stanie pływać pod koniec badania. Stężenia powodujące zerową lub 100% immobilizację są wyprowadzane bezpośrednio z obserwacji badania, przy którym oznacza się 48-godzinne EC_{50} metodą obliczeń, o ile to możliwe.

W przypadku tej metody używa się układu statycznego, gdyż badane roztwory nie są wymieniane podczas okresu ekspozycji.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Kryteria jakościowe należy stosować do badania granicznego jak również do pełnej metody badania.

Wskaźnik immobilizacji w grupie kontrolnej nie może przekraczać 10% pod koniec badania.

Badane rozwielitki w grupach kontrolnych nie mogą być wylapywane z powierzchni roztworu.

Pożądane jest by stężenie rozpuszczonego tlenu w naczyniach badawczych pozostawało ponad 3 mg/litr w trakcie całego przebiegu badania. Jednakże bezwarunkowo, stężenie rozpuszczonego tlenu nie może spaść poniżej 2 mg/litr.

Stężenie substancji badanej należy utrzymywać w obrębie 80% stężenia początkowego poprzez cały czas trwania badania.

Dla substancji łatwo rozpuszczalnych w podłożu badawczym, dających stabilne roztwory, to jest takie, które żadnych istotnych zmian obejmujących ulatnianie się, rozkład, hydrolizę lub absorpcję, stężenie początkowe można przyjąć za równoważne stężeniu nominalnym. Należy udowodnić, że utrzymywano stężenia przez cały okres przebiegu badania i spełniono kryteria jakościowe.

Dla substancji, które są:

- (i) słabo rozpuszczalne w podłożu badawczym, lub
- (ii) zdolne do tworzenia stabilnych emulsji lub zawiesin, lub
- (iii) nie stabilne w roztworach wodnych,

początkowe stężenie musi być pobrane jako zmierzone stężenie w roztworze (lub, jeśli to technicznie niemożliwe, zmieszone w słupie wody) na początku badania. Stężenie należy oznaczyć po okresie równowagi, lecz przed wprowadzeniem badanych ryb.

W każdym z tych przypadków, muszą być prowadzone dalsze pomiary w czasie trwania badania dla potwierdzenia rzeczywistych stężeń ekspozycji lub spełnienia kryteriów jakościowych.

pH nie może się zmieniać więcej niż jedną jednostkę.

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. Odczynniki

1.6.1.1. *Roztwory substancji badanych*

Przygotowuje się roztwory podstawowe o wymaganej mocy przez rozpuszczenie substancji w wodzie dejonizowanej lub w wodzie przygotowanej według opisu w ppkt 1.6.1.2.

Wybrane stężenia badane przygotowuje się przez rozcieńczanie roztworu podstawowego. W przypadku badania wysokich stężeń substancję można rozpuścić bezpośrednio w wodzie do rozcieńczania.

Substancje zwykle należy badać tylko do granicy rozpuszczalności. Dla niektórych substancji (na przykład dla substancji posiadających niską rozpuszczalność w wodzie, lub o wyższym P_{ow} lub tych tworzących raczej stabilne zawiesiny niż roztwory rzeczywiste w wodzie), jest dopuszczalne stężenie badania powyżej granicy rozpuszczalności celem zapewnienia, że uzyskano maksymalne stężenie rozpuszczenia/stabilności. Jest ważne jednakże, żeby to stężenie w żaden sposób nie zakłócało systemu badania (np. warstwa substancji na powierzchni wody zapobiegająca utlenianiu wody, itp.).

Stosuje się ultradźwiękowe rozpraszanie, rozpuszczalniki organiczne, emulsyfikatory lub dyspergatory jako środki do przygotowania roztworów podstawowych substancji o niskiej rozpuszczalności lub w celu ułatwienia rozproszenia tych substancji w podłożu badawczym. Jeżeli stosuje się takie substancje pomocnicze, wszystkie badane stężenia muszą zawierać tę samą ilość substancji pomocniczej, oraz dodatkowa grupa kontrolna ryb powinna być poddana ekspozycji przy tym samym stężeniu substancji pomocniczej, które użyto w badanych seriach. Stężenie takich substancji należy zminimalizować, lecz w żadnym przypadku nie może przekraczać 100 mg na litr w podłożu badawczym.

Badanie należy przeprowadzić bez regulacji pH. Jeżeli istnieją oznaki zaznaczonej zmiany pH, doradza się powtórzenie badania z odpowiednim dostosowaniem jego wartości i przedstawienie uzyskanych wtedy wyników. W takim przypadku wartość pH roztworu podstawowego należy doprowadzić do pH wody do rozcieńczenia, chyba że istnieją powody, z których nie należy tego robić. Zalecane są w tym celu HCl i NaOH. Regulację pH należy przeprowadzić w taki sposób, aby nie zmienić w istotnym stopniu stężenia substancji badanej w roztworze podstawowym. W przypadku gdyby zaszła reakcja chemiczna lub doszło do fizycznego wytrącania się osadu badanego związku z powodu ustawiania pH, należy podać ten fakt.

1.6.1.2. *Woda badana*

W niniejszym badaniu zalecana jest regenerowana woda (patrz dodatek 1 i pozycja 2): ISO 6341). W celu zapobieżenia konieczności aklimatyzacji przed badaniem, zalecane jest by kultura wodna była podobnej jakości (pH, twardość) jak woda użyta w badaniu.

1.6.2. **Przyrząd**

Należy stosować zwykłe przyrządy i sprzęt laboratoryjny. Najkorzystniej byłoby, gdyby urządzenia wchodzące w kontakt z roztworami badanymi były wykonane całkowicie ze szkła:

- miernik tlenu (z mikroelektrodą lub innymi, odpowiednimi urządzeniami do pomiarów stężenia tlenu rozpuszczonego w małych próbkach),
- odpowiednie urządzenia do regulacji temperatury,
- pH metr,
- wyposażenie do oznaczenia twardości wody.

1.6.3. **Badane organizmy**

Zalecanym gatunkiem jest rozwielitka magna, chociaż również dozwolona jest także rozwielitka pulex. Zwierzęta badane powinny być w wieku niższym od 24 godzin na początku badania, hodowane laboratoryjnie, wolne od widocznych chorób, o znanej historii (np. hodowla – wszystkie pierwotne zabiegi itp.).

1.6.4. **Procedura badania**

Badanie ostateczne można poprzedzić przeprowadzeniem badania służącego wyznaczeniu zakresu stężeń, aby uzyskać informacje na temat zakresu stężeń, który zostanie wykorzystany w zasadniczym badaniu.

Do serii badań włącza się dodatkowo jedną grupę kontrolną bez badanej substancji, a także jedną grupę kontrolną zawierającą substancje pomocniczą.

Rozwielitki poddaje się ekspozycji na substancję w następujących warunkach:

- *czas trwania*: najkorzystniej 48 godzin,
- *liczba zwierząt*: co najmniej po 20 zwierząt na każde stężenie badane, najkorzystniej podzielone na cztery stada po pięć zwierząt lub dwa stada po 10 z nich,
- *napełnienie*: należy przewidzieć co najmniej 2 ml roztworów badanych na każde zwierzę,
- *stężenie badania*: roztwór badany należy sporządzić bezpośrednio przed wprowadzeniem rozwielitek, najlepiej bez dodawania jakiegokolwiek innego rozpuszczalnika niż woda. Stężenia przygotowywane są w szeregu geometrycznym o stosunku stężeń nieprzekraczającym 2,2. Badaniu należy poddać, wraz z grupami kontrolnymi, stężenia wystarczające do dania immobilizacji 0 i 100% po 48 godzinach i zakresach średnich immobilizacji pozwalającymi na obliczenie 48 godzinnego EC_{50} ,
- *woda*: patrz 1.6.1.2,
- *oświetlenie*: cykl światło-ciemność jest dowolny,
- *temperatura*: temperatura przeprowadzania badania powinna zamykać się w granicach od 18 do 22 °C, jednak w przypadku każdego pojedynczego badania powinna być utrzymywana na stałym poziomie, w granicach wahania ± 1 °C,

- *napowietrzenie*: roztwory badane nie mogą być napowietrzane z wytwarzaniem pęcherzyków powietrza,
- *karmienie*: żadne.

Pod koniec badania należy zmierzyć pH i stężenie tlenu w kontrolach i we wszystkich roztworach badanych; pH roztworów badanych nie powinno być modyfikowane.

Związki lotne należy badać w całkowicie napełnionych, zamkniętych pojemnikach, na tyle dużych, aby zapobiec brakowi tlenu.

rozwiłtiki są kontrolowane co najmniej po 24 godzinach ekspozycji i ponownie po 48 godz.

Badanie graniczne

Stosując procedury opisane w niniejszej metodzie badania, przeprowadza się badanie graniczne przy stężeniu 100 mg na litr w celu pokazania, że LC_{50} jest większy niż dla danego stężenia.

Jeżeli natura badanej substancji jest taka, że nie można uzyskać stężenia 100 mg na litr w wodzie, badanie graniczne należy przeprowadzić w stężeniu równym rozpuszczalności substancji (lub w maksymalnym stężeniu tworzącym stabilną zawiesinę) w użytym podłożu (patrz także pkt 1.6.1.1.).

Badanie graniczne należy przeprowadzić stosując 20 rozwiłtek, podzielonych na dwie lub cztery partie, wraz z tą samą liczbą w kontroli(-ach). Jeżeli zachodzi immobilizacja, należy wykonać pełne badania.

2. DANE I OCENA

Dla każdego okresu czasu, gdzie zapisywano obserwacje (24 i 48 godzin), należy wykreślić procent śmiertelności w stosunku do stężenia na papierze logarytm- prawdopodobieństwo.

Gdy to możliwe, dla każdego czasu obserwacji, należy oszacować EC_{50} i granice ufności ($p = 0,05$) stosując standartowe procedury; wartości te należy zaokrąglić do jedności, lub najwyżej do dwóch znaczących cyfr (przykłady zaokrąglania: 170 dla 173,5; 0,13 dla 0,127; 1,2 dla 1,21).

W przypadkach gdy kąt nachylenia krzywej zależności stężenia od odpowiedzi procentowej jest zbyt stromy, aby było możliwe obliczenie EC_{50} , wystarczy graficzna ocena szacunkowa tej wartości.

W przypadku gdy kolejne dwa stężenia w stosunku 2,2 dają jedynie immobilizację wynoszącą 0 i 100%, wystarczają one do wskazania zakresu, w którym znajduje się EC_{50} .

Jeżeli zaobserwowano, że nie można utrzymać stabilności lub jednorodności substancji badanej, należy to przedstawić w sprawozdaniu i zachować ostrożność w interpretacji wyników.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- informacje na temat badanego organizmu (nazwa naukowa, szczep, dostawca lub źródło, wszelkie wcześniejsze kontakty z innymi substancjami, metoda hodowli, włącznie ze źródłem, rodzajem i ilością karmy, częstotliwość karmienia);
- źródło wody rozcieńczającej i główne charakterystyki chemiczne (to jest pH, temperatura, twardość);
- w przypadku substancji o niskiej rozpuszczalności w wodzie, metodę przygotowania roztworu podstawowego i badanego;
- stężenie wszelkich substancji pomocniczych;
- wykaz zastosowanych stężeń i wszelkie dostępne informacje na temat stabilności w danych stężeniach badanego związku chemicznego w roztworze badanym;

- jeśli przeprowadzano analizy chemiczne, metody użyte i uzyskane wyniki;
- wyniki badania granicznego, o ile prowadzono;
- opis urządzeń badawczych;
- reżim oświetlenia;
- stężenia rozpuszczonego tlenu, wartości pH i temperatury roztworów badanych;
- dowody spełnienia kryteriów jakościowych;
- tabelę pokazującą immobilizację skumulowaną przy każdym stężeniu i dla roztworów kontrolnych (oraz kontrolnych z substancją pomocniczą, jeśli wymagane) przy każdym z zalecanych czasów obserwacji (24 i 48 godzin);
- wykres zależności stężenia od odpowiedzi procentowej pod koniec badania;
- jeśli możliwe wartości EC_{50} w każdym z zalecanych okresów obserwacji (z granicami ufności 95%);
- procedury statystyczne wykorzystywane do ustalania wartości EC_{50} ;
- jeśli stosowano substancję odniesienia, uzyskane wyniki;
- najwyższe badane stężenie niepowodujące immobilizacji w okresie badania;
- najniższe zbadane stężenie powodujące 100% immobilizacji w okresie badania.

4. LITERATURA

- (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

Regenerowana woda

Przykład odpowiedniej wody rozcieńczającej (zgodnie z ISO 6341)

Wszystkie substancje chemiczne muszą być czystości analitycznej.

Woda powinna być dobrej jakości wodą destylowaną lub wodą dejonizowaną o przewodności niższej od 5 $\mu S cm^{-1}$.

Przyrząd do destylacji wody nie może zawierać żadnych części wykonanych z miedzi.

Roztwory podstawowe

CaCl ₂ · 2 H ₂ O (diwodny chlorek wapnia):	11,76 g
rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą	
MgSO ₄ · 7H ₂ O (heptawodny siarczan magnezu):	4,93 g
rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą	
NaHCO ₃ (wodorowęglan sodu):	2,59 g
rozpuścić, i dopełnić do 1 litra wodą	
KCl (chlorek potasu):	0,23 g
rozpuścić i dopełnić do 1 litra wodą	

Odtworzona woda do rozcieńczania

Zmieszać po 25 ml każdego z czterech roztworów podstawowych i uzupełnić wodą do 1 litra.

Napowietrzać, aż stężenie rozpuszczonego tlenu osiągnie wartość nasycenia powietrzem.

pH powinno wynosić $7,8 \pm 0,2$.

W razie potrzeby należy wyregulować pH przy użyciu NaOH (wodorotlenku sodowego) lub HCl (kwasu solnego).

Tak przygotowaną wodę do rozcieńczania odstawia się na około 12 godzin, przy czym nie należy jej dalej napowietrzać.

Suma zawartości jonów Ca i Mg w tym roztworze wynosi 2,5 mmola na litr. Stosunek jonów Ca:Mg wynosi 4:1 oraz jonów Na:K wynosi 10:1. Całkowita zasadowość niniejszego roztworu wynosi 0,8 mmola na litr.

Wszelkie odchylenia w przygotowaniu wody do rozcieńczania nie mogą zmieniać jej składu ani właściwości.

Dodatek 2

Podsumowanie wyników EWG próby pierścieniowej przeprowadzone w 1978 r. (także cytowane w pozycji 2)

Uwaga: celem niniejszej próby pierścieniowej było oznaczenie EC₅₀ 24 godzinne.

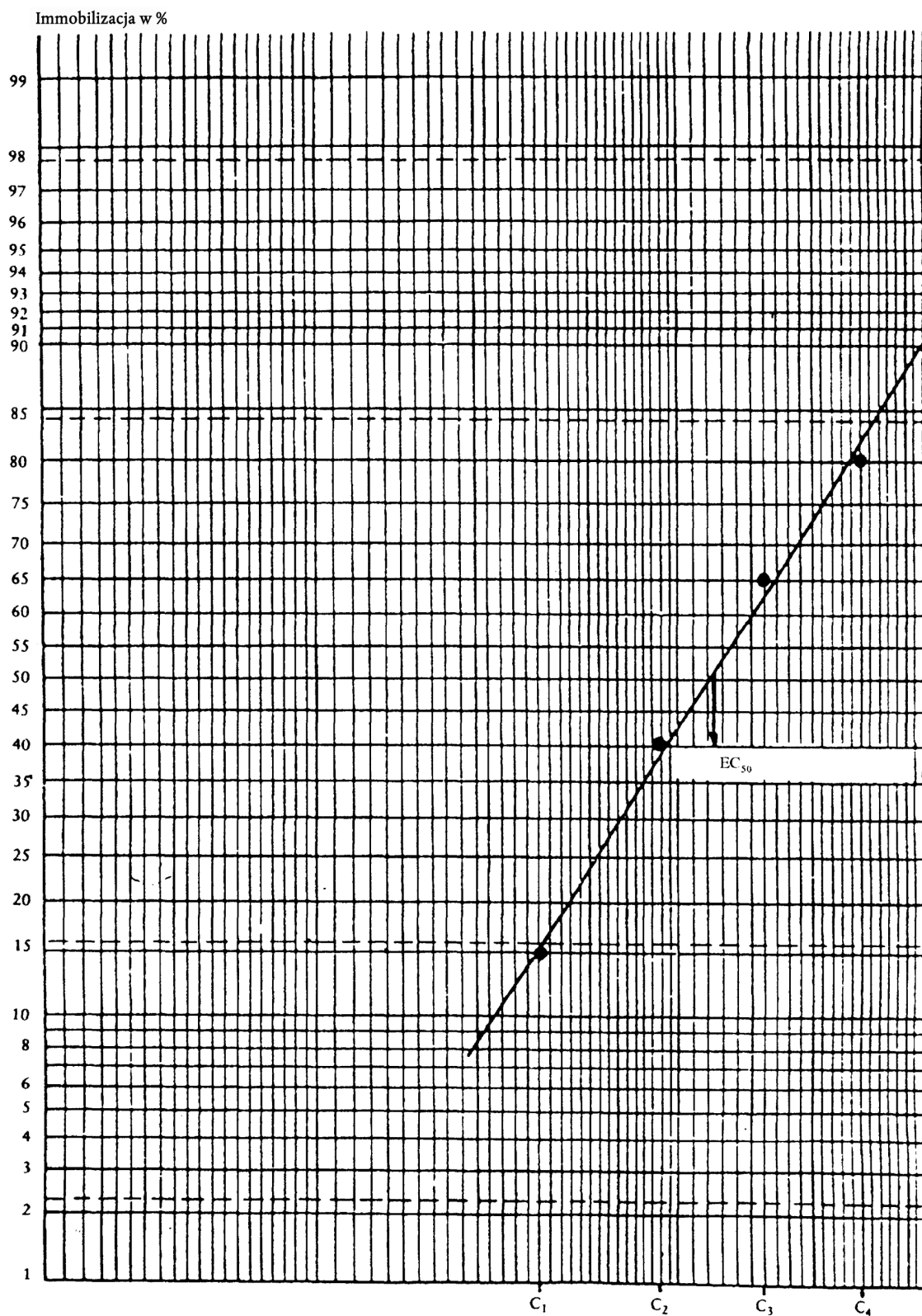
Użyte substancje:

- 1) dichromian potasu
- 2) kwas tetrapropylobenzenosulfonowy
- 3) kwas tetrapropylobenzenosulfonowy, sól sodu
- 4) kwas trichloro-2,4,5-fenoksyoctowy, sól potasu

Substancja	Liczba uczestniczących laboratoriów	Ilość wyników na obliczenie	Średnie EC ₅₀ -24 godziny mg/l
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

Dodatek 3

Przykład stężenia: procent immobilizacji

Przykład oznaczenia EC_{50} przy użyciu papieru log-probitowego

C.3. BADANIE INHIBICJI GLONÓW

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Celem niniejszego badania jest oznaczenie wpływu substancji na wzrost gatunków jednokomórkowych glonów zielonych. Względnie szybkie (72 godziny) badania mogą oszacować wpływy na niektóre generacje. Niniejsza metoda może być zaadoptowana do użycia niektórych gatunków jednokomórkowych glonów, w przypadku których opis zastosowanej metody musi być przedstawiony w raporcie z badań.

Niniejsza metoda jest łatwo stosowana do substancji rozpuszczalnych w wodzie, które zgodnie z warunkami badania, prawdopodobnie pozostaną w wodzie.

Metodę należy stosować dla substancji które nie powodują bezpośredniego zakłócenia pomiaru wzrostu glonów.

Przed przystąpieniem do badania pożądane jest posiadanie, w możliwym zakresie, informacji na temat rozpuszczalności w wodzie, ciśnienia pary, stabilności chemicznej, stałych dysocjacji i rozkładu biologicznego substancji badanej.

Przy planowaniu i interpretacji wyników badania należy także wziąć pod uwagę dodatkowe informacje (np. wzór strukturalny, stopień czystości, charakter i zawartość procentowa istotnych zanieczyszczeń, obecność i ilość substancji pomocniczych oraz współczynnik podziału n-oktanol/woda).

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Gęstość komórek: liczba komórek na mililitr;

Wzrost: wzrost gęstości komórek w okresie czasu badania;

Szybkość wzrostu: wzrost gęstości komórek na jednostkę czasu;

EC_{50} : w niniejszej metodzie, stężenie substancji badanej, które daje 50% zmniejszenie albo wzrostu ($E_b C_{50}$) albo szybkości wzrostu ($E_r C_{50}$) względem kontroli;

NOEC (nieobserwowany wpływ stężenia): w niniejszej metodzie, najwyższe badane stężenie przy którym nie obserwuje się znaczącej inhibicji wzrostu względem kontroli.

Wszystkie stężenia substancji badanej podano w wadze na objętość (miligramy na litr). Mogą być także wyrażone w wadze do wagi (mg/kg).

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Można przeprowadzić badanie substancji odniesienia w celu wykazania, że reakcja badanych gatunków nie uległa istotnej zmianie w laboratoryjnych warunkach badania.

Jeżeli zastosowano substancję odniesienia, wyniki należy podać w sprawozdaniu z badania. Potasu dichromian może być użyty jako substancja odniesienia, lecz jego kolor wpływa na jakość oświetlenia i dopuszczalną intensywność dla komórek, a także na ewentualne oznaczenia spektrofotometryczne. Dichromian potasu stosowano w badaniu międzylaboratoryjnym (patrz poz.lit. (3) i dodatek 2).

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Badanie graniczne przeprowadzane jest przy 100 mg na litr w celu zademonstrowania że EC_{50} jest większe od stężenia.

Wykładniczo wzrastające kultury wybranych zielonych glonów są poddawane ekspozycji przy różnych stężeniach badanej substancji przez kilka generacji w pokreślonych warunkach.

Badane roztwory są inkubowane przez okres 72 godziny, w trakcie którego gęstość komórek w każdym z roztworów jest mierzona, co najmniej co 24 godziny. Oznacza się inhibicję wzrostu w odniesieniu do kultury kontrolnej.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Do badania granicznego, jak również do pełnej metody badania należy zastosować kryteria jakościowe.

Gęstość komórek w kulturach kontrolnych musi wzrosnąć o współczynnik co najmniej 16 w ciągu okresu trzech dni.

Stężenia substancji badanej należy utrzymywać w obrębie 80% stężeń początkowych poprzez czas odpowiadający czasowi trwania badania.

Dla substancji łatwo rozpuszczalnych w podłożu badanym, roztwory podatne na stabilność, to jest te które nie wykazują żadnego znacznego stopnia ulatniania, rozkładu, hydrolizy lub absorpcji, początkowe stężenie uważane jest za równoważne nominalnemu stężeniu. Należy przedstawić dowody, że utrzymano stężenia poprzez całe badanie i spełniono kryteria jakościowe.

Dla substancji które są:

- (i) słabo rozpuszczalne w podłożu badawczym, lub
- (ii) zdolne do tworzenia stabilnych emulsji lub zawiesin, lub
- (iii) niestabilne w roztworach wodnych,

początkowe stężenie musi być pobrane jako zmierzone stężenie w roztworze na początku badania. Stężenie należy oznaczyć po okresie równowagi.

Znany jest fakt, że znaczne ilości badanej substancji są włączane w biomasę glonów w czasie trwania okresu badania.

Zatem w celu zademonstrowania zgodności z powyższymi kryteriami jakości, zarówno ilość substancji badanej włączonej do biomasy glonów jak i substancji w roztworze (lub jeśli to niemożliwe ze względów technicznych, zmierzone w słupie wody) muszą być wzięte pod uwagę. Jednakże jeśli oznaczenie stężenia substancji w biomasie glonów napotyka na poważne trudności techniczne, odpowiedniość z kryteriami jakościowymi, można przedstawić poprzez włączenie do procesu zbiornika badawczego z najwyższym stężeniem substancji, lecz bez glonów i pomiary stężeń w roztworze (lub, jeśli niemożliwe to technicznie, w słupie wody) na początku i na końcu okresu czasu badania.

1.6. OPIS PROCEDURY BADANIA

1.6.1. Odczynniki

1.6.1.1. *Roztwory substancji badanych*

Przygotowuje się roztwory podstawowe o wymaganym stężeniu przez rozpuszczenie substancji w wodzie dejonizowanej lub w wodzie przygotowanej według opisu w 1.6.1.2.

Wybrane stężenia badane są przygotowywane przez dodawanie odpowiednich podwielokrotności do prekultur glonów (patrz dodatek 1). Substancje zwykle należy badać tylko do granicy rozpuszczalności. Dla niektórych substancji (na przykład dla substancji posiadających niską rozpuszczalność w wodzie, lub o wysokim P_{0w} lub tych tworzących raczej stabilne zawiesiny niż roztwory rzeczywiste w wodzie), jest dopuszczalne stężenie badania powyżej granicy rozpuszczalności celem zapewnienia że uzyskano maksymalne stężenie rozpuszczenia/stabilności. Jest ważne jednakże, żeby to stężenie w żaden sposób nie zakłócało systemu badania (np. warstwa substancji na powierzchni wody zapobiegająca utlenianiu wody, itp.).

Stosuje się ultradźwiękowe rozpraszanie, rozpuszczalniki organiczne, emulsyfikatory lub dyspergatory jako środki do przygotowania roztworów podstawowych substancji o niskiej rozpuszczalności lub w celu ułatwienia rozproszenia tych substancji w podłożu badawczym. Jeżeli stosuje się takie substancje pomocnicze, wszystkie badane stężenia muszą zawierać tę samą ilość substancji pomocniczej, oraz dodatkowa grupa kontrolna powinna być poddana ekspozycji przy tym samym stężeniu substancji pomocniczej, które użyto w badanych seriach. Stężenie takich substancji należy zminimalizować, lecz w żadnym przypadku nie może przekraczać 100 mg na litr w podłożu badawczym.

Badanie należy przeprowadzić bez regulacji pH. Jeżeli istnieją oznaki zaznaczonej zmiany pH, doradza się powtórzenie badania z odpowiednim dostosowaniem jego wartości i przedstawienie uzyskanych wtedy wyników. W takim przypadku wartość pH roztworu podstawowego należy doprowadzić do pH wody do rozcieńczenia, chyba że istnieją powody, z których nie należy tego robić. Najlepsze są HCl i NaOH w tym celu. Regulację pH należy przeprowadzić w taki sposób, aby nie zmienić w istotnym stopniu stężenia substancji badanej w roztworze podstawowym. W przypadku gdyby zaszła reakcja chemiczna lub doszło do fizycznego wytrącania się osadu badanego związku z powodu ustawiania pH, należy podać ten fakt.

1.6.1.2. Podłoże badania

Woda powinna być dobrej jakości wodą destylowaną lub wodą dejonizowaną o przewodności niższej od 5 μScm^{-1} . Przyrząd do destylacji nie może zawierać żadnych części wykonanych z miedzi.

Zalecane jest następujące podłoże.

Cztery roztwory podstawowe są przygotowywane zgodnie z następującą tabelą. Roztwory podstawowe są sterylizowane poprzez filtrowanie przez membranę i autoklawizowanie, i przechowywane w ciemnym miejscu w 4 °C. Roztwór podstawowy nr 4 należy sterylizować tylko membranową filtracją. Te roztwory podstawowe rozcieńcza się do uzyskania końcowych stężeń składników pokarmowych w badanych roztworach.

Składnik pokarmowy	Stężenie w roztworze podstawowym		Końcowe stężenie w roztworze badanym	
Roztwór podstawowy 1: makroskładniki				
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
Roztwór podstawowy 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
Roztwór podstawowy 3: pierwiastki śladowe				
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
Roztwór podstawowy 4: NaHCO ₃				
NaHCO ₃	50	g/l	50	mg/l

pH podłoża po ustaleniu się równowagi z powietrzem jest około 8.

1.6.2. Przyrząd.

- Zwykły sprzęt laboratoryjny,
- Kolby do badań o stosownej objętości (np. kolby stożkowe 250 ml są odpowiednie dla objętości badanego roztworu równej 100 ml). Wszystkie kolby do badań powinny być identyczne materiałowo i wymiarowo.
- Przyrząd do rozwoju kultur: szafka lub komora w której temperatura wynosi w zakresie 21 °C do 25 °C i jest utrzymywana z dokładnością ± 2 °C, o stałym, jednorodnym oświetleniu, dające zakres widma 400 do 700 nm. Jeżeli glony w kulturach kontrolnych osiągną zalecaną szybkość wzrostu, uznaje się, że warunki wzrostu, włączając intensywność oświetlenia, zostały spełnione.

Zalecane jest użycie dla średniego poziomu badanych roztworów, intensywność oświetlenia w zakresie 60 do 120 $\text{i.tE.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (35 do 70×10^{18} fotonów $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) przy pomiarze w zakresie długości fali światła 400 do 700 nm stosując odpowiedni czujnik. Dla przyrządów mierzących światło, skalibrowanych w luksach, akceptowalnym równoważnym zakresem jest 6 000 do 10 000 luksów.

Intensywność światła może być uzyskana przez zastosowanie od czterech do siedmiu lamp fluorescencyjnych o mocy 30 W typu uniwersalnego białego (temperatura barwy około 4 300 K), w odległości 0,35 m od kultury glonów.

- Pomiarzy gęstości komórek powinny być wykonywane używając bezpośrednią metodę zliczania żywych komórek, np. za pomocą mikroskopu z komorą liczącą. Jednakże można zastosować inne procedury wystarczająco czułe i wystarczająco dobrze skorelowane z gęstością komórek (np. fotometria, turbidymetria).

1.6.3. Badane organizmy

Sugeruje się używanie takich gatunków glonów zielonych, które są gatunkami szybko wzrastającymi co jest wygodne dla kulturowania i badania. Najlepszymi gatunkami są:

- *Selenastrum capricornutum*, np. ATCC 22662 lub CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, np. 86.81 SAG,

Uwaga:

ATCC = American Type Culture Collection (U.S.A.)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (U.K.)

SAG = Collection of algal culture (Gottingen, F.R.G.)

Jeżeli użyto innych gatunków, należy umieścić nazwę szczepu w sprawozdaniu.

1.6.4. Procedura badania

Zakres stężenia w którym prawdopodobnie zajdzie wpływ jest ustalany na podstawie wyników z badań znalezienia zakresu.

Dwa pomiary wzrostu (biomasy i szybkość wzrostu) mogą dać szeroko rozbieżne pomiary wzrostu inhibicji; obydwie należy użyć w badaniu znalezienia zakresu dla zapewnienia że geometryczny ciąg stężeń umożliwi oszacowanie zarówno $E_b C_{50}$ jak i $E_r C_{50}$.

Początkowa gęstość komórek

Jest zalecane, aby początkowa gęstość komórek w badanych kulturach była około 10 komórek/ml dla *Selenastrum capricornutum* i *Scenedesmus subspicatus*. Jeśli stosuje się inne gatunki, biomasa musi być porównywalna.

Stężenia substancji badanej

Do badania, przygotowuje się co najmniej pięć stężeń w seriach geometrycznych przy stosunku stężenia nieprzekraczającym 2,2. Najniższe badane stężenie powinno nie dawać obserwowalnego efektu wzrostu glonów. Najwyższe stężenie badane powinno hamować wzrost o co najmniej 50% w stosunku do kontroli, i najkorzystniej całkowicie zatrzymać wzrost.

Repliki i kontrole

Projekt badania powinien zawierać trzy kopie badania przy każdym badanym stężeniu. Dołączane są trzy kontrole badania bez substancji badanej, oraz jeśli stosowne trzy kontrole zawierające substancję pomocniczą. O ile jest to uzasadnione, projekt może być zmieniony w celu zwiększenia liczby stężeń i zmniejszenia liczby replik na dane stężenie.

Przeprowadzenie badania

Badane kultury zawierające pożądane stężenia badanej substancji i pożądaną ilość inokulum glonowych są przygotowywane przez dodanie podwielokrotności roztworu podstawowego substancji badanej do odpowiednich ilości prekultur glonów (patrz dodatek 1).

Kolby z kulturami są wstrząsane i umieszczane w aparacie do hodowania kultur. Komórki glonów są utrzymywane w stanie zawiesiny poprzez wstrząsanie, wirowanie lub przepuszczaniem pęcherzyków powietrza w celu poprawy wymiany gazu z zmniejszenia zmian pH w badanych roztworach. Kultury powinny być utrzymywane w temperaturze w zakresie 21 do 25 °C, kontrolowanej w tolerancji ± 2 °C.

Gęstość komórkowa jest ustalana co najmniej w 24, 48 i 72 godziny po rozpoczęciu badania. Filtrowanie podłoża glonów zawierającego odpowiednie stężenia badanej substancji jest stosowane celem ustalenia tła, gdy prowadzone są pomiary gęstości komórek, inne od bezpośrednich metod zliczania.

Wartość pH jest mierzona na początku badania i w 72 godzinie.

Wartości pH w zbiornikach kontrolnych nie powinno zwykle odchyłać się więcej niż 1,5 jednostki w czasie trwania badania.

Badanie substancji lotnych

Nie ma obecnie ogólnej uznanej drogi badania substancji lotnych. Jeżeli substancja jest znana z tendencji do parowania, używa się zamkniętych kolb badawczych ze zwiększoną przestrzenią głowicy. Zaproponowano zmiany do tej metody (patrz poz. lit. (4)).

Należy podjąć próby do ustalenia ilości substancji która pozostaje w roztworze, i zwrócić ekstremalną uwagę przy interpretacji wyników badań z lotnymi związkami chemicznymi przy zastosowaniu systemów zamkniętych.

Badanie graniczne

Stosując procedury opisane w niniejszej metodzie badania, przeprowadza się badanie graniczne przy stężeniu 100 mg na litr w celu pokazania że EC_{50} jest większy niż dla danego stężenia.

Jeżeli natura badanej substancji jest taka, że nie można uzyskać stężenia 100 mg na litr w badanej wodzie, badanie graniczne należy przeprowadzić w stężeniu równym rozpuszczalności substancji (lub w maksymalnym stężeniu tworzącym stabilną zawiesinę) w użytym podłożu (patrz także 1.6.1.1).

Badanie graniczne należy przeprowadzić w co najmniej potrojonej ilości, z taką samą ilością kontroli. Do badania granicznego należy wykonać dwa pomiary wzrostu (biomasy i szybkości wzrostu).

Jeżeli w badaniu granicznym znajduje się średni spadek o 25% lub więcej, biomasy albo szybkości wzrostu między badaniem granicznym i kontrolą, należy przeprowadzić pełne badanie.

2.

DANE I OCENA

Zmierzone gęstości komórek w badanych kulturach i kontrolach ujmuje się w postaci stabelaryzowanej wraz ze stężeniami substancji badanej i czasami pomiarów. Wartość średnia gęstości komórek dla każdego stężenia substancji badanej oraz kontroli jest wykreślana w zależności od czasu (0-72 godz.) dla uzyskania krzywych wzrostu.

Dla ustalenia zależności stężenie/skutek należy zastosować dwa podejścia. Niektóre substancje mogą stymulować wzrost przy niskich stężeniach. Należy rozważyć tylko punkty danych wskazujących hamowanie między 0 i 100%.

2.1. PORÓWNANIE POWIERZCHNI POD KRZYWYMI WZROSTU

Obszar między krzywymi wzrostu i poziomą linią $N = N_0$ oblicza się zgodnie ze wzorem:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

gdzie

A = powierzchnia,

N_0 = ilość komórek/ml w czasie t_0 (początek badania),

N_1 = zmierzona liczba komórek/ml w czasie t_1 ,

N_n = zmierzona liczba komórek/ml w czasie t_n ,

t_1 = czas pierwszego pomiaru po rozpoczęciu badania,

t_n = czas n-tego pomiaru po rozpoczęciu badania.

n = liczba pomiarów zdjętych po rozpoczęciu badania.

Procentowe hamowanie wzrostu komórek przy każdym stężeniu substancji badanej (I_A) jest obliczane zgodnie ze wzorem:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

gdzie

A_c = powierzchnia między krzywą wzrostu kontroli i linią poziomą $N = N_0$.

A_t = powierzchnia między krzywą wzrostu przy stężeniu t i linią poziomą $N = N_0$.

Wartości I_A są wykreślane na półlogarytmicznym papierze lub półlogarytmicznym probitowym papierze w relacji do odpowiadających stężeń. Jeżeli wykreśla się na papierze probitowym, punkty łączone są prostą linią albo wizualnie, albo regresją obliczeniową.

EC_{50} oszacowuje się z linii regresji przez odczyt stężenia równoważnego 50% inhibicji ($I_A = 50\%$). Do oznaczenia niniejszej wartości jednoznacznie w odniesieniu do tej metody obliczeniowej, proponuje się użycie symbolu E_bC_{50} . Jest podstawą, że E_bC_{50} jest dzielone przez odpowiedni okres czasu ekspozycji, np. $E_bC_{50}(0-72 \text{ godz.})$.

2.2. PORÓWNANIE SZYBKOŚCI WZROSTU

Średnia właściwa szybkość wzrostu (μ) dla wykładniczo rosnącej kultury może być obliczona jako

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

gdzie t_0 jest czasem początku badania.

Alternatywnie, średnia właściwa szybkość wzrostu może być wyprowadzona z nachylenia linii regresji z wykresu N w stosunku do czasu.

Procentowe hamowanie właściwej szybkości wzrostu przy każdym stężeniu substancji badanej ($I_{\mu t}$) jest obliczane zgodnie ze wzorem:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

gdzie

μ_c = średnia właściwa szybkość wzrostu dla kontroli

μ_t = średnia właściwa szybkość wzrostu dla stężenia badania t

Procentowe zmniejszenie średniej właściwej szybkości wzrostu przy każdym stężeniu substancji badanej porównane do wartości kontroli jest wykreślane w odniesieniu do logarytmu stężenia. EC_{50} odczytuje się z wynikowego wykresu. Dla jednoznacznego oznaczenia EC_{50} wyprowadzonego z niniejszej metody proponowane jest użycie symbolu E_rC_{50} . Czasy pomiaru muszą być wskazane, na przykład jeżeli wartość jest odniesiona do czasów 0 i 72 godziny, symbol staje się E_rC_{50} (0-72 godz.).

Uwaga: właściwa szybkość wzrostu jest członem logarytmicznym, czyli mała zmiana w szybkości wzrostu prowadzi do wielkiej zmiany w biomacie. Wartości E_bC i E_rC są zatem porównywalne nienumerycznie.

2.3. OBLICZENIE NOEC

Stężenie bez Obserwowanego Działania Toksycznego jest oznaczane odpowiednią procedurą statystyczną dla wielopróbkowego porównania (np. analizy wariancji i badaniem Dunnett'a), stosując poszczególne replikowane wartości powierzchni spod krzywych wzrostu A (patrz 2.1) lub właściwych szybkości wzrostu i (patrz 2.2).

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- substancja badana: dane tożsamości chemicznej;
- badane organizmy: pochodzenie, kultura laboratoryjna, numer szczepu, metoda hodowli;
- warunki badania:
 - data startu i zakończenia badania i jego czas trwania,
 - temperatura,
 - skład podłoża,
 - przyrząd do hodowania kultur,
 - pH roztworów na początku oraz na końcu badania (należy wyjaśnić jeżeli obserwowano odchylenia pH powyżej 1,5 jednostki),
 - nośnik i metoda stosowana do rozpuszczenia substancji badanej i stężenie nośnika w roztworach badanych,
 - jakość oraz intensywność oświetlenia,
 - badane stężenia (zmierzone lub nominalne).
- wyniki:
 - gęstość komórek dla każdej kolby w każdym punkcie pomiarowym oraz metoda pomiaru gęstości komórek
 - wartość średnia gęstości komórek,
 - krzywe wzrostu,
 - graficzne przedstawienie zależności wpływu stężenia,
 - wartości EC i metody obliczenia,
 - NOEC,
 - inne obserwowane działania.

4. LITERATURA

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*”, in: Rudoiph/Boje: Okotoxikologie, 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

Przykład procedury hodowli glonów**Uwagi ogólne**

Celem hodowli glonów na podstawie niniejszej procedury jest uzyskanie kultur glonów dla badań toksyczności.

Należy użyć odpowiednich metod dla zapewnienia, że kultury glonów nie są zainfekowane bakteriami (ISO 4833). Podstawowe jest dla kultur glonów by były wolne od pasożytów.

Wszystkie operacje powinny być prowadzone w warunkach sterylnych w celu zapobieżenia zanieczyszczeniu bakteriami i innymi glonami. Zanieczyszczone kultury należy odrzucić.

Procedury uzyskania kultur glonów

Przygotowanie roztworów składników pokarmowych (podłoża):

Podłoże przygotowuje się przez rozcieńczenie stężonych roztworów podstawowych składników pokarmowych. Dla stałego podłoża dodaje 0,8% agaru. Używane podłoże powinno być sterylne. Sterylizacja za pomocą autoklawów prowadzi do strat amoniaku.

Kultura podstawowa:

Kultury podstawowe są kulturami małych glonów, które są regularnie przenoszone do świeżego podłoża działają jako materiał początkowy badania. Jeżeli kultury nie są regularnie używane tworzą pasma na nachylonych kanalikach agaru. Kultury są przenoszone do świeżego podłoża co najmniej raz na dwa miesiące.

Kultury podstawowe wzrastają w stożkowych kolbach zawierających odpowiednie podłoże (objętość około 100 ml). Gdy glony są inkubowane w 20 °C ze stałym oświetleniem, wymagane jest cotygodniowe przenoszenie.

W czasie trwania przenoszenia, ilość starej kultury jest przenoszona za pomocą sterylnych pipet do kolby ze świeżym podłożem, tak że wraz z szybkim wzrostem gatunku, początkowe stężenie jest około 100 razy mniejsze niż w starej kulturze.

Szybkość wzrostu gatunku może być określona przez krzywą wzrostu. Jest wiadome, że jest możliwe oszacowanie gęstości przy której kulturę należy przenieść do nowego podłoża. Należy to wykonać zanim kultura osiągnie fazę martwą.

Prekultura:

Przeznaczeniem prekultury jest danie odpowiedniej ilości glonów dla inokulacji badanych kultur. Prekultura jest inkubowana w warunkach badania i stosowana gdy wciąż wykładniczo narasta, zwykle po czasie inkubacji około trzech dni. Jeżeli kultury glonów zawierają zdeformowane lub nienormalne komórki, należy je odrzucić.

Dodatek 2

ISO 8692 - Jakość wody - badanie zahamowania wzrostu glonów słodkowodnych *Scenedesmus subspicatus* i *Selenastrum capricornutum* przedstawia następujące wyniki badania międzylaboratoryjnego między 16 laboratoriami, przy badaniu dichromianu potasu

	Średnie (mg/l)	Zakres (mg/l)
E _r C ₅₀ (0-72 godz)	0,84	0,60-1,03
E _b C ₅₀ (0-72 godz)	0,53	0,20-0,75

C.4. OZNACZENIE BIODEGRADOWALNOŚCI

CZĘŚĆ I. ROZWAŻANIA OGÓLNE

I.1. WPROWADZENIE

Opisano sześć metod pozwalających na sortowanie substancji chemicznych w celu biodegradowalności w aerobowych wodnych podłożach:

- Rozpuszczalny węgiel organiczny (DOC) metoda „Die-Away”(Metoda C.4-A)
- Zmodyfikowane badanie przesiewowe OECD - DOC metoda „Die-Away”(Metoda C.4-B)
- Wydzielanie ditlenku węgla (CO_2) (Zmodyfikowane badanie Sturma) (Metoda C.4-C)
- Respirometria manometryczna (Metoda C.4-D)
- Zamkniętej butli (Metoda C.4-E)
- MITI (Ministerstwo Handlu Międzynarodowego i Przemysłu - Japonia) (Metoda C.4-F)

Zwykle i ogólne rozważania do wszystkich sześciu badań podano w części I metody. Punkty specyficzne dla poszczególnych metod podano w części II do VII. Dodatki zawierają definicje, wzory i materiał wiodący.

Ćwiczenie porównawcze międzynarodowego laboratorium OECD, przeprowadzone w 1988 r., pokazały że metody dają zgodne wyniki. Jednakże w zależności od fizycznych charakterystyk badanych substancji, jedna lub inne metody są zalecane.

I.2. WYBÓR ODPOWIEDNIEJ METODY

W celu wybrania najbardziej odpowiedniej metody, podstawowe jest posiadanie informacji na temat rozpuszczalności chemicznej, prężności pary i charakterystyk adsorpcji. Powinna być znana struktura chemiczna i wzór w celu obliczenia teoretycznych wartości i/lub sprawdzenia wartości pomierzonych parametrów, na przykład ThOD , ThCO_2 , DOC, TOC, COD (patrz załącznik I i II).

Badania substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie w co najmniej 100 mg/l mogą być oszacowane wszystkimi metodami, pod warunkiem że są one nietłoczne i nieabsorbujące. Dla tych substancji chemicznych, które są słabo rozpuszczalne w wodzie, lotne lub adsorbujące, odpowiednie metody wskazano w tabeli 1. Sposób w który substancje chemiczne słabo rozpuszczalne w wodzie można przygotować opisano w załączniku III. Średnio lotne substancje chemiczne mogą być badane metodą DOC (metoda „Die-Away”) jeżeli jest wystarczająca przestrzeń na gaz w naczyniach pomiarowych(które powinny być odpowiednio zakorkowane). W tym przypadku należy ustawić kontrolę abiotyczną, by nie pozwolić na jakiegokolwiek straty fizyczne.

Tabela 1: Stosowalność metod badania

Badanie	Metoda analityczna	Odpowiedniość dla substancji które są:		
		słabo rozpuszczalne	lotne	adsorbujące
DOC Die-Away	Rozpuszczalny węgiel organiczny	—	—	+/-
Zmod. OECD Die-Away	Rozpuszczalny węgiel organiczny	—	—	+/-
Wydzielanie CO_2	Respirometria: wydzielanie CO_2	+	—	+
Respirometria manometryczna	Respirometria manometryczna: zużycie tlenu	+	+/-	+
Zamkniętej butla	Respirometria: rozpuszczony tlen	+/-	+	+
MITI	Respirometria: zużycie tlenu	+	+/-	+

Wymagane są informacje na temat czystości lub względnych stosunków głównych składników badanego materiału w celu interpretacji uzyskanych wyników, szczególnie gdy wyniki są niskie lub marginalne.

Informacje na temat toksyczności badanej substancji w stosunku do bakterii (załącznik IV) są bardzo użyteczne dla wyboru odpowiednich stężeń badania i mogą być podstawowe dla prawidłowej interpretacji niskich wartości biodegradacji.

I.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

W celu sprawdzenia procedury, chemiczne substancje odniesienia spełniające kryteria łatwej biodegradowalności są badane przez umieszczenie w odpowiedniej kolbie równolegle do zwykłego przebiegu badania.

Odpowiednimi substancjami chemicznymi są anilina (świeżo destylowana), octan sodu i benzoetan sodu. Te chemiczne substancje odniesienia całkowicie degradują się w tych metodach, nawet gdy nie dodano przezornie inokulum.

Zasugerowano, że należy szukać chemicznej substancji odniesienia, która by była łatwo biodegradowalna, lecz wymagałaby dodania inokulum. Zaproponowano wodorostalan potasu lecz potrzeba uzyskać więcej dowodów dla tej substancji przed jej zaakceptowaniem jako substancji odniesienia.

W badaniach respirometrycznych, związki zawierające azot oddziałują na pobieranie tlenu z powodu procesu nityfikacji (patrz załącznik II i V).

I.4. ZASADA METOD BADAŃ

Roztwór lub zawiesinę substancji badanej na podłożu mineralnym jest zaszczepiany i inkubowany w warunkach aerobowych w ciemności lub rozproszonym świetle. Ilość DOC w roztworze badanym powinna być utrzymywana tak mała jak to możliwe w porównaniu z ilością DOC spodziewanej w substancji badanej. Wykonuje się poprawkę na aktywność endogeniczną inokulum przez prowadzenie równoległych badań ślepych z inokulum ale bez substancji badanej, chociaż endogeniczna aktywność komórek w obecności substancji nie tak samo dokładnie odpowiada tej w kontroli endogenicznej. Substancja odniesienia jest równolegle badana w celu sprawdzenia operacji procedury.

Ogólnie biorąc, degradacja jest wykonywana przez oznaczanie parametrów takich jak DOC, tworzenie CO₂ i pobrany tlen, wykonywane są pomiary w dostatecznie częstych odstępach czasu pozwalających na identyfikację początku i końca biodegradacji. Przy zastosowaniu automatycznych respirometrów pomiar staje się ciągły. DOC jest czasem mierzony dodatkowo do innych parametrów, lecz jest to zwykle wykonywane tylko na początku i końcu badania. Stosuje się także specyficzną analizę chemiczną do oceny pierwotnej degradacji substancji badanej, i do oznaczenia stężenia wszystkich utworzonych substancji pośrednich (obligatoryjne w badaniu MITI).

Zwykle badanie biegnie przez 28 dni. Badanie jednakże można zakończyć przed upływem 28 dni, to jest wtedy kiedy krzywa biodegradacji osiąga plateau dla co najmniej 3 oznaczeń. Badania można także wydłużyć ponad 28 dni, jeżeli krzywa pokazuje że biodegradacja rozpoczęła się natomiast nie osiągnięto plateau 28 dnia.

I.5. KRYTERIA JAKOŚCI

I.5.1. Odtwarzalność

Z powodu istoty biodegradacji oraz stosowania mieszanych populacji bakteryjnych, oznaczenia przeprowadzać co najmniej zdublowane.

Ze zwykłego doświadczenia wynika, iż im większe jest stężenie drobnoustrojów wstępnie dodanych do podłoża badawczego, tym mniejsze będą zmiany między replikami. Badanie obrączkowe również pokazuje, że mogą występować duże zmiany między wynikami uzyskanymi przez różne laboratoria, lecz zwykle uzyskuje się dobrą zgodność przy zastosowaniu łatwo degradowalnych związków.

I.6.1. Woda rozcieńczająca

Stosuje się dejonizowaną lub destylowaną wodę, wolną od inhibujących stężeń substancji toksycznych (np. jonów Cu^{2+}). Musi zawierać nie więcej niż 10% zawartości węgla organicznego wprowadzanego w badany materiał. Konieczna jest woda do badań o wysokiej czystości w celu eliminacji wysokich wartości dla ślepej próby. Zanieczyszczenia mogą pochodzić z naturalnych zanieczyszczeń wody ale również z żywic jonowymiennych oraz lizowanych materiałów bakteryjnych i glonów. Dla każdej serii badań stosuje się tylko jedną partię wody, sprawdzoną uprzednio analizą DOC. Takie sprawdzenie nie jest konieczne dla badania „zamkniętej butli” lecz zapotrzebowanie wody na tlen musi być niskie.

I.6.2. Roztwory podstawowe składników mineralnych

Do sporządzenia roztworów badanych, sporządzane są roztwory podstawowe o odpowiednich stężeniach składników mineralnych. Następujące roztwory podstawowe są używane (o różnych współczynnikach rozcieńczenia) dla metod DOC Die-Away, zmodyfikowanego badania przesiewowego OECD, wydzielanie CO_2 , respirometrii manometrycznej i badania „zamkniętej butli”. Współczynniki rozcieńczenia oraz, dla badania MITI, właściwie przygotowane podłoża mineralne podano pod nagłówkami właściwych badań.

Roztwory podstawowe: Przygotować następujące roztwory podstawowe, stosując odczynniki czystości analitycznej.

- | | | |
|----|--|---------|
| a) | Diwodoroortofosforan monopotasu, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Monowodoroortofosforan dipotasu, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Diwodny monowodoroortofosforan disodium $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 33,40 g |
| | Chlorek amonu, NH_4Cl | 0,50 g |
| | Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra. Wartość pH roztworu powinna być 7,4. | |
| b) | Chlorek wapnia, bezwodny, CaCl_2 | 27,50 g |
| | lub chlorek wapnia diwodny, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 36,40 g |
| | Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra | |
| c) | Heptawodny siarczan magnezu, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra | |
| d) | Heksawodny chlorek żelaza (III), $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra. | |

Uwaga: aby nie przygotowywać niniejszego roztworu bezpośrednio przed użyciem, dodać kroplę stężonego kwasu solnego lub 0,4 grama soli disodowej kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) na litr.

I.6.3. Roztwory podstawowe substancji chemicznych

Przykładowo, rozpuścić 1-10 g, odpowiednio badanej substancji chemicznej lub chemicznej substancji odniesienia w wodzie dejonizowanej i dopełnić do 1 litra gdy rozpuszczalność przekracza 1 g/l. Z drugiej strony przygotować roztwory podstawowe w podłożu mineralnym lub dodać substancje chemiczne bezpośrednio do podłoża mineralnego. Postępowanie ze słabo rozpuszczalnymi substancjami chemicznymi - patrz załącznik III, ale w badaniu MITI (Metoda C.4-F), nie stosuje się ani rozpuszczalników ani środków emulsyfikujących.

I.6.4. Materiał inokulacyjny

Inokulum może pochodzić z różnych źródeł: aktywowany osad, ścieki kanalizacyjne (niechlorowane), wody powierzchniowe i gleby lub ich mieszaniny. Dla badań DOC Die-Away, wydzielania CO_2 i respirometrii manometrycznej, jeżeli stosowany jest aktywowany osad, powinien być pobrany z oczyszczalni ścieków i urządzeń skali laboratoryjnej przyjmujących głównie ścieki domowe. Materiał inokulacyjny z innych źródeł, okazał się dawać bardziej rozproszone wyniki. Dla zmodyfikowanego OECD badania przesiewowego i badania zamkniętej butli potrzebne jest bardziej rozcieńczone inokulum bez kłaczków osadu i zalecanym źródłem jest ściek drugiego stopnia oczyszczalnia ścieków domowych lub urządzeń skali laboratoryjnej. Dla badania MITI inokulum jest otrzymywane z mieszanych źródeł i opisane jest pod nagłówkiem tego specyficznego badania.

I.6.4.1. *Inokulum z aktywowanych osadów*

Zebrać świeżo pobraną próbkę aktywowanego osadu z komora napowietrzania oczyszczalni ścieków lub urządzenia skali laboratoryjnej przetwarzającego głównie ścieki domowe. Odrzucić duże cząstki, jeżeli konieczne poprzez filtrację przez siatkę o drobnym oczku i utrzymywać napowietrzanie.

Alternatywnie, zsedymetować lub odwirować (np. 1 100 rpm, 10 min.) po usunięciu wszystkich dużych cząstek. Odrzucić nadszacz. Można przemyć osad w podłożu mineralnym. Zawiesić stężony osad w podłożu mineralnym dla uzyskania stężenia 3-5 g zawiesiny ciał stałych/l i napowietrzać do wymaganego momentu.

Osad powinien być pobrany z prawidłowo działającej konwencjonalnej oczyszczalni ścieków. Jeżeli pobrano osad z oczyszczalni o wysokiej szybkości oczyszczania, lub podejrzewa się zawartość inhibitorów, należy go przemyć. Zsedymetować lub odwirować ponownie zawieszony osad po energicznym mieszanii, odrzucić nadszacz i ponownie zawiesić umyty osad w dalszej objętości podłoża mineralnego. Powtarzać tę procedurę do czasu, gdy uzna się iż jest wolny od nadmiaru substratów lub inhibitorów.

Po zakończeniu ponownego zawieszenia lub niepoddany obróbce osad, odstawić ich próbkę do momentu jej użycia do ustalenia suchej masy ciał stałych w zawieszynie.

Dalszą alternatywą jest homogenizacja aktywowanego osadu (3-5 g zawiesiny ciał stałych/l). Rozdrobnić osad w mechanicznym rozdrabniaczu przy średniej szybkości przez 2 minuty. Zsedymetować rozdrobniony osad przez 30 minut lub dłużej, gdy trzeba, i zdekantować ciecz do użycia jako inokulum przy szybkości 10 ml/l podłoża mineralnego.

I.6.4.2. *Inne źródła inokulum*

Można je uzyskać ze ścieków drugiego stopnia oczyszczalni ścieków lub urządzeń skali laboratoryjnej przyjmujących głównie ścieki domowe. Zebrać świeżą próbkę i utrzymywać napowietrzaną w czasie transportu. Pozwolić osadzić się przez 1 godzinę lub przefiltrować przez grubą bibułę filtracyjną i zatrzymać zdekantowany wyciek lub jeśli wymagane przefiltrować z napowietrzaniem. Do 100 ml tego typu inokulum może być użyte na litr podłoża.

Następnym źródłem inokulum są wody powierzchniowe. W tym przypadku zebrać próbkę z odpowiedniej wody powierzchniowej, np. rzeki, jeziora i utrzymywać w napowietrzeniu przez wymagany czas. Jeżeli konieczne, zatężyć inokulum przez filtrację lub odwirowanie.

I.6.5. **Wstępne sezonowanie inokulum**

Materiał inokulacyjny może być wstępnie sezonowany do warunków eksperymentalnych, lecz niewstępnie adoptowany do badanej substancji. Wstępne sezonowanie składa się z napowietrzania aktywowanego osadu w podłożu mineralnym lub ścieku drugiego stopnia, przez 5-7 dni w temperaturze badania. Wstępne sezonowanie poprawia czasem precyzję metod badania przez zmniejszenie wartości dla ślepej próby. Uważane jest za niekonieczne wstępne sezonowanie inokulum dla metody MITI.

I.6.6. **Kontrole abiotyczne**

Gdy wymagane, sprawdzić możliwą abiotyczną degradację badanej substancji przez oznaczenie usuniętego DOC, pobieranie tlenu lub wydzielania ditlenku węgla w sterylnych kontrolach niezawierających inokulum. Sterylizować za pomocą filtracji przez membranę (0,2-0,45 mikrona) lub przez dodanie odpowiedniej toksycznej substancji o odpowiednim stężeniu. Jeżeli stosuje się filtrację membranową, pobrać próbki aseptycznie dla utrzymania sterylności. Chociaż absorpcję badanej substancji wykluczono z góry, badania które mierzą biodegradację jako usuwanie DOC, szczególnie dla inokulum aktywowanego osadu, powinny zawierać kontrole abiotyczne, zaszczepione i intoksykowane.

1.6.7. Liczba kolb

Liczba kolb w typowym badaniu jest opisana pod nagłówkiem każdego badania.

Stosuje się następujące typy kolb:

Zawiesina badana: zawierających substancję badaną i inokulum

Ślepa próba inokulum: zawierające tylko inokulum

Kontrola procedury: zawierających substancje odniesienia i inokulum

Kontrola sterylności abiotycznej: sterylne, zawierających substancję badaną (patrz 1.6.6)

Kontrola adsorpcji: zawierających substancję badaną inokulum i środek sterylizujący

Kontrola toksyczności: zawierających substancję badaną substancje odniesienia i inokulum

Obowiązkowe jest by oznaczenia w zawieszynie badanej i w ślepej próbie inokulum były wykonywane równolegle. Wskazane jest wykonywanie oznaczeń w innych kolbach również w oznaczeniach równoległych.

To jednakże nie zawsze jest możliwe. Upewnić się, że pobrano wystarczającą ilość próbek lub odczytów do oceny procentowego usunięcia DOC w 10-dniowym badaniu „okienkowym”.

1.7. DANE I OCENA

W obliczeniu DOC, zastosowano procent degradacji, średnie wartości zdublowanych pomiarów parametrów w obu badanych naczyniach i w ślepej próbie inokulum. Wzory są przedstawione w sekcjach poniżej właściwych badań. Przebieg degradacji jest zobrazowany graficznie i badanie 10-dni okno jest wskazane. Należy obliczyć i przedstawić w sprawozdaniu usunięcie procentowe uzyskane na koniec 10-dniowego „okna” i wartość w plateau, lub pod koniec badania, w zależności od tego, co jest odpowiednie.

W badaniach respirometrycznych związki zawierające azot mogą wpływać na pobieranie tlenu z powodu nityfikacji (patrz załącznik II i V).

1.7.1. Degradacja zmierzona za pomocą oznaczenia DOC

Procentową degradację D przy każdym czasie pobierania próbki należy obliczyć oddzielnie dla kolb zawierających substancję badaną stosując średnie wartości zdublowanych pomiarów DOC w celu oszacowania ważności badania (patrz 1.5.2.). Oblicza się to stosując następujące równanie:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

gdzie:

D_t = % degradacji w czasie t,

C_o = średnie początkowe stężenie DOC w zaszczepionym podłożu kultury zawierającym substancję badaną (mg DOC/l),

C_t = średnie stężenie DOC w zaszczepionym podłożu kultury zawierającym substancję badaną w czasie t (mg DOC/l),

C_{bo} = średnie początkowe stężenie DOC w zaszczepionym podłożu mineralnym ślepej próby (mg DOC/l),

C_{bt} = średnie stężenie DOC w zaszczepionym podłożu mineralnym ślepej próby w czasie t (mg DOC/l).

Wszystkie stężenia są mierzone eksperymentalnie.

I.7.2. Degradacja mierzona w pojęciu właściwej analizy

Gdy dostępne są dane z właściwej analizy, można obliczyć pierwotną biodegradację z:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

gdzie:

D_t = % degradacja w czasie t , zwykle 28 dni,

S_a = ilość pozostałości substancji badanej w zaszczepionym podłożu na koniec badania (mg),

S_b = ilość pozostałości substancji badanej w badaniu ślepej próby woda/podłoże do którego dodano tylko substancję badaną (mg).

I.7.3. Abiotyczna degradacja

Gdy stosuje się kontrolę sterylną abiotyczną, obliczyć procentową abiotyczną degradację stosując

$$\% \text{ abiotyczna degradacja} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

gdzie

$C_{s(0)}$ = DOC stężenie w sterylnej kontroli w dniu 0

$C_{s(t)}$ = DOC stężenie w sterylnej kontroli w dniu t

I.8. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

W miarę możliwości, sprawozdanie z badań zawiera następujące elementy:

- badana i chemiczne substancje odniesienia, i ich czystość;
- warunki badania;
- inokulum: natura i miejsce próbkowania(-ń), stężenie i wszystkie operacje przygotowania wstępnego;
- proporcja i charakter odpadu przemysłowego obecnego w ścieku jeśli znany;
- czas trwania badania i temperatura;
- w przypadku słabo rozpuszczalnych badanych substancji, zastosowane operacje;
- zastosowana metoda badania; dla każdej zmiany procedury należy podać przyczyny uzasadnione naukowo i uzasadnienie;
- arkusz danych;
- wszystkie obserwowane zjawiska inhibicji;
- wszystkie obserwowane abiotyczne degradacje;
- dane właściwej analizy chemicznej, jeśli dostępne;
- dane analityczne etapów pośrednich, jeśli dostępne;
- wykres procentowy degradacji w stosunku do czasu dla substancji badanych i odniesienia; fazy opóźnienia, fazy degradacji, 10-dniowe „okno” oraz nachylenie wykresu należy wyraźnie wskazać (załącznik I). Jeżeli badanie odpowiadało kryteriom ważności, można użyć do wykresu średni procent degradacji w kolbach zawierających substancje badaną.
- procentowe usunięcie po 10-dniach „okna”, i w plateau lub na koniec badania.

CZĘŚĆ II. BADANIE DOC METODĄ „DIE-AWAY” (Metoda C.4-A)**II.1. ZASADA METODY**

Zmierzoną objętość zaszczepionego podłoża mineralnego zawierającego znane stężenie substancji badanej (10-40 mg DOC/l) jako pojedyncze nominalne źródło węgla organicznego napowietrza się w ciemności lub w rozproszonym świetle w 22 ± 2 °C.

Postępującą degradację określa się analizą DOC w częstych przedziałach czasowych przez 28 dni. Stopień biodegradacji jest obliczany przez wyrażenie stężenia usuniętego DOC (skorygowanego do tego ze ślepej próby inokulum w kontroli) jako procent stężenia obecnego początkowo. Stopień pierwotnej biodegradacji może być także obliczony z dodatkowych analiz chemicznych wykonanych na początku i pod koniec inkubacji.

II.2. OPIS METODY**II.2.1. Przyrząd**

- a) Kolby stożkowe, np. 250 ml do 21, w zależności od objętości wymaganej dla analizy DOC;
- b) Wytrząsarka do akomodacji kolb stożkowych, albo z automatyczną kontrolą temperatury albo używaną w stałej temperaturze pokojowej, oraz wystarczająca moc dla utrzymania aerobowych warunków we wszystkich kolbach;
- c) Przyrząd filtracyjny z odpowiednimi membranami;
- d) Analizator DOC;
- e) Przyrząd dla oznaczania rozpuszczonego tlenu;
- f) Wirówka.

II.2.2. Przygotowanie podłoża mineralnego

W celu przygotowania roztworów podstawowych, patrz I.6.2.

Zmieszać 10 ml roztworu (a) z 800 ml wody rozcieńczającej, dodać 1 ml roztworu (b) do (d) i dopełnić do 1l wodą rozcieńczającą.

II.2.3. Przygotowanie wstępne inokulum

Inokulum może być otrzymane z różnych źródeł: aktywowany osad; ścieki kanalizacyjne; wody powierzchniowe; gleb lub z mieszaniny tu wymienionych.

Patrz I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. i I.6.5.

II.2.4. Przygotowanie kolb

Jako przykład, wprowadzić porcje 800 ml podłoża mineralnego do 2l kolb stożkowych i dodać wystarczającą objętość roztworów podstawowych substancji badanej i odniesienia do oddzielnych kolb dla uzyskania stężenia równoważnika chemicznego do 10-40 mg DOC/l. Sprawdzić wartość pH i ustawić, gdy konieczne do 7,4. Przygotować materiał inokulacyjny w kolbach z aktywowanym osadem lub innym źródłem inokuli (patrz I.6.4.), do uzyskania stężenia końcowego większego niż 30 mg zawiesiny ciał stałych/litr. Przygotować także kontrole inokulum w podłożu mineralnym lecz bez badanej substancji i chemicznej substancji odniesienia.

Jeśli wymagane, użyć jedno naczynie dla sprawdzenia możliwych działań inhibicyjnych substancji badanej przez inokulację roztworu zawierającego w podłożu mineralnym, porównywalne stężenia substancji tak badanej, jak i chemicznej substancji odniesienia.

Także jeżeli jest to wymagane, ustawić następną sterylną kolbę dla sprawdzenia czy badana substancja degradowa się abiotycznie, używając niezaszczepiony roztwór substancji chemicznej (patrz I.6.6.).

Dodatkowo, jeżeli podejrzewa się że badana substancja zostanie zaabsorbowana znacząco w szkło, osadzie itp., wykonać wstępną ocenę prawdopodobnego wzrostu absorpcji, a zatem przydatności badania dla substancji chemicznej (patrz tabela 1). Nastawić kolby zawierające substancję badaną, inokulum i środek sterylizujący.

Dopełnić objętość we wszystkich kolbach do 1 l podłożem mineralnym i, po wymieszaniu, pobrać próbkę z każdej kolby do oznaczenia początkowego stężenia DOC (patrz załącznik II.4). Przykryć otwory kolb np. aluminiową folią, w taki sposób by umożliwić swobodną wymianę powietrza między kolbą i otaczającą atmosferą. Następnie włożyć naczynia do wytrząsarki celem rozpoczęcia badania.

II.2.5. **Liczba kolb w typowym przebiegu**

Kolby 1 i 2: Zawiesina badana

Kolby 3 i 4: Ślepa próba inokulum

Kolba 5: Kontrola procedury

Zalecane oraz gdy konieczne:

Kolba 6: Kontrola sterylności abiotycznej

Kolba 7: Kontrola adsorpcji

Kolba 8: Kontrola toksyczności

Patrz także I.6.7.

II.2.6. **Przeprowadzenie badania**

Poprzez całe badanie oznaczać stężenia DOC w każdej kolbie duplikatu w znanych odstępach czasu, wystarczająco często, by można było oznaczyć 10-dniowe „okno” i usunięcie procentowe na koniec 10-dniowego „okna”. Pobrać tylko minimalną objętość zawiesiny badanej konieczną dla każdego oznaczenia.

Przed pobieraniem próbek zmniejszyć straty parowania z kolb przez dodanie wody rozcieńczającej (I.6.1) w wymaganej ilości, jeśli konieczne. Zamieszać energicznie podłoże kultury przed pobraniem próbki i upewnić się że materiał przylegający do ścianek naczynia jest rozpuszczony lub zawieszony, przed pobieraniem próbek. Przefiltrować przez filtr membranowy lub odwirować (patrz załącznik II.4) natychmiast po pobraniu próbek. Analizować odfiltrowane lub odwirowane próbki tego samego dnia, w innym razie przechować w 2-4 °C przez maksimum 48 godzin, lub w niższej temperaturze - 18 °C przez czas dłuższy.

II.3. **DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

II.3.1. **Obróbka wyników**

Obliczyć procentową degradację w czasie t jak podano w I.7.1. (oznaczanie DOC) i do wyboru, według I.7.2. (właściwa analiza).

Zapisać wszystkie wyniki na dołączonych arkuszach danych.

II.3.2. **Ważność wyników**

Patrz I.5.2.

II.3.3. **Sporządzanie sprawozdania**

Patrz I.8.

II.4. ARKUSZ DANYCH

Przykład arkusza danych podano poniżej.

BADANIE DOC METODĄ „DIE-AWAY”**1. LABORATORIUM****2. DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA****3. SUBSTANCJA BADANA**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego:... mg/l jako substancja chemiczna

Początkowe stężenie w podłożu, t_0 :... mg/l jako substancja chemiczna

4. INOKULUM

Źródło:

Poddano traktowaniu:

Wstępne sezonowanie, jeśli wykonano:

Stężenie zawiesiny ciał stałych w mieszaninie reakcyjnej:... mg/l

5. OZNACZENIA WĘGLA

Analizator węgla:

	Kolba nr		DOC po n dniach (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Badana substancja chemiczna plus inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, średnia $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, średnia $C_{b(t)}$					
Ślepa próba inokulum bez badanej substancji	3	c_1					
		c_2					
		c, średnia $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, średnia $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. OCENA DANYCH PIERWOTNYCH

Kolba nr		% degradacja po n dniach				
		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				
Średnia*	$D = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(¹) * D₁ i D₂ nie należy uśredniać jeśli znacznie się różnią.

Uwaga: podobne arkusze można użyć dla chemicznej substancji odniesienia i kontroli toksyczności.

7. KONTROLA ABIOTYCZNA (do wyboru)

	Czas (dni)	
	0	t
DOC cone, (mg/l) kontrola sterylności	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ abiotyczna degradacja} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. WŁAŚCIWA ANALIZA CHEMICZNA (do wyboru)

	ilość pozostałości badanej substancji na koniec badania (mg/l)	% pierwotna degradacja
Kontrola sterylności	S _b	
Zaszczepione podłoże badawcze	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

CZĘŚĆ III. ZMODYFIKOWANE BADANIE PRZESIEWOWE OECD (Metoda C.4-B)

III.1. ZASADA METODY

Zmierzoną objętość podłoża mineralnego zawierające znane stężenie substancji badanej (10-40 mg DOC/litr) jako nominalne pojedyncze źródło węgla organicznego, zaszczerpiono za pomocą 0,5 ml wycieku na litr podłoża. Mieszaninę napowietrza się w ciemności lub w rozproszonym świetle w 22 ± 2 °C.

Postępującą degradację określa się analizą DOC w częstych przedziałach czasowych przez 28 dni. Stopień biodegradacji jest obliczany przez wyrażenie stężenia usuniętego DOC (skorygowanego do tego ze ślepej próby inokulum w kontroli) jako procent stężenia obecnego początkowo. Stopień pierwotnej biodegradacji może być także obliczony z dodatkowych analiz chemicznych wykonanych na początku i pod koniec inkubacji.

III.2. OPIS METODY

III.2.1. **Przyrząd**

- a) Kolby stożkowe, np. 250 ml do 2 l, w zależności od objętości wymaganej dla analizy DOC;
- b) Wyrząsarka do akomodacji kolb stożkowych, albo z automatyczną kontrolą temperatury albo używaną w stałej temperaturze pokojowej, oraz wystarczająca moc dla utrzymania aerobowych warunków we wszystkich kolbach;
- c) Przyrząd filtracyjny z odpowiednimi membranami;
- d) Analizator DOC;
- e) Przyrząd dla oznaczania rozpuszczonego tlenu;
- f) Wirówka.

III.2.2. **Przygotowanie podłoża mineralnego**

W celu przygotowania roztworów podstawowych, patrz I.6.2.

Zmieszać 10 ml roztworu (a) z 80 ml wody rozcieńczającej, dodać 1 ml roztworu (b) do (d) i dopełnić do 1 litra wodą rozcieńczającą.

Niniejsza metoda wykorzystuje tylko 0,5 ml wycieku/litr jako inokulum i dlatego podłoże może wymagać wzmocnienia śladowymi pierwiastkami i czynnikami wzrostu. Wykonuje się to przez dodanie 1 ml każdego z następujących roztworów, na litr końcowego podłoża:

Roztwór pierwiastków śladowych:

Siarczan manganu tetrawodny, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
Kwas borowy, H_3BO_3	57,2 mg
Siarczan cynku heptawodny, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
Heptamolibdenian amonu $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24}$	34,7 mg
Fe-chelata (FeCl_3) kwasu etylenodiaminotetraoctowego	100,0 mg
Rozpuścić w, i dopełnić do 1 000 ml wodą rozcieńczającą	

Roztwór witaminowy:

Ekstrakt drożdży	15,0 mg
------------------	---------

Rozpuścić ekstrakt drożdży w 100 ml wody. Sterylizować przez przepuszczenie przez membranę 0,2 mikrona, lub przygotować na świeżo.

III.2.3. **Przygotowanie wstępne inokulum**

Inokulum może być otrzymane z ścieków drugiego stopnia oczyszczalni ścieków lub urządzeń skali laboratoryjnej przyjmujących głównie ścieki domowe (patrz I.6.4.2. i I.6.5.)

Stosuje się 0,5 ml na litr podłoża mineralnego.

III.2.4. **Przygotowanie kolb**

Jako przykład, wprowadzić porcje 800 ml podłoża mineralnego do 2 litrowych kolb stożkowych i dodać wystarczające objętości roztworów podstawowych substancji badanej i odniesienia do oddzielnych kolb dla uzyskania stężenia równoważnika chemicznego do 10-40 mg DOC/l. Sprawdzić wartość pH i ustawić, gdy konieczne do 7,4. Zaszczepić kolby wyciekami ściekowym 0,5 ml/litr (patrz I.6.4.2). Przygotować także kontrole inokulum w podłożu mineralnym lecz bez badanej substancji i chemicznej substancji odniesienia.

Jeśli wymagane, użyć jedno naczynie dla sprawdzenia możliwych działań inhibicyjnych substancji badanej przez inokulację roztworu zawierającego w podłożu mineralnym, porównywalne stężenia substancji tak badanej, jak i chemicznej substancji odniesienia. Także jeżeli jest to wymagane, ustawić następną sterylną kolbę dla sprawdzenia czy badana substancja degradowa się abiotycznie, używając niezaszczepioną roztwór substancji chemicznej (patrz I.6.6.).

Dodatkowo, jeżeli podejrzewa się że badana substancja zostanie zaabsorbowana znacząco w szkło, osadzie itp., wykonać wstępną ocenę prawdopodobnego wzrostu absorpcji, a zatem przydatności badania dla substancji chemicznej (patrz tabela 1). Nastawić kolby zawierające substancję badaną, inokulum i środek sterylizujący.

Dopełnić objętość we wszystkich kolbach do 1 litra podłożem mineralnym i, po wymieszaniu, pobrać próbkę z każdej kolby do oznaczenia początkowego stężenia DOC (patrz załącznik II.4). Przykryć otwory kolb np. aluminiową folią, w taki sposób by umożliwić swobodną wymianę powietrza między kolbą i otaczającą atmosferą. Następnie włożyć naczynia do wytrząsarki celem rozpoczęcia badania.

III.2.5. **Liczba kolb w typowym przebiegu**

Kolby 1 i 2: Zawiesina badana

Kolby 3 i 4: Ślepa próba inokulum

Kolba 5: Kontrola procedury

i zalecane oraz gdy konieczne:

Kolba 6: Kontrola sterylności abiotycznej

Kolba 7: Kontrola adsorpcji

Kolba 8: Kontrola toksyczności

Patrz także I.6.7.

III.2.6. **Przeprowadzenie badania**

Poprzez całe badanie oznaczać stężenia DOC w każdej kolbie duplikatu w znanych odstępach czasu, wystarczająco często, by można było oznaczyć 10-dniowe „okno” i usunięcie procentowe na koniec 10-dniowego „okna”. Pobrać tylko minimalną objętość zawiesiny badanej konieczną dla każdego oznaczenia.

Przed pobieraniem próbek zmniejszyć straty parowania z kolb przez dodanie wody rozcieńczającej (I.6.1) w wymaganej ilości, jeśli konieczne. Zamieszać energicznie podłoże kultury przed pobraniem próbki i upewnić się że materiał przylegający do ścianek naczynia jest rozpuszczony lub zawieszony, przed pobieraniem próbek. Przefiltrować przez filtr membranowy lub odwirować (patrz załącznik II.4) natychmiast po pobraniu próbek. Analizować odfiltrowane lub odwirowane próbki tego samego dnia, w innym razie przechować w 2-4 °C przez maksimum 48 godzin, lub w niższej temperaturze - 18 °C przez czas dłuższy.

III.3. **DANE AND SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA**

III.3.1. **Obróbka wyników**

Obliczyć procentową degradację w czasie t jak podano w I.7.1. (oznaczanie DOC) i, do wyboru, pod I.7.2. (właściwa analiza).

Zapisać wszystkie wyniki na dołączonych arkuszach danych.

III.3.2. **Ważność wyników**

Patrz I.5.2.

III.3.3. **Sporządzanie sprawozdania**

Patrz I.8.

III.4. ARKUSZ DANYCH

Przykład arkusza danych podano poniżej.

ZMODYFIKOWANE OECD BADANIE PRZESIEWOWE**1. LABORATORIUM****2. DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA****3. SUBSTANCJA BADANA**

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: mg/litr jako substancja chemiczna

Początkowe stężenie w podłożu, t_0 : mg/litr jako substancja chemiczna

4. INOKULUM

Źródło:

Poddano traktowaniu:

Wstępne sezonowanie, jeśli wykonano:

Stężenie zawiesiny ciał stałych w mieszaninie reakcyjnej: mg/l

5. OZNACZENIA WĘGLA

Analizator węgla:

	Kolba nr		DOC po n dniach (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Badana substancja chemiczna plus inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, średnia $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, średnia $C_{b(t)}$					
Ślepa próba inokulum bez badanej substancji	3	c_1					
		c_2					
		c, średnia $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, średnia $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. OCENA DANYCH PIERWOTNYCH

Kolba nr		% degradacja po n dniach				
		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				
Średnia ⁽¹⁾	$D = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

⁽¹⁾ D₁ i D₂ nie mogą być uśredniane jeżeli znacznie się różnią.

Uwaga: podobne arkusze można stosować dla chemicznej substancji odniesienia i kontroli toksyczności.

7. KONTROLA ABIOTYCZNA (do wyboru)

	Czas (dni)	
	0	t
DOC cone, (mg/l) kontrola sterylności	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ abiotyczna degradacja} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. WŁAŚCIWA ANALIZA CHEMICZNA (do wyboru)

	ilość pozostałości badanej substancji na koniec badania (mg/l)	% pierwotna degradacja
Kontrola sterylności	S _b	
Zaszczepione podłoże badawcze	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

CZĘŚĆ IV. BADANIE WYDZIELANIA CO₂ (Metoda C.4-C)**IV.1. ZASADA METODY**

Zmierzoną objętość zaszczipionego podłoża mineralnego zawierającego znane stężenie badanej substancji (10-20 mg DOG lub TOC/l) jako nominalne pojedyncze źródło węgla organicznego jest napowietrzane przez przepuszczanie powietrza wolnego od ditlenku węgla z kontrolowaną szybkością w ciemności lub rozproszonym świetle. Degradacja jest prowadzona przez 28 dni przez oznaczanie wytwarzanego ditlenku węgla, który jest pochłaniany w wodorotlenku sodowym lub barowym i mierzony za pomocą miareczkowania pozostałego wodorotlenku lub jako nieorganiczny węgiel. Ilość ditlenku węgla wydzielonego z badanej substancji (skorygowana dla tej uzyskanej ze ślepej próby inokulum) jest wyrażana jako procent ThCO₂. Stopień biodegradacji można także obliczyć z dodatkowej analizy DOG wykonanej na początku i końcu inkubacji.

IV.2. OPIS METODY**IV.2.1. Przyrząd**

- a) Kolby, 2-5 litra, każda zaopatrzona w rurkę napowietrzającą sięgającą blisko dna naczynia i w wylot;
- b) Mieszadła magnetyczne przy ocenie słabo rozpuszczalnych substancji chemicznych;
- c) butle absorpcji gazu;
- d) Urządzenia do kontroli i pomiaru przepływu powietrza;
- e) Przyrząd do przemywania ditlenku węgla, dla przygotowania powietrza wolnego od ditlenku węgla; alternatywnie mieszanina tlenu i azotu wolnych od ditlenku węgla z butli gazowych, używane w prawidłowej proporcji (20% O₂;80% N₂);
- f) Przyrząd do oznaczania ditlenku węgla, albo miareczkowaniem albo jedną z postaci analizatora węgla nieorganicznego;
- g) Urządzenie filtracji membranowej (do wyboru);
- h) Analizator DOG (do wyboru).

IV.2.2. Przygotowanie podłoża mineralnego

W celu przygotowania roztworów podstawowych, patrz I.6.2.

Zmieszać 10 ml roztworu (a) z 800 ml wody rozcieńczającej, dodać 1 ml roztworu (b) do (d) i dopełnić do 1l wodą rozcieńczającą.

IV.2.3. Przygotowanie wstępne inokulum

Inokulum można otrzymać z różnych źródeł: aktywowany osad; ścieki kanalizacyjne; wody powierzchniowe; gleby lub z mieszaniny tu wymienionych.

Patrz I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. i I.6.5.

IV.2.4. Przygotowanie kolb

Przykładowo wskazano następujące objętości i wagi dla 5 litrowych kolb zawierających 3 litry zawiesiny. Jeżeli używa się mniejszych objętości, należy je odpowiednio zmodyfikować, ale należy zapewnić że utworzony ditlenek węgla zostanie zmierzony dokładnie.

Do każdej 5 litrowej kolby dodać 2 400 ml podłoża mineralnego. Dodać odpowiednią objętość przygotowanego aktywowanego osadu (patrz I.6.4.1. i I.6.5.) dla otrzymania stężenia zawiesiny ciał stałych nie większego niż 30 mg/l w końcowej 3-litrowej zaszczipionej mieszaninie.

Alternatywnie, rozcieńczyć wpięrow przygotowany osad do uzyskania zawiesiny 500-1 000 mg/l w podłożu mineralnym przed dodaniem podwielokrotności do zawartości 5 litrowej kolby, dla uzyskania stężenia 30 mg/l; zapewnia to większą dokładność. Można użyć innych źródeł inokulum (patrz I.6.4.2.).

Napowietrzać te zaszczepione mieszaniny powietrzem wolnym od ditlenku węgla przez noc celem przepłukania systemu z ditlenku węgla.

Dodać badany materiał oraz substancje odniesienia oddzielnie, jako znaną objętość roztworów podstawowych, do replikowanych kolb dla uzyskania stężeń wnoszących udział przez dodane substancje chemiczne, 10 do 20 mg DOC lub TOC/l; pozostawić kilka kolb bez dodawania substancji chemicznych jako kontrole inokulum. Dodać badane słabo rozpuszczalne substancje bezpośrednio do kolb na podstawie masy lub objętości lub postępować jak opisano w załączniku III.

Jeżeli wymagane, użyć jedną kolbę do sprawdzenia możliwego działania inhibicyjnego badanej substancji przez dodanie zarówno badanej jak i substancji odniesienia, w tych samych stężeniach jak obecne w innych kolbach.

Także, jeżeli wymagane, użyć sterylnej kolby do sprawdzenia czy badana substancja jest degradowana abiotycznie przez użycie niezaszczepionego roztworu substancji chemicznej (patrz I.6.6.). Sterylizować przez dodanie substancji toksycznej o odpowiednim stężeniu.

Dopełnić objętości zawiesin we wszystkich kolbach do 3l dodając podłoże mineralne uprzednio napowietrzone powietrzem wolnym od CO₂. Jako alternatywa, można pobrać próbki do analizy DOC (patrz załącznik II.4.) i/lub właściwej analizy. Podłączyć butle absorpcyjne do wylotów powietrza kolb.

Jeżeli używany jest wodorotlenek baru, połączyć trzy butle absorpcyjne, każda zawierająca 100 ml 0,0125 M roztworu wodorotlenku baru, w seriach do każdej 5-litrowej kolby. Roztwór musi być wolny od wytrąconych siarczanów oraz węglanów i jego stężenie musi być oznaczone bezpośrednio przed użyciem. Jeżeli używa się wodorotlenek sodu, podłączyć dwie pułapki, druga działa jako kontrola pokazania że cały ditlenek węgla został zaabsorbowany w pierwszej. Butle absorpcyjne wyposażone w zamknięcia typu kropłówkowego są odpowiednie. Dodać 200 ml 0,05 M wodorotlenku sodu do każdej butli, która jest odpowiednia do zaabsorbowania całkowitej ilości ditlenku węgla wydzielonego po całkowitej degradacji badanej substancji. Roztwory wodorotlenku sodu, nawet świeżo przygotowane mogą zawierać ślady węglanów; jest to korygowane przez odjęcie węglanów ze ślepej próby.

IV.2.5. Liczba kolb w typowym przebiegu

Kolby 1 i 2: Zawiesina badana

Kolby 3 i 4: Ślepa próba inokulum

Kolba 5: Kontrola procedury

oraz zalecane i gdy konieczne:

Kolba 6: Kontrola sterylności abiotycznej

Kolba 7: Kontrola toksyczności

Kolba 8: Kontrola toksyczności

Patrz także I.6.7.

IV.2.6. Przeprowadzenie badania

Rozpocząć badanie przez wpuszczenie pęcherzyków powietrza wolnego od ditlenku węgla przez zawiesiny z szybkością 30-100 ml/min. Pobierać próbki absorbenta ditlenku węgla okresowo do analiz na zawartość CO₂. W trakcie pierwszych dziesięciu dni, zalecane jest by analizy były wykonywane co drugi lub trzeci dzień, a następnie co pięty, aż do 28 dnia, tak by okres 10-dniowego okna był zidentyfikowany.

W dniu 28, pobrać próbki (do wyboru) do analizy DOC i/lub właściwej analizy, pomierzyć pH zawiesin i dodać 1 ml stężonego kwasu solnego do każdej kolby; napowietrzać przez noc do wypędzenia ditlenku węgla obecnego w badanych zawiesinach. Dnia 29 wykonać analizę wydzielonego ditlenku węgla.

W dniu pomiaru CO₂, rozłączyć absorber wodorotlenku baru najbliższy kolby i zmiareczkować roztwór wodorotlenku za pomocą HCl 0,05 M stosując fenoloftaleinę jako wskaźnik. Przesunąć pozostałe absorbery o jedno miejsce bliżej kolby i umieścić nowy absorber zawierający 100 ml świeżego 0,0125 M wodorotlenku baru na dalszym końcu serii. Wykonać miareczkowania według potrzeby, na przykład, gdy podstawowe strącenie jest widoczne w pierwszej pułapce i przed strąceniem w drugim, lub co najmniej co tydzień. Alternatywnie, z NaOH jako absorbentem, pobrać strzykawką małą próbkę (w zależności od charakterystyki stosowanego analizatora węgla) roztworu wodorotlenku sodu z absorbera najbliższego kolbie. Wstrzyknąć próbkę do części IC analizatora węgla do bezpośredniej analizy wydzielonego ditlenku węgla.

Analizować zawartość drugiej pułapki tylko na koniec badania dla skorygowania przenoszenia ditlenku węgla.

IV.3. DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

IV.3.1. Obróbka wyników

Ilość CO₂ zatrzymana w absorberze przy miareczkowaniu jest dana przez:

$$\text{mgCO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

gdzie:

V = objętość HCl użytego do miareczkowania 100 ml w absorberze (ml),

C_B = stężenie roztworu wodorotlenku baru (M),

C_A = stężenie roztworu kwasu solnego (M),

jeśli C_B wynosi 0,0125 M i C_A jest 0,05 M, miareczkowanie 100 ml wodorotlenku baru daje 50 ml, a waga CO₂ jest dana przez:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl miareczkującego} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Zatem, w tym przypadku, dla przeliczenia objętości HCl miareczkującego na wytworzone miligramy CO₂, współczynnik wynosi 1,1.

Obliczyć wagi wytworzonego CO₂ z samego inokulum oraz z inokulum plus badana substancja używając odnośne wartości miareczkowania, a różnica jest wagą CO₂ wytworzonego przez samą badaną substancję.

Przykładowo, jeżeli samo inokulum daje zmiareczkowane 48 ml oraz inokulum plus badana substancja daje 45 ml,

$$\text{CO}_2 \text{ z inokulum} = 1,1 \times (50-48) = 2,2 \text{ mg}$$

$$\text{CO}_2 \text{ z inokulum plus badana substancja} = 1,1 \times (50-45) = 5,5 \text{ mg}$$

Zatem waga CO₂ wytworzonego z badanej substancji wynosi 3,3 mg.

Procentowa biodegradacja jest obliczana z:

$$\% \text{ degradacja} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ wytworz} \times 100}{\text{ThCO}_2 \times \text{mg dodanej substancji badanej}}$$

lub,

$$\% \text{ degradacja} = \frac{\text{mgCO}_2 \text{ wytworzony} \times 100}{\text{mg TOC dodanego w badaniu} \times 3,67}$$

3,67 istniejący współczynnik konwersji (44/12) węgla do ditlenku węgla.

Uzyskać procentową degradację po każdym przedziale czasu przez dodanie stosunków procentowych wartości ThCO_2 obliczonych dla każdego z dni, do czasu w ja zmierzono.

Dla absorberów z wodorotlenkiem sodu, obliczyć ilość wytworzonego ditlenku węgla, wyrażając jako IC (mg), przez pomnożenie stężenia IC w absorbencie przez objętość absorbenta.

Obliczyć procentową degradację z:

$$\% \text{ThCO}_2 = \frac{\text{mg IC z badanej kolby} - \text{mg IC ześlepej próby}}{\text{mg TOC dodanego jako substancja badana}} \times 100$$

Obliczyć usunięcie DOC (do wyboru) jak opisano pod I.7. Zapisać te i wszystkie inne wyniki na przygotowanych arkuszach danych.

IV.3.2. **Ważność wyników**

Zawartość IC zawiesiny badanej substancja w podłożu mineralnym na początku badania musi być mniejsza niż 5% wartości TC, a całkowite wydzielanie CO_2 w ślepej próbie z inokulum na końcu badania nie powinna zwykle przekraczać 40 mg/l podłoża. Jeżeli uzyskuje się wartości wyższe niż 70 mg CO_2 /litr, dane i technika eksperymentalna muszą być krytycznie przebadane.

Patrz także I.5.2.

IV.3.3. **Sporządzanie sprawozdania**

Patrz I.8.

IV.4. **ARKUSZ DANYCH**

Przykład arkusza danych podano poniżej.

BADANIE WYDZIELANIA DITLENKU WĘGLA

1. LABORATORIUM

2. DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA

3. SUBSTANCJA BADANA

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: mg/litr jako substancja chemiczna

Wstępne stężenie. w podłożu: mg/litr jako substancja chemiczna

Całkowity C dodany do kolby: mg C

ThCO_2 : mg CO_2

4. INOKULUM

Źródło:

Poddano traktowaniu:

Przygotowanie wstępne o ile stosowano:

Stężenie zawiesiny ciał stałych w mieszaninie reakcyjnej: mg/litr

5. WYTWARZANIE DITLENKU WĘGLA I DEGRADOWALNOŚĆ

Metoda: Ba(OH)₂/NaOH/inne

Czas (dzień)	CO ₂ utworzone- go w badaniu (mg)		CO ₂ utworzonego w ślepej próbie (mg)		CO ₂ utworzony zbiorczo (mg) (badanie minus średnia ślepej próby)		ThCO ₂ $\frac{\text{zbiorczo CO}_2}{\text{ThCO}_2} \times 100$		
	1	średnia	3	średnia	1	2	1	2	średnia
	2		4						
0									
n ₁									
n ₂									
n ₃									
28									

Uwaga: podobne arkusze mogą być używane dla chemicznej substancji odniesienia i kontroli toksyczności

6. ANALIZA WĘGLA (do wyboru)

Analizator węgla:

Czas (dzień)	Ślepa próba mg/l	Badana substancja chemiczna mg/l
0	C _{b(o)}	C _o
28 (l)	C _{b(t)}	C _t
(l) lub w końcu inkubacji		

$$\% \text{ DOC usuniętego} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}} \right) \times 100$$

7. DEGRADACJA ABIOTYCZNA (do wyboru)

$$\% \text{ abiotycznej degradacji} = \frac{\text{CO}_2 - \text{CO}_2 \text{ utworzonego w kolbie (starlite) po 28 dniach (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

CZĘŚĆ V. BADANIE RESPIROMETRII MANOMETRYCZNEJ (Metoda C.4.D)**V.1. ZASADA METODY**

Zmierzona objętość zaszczerpionego podłoża mineralnego, zawierającego znane stężenie badanej substancji (100 mg/litr substancji badanej, dająca co najmniej 50-100 mg ThOD/litr) jako nominalnego pojedynczego źródła węgla organicznego, jest mieszana w zamkniętej kolbie w stałej temperaturze ($\pm 1^\circ \text{C}$ lub bliżej) do 28 dnia włącznie. Zużycie tlenu jest oznaczane albo przez pomiary ilości tlenu (wytwarzanego elektrolitycznie) wymaganego do utrzymania stałej objętości gazu w kolbie respirometru, lub przez zmianę w objętości lub ciśnieniu (lub w kombinacji dwóch) w aparacie. Wydzielany ditlenek węgla jest absorbowany w roztworze wodorotlenku potasu lub w innym odpowiednim absorbencie. Ilość tlenu pobrana przez badaną substancję (skorygowana o pobór w ślepej próbie z inokulum, biegnącej równolegle) jest wyrażana jako stosunek procentowy ThOD lub COD. Alternatywnie, pierwotna biodegradacja może być także obliczona z dodatkowych właściwych analiz wykonanych na początku i końcu inkubacji, i ostatecznie przez analizę DOC.

V.2. OPIS METODY**V.2.1. Przyrząd**

- a) odpowiedni respirometr;
- b) regulator temperatury, utrzymujący $\pm 1^\circ \text{C}$ lub lepszą;
- c) urządzenie do filtracji membranowej (do wyboru);
- d) analizator węgla (do wyboru).

V.2.2. Przygotowanie podłoża mineralnego

W celu przygotowania roztworów podstawowych, patrz I.6.2.

Zmieszać 10 ml roztworu (a) z 800 ml wody rozcieńczającej, dodać 1 ml roztworu (b) do (d) i dopełnić do 1 litra wodą rozcieńczającą.

V.2.3. Przygotowanie i przygotowanie wstępne inokulum

Inokulum może być uzyskane z różnych źródeł: aktywowany osad; ścieki kanalizacyjne; wody powierzchniowe i gleby lub mieszanina wymienionych.

Patrz I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. i I.6.5.

V.2.4. Przygotowanie kolb

Przygotować roztwory badane oraz chemicznej substancji odniesienia, w oddzielnych partiach, w podłożu mineralnym równoważnym stężeniu, zwykle 100 mg substancji chemicznej/litr (dający co najmniej 50-100 mg ThOD/litr), stosując roztwory podstawowe.

Obliczyć ThOD na podstawie tworzenia się soli amonowych, poza spodziewaną nityfikacją, dla której należy oprzeć obliczenia na tworzeniu się azotanów (patrz załącznik II.2.)

Oznaczyć wartości pH i jeśli konieczne ustawić na $7,4 \pm 0,2$.

Substancje słabo rozpuszczalne należy dodawać na dalszym etapie (patrz poniżej).

Jeżeli ma być ustalona toksyczność badanej substancji, przygotować dalszy roztwór z podłoża mineralnego zawierającego zarówno substancję badaną jak i chemiczną substancję odniesienia o tych samych stężeniach co w poszczególnych roztworach.

Jeżeli wymagany jest pomiar fizyko - chemicznego poboru tlenu, przygotować roztwór badanej substancji zwykle 100 mg ThOD/litr który został sterylizowany dodatkiem odpowiedniej toksycznej substancji (patrz I.6.6.).

Wprowadzić konieczne objętości roztworów badanej substancji i chemicznej substancji odniesienia, odpowiednio, w co najmniej zdublowanych kolbach. Dodać do następnych kolb tylko podłoże mineralne (dla kontroli inokulum) i, jeśli wymagane, zmieszane roztwory substancja badana/substancja odniesienia i roztwór sterylny.

Jeśli badana substancja chemiczna jest słabo rozpuszczalna, dodać ją bezpośrednio na niniejszym etapie na podstawie wagi lub objętości lub postępować jak opisano w dodatku III. Dodać wodorotlenek potasu, tabletki wapna sodowanego lub innego absorbenta do zbiorników absorbera CO₂.

V.2.5. Liczba kolb w typowym przebiegu

Kolby 1 i 2: Zawiesina badana

Kolby 3 i 4: Ślepa próba inokulum

Kolba 5: Kontrola procedury

Zalecane i gdy konieczne:

Kolba 6: kontrola sterylności

Kolba 7: Kontrola toksyczności

Kolba 8: Kontrola toksyczności

Patrz także I.6.7.

V.2.6. Przeprowadzenie badania

Pozwolić na uzyskanie przez naczynia żądanej temperatury i zaszcześcić odpowiednie naczynia przygotowanym aktywowanym osadem lub innym źródłem inokulum by otrzymać stężenie zawiesiny ciał stałych nie większe niż 30 mg/litr. Zestawić wyposażenie, włączyć mieszanie i sprawdzić szczelność, rozpocząć pomiar pobierania tlenu. Zwykle niewymagana jest dalsza uwaga inna niż zbieranie koniecznych danych i wykonywanie codziennych sprawdzeń czy jest utrzymywane są właściwa temperatura i stosowne mieszanie.

Obliczyć pobieranie tlenu z odczytów zbieranych w regularnych i częstych przedziałach czasowych, stosując metody podane przez producenta wyposażenia. Pod koniec inkubacji, zwykle 28-dniowej, zmierzyć pH zawartości kolb, szczególnie jeśli pobieranie tlenu jest niższe lub większe niż ThOD_{NH4} (dla związków zawierających azot).

Jeżeli wymagane, pobrać próbki z kolb respiratora, początkowej i końcowej, do analizy DOC lub właściwej chemicznej (patrz załącznik II.4). Przy początkowym pobieraniu, upewnić się że objętość zawiesiny badanej pozostającej w kolbie jest znana. Gdy tlen zostanie pobrany przez substancję badaną zawierającą azot, oznaczyć wzrost stężenia azotynów oraz azotanów przez okres 28 dni i obliczyć poprawkę dla tlenu zużytego przez nityfikację (załącznik V).

V.3. DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

V.3.1. Obróbka wyników

Podzielić pobór tlenu (mg) przez badaną substancję po danym czasie (skorygować o tę ze ślepej kontroli inokulum po tym samym czasie) przez wagę użytej badanej substancji. Da to BOD wyrażone jako mg tlenu/mg badanej substancji, czyli

$$\text{BOD} = \frac{\text{mgO}_2 \text{ pobór przez badaną substancję} - \text{mg O}_2 \text{ pobrane w ślepej próbie}}{\text{mg badanej substancji w kolbie}}$$

$$= \text{mg O}_2 \text{ na mg badanej substancji.}$$

obliczyć procentową biodegradację albo z:

$$\% \text{ biodegradacja} = \% \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg subst. badanej})}{\text{ThOD}(\text{mg O}_2/\text{mg subst. badanej})} \times 100$$

lub postaci

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg subst. badanej})}{\text{ThOD}(\text{mg O}_2/\text{mg subst. badanej})} \times 100$$

Należy zauważyć że te dwie metody niekoniecznie muszą dawać te same wartości; korzystniejsze jest użycie pierwszej metody.

Dla badanych substancji zawierających azot stosuje się odpowiednie ThOD (NH_4 lub NO_3) zgodnie z tym co jest znane lub oczekiwane o zajściu nitrifikacji (załącznik II.2). Jeżeli nitrifikacja zachodzi, lecz nie jest całkowita, obliczyć poprawkę dla tlenu zużytego przez nitrifikację ze zmian w stężeniu azotanów i azotanów (załącznik V).

Gdy wykonano alternatywne oznaczenia węgla organicznego i/lub właściwej substancji chemicznej, obliczyć procentową degradację, jak opisano pod I.7.

Zapisać wszystkie wyniki na dołączonych arkuszach danych.

V.3.2. **Ważność wyników**

Pobieranie tlenu w ślepej próbie z inokulum jest zwykle 20-30 mg O_2 /litr i powinno być niewiększe niż 60 mg/litr w ciągu 28 dni. Wartości wyższe od 60 mg/litr wymagają krytycznego sprawdzenia danych i technik eksperymentalnych. Jeżeli wartość pH jest poza zakresem 6-8,5 a zużycie tlenu przez badaną substancję jest mniejsze niż 60%, należy powtórzyć badanie z niższym stężeniem badanej substancji.

Patrz także I.5.2.

V.3.3. **Sporządzanie sprawozdania**

Patrz 1.8.

V.4. **ARKUSZ DANYCH**

Przykład arkusza danych podano poniżej.

BADANIE RESPIROMETRII MANOMETRYCZNEJ

1. LABORATORIUM

2. DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA

3. SUBSTANCJA BADANA

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: mg/litr

Początkowe stężenie w podłożu, C_0 : mg/litr

Objętość w kolbie do badań (V): ml

ThOD lub COD: mg O_2 /mg substancji badanej (NH_4 , NO_3)

4. INOKULUM

Źródło:

Poddano traktowaniu:

Wstępne sezonowanie, o ile wykonano:

Stężenie zawiesiny ciał stałych w mieszaninie reakcyjnej: mg/l

5. POBÓR TLENU: BIODEGRADOWALNOŚĆ

		Czas (dni)											
		0		7		14			21			28	
O ₂ pobór (mg) badana substancja	1												
	2												
	a, średnia												
O ₂ pobór (mg)	3												
	4												
	b, średnia												
skorygowane BOD (mg)	(a ₁ - b _m)												
	(a ₂ - b _m)												
BOD na mg badanej substancji	$\frac{(a_1 - b)}{C_0 V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_0 V}$												
% degradacja $\frac{\text{BOD}}{\text{ThOD}} \times 100$	D ₁ (a ₁)												
	D ₂ (a ₂)												
	średnia (!)												
V = objętość podłoża w kolbie do badań													

(!) D₁ i D₂ nie należy uśredniać jeśli się znacząco różnią.

Uwaga: Podobne arkusze używać można do chemicznej substancji odniesienia i kontroli toksyczności

6. POPRAWKA DLA NITRYFIKACJI (patrz załącznik V)

Dzień	0	28	Różnica
(i) Stężenie azotanów (mg N/litr)			(N)
(ii) równoważnik tlenu (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii) Stężenie azotynów (mg N/litr)			(N)
(iv) równoważnik tlenu (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv) Całkowity równoważnik tlenu	—	—	

7. ANALIZA WĘGLA (alternatywna)

Analizator węgla:

Czas (dzień)	Ślepa próba mg/litr	Badana substancja chemiczna mg/litr
0	(C _{blo})	(C _o)
28 (!)	(C _{blt})	(C _t)
(!) lub w końcu inkubacji		

$$\% \text{ DOC usuniętego} = \left(1 - \frac{C_t - C_{\text{blt}}}{C_o - C_{\text{blo}}} \right) \times 100$$

8. WŁAŚCIWA CHEMICZNA (alternatywna)

S_b = stężenie w fizyko - chemicznej (sterylnej) kontroli w 28 dniu

S_a = stężenie w zaszczepionej kolbie w 28 dniu

$$\% \text{ biodegradacji} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. DEGRADACJA ABIOTYCZNA (alternatywna)

a = zużycie tlenu w sterylnej kolbie po 28 dniach, (mg)

$$\text{zużycie tlenu na mg badanej substancji} = \frac{a}{C_o V}$$

(patrz sekcje 1 i 3)

$$\% \text{ abiotyczna degradacja} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

CZĘŚĆ VI. BADANIE „ZAMKNIĘTEJ BUTLI” (Metoda C.4-E)

VI.1. ZASADA METODY BADANIA

Roztwór badanej substancji w podłożu mineralnym, zwykle 2-5 mg/litr, jest zaszczepiany relatywnie małą liczbą drobnoustrojów ze zmieszanej populacji i trzymany w całkowicie pełnej, zamkniętej butli w ciemności w stałej temperaturze. Degradacja jest oznaczana przez analizę rozpuszczonego tlenu przez okres czasu 28-dni. Ilość tlenu pobrana przez badaną substancję, skorygowany o pobór w równoległej ślepej próbie z inokulum, jest wyrażona jako stosunek procentowy ThOD lub COD.

VI.2. OPIS METODY

VI.2.1. Przyrząd

- a) Butle BOD, ze szklanymi korkami, np. 250-300 ml;
- b) Łaźnia wodna lub inkubator, dla trzymania butli w stałej temperaturze (± 1 °C lub lepiej) przy wyłączonym świetle;
- c) Duże szklane butle(2-5 litrów) dla przygotowania podłoża i napełniania butli BOD;
- d) Elektroda tlenowa i miernik, lub wyposażenie oraz odczynniki dla miareczkowania Winklera.

VI.2.2. Przygotowanie podłoża mineralnego

W celu przygotowania roztworów podstawowych, patrz 1.6.2.

Zmieszać 1 (jeden) ml roztworu (a) z (d) i dopełnić do 1 litra wodą rozcieńczającą.

VI.2.3. Przygotowanie inokulum

Inokulum jest zwykle uzyskiwane ze ścieku drugiego stopnia oczyszczalni ścieków lub urządzenia skali laboratoryjnej przyjmującego głównie ścieki domowe. Alternatywnym źródłem inokulum są wody powierzchniowe. Zwykle używa się od jednej kropli (0,05 ml) do 5 ml filtratu na litr podłoża; konieczne mogą być próby dla znalezienia optymalnej objętości danego wycieku (patrz I.6.4.2. i I.6.5.).

VI.2.4. Przygotowanie kolb

Silnie napowietrzyć podłoże mineralne na co najmniej 20 mm. Przeprowadzić każdą serię badań podłożem mineralnym pochodzącym z tej samej partii. Ogólnie, podłoże jest gotowe do użycia po odstaniu 20 h, w temperaturze badania. Oznaczyć stężenie rozpuszczonego tlenu do celów kontrolnych; wartość powinna wynosić około 9 mg/litr w 20 °C. Prowadzić wszystkie przenoszenia i operacje napełniania nasyconym podłożem wolnym od pęcherzyków, na przykład poprzez użycie syfonów.

Przygotować równoległe grupy butli BOD dla oznaczeń badanej i chemicznej substancji odniesienia w równoczesnych seriach doświadczalnych. Zestawić wystarczającą liczbę butli BOD, włączając ślepe próby inokulum, wykonać co najmniej zdublowane pomiary zużycia tlenu w pożądanych odstępach badawczych, na przykład po 0, 7, 14, 21 i 28 dniach. Dla zapewnienia zdolności identyfikacji 10-dniowego okna, wymagana jest większa ilość butli.

Dodać całkowicie napowietrzone podłoże mineralne do dużych butli, tak by były wypełnione w około jednej trzeciej. Następnie dodać wystarczającą ilość roztworu podstawowego badanej substancji i chemicznej substancji odniesienia do oddzielnych dużych butli tak by końcowe stężenie substancji chemicznej zwykle było niewiększe niż 10 mg/litr. Nie dodawać substancji chemicznej do podłoża kontrolnego ślepej próby zawartego w następnej dużej butli.

W celu zapewnienia że aktywność inokulum nie jest ograniczona, stężenie rozpuszczonego tlenu nie może być poniżej 0,5 mg/litr w butli BOD. To ogranicza stężenie badanej substancji do około 2 mg/litr. Jednakże dla słabo rozpuszczalnych związków i tych o niskim ThOD, 5-10 mg/litr można użyć. W kilku przypadkach jest zalecane przeprowadzenie równoległych serii badań badanej substancji o dwu różnych stężeniach na przykład, 2 i 5 mg/litr. Zwykle oblicza się ThOD na podstawie tworzenia się soli amonowych, lecz jeżeli oczekiwana lub znana jest fakt, że może zajść nityfikacja, oblicza się go na podstawie tworzenia azotanu ($\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$; patrz załącznik II.2). Jednakże, jeśli nityfikacja nie jest całkowita, ale zaszła, należy skorygować zmiany w stężeniu azotynu i azotanu, oznaczone analitycznie (patrz załącznik V).

Jeżeli jest do zbadania toksyczność badanej substancji (w przypadku na przykład, gdy znaleziono wcześniejsze wartości niskiej biodegradowalności) inna seria butli jest konieczna..

Przygotować inną dużą butlę do pomieszczenia napowietrzonego podłoża mineralnego (do około jednej trzeciej jej objętości) plus badana substancja i chemiczna substancja odniesienia o końcowych stężeniach zwykle takich samych jak w tych z innych dużych butli.

Zaszczepić roztwory w dużych butlach ściekiem drugiego stopnia (jedną kroplą (0,05 ml), lub do 5 ml/litr)) lub z innego źródła, na przykład wody rzecznej (patrz I.6.4.2.). Na koniec dopełnić roztwory do objętości napowietrzoną podłożem mineralnym stosując wąż wpuszczony na dno butli dla uzyskania odpowiedniego mieszania.

VI.2.5. Liczba kolb w typowym przebiegu

W typowym przebiegu stosuje się następujące butle:

co najmniej 10 zawierających badaną substancję i inokulum (zawiesina badana),

co najmniej 10 zawierających tylko inokulum (ślepa próba z inokulum),

co najmniej 10 zawierających chemiczną substancję odniesienia i inokulum (procedura kontroli),

i, gdy konieczne, 6 butli zawierających badaną substancję, chemiczną substancję odniesienia i inokulum (kontrola toksyczności). Jednakże dla zapewnienia zdolności identyfikacji 10-dniowego okna, konieczna może być około dwukrotnie większa ilość butli.

VI.2.6. Przeprowadzenie badania

Rozdzielić przygotowany roztwór niezwłocznie do odpowiednich grup butli BOD za pomocą węża z dolnej ćwiartki (nie z dna) do odpowiednio dużych butli tak aby wszystkie butle BOD zostały całkowicie napełnione. Postukać delikatnie by usunąć wszystkie pęcherzyki powietrza. Analizować butle o zerowym czasie niezwłocznie, na zawartość rozpuszczonego tlenu metodą Winkler lub elektrodowo. Zawartość butli może być zabezpieczona dla późniejszej analizy metodą Winklera przez dodanie siarczanu manganu (II) i wodorotlenku sodu (pierwszy odczynnik Winklera). Przechowywać w starannie zamkniętych, zawierających związany tlen jako brązowy uwodniony tlenek manganu (III), w ciemności w t 10-20 °C przez nie dłużej niż 24 godziny przed wykonaniem pozostałych kroków metody Winklera. Zakorkować pozostałe replikowane butle, upewniając się że nie zawierają pęcherzyków powietrza i inkubować w 20 °C w ciemności. Każdej serii musi towarzyszyć całkowita seria równoległa z zaszczepionymi podłożami ślepej próby. Wyjąć co najmniej zdublowane butle wszystkich serii w celu analizy rozpuszczonego tlenu w odstępach czasu (co najmniej cotygodniowo) przez 28 dni inkubacji.

Cotygodniowe pobieranie próbek powinno umożliwić ocenę stosunku procentowego usunięcia w 14-dniowym oknie, przy czym pobieranie próbek co 3-4 dni powinno umożliwić identyfikację 10-dniowego okna, wymaganego około podwójnie co większość butli.

Dla substancji badanych zawierających azot, należy wykonać korekty poboru tlenu przez każdą zachodzącą nityfikację. By to wykonać użyć metodę O₂-elektrody dla oznaczania stężenia rozpuszczonego tlenu i następnie pobrać próbkę z butli BOD do analizy na azotyny i azotany. Ze wzrostu stężenia azotynów i azotanów, obliczyć użyty tlen (patrz załącznik V).

VI.3. DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

VI.3.1. Obróbka wyników

Wpierw obliczyć BOD użyte po każdym okresie czasu przez odejmowanie zubożenia tlenu (mg/litr) ślepej próby z inokulum od tej wykazanej przez badaną substancję. Podzielić to poprawione zubożenie przez stężenie(mg/litr) badanej substancji, aby uzyskać właściwe BOD jako mg tlenu na mg badanej substancji. Obliczyć procentową biodegradowalność przez podzielenie właściwego BOD przez właściwe ThOD (obliczonego zgodnie z załącznikiem II.2) lub COD (oznaczonego przez analizę, patrz załącznik II.3), zatem:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg O}_2 \text{ pobranego przez badaną substancję} - \text{mg O}_2 \text{ pobranego w ślepej próbce}}{\text{mg badanej substancji w kolbie}}$$

$$= \text{mg O}_2/\text{mg badana substancja}$$

$$\% \text{ degradacji} = \frac{\text{BOD (mg O}_2/\text{mg badanej substancji)}}{\text{ThOD (mg O}_2/\text{mg badanej substancji)}} \times 100$$

lub

$$\% \text{ degradacji} = \frac{\text{BOD (mg O}_2/\text{mg badanej substancji)}}{\text{COD (mg O}_2/\text{mg badanej substancji)}} \times 100$$

Należy zauważyć, że te dwie metody niekoniecznie dają te same wartości; korzystne jest użycie pierwszej metody.

Dla badanych substancji zawierających azot, użyć odpowiednie ThOD (NH₄ lub NO₃) zgodnie z tym co jest znane lub oczekiwane o występowaniu nityfikacji (załącznik II.2). Jeżeli nityfikacja zachodzi lecz nie jest całkowita, obliczyć poprawkę dla tlenu zużytego przez nityfikację ze zmiany w stężeniu azotynów i azotanów (załącznik V).

VI.3.2. Ważność wyników

Zubożenie tlenu w ślepej próbce z inokulum nie powinno przekraczać 1,5 mg rozpuszczonego tlenu/litr po 28 dniach. Wyższe wartości wymagają przesłedzenia techniki eksperymentalnej. Reszkowe stężenie tlenu w badanych butlach nie powinno nigdy spaść poniżej 0,5 mg/litr. Takie niskie poziomy tlenu są ważne gdy stosowana metoda oznaczania rozpuszczonego tlenu jest zdolna do dokładnego pomiaru takich poziomów.

Patrz także I.5.2.

VI.3.3. Sporządzanie sprawozdania

Patrz I.8.

VI.4. ARKUSZ DANYCH

Przykład arkusza danych podano poniżej.

BADANIE METODĄ „ZAMKNIĘTEJ BUTLI”

1. LABORATORIUM

2. DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA

3. SUBSTANCJA BADANA

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: mg/litr

Początkowe stężenie w butli: mg/litr

ThOD lub COD: mg O₂/mg substancji badanej

4. INOKULUM

Źródło:

Poddano traktowaniu:

Przygotowanie wstępne o ile stosowano:

Stężenie w mieszaninie reakcyjnej: mg/litr

5. OZNACZANIE DO

Metoda: Winklera/elektrodowa

Analizy kolb

Czas inkubacji (d)			DO (mg/l)			
			0	n ₁	n ₂	
Ślepa próba (bez substancji chemicznej)	1	C ₁				
	2	C ₂				
Średnia	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Badana substan- cja chemiczna	1	a ₁				
	2	a ₂				
Średnia	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Uwaga: Podobny arkusz może być stosowany dla substancji odniesienia i kontroli toksyczności.

6. **POPRAWKA DLA NITRYFIKACJI** (patrz załącznik V)

Czas inkubacji (d)	0	n ₁	n ₂	n ₃
(i) Stężenie azotanu (mg N/litr)				
(ii) Zmiana w stężeniu azotanu (mg N/litr)	—			
(iii) Równoważnik tlenu (mg/litr)	—			
(iv) Stężenie azotynu (mg N/litr)				
(v) Zmiana w stężeniu azotynu (mg N/litr)	—			
(vi) Równoważnik tlenu (mg/litr)	—			
(iii + vi) Całkowity równoważnik tlenu (mg/litr)	—			

7. **ZUBOŻENIE DO: % DEGRADACJA**

	Zubożenie po n dniach (mg/litr)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
KOLBA 1: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				
KOLBA 2: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				
KOLBA 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{stężenie badane} \times \text{ThOD substancji chemicznej}}$				
KOLBA 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{stężenie badane} \times \text{ThOD substancji chemicznej}}$				
$\% D \text{ średnia}^{(1)} = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(¹) Nie brać średniej jeżeli jest znacząca różnica pomiędzy replikami.

m_{to} = wartość w badanej kolbie w czasie 0

m_{tx} = wartość w badanej kolbie w czasie x

m_{bo} = średnia wartość ślepej próby w czasie 0

m_{bx} = średnia wartość ślepej próby w czasie x

Zastosować także poprawkę dla nitryfikacji z (iii + vi) w sekcji 6.

8. **ZUBOŻENIA DO W ŚLEPYCH PRÓBACH**

Zużycie tlenu przez ślepa próbę: (m_{bo} — m_{b28}) mg/litr. Niniejsze zużycie jest istotne dla ważności naukowej badania. Powinno być mniejsze niż 1,5 mg/litr.

CZĘŚĆ VII. BADANIE M.I.T.I. (Metoda C.4-F)**VII.1. ZASADA METODY**

Pobieranie tlenu trakcie mieszania roztworu lub zawiesiny badanej substancji w podłożu mineralnym, zaszczipionego specjalnie hodowanymi, nieadaptowanymi drobnoustrojami, jest mierzone automatycznie w ciągu okresu 28 dni w zaciemnionym, zamkniętym respirometrze w 25 ± 1 °C. Wydzielany ditlenek węgla jest absorbowany przez wapno sodowane. Biodegradowalność jest wyrażana jako procent pobieranego tlenu (skorygowany dla poboru w ślepej próbie) poboru teoretycznego (ThOD). Procent pierwotnej biodegradowalności jest również obliczany z dodatkowej właściwej analizy chemicznej wykonywanej na początku i pod koniec inkubacji oraz, alternatywnie przez analizę DOC.

VII.2. OPIS METODY**VII.2.1. Przyrząd**

- a) Automatyczny elektrolityczny miernik BOD respirometr zwykle wyposażony w 6 butli, każda 300 ml i zaopatrzony w kubki na substancję absorbującą CO_2 ;
- b) Stała temperatura pokojowa i/lub łaźnia wodna $25 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ lub lepszej;
- c) Zespół filtracji membranowej (alternatywny);
- d) Analizator węgla (alternatywny).

VII.2.2. Przygotowanie podłoża mineralnego

Przygotować następujące roztwory podstawowe, stosując odczynniki czystości analitycznej i wodę (I.6.1.):

- | | | |
|----|---|---------|
| a) | diwodoroortofosforan potasu, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | monowodoroortofosforan dipotasu, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | monowodoroortofosforan disodu, dodekawodny $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ | 44,60 g |
| | chlorek amonu, NH_4Cl | 1,70 g |
| | Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra | |
| | Wartość pH roztworu powinna wynosić 7,2 | |
| b) | siarczan magnezu, heptawodny, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra | |
| c) | chlorek wapnia bezwodny, CaCl_2 | 27,50 g |
| | Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra | |
| d) | chlorek żelaza (III), heksawodny, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ | 27,50 g |
| | Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra | |

Pobrać 3 ml każdego roztworu (a), (b), (c) i (d) i dopełnić do 1 litra.

VII.2.3. Przygotowanie inokulum

Zebrać świeże próbki z nie więcej niż dziesięciu miejsc, głównie z obszarów, gdzie stosowana i unieszkodliwiana jest duża różnorodność substancji chemicznych. Z takich miejsc jak oczyszczalnie ścieków, oczyszczalnie ścieków wodnych przemysłowych, rzek, jezior, mórz, zebrać 1 litrowe próbki osadu, gleby powierzchniowej, wody itp. i dokładnie wymieszać. Po usunięciu ciał znajdujących się na powierzchni i odstawieniu, ustawić pH nadsącza na 7 ± 1 za pomocą wodorotlenku sodu lub kwasu fosforowego.

Użyć odpowiednią objętość odfiltrowanego nadsączu napełnienia zbiornika, służącego do napełniania i wylewania aktywowanego osadu, i napowietrzać roztwór około 23 1/2 godziny. Trzydzieści minut po wstrzymaniu napowietrzania, odrzucić około jednej trzeciej całej objętości nadsącza i dodać równą objętość roztworu (pH 7) zawierającego po 0,1% glukozy, peptonu i ortofosforanu potasu w celu zsedymetowania materiału i rozpocząć ponowne napowietrzanie. Powtarzać niniejszą procedurę raz dziennie. Zbiornik z osadem należy obsługiwać zgodnie z dobrą praktyką: ciecz musi być klarowna, temperaturę należy utrzymywać w 25 ± 2 °C, pH powinno wynosić 7 ± 1 , osad należy prawidłowo osadzać, należy utrzymywać wystarczające napowietrzanie mieszaniny aerobowej przez cały czas, powinny być obecne pierwotniaki a aktywność osadu należy badać względem substancji odniesienia co najmniej raz na trzy miesiące. Nie używać osadu jako inokulum, przed upływem co najmniej miesiąca jego utrzymywania i po okresie dłuższym od czterech miesięcy. Następnie pobierać próbki z co najmniej 10 miejsc w regularnych odstępach czasu, raz na trzy miesiące.

W celu utrzymania świeżego i starego osadu w tej samej aktywności, zmieszać odfiltrowany nadsącz aktywowanego bieżąco używanego osadu z równą objętością odfiltrowanego nadsącza z mieszaniny zebranej z dziesięciu źródeł i prowadzić kulturę połączonej cieczy jak powyżej. Pobrać osad do użycia jako inokulum 18-24 godzin po zasileniu zbiornika.

VII.2.4. Przygotowanie kolb

Przygotować następujące sześć kolb:

nr 1: badana substancja w wodzie rozcieńczającej w 100 mg/l

nr 2, 3 i 4: badana substancja w podłożu mineralnym w 100 mg/l

nr 5: chemiczna substancja odniesienia (np. anilina) w podłożu mineralnym w 100 mg/l

nr 6: tylko podłoże mineralne

Dodać słabo rozpuszczalną badaną substancję bezpośrednio na podstawie wagi lub objętości lub postępować jak opisano w załączniku III, poza przypadkiem gdy nie należy używać ani rozpuszczalników ani środków emulsyfikujących. Dodać absorbent CO₂ do wszystkich kolb w przygotowanych specjalnych kubkach. Ustawić pH w kolbach nr 2, 3 i 4 na 7,0.

VII.2.5. Przeprowadzenie badania

Zaszczepić kolby nr 2, 3 i 4 (zawiesina badana), nr 5 (kontrola aktywności) i nr 6 (inokulum ślepa próba) małą objętością inokulum by uzyskać stężenie 30 mg/l zawiesiny ciał stałych. Niedodawane jest inokulum do kolby nr 1, która służy jako kontrola abiotyczna. Zestawić wyposażenie, sprawdzić szczelność, włączyć mieszadła, i rozpocząć pomiar pobierania tlenu w warunkach ciemności. Codziennie sprawdzać temperaturę, mieszadła i rejestrator kulometrycznego pobierania tlenu, notować wszystkie zmiany w kolorze zawartości kolb. Bezpośrednio odczytywać pobieranie tlenu w sześciu kolbach odpowiednią metodą, na przykład z sześciopunktowego rejestratora drukującego krzywe BOD. Na koniec inkubacji, zwykle 28 dni, zmierzyć pH zawartości kolb i oznaczyć stężenie pozostałości badanej substancji i wszystkich pośrednich, a w przypadku substancji rozpuszczalnych w wodzie, stężenie DOC (załącznik II.4). Zwrócić szczególną uwagę w przypadku lotnych substancji chemicznych. Jeżeli przewidywana jest nityfikacja, oznaczyć jeżeli możliwe, stężenie azotynów i azotanów.

VII.3. DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

VII.3.1. Obróbka wyników

Podzielić ilość pobranego tlenu (mg) przez badaną substancję po danym czasie, (skorygować o wartość pobraną w ślepej próbie kontroli inokulum po tym samym czasie), przez wagę użytej badanej substancji. Daje to BOD wyrażone jako mg tlenu/mg badana substancja, czyli:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg O}_2 \text{ pobranego przez badaną substancję} - \text{mg O}_2 \text{ pobranego w ślepej próbie}}{\text{mg badanej substancji w kolbie}}$$

$$= \text{mg O}_2/\text{mg badana substancja.}$$

Procentowa biodegradacja jest zatem otrzymywana z:

$$\% \text{ biodegradacji} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg substancji})}{\text{ThOD}(\text{mg O}_2/\text{mg substancji})} \times 100$$

Dla mieszanin, obliczyć ThOD z analizy składników jak dla pojedynczych związków. Użyć odpowiednie ThOD (ThOD_{NH4} lub ThOD_{NO3}) w zależności czy nitrifikacja jest obecna czy ukończona (załącznik II.2). Jeżeli jednakże nitrifikacja zachodzi ale nie jest całkowita, wykonać poprawkę dla tlenu zużytego w nitryfikacji, wyliczonego ze zmian stężeń azotynów i azotanów (załącznik V).

Obliczyć procentową pierwotną biodegradację ze straty właściwej macierzystej substancji chemicznej (patrz I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

Jeżeli zaszła strata badanej substancji w kolbie nr 1 mierzącej fizyko - chemiczne usunięcie, zarejestrować to i użyć stężenia badanej substancji (S_b) po 28 dniach w tej kolbie dla obliczenia procentowej biodegradacji.

Jeżeli wykonano oznaczenia DOC (alternatywne), obliczyć ostateczną procentową biodegradację z:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100 \%$$

jak opisano w pkt I.7.1. Jeśli nie wystąpiła strata DOC w kolbie nr 1, mierzącej fizyko - chemiczne usunięcie, użyć stężenia DOC w niniejszej kolbie do obliczenia procentowej biodegradacji.

Zapisać wszystkie wyniki na dołączonych arkuszach danych.

VII.3.2. **Ważność wyników**

Pobieranie tlenu w ślepej próbie z inokulum jest zwykle 20-30 mg O₂/l i powinno być nie większe niż 60 mg/l w ciągu 28 dni. Wartości wyższe od 60 mg/l wymagają krytycznego sprawdzenia danych i technik eksperymentalnych. Jeżeli wartość pH jest poza zakresem 6-8,5 a zużycie tlenu przez badaną substancję jest mniejsze niż 60%, należy powtórzyć badanie z niższym stężeniem badanej substancji.

Patrz także I.5.2.

Jeżeli procentowa degradacja aniliny obliczona ze zużycia tlenu nie przekracza 40% po 7 dniach i 65% po 14 dniach, badanie uważane jest za nieważne.

VII.3.3. **Sporządzanie sprawozdania**

Patrz: I.8.

VII.4. **ARKUSZ DANYCH**

Przykład arkusza danych podano poniżej.

BADANIE MITI (I)

1. LABORATORIUM

2. DATA ROZPOCZĘCIA BADANIA

3. SUBSTANCJA BADANA

Nazwa:

Stężenie roztworu podstawowego: mg/l jako substancja chemiczna

Początkowe stężenie w podłożu, C_0 : mg/l jako substancja chemiczna

Objętość mieszaniny reakcyjnej, V: ml

ThOD: mg O_2 /l**4. INOKULUM**

Miejsca pobierania osadu kanalizacyjnego:

- | | |
|--------|---------|
| 1) ... | 6) ... |
| 2) ... | 7) ... |
| 3) ... | 8) ... |
| 4) ... | 9) ... |
| 5) ... | 10) ... |

Stężenie zawiesiny ciał stałych w aktywowanym osadzie po sezonowaniu z syntetycznym ściekiem =... mg/l

Objętość aktywowanego osadu na litr końcowego podłoża =... ml

Stężenie osadu końcowym podłożu =... mg/l

5. POBÓR TLENU: BIODEGRADOWALNOŚĆ

Typ używanego respirometru:

			Czas (dni)				
			0	7	14	21	28
O ₂ pobrany (mg) badana substancja	a ₁						
	a ₂						
	a ₃						
O ₂ pobrany (mg) ślepa próba	b						
Poprawka pobranego O ₂ (mg)	(a ₁ -b) (a ₂ -b) (a ₃ -b)						
BOD na mg badanej substancji	$\frac{(a-b)}{C_0 V}$	Kolba 1					
		Kolba 2					
		Kolba 3					
% degradacja $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		średnia (!)					

Uwaga: podobny arkusz można używać dla substancji odniesienia.

(!) Nie uśredniać przy znacznych różnicach pomiędzy replikami.

6. ANALIZA WĘGLA (alternatywna):

Analizator węgla:

Kolba	DOC				% DOC usunięte	Średnia
	zmierzone		skorygowane			
Woda + substancja badana	a				—	—
Osad + substancja badana	b1		b1-c			
Osad + substancja badana	b2		b2-c			
Osad + substancja badana	b3		b3-c			
Ślepa próba kontrolna	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC usunięty} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. WŁAŚCIWE CHEMICZNE DANE ANALITYCZNE

	Pozostałość badanej substancji na koniec badania	% degradacja
ślepa próba z wodą	S _b	
zaszczepione podłoże	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

$$\% \text{ degradacja} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Obliczyć % degradacji odpowiednio dla kolby a1 i a3

8. UWAGI

Należy dołączyć, gdy dostępna, krzywą BOD w zależności od czasu.

ZAŁĄCZNIK I

SKRÓTY I DEFINICJE

- DO: Rozpuszczony tlen (mg/l) jest stężeniem tlenu rozpuszczonego w wodnej próbce.
- BOD: Zapotrzebowanie biochemiczne na tlen (g) jest ilością tlenu zużytego przez drobnoustroje metabolizujące badany związek; także wyrażane jako gramy pobieranego tlenu na gramy badanego związku (patrz metoda C.5).
- COD: Zapotrzebowanie chemiczne na tlen (g) jest ilością tlenu zużytego w czasie trwania utleniania badanego związku gorącym zakwaszonym dichromianem; dostarcza pomiaru ilości obecnych utleniających ciał; także wyrażane jako gramy tlenu zużytego na gramy badanego związku (patrz metoda C.6).
- DOC: Rozpuszczalny węgiel organiczny jest to węgiel organiczny obecny w roztworze, lub ten przechodzący przez filtr 0,45 mikrona lub pozostaje w nadsączu po odwirowaniu przy 40 000 m/s² (± 4 000 g) dla 15 min.
- ThOD: Teoretyczne zapotrzebowanie na tlen (mg) jest całkowitą ilością tlenu wymaganą do całkowitego chemicznego utlenienia; jest obliczane ze wzoru cząsteczkowego (patrz załącznik II.2) i jest także wyrażane jako mg wymaganego tlenu na mg badanego związku.
- ThCO₂: Teoretyczny ditlenek węgla (mg) jest ilością ditlenku węgla obliczoną jako wytworzoną ze znanej lub zmierzonej zawartości węgla związku badanego, przy pełnej mineralizacji; także wyrażany jako ilość mg ditlenku węgla wydzielanego na mg badanego związku.
- TOC: Całkowity węgiel organiczny próbki jest sumą węgla organicznego w roztworze i w zawiesinie.
- IC: Węgiel nieorganiczny
- TC: Całkowity węgiel, jest sumą węgla organicznego i nieorganicznego obecną w próbce.

Pierwotna biodegradacja:

jest zmianą w chemicznej strukturze substancji, spowodowaną działaniem biologicznym, powodująca utratę specyficznych właściwości tej substancji.

Ostateczna biodegradacja (aerobowa):

jest uzyskanym poziomem degradacji gdy badany związek zostaje całkowicie rozłożony przez drobnoustroje, objawiający się wytworzeniem ditlenku węgla, wody, soli mineralnych i nowych mikrobiowych składowych komórkowych (biomasy).

Łatwobiodegradowalne:

umowna klasyfikacja substancji chemicznych przechodzących pewne specyficzne badania przesiewowe na ostateczną biodegradowalność; te badania są tak zastrzone, że można stwierdzić, że takie związki ulegną szybko i całkowicie biodegradacji w środowiskach wodnych w warunkach aerobowych.

Pierwotnie biodegradowalny:

klasyfikacja substancji chemicznych dla których istnieją niedwuznaczne dowody biodegradacji (pierwotnej lub ostatecznej) we wszystkich naukowo uznanych badaniach biodegradowalności.

Podatność na obróbkę (Treatability):

jest uległością związków do usuwania w czasie trwania biologicznej obróbki ścieków bez zakłócania zwykłego działania procesów przetwarzania. Ogólnie łatwo biodegradowalne związki są podatne na obróbkę, lecz nie wszystkie o pierwotnej biodegradowalności. Abiotyczne procesy mogą także powodować działanie.

Czas opóźnienia

jest czasem od inokulacji, w badaniu „die – away”, do momentu aż procent degradacji wzrośnie co najmniej 10%. Czas opóźnienia jest często bardzo zmienny i słabo odtwarzalny:

Czas degradacji

jest czasem od końca czasu opóźnienia do czasu uzyskania 90% maksymalnego poziomu degradacji.

10- dniowe okno

jest 10 dniami bezpośrednio następującymi po osiągnięciu 10% degradacji.

ZAŁĄCZNIK II

OBLICZENIE I OZNACZENIE ODPOWIEDNICH PARAMETRÓW PODSUMOWUJĄCYCH

W zależności od wybranej metody, mogą być wymagane pewne parametry podsumowujące. Następująca sekcja opisuje wyprowadzenie tych wartości. Użycie tych parametrów jest opisane w poszczególnych metodach.

1. Zawartość węgla

Zawartość węgla jest obliczana ze znanego składu pierwiastkowego lub oznaczana poprzez analizę pierwiastkową substancji badanej.

2. Teoretyczne zapotrzebowanie tlenu (ThOD)

Teoretyczne zapotrzebowanie tlenu (ThOD) może być obliczone jeżeli znany jest skład pierwiastkowy lub jest wyznaczony przez analizę elementarną. Dla związku:



bez nitryfikacji,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

lub z nitryfikacją,

$$ThOD_{NH3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. Zapotrzebowanie chemiczne na tlen (COD)

Zapotrzebowanie chemiczne na tlen (COD) jest oznaczane zgodnie z metodą C.6.

4. Rozpuszczalny węgiel organiczny (DOC)

Rozpuszczalny węgiel organiczny (DOC) jest według definicji węglem organicznym wszystkich substancji chemicznych i mieszanin w wodzie przechodzących przez filtr 0,45 mikrona.

Próbki z naczyń badawczych są pobierane i niezwłocznie filtrowane w aparacie filtracyjnym stosując odpowiedni filtr membranowy. Pierwsze 20 ml (można zmniejszyć ilość stosując mniejsze filtry) filtratu jest odrzucane. Objętości 10-20 ml lub mniej, jeżeli wstrzykuje się (objętość zależy od ilości wymaganej dla analizatora węgla) są poddawane analizie na węgiel. Stężenie DOC jest oznaczane za pomocą analizatora węgla organicznego zdolnego do dokładnych pomiarów stężenia węgla równoważnego lub niższego niż 10% początkowego stężenia DOC użytego w badaniu.

Odfiltrowane próbki, które nie mogą być analizowane tego samego dnia, można zabezpieczyć przez przechowanie w lodówce w 2-4 °C przez 48 godz., lub niższej - 18 °C przez dłuższy czas.

Uwagi;

Filtry membranowe są często impregnowane środkami powierzchniowymi w celu hydrofilizacji. Zatem filtr może zawierać do kilku mg rozpuszczalnego węgla organicznego który będzie zakłócał oznaczenia biodegradowalności. Usuwa się związki powierzchniowe i inne rozpuszczalne związki organiczne z filtrów przez gotowanie ich w wodzie dejonizowanej przez trzy okresy czasu po jednej godzinie każdy. Filtry następnie można przechowywać w wodzie przez tydzień. Jeżeli wkłady filtrów jednorazowych są używane, każda partia musi być sprawdzona dla potwierdzenia że nie zawiera rozpuszczalnego węgla organicznego.

W zależności od rodzaju filtra membranowego badana substancja może być zatrzymywana przez adsorpcję. Jest zatem godne polecenia upewnienie się czy badana substancja nie jest zatrzymywana przez filtr.

Odwieranie w 40 000 m/sec² (4 000 g) przez 15 min można stosować do zróżnicowania TOC względem DOC zamiast filtracji. Metoda nie jest pewna przy początkowym stężeniu < 10 mg DOC/l ponieważ, albo nie wszystkie bakterie są usuwane, albo węgiel jako składnik plazmy bakteryjnej jest ponownie rozpuszczany.

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.

ZAŁĄCZNIK III

OCENA BIODEGRADOWALNOŚCI SŁABO ROZPUSZCZALNYCH SUBSTANCJI

W badaniach biodegradowalności słabo rozpuszczalnych substancji należy zwrócić szczególną uwagę na następujące aspekty.

Podczas gdy jednorodne ciecze rzadko stwarzają problemy z pobieraniem ich próbek, dla materiałów w postaci ciał stałych, zalecana jest ich homogenizacja odpowiednimi metodami, aby zapobiec błędowi z powodu ich niejednorodności. Należy zwrócić szczególną uwagę, gdy wymagane są reprezentatywne próbki kilkumiligramowe z mieszanin substancji chemicznych o dużej zawartości zanieczyszczeń.

W czasie badań można stosować różne formy mieszania. Należy zwrócić uwagę by używać dostatecznego mieszania tylko do utrzymania substancji chemicznej w postaci zawiesiny, w celu zapobieżenia przegrzaniu, nadmiernemu pienieniu i nadmiernym siłom poprzecznym.

Można stosować emulsyfikator dający stabilną zawiesinę substancji chemicznej. Nie może być on toksyczny dla bakterii i ulegać biodegradacji lub powodować pienienie w warunkach badania.

Do rozpuszczalników stosuje się takie same kryteria jak do emulsyfikatorów.

Nie jest zalecane używanie stałych nośników przy badaniu stałych substancji ale mogą być one odpowiednie dla substancji oleistych.

Gdy stosowane są pomocnicze substancje takie jak emulsyfikatory, rozpuszczalniki oraz nośniki, należy przeprowadzić ślepe próby z substancją pomocniczą.

Każde z trzech badań respirometrycznych CO₂, BOD, MITI można użyć w badaniach biodegradowalności związków słabo rozpuszczalnych.

BIOBLIGRAFIA

— de Morsier, A. et al., Biodegradacja tests for słabo rozpuszczalne compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

— Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

ZAŁĄCZNIK IV

OCENA BIODEGRADOWALNOŚCI SUBSTANCJI CHEMICZNEJ PODEJRZEWANEJ O DZIAŁANIE TOKSYCZNE DLA INOKULUM

Jeżeli substancja chemiczna podlegająca badaniu na łatwość biodegradowalności okazuje się być niebiodegradowalną, zalecana jest następująca procedura, jeśli pożądana jest różnica pomiędzy inhibicją a obojętnością. (Reynolds et al., 1987).

Do badań biodegradacji i toksyczności należy użyć podobnych lub identycznych inokulum.

Do oceny toksyczności substancji chemicznych w badaniach łatwości biodegradacji, wydaje się odpowiednie zastosowanie jednego z, lub połączonych badań: inhibicji szybkości respiracji aktywowanego osadu (Dir 88/302/EEC), BOD i/lub inhibicji wzrostu.

Aby zapobiec inhibicji z powodu toksyczności, sugeruje się, aby stężenia substancji badanej stosowane w badaniach łatwości biodegradowalności były mniejsze niż 1/10 wartości EC₅₀ (lub mniejsze niż wartości EC₂₀) otrzymywanych w badaniach toksyczności. Związki o wartości EC₅₀ większej niż 300 mg/l nie wywierają prawdopodobnie działania toksycznego w badaniach łatwości biodegradacji.

Wartości EC₅₀ mniejsze niż 20 mg/l prawdopodobnie stwarzają poważne problemy w następnych badaniach. Należy zastosować niskie stężenia badania, powodującego konieczność użycia surowego i czułego badania „zamkniętej butli” lub użycia znacznika ¹⁴C. Alternatywnie sezonowane inokulum pozwala użyć wyższego stężenia substancji badanej. W ostatnim przypadku gubi się jednak kryterium właściwe badaniu łatwości biodegradacji.

BIOBLIGRAFIA

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

ZAŁĄCZNIK V

KOREKCJA POBORU TLENU Z POWODU ZAKŁÓCENIA PRZEZ NITRYFIKACJĘ

Błędy z powodu nie uwzględniania nitryfikacji w ocenie pobierania tlenu w biodegradowalności substancji badanych niezawierających azotu są marginalne (nie większe niż 5%), nawet jeżeli utlenianie azotu amonowego w podłożu zachodzi inaczej niż pomiędzy substancją badaną i naczyniami ślepej próby. Jednakże, zawarty w badanych substancjach azot, powoduje powstanie poważnych błędów.

Jeżeli zaszła nitryfikacja lecz nie jest całkowita, obserwowane pobieranie tlenu przez mieszaninę reakcyjną musi być skorygowane o ilość tlenu zużytego przy utlenieniu amoniaku do azotynów i azotanów; jeżeli zmiany w stężeniu, w czasie trwania inkubacji, azotynów i azotanów są określone następującymi równaniami:



ogólnie:



Według równania (1), pobór tlenu przez 28 g azotu zawartego w chlorku amonu (NH_4Cl) utlenianego do azotynu wyniesie 96 g, dając wskaźnik 3,43 (96/28). W ten sam sposób, z równania (3) pobór tlenu przez 28 g azotu utlenionego do azotanu wynosi 28 g, dając wskaźnik 4,57 (128/28).

Ponieważ reakcje zachodzą *sekwencyjnie*, zostały przeprowadzone przez różne szczepy bakterii, jest możliwy wzrost lub spadek stężenia azotynów; w ostatnim przypadku utworzy się równoważne stężenie azotanów. Zatem, tlen zużyty w utworzeniu azotanu jest 4,57 mnożony przez wzrost w stężeniu azotanu, podczas gdy tlen połączony z utworzeniem azotynu jest 3,43 pomnożony przez wzrost w stężeniu azotynu lub ze spadkiem w jego stężeniu strata tlenu jest - 3,43 pomnożona przez spadek w stężeniu.

Oznacza to:

$$\text{O}_2 \text{ zużytego w tworzeniu azotanu} = 4,57 \times \text{wzrost w stężeniu azotanu} \quad (4)$$

i

$$\text{O}_2 \text{ zużytego w tworzeniu azotynu} = 3,43 \times \text{wzrost w stężeniu azotynu} \quad (5)$$

i

$$\text{Strata O}_2 \text{ w zaniku azotynu} = - 3,43 \times \text{spadek w stężeniu azotynu} \quad (6)$$

Tak więc

$$\text{Pobór O}_2 \text{ z powodu nitryfikacji} = \pm 3,43 \times \text{zmiana stężenia azotynu} + 4,57 \times \text{wzrost stężenia azotanu.} \quad (7)$$

I dlatego

$$\text{Pobór O}_2 \text{ z powodu utleniania C} = \text{całkowity obserwowany pobór} - \text{pobór z powodu nitryfikacji} \quad (8)$$

Alternatywnie, jeżeli tylko całkowity utleniony azot jest oznaczony, pobieranie tlenu z powodu nitryfikacji, może być wzięte, w pierwszym przybliżeniu, 4,57 x wzrost w utlenionym azocie.

Wartość poprawki zużycia tlenu z powodu utleniania węgla jest następnie porównywana z ThOD NH_3 , jak wyliczono w załączniku II.

C.5 DEGRADACJA – ZAPOTRZEBOWANIE BIOCHEMICZNE NA TLEN

1. METODA

1.1. WPROWADZENIE

Celem metody jest pomiar zapotrzebowania biochemicznego na tlen (BOD) substancji organicznych w stanie ciekłym lub stałym.

Dane wypracowane w niniejszym badaniu odnoszą się do związków rozpuszczalnych w wodzie, jednakże związki lotne oraz te o niskiej rozpuszczalności w wodzie, mogą być również, przynajmniej z zasady badane.

Metoda jest stosowana tylko do tych badanych materiałów organicznych, które nie są inhibitorami w stosunku do bakterii w stężeniach używanych w badaniu. Jeżeli badany materiał nie jest rozpuszczalny w stężeniu badania, należy użyć specjalnych środków, takich jak użycie ultradźwięków, dla uzyskania dobrej zawiesiny badanego materiału.

Informacje na temat toksyczności substancji chemicznej są użyteczne do interpretacji niskich wyników i do wyboru odpowiednich stężeń badań.

1.2. DEFINICJA I JEDNOSTKI

BOD jest zdefiniowane jako masa rozpuszczonego tlenu pożądana przez właściwą objętość roztworu substancji dla procesu utleniania biochemicznego w opisanych warunkach.

Wyniki są wyrażane jako gramy BOD na gram badanej substancji.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Pożądane jest użycie odpowiednich substancji odniesienia dla sprawdzenia aktywności inokulum.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Wstępnie oznaczona ilość substancji, rozpuszczona lub zawieszona w dobrze napowietrzanym odpowiednim podłożu, jest zaszczipiana drobnoustrojami i inkubowana w stałej zdefiniowanej temperaturze otoczenia w ciemności.

BOD jest oznaczane przez różnicę w zawartości rozpuszczonego tlenu na początku i na końcu badania. Czas trwania badania wynosi co najmniej 5 dni i nie więcej niż 28 dni.

Ślepa próba musi być oznaczona w równoległym badaniu niezawierającym badanej substancji.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Oznaczenie BOD nie może być uważane jako mające ważność naukową oznaczenie biodegradowalności substancji, a jedynie jako badanie przesiewowe(sortujące).

1.6. OPIS METODY BADANIA

Wstępny roztwór lub zawiesina substancji jest przygotowywana aby uzyskać stężenie BOD odpowiednie dla zastosowanej metody. Następnie BOD jest oznaczane stosując jedną z odpowiednich narodowo i międzynarodowo standaryzowanych metod.

2. DANE I OCENA

BOD zawarte w wstępnym roztworze jest obliczane zgodnie z wybraną znormalizowaną metodą i przeliczane na gramy BOD na gram badanej substancji.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Metoda stosowana musi być ustalona.

Zapotrzebowanie biochemiczne na tlen należy uśrednić z co najmniej trzech ważnych pomiarów.

Wszystkie informacje i uwagi odnośnie interpretacji wyników muszą być przedstawione w sprawozdaniu, szczególnie w odniesieniu do zanieczyszczeń, postaci fizycznej, działania toksycznego i właściwości związanych z budową substancją które powodują wpływ na wyniki.

Musi być wykazane w sprawozdaniu użycie dodatków hamujących biologiczną nitryfikację.

4. LITERATURA

Wykaz standaryzowanych metod, dla przykładu:

NF T 90-103: Determination 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. DEGRADACJA – ZAPOTRZEBOWANIE CHEMICZNE NA TLEN**1. METODA****1.1. WPROWADZENIE**

Celem metody jest pomiar zapotrzebowania chemicznego na tlen (COD) substancji organicznych w stanie ciekłym lub stałym w standardowy arbitralny sposób, w ustalonych warunkach laboratoryjnych.

Informacje na temat wzoru chemicznego są użyteczne dla prowadzenia tego badania oraz interpretacji uzyskanych wyników (np. sole halogenowe, sole żelazowe związków organicznych, związki chloroorganiczne).

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Zapotrzebowanie chemiczne na tlen jest zmierzoną utlenialnością substancji, wyrażoną jako równoważna ilość tlenu odczynnika utleniającego zużytego przez substancje w ustalonych warunkach laboratoryjnych.

Wynik jest wyrażany w gramach COD na gram badanej substancji.

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Wstępnie oznaczona ilość substancji, rozpuszczonej lub zawieszonej w wodzie, jest utleniana przez dichromian potasu w stężonym kwasie siarkowym z siarczanem srebra jako katalizatorem, pod chłodnicą zwrotną przez dwie godziny. Pozostałość dichromianu jest oznaczana miareczkowo mianowanym roztworem siarczynu żelazoamonowego.

W przypadku substancji zawierających chlor, dodaje się siarczanu rtęci (*) celem zmniejszenia zakłócenia przez chlorki.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

Z powodu arbitralnego sposobu oznaczenia, COD jest „wskaźnikiem utlenialności” i jako taki używany jest jako praktyczna metoda pomiaru związków organicznych.

Chlorki zakłócają to badanie; redukujące środki nieorganiczne lub utleniające mogą także powodować zakłócenia w oznaczaniu COD.

Niektóre związki cykliczne i wiele substancji lotnych (np. niższe kwasy tłuszczowe) nie są w pełni utleniane w niniejszym badaniu.

1.6. OPIS METODY BADANIA

Wstępny roztwór lub zawiesina substancji jest tak przygotowywana by uzyskać COD pomiędzy 250 i 600 mg na litr.

Uwagi:

W przypadku słabo rozpuszczalnych i niedających się zdyspergować substancji, należy ilość drobno sproszkowanej substancji, odpowiadającej około 5 mg COD odważyć i umieścić w aparacie doświadczalnym wraz z wodą.

Zapotrzebowanie chemiczne na tlen (COD) jest często i szczególnie w przypadku słaborozpuszczalnych substancji oznaczane korzystnie w odmianach metody, to jest w zamkniętym systemie z ciśnieniowym ekwalizmem (H. Kelkenberg, 1975). W niniejszej modyfikacji związki, które tylko z trudnością można oznaczyć metodą konwencjonalną- na przykład kwas octowy- są często z powodzeniem oznaczane. Metoda także zawodzi, jak w przypadku pirydyny. Jeżeli stężenie dichromianu potasu, jak opisano w pozycji lit. (1), wzrośnie do 0,25 N (0,0416 M), bezpośrednia doważka 5-10 mg substancji ułatwia oznaczenie COD, co jest zasadnicze dla słabo rozpuszczalnych w wodzie substancji (poz. lit. (2)).

Z drugiej strony, COD jest oznaczane wykorzystując wszystkie odpowiednie krajowe i międzynarodowe standaryzowane metody.

2. DANE I OCENA

COD zawarte w kolbie doświadczalnej jest obliczane stosując wybrane znormalizowane metody i przeliczane na gramy COD na gram badanej substancji.

(*) Po użyciu, roztwory zawierające sole rtęci należy unieszkodliwić, by zapobiec przeniesieniu rtęci do środowiska naturalnego.

3. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Zastosowana metoda odniesienia musi być ustalona.

Zapotrzebowanie chemiczne na tlen musi być średnią co najmniej z trzech pomiarów. Wszystkie informacje i uwagi odnośnie interpretacji wyników muszą być przedstawione w sprawozdaniu, szczególnie w odniesieniu do zanieczyszczeń, postaci fizycznej, i właściwości związanych z budową substancji, które powodują wpływ na wyniki.

W sprawozdaniu należy przedstawić również fakt użycia siarczanu rtęci dla zminimalizowania zakłóceń pochodzących od chlorków.

4. LITERATURA

(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.

Wykaz standaryzowanych metod, dla przykładu:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NFT 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 liter.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

C.7. DEGRADACJA ABIOTYCZNA – HYDROLIZA JAKO FUNKCJA pH

1. METODA

Niniejsza metoda jest oparta na wytycznych OECD (1).

1.1. WPROWADZENIE

Hydroliza jest ważną reakcją kontrolującą abiotyczną degradację. Niniejsza reakcja jest szczególnie stosowna dla substancji o niskiej biodegradowalności i ma wpływ na utrzymywanie się substancji w środowisku naturalnym.

Większość reakcji hydrolizy jest reakcjami *pseudopierwszego* rzędu, i zatem czasy półreakcji są niezależne od stężenia. To zwykle pozwala ekstrapolować wyniki otrzymane w laboratorium na warunki środowiska naturalnego.

Ponadto, kilka przykładów o których doniesiono w poz. lit. (2), pokazało zadawalającą zgodność pomiędzy wynikami znalezionymi w czystych i naturalnych wodach dla różnych typów substancji chemicznych.

Jest korzystne posiadanie wstępnych informacji na temat prężności pary substancji stosowanej w tym badaniu.

Niniejsza metoda ma zastosowanie tylko do substancji rozpuszczalnych w wodzie. Zanieczyszczenia mogą wpływać na wyniki.

Hydrolityczne zachowanie się substancji chemicznej należy zbadać przy wartości pH najczęściej znajdowanej w środowisku naturalnym (pH 4-9).

1.2. DEFINICJE I JEDNOSTKI

Hydroliza odnosi się do reakcji substancji RX z wodą. Reakcja ta może być przedstawiona przez wymianę grupy X na OH:



Szybkość, w której stężenie RX spada jest dana przez:

$$\text{szybkość} = k [\text{H}_2\text{O}] \cdot [\text{RX}] \quad [2]$$

Ponieważ woda jest obecna w dużym nadmiarze w porównaniu z substancją, ten ty reakcji zwykle opisuje się jako reakcję *pseudopierwszego* rzędu, w której obserwowana stała szybkości jest dana zależnością:

$$k_{\text{obs}} = k \times [\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

Stała ta może być oznaczona dla jednej wartości pH i jednej wartości temperatury T, stosując wyrażenie:

$$k_{\text{obs}} = \frac{2,303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

gdzie:

t = czas,

C₀ = stężenie substancji w czasie 0,

C_t = stężenie substancji w czasie t; i

2,303 = współczynnik konwersji logarytmem naturalnym i dziesiętnym.

Stężenia są wyrażone w gramach na litr lub molach na litr.

Wymiarem stałej k_{obs} jest (czas)⁻¹

„Półokres reakcji” t_{1/2} jest zdefiniowany jako czas wymagany do zmniejszenia stężenia substancji badanej o 50%, czyli jest: 2

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

Z wyrażen (4) i (5) można pokazać, że:

$$t_{1/2} = 0,693/k_{\text{obs}} \quad [6]$$

1.3. SUBSTANCJE ODNIESIENIA

Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia za każdym razem, gdy przeprowadzane są badania nowej substancji. Powinny one służyć głównie sprawdzeniu od czasu do czasu wydajności metody i pozwolić na porównanie wyników z innymi metodami.

Następujące substancje używano jako substancje odniesienia (1):

Kwas acetylosalicylowy (aspiryna)

Ester kwasu 0,0-dietylo-0-(6-metylo-2-(1-metyloetylo)4-pirymidynylofosforotowego (Dimpylate, Diazinon)

1.4. ZASADA METODY BADANIA

Substancja jest rozpuszczana w wodzie przy niskim stężeniu; wartości pH i temperatury są kontrolowane.

Spadek stężenie substancji w zależności od czasu jest obserwowany dowolną stosowną procedurą analityczną.

Logarytm stężenia jest wykreślany w zależności od czasu, jeżeli wykres jest prostą linią, stała szybkości pierwszego rzędu może być uzyskana z jej nachylenia (patrz pkt 2).

Jeżeli nie jest praktyczne oznaczenie stałej szybkości bezpośrednio dla poszczególnej temperatury, zwykle jest możliwe oszacowanie stałej poprzez użycie zależności Arrheniusa, dającej zależność temperaturową stałej szybkości. Z liniowego wykresu logarytmu stałej szybkości, którą oznaczono w odpowiedniej temperaturze, jako funkcję odwrotności temperatury bezwzględnej, K , jest możliwe ekstrapolowanie wartości stałej szybkości, która nie jest uzyskiwana bezpośrednio.

1.5. KRYTERIA JAKOŚCI

W pozycji literaturowej (2) doniesiono, że pomiary stałych szybkości hydrolizy w 13 klasach struktur organicznych przeprowadzono z wysoką precyzją.

Powtarzalność zależy w szczególności od kontroli pH i temperatury i może ulegać wpływowi obecności drobnoustrojów i w specjalnych przypadkach stężeniu rozpuszczonego tlenu.

1.6. OPIS METODY BADANIA

1.6.1. Odczynniki

1.6.1.1. Roztwory buforowe

Badanie jest wykonywane przy trzech wartościach pH: 4,0; 7,0 i 9,0.

Do tego celu, roztwory buforowe należy przygotować stosując substancje chemiczne czystości analitycznej oraz destylowaną lub dejonizowaną sterylną wodę. Kilka przykładów systemów buforowych przedstawiono w Dodatku.

Używane systemy buforowe mogą wpływać na szybkość hydrolizy; jeżeli są na to dowody, należy zastosować alternatywny system buforujący. Użycie buforów boranu lub octanu polecono w pozycji (2) zamiast fosforanu.

Jeżeli wartości pH roztworów buforowych nie są znane w temperaturze używanej w badaniu, można to określić stosując skalibrowany pHmetr, w wybranych temperaturach z dokładnością $\pm 0,1$ jednostki pH.

1.6.1.2. Roztwory do badania

Substancję badaną należy rozpuścić w wybranym buforze i stężenie nie powinno przekraczać 0,01 M lub połowy stężenia nasycenia, w zależności która jest niższa.

Użycie rozpuszczalników mieszalnych z wodą jest zalecane tylko dla substancji o niskiej rozpuszczalności w wodzie.

Ilość rozpuszczalnika musi być mniejsza niż 1%, i nie może zakłócać procesów hydrolitycznych.

1.6.2. **Przyrząd**

Należy użyć zakorkowanych szklanych kolb, lecz nie może być smaru na szlifach.

Jeżeli substancja albo system buforowy są lotne, lub jeśli badanie będzie prowadzone w podwyższonej temperaturze, zalecane są szczelne lub septycznie zamknięte rury, należy unikać wolnej objętości.

1.6.3. **Metoda analityczna**

Metoda musi być specyficzna do umożliwienia oznaczenia substancji badanej w stężeniach roztworów badanych i może składać się z kilku połączeń odpowiednich technik analitycznych.

Stosowana metoda analityczna zależy od natury substancji i musi odpowiednio precyzyjnie i czule wykryć zmniejszenie początkowego stężenia o 10%.

1.6.4. **Warunki badania**

Badania należy przeprowadzać stosując termostatycznie kontrolowaną obudowę lub łaźnię o stałej temperaturze ustawioną na $\pm 0,5$ °C wybranej temperatury. Temperatura powinna być utrzymywana i mierzona w zakresie $\pm 0,1$ °C. Należy zapobiec zakłóceniom fotolitycznym odpowiednimi środkami.

Dla substancji które są łatwo utlenialne, konieczne jest pozbycie się rozpuszczonego tlenu (na przykład przez przepłukanie azotem lub argonem na pięć minut przed przygotowaniem roztworu).

1.6.5. **Procedura badania**

1.6.5.1. *Badanie wstępne*

Dla wszystkich substancji, wstępne badanie należy przeprowadzić przy $50 \pm 0,5$ °C dla trzech wartości pH: 4,0; 7,0 i 9,0. Jest wykonywana wystarczająca ilość pomiarów, aby móc oszacować czy dla każdej wartości pH i przy 50 °C, półokres reakcji (t!) jest mniejszy niż 2,4 godziny czy mniejszy niż 10% hydrolizy obserwowanej po pięciu dniach. (można oszacować że te wartości odpowiadające odpowiednio półokresowi reakcji mniejszych niż jeden dzień lub wyższych niż jeden rok w warunkach bardziej reprezentatywnych od tych z otoczenia (25 °C)).

Jeżeli badanie wstępne wskazuje, że 50% lub więcej substancji badanej zhydrolizowało w 2,4 godziny w 50 °C, lub mniej niż 10% zhydrolizowało po pięciu dniach przy każdej z trzech wartości pH (4, 7 i 9), nie jest konieczne dalsze badanie.

W innych przypadkach, i dla poszczególnych wartości pH, dla których niniejszy warunek nie był spełniony, przeprowadzane jest badanie 1.

1.6.5.2. *Badanie 1*

Badanie 1 jest przeprowadzane w jednej temperaturze; najkorzystniej w $50 \pm 0,5$ °C, oraz, jeżeli jest to możliwe, w sterylnych warunkach, w których te wartości pH, dla których wstępne badanie pokazało konieczność prowadzenia dalszych badań.

Należy wybrać wystarczającą ilość próbek (niemniej niż cztery) do objęcia zakresu hydrolizy 20-70% dla badania zachowania się reakcji pseudopierwszego rzędu w określonych wartościach pH.

Dla każdej wartości pH, przy której wykonano badanie 1, wyznaczono rząd reakcji.

Oszacowanie stałej szybkości w 25 °C:

Decyzja jak postępować eksperymentalnie zależy od tego czy można skonkludować z badania 1, że reakcja jest *pseudopierwszego* rzędu czy nie.

Jeżeli nie można skonkludować z pewnością z badania 1, że reakcja jest *pseudopierwszego* rzędu, dalsze doświadczenia należy przeprowadzić jak opisano w badaniu 2.

Jeżeli można bezpiecznie skonkludować z badania 1, że reakcja jest *pseudopierwszego* rzędu, dalsze doświadczenia należy przeprowadzić jak opisano w badaniu 3. (Alternatywnie, można w specjalnych warunkach obliczyć stałe szybkości w 25 °C ze stałych w 50 °C, obliczonych przy użyciu wyników z badania 1, (patrz 3.2)).

1.6.5.3. Badanie 2

Niniejsze badanie przeprowadzono, przy każdej wartości pH, dla której wyniki badania 1 pokazały konieczność następującego postępowania:

— albo w jednej temperaturze niższej niż 40 °C,

— lub w dwóch temperaturach powyżej 50 °C różniących się od siebie co najmniej 10 °C.

Dla każdej wartości pH oraz temperatury gdzie badanie 2 jest przeprowadzane, co najmniej sześć stosownie rozdzielonych punktów danych powinno być pobranych, tak by stopień hydrolizy był w zakresie 20-70%.

Dla jednej wartości pH i jednej temperatury oznaczanie jest przeprowadzane w dublecie. Gdy badanie 2 wykonano w dwóch temperaturach powyżej 50 °C, dublikat jest przeprowadzany najkorzystniej w niższej z tych dwóch temperatur.

Dla każdej wartości pH oraz temperatury, dla których wykonano badanie 2 należy podać graficzne oszacowanie półokresu reakcji ($t_{1/2}$) o ile to możliwe.

1.6.5.4. Badanie 3

Niniejsze badanie przeprowadzono, przy każdej wartości pH, dla której wyniki badania 1 pokazały konieczność takiego postępowania.

— albo w jednej temperaturze mniejszej niż 40 °C,

— albo w dwóch temperaturach powyżej 50 °C różniących się od siebie co najmniej 10 °C.

Dla każdego pH i temperatury gdzie przeprowadzono badanie 3, wybierane są trzy punkty danych, pierwszy w czasie 0 oraz drugi i trzeci gdy stopień hydrolizy jest większy niż 30%; stała k_{obs} , i $t_{1/2}$ muszą być wyliczone.

2. DANE

Dla *pseudopierwszego* rzędu zachowanie się wartości k_{obs} , dla każdej wartości pH i każdej temperatury badań może być uzyskane z wykresów logarytmów stężeń w stosunku do czasu stosując wyrażenie:

$$k_{obs} = - \text{nachylenie} \times 2,303 \quad [7]$$

Zatem $t_{1/2}$ może być obliczone zgodnie z równaniem [6].

Oszacować $k_{25^\circ\text{C}}$ stosując równanie Arrheniusa, gdzie odpowiednie.

Dla nie-*pseudopierwszego* rzędu zachowanie się patrz 3.1.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z badań zawiera w miarę możliwości następujące informacje:

- specyfikację substancji;
- wszystkie wyniki uzyskane z substancjami odniesienia;
- zasada i szczegóły zastosowanej metody analitycznej;
- dla każdego badania: temperatura, wartość pH, skład buforu i tabelę wszystkich danych punktów stężenie-czas;
- dla reakcji *pseudopierwszego* rzędu, wartości k_{obs} dla $t_{1/2}$ i ich procedurę obliczeń;
- dla reakcji *nie-pseudopierwszego* rzędu, wykreślić wyniki jako logarytm stężenia w stosunku do czasu;
- wszystkie informacje i obserwacje dla interpretacji wyników.

3.2. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Jest możliwe obliczenie dopuszczalnych wartości stałej szybkości (w 25 °C) substancji badanych, pod warunkiem, że wartości doświadczalne energii aktywacji już istnieją dla homologów substancji badanej i pod warunkiem że założy się umiarkowanie, że energia aktywacji substancji badanej jest tego samego rzędu wielkości.

4. **LITERATURA**

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) W. Mabey and T. Mill, 'Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions,' J. Phys. Chem. Ref. Data, 1978, vol. 7 (2), 383-415.

*Dodatek***MIESZANINY BUFOROWE**A. **CLARKA I LUBSA**

Wartości pH przedstawione w tych tabelach obliczono z pomiarów potencjału używając standartowe równania Sörensen. Rzeczywiste wartości pH są 0,04 jednostki wyższe niż wartości tabelaryzowane.

Skład	pH
0,1 M wodoroftalan potasu + 0,1 N HCl przy 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalanu do 100 ml	3,8
0,1 M wodoroftalan potasu + 0,1 N NaOH przy 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalanu do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalanu do 100 ml	4,2
0,1 M fosforan monopotasu + 0,1 N NaOH przy 20 °C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforanu do 100 ml	7,2

0,1 M H_3BO_3 w 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH przy 20 °C

16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml 8,8

21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml 9,0

26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kwasu borowego do 100 ml 9,2

B. **KOLTHOFFA I VLEESHOUWERA**

Skład pH

0,1 M cytrynian monopotasu i 0,1 N NaOH przy 18 °C (dodać mały kryształ tymolu by zapobiec wzrostowi pleśni)

2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml 3,8

9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml 4,0

16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml cytrynianu do 100 ml 4,2

C. **SÖRENSENA**

0,05 M boraks + 0,1 N HCl

Skład		pH			
ml boraksu	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

Skład		pH			
ml boraksu	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