

31992L0069

29.12.1992

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

L 383/113

SMERNICA KOMISIE 92/69/EHS**z 31. júla 1992,****ktorou sa po sedemnástykrát prispôsobuje technickému pokroku smernica Rady 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok**

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 67/548/EHS z 27. júna 1967 o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok⁽¹⁾, naposledy zmenenej a doplnenej smernicou 92/32/EHS⁽²⁾, najmä na jej články 28 a 29,

keďže článok 3 ods. 1 smernice 67/548/EHS a článok 3 smernice Rady 88/379/EHS zo 7. júna 1988 o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení, ktoré sa týkajú klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok⁽³⁾, naposledy zmenenej a doplnenej smernicou Komisie 90/492/EHS⁽⁴⁾, ustanovuje, že fyzikálno-chemické vlastnosti, toxicita a ekotoxicita látok a prípravkov sa určujú podľa metód špecifikovaných v prílohe V k smernici 67/548/EHS;

keďže znenie prílohy V k smernici 67/548/EHS je súčasne uverejnené v dvoch častiach, ktorými sú príloha k smernici Komisie 84/449/EHS⁽⁵⁾ a príloha k smernici Komisie 88/302/EHS⁽⁶⁾;

keďže je potrebné v záujme zohľadnenia technického pokroku prekontrolovať skúšobné metódy, ktoré sa nachádzajú v prílohe k smernici Komisie 84/449/EHS;

keďže je tiež potrebné v záujme zohľadnenia technického pokroku prekontrolovať skúšobnú metódu pre test utlmenia rias, ktorá sa v súčasnosti nachádza v prílohe k smernici Komisie 88/302/EHS, a pri tejto príležitosti presunúť túto skúšobnú metódu do prílohy k smernici 84/449/EHS;

keďže je vhodné znížiť na minimum počet zvierat používaných na experimentálne účely v súlade so smernicou Rady 86/609/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení členských štátov s ohľadom na ochranu zvierat používaných na experimentálne účely⁽⁷⁾;

keďže ustanovenia tejto smernice sú v súlade so stanoviskom Výboru na prispôbovanie smerníc technickému pokroku pri odstraňovaní technických prekážok obchodu s nebezpečnými látkami a prípravkami,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

⁽¹⁾ Ú. v. ES 196, 16.8.1967, s. 1.

⁽²⁾ Ú. v. ES L 154, 5.6.1992, s. 1.

⁽³⁾ Ú. v. ES L 187, 16.7.1988, s. 14.

⁽⁴⁾ Ú. v. ES L 275, 5.10.1990, s. 35.

⁽⁵⁾ Ú. v. ES L 251, 19.9.1984, s. 1.

⁽⁶⁾ Ú. v. ES L 133, 30.5.1988, s. 1, a Ú. v. ES L 136, 2.6.1988, s. 20.

Príloha k smernici 84/449/EHS sa týmto nahrádza prílohou k súčasnej smernici.

⁽⁷⁾ Ú. v. ES L 358, 18.12.1986, s. 1.

Článok 2

Metóda pre test utlmenia rias, opísaná v prílohe k smernici 88/302/EHS, sa týmto zrušuje.

Článok 3

Členské štáty uvedú do účinnosti zákony, iné právne predpisy a správne opatrenia potrebné na dosiahnutie súladu s touto smernicou najneskôr do 30. októbra 1993. Členské štáty o tom bezodkladne informujú Komisiu.

Členské štáty uvedú priamo v prijatých ustanoveniach alebo pri ich úradnom uverejnení odkaz na túto smernicu.

Podrobnosti o odkaze upravia členské štáty.

Článok 4

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 31. júla 1992

Za Komisiu

Karel VAN MIERT

člen Komisie

KOMISIA

Príloha k smernici Komisie 92/69/EHS z 31. júla 1992, ktorou sa po sedemnástykrát prispôsobuje technickému pokroku smernica Rady 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok ⁽¹⁾1)

⁽¹⁾ 1) Ú. v. ES L 383, 29.12.1992, s. 113.

ÚVOD

ČASŤ A:	METÓDY NA STANOVENIE FYZIKÁLNO-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ.....	5
A.1.	Teplota topenia/tuhnutia	5
A.2.	Teplota varu	15
A.3.	Relatívna hustota	21
A.4.	Tlak pary	26
A.5.	Povrchové napätie	47
A.6.	Rozpustnosť vo vode	54
A.8.	Rozdeľovací koeficient	63
A.9.	Teplota vzplanutia	74
A.10.	Horľavosť (tuhé látky)	76
A.11.	Horľavosť (plyny)	79
A.12.	Horľavosť (kontakt s vodou)	81
A.13.	Samozápalné vlastnosti tuhých látok a kvapalín	85
A.14.	Výbušné vlastnosti	87
A.15.	Teplota samovznietenia (kvapaliny a plyny)	98
A.16.	Relatívna teplota samovznietenia pre tuhé látky	99
A.17.	Oxidačné vlastnosti (tuhé látky)	102
ČASŤ B:	METÓDY NA STANOVENIE TOXIKOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ.....	111
	Všeobecný úvod	107
B.1.	Akútna toxicita (orálna)	110
B.1(bis)	Akútna toxicita (orálna) metóda fixnej dávky	113
B.2.	Akútna toxicita (inhalačná)	117
B.3.	Akútna toxicita (dermálna)	121
B.4.	Akútna toxicita (kožná dráždivosť)	124
B.5.	Akútna toxicita (očná dráždivosť)	127
B.6.	Senzibilizácia pokožky	131
B.7.	Toxicita po 28-dňovej opakovanej dávke (orálna)	136
B.8.	Toxicita po 28-dňovej opakovanej dávke (inhalačná)	140
B.9.	Toxicita po 28-dňovej opakovanej dávke (dermálna)	144
B.10.	Mutagenita (<i>in vitro</i> cytogenetický test na cicavcoch)	148
B.11.	Mutagenita (<i>in vivo</i> cytogenetický test kostnej drene cicavcov, chromozómová analýza)	151
B.12.	Mutagenita (test jadierok)	154
B.13.	Mutagenita (<i>Escherichia coli</i> – skúška reverznej mutácie)	157
B.14.	Mutagenita (<i>Salmonella typhimurium</i> – skúška reverznej mutácie)	160

ČASŤ C:	METÓDA NA STANOVENIE EKOTOXICITY.....	163
C.1.	Akútna toxicita na rybách	163
C.2.	Akútna toxicita na dafniách	172
C.3.	Test inhibície rastu rias	179
C.4.	Biodegradácia: stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti	187
	C.4-A: Úbytok rozpusteného organického uhlíka (DOC DIE AWAY)	194
	C.4-B: Modifikovaný skriningový test podľa OECD	197
	C.4-C: Vývoj oxidu uhličitého (CO ₂)	202
	C.4-D: Manometrická respirometria	207
	C.4-E: Test uzavretej fľaše	211
	C.4-F: MITI (Ministerstvo medzinárodného obchodu a priemyslu – Japonsko)	216
	Prílohy	221
C.5.	Degradácia: biochemická spotreba kyslíka	226
C.6.	Degradácia: chemická spotreba kyslíka	227
C.7.	Degradácia: abiotická degradácia: hydrolýza ako funkcia pH	229

ÚVOD

V tejto prílohe sú opísané skúšobné metódy stanovenia fyzikálnochemických, toxikologických a ekotoxikologických vlastností uvedených v prílohách VII a VIII k smernici 79/831/EHS. Vychádzajú z metód uznaných a odporučených príslušnými medzinárodnými subjektmi (obzvlášť OECD).

Keď takéto metódy neboli k dispozícii, boli prevzaté vnútroštátne normy alebo metódy, pri ktorých došlo medzi vedcami k dohode. Testy by sa mali vo všeobecnosti vykonávať s látkami definovanými v smernici. Pozornosť treba venovať možnému vplyvu nečistôt na výsledky testov.

Ak metódy uvedené v tejto prílohe nie sú vhodné na skúmanie určitej vlastnosti, musí oznamovateľ zdôvodniť použitie alternatívnej metódy.

Testy a štúdie na zvieratách sa musia vykonávať v súlade s vnútroštátnymi predpismi a musia byť pri nich zohľadnené humánne princípy a medzinárodný vývoj v oblasti ochrany zvierat.

Z rovnocenných skúšobných metód sa zvolí metóda vyžadujúca najmenší počet zvierat.

ČASŤ A: METÓDY NA STANOVENIE FYZIKÁLNO-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ**A.1. TEPLOTA TOPENIA A TUHNUTIA****1. METÓDA**

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkazoch (2) a (3).

1.1. ÚVOD

Na stanovenie teploty topenia látok je potrebné použiť opísané metódy, prístroje a zariadenia, a to bez akýchkoľvek obmedzení týkajúcich sa stupňa ich čistoty.

Výber metódy závisí od charakteru látky určenej na testovanie. Z toho dôvodu limitujúce faktory budú závisieť od toho, či príslušná látka môže byť rozomletá na prášok ľahko, ťažko alebo vôbec nie.

Pre niektoré látky je vhodnejšie stanovenie teploty tuhnutia, a preto boli do tejto metódy zahrnuté aj normy pre toto stanovenie.

V prípadoch, kde kvôli zvláštnym vlastnostiam látky nie je možné bez problémov merať žiadny z horeuvedených parametrov, môže byť vhodné stanovenie teploty kvapalného skupenstva, resp. teploty tuhnutia olejov.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Teplota topenia je definovaná ako teplota, pri ktorej sa zmena z tuhého do kvapalného skupenstva prejavuje pri atmosférickom tlaku, a táto teplota ideálne zodpovedá teplote tuhnutia.

Keďže fázová zmena mnohých látok sa uskutočňuje v určitom tepelnom rozmedzí, často sa opisuje ako rozmedzie topenia.

Prepočítavanie jednotiek (K na °C)

$$t = T - 273,15$$

t: teplota v stupňoch Celzia, stupne Celzia (°C)

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nemusia byť použité vo všetkých prípadoch, ak sa skúma nová látka alebo nová látka obsiahnutá v prípravku. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Niektoré kalibračné látky sú uvedené v odkazoch (4).

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Stanoví sa teplota (teplotné rozmedzie) fázovej zmeny z tuhého do kvapalného skupenstva alebo z kvapalného do tuhého skupenstva. Prakticky sa počas zohrievania, resp. ochladzovania vzorky testovanej látky pri atmosférickom tlaku stanovujú teploty počiatočného štádia topenia, resp. tuhnutia, a konečného štádia topenia, resp. tuhnutia. Opísaných je päť metód, menovite kapilárna metóda, metódy tepelných blokov, stanovenia teploty tuhnutia, metódy termickej analýzy a stanovenie teploty kvapalného skupenstva, resp. teploty tuhnutia (metóda vyvinutá pre ropné oleje).

V určitých prípadoch môže byť vhodné merať namiesto teploty topenia teplotu tuhnutia.

1.4.1. **Kapilárna metóda**

1.4.1.1. *Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalinovým kúpeľom*

Malé množstvo jemne rozomletej látky sa vloží do kapilárnej rúrky a tesne sa natlačí. Rúrka sa zohrieva spolu s teplomerom a v priebehu vlastného topenia sa nárast teploty adjustuje na menej ako 1 K/min. Stanovuje sa počiatočná a konečná teplota topenia.

1.4.1.2. *Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kovovým blokom*

Postupuje sa tak, ako je to opísané v odseku 1.4.1.1, avšak s výnimkou, že kapilárna rúrka a teplomer sú umiestnené do zahrievaného kovového bloku, pričom celý proces a hodnoty na teplomere možno sledovať otvormi v bloku.

1.4.1.3. *Fotočlánková detekcia*

Vzorka v kapilárnej rúrke sa zahrieva automaticky v kovovom valci. Dierou vo valci sa cez sledovanú látku namieri svetelný lúč na presne kalibrovaný fotoelektrický článok. Optické vlastnosti väčšiny látok sa počas topenia menia tak, že látka sa z nepriehľadnej mení na priehľadnú. Intenzita svetla dopadajúceho na fotoelektrický článok sa tak zvýši a vyšle stop signál k digitálnemu indikátoru, ktorý odčíta teplotu z platínového odporového teplomeru, ktorý je umiestnený vo vyhrievacej komore. Táto metóda nie je vhodná pre niektoré intenzívne sfarbené látky.

1.4.2. **Tepelné bloky**

1.4.2.1. *Koflerov tepelný blok*

Koflerov tepelný blok pozostáva z dvoch kusov kovu s rozdielnou tepelnou vodivosťou a s elektrickým ohrievaním, pričom samotný blok je zhotovený tak, aby teplotný gradient bol takmer lineárny po celej jeho dĺžke. Teplota Koflerovho tepelného bloku sa môže meniť v rozmedzí od 283 do 573 K. Tepelný blok je vybavený zvláštnym zariadením na čítanie teploty, ktoré je opatrené posuvným bežcom s ručičkou a tabuľkou zostavenou pre konkrétny typ žeraviacej tyče. Pre stanovenie teploty topenia sa testovaná látka v tenkej vrstve naniesie na tepelný blok. V priebehu niekoľkých sekúnd sa vytvorí zreteľná deliaca čiara medzi kvapalnou a tuhú fázou. Teplota na deliacej čiare sa odčíta nastavením ručičky do takej polohy, aby spočívala priamo na čiare.

1.4.2.2. *Mikroskop na sledovanie taveniny*

Na stanovenie teploty topenia pri veľmi malých množstvách materiálu sa používajú viaceré mikroskopicky sledované horúce štádiá. V prípade väčšiny horúcich štádií sa teplota meria citlivým termočlánkom, ale niekedy sa používajú aj klasické ortuťové teplomery. Typický prístroj na mikroskopické sledovanie teploty topenia v horúcich štádiách pozostáva z vyhrievacej komory, v ktorej sa nachádza kovová platňa, na ktorú sa umiestni vzorka na podložné sklíčko. Uprostred kovovej platne je otvor, ktorý umožňuje prenikanie svetelných lúčov z osvetľovacieho zrkadielka mikroskopu. Počas používania je komora uzavretá sklenenou platňou, aby sa zabránilo prístupu vzduchu do priestoru so skúmanou vzorkou.

Zahrievanie vzorky je regulované reostatom. Pre veľmi presné merania na opticky anizotropných látkach možno použiť polarizované svetlo.

1.4.2.3. *Menisková metóda*

Táto metóda sa používa špeciálne pre polyamidy.

Vizuálne sa stanovuje teplota, pri ktorej dochádza k posunu menisku silikónového oleja, vloženého medzi zdroj horúceho štádia a krycie sklíčko, spočívajúce na polyamidovej testovanej vzorke.

1.4.3. **Metóda na stanovenie teploty tuhnutia**

Vzorka sa umiestni do zvláštnej skúšobnej trubice, ktorá sa potom vloží do prístroja na stanovenie teploty tuhnutia. Počas ochladzovania sa vzorka jemne a neustále mieša a vo vhodných intervaloch sa meria teplota. Ak pri niekoľkých za sebou nasledujúcich čítaniach zostáva teplota konštantná, jej hodnota (s korektúrou odchýlky teplomeru) sa zaznamená ako teplota tuhnutia.

Má sa zabrániť podchladeniu udržiavaním rovnováhy medzi tuhú a kvapalnou fázou.

1.4.4. Tepelná (termická) analýza

1.4.4.1. Diferenciálna tepelná (termická) analýza (DTA)

V rámci tohto postupu sa zaznamenáva rozdiel v teplotách medzi príslušnou testovanou látkou a referenčným materiálom ako funkcia teploty, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému tepelnému programu. Keď testovaná vzorka podstúpi fázovú zmenu majúcu za následok zmenu entalpie, táto zmena sa prejaví ako endotermická (topenie) alebo exotermická (tuhnutie) odchýlka od základnej čiary zaznamenávajúcej teplotu.

1.4.4.2. Diferenciálna snímacia kalorimetria (DSK)

V rámci tohto postupu sa zaznamenáva rozdiel v energetických vstupoch do príslušnej testovanej látky a do referenčného materiálu, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému tepelnému programu. Toto je energia, ktorá je potrebná na vytvorenie nulového teplotného rozdielu medzi testovanou látkou a referenčným materiálom. Keď testovaná vzorka podstúpi fázovú zmenu majúcu za následok zmenu entalpie, táto zmena sa prejaví ako endotermická (topenia) alebo exotermická (tuhnutie) odchýlka od základnej čiary zaznamenávajúcej tepelný tok.

1.4.5. Teplota tuhnutia olejov

Táto metóda bola vyvinutá na použitie s ropnými olejmi a je vhodná na použitie s olejovitými látkami vyznačujúcimi sa nízkymi teplotami topenia.

Po predchádzajúcom zohriatí sa vzorka ochladzuje špecifickou rýchlosťou a v intervaloch poklesu teploty o 3 K sa skúma jej tekutosť. Najnižšia teplota, pri ktorej sa ešte dá pozorovať pohyb testovanej látky, sa zaznamená ako teplota tuhnutia oleja.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Použitelnosť a presnosť rozličných metód používaných na stanovenie teploty topenia, resp. rozmedzia topenia je uvedená v nasledujúcej tabuľke:

TABUĽKA: POUŽITEĽNOSŤ METÓD

A. Kapilárne metódy

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť ⁽¹⁾	Platná norma
Zariadenie na stanovenie teploty topenia s kvapalinovým kúpeľom	áno	len pre niekoľko látok	273 až 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Zariadenie na stanovenie teploty topenia s kovovým blokom	áno	len pre niekoľko látok	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Detekcia fotočlánkom	áno	pre niektoré látky s použitím prídavných zariadení	253 až 573 K	± 0,5 K	
⁽¹⁾ Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky					

B. Vyhrievacie bloky a metódy tuhnutia

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť ⁽¹⁾	Platná norma
Koflerov vyhrievací stolík	áno	nie	283 až > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 345176
Taviaci mikroskop	áno	len pre niekoľko látok	273 až > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Menisková metóda	nie	predovšetkým pre polymidy	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Metóda stanovenia teploty tuhnutia	áno	áno	223 až 573 K	± 0,5 K	napr. BS 4695
⁽¹⁾ Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky					

C. Tepelná (termická) analýza

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť ⁽¹⁾	Platná norma
Diferenčná tepelná analýza	áno	áno	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 53776
Diferenčná skenovacia kalorimetria	áno	áno	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 53776
⁽¹⁾ Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky					

D. Teplota tuhnutia olejov

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť ⁽¹⁾	Platná norma
Teplota tuhnutia olejov	pre minerálne oleje a olejovité látky	pre minerálne oleje a olejovité látky	223 až 323 K	± 3,0 K	ASTM D 9766
⁽¹⁾ Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky					

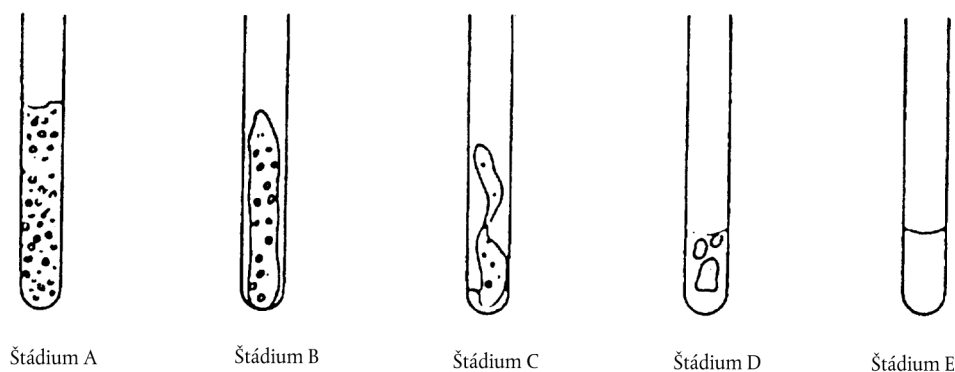
1.6. OPIS METÓD

Postupy skoro všetkých skúšobných metód sú opísané v medzinárodných a štátnych normách (pozri dodatok 1).

1.6.1. Metódy s kapilárnou rúrkou

Keď sú testované látky, ktoré sú rozdrvené na jemný prach, vystavené pomalému nárastu teploty, zvyčajne prejavujú štádiá topenia, ktoré sú znázornené na obrázku 1.

Obrázok 1



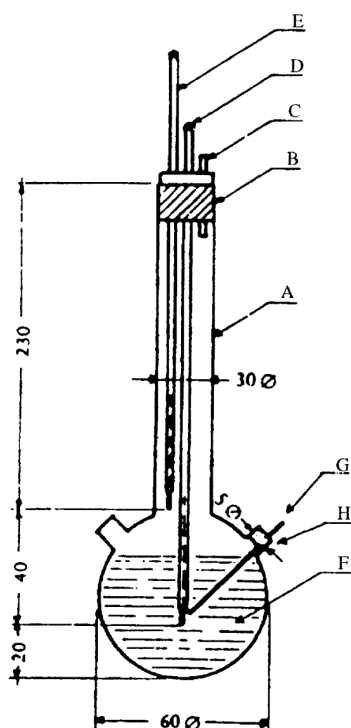
- Štádium A** (začiatok procesu topenia): Jemné kvapôčky rovnomerne priliehajú k vnútornej stene kapilárnej rúrky.
- Štádium B:** medzi testovanou vzorkou a vnútornou stenou kapilárnej rúrky sa objavuje voľný priestor následkom zmrašťovania taveniny.
- Štádium C:** zmraštená testovaná vzorka sa začína zosúvať nadol a skvapalnieva.
- Štádium D:** na povrchu sa vytvára úplný meniskus, avšak značné množstvo testovanej vzorky zostáva naďalej v tuhom skupenstve.
- Štádium E** (konečné štádium procesu topenia): v kapilárnej rúrke už nemožno sledovať žiadne tuhé čiastočky.

Počas stanovovania teploty topenia sa teploty zaznamenávajú na začiatku procesu topenia a v konečnom štádiu.

1.6.1.1. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalinovým kúpeľom

Na obrázku 2 je znázornený typ standardizovaného prístroja na meranie teploty topenia vyrobeného zo skla (JIS K 0064); všetky špecifikácie (rozmery) sú uvedené v milimetroch (mm).

Obrázok 2



- A: Meracia nádoba
 B: Zátka
 C: Ventil
 D: Teplomer
 E: Pridavný teplomer
 F: Kúpeľová kvapalina
 G: Kapilárna rúrka vytrpená zo skla o dĺžke 80-100 mm, s vnútorným priemerom približne 1 mm, s maximálnym vonkajším priemerom 5 mm a s hrúbkou steny 0,2-0,3 mm
 H: Bočná rúrka

Temperačná kvapalina:

Je potrebné zvoliť vhodnú kvapalinu. Voľba správnej kvapaliny závisí od teploty topenia, ktorá má byť stanovená, napr. parafínový olej pre teploty topenia, ktoré nepresahujú 473 K, silikónový olej pre teploty topenia, ktoré nepresahujú 573 K.

Pre teploty topenia nad 523 K sa môže použiť zmes pozostávajúca z troch dielov kyseliny sírovej a dvoch dielov síranu draselného (v pomere hmôt). Pri použití takejto zmesi je potrebné dodržiavať vhodné bezpečnostné opatrenia.

Teplomer:

Treba používať len také teplomery, ktoré spĺňajú požiadavky týchto alebo ekvivalentných noriem:

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

Postup:

Suchá testovaná látka sa v tretej miske rozomelie na jemný prášok a vloží sa do kapilárnej rúrky, ktorá je na jednom konci zatavená. Testovaný prášok sa tesne natlačí tak, aby náplň tvorila približne 3 mm stĺpec. Na účely dosiahnutia rovnomerne natesnanej vzorky je potrebné kapilárnu rúrku pustiť z výšky približne 700 mm cez sklenú rúrku vertikálne na hodinkové sklíčko.

Naplnená kapilárna rúrka sa umiestni do kúpeľa tak, aby sa stredná časť ortuťovej guľôčky teplomeru dotýkala tej časti rúrky, v ktorej je umiestnená testovaná vzorka. Kapilárna rúrka sa do prístroja vkladá zvyčajne pri teplote, ktorá je o 10 K nižšia ako samotná teplota topenia.

Temperačná kvapalina sa zahrieva tak, aby nárast teploty predstavoval približne 3 K za minútu. Kvapalinu je potrebné neustále miešať. Pri teplote približne o 10 K nižšej ako predpokladaná teplota topenia testovanej látky sa nárast teploty nastaví na maximum 1 K za minútu.

Výpočet:

Výpočet teploty topenia je takýto:

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

kde:

T = korigovaná teplota topenia v K

T_D = teplota odčítaná na teplomere D v K

T_E = teplota odčítaná na teplomere E v K

n = počet dielikov ortuťového stĺpca teplomeru D na výstupnej trubičke.

1.6.1.2. Zariadenia na meranie teploty topenia s kovovým blokom

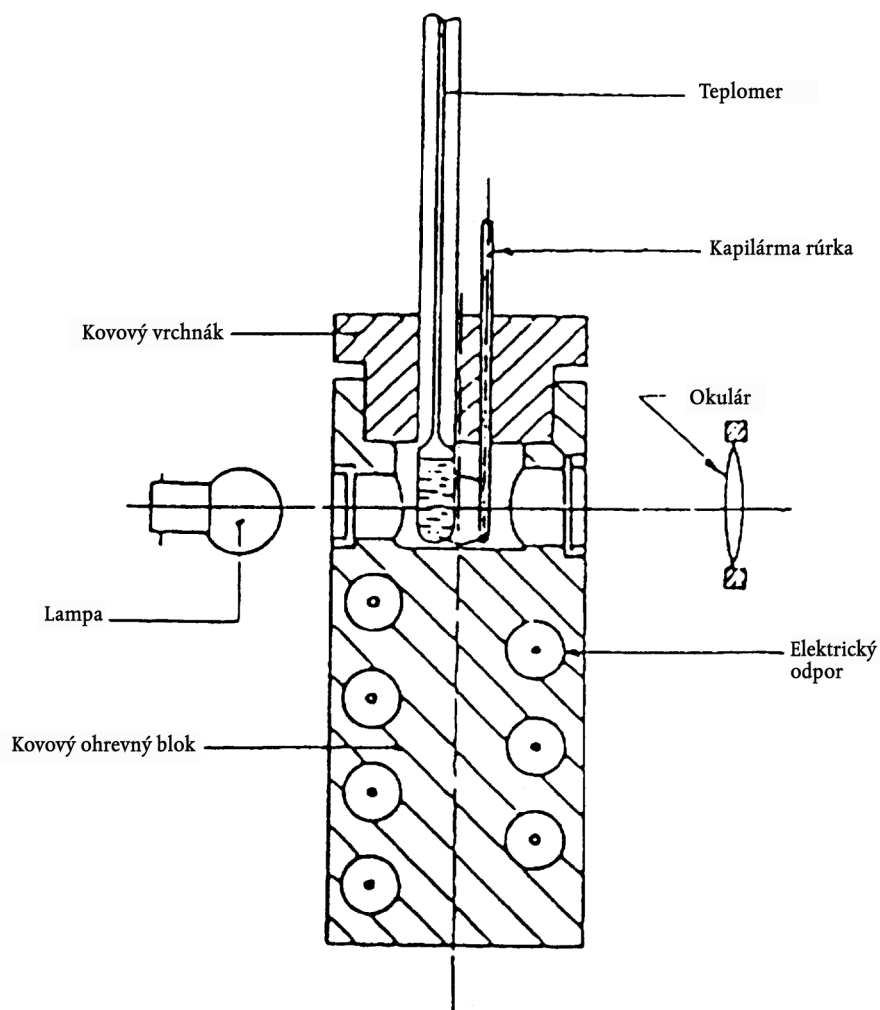
*Prístroje:**Pozostávajú z týchto častí:*

- valcovitý blok, ktorého horná časť je dutá a vytvára komoru (pozri obrázok 3),
- kovový vrchnák s dvoma alebo viacerými otvormi umožňujúcimi zasunutie rúrok do kovového bloku,
- ohrevný systém kovového bloku, pozostávajúci napríklad z elektrického odporu zabudovaného do kovového bloku,
- reostat na reguláciu príkonu energie v prípade použitia elektrického ohrievania,
- štyri okienka zo žiaruvzdorného skla na bočných stenách komory, ktoré sú umiestnené protiľahlo a vzájomne v pravých uhloch. Pred jedným z týchto okienok je namontovaný okulár na sledovanie kapilárnej rúrky. Zvyšné tri okienka sa používajú na osvetlenie vnútornej komory kovového bloku pomocou lámp,
- kapilárna rúrka zo žiaruvzdorného skla, na jednom konci uzavretá (pozri odsek 1.6.1.1).

Teplomer:

Pozri normy spomínané v odseku 1.6.1.1. Možno tiež použiť termoelektrické meracie zariadenia s porovnateľným stupňom presnosti.

Obrázok 3



1.6.1.3. Fotočlánková (fotónková) detekcia

Prístroje a postup:

Prístroj pozostáva z kovovej komory s automatickým ohrevným systémom. Tri kapilárne rúrky sa naplnia testovanou látkou podľa pokynov uvedených v odseku 1.6.1.1 a umiestnia sa do piecky.

Na účely kalibrovania prístroja existuje viacero lienárnych prírastkov teploty a vhodný nárast teploty je elektricky nastavovaný predvolenou konštantnou a lineárnou rýchlosťou ohrevu. Registračné prístroje ukazujú skutočnú teplotu v piecke, ako aj teplotu testovanej látky umiestnenej v kapilárnych rúrkach.

1.6.2. Tepelné bloky**1.6.2.1. Koflerov tepelný blok**

Pozri dodatok.

1.6.2.2. Mikroskop na sledovanie taveniny

Pozri dodatok.

1.6.2.3. Menisková metóda (polyamidy)

Pozri dodatok.

Rýchlosť ohrevu pri teplote topenia by mala byť nižšia ako 1 K za minútu.

1.6.3. Metódy na stanovenie teploty tuhnutia

Pozri dodatok.

1.6.4. Tepelná analýza**1.6.4.1. Diferenciálna tepelná analýza**

Pozri dodatok.

1.6.4.2. Diferenciálna snímacia kalorimetria

Pozri dodatok.

1.6.5. Stanovenie teploty tuhnutia olejov

Pozri dodatok.

2. ÚDAJE

V niektorých prípadoch je potrebná korekcia teplomeru.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- použitú metódu,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak boli také uskutočnené,
- stanovenie presnosti.

Ako teplota topenia sa v správe uvádza priemer najmenej dvoch meraní, ktoré sa nachádzajú v rozmedzí stanovenej presnosti (pozri tabuľky).

Ak sa rozdiel medzi teplotou na začiatku a v konečnom štádiu procesu topenia nachádza v rámci hraničných limitov presnosti metódy, za teplotu topenia sa bude považovať teplota nameraná v konečnom štádiu procesu topenia. Inak sa v správe uvádzajú obidve teploty.

Ak sa testovaná látka rozloží alebo sublimuje ešte pred dosiahnutím teploty topenia, v správe je potrebné uviesť teplotu, pri ktorej bol tento jav pozorovaný.

V správe musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímiesí a fyzikálneho stavu testovanej látky.

4. ODKAZY

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline No 102 – Melting Point/Melting Range (Updated Guideline, adopted 27th July 1995).
- (2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. (vyd.). Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II, s. 803 – 834.
- (3) R. Weissberger ed. (vyd.): 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, s. 505 – 515.

Dodatok

V prípade potreby dodatočných technických podrobností možno použiť napríklad tieto technické normy.

1. Kapilárne metódy

1.1. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalným kúpeľom

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

1.2. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kovovým blokom

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

2. Tepelné bloky

2.1. Koflerov tepelný blok

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

2.2. Mikroskop na sledovanie tavenín

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

2.3. Menisková metóda (polyamidy)

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. Metódy na stanovenie teploty tuhnutia

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

4. Tepelná analýza**4.1. Diferenciálna tepelná analýza**

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. Diferenciálna snímacia kalorimetria

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. Stanovenie teploty tuhnutia olejov

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

A.2. TEPLOTA VARU

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkazoch (2) a (3).

1.1. ÚVOD

Metódy, prístroje a zariadenia opísané v tejto časti môžu byť použité pre kvapalné látky a látky s nízkou teplotou topenia za predpokladu, že tieto látky nepodliehajú reakciám pod teplotou varu (napr. samovoľnej oxidácii alebo prešmykovaníu či degradácii a pod.). Metódy môžu byť aplikované na čisté, ako aj na nečisté kvapalné látky.

Dôraz sa kladie na metódy využívajúce fotočlánkovú detekciu a tepelnú (termickú) analýzu, pretože tieto metódy umožňujú stanovenie teploty topenia a zároveň aj teploty varu. Navyše, merania sa môžu uskutočniť automaticky.

Tzv. „dynamická metóda“ má tú výhodu, že sa môže použiť aj na stanovenie tlaku pary a nie je teda potrebné upravovať teplotu varu k normálnemu tlaku (101,325 kPa), pretože normálny tlak sa môže počas meraní upravovať manostatom.

Poznámky:

Vplyv prímiesí na stanovenie teploty varu závisí vo veľkej miere od charakteru prímiesi. Keď sa vo vzorke nachádzajú prchavé prímiesi, ktoré by mohli nepriaznivo ovplyvniť výsledky, testovaná látka sa očistí.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Normálna teplota varu je definovaná ako teplota, pri ktorej má tlak pary danej kvapaliny hodnotu 101,325 kPa.

Ak sa teplota varu nemeria pri normálnom atmosférickom tlaku, závislosť teploty od tlaku pary môže byť opísaná Clausiusovou-Clapeyronovou rovnicou:

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

kde:

p = tlak pary testovanej látky v pascaloch

ΔH_v = jej výparné teplo (skupenské teplo vyparovania) v J mol⁻¹

R = univerzálna mólová plynová konštanta = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹

T = termodynamická teplota v K

Teplota varu je stanovená pri zohľadnení okolitého tlaku pôsobiaceho počas merania.

Prepočty

Tlak (jednotky: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 Mpa

(„bar“ je naďalej prípustná jednotka, avšak neodporúča sa jej používanie)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(jednotky „mm Hg“ a „Torr“ nie sú prípustné)

1 atm = štandardná atmosféra = 101 325 Pa

(jednotka „atm“ nie je prípustná).

Teplota (jednotky K – kelvin)

$$t = T - 273,15$$

t: teplota v stupňoch Celzia, stupne Celzia (°C),

T: termodynamická teplota, kelvin (K).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nemusia byť použité vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka alebo nová látka obsiahnutá v prípravku. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Niektoré kalibračné látky možno vyhľadať v metódach uvedených v dodatku.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Päť metód na stanovenie teploty varu (rozmedzia varu) sa zakladá na meraní teploty varu, dve ďalšie sa zakladajú na tepelnej analýze.

1.4.1. Stanovenie použitím ebulliometra

Ebulliometre boli pôvodne vyvinuté na stanovenie hmotnosti molekúl zvýšením teploty varu, ale sú vhodné aj na presné merania teploty varu. Veľmi jednoduchý prístroj je opísaný v technickej norme ASTM D 1120-72 (pozrite dodatok). Kvapalina sa v tomto prístroji zahrieva v rovnovážnych podmienkach pri atmosférickom tlaku až po dosiahnutie varu.

1.4.2. Dynamická metóda

Táto metóda spočíva v meraní rekondenzačnej teploty pary v spätnom toku počas varu pomocou vhodného teplomeru. Pri tejto metóde môže byť regulovaný tlak.

1.4.3. Destilačná metóda pre teplotu varu

Táto metóda spočíva v destilácii kvapaliny a v meraní rekondenzačnej teploty pary a v stanovení množstva destilátu.

1.4.4. Metóda podľa Sivolobova

Testovaná vzorka sa zahrieva vo vzorkovej rúrke, ktorá je ponorená do kvapaliny v tepelnom kúpeli. Do vzorkovej rúrky sa zasunie zatavená kapilára, ktorá obsahuje vo svojej spodnej časti vzduchovú bublinu.

1.4.5. Fotočlánková detekcia

Postupuje sa podľa princípov Sivolobovovej metódy, avšak s uskutočnením automatického fotoelektrického merania pri použití stúpajúcich bublín.

1.4.6. Diferenciálna tepelná analýza

Touto technikou merania sa zaznamenáva teplotný rozdiel medzi testovanou látkou a referenčným materiálom ako funkcia teploty, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému teplotnému programu. Keď testovaná vzorka prejde fázovou zmenou zahrnujúcou zmenu entalpie, táto zmena sa prejaví endotermickou odchýlkou (varom) od základnej línie teplotného záznamu.

1.4.7. **Diferenciálna snímacia kalorimetria**

Touto meracou technikou sa zaznamenáva rozdiel vo vstupoch energie do testovanej látky a do referenčného materiálu ako funkcia teploty, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému teplotnému programu. Toto je energia, ktorá je potrebná na vytvorenie nulového teplotného rozdielu medzi testovanou látkou a referenčným materiálom. Keď testovaná vzorka prejde fázovou zmenou zahrnujúcou zmenu entalpie, táto zmena sa prejaví endotermickou odchýlkou (varom) od základnej línie záznamu tepelného toku.

1.5. **KRITÉRIÁ KVALITY**

Aplikovateľnosť a presnosť rozdielnych metód použitých na stanovenie teploty varu, resp. teplotného rozmedzia je uvedená v tabuľke 1.

TABUĽKA 1: POROVNANIE METÓD

Metóda merania	Odhadnutá presnosť	Platná norma
Stanovenie ebulliometrom	$\pm 1,4$ K (do 373 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾ $\pm 2,5$ K (do 600 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾	ASTM D 112072 ⁽¹⁾
Dynamická metóda	$\pm 0,5$ K (do 600 K) ⁽²⁾	
Destilačná metóda (stanovenie rozmedzia teploty varu)	$\pm 0,5$ K (do 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Postup podľa Sivolobova	± 2 K (do 600 K) ⁽²⁾	
Detekcia fotočlánkom	$\pm 0,3$ K (pri 373 K) ⁽²⁾	
Diferenčná tepelná analýza	$\pm 0,5$ K (do 600 K) $\pm 2,0$ K (do 1 273 K)	ASTM E 53776
Diferenčná snímacia kalorimetria	$\pm 0,5$ K (do 600 K) $\pm 2,0$ K (do 1 273 K)	ASTM E 53776
⁽¹⁾ Táto presnosť platí len pre jednoduchý prístroj opísaný napr. v norme ASTM D 112072; môže byť zlepšená použitím dokonalejšieho ebulliometra. ⁽²⁾ Platí len pre čisté látky. Použitie za iných okolností by malo byť zdôvodnené.		

1.6. **OPIS SKÚŠOBNÝCH METÓD**

Postupy niektorých skúšobných metód sú opísané v medzinárodných a štátnych technických normách (pozri dodatok).

1.6.1. **Ebulliometer**

Pozri dodatok.

1.6.2. **Dynamická metóda**

Pozri testovaciu metódu A4 na stanovenie tlaku pary.

Zaznamenáva sa teplota varu pozorovaná pri aplikovanom tlaku 101,325 kPa.

1.6.3. **Destilačný proces (rozmedzie varu)**

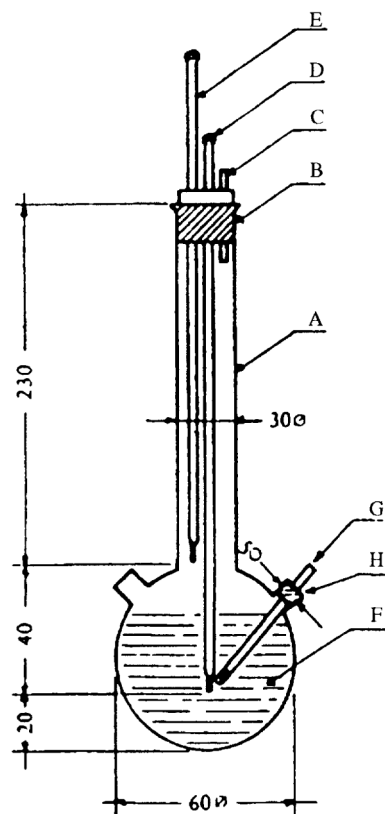
Pozri dodatok.

1.6.4. Metóda bodľa Sivoloboffa

Testovaná vzorka sa zahrieva v prístroji na meranie teploty topenia vo vzorkovej rúrke s priemerom približne 5 mm (obrázok 1).

Obrázok 1 znázorňuje typ štandardizovaného prístroja na meranie teploty topenia a teploty varu (podľa technickej normy JIS K 0064) (vyrobený zo skla, všetky rozmery sú uvedené v milimetroch).

Obrázok 1



- A: Meracia náboda
- B: Zátka
- C: Ventil
- D: Teplomer
- E: Prídvaný teplomer
- F: Kúpeľová kvapalina
- G: Kapilárna rúrka vyrobená zo skla o dĺžke 80-100 mm, s vnútorným priemerom približne 1 mm, s maximálnym vonkajším priemerom 5 mm a s hrúbkou steny 0,2-0,3 mm
- H: Bočná rúrka

Kapilárna rúrka (varná kapilára), ktorá je zatavená približne vo výške 1 cm nad spodným koncom, sa umiestni do vzorkovej rúrky. Výška úrovne, do ktorej sa pridá testovaná látka, musí byť taká, aby zatavená časť kapiláry bola pod hladinou kvapaliny. Vzorková rúrka obsahujúca varnú kapiláru sa buď pripevní k teplomeru pomocou gumičky, alebo sa zboku fixuje podpierkou (pozri obrázok 2).

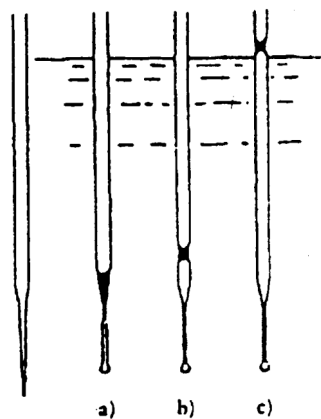
Obrázok 2

Princíp podľa Sivoloboffa



Obrázok 3

Modifikovaný princíp



Temperačná kvapalina sa zvolí v závislosti od teploty varu. Pri teplotách do 573 K možno použiť silikónový olej. Parafínový olej možno použiť len do teploty 473 K. Zahrievanie temperačnej kvapaliny musí byť spočiatku adjustované na nárast teploty 3 K za minútu. Temperačná kvapalina sa musí neustále miešať. Pri teplote približne 10 K pod predpokladanou teplotou varu sa intenzita zahrievania zníži na menej ako 1 K za minútu. V bezprostrednej blízkosti teploty varu sa vo varnej kapiláre začnú rýchlo tvoriť bublinky.

Teplota varu je tá teplota, keď pri momentálnom ochladení v kapiláre ustane tvorba reťazca bubliniek a zrazu začne stúpať stĺpec kvapaliny. Zodpovedajúci údaj na stupnici teplomeru bude predstavovať teplotu varu príslušnej testovanej látky.

V prípade modifikovaného princípu (obrázok č. 3) sa teplota varu stanovuje v kapiláre na meranie teploty topenia. Koniec kapiláry sa nataví a natiahne do hrotu v dĺžke asi 2 cm (a) a nasaje sa malé množstvo testovanej látky. Otvorený koniec jemnej kapiláry sa uzavrie zatavením tak, že na konci zostane malá vzduchová bublinka. Počas zohrievania v prístroji na stanovenie teploty topenia (b) sa vzduchová bublinka rozpína. Teplota varu zodpovedá teplote, pri ktorej testovaná látka dosiahne povrch temperačnej kvapaliny (c).

1.6.5. Fotočlánková detekcia

Testovaná vzorka sa zahrieva v kapiláre umiestnenej vo vyhrievanom kovovom bloku.

Cez vhodne umiestnené otvory v kovovom bloku sa nasmeruje svetelný lúč cez testovanú látku na dôkladne kalibrovaný fotočlánok.

Počas nárastu teploty testovanej vzorky sa vo varnej kapiláre začnú objavovať samostatné vzduchové bublinky. Keď sa dosiahne teplota varu, počet vzduchových bubliniek sa nápadne zvýši. Tento jav spôsobí zmenu v intenzite svetla zaznamenanú fotočlánkom, ktorý vyšle stop signál indikátoru odčítavajúcemu teplotu z platínového odporového teplomeru umiestneného v kovovom bloku.

Táto metóda je obzvlášť výhodná, pretože umožňuje stanovenie skúmaných hodnôt aj pri teplotách nižších ako bežná izbová teplota až do 253,15 K (- 20 °C) bez akýchkoľvek zmien na prístroji. Inštrument stačí iba umiestniť do chladiaceho kúpeľa.

1.6.6. Tepelná analýza

1.6.6.1. Diferenciálna tepelná analýza

Pozri dodatok.

1.6.6.2. Diferenciálna snímacia kalorimetria

Pozri dodatok.

2. ÚDAJE

Pri malých odchýlkach od normálneho tlaku (max. ± 5 kPa) sa teploty varu normalizujú na T_n pomocou tejto rovnice podľa Sidneyho Younga:

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

kde:

Δp = (101,325 - p) [pozor na znamienko!]

p = meranie tlaku v kPa

f_T = pomer zmeny teploty varu k tlaku v K/kPa

T = nameraná teplota varu v K

T_n = teplota varu korigovaná k normálnemu tlaku v K

Opravné koeficienty na teplotu, f_T , a rovnice na ich aproximáciu sú pre mnohé látky zahrnuté v uvedených medzinárodných a národných technických normách.

Napríklad v metóde podľa technickej normy DIN 53171 sa spomínajú tieto hrubé opravy pre rozpúšťadlá obsiahnuté v náterových farbách:

TABUĽKA 2: OPRAVNÉ KOEFICIENTY f_T NA TEPLOTU

Teplota T (K)	Opravný koeficient 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. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- použitú metódu,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a nečistoty) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak boli takéto uskutočnené,
- odhad presnosti.

Ako teplota varu sa uvádza stredná hodnota najmenej dvoch meraní, ktoré sú v rozmedzí stanovenej presnosti (pozri tabuľku 1).

V správe musia byť zaznamenané namerané teploty varu a ich priemerné hodnoty a tlak, resp. tlaky, pri ktorých boli merania uskutočnené a sú uvedené v kPa. Odporúča sa, aby použitý tlak dosahoval hodnoty blízke normálnemu atmosférickému tlaku.

V správe musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímiesí a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

4. ODKAZY

- (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.

Dodatok

V prípade potreby dodatočných technických podrobností možno použiť napríklad tieto technické normy:

1. Ebulliometer

ASTM D 1120-72

Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. Destilačný proces (rozmedzie varu)

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

3. Diferenciálna tepelná analýza a diferenciálna snímacia kalorimetria

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. RELATÍVNA HUSTOTA

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkazoch (2) a (3).

1.1. ÚVOD

Opísané metódy na stanovenie relatívnej hustoty sa môžu použiť pre tuhé a kvapalné látky bez akýchkoľvek obmedzení v spojitosti so stupňom ich čistoty. Rozličné použiteľné metódy sú uvedené v tabuľke 1.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Relatívna hustota, D_4^{20} , tuhých látok alebo kvapalín je pomer medzi hmotnosťou objemu príslušnej látky určenej na testovanie, stanovenou pri teplote 20 °C, a hmotnosťou toho istého objemu vody, stanoveného pri teplote 4 °C. Relatívna hustota nemá žiadny rozmer.

Hustota, ρ , danej látky je pomer hmotnosti, m , a jej objemu, v .

Hustota, ρ , sa udáva v jednotkách SI, v kg/m^3 .

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY (1) (3)

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová chemická látka alebo nová chemická látka obsiahnutá v chemickom prípravku. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNÝCH METÓD

Používajú sa štyri triedy (skupiny) skúšobných metód.

1.4.1. Výlačné metódy**1.4.1.1. Hustomer (pre kvapalné látky)**

Dostatočne presné a rýchle stanovenia hustoty možno dosiahnuť ponorným hustomerom, ktorý umožňuje stanovenie hustoty testovanej kvapaliny na základe hĺbky ponorenia odčítaním príslušnej hodnoty z delenej stupnice.

1.4.1.2. Hydrostatické váhy (pre tuhé a kvapalné látky)

Na stanovenie hustoty možno použiť rozdiel medzi hmotnosťou príslušnej testovanej vzorky, meranou vo vzduchu a vo vhodnej kvapaline (napr. vo vode).

V prípade tuhých látok sa nameraná hustota vzťahuje iba na konkrétnu použitú vzorku. Na stanovenie hustoty kvapalín sa teleso so známym objemom, v, odváži najprv vo vzduchu a potom v kvapaline.

1.4.1.3. Metóda ponoreného telesa (pre kvapalné látky) (4)

V rámci tejto metódy sa hustota kvapaliny stanoví z rozdielu hodnôt váženia kvapaliny pred ponorením a po ponorení telesa so známym objemom do testovanej kvapaliny.

1.4.2. Pyknometrické metódy

Pre tuhé alebo kvapalné látky možno použiť pyknometre rozličných tvarov a so známymi objemami. Hustota sa vypočíta z rozdielu hmotností medzi plným a prázdny pyknometrom a jeho známeho objemu.

1.4.3. Vzduchový porovnávací pyknometer (pre tuhé látky)

Hustota tuhej látky v akejkoľvek forme sa môže merať pri teplote miestnosti pomocou plynového porovnávacieho pyknometra. Objem látky sa meria vo vzduchu alebo v inertnom plyne vo valci s meniteľným kalibrovaným objemom. Na výpočet hustoty sa jedno meranie hmotnosti vykoná po ukončení merania objemu.

1.4.4. Oscilujúci hustomer (5) (6) (7)

Hustota kvapaliny sa môže merať aj oscilujúcim hustomerom. Mechanický oscilátor zostrojený v tvare trubice do U sa rozkmitá na rezonančný kmitočet oscilátora, ktorý závisí od jeho hmotnosti. Vloženie testovanej látky zmení rezonančný kmitočet oscilátora. Prístroj musí byť kalibrovaný dvoma kvapalnými látkami známej hustoty. Tieto látky by sa mali zvoliť podľa možnosti tak, aby ich hustoty pokryli celý meraný rozsah.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Použiteľnosť rozdielných metód používaných na stanovenie relatívnej hustoty je uvedená v tabuľke.

1.6. OPIS METÓD

Technické normy uvedené ako príklady, ktoré treba použiť pre dodatočné technické podrobnosti, sú uvedené v dodatku.

Testy sa musia vykonať pri teplote 20 °C a zároveň je potrebné uskutočniť vždy aspoň dve merania.

2. **ÚDAJE**

Pozrite príslušné technické normy uvedené v dodatku.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- použitú metódu,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak sa takéto uskutočnili.

Relatívna hustota, D_4^{20} , musí byť v správe uvedená podľa definície v bode 1.2, spolu s fyzikálnym stavom meranej látky.

Musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov, obzvlášť v súvislosti s prímесami a s fyzikálnym skupenstvom testovanej látky.

TABUĽKA: POUŽITEĽNOSŤ METÓD

Metóda merania	Hustota		Najvyššia možná hodnota dynamického viskozity	Platná norma
	tuhé látky	kvapaliny		
1.4.1.1 Hustomer		áno	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Hydrostatické váhy				
a) tuhé látky	áno			ISO 1183 (A),
b) kvapaliny		áno	5 Pa s	ISO 901 a 758
1.4.1.3. Metóda ponoreného telesa		áno	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pyknometer				ISO 3507,
a) tuhé látky	áno			ISO 1183 (B), NF T 20053,
b) kvapaliny		áno	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Vzduchový porovnávací pyknometer	áno			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Oscilujúci hustomer		áno	5 Pa s	

4. **ODKAZY**

- (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.

Dodatok

V prípade potreby dodatočných technických podrobností možno použiť napríklad tieto technické normy:

1. **VÝTLAČNÉ METÓDY**

1.1. Hydrometer

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. Hydrostatické váhy

Pre tuhé látky

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use – Determination of the density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers, determination of density

Pre kvapalné látky

ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 a 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. Metóda ponoreného telesa

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

2. **PYKNOMETRICKÉ METÓDY**

2.1. Pre kvapalné látky

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 ⁻¹ at 15 °C),

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

A.4. TLAK PARY**1. METÓDA**

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie testov OECD (1). Základné princípy sú uvedené v odkazoch (2) a (3).

1.1. ÚVOD

Na účely úspešného uskutočnenia tohto testu sa odporúča získať predbežné informácie o štruktúre, resp. stavbe, teplote topenia a teplote varu príslušnej látky určenej na testovanie.

Neexistuje jediný postup merania, ktorý by sa dal aplikovať (použiť) na celé rozmedzie tlakov pary. Z toho dôvodu sa na meranie tlaku od $<10^{-4}$ Pa do 10^5 Pa odporúča uplatnenie viacerých metód.

Prímesi zvyčajne ovplyvnia tlak pary, a to do takej miery, ktorá závisí od druhu príslušnej prímesi.

V prípadoch, kde sa vo vzorke nachádzajú prchavé prímesi, ktoré by mohli nepriaznivo ovplyvniť výsledok, odporúča sa látku vopred očistiť, resp. zbaviť príslušných prímiesí. Môže byť tiež vhodné stanoviť tlak pary pre technický materiál.

V rámci niektorých metód opísaných v tomto materiáli sa používajú prístroje s kovovými časťami. Túto skutočnosť je potrebné vziať do úvahy pri testovaní žieravých látok.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Tlak pary látky je definovaný ako tlak nasýtenej pary nad tuhou alebo kvapalnou látkou. Pri termodynamickej rovnováhe tlak pary čistej látky je výlučne funkciou teploty.

Jednotka SI pre tlak, ktorá sa má používať, je pascal (Pa).

Jednotky, ktoré sa postupne používali s vývojom doby, spolu s prepočítavacími koeficientmi, sú tieto:

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

Jednotkou teploty v rámci sústavy SI je kelvin (K).

Všeobecná mólová (molekulová) plynová konštanta R je $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Teplotná závislosť tlaku pary je opísaná v Clausiusovej-Clapeyronovej rovnici:

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

kde:

p = tlak pary látky vyjadrený v pascaloch

ΔH_v = jej teplota vyparovania v J mol^{-1}

R = všeobecná mólová (molekulová) plynová konštanta $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = termodynamická teplota v K (kelvinoch).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová chemická látka alebo nová chemická látka obsiahnutá v chemickom prípravku. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNÝCH METÓD

Na stanovenie tlaku bolo navrhnutých sedem metód, ktoré sa môžu aplikovať v rozdielnych rozmedziach tlaku pary. V rámci každej metódy je tlak pary stanovovaný pri rozličných teplotách. V limitovanom teplotnom rozmedzí je logaritmus tlaku pary čistej látky lineárnou funkciou inverzie teploty.

1.4.1. **Dynamická metóda**

V rámci dynamickej metódy sa meria teplota varu, ktorá prináleží špecifikovanému tlaku.

Odporúčané rozmedzie:

10^3 až 10^5 Pa.

Táto metóda sa odporúča aj na stanovenie normálnej teploty varu a na tento účel sa dá použiť až do teploty 600 K.

1.4.2. **Statická metóda**

V rámci statického procesu pri termodynamickej rovnováhe sa stanovuje tlak pary vytvorený v uzavretom systéme pri špecifikovanej teplote. Táto metóda je vhodná pre jednozložkové a viaczožkové tuhé látky a kvapaliny.

Odporúčané rozmedzie:

10 až 10^5 Pa.

Táto metóda sa dá použiť aj v rozmedzí od 1 do 10 Pa, len za predpokladu, že sa bude postupovať pozorne a opatrne.

1.4.3. **Izoteniskop**

Táto štandardizovaná metóda je taktiež statickou metódou, avšak zvyčajne nie je vhodná pre viaczožkové systémy. Doplňkové informácie možno získať v technickej norme ASTM, metóda D-2879-86.

Odporúčané rozmedzie:

od 100 do 10^5 Pa.

1.4.4. **Výtoková metóda: Váhy na meranie tlaku pary**

Množstvo látky unikajúce z komôrky za jednotku času cez otvor známej veľkosti sa stanovuje vo vákuových podmienkach, pri ktorých je množstvo látky vracajúce sa späť do komôrky zanedbateľné (napríklad meraním impulzu vyvinutého na vysokocitlivé váhy prúdom pary alebo meraním úbytku hmotnosti).

Odporúčané rozmedzie:

10^{-3} až 1 Pa.

1.4.5. Výtoková metóda: meraním úbytku hmotnosti alebo zachytávaním odparenej látky

Táto metóda je založená na odhade hmotnosti testovanej látky, ktorá za jednotku času unikla z Knudsenovej komôrky (4) vo forme pary cez mikrootvor v ultravákuových podmienkach. Hmotnosť výtokovej uniknutej pary sa dá zistiť buď stanovením úbytku hmotnosti komôrky, alebo kondenzáciou pary pri nízkej teplote a stanovením množstva vyprchanej látky použitím chromatografickej analýzy. Tlak pary sa vypočíta použitím Hertzovho-Knudsenovho vzťahu.

Odporúčané rozmedzie:

10^{-3} až 1 Pa.

1.4.6. Metóda plynovej saturácie

Prúd inertného nosného plynu sa prepúšťa nad testovanou látkou takým spôsobom, že plyn sa nasýti parou testovanej látky. Množstvo materiálu transportovaného známym množstvom nosného plynu sa dá merať buď jeho zachytením do vhodného zachytávača, alebo vhodnou „intrain“ analytickou metódou. Výsledná hodnota sa potom použije na výpočet tlaku pary pri danej teplote.

Odporúčané rozmedzie:

10^{-4} až 1 Pa.

Táto metóda sa dá použiť aj v rozmedzí od 1 do 10 Pa, avšak za predpokladu, že sa bude postupovať pozorne a opatrne.

1.4.7. Metóda rotujúcej guľôčky

Bezprostredným meracím prvkom v rotačnom meracom prístroji je malá oceľová guľôčka, ktorá je zavesená do magnetického poľa a v ňom rotuje vysokou rýchlosťou. Tlak pary sa odvodzuje zo spomaľovania rotačného pohybu guľôčky, ktoré je závislé od tlaku.

Odporúčané rozmedzie:

10^{-4} až 0,5 Pa.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Rôzne metódy na stanovenie tlaku pary sa porovnávajú z hľadiska ich použiteľnosti, opakovateľnosti, reprodukovateľnosti, rozsahu merania a existujúcich technických noriem. Prehľadná forma porovnania týchto metód je uvedená v tejto tabuľke.

KRITÉRIÁ AKOSTI

Metóda merania	Látky		Odhad opakovateľnosti ⁽¹⁾	Odhad reprodukovateľnosti ⁽¹⁾	Odporúčaná oblasť	Platná norma
	tuhé	kvapalné				
1.4.1. Dynamická metóda	s nízkou teplotou topenia	áno	do 25 %	do 25 %	10^3 Pa až 2×10^3 Pa	—
			1 až 5 %	1 až 5 %	2×10^3 Pa až 10^5 Pa	—
1.4.2. Statická metóda	áno	áno	5 až 10 %	5 až 10 %	10 Pa až 10^5 Pa ⁽²⁾	NF T 20048(5)
1.4.3. Izoteniskop	áno	áno	5 až 10 %	5 až 10 %	10^3 Pa až 10^5 Pa	ASTMD 287986
1.4.4. Výtoková metóda – váhy na meranie tlaku pár	áno	áno	5 až 20 %	do 50 %	10^{-3} Pa až 1 Pa	NF T 20047(6)
1.4.5. Výtoková metóda – meranie úbytku hmotnosti	áno	áno	10 až 30 %	—	10^{-3} Pa až 1 Pa	—
1.4.6. Metóda plynovej saturácie	áno	áno	10 až 30 %	Do 50 %	10^{-4} Pa až 1 Pa ⁽²⁾	—
1.4.7. Metóda rotujúcej guľôčky	áno	áno	10 až 20 %	—	10^{-4} Pa až 0,5 Pa	—

⁽¹⁾ V závislosti od stupňa čistoty látky.

⁽²⁾ Tieto metódy sa dajú použiť aj v rozmedzí od 1 do 10 Pa, avšak za predpokladu, že sa bude postupovať pozorne a opatrne.

1.6. OPIS METÓD

1.6.1. **Dynamické meranie**1.6.1.1. *Prístroje*

Merací prístroj obvyčajne pozostáva z varnej nádoby s pripojeným chladičom, vyrobenými zo skla alebo kovu (obrázok 1), zo zariadenia na meranie teploty a zariadenia na reguláciu a meranie tlaku. Typický merací prístroj, znázornený na kresbe, je vyrobený z teplovzdorného skla a pozostáva z piatich častí:

Veľká, čiastočne dvojstenová trubica pozostáva zo zabrusenej plášťovej prípojky, chladiča, chladiacej nádoby a prívodu (vstupu).

Sklený valec opatrený „Cottrellovou pumpou“ je inštalovaný do varnej časti trubice a má hrubý povrch z drveného skla na zabránenie prudkého varu v priebehu procesu varu.

Teplota sa meria pomocou vhodného teplotne citlivého elementu (napríklad odporového teplomeru, plášťového termočlánku), zasunutého do prístroja až po miesto merania teploty (č. 5, obrázok 1) cez vhodný vstup (napríklad cez zasunovaciu zabrusenú prípojku).

Vytvorené sú potrebné spojenia so zariadením na reguláciu tlaku a s meracím zariadením.

Banka, ktorá funguje ako oddeľujúci priestor, je spojená s meracím prístrojom kapilárou.

Varnú nádobu zohrieva ohrievací článok (napríklad výmenný patrónový ohrievač), ktorý sa zospodu zasúva do prístroja. Požadovaný ohrievací prúd sa nastavuje, reguluje a stabilizuje prostredníctvom termočlánku (tepelného článku).

Potrebné vákuum v rozmedzí od 10^2 Pa do približne 10^5 Pa sa vytvorí pomocou vákuovej pumpy.

Vhodný ventil sa používa na dávkovanie vzduchu alebo dusíka na reguláciu tlaku (rozsah merania približne od 10^2 Pa do 10^5 Pa) a ventiláciu.

Tlak sa meria tlakomerom.

1.6.1.2. *Postup merania*

Tlak pary sa meria stanovením teploty varu testovanej vzorky pri rôznych špecifikovaných tlakoch zhruba medzi 10^3 Pa a 10^5 Pa. Stála teplota pri konštantnom tlaku naznačuje, že bola dosiahnutá teplota varu. Peniace látky sa nemôžu merať použitím tejto metódy.

Testovaná látka sa umiestni do čistej a suchej nádoby na vzorky. S problémami sa možno stretnúť v prípade tuhých látok, ktoré nie sú vo forme prášku, avšak tieto problémy sa môžu v niektorých prípadoch vyriešiť zahriatím chladiaceho plášťa. Po naplnení nádoby sa prístroj tesne uzavrie v prírube a testovaná látka sa odplyní. Potom sa nastaví najnižší požadovaný tlak a zapne sa zohrievanie. Zároveň sa teplotne citlivý element pripojí na registračný prístroj.

Rovnováha sa dosiahne vtedy, keď sa zaregistruje konštantná teplota varu pri konštantnom tlaku. Treba obzvlášť dávať pozor na to, aby sa zabránilo prudkému varu. Okrem toho musí v chladiči dôjsť k úplnej kondenzácii. Keď sa stanovuje tlak pary tuhých látok s nízkou teplotou topenia, je potrebné dbať na to, aby sa zabránilo zablokovaniu chladiča.

Po zaregistrovaní tohto rovnovážneho bodu sa nastaví vyšší tlak. Postup pokračuje rovnakým spôsobom až po dosiahnutie tlaku 10^5 Pa (spolu je to približne 5 až 10 meraní, t. j. meraní v rovnovážnych bodoch). V rámci kontroly sa musia rovnovážne body opakovať a merať pri klesajúcich tlakoch.

1.6.2. Statické meranie**1.6.2.1. Prístroje**

Prístroj pozostáva z nádoby na testovanú vzorku, ohrievacieho a chladiaceho systému na reguláciu teploty testovanej vzorky a na meranie teploty. Prístroj je taktiež vybavený nástrojmi na nastavenie a meranie tlaku. Obrázky 2a a 2b ilustrujú príslušné základné princípy.

Komora na vzorky (obrázok 2a) je na jednej strane napojená na vhodný vysokovákuový ventil. Na druhej strane je pripojená trubica v tvare U, ktorá obsahuje vhodnú manometrovú (tlakomerovú) kvapalinu. Jeden koniec trubice v tvare U odbočuje k vákuovej výveve, valcu s dusíkom alebo ventilačnému ventilu a k manometru (tlakomeru).

Namiesto trubice v tvare U možno použiť snímač tlaku s tlakomerom (obrázok 2b).

Na účely regulácie teploty testovanej vzorky je nádoba na vzorky spolu s ventilom a trubicou do tvaru U alebo snímačom tlaku (tlakomerom) umiestnená do kúpeľa, ktorý sa udržiava pri konštantnej teplote s maximálnym výkyvom $\pm 0,2$ K. Merania teploty sa uskutočňujú na vonkajšej stene nádoby obsahujúcej testovanú vzorku alebo priamo v samotnej nádobe.

Vákuová výveva s chladiacim zachytávačom sa používa na vákuovanie prístroja.

V prípade metódy 2a sa tlak pary testovanej látky meria nepriamo použitím nulového indikátora (ukazovateľa s nulovým bodom). Toto zohľadňuje skutočnosť, že hustota kvapaliny v trubici tvaru U sa mení pri rýchlej zmene teploty.

Tieto kvapaliny sú vhodné na použitie ako nulové indikátory pre trubicu v tvare U v závislosti od tlakového rozmedzia a vlastností testovanej látky: silikónové tekutiny, ftaláty. Testovaná látka sa nesmie vo výraznejšej miere rozpúšťať v kvapaline nachádzajúcej sa v trubici tvaru U alebo s ňou reagovať.

Pre manometer (tlakomer) možno v rozsahu normálneho atmosférického tlaku do 10^2 Pa použiť ortuť, zatiaľ čo silikónové tekutiny a ftaláty sú vhodné na použitie pri tlakoch pod 10^2 Pa až po 10 Pa. Pri tlakoch pod 10^{-1} Pa sa môžu použiť kapacitné manometre (tlakomery) so zahrievateľnou membránou. Existujú aj iné tlakové snímače (tlakomery), ktoré možno použiť pri tlakoch pod 10^2 Pa.

1.6.2.2. Postup merania

Pred začatím merania sa musia všetky súčasti prístroja zobrazeného na obrázku 2 dôkladne očistiť a osušiť.

V prípade metódy 2a naplňte trubicu v tvare U zvolenou kvapalinou, ktorá sa musí pred odčítaním nameraných hodnôt odplyníť pri zvýšenej teplote.

Testovaná látka sa umiestni do prístroja, ktorý sa potom uzatvorí a teplota sa dostatočne zredukuje na odplynenie. Teplota musí byť dostatočne nízka, aby sa tak zaručilo, že vzduch bude vysatý, ale v prípade viaczložkového systému nesmie zmeniť zloženie materiálu. Ak sa tak požaduje, rovnováha sa dá dosiahnuť rýchlejšie miešaním.

Testovaná vzorka môže byť podchladená napríklad skvapalneným dusíkom (pričom treba dbať na to, aby sa zabránilo kondenzácii vzduchu alebo nasatiu kvapaliny) alebo zmesou etanolu a suchého ľadu. Na merania nízkych teplôt sa odporúča použiť tepelne regulovaný kúpeľ napojený na ultrakryomat.

Pri otvorenej polohe ventilu nad nádobou obsahujúcou testovanú vzorku sa odsávaním počas niekoľkých minút odstráni prítomný vzduch. Ventil sa potom uzavrie a teplota testovanej vzorky sa redukuje na najnižšiu žiaducu úroveň. Ak je to potrebné, postup vákuovania sa musí opakovať niekoľkokrát za sebou.

Keď sa vzorka zahreje, tlak pary narastá. Toto zmení rovnováhu kvapaliny v trubici tvaru U. Na kompenzovanie tohto javu sa do prístroja cez ventil vpúšťa dusík alebo vzduch dovtedy, kým sa kvapalina na indikáciu tlaku opäť neustáli na nulovej hodnote. Tlak, ktorý je na toto potrebný, sa môže odčítať z presného kontrolného tlakomeru (manometra) pri teplote miestnosti. Tento tlak zodpovedá tlaku pary testovanej látky pri tejto danej konkrétnej teplote merania.

Metóda 2b je podobná, avšak tlak pary sa odčítava priamo.

Teplotná závislosť tlaku pary sa stanovuje vo vhodne krátkych intervaloch (spolu približne 5 až 10 meraciach bodov) až po požadované maximum. Odčítania nízkych teplôt sa musia opakovať ako kontrola.

Ak sa hodnoty dosiahnuté z opakovaných odčítaní nezhodujú s krivkou dosiahnutou pre stúpajúcu teplotu, môže to byť následkom jednej z uvedených skutočností:

1. Testovaná vzorka naďalej obsahuje vzduch (napríklad materiály s vysokou viskozitou) alebo nízkovriace látky, ktorý je uvoľňovaný, resp. ktoré sú uvoľňované počas zahrievania a môže byť odstránený, resp. môžu byť odstránené odsátím po ďalšom podchladení.
2. Chladiaca teplota nie je dostatočne nízka. V tomto prípade sa ako chladiaci činiteľ použije skvapalnený dusík.

V prípade, ak ide o bod 1 alebo 2, musia sa merania opakovať.

3. Testovaná látka podlieha reakcii v skúmanom teplotnom rozmedzí (napríklad rozkladu alebo polymerizácii).

1.6.3. Izoteniskop

Vyčerpávajúci opis tejto metódy možno nájsť v odkaze pod bodom 7. Princíp meracieho zariadenia je znázornený na obrázku 3. Podobne ako statická metóda opísaná v odseku 1.6.2, aj izoteniskop je vhodný na skúmanie tuhých látok aj kvapalín.

V prípade kvapalín samotná testovaná látka slúži ako kvapalina v pomocnom tlakomere (manometri). Množstvo kvapaliny, ktoré je dostatočné na zaplnenie banky a krátkeho ramena tlakomerovej sekcie, sa umiestni do izoteniskopu. Izoteniskop sa napojí na vákuový systém a vákuuje, potom sa naplní dusíkom. Vákuovanie a prečistenie systému sa opakuje dvakrát, aby sa odstránil reziduálny kyslík. Naplnený izoteniskop sa umiestni v horizontálnej polohe, tak aby sa testovaná vzorka rozšírila v tenkej vrstve vo vzorkovej banke a tlakomerovej sekcii (časť v tvare U). Tlak systému sa redukuje na 133 Pa a testovaná vzorka sa mierne zahrieva, až kým nezačne vriieť (odstránenie rozpustených viazaných plynov). Izoteniskop sa potom umiestni tak, aby sa testovaná vzorka opäť vrátila do banky a krátkeho ramena tlakomeru a aby tieto boli opäť úplne naplnené kvapalinou. Tlak sa udržiava na takej úrovni ako pri odplynovaní; vytiahnutá špička banky so vzorkou sa zahrieva malým plameňom dovtedy, kým sa uvoľnená para zo vzorky nerozšíri v dostatočnej miere na to, aby vytlačila časť vzorky z hornej časti banky a ramena tlakomeru do tlakomerovej sekcie izoteniskopu, vytvoriac tak plynom naplnený priestor bez prítomnosti dusíka.

Izoteniskop sa potom umiestni do kúpeľa s konštantnou teplotou a tlak dusíka sa nastaví tak, aby sa rovnal tlaku testovanej vzorky. Rovnováhu tlaku ukáže tlakomerová sekcia izoteniskopu. V rovnovážnom stave sa tlak dusíka rovná tlaku pary testovanej látky.

V prípade tuhých látok sa použijú tlakomerové kvapaliny uvedené v odseku 1.6.2.1 v závislosti od tlakového a teplotného rozmedzia. Odplynená tlakomerová kvapalina sa naleje do vydutiny na dlhom ramene izoteniskopu. Potom sa tuhá látka určená na skúmanie umiestni do banky a odplyní sa pri zvýšenej teplote. Po tomto úkone sa izoteniskop nakloní tak, aby tlakomerová kvapalina mohla natiecť do trubice v tvare U. Meranie tlaku pary ako funkcie teploty sa uskutoční podľa postupu uvedeného v odseku 1.6.2.

1.6.4. Výtoková metóda: Váhy na meranie tlaku pary

1.6.4.1. Prístroje

Rozličné verzie prístroja sú opísané v literatúre pod bodom (1). Prístroj, ktorý je opísaný v tejto časti, ilustruje všeobecný princíp tejto metódy (obrázok 4). Na obrázku 4 sú znázornené hlavné zložky prístroja, pozostávajúce z vysokovákuovej nádoby z nehrdzavejúcej ocele alebo zo skla, zariadenia na vytváranie a meranie vákuu a zo vstavaných zložiek na meranie tlaku pary na váhach. Prístroj pozostáva z nasledujúcich vstavaných zložiek (komponentov):

- odparovacej piecky s prírubou a otočným vstupom. Odparovacia piecka je v podstate valcovitá nádoba, vyrobená napríklad z medi alebo chemicky odolnej zliatiny s dobrou tepelnou vodivosťou. Možno tiež použiť sklenú nádobu s medenou stenou. Piecka má priemer približne 3 cm až 5 cm a je vysoká 2 cm až 5 cm. Je opatrená jedným až tromi otvormi s rozdielnymi veľkosťami na umožnenie prúdenia pary. Piecka je vyhrievaná buď vyhrievacou platničkou umiestnenou pod ňou alebo vyhrievacou špirálou ovinutou okolo jej vonkajšieho plášťa. Aby sa zabránilo strate tepla únikom cez podkladovú platňu, ohrievač je prichytený k tejto platni kovom s nízkou tepelnou vodivosťou (argentán, pakfón, nové striebro, niklová mosadz alebo chrómniklová ocel), napríklad rúrkou z niklovej mosadze pripojenou k otočnému vstupu, ak sa používa piecka s viacerými otvormi. Táto úprava má tú výhodu, že umožňuje zasunutie medenej tyče. Umožňuje to chladenie z vonkajšej strany použitím chladiaceho kúpeľa,

- ak má veko medenej piecky viacero otvorov rozličných priemerov pod vzájomným uhlom 90°, možno tak v rámci celkového rozmedzia merania pokryť rôzne rozmedzia tlaku pary (otvory s priermi v rozmedzí približne od 0,30 mm do 4,50 mm). Veľké otvory sa používajú pre nízke tlaky pary a naopak. Otáčaním piecky môže byť nastavený požadovaný otvor alebo medzipoloha na prúdenie pary (otvor v piecke – kryt – miska váh) a prúd molekúl sa uvoľní alebo odkloní cez otvor v piecke na miskú váh. Na účely merania teploty testovanej látky sa na vhodné miesto umiestni tepelný článok (termočlánok) alebo odporový teplomer,
- nad krytom je umiestnená miska váh prináležiaca vysokocitlivým mikrováham (pozri ďalej). Miska váh má priemer približne 30 mm. Pozlátený hliník predstavuje vhodný materiál,
- miska váh je obklopená valcovitým mosadzným alebo medeným chladiacim boxom. V závislosti od typu váh je opatrená otvormi pre rameno váh (vahadlo) a otvorom v ochrannom kryte pre prúd molekúl a jej úlohou je zaručiť úplnú kondenzáciu pary na miske váh. Odvádzanie tepla smerom von je zabezpečené napríklad medenou tyčou pripojenou k chladiacemu boxu. Tyč je vyvedená cez základovú platňu a je od nej tepelne izolovaná napríklad trubicou z chrómnikovej ocele. Tyč je zasunutá do Dewarovej nádoby obsahujúcej skvapalnený dusík, umiestnenej pod základovou platňou, alebo skvapalnený dusík cirkuluje priamo cez tyč. Chladiaci box sa takto udržiava pri teplote približne - 120 °C. Miska váh je chladená výlučne sálaním a vyhovuje skúmanému tlakovému rozmedziu (chladenie približne jednu hodinu pred začatím merania),
- váhy sú umiestnené nad chladiacim boxom. Vhodnými váhami pre túto metódu sú napríklad vysokocitlivé dvojramenné elektronické mikrováhy (8) alebo vysokocitlivý magneto-elektrický prístroj (pozri Smernicu na vykonávanie OECD testov 104, vydanie 12. 5. 1981),
- v základovej platni sú zabudované aj elektrické prípojky pre tepelné články (termočlánky) (alebo odporové teplomery) a ohrievací rúrkový had,
- vákuum sa v nádobe vytvára použitím vákuovej vývevy na tvorbu čiastočného vákua (podtlaku) alebo použitím vysokovákuovej vývevy (požadované vákuum približne 1 Pa až 2 · 10⁻³ Pa sa dosiahne po 2 hodinách odčerpávania vzduchu). Tlak je regulovaný vhodným ionizačným tlakomerom (manometrom).

1.6.4.2. Postup merania

Nádoba sa naplní testovanou látkou a veko sa uzavrie. Kryt a chladiaci box sa posunú nad piecku. Prístroj sa uzavrie a zapnú sa vákuové vývevy. Konečný tlak pred začatím meraní by mal byť približne 10⁻⁴ Pa. Chladenie v chladiacom boxe sa začína pri tlaku 10⁻² Pa.

Ak sa dosiahne požadované vákuum, začne sa so sériou kalibrácií pri najnižšej požadovanej teplote. Nastaví sa zodpovedajúci otvor na veku, prúd pary prechádza štítom umiestneným priamo nad otvorom a naráža na ochladený povrch misky váh. Miska váh musí byť dostatočne veľká, aby sa zabezpečilo, že celý prúd pary vedený krytom bude narážať na jej povrch. Impulz prúdu pary pôsobí ako sila proti miske váh a molekuly sa kondenzujú na jej chladnom povrchu.

Impulz a následná kondenzácia vytvárajú signál na registračnom prístroji. Vyhodnotenie signálov poskytuje dve informácie:

1. V prístroji, ktorý je tu opísaný, sa tlak pary stanovuje priamo z impulzu na miskú váh [nie je na to potrebné poznať molekulovú hmotnosť (2)]. Geometrické faktory ako otvor v piecke a uhol prúdenia molekúl musia byť zohľadnené pri vyhodnocovaní čítaní.
2. Zároveň sa môže merať aj hmotnosť kondenzátu a z nej možno vypočítať rýchlosť odparovania. Tlak pary sa môže tiež vypočítať z rýchlosti odparovania a molekulovej hmotnosti použitím Hertzeovej rovnice (2).

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

kde:

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

M = (relatívna) molekulová (mólová) hmotnosť (g mol^{-1})

T = teplota (K) (kelvin)

R = všeobecná molekulová plynová konštanta ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

p = tlak pary (Pa)

Po dosiahnutí potrebného vaku (podtlaku) sa séria meraní začne pri najnižšej želanej meracej teplote.

Pre ďalšie merania sa teplota zvyšuje v malých intervaloch, až kým sa nedosiahne maximálna želaná teplotná hodnota. Testovaná vzorka sa potom opäť ochladí a môže byť zaznamenaná druhá krivka tlaku pary. Ak druhé kolo nepotvrdí výsledky prvého kola meraní, potom je možné, že testovaná látka sa rozkladá v rámci meraného teplotného rozmedzia.

1.6.5. Výtoková metóda – stanovením úbytku hmotnosti

1.6.5.1. Prístroje

Výtokový prístroj pozostáva z týchto základných častí:

- nádoby (nádržky), ktorá môže byť termostaticky udržiavaná pri stálej teplote a vákuovaná a v ktorej sú umiestnené výtokové komôrky,
- vysokovákuovej vývevy (napríklad difúznej vývevy alebo turbomolekulárnej vývevy) s podtlakovým (vákuovým) ventilom,
- zachytávača s použitím skvapalneného dusíka alebo suchého ľadu.

Na obrázku č. 5 je ako príklad znázornená elektricky zohrievaná hliníková vákuová nádoba so štyrmi výtokovými komôrkami s nehrdzavejúcej ocele. Fólia z nehrdzavejúcej ocele s hrúbkou približne 0,3 mm je opatrená výtokovým otvorom s priemerom 0,2 až 1,0 mm a k výtokovej komôrke je prichytená závitovým vekom.

1.6.5.2. Postup merania

Referenčná a testovaná látka sa naplnia do jednotlivých výtokových komôrok, kovová medzistena s otvorom je zaistená závitovým vekom a každá komôrka sa potom odváži s presnosťou na 0,1 mg. Komôrka sa umiestni do prístroja termostaticky udržiavaného pri stálej teplote, ktorý sa potom vákuuje na menej ako jednu desatinu predpokladaného tlaku. V stanovených časových intervaloch v rozmedzí od 5 hodín do 30 hodín sa do prístroja vpúšťa vzduch a opätovným odvážením sa stanoví úbytok hmotnosti výtokových komôrok.

Aby sa zabránilo ovplyvneniu výsledkov prchavými prísadami, komôrka sa opakovane preváža v stanovených časových intervaloch na účely skontrolovania, či je rýchlosť odparovania konštantná prinajmenšom v priebehu dvoch takýchto časových intervalov.

Tlak pary p vo výtokovej komôrke je daný nasledujúcou rovnicou:

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

kde:

p = tlak pary (Pa)

m = hmotnosť testovanej látky, ktorá unikla z komôrky v priebehu času t (kg)

t = čas (s)

A = plocha otvoru (m^2)

K = opravný koeficient

R = všeobecná plynová konštanta ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = teplota (K) (kelvin)

M = relatívna (pomerná) molekulová hmotnosť (kg mol^{-1})

Korekčný činiteľ K závisí od pomeru dĺžky k polomeru valcovitého hrdla otvoru:

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

Vyššie uvedená rovnica môže byť napísaná aj v tomto tvare:

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

kde: $E = \frac{1}{KA} \sqrt{2 \pi R}$ a predstavuje konštantu pre výtokovú komôrku.

Táto konštantu pre výtokovú komôrku E môže byť stanovená referenčnou látkou, pričom sa použije táto rovnica:

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

kde:

$p(r)$ = tlak pary referenčnej látky (Pa)

$M(r)$ = relatívna molekulová hmotnosť referenčnej látky ($\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)

1.6.6. Metóda plynovej saturácie

1.6.6.1. Prístroje

Typický prístroj používaný na uskutočnenie tohto testu pozostáva z celého radu komponentov uvedených na obrázku 6a, ktoré sú opísané nižšie (1).

Inertný plyn:

Nosný plyn nesmie chemicky reagovať s testovanou látkou. Na tento účel zvyčajne stačí použiť dusík, avšak z prípadu na prípad sa môžu požadovať aj iné plyny (10). Použitý plyn musí byť suchý [pozri obrázok 6a, legenda 4: snímač (senzor) relatívnej vlhkosti].

Regulácia toku:

Vhodný systém na reguláciu plynu je žiaduci na zabezpečenie konštantného a upraveného toku plynu cez saturačný stĺpec (kolónu).

Zachytávače pary:

Tieto závisia od konkrétnych vlastností príslušnej testovanej vzorky a od zvolenej metódy analýzy. Para by mala byť zachytávaná kvantitatívne a v takej forme, ktorá umožňuje následnú analýzu. Pre niektoré testované látky budú vhodné aj také typy zachytávačov, ktoré obsahujú kvapaliny ako hexán alebo etylénglykol. Pre iné látky možno zasa použiť tuhé absorpčné činidlá.

Ako alternatívu zachytávania pary s následnou analýzou možno na kvantitatívne stanovenie množstva materiálu transportovaného známym množstvom nosného plynu použiť analytické techniky typu „in-train“, napríklad chromatografiu. Okrem toho možno merať aj úbytok hmotnosti testovanej vzorky.

Výmenník tepla:

Na merania pri rozdielnych teplotách môže byť potrebné do celkovej zostavy zahrnúť aj výmenník tepla.

Saturátorová kolóna:

Testovaná látka sa z roztoku naniesie na vhodný inertný nosič. Pokrytý nosič sa umiestni do saturátorovej kolóny, ktorého rozmery a prietok musia byť také, aby za zaručila úplnú saturáciu nosného plynu. Saturátorová kolóna musí mať termostaticky udržiavanú teplotu. Na merania nad teplotu miestnosti by mal byť priestor medzi saturátorovou kolónou a zachytávačmi ohrievaný, aby sa zabránilo kondenzácii testovanej látky.

Na účely zníženia transportu hmoty, ktorý sa prejavuje pri difúzii, môže byť v poradi za saturátorovou kolónou umiestnená kapilára (pozri obrázok 6b).

1.6.6.2. Postup merania

Príprava saturátorovej kolóny:

Roztok testovanej látky v rozpúšťadle s vysokým stupňom prchavosti sa pridá k vhodnému množstvu nosiča. Je potrebné pridať dostatočné množstvo testovanej látky, aby sa saturácia udržiavala počas trvania celého testu. Rozpúšťadlo sa úplne odparí vo vzduchu alebo v rotačnom odparovači a dôkladne zmiešaný materiál sa pridá do saturátorovej kolóny. Po termostatickej úprave testovanej vzorky sa cez prístroj nechá prúdiť suchý dusík.

Meranie:

Zachytávače alebo „in-train“ detektor sú napojené na výtokovú linku kolóny a zaznamenáva sa čas. Prietok sa kontroluje na začiatku a potom v pravidelných intervaloch počas celého experimentu, pričom sa používa bublinomer (alebo priebežne, kontinuálne pomocou hmotového prietokomeru).

Musí sa merať tlak na výstupe zo saturátora. Tento úkon sa môže uskutočniť jedným z uvedených spôsobov:

- a) buď zapojením snímača tlaku (tlakomeru) medzi saturátor a zachytávače (toto však nebýva uspokojivé riešenie, pretože to zvyšuje mŕtvý priestor a adsorpčný povrch), alebo
- b) stanovením úbytku (poklesu) tlaku v rámci príslušného použitého zachytávacieho systému ako funkcie prietoku v samostatnom pokuse (tento postup nebýva veľmi uspokojivý v prípade kvapalných zachytávačov).

Čas požadovaný na zachytenie potrebného množstva testovanej látky pre rozdielne metódy analýzy je stanovený v predbežných cykloch alebo odhadom. Ako alternatívu zachytávania testovanej látky pre ďalšiu analýzu možno použiť „in-train“ kvantitatívny analytický postup (napríklad chromatografiu). Pred vypočítaním tlaku pary pri danej teplote je potrebné uskutočniť predbežné cykly na stanovenie maximálneho prietoku, ktorý úplne saturuje nosný plyn parou testovanej látky. Toto sa dá zaručiť, ak sa nosný plyn prepúšťa cez saturátor dostatočne pomaly, tak aby nižšia rýchlosť nedávala väčší vypočítaný tlak pary.

Konkrétna analytická metóda sa stanoví na základe charakteristických vlastností látky určenej na testovanie (napríklad plynová chromatografia alebo gravimetria).

Stanoví sa množstvo testovanej látky transportované známym objemom nosného plynu.

1.6.6.3. Výpočet tlaku pary

Tlak pary sa vypočíta z hustoty pary, W/V , pomocou nasledujúcej rovnice:

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

kde:

p = tlak pary (Pa)

W = hmotnosť odparenej testovanej látky (g)

V = objem nasýteného (saturovaného) plynu (m^3)

R = všeobecná molekulová plynová konštanta ($J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = teplota (K) (kelvin)

M = relatívna molekulová hmotnosť testovanej látky ($g \text{ mol}^{-1}$).

Namerané objemy musia byť opravené z hľadiska tlakových a teplotných rozdielov medzi prietokomerom a termostaticky upraveným saturátorom. Ak je prietokomer umiestnený smerom po prúde od zachytávača pary, môžu byť potrebné opravy zohľadňujúce všetky odparené ingrediencie zachytávača (1).

1.6.7. **Metóda rotujúcej guľôčky (8, 11, 13)**1.6.7.1. *Prístroje*

Metóda rotujúcej guľôčky sa môže uskutočniť použitím meradla viskozity rotujúceho rotora podľa znázornenia na obrázku 8. Schematický náčrt pokusného systému je zobrazený na obrázku 7.

Merací prístroj zvyčajne pozostáva z meracej hlavy rotujúceho rotora, umiestnenej v termostaticky upravovanom uzavretom priestore (s presnosťou regulácie na 0,1 °C). Nádoba so vzorkou je umiestnená v termostaticky upravovanom uzavretom priestore (s presnosťou regulácie na 0,1 °C) a všetky ostatné časti systému sú udržiavané pri vyššej teplote, aby sa zabránilo kondenzácii. Vysokovákuové vývevové zariadenie je napojené na systém pomocou vysokovákuových ventilov.

Meracia hlava rotujúceho rotora pozostáva z ocelevej guľôčky (s priemerom 4 mm až 5 mm) v rúrke. Guľôčka je zavesená a stabilizovaná v magnetickom poli, zvyčajne s použitím kombinácie permanentných magnetov a regulačných cievok.

Guľôčka sa privádza do otáčavého pohybu rotačnými poľami vytváranými cievkami. Snímacie cievky, ktoré merajú neustále prítomnú nízku laterálnu magnetizáciu guľôčky, umožňujú meranie jej rýchlosti otáčania.

1.6.7.2. *Postup merania*

Keď guľôčka dosiahla danú rotačnú rýchlosť $v(o)$ (približne 400 otáčok za sekundu), ďalšie budenie sa zastaví a následkom trenia plynu dochádza k spomaľovaniu.

Pokles rýchlosti otáčania sa meria ako funkcia času. Keďže trenie spôsobené magnetickou suspenziou je zanedbateľné v porovnaní s trením plynu, tlak plynu je daný nasledujúcou rovnicou:

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

kde:

$\bar{c}$ = priemerná rýchlosť molekúl plynu

r = polomer guľôčky

ρ = hustota hmoty guľôčky

σ = koeficient tangenciálneho prenosu hybnosti ($\Sigma = 1$ pre ideálnu guľovú plochu guľôčky)

t = čas

$v(t)$ = rýchlosť otáčania po uplynutí času t

$v(o)$ = počiatočná rýchlosť otáčania

Túto rovnicu možno napísať aj v tejto forme:

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

Kde t_n, t_{n-1} sú časy potrebné pre daný počet N otáčok. Tieto časové intervaly t_n a t_{n-1} nasledujú za sebou a $t_n > t_{n-1}$.

Priemerná rýchlosť molekuly plynu $\bar{c}$ je daná nasledujúcou rovnicou:

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

kde:

T = teplota

R = všeobecná molárna plynová konštanta

M = relatívna molekulová hmotnosť

2. ÚDAJE

Tlak pary zo všetkých predchádzajúcich metód musí byť stanovený pre minimálne dve teploty. V rozmedzí od 0 °C do 50 °C sa odporúčajú tri alebo viac teplôt, aby sa dala skontrolovať lineárnosť krivky tlaku plynu.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- použitú metódu,
- presnú špecifikáciu látky (identifikáciu a prímеси) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak sa takéto uskutočnili,
- minimálne dve tlakové a teplotné hodnoty, podľa možnosti v rozmedzí od 0 °C do 50 °C,
- všetky prvotné, nespracované údaje,
- log p versus 1/T krivku,
- odhad tlaku pary pri 20 °C alebo 25 °C.

Ak sa pozoruje premena (zmena skupenstva, rozklad), treba uviesť nasledujúce informácie:

- charakter zmeny,
- teplotu, pri ktorej sa zmena prejavuje pri atmosférickom tlaku,
- tlak pary pri 10 °C a 20 °C pod teplotou premeny a 10 °C a 20 °C nad touto teplotou (s výnimkou premeny z tuhej látky na plyn).

V správe z testu musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímеси a fyzikálneho stavu (skupenstva) testovanej látky.

4. ODKAZY

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

Dodatok 1

Metóda odhadu (predbežného výpočtu)

ÚVOD

Vypočítané hodnoty tlaku pary sa môžu použiť:

- na rozhodnutie, ktorá z existujúcich pokusných metód sa najlepšie hodí,
- na poskytnutie odhadu alebo medznej hodnoty v prípadoch, kde sa pokusná metóda nemôže uplatniť z technických príčin (vrátane situácie, kde tlak pary je veľmi nízky),
- ako pomôcka na identifikáciu tých prípadov, kde vynechanie pokusného merania je zdôvodnené tým, že tlak pary je pri teplote okolitého prostredia (vzduchu) pravdepodobne $<10^{-5}$ Pa.

METÓDA ODHADU (predbežného výpočtu)

Tlak pary kvapalín a tuhých látok sa môže odhadnúť, predbežne vypočítať použitím modifikovanej Watsonovej korelácie (a). Jediným potrebným pokusným údajom je normálna teplota varu. Táto metóda sa dá použiť v celom rozmedzí tlaku od 10^5 Pa až po 10^{-5} Pa.

Podrobné informácie o tejto metóde sú uvedené v príručke *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (Príručka metód na odhadovanie vlastností) (b).

POSTUP VÝPOČTU

Podľa (b) sa tlak pary vypočíta týmto spôsobom:

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

kde:

T = daná teplota

T_b = normálna teplota (bod) varu,

P_{vp} = tlak pary pri teplote T ,

ΔH_{vb} = výparné teplo, skupenské teplo vyparovania,

ΔZ_b = korekcia na stlačiteľnosť, koeficient stlačiteľnosti (odhadovaný pri 0,97),

m = empirický koeficient závislý od fyzikálneho skupenstva pri danej teplote T .

Ďalej

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

kde K_F je empirický koeficient (faktor) zohľadňujúci polaritu testovanej látky. Pre viaceré typy zlúčenín sú koeficienty (faktory) K_F uvedené v odkazoch (b).

Často sú k dispozícii údaje uvádzajúce teplotu varu pri redukovanom tlaku. V takom prípade sa podľa (b) tlak pary vypočíta nasledujúcim spôsobom:

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

kde T_1 je teplota varu pri redukovanom tlaku P_1 .

SPRÁVA

Ak sa použije metóda odhadu, správa z testu musí obsahovať vyčerpávajúcu, úplnú dokumentáciu výpočtov.

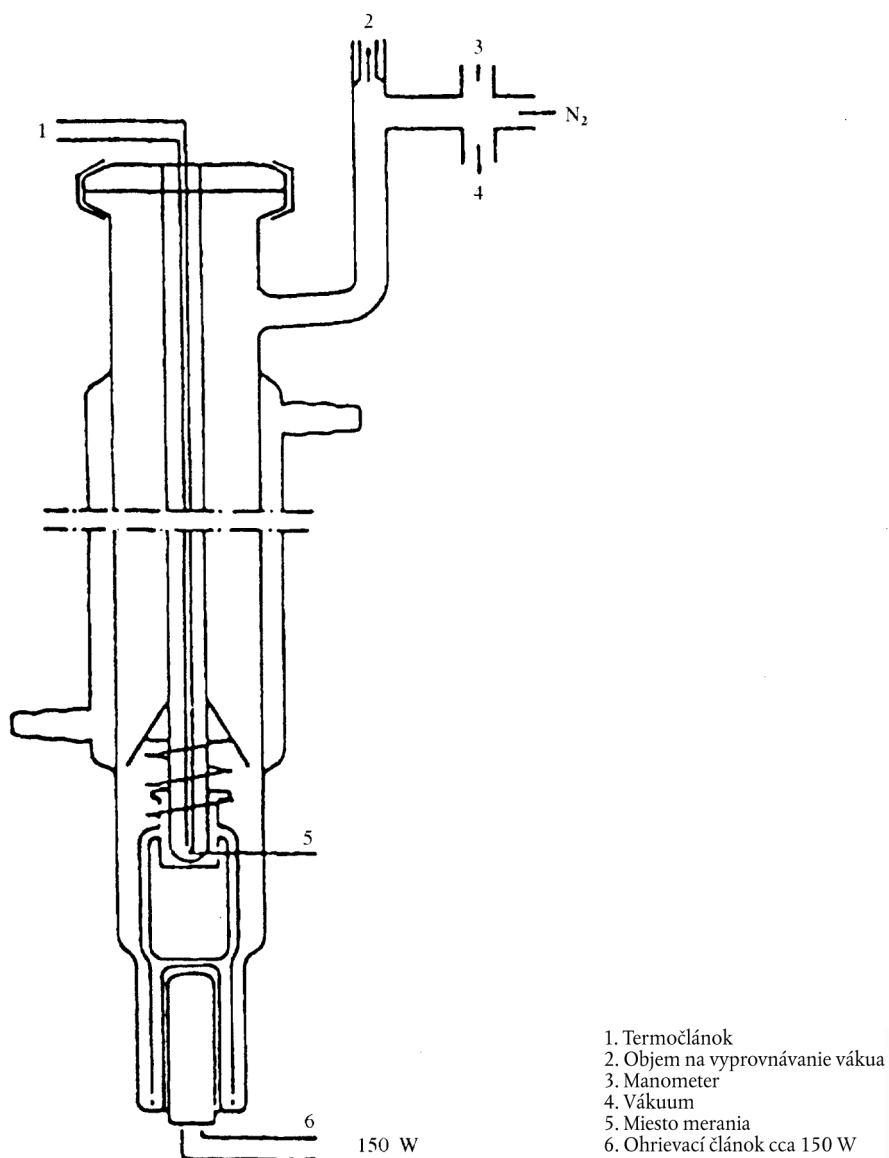
LITERATÚRA

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

Dodatok 2

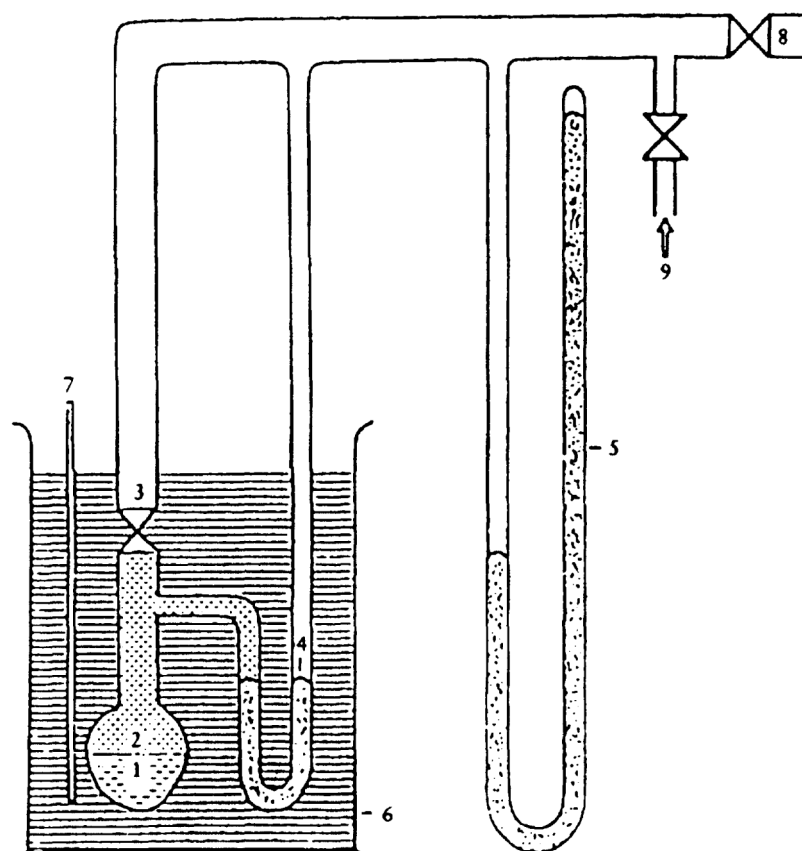
Obrázok 1

Prístroj na stanovenie krivky tlaku pary podľa dynamickej metódy



Obrázok 2a

Prístroj na stanovenie krivky tlaku pary podľa statickej metódy (s použitím tlakomeru v podobe trubice do tvaru U)

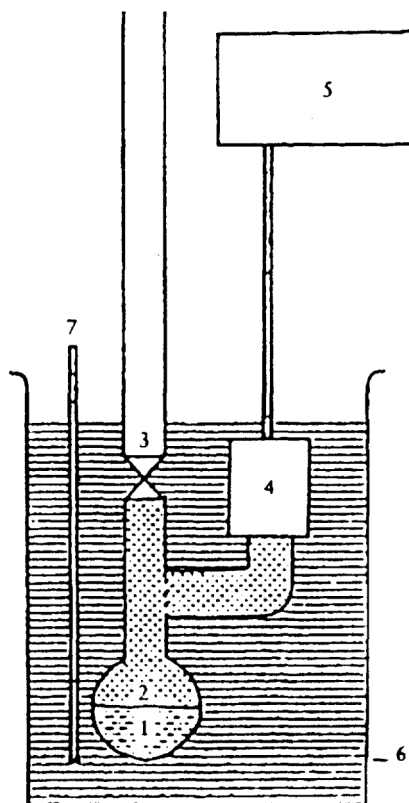


1. Testovaná chemická látka
2. Para, plynná fáza
3. Vysokovákuový ventil
4. Trubica v tvare U (pomocný manometer)
5. Manometer

6. Tepelný kúpeľ
7. Prístroj na meranie teploty
8. K vakuovej výveve
9. Ventilácia

Obrázok 2b

Prístroj na stanovenie krivky tlaku pary podľa statickej metódy (s použitím ukazovateľa tlaku)

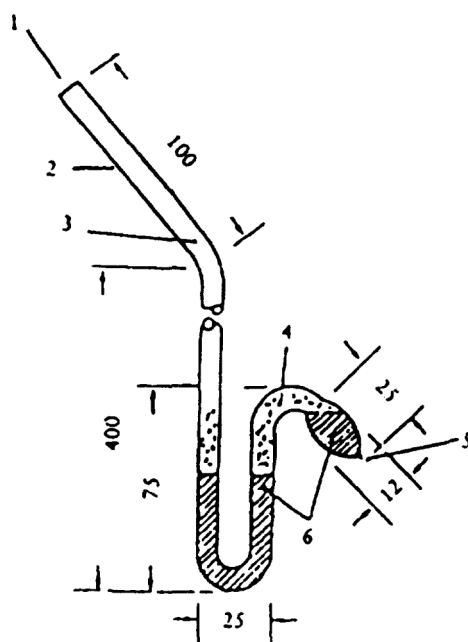


- 1. Testovaná chemická látka
- 2. Para, plynná fáza
- 3. Vysokovákuový ventil
- 4. Manometer

- 5. Ukazovateľ tlaku
- 6. Tepelný kúpeľ
- 7. Prístroj na meranie teploty

Obrázok 3

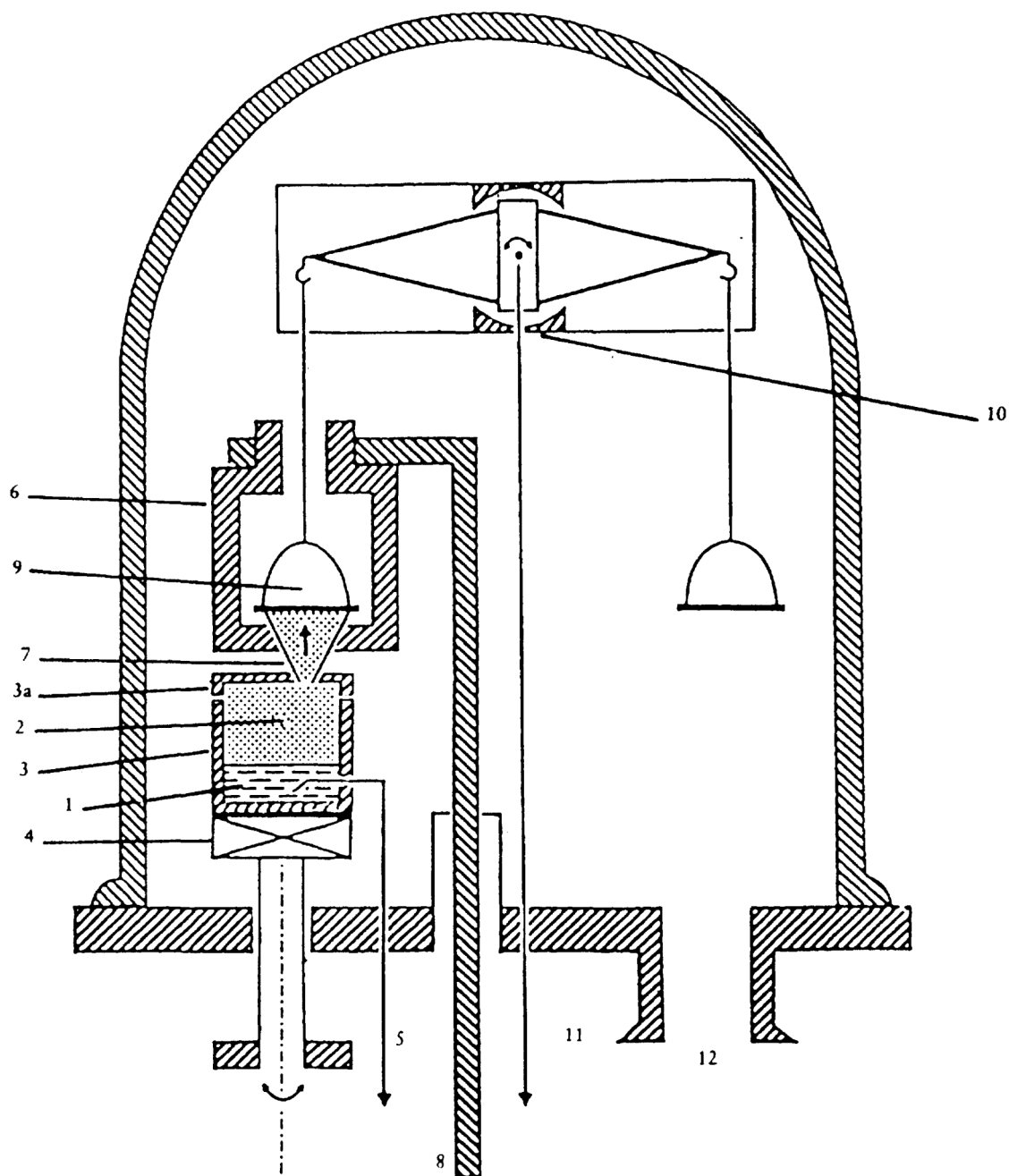
Izoteniskop (pozri odkaz 7)



- 1 = K systému na reguláciu teploty a merania
- 2 = Rúra s vonkajším priemerom 8 mm
- 3 = Suchý dusík v tlakovom systéme
- 4 = Para na vzorky
- 5 = Malý hrot
- 6 = Kvapalná testovaná vzorka

Obrázok 4

Prístroj na stanovenie krivky tlaku pary podľa efúznej metódy s použitím váh na meranie tlaku pary

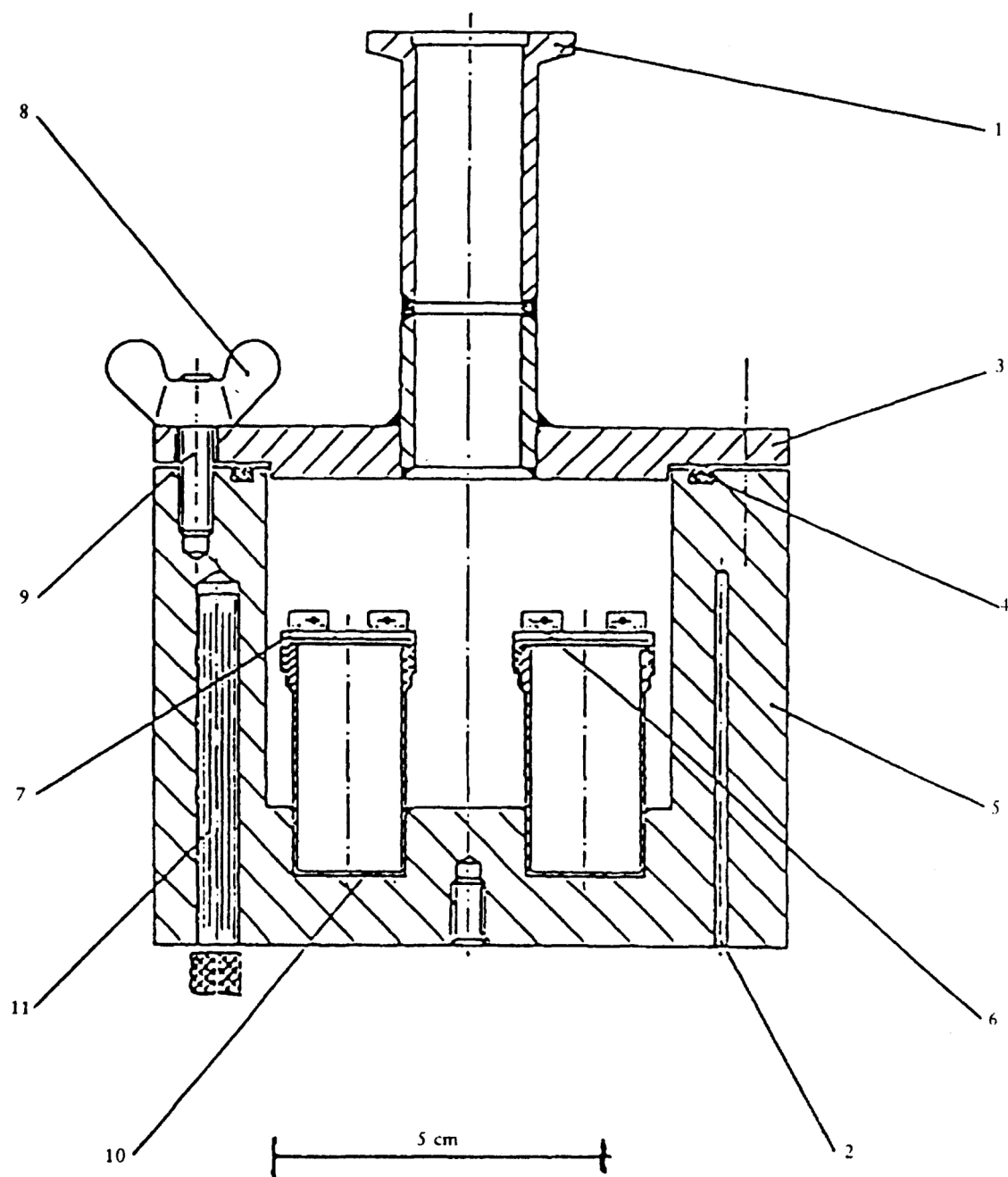


1. Testovaná látka
2. Plybná fáza a prúd pary
3. Odparovacia piecka s otočným vstupom
- 3a. Veko piecky s otvorom
4. Ohrievanie (chiadenie) vzorky
5. Meranie teploty testovanej vzorky
6. Chiadaci box

7. Kryt
8. Chiadiaca tyč pre chiadaci box
9. Miska váh
10. Mikrováhy
11. K registrónému prístroju
12. K vysokovákuovej výveve

Obrázok 5

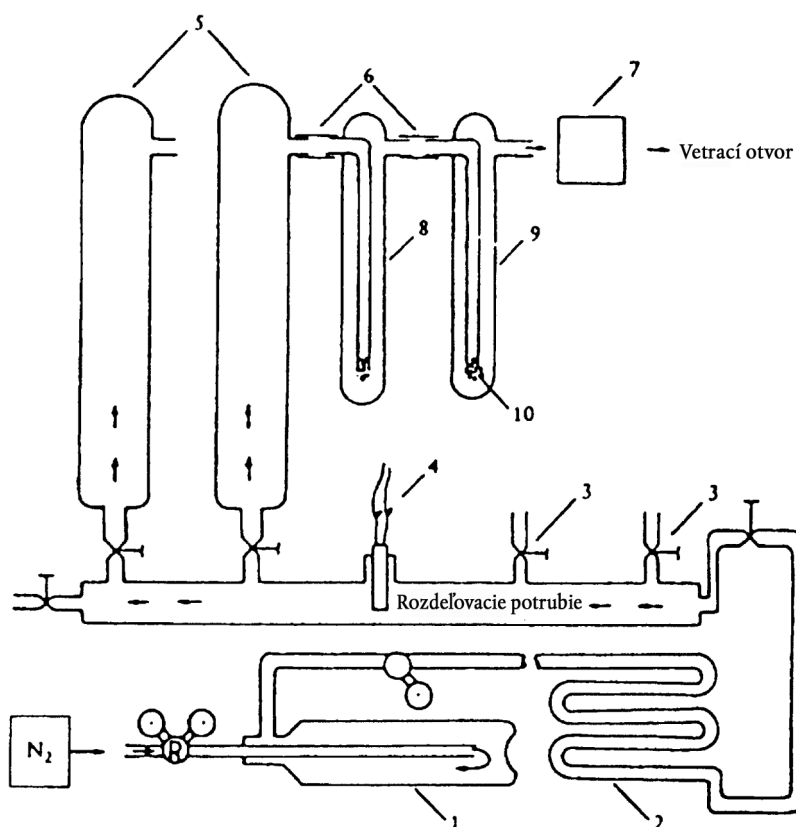
Príklad prístroja na odparovanie pri nízkom tlaku efúznou metódou s objemom efúznej komory 8 cm³



1. Pripojenie na vákuum
2. Dubina na zasunutie odporového teplomera, alebo na odmeranie aneguláciu teploty
3. Veko vákuovej komory
4. Tesniaci O = krúžok
5. Hlinková vákuová nádoba
6. Zariadenie na initalovanie a vyberanie efúzných komôr
7. Veko so závitom
8. Kridlové matice
9. Skzutky
10. Efúzne konnörky z nehrdzavejúcej ucele
11. Úhrievacie telesá (6)

Obrázok 6a

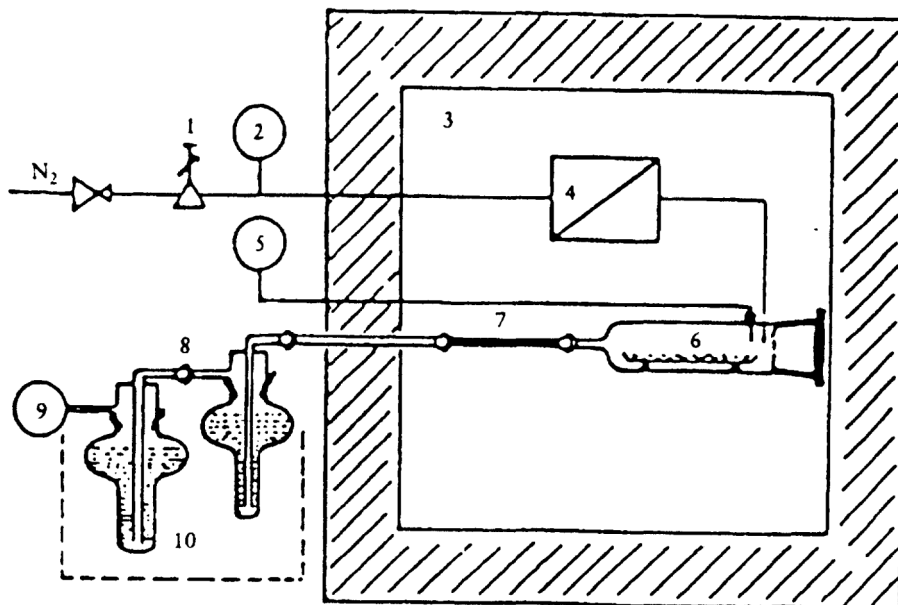
Príklad prietokového systému na stanovenie tlaku pary metódou plynnej saturácie



1. Regulátor toku
2. Výmenník tepla
3. Ihlové ventily
4. Snímač relatívnej vlhkosti
5. Saturačné kolóny
6. PTFE spojky
7. Prietokomer
8. Zachytávač
9. Olejový zachytávač
10. Fritová prebublávačka

Obrázok 6b

Príklad systému na stanovenie tlaku pary plynou saturácnou metódou s kapilárou umiestnenou v slede za saturačnou komorou

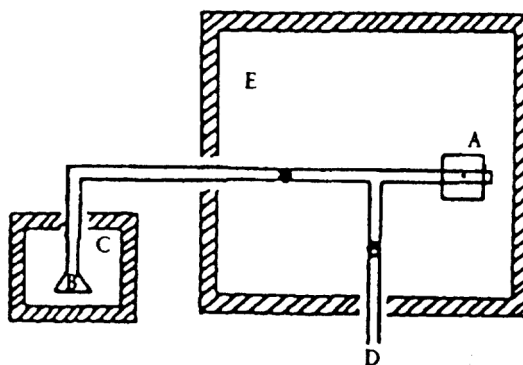


1. Teplotný hmotnostný prietokomer
2. Tlakomer, manometer
3. Komora s teplotnou reguláciou
4. Termostatová cievka pre nosný plyn
5. Teplomer (Pt 100)

6. Plyná saturačná komora
7. Kapilára
8. Absorpčné nádoby
9. Plynomer
10. Chladený zachytávač

Obrázok 7

Príklad potrubného systému pre metódu rotujúcej guľôčky

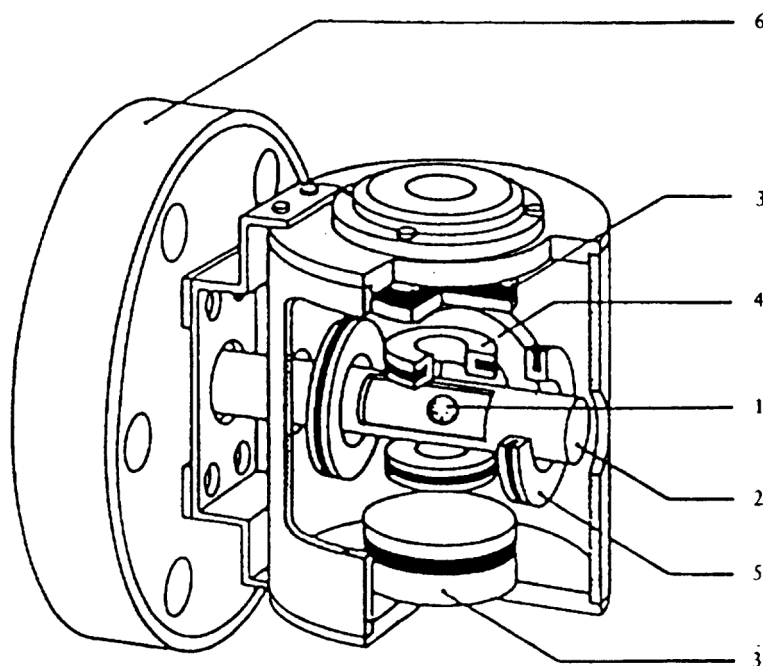


Prístroj na meranie tlaku pary.

- A. Snímacia hlava rotujúceho rotora
- B. Komôrka s testovanou vzorkou
- C. Termostat
- D. Podtlaková rúrka (turbo čerpadlo)
- E. Vzduchový termostat

Obrázok 8

Príklad meracej hlavy rotujúceho rotora



1. Gulička
2. Vákuová rúrková extenzia spojovej príruby
3. Permanentné magnety
4. Cievky (2) pre vertikálnu stabilizáciu
5. Vodiace cievky (4)
6. Spojková príruby

A.5. POVRCHOVÉ NAPÄTIE

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkazoch (2).

1.1. ÚVOD

Opísané metódy sú určené na meranie povrchového napätia vodných roztokov.

Pred vykonaním týchto testov sa odporúča získať predbežné informácie o rozpustnosti vo vode, hydrolyzných vlastnostiach a kritickej koncentrácii pre tvorbu micel testovanej látky.

Nasledujúce uvedené metódy sa dajú použiť pre väčšinu chemikálií bez akýchkoľvek obmedzení v spojitosti s ich stupňom čistoty.

Meranie povrchového napätia metódou krúžkového tenzometra sa obmedzuje na vodné roztoky s dynamickou viskozitou nižšou ako približne 200 mPa s.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Entalpia voľnej hladiny na jednotku povrchovej plochy sa vzťahuje na povrchové napätie.

Povrchové napätie sa udáva ako:

N/m (jednotka SI) alebo

mN/m (podjednotka SI)

1 N/m = 10^3 dyn/cm

N/m = 1 dyn/cm v zastaranej jednotkovej sústave cgs.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nemusia byť použité vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Referenčné látky, ktoré pokrývajú široký rozsah povrchových napätí, sú uvedené v odkazoch (1) a (3).

1.4. PRINCÍP METÓD

Metódy sú založené na meraní maximálnej sily, ktorá musí byť vynaložená vertikálne na strmienok alebo krúžok v kontakte s hladinou testovanej kvapaliny umiestnenej v meracej miske na účely jeho oddelenia od tejto hladiny alebo na doštičku s jednou hranou v kontakte s povrchom na účely zdvihnutia filmu, ktorý sa vytvoril.

Látky, ktoré sú rozpustné vo vode pri koncentrácii aspoň 1mg/liter, sú testované vo vodnom roztoku pri jednej koncentrácii.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Tieto metódy sa dajú realizovať s väčšou presnosťou, než aká sa pravdepodobne bude požadovať na environmentálne zhodnocovanie.

1.6. OPIS METÓD

Roztok testovanej látky sa pripraví v destilovanej vode. Koncentrácia tohto roztoku by mala predstavovať 90 % nasýtenej rozpustnosti testovanej látky vo vode; keď táto koncentrácia prevyšuje 1g/liter, na účely testovania sa použije koncentrácia 1g/liter. Látky s rozpustnosťou vo vode nižšou ako 1mg/liter sa nemusia testovať.

1.6.1. Doštičková metóda

Pozri technické normy ISO 304 a NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films) (Povrchovo aktívne činidlá – stanovenie povrchového napätia pomocou kvapalinových filmov).

1.6.2. Strmienková metóda

Pozri technické normy ISO 304 a NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films) (Povrchovo aktívne činidlá – stanovenie povrchového napätia pomocou kvapalinových filmov).

1.6.3. Krúžková metóda

Pozri technické normy ISO 304 a NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films) (Povrchovo aktívne činidlá – stanovenie povrchového napätia pomocou kvapalinových filmov).

1.6.4. Harmonizovaná krúžková metóda podľa OECD

1.6.4.1. Prístroje

Na účely tohto merania postačujú komerčne dostupné tenzometre. Pozostávajú z nasledujúcich častí:

— pohyblivá doska na vzorky,

— systém na meranie sily,

- meracie teleso (krúžok),
- meracia nádoba.

1.6.4.1.1. Pohyblivá doska na vzorky

Pohyblivá doska na vzorky sa používa ako podložka pod termoregulovanú meraciu nádobu obsahujúcu kvapalinu určenú na testovanie. Spolu s meracím systémom je prichytená na stojan.

1.6.4.1.2. Systém na meranie sily

Systém na meranie sily (pozrite obrázok) je umiestnený nad dosku na vzorky. Odchýlka merania sily nemá presahovať hodnotu $\pm 10^{-6}$ N, zodpovedajúc tak dovolenej chybe $\pm 0,1$ mg pri meraní hmotnosti. Vo väčšine prípadov je meracia stupnica komerčne dostupných tenzometrov kalibrovaná v mN/m, takže povrchové napätie môže byť odčítané priamo v mN/m s presnosťou na 0,1mN/m.

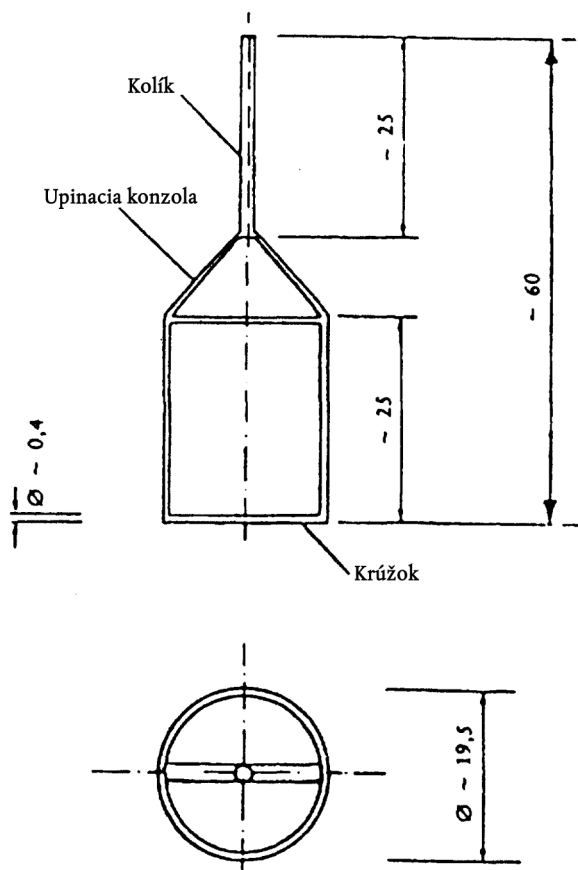
1.6.4.1.3. Meracie teleso (krúžok)

Krúžok je zvyčajne vyrobený z platino-irídiového drôtu s hrúbkou približne 0,4 mm a so stredným obvodom 60 mm. Drôtený krúžok je zavesený horizontálne na kovový kolík a drôtenú upínaciu konzolu, aby sa tak vytvorilo prepojenie so systémom na meranie sily (pozri obrázok).

Obrázok

Meracie teleso (krúžok)

(Všetky rozmery sú vyjadrené v milimetroch)



1.6.4.1.4. Meracia nádobka

Meracia nádobka určená pre testovanie látky musí byť termoregulovaná sklenená nádobka. Musí mať také vlastnosti, aby počas merania teplota testovaného kvapalinového roztoku a plynová fáza nad jeho povrchom zostali konštantná a aby sa testovaná vzorka nemohla odparovať. Vyhovujúce sú valcovité sklené nádoby s vnútorným priemerom najmenej 45 mm.

1.6.4.2. Príprava prístroja

1.6.4.2.1. Čistenie

Sklené nádoby musia byť dôkladne vyčistené. Ak je to potrebné, musia byť umyté horúcou kyselinou chrómsírovou a následne sirupovitou kyselinou fosforečnou (83 až 98 hmotnostných % H_3PO_4), dôkladne opláchnuté pod vodou z vodovodu a nakoniec umyté v dvakrát destilovanej vode, až kým sa nedosiahne neutrálna reakcia, a potom sa musia osušiť alebo vymyť časťou kvapalnej vzorky určenej na testovanie, resp. meranie.

Kružok musí byť najprv dôkladne opláchnutý vo vode, aby sa odstránili všetky látky, ktoré sú rozpustné vo vode, potom sa krátko ponorí do kyseliny chrómsírovej, umyje v dvakrát destilovanej vode, až kým sa nedosiahne neutrálna reakcia, a nakoniec sa krátko ohreje nad metanolovým plameňom.

Upozornenie:

Kontaminácia látkami, ktoré sa nerozpustili alebo nerozrušili kyselinou chrómsírovou alebo kyselinou fosforečnou, ako napríklad silikónmi, sa musí odstrániť pomocou vhodného organického rozpúšťadla.

1.6.4.2.2. Kalibrácia prístroja

Kalibrácia prístroja spočíva v kontrole nulového bodu a jeho nastavení takým spôsobom, aby označenie prístroja umožňovalo spoľahlivé stanovenie hodnôt v mN/m.

Inštalácia:

Prístroj musí byť vyvážený napríklad pomocou liehovej vodováhy na tenzometrovej základni nastavovacími skrutkami umiestnenými naspodu základovej platne.

Nastavenie nulového bodu:

Po inštalácii krúžku na prístroj a pred jeho ponorením do kyseliny musí byť ukazovateľ tenzometra nastavený na nulu a musí sa skontrolovať, či je krúžok rovnobežný s hladinou kvapaliny. Na tento účel možno použiť hladinu kvapaliny ako zrkadlo.

Kalibrácie:

Vlastná testová kalibrácia sa môže uskutočniť jedným z týchto dvoch postupov:

- použitím závažia: postup používajúci závažia známej hmotnosti medzi 0,1 a 1,0 g umiestnené na krúžku. Kalibračná konštanta (konštanta pri ciachovaní), Φ_a , ktorou musia byť vynásobené všetky hodnoty odčítané na inštrumente, sa stanoví podľa rovnice (1):

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

kde:

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

m = hmotnosť závažia (g)

g = gravitačné zrýchlenie (981 cm s⁻² pri hladine mora)

b = stredný obvod krúžku (cm)

σ_a = údaj na stupnici tenzometra po umiestnení závažia na krúžok (mN/m).

- b) použitím vody, postup používajúci čistú vodu, ktorej povrchové napätie sa napríklad pri teplote 23 °C rovná 72,3 mN/m. Tento postup sa dá uskutočniť rýchlejšie ako hmotnostná kalibrácia, len je tu stále riziko, že povrchové napätie vody bude skreslené stopami kontaminácie povrchovo aktívnymi činidlami.

Kalibračná konštanta, Φ_b , ktorou musia byť vynásobené všetky údaje odčítané na prístroji, sa stanoví podľa rovnice (2):

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

kde:

σ_o = hodnota citovaná v literatúre pre povrchové napätie vody (mN/m)

σ_g = nameraná hodnota povrchového napätia vody (mN/m)

obidve hodnoty pri tej istej teplote.

1.6.4.3. *Príprava vzoriek*

Pri príprave vodných roztokov látok určených na testovanie treba použiť požadované koncentrácie vo vode, pričom roztoky nesmú obsahovať žiadne nerozpustené látky.

Roztok sa musí udržiavať pri konštantnej teplote ($\pm 0,5$ °C). Keďže povrchové napätie roztoku sa v meracej nádobe mení v priebehu času, je potrebné uskutočniť viacero meraní v rozličných časoch, ako aj vynášať hodnoty vo forme krivky diagramu ako funkcie času. Keď sa ďalšie zmeny už neobjavia, dosiahol sa rovnovážny stav.

Prach a plynová kontaminácia inými látkami rušivo pôsobia na výsledky meraní. Celý postup sa preto uskutoční pod ochranným krytom.

1.6.5. **Podmienky skúšania**

Meranie musí byť uskutočnené pri teplote približne 20 °C a táto teplota sa udržiava v rozmedzí $\pm 0,5$ °C.

1.6.6. **Realizácia testu**

Roztoky určené na meranie treba premiestniť do dôkladne očistenej meracej nádoby, pričom treba dbať na to, aby sa zabránilo peneniu. Meracia nádoba sa potom položí na dosku prístroja. Dosku potom treba dvíhať až dovtedy, kým sa krúžok neponorí pod hladinu roztoku určeného na meranie. Doska sa potom pozvoľna a rovnomerne spúšťa nadol (rýchlosťou približne 0,5 cm/min.), akoby sme krúžok chceli oddeliť od hladiny kvapaliny, a to až dovtedy, kým sa nedosiahne maximálna sila. Vrstva kvapaliny prilipnutá ku krúžku sa však od neho nesmie oddeliť. Po ukončení merania treba krúžok opäť ponoriť pod hladinu a merania sa takto opakujú až dovtedy, kým sa nedosiahne konštantná hodnota povrchového napätia. Čas, ktorý uplynul od premiestnenia testovaného roztoku do meracej nádoby, sa musí zaznamenať pre každé jedno stanovenie. Hodnoty sa odčítajú vždy pri maximálnej sile vyvinutej pri snahe o oddelenie krúžku od povrchu hladiny kvapaliny.

2. **ÚDAJE**

Pre výpočet povrchového napätia sa hodnota odčítaná v mN/m zo stupnice prístroja najprv vynásobí kalibračným koeficientom Φ_a alebo Φ_b (v závislosti od použitého kalibračného postupu). Takto získame hodnotu, ktorá je iba približná a vyžaduje si preto korekciu.

Harkins a Jordan (4) empiricky stanovili korekčné koeficienty pre hodnoty povrchového napätia meraného krúžkovou metódou, ktoré sú závislé od rozmerov krúžku, hustoty testovanej kvapaliny a od jej povrchového napätia.

Keďže je veľmi ťažké stanoviť korekčný koeficient pre každé jedno samostatné meranie z Harkinsonových a Jordanových tabuliek, na účely výpočtu povrchového napätia vodných roztokov možno použiť zjednodušený postup odčítania korekčných hodnôt povrchového napätia priamo z tabuľky. (Na odčítanie v rozmedzí tabuľkových hodnôt je potrebné použiť interpoláciu.)

TABUĽKA: KOREKCIA NAMERANÉHO POVRCHOVÉHO NAPÄTIA

Platí iba pre vodné roztoky, $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$

R = 9,55 mm (stredný polomer krúžku)

r = 0,185 mm (polomer drôtu, z ktorého je krúžok zhotovený)

Experimentálna hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m)	
	Kalibrácia závažiami [pozri bod 1.6.4.2.2 a)]	Kalibrácia vodou [pozri bod 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	—

Táto tabuľka bola zostavená na základe Harkinsonovej-Jordanovej korekcie. Je podobná tabuľke uvedenej v technickej norme DIN Standard (DIN 53914) pre vodu a vodné roztoky (hustota $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$) a je vhodná pre komerčne dostupný krúžok s rozmermi R = 9,55 mm (stredný polomer krúžku) a r = 0,185 mm (polomer drôtu, z ktorého je krúžok zhotovený). Tabuľka udáva korigované hodnoty pre merania povrchového napätia, vykonané po kalibrácii závažiami alebo vodou.

Alternatívne, bez predchádzajúcej kalibrácie, povrchové napätie sa môže vypočítavať podľa tohto vzorca:

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

kde:

F = sila nameraná na dynamometri v bode prerušenia filmu

R = polomer krúžku

f = korekčný (opravný) koeficient (1).

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- použitú metódu,
- typ použitej vody alebo roztoku,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- výsledky merania: povrchové napätie (hodnoty odčítané zo stupnice) uvádzajúce jednotlivé samostatné odčítania hodnôt a ich aritmetický priemer, ako aj korigované stredné hodnoty (zohľadňujúce koeficient zariadenia a korekčnú tabuľku),
- koncentráciu roztoku,
- testovaciu teplotu,
- vek použitého roztoku, obzvlášť čas medzi prípravou a meraním roztoku,
- opis časovej závislosti povrchového napätia po premiestnení roztoku do meracej nádoby,
- všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímеси a fyzikálneho skupenstva testovanej látky.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Za predpokladu, že destilovaná voda má povrchové napätie 72,75 mN/m pri teplote 20 °C, látky prejavujúce povrchové napätie nižšie ako 60 mN/m za podmienok tejto metódy treba považovať za povrchovo aktívne materiály.

4. ODKAZY

- (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. ROZPUSTNOSŤ VO VODE**1. METÓDA**

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1).

1.1. ÚVOD

Na účely realizácie tejto metódy sa odporúča získať predbežné informácie o štruktúrnom vzorci, tlaku pary, disociačnej konstante a hydrolyze (ako funkcie pH) látky určenej na testovanie.

Neexistuje jediná dostupná metóda, ktorá by pokrývala celý rozsah rozpustnosti vo vode.

Dve skúšobné metódy, ktoré sú opísané v nasledujúcom texte, pokrývajú síce celý rozsah rozpustnosti, avšak nedajú sa použiť v prípade prchavých látok:

- jedna, ktorá sa vzťahuje na absolútne čisté látky s nízkou rozpustnosťou ($<10^{-2}$ gramov na liter), ktoré sú stabilné vo vode, sa nazýva „metóda vypierania z kolóny“,
- druhá, ktorá sa vzťahuje na absolútne čisté látky s vyššou rozpustnosťou ($>10^{-2}$ gramov na liter), ktoré sú stabilné vo vode, sa nazýva „banková (fľašová) metóda“.

Rozpustnosť látok vo vode môže byť do značnej miery ovplyvnená prítomnosťou prímiesí.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Rozpustnosť látky vo vode je špecifikovaná saturačnou hmotnostnou koncentráciou látky vo vode pri danej teplote. Rozpustnosť vo vode je špecifikovaná v jednotkách hmotnosti na objem roztoku. Príslušnou jednotkou SI je kg/m^3 (možno však použiť aj g/liter).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Približné množstvo testovanej vzorky a čas potrebný na dosiahnutie saturačnej hmotnostnej koncentrácie sa stanoví v jednoduchom predbežnom teste.

1.4.1. Metóda vypierania z kolóny

Táto metóda je založená na vypieraní testovanej látky vodou z mikrokolóny, ktorá je naplnená inertným nosným materiálom, napr. sklenenými guľôčkami alebo pieskom. Tento nosný materiál je pokrytý nadbytkom testovanej látky. Rozpustnosť vo vode sa stanovuje vtedy, keď je hmotnostná koncentrácia eluátu konštantná. Vyjadruje sa úrovňou koncentrácie ako funkcia času.

1.4.2. Banková (fľašová) metóda

V rámci tejto metódy sa testovaná látka (tuhé látky musia byť rozomleté na prach) rozpustí vo vode pri teplote o niečo vyššej, ako je testovacia teplota. Keď sa dosiahne saturácia, zmes sa ochladí a udržiava sa pri skúšobnej teplote, pričom sa mieša dovtedy, kým je to potrebné na dosiahnutie rovnovážneho stavu. Meranie sa môže alternatívne uskutočniť priamo pri skúšobnej teplote, ak sa vhodným vzorkovaním zabezpečí, že sa dosiahne saturačný rovnovážny stav. Následne sa hmotnostná koncentrácia testovanej látky vo vodnom roztoku, ktorý nesmie obsahovať žiadne nerozpustené častice, stanoví vhodnou analytickou metódou.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

1.5.1. **Opakovateľnosť**

V prípade metódy vypierania z kolóny možno dosiahnuť <30 %, v prípade bankovej (fľašovej) metódy by sa malo dodržiavať <15 %.

1.5.2. **Citlivosť**

Citlivosť závisí od metódy analýzy, avšak stanovenia hmotnostnej koncentrácie môžu byť stanovované až do 10^{-6} gramov na liter.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Podmienky skúšania**

Odporúča sa uskutočniť test pri teplote 20 °C s výkyvom maximálne $\pm 0,5$ °C. Ak sa v spojitosti s rozpustnosťou považuje za možnú teplotnú závislosť (>3 % na každý jeden °C), mali by sa použiť dve ďalšie teploty minimálne 10 °C nad a pod hodnotou pôvodne zvolenej teploty. V tomto prípade by teplotná regulácia mala byť $\pm 0,1$ °C. Zvolená teplota by sa mala udržiavať na konštantnej úrovni vo všetkých relevantných častiach skúšobného zariadenia.

1.6.2. **Predbežný test**

K približne 0,1 g testovanej vzorky (tuhé látky musia byť rozdrvené na prach) v ciachovanom odmernom valci so zabrusenou sklenou zátkou sa pridávajú narastajúce objemy destilovanej vody pri teplote miestnosti, pridriavajúc sa krokov uvedených v tejto tabuľke:

0,1 g rozpustiteľná v 'x' ml vody	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Približná rozpustnosť (g/liter)	> 1 000	1 000 až 200	200 až 100	100 až 50	50 až 10	10 až 1	< 1

Po každom pridaní stanoveného množstva vody sa zmes intenzívne trepe 10 minút a vizuálne sa skontroluje z hľadiska akýchkoľvek nerozpustených častí testovanej vzorky. Ak po pridaní 10 ml vody testovaná vzorka alebo jej časti zostanú nerozpustené, pokus sa musí zopakovať v 100 ml odmernom valci s väčším objemom vody. Pri nižších mierach rozpustnosti môže byť čas potrebný na rozpustenie testovanej látky podstatne dlhší (treba počítať minimálne s 24 hod.). Približná rozpustnosť je uvedená v tabuľke pod tým objemom pridanej vody, v ktorom dôjde k úplnému rozpusteniu testovanej vzorky. Ak je testovaná vzorka naďalej zjavne nerozpustná, treba predĺžiť čas na rozpustenie z 24 hodín na maximálne 96 hodín alebo treba pokračovať v zriedňovaní, aby sa zistilo, ktorú metódu použiť, či metódu vypierania z kolóny, alebo metódu rozpúšťania v banke (fľaši).

1.6.3. **Metóda vypierania z kolóny**1.6.3.1. *Nosný materiál, rozpúšťadlo a eluent*

Nosný materiál pre metódu vypierania z kolóny musí byť inertný. Vhodné použiteľné materiály sú sklené guľôčky a piesok. Na naniesenie testovanej látky na nosný materiál treba použiť vhodné prchavé rozpúšťadlo kvality analytického činidla. Ako eluent sa použije voda, ktorá bola dvakrát destilovaná v sklenom alebo kremennom destilačnom prístroji.

Upozornenie:

Nesmie byť použitá voda pochádzajúca priamo z výmenníka organických iónov.

1.6.3.2. Aplikácia testovanej látky na nosný materiál

Odváži sa približne 600 mg nosného materiálu a tento sa potom premiestni do 50 ml banky s guľatým dnom.

Vhodné odvážené množstvo testovanej látky sa rozpustí vo zvolenom rozpúšťadle. Primerané množstvo tohto roztoku sa pridá do nosného materiálu. Rozpúšťadlo sa musí úplne odpariť napr. v rotačnom odparovacom prístroji, pretože inak sa nedosiahne saturácia nosiča vodou kvôli separačným účinkom na povrchu nosného materiálu.

Aplikácia testovanej látky na nosný materiál môže spôsobovať problémy (chybné výsledky), ak sa testovaná látka nanáša ako olej alebo odlišná kryštalická fáza. Problém treba experimentálne preskúmať a podrobnosti musia byť uvedené v správe o teste.

Nosný materiál s aplikovanou testovanou látkou sa nechá máčať približne v 5 ml vody asi dve hodiny. Suspenzia sa potom pridá do mikrokolóny. Suchý nosný materiál s aplikovanou testovanou látkou sa môže alternatívne pridať do mikrokolóny, ktorá bola naplnená vodou, a potom vyvažovať približne dve hodiny.

Testovací postup

Vypieranie testovanej látky z nosného materiálu sa môže uskutočniť jedným z dvoch odlišných uvedených spôsobov:

- recirkulačným čerpadlom (pozri obrázok 1),
- egalizačnou nádobou (pozri obrázok 4).

1.6.3.3. Metóda vypierania z kolóny s recirkulačným čerpadlom

Prístroje

Schematická zostava typického systému je znázornená na obrázku 1. Vhodná mikrokolóna je znázornená na obr. 2, hoci akceptovateľná je akákoľvek veľkosť za predpokladu, že bude spĺňať kritériá reprodukovateľnosti a citlivosti. V kolóne musí byť voľný priestor zodpovedajúci minimálne piatim úložným objemom vody a samotná musí byť schopná pojať minimálne päť vzoriek. Veľkosť sa môže alternatívne redukovať, ak sa použije doplnkové riedidlo ako náhrada za počiatočných päť úložných objemov vody vypustených zo systému spolu s rozpustenými prísadami.

Kolóna musí byť napojená na recirkulačné čerpadlo, ktoré je schopné regulovať tok približne 25 ml/h. Čerpadlo je pripojené polytetrafluóretylén (P.T.F.E.), resp. sklenými spojkami. Kolóna a čerpadlo musia po zostavení zabezpečiť vzorkovanie výtoku a vyváženie voľného priestoru pri atmosférickom tlaku. Materiál v kolóne spočíva na malom tesnení (5 mm) zo sklenej vaty (vlny), ktoré zároveň slúži na filtráciu častíc. Recirkulačné čerpadlo môže byť napríklad peristaltické čerpadlo alebo membránové čerpadlo (musí sa dbať na to, aby sa zabránilo akejkoľvek kontaminácii, resp. absorpcii materiálom, z ktorého sú zhotovené rúrky).

Postup merania

Spustí sa prúdenie cez kolónu. Odporúča sa použiť prietok približne 25 ml/h (v prípade opísanej kolóny to zodpovedá 10 úložným objemom/h). Prvých päť úložných objemov (minimálne) sa vypustí s cieľom odstránenia prísad rozpustných vo vode. Po tomto sa recirkulačné čerpadlo nechá bežať až dovtedy, kým sa nedosiahne vyváženie definované piatimi za sebou nasledujúcimi vzorkami, ktorých koncentrácie sa nelíšia viac ako $\pm 30\%$ v náhodnom slede. Vzorky musia byť od seba oddelené časovými intervalmi zodpovedajúcimi prietoku najmenej 10 úložných objemov eluentu.

1.6.3.4. Metóda vypierania z kolóny s egalizačnou nádobou

Prístroje (pozri obrázky 3 a 4)

Egalizačná nádoba: Spojenie s egalizačnou nádobou sa uskutoční použitím zabrušeného skleneného spoja napojeného na polytetrafluóretylénové (P.T.F.E.) rúrky. Odporúča sa použiť prietok približne 25 ml za hodinu. Za sebou nasledujúce eluátové frakcie by sa potom mali zachytávať a analyzovať podľa zvolenej metódy.

Postup merania

Tie frakcie zo stredného eluátového rozsahu, v ktorých sú koncentrácie konštantné ($\pm 30\%$) minimálne v piatich následných frakciách, sa použijú na stanovenie rozpustnosti vo vode.

V obidvoch prípadoch (pri použití recirkulačného čerpadla alebo egalizačnej nádoby) je potrebné uskutočniť druhé kolo merania pri polovičnej miere prvého (pôvodného) prietoku. Ak sú výsledky oboch kôl meraní súhlasné, test bol uskutočnený na uspokojivej úrovni; ak sa však pri nižšom prietoku prejaví vyššia skutočne pozorovaná rozpustnosť, znižovanie miery prietoku na polovicu musí pokračovať dovtedy, kým dve za sebou nasledujúce kolá meraní nevykážu rovnakú rozpustnosť.

V obidvoch prípadoch (pri použití recirkulačného čerpadla alebo egalizačnej nádoby) sa musia frakcie kontrolovať z hľadiska prítomnosti koloidného materiálu skúmaním Tyndallovho efektu (rozptyl svetla). Prítomnosť takýchto častíc znehodnocuje výsledky a test sa musí zopakovať po zdokonalení postupu filtrácie v kolóne.

Je potrebné zaznamenať hodnoty pH pre každú vzorku. Druhé kolo meraní sa musí uskutočniť pri tej istej teplote ako prvé.

1.6.4. **Banková (fľašová) metóda**

1.6.4.1. *Prístroje*

Pri použití bankovej (fľašovej) metódy je potrebný tento materiál:

- normálne laboratórne sklené nádoby a vybavenie laboratórnymi prístrojmi,
- zariadenie vhodné na premiešavanie, resp. pretrepávanie roztokov pri kontrolovaných a regulovaných konštantných teplotách,
- odstredivka (podľa možnosti termostatovaná), ak sa tak požaduje pri emulziách,
- zariadenie na analytické stanovenie hodnôt.

1.6.4.2. *Postup merania*

Množstvo materiálu potrebného na saturáciu želaného objemu vody sa odhaduje, resp. stanovuje z predbežného testu. Požadovaný objem vody bude závisieť od použitej analytickej metódy a rozsahu rozpustnosti. Približne päťnásobok stanoveného množstva materiálu sa odváži do každej z troch sklených nádob opatrených sklenými zátkami (napr. do odstredivkových skúmaviek, sklených baniek). Do každej nádoby sa potom pridá zvolený objem vody a nádoby sa tesne uzatvoria. Uzavreté nádoby sa potom premiešavajú, resp. pretrepávajú pri teplote 30 °C. (Odporúča sa použiť trepačku alebo miešačku schopnú fungovať pri konštantnej teplote, napr. magnetické miešadlo v termostaticky kontrolovanom a regulovanom vodnom kúpeli.) Po uplynutí jedného dňa sa jedna z nádob vyberie a ďalších 24 hodín sa opätovne vyváža pri skúšobnej teplote s občasným premiešaním, resp. pretrepaním. Obsah nádoby sa odstredí pri skúšobnej teplote a pomocou vhodnej analytickej metódy sa stanoví koncentrácia testovanej látky v čírej vodnej fáze. So zvyšnými dvoma bankami sa naloží podobne po počiatočnom vyvážení pri teplote 30 °C počas dvoch dní u jednej a počas troch dní u druhej. Ak výsledky koncentrácií aspoň z dvoch posledných nádob súhlasia s požadovanou reprodukovateľnosťou, výsledky testu sú uspokojivé. Ak výsledky z nádob 1, 2 a 3 prejavia tendenciu narastajúcich hodnôt, celý test sa musí zopakovať pri použití dlhších vyvažovacích časov.

Postup merania sa môže uskutočniť aj bez predchádzajúcej inkubácie pri teplote 30 °C. Na účely odhadu rýchlosti vzniku saturačnej rovnováhy sa vzorky odoberú, až keď už čas miešania neovplyvňuje koncentráciu testovaného roztoku.

Je potrebné zaznamenať hodnoty pH pre každú vzorku.

1.6.5. **Analýza**

Na účely týchto stanovení sa odporúča použiť špecifickú analytickú metódu pre príslušnú testovanú látku, pretože malé množstvá rozpustných prímiesí môže spôsobiť veľké chyby v nameranej rozpustnosti. Príkladmi takýchto metód sú plynová alebo kvapalinová chromatografia, titračné metódy, fotometrické metódy, voltamperometrické metódy.

2. ÚDAJE**2.1. METÓDA VYPIERANIA Z KOLÓNY**

Pre každé kolo meraní sa musí vypočítať stredná hodnota najmenej z piatich za sebou nasledujúcich vzoriek odobratých zo saturačnej úrovne, to isté platí aj o štandardnej odchýlke (smerodajnej odchýlke). Výsledky sa musia uvádzať v jednotkách hmotnosti na objem roztoku.

Porovnajú sa stredné hodnoty vypočítané pre dva testy s použitím odlišných prietokov a mali by mať opakovateľnosť menšiu ako 30 %.

2.2. BANKOVÁ (FLAŠOVÁ) METÓDA

Pre každú z troch baniek (fľašiek) musia byť uvedené samostatné výsledky, pričom tie výsledky, ktoré sa považujú za konštantné (opakovateľnosť menšia ako 15 %), treba spriemerovať a uviesť v jednotkách hmotnosti na objem roztoku. Tento postup si môže vyžadovať spätnú premenu hmotnostných jednotiek na objemové jednotky, použijúc hustotu, keď je rozpustnosť veľmi vysoká (>100g/l).

3. SPRÁVA**3.1. METÓDA VYPIERANIA Z KOLÓNY**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- výsledky predbežného testu,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identitu a prímеси),
- samostatné hodnoty koncentrácií, prietokov a pH pre každú vzorku,
- stredné hodnoty a smerodajné odchýlky namerané najmenej u piatich vzoriek zo saturačnej úrovne každého kola meraní,
- priemer dvoch za sebou nasledujúcich a akceptovateľných kôl meraní,
- teplotu vody počas saturačného procesu,
- použitú metódu analýzy,
- charakteristické vlastnosti použitého nosného materiálu,
- spôsob aplikácie testovanej látky na nosný materiál,
- druh použitého riedidla,
- dôkazy akejkoľvek nestálosti testovanej látky počas testu a príslušné použité metódy,
- všetky informácie dôležité pre interpretáciu výsledkov, najmä týkajúce sa prímеси a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

3.2. BANKOVÁ (FLAŠOVÁ) METÓDA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- výsledky predbežného testu,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- samostatné analytické stanovenia hodnôt a ich priemer v prípadoch, kde boli pre každú banku stanovené viaceré hodnoty,
- hodnotu pH osobitne pre každú vzorku,

- priemer hodnoty pre rozdielne banky, pri ktorých sa dosiahla súhlasnosť výsledkov,
- testovaciu teplotu,
- použitú analytickú metódu,
- dôkazy o akejkoľvek nestálosti testovanej látky počas testu a príslušnú použitú metódu,
- všetky informácie dôležité pre interpretáciu výsledkov, najmä týkajúce sa prímiesí a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

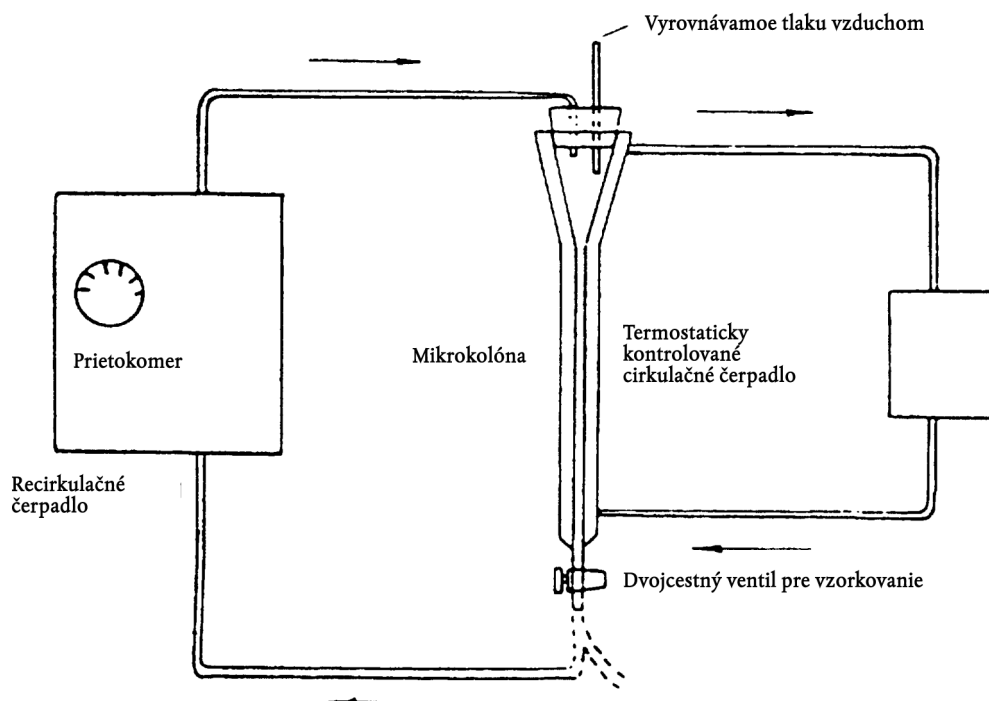
4.

ODKAZY

- (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.

*Dodatok***Obrázok 1**

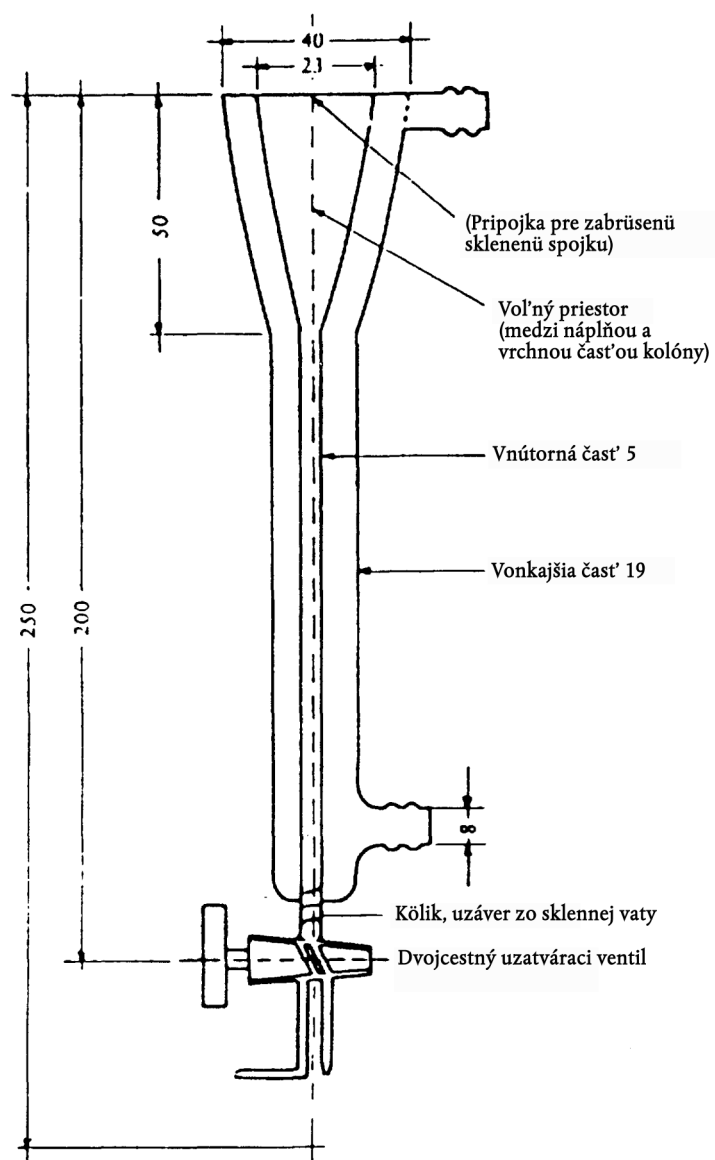
Metóda eluovania z kolóny s recirkulačným čerpadlom



Obrázok 2

Typická mikrokolóna

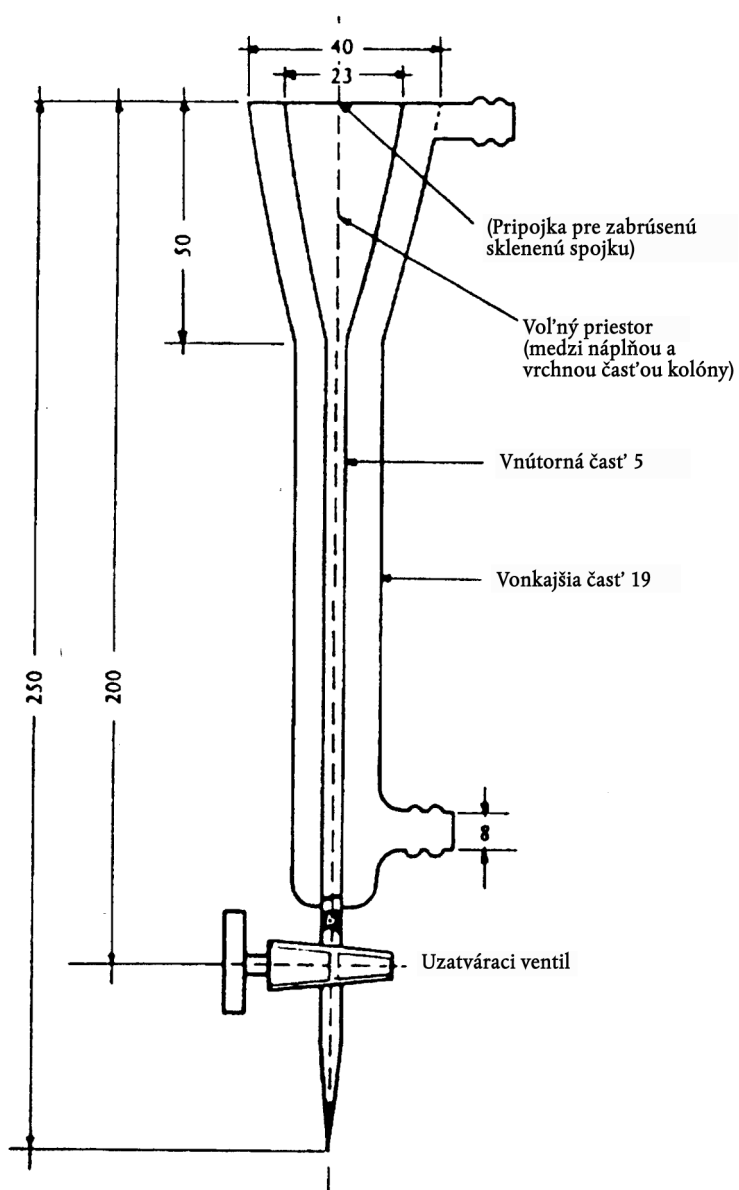
(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Obrázok 3

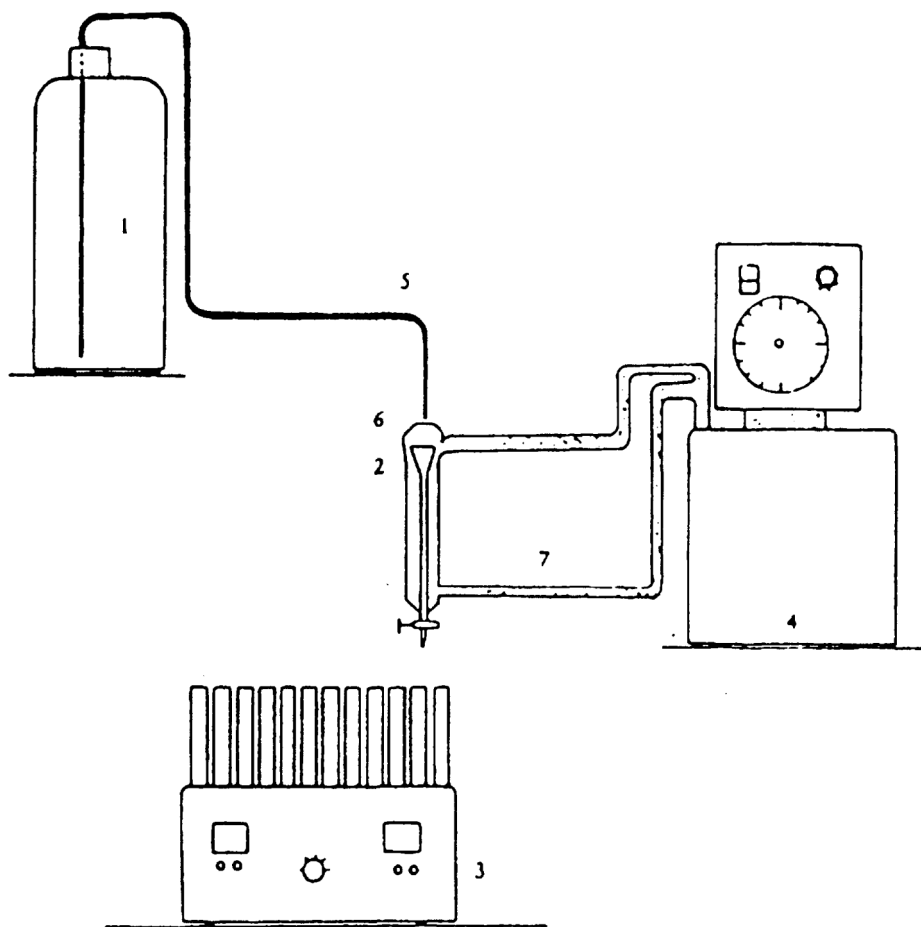
Typická mikrokolóna

(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Obrázok 4

Metóda eluovania z kolóny s egalizačnou nádobou



1 = Egalizačná nádoba (napr. 2,5 litrová banka)

2 = Kolóna (pozri obr. 3)

3 = Frakčný kolektor

4 = Termostat

5 = Teflónová rúrka (hadička)

6 = Zabrúsená sklenená spojka

7 = Vodné potrubie (medzi termostatom a kolónou, s vnútorným priemerom približne 8 mm)

A.8. ROZDELOVACÍ KOEFICIENT

1. METÓDA

Opísaná metóda „trepačkovej banky“ je upravená smernicou na vykonávanie testov OECD (1).

1.1. ÚVOD

Na účely realizácie tejto metódy sa odporúča získať predbežné informácie o štruktúrnom vzorci, disociačnej konštante, rozpustnosti vo vode, hydrolýze, rozpustnosti v n-oktanele a povrchovom napätí látky určenej na testovanie.

Merania na ionizovateľných testovaných látkach by sa mali realizovať iba v ich neionizovanej forme (voľná kyselina alebo voľná zásada) dosiahnutej použitím vhodného tlmivého roztoku s hodnotou pH minimálne o jednu jednotku pH pod (voľná kyselina) alebo nad (voľná zásada) hodnotou pH.

Táto testovacia metóda pozostáva z dvoch samostatných postupov: z metódy trepačkovej banky a vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Prvý z uvedených postupov sa dá aplikovať, keď hodnota $\log P_{ow}$ patrí do rozsahu od - 2 do 4, a druhý, keď táto hodnota patrí do rozsahu od 0 do 6. Pred uskutočnením ktoréhokoľvek z uvedených postupov je potrebné najprv získať predbežný odhad rozdeľovacieho koeficientu.

Metóda trepačkovej banky sa dá použiť iba v prípade absolútne čistých testovaných látok rozpustných vo vode a n-oktanele. Nemožno ju uplatniť v prípade povrchovo aktívnych látok (pre ktoré treba zabezpečiť vypočítanú hodnotu alebo odhad založený na rozpustnosti vo vode a n-oktanele).

Metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) sa nedá použiť v prípade silných kyselín a zásad, polymetalických látok, povrchovo aktívnych látok alebo látok, ktoré reagujú s eluentom. Pre tieto materiály treba zabezpečiť vypočítanú hodnotu alebo odhad založený na rozpustnosti vo vode a n-oktanele.

Metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) je menej citlivá na prítomnosť prímies v testovanej látke alebo prípravku než metóda trepačkovej banky. Napriek tomu však prímies v niektorých prípadoch môžu značne skomplikovať interpretáciu výsledkov, pretože vrcholová špecifikácia sa stáva neistou. Pre zmesi, ktoré vykazujú nerozpustené pásma, treba určiť vrchné a spodné medzné hodnoty $\log P$.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Rozdeľovací koeficient (P) je definovaný ako pomer rovnovážnych koncentrácií (c_i) rozpustenej látky v dvojfázovom systéme pozostávajúcom z dvoch do značnej miery nezmiešateľných rozpúšťadiel. V prípade n-oktanolu a vody platí:

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{oktan-l-ol}}}{C_{\text{voda}}}$$

Rozdeľovací koeficient (P) je preto kvocientom dvoch koncentrácií a udáva sa vo forme dekadického logaritmu ($\log P$).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Metóda trepačkovej banky

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Metóda HPLC

Na účely korelácie nameraných údajov HPLC (vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie) príslušnej zlúčeniny s jej hodnotou P treba zostrojiť kalibračný graf údajov $\log P$ versus chromatografické údaje s použitím najmenej 6 referenčných bodov. Zostáva na užívateľovi, aby si zvolil príslušné vhodné referenčné látky. Vždy keď je to možné, najmenej jedna referenčná látka má mať hodnotu P_{ow} vyššiu než testovaná látka a iná zasa hodnotu P_{ow} nižšiu než testovaná látka. Pre hodnoty $\log P$ nižšie ako 4 môže byť kalibrácia založená na údajoch nadobudnutých v rámci metódy trepačkovej banky. Pre hodnoty $\log P$ vyššie ako 4 môže byť kalibrácia založená na literárnych údajoch s potvrdenou platnosťou, ak tieto súhlasia s vypočítanými hodnotami. Pre väčšiu presnosť sa odporúča radšej vybrať také referenčné látky, ktoré majú podobnú štruktúru ako príslušná testovaná látka.

Existujú obsiahle zoznamy hodnôt $\log P_{ow}$ pre mnohé skupiny chemických látok a prípravkov (2) (3). Ak údaje týkajúce sa rozdeľovacích koeficientov štruktúralne príbuzných látok nie sú dostupné, možno použiť všeobecnejšiu kalibráciu uskutočnenú s inými referenčnými látkami.

Zoznam odporúčaných referenčných látok a ich hodnoty P_{ow} sú uvedené v dodatku 2.

1.4. PRINCÍP METÓDY

1.4.1. Metóda trepačkovej banky

Na účely stanovenia rozdeľovacieho koeficientu musí byť dosiahnutá rovnováha medzi všetkými vzájomne pôsobiacimi zložkami systému a musia byť stanovené koncentrácie látok rozpustených v dvoch fázach. Štúdium odbornej literatúry týkajúcej sa tejto otázky ukazuje, že na vyriešenie problému dôkladného premiešania dvoch fáz s ich následnou separáciou na účely stanovenia rovnovážnej koncentrácie pre testovanú látku možno použiť viacero odlišných technických postupov.

1.4.2. Metóda HPLC (vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie)

Vysokoúčinnná kvapalinová chromatografia sa uskutočňuje na analytických kolónach naplnených komerčne dostupnou tuhrou fázou obsahujúcou dlhé uhlíkové reťazce (napr. C_8 , C_{18}), ktoré sú chemicky viazané na kremík. Látky injektované na takúto kolónu sa pohybujú pozdĺž nej rozdielnymi rýchlosťami, pretože dochádza k rozdielnym stupňom rozdeľovania medzi pohyblivú fázou a uhlíkovú nepohyblivú fázou. Zmesi látok sa vypierajú v poradí za sebou v závislosti od ich hydrofóbnosti, pričom látky rozpustné vo vode sa vypierajú ako prvé a látky rozpustné v oleji ako posledné, proporcionálne k ich rozdeľovaciemu koeficientu medzi uhlíkom a vodou. Toto umožňuje vytvorenie vzájomného vzťahu medzi dobou zdržania na takejto kolóne s reverznou fázou a rozdeľovacím koeficientom n-oktanol/voda. Rozdeľovací koeficient je odvodený z činiteľa využitia (*kapacitného faktora*) k , daného výrazom:

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

v ktorom t_R = doba zdržania (retencie) testovanej látky, t_0 = priemerný čas, ktorý potrebuje molekula rozpúšťadla na to, aby prešla kolónou (nečinná doba).

Kvantitatívne analytická metóda sa nepožadujú a potrebné je iba stanovenie časov vypierania.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

1.5.1. Opakovateľnosť

Metóda trepačkovej banky

Na účely zaistenia presnosti rozdeľovacieho koeficientu je potrebné vykonať duplikátne stanovenia za troch odlišných skúšobných podmienok, pričom možno meniť množstvo špecifikovanej látky, ako aj pomer objemov rozpúšťadiel. Stanovené hodnoty rozdeľovacieho koeficientu vyjadrené ako ich dekadické (Briggsove) logaritmy musia patriť do rozsahu $\pm 0,3$ log jednotiek.

Metóda HPLC (vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie)

Na účely zvýšenia dôveryhodnosti merania sa musia uskutočniť duplikátne stanovenia. Hodnoty $\log P$ odvodené z jednotlivých meraní musia patriť do rozsahu $\pm 0,1$ log jednotiek.

1.5.2. Citlivosť*Metóda trepačkovej banky*

Rozsah merania v rámci tejto metódy je určený možnosťou sledovania analytického postupu. Toto by malo umožniť stanovenie hodnôt $\log P_{ow}$ v rozmedzí od - 2 do 4 (príležitostne, keď sú na to podmienky, toto rozmedzie môže byť rozšírené na $\log P_{ow}$ s hodnotou až 5), keď koncentrácia rozpustenej látky ani v jednej fáze nepresiahne hodnotu 0,01 molu na jeden liter.

Metóda HPLC (vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie)

Metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie umožňuje odhadovanie rozdeľovacích koeficientov v rozmedzí $\log P_{ow}$ od 0 do 6.

Za normálnych okolností možno rozdeľovací koeficient látky alebo prípravku odhadnúť s presnosťou na ± 1 log jednotku hodnoty v rámci metódy trepačkovej banky. Typické korelácie možno nájsť v literatúre (4) (5) (6) (7) (8). Vyššia presnosť sa môže zvyčajne dosiahnuť vtedy, keď sú korelačné diagramy založené na štruktúrne príbuzných referenčných látkach (9).

1.5.3. Špecifickosť*Metóda trepačkovej banky*

Nernstov rozdeľovací zákon sa dá použiť iba pri konštantnej teplote, tlaku a hodnote pH pre zriedené roztoky. Uplatňuje sa výlučne pre čisté látky dispergované medzi dve čisté riedidlá. Ak sa v tom istom čase objavajú v jednej alebo oboch fázach viaceré odlišné rozpustené látky, môže to nepriaznivo ovplyvniť výsledky.

Disociácia alebo spájanie rozpustených molekúl má za následok odchýlky od Nernstovho rozdeľovacieho zákona. Takéto odchýlky sú naznačované skutočnosťou, že rozdeľovací koeficient sa stane závislý od koncentrácie roztoku.

Kvôli viacnásobným rovnovážnym stavom by sa táto testovacia metóda nemala aplikovať na ionizovateľné prípravky bez uplatnenia korekcie. V prípade takýchto prípravkov by sa malo uvažovať o použití tlmivých roztokov namiesto vody, pričom hodnota pH tlmivého roztoku by mala predstavovať minimálne jednu jednotku pH z pK_a testovanej látky, a zároveň treba mať na pamäti závažnosť tejto hodnoty pH pre životné prostredie.

1.6. OPIS METÓDY**1.6.1. Predbežný odhad rozdeľovacieho koeficientu**

Uprednostňuje sa odhad rozdeľovacieho koeficientu použitím výpočtovej metódy (dodatok 1) alebo kde je to vhodné, z pomeru rozpustností testovanej látky v čistých rozpúšťadlách (10).

1.6.2. Metóda trepačkovej banky**1.6.2.1. Príprava**

n-oktanol: stanovenie rozdeľovacieho koeficientu by sa malo uskutočniť s reagentom analytickej triedy vysokej čistoty.

Voda: použije sa voda destilovaná alebo dvakrát destilovaná v sklenom alebo kremennom destilačnom prístroji. V zdôvodnených prípadoch treba na ionizovateľné prípravky namiesto vody použiť tlmivé roztoky.

Upozornenie:

Nesmie sa používať voda odoberaná priamo z ionexu (vymieňača iónov).

1.6.2.1.1. Predsaturácia rozpúšťadiel

Predtým než sa stanoví rozdeľovací koeficient, fázy rozpúšťadlového systému sa vzájomne nasýtia trepaním pri teplote pokusu. Na tento účel je praktické pretrepávať dve veľké a vysoké fľaše s n-oktanolom analytickej triedy vysokej čistoty alebo s vodou, pričom každá musí obsahovať dostatočné množstvo druhého rozpúšťadla, počas 24 hodín na mechanickej trepačke a potom sa nechajú odstáť dostatočne dlhý čas na to, aby sa fázy od seba oddelili a aby sa dosiahol stav saturácie.

1.6.2.1.2. Príprava na test

Celý objem sústavy dvoch fáz by mal skoro úplne naplniť testovaciu nádobu. Toto pomôže zabrániť stratám materiálu následkom vyprchávania. Objemový pomer a množstvo látky, ktoré sa majú použiť, sú stanovené týmto:

- predbežným odhadom rozdeľovacieho koeficientu (pozri vyššie),
- minimálnym množstvom testovanej látky potrebným pre analytický postup,
- obmedzením maximálnej koncentrácie v každej fáze na 0,01 molu na liter.

Uskutočňujú sa tri testy. V prvom teste sa použije vypočítaný objemový pomer n-oktanolu k vode; v druhom teste sa tento pomer vydolí dvom; a v treťom teste sa tento pomer vynásobí dvoma (napr. 1: 1, 1: 2, 2: 1).

1.6.2.1.3. Testovaná látka

V n-oktane predsaturovanom vodou sa pripraví základný zásobný roztok. Koncentrácia tohto základného zásobného roztoku musí byť presne stanovená ešte predtým, než sa použije na stanovenie rozdeľovacieho koeficientu. Tento roztok by mal byť uskladnený v takých podmienkach, ktoré zaručia jeho stabilitu.

1.6.2.2. Podmienky skúšania

Testovacia teplota sa musí udržiavať na konštantnej úrovni (± 1 °C) a musí ležať v rozmedzí od 20 °C do 25 °C.

1.6.2.3. Postup merania

1.6.2.3.1. Vytvorenie rozdeľovacej rovnováhy

Pre každú zo skúšobných podmienok treba pripraviť duplikátne skúšobné nádoby obsahujúce požadované, presne odmerané množstvá dvoch rozpúšťadiel spolu s potrebným množstvom základného zásobného roztoku.

Fázy n-oktanolu (n-oktanolové fázy) sa musia merať podľa objemu. Skúšobné nádoby treba buď umiestniť na vhodnú trepačku, alebo ich pretrepávať ručne. V prípade použitia odstredivkovej skúmavky spočíva odporúčaná metóda v rýchlom obracaní skúmavky o 180 stupňov okolo jej priečnej osi tak, aby všetok zachytený vzduch vystúpil cez obidve fázy. Skúsenosti ukázali, že na vytvorenie rozdeľovacej rovnováhy zvyčajne postačí 50 takýchto obrátov. Na zabezpečenie želaného výsledku sa odporúča 100 obrátov v priebehu piatich minút.

1.6.2.3.2. Oddelovanie fáz odstreďovaním

Keď je to potrebné, na účely oddelenia fáz by malo byť výkonné odstredenie zmesi. Tento úkon by sa mal uskutočniť v laboratórnej odstredivke s udržiavanou stálou teplotou miestnosti alebo v prípade, ak sa použije odstredivka bez tepelnej regulácie, odstredivkové skúmavky by mali byť ponechané pri skúšobnej teplote počas najmenej jednej hodiny pred začatím analýzy.

1.6.2.4. Analýza

Na stanovenie rozdeľovacieho koeficientu je potrebné stanoviť koncentrácie testovanej látky v oboch fázach. Toto možno uskutočniť odobratím alikvotnej časti oboch fáz z každej skúmavky pre každú z skúšobných podmienok a ich analyzovaním zvoleným postupom. Celkové množstvo látky prítomné v oboch fázach je treba vypočítať a porovnať s množstvom látky, ktoré sa pôvodne použilo.

Vodná fáza by sa mala vzorkovať takým postupom, ktorý by minimalizoval riziko prítomnosti stopových množstiev n-oktanolu: na odber vzorky z vodnej fázy sa môže použiť sklená injekčná striekačka s oddeliteľnou ihlou. Injekčná striekačka by mala byť spočiatku čiastočne naplnená vzduchom. Počas prenikania ihly cez vrstvu n-oktanolu treba mierne vypudzovať vzduch z injekčnej striekačky. Potom sa do striekačky naberie primeraný objem vodnej fázy. Striekačka sa rýchlym pohybom vytiahne z roztoku a ihla sa odstráni. Obsah striekačky potom možno použiť ako vodnú vzorku. Koncentrácia v oboch odstreďených oddelených fázach by sa podľa možnosti mala stanoviť metódou špecifickou pre príslušnú testovanú látku. Príklady analytických metód, ktoré tu možno použiť, sú:

- fotometrické metódy,
- plynová chromatografia,
- vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC).

1.6.3. Metóda HPLC (vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie)

1.6.3.1. Príprava

Prístroje

Požaduje sa kvapalinový chromatograf vybavený impulzovým čerpadlom a vhodným zariadením na detekciu. Odporúča sa použitie vstrekovacieho ventilu so vstrekovacími slučkami. Prítomnosť polárnych skupín v nepohyblivej fáze môže vážne narušiť fungovanie kolóny vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Z toho dôvodu by mali stacionárne fázy obsahovať minimálne percento polárnych skupín (11). Možno použiť aj komerčné mikročasticové náplne so spätnou fázou alebo kolóny s hotovou náplňou. Medzi vstrekovací systém a analytickú kolónu sa môže umiestniť ochranná kolóna.

Pohyblivá fáza

Na prípravu elučného rozpúšťadla, ktoré treba pred použitím odplyniť, sa použije metanol kvalitatívnej triedy HPLC a voda kvalitatívnej triedy HPLC. Treba použiť izokratické vypieranie. Ďalej treba použiť pomery metanolu a vody s minimálnym obsahom vody 25 %. Na vypieranie prípravkov s hodnotou log P 6 v priebehu jednej hodiny pri prietoku 1 ml za minútu postačí typický pomer zmesi metanolu a vody 3:1 (v/v). Pre prípravky s vysokým log P môže byť potrebné skrátiť čas vypierania (ako aj časy referenčných látok) znížením polarít pohyblivej fázy alebo skrátením dĺžky kolóny.

Látky s veľmi nízkou rozpustnosťou v n-oktane majú pri použití metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie tendenciu vykazovať abnormálne nízke hodnoty log P_{ow} , pričom zóny takýchto prípravkov sa niekedy spájajú s čelom rozpúšťadla. Toto pravdepodobne vyplýva zo skutočnosti, že rozdeľovací proces je príliš pomalý na to, aby dosiahol rovnovážny stav v čase potrebnom za normálnych okolností v rámci separácie metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Na dosiahnutie spoľahlivej hodnoty môže byť potom účinné zníženie prietoku, resp. zmenšenie pomeru metanolu a vody.

Testované a referenčné látky by mali byť rozpustné v pohyblivej fáze v dostatočných koncentráciách, aby sa umožnila ich detekcia. Iba vo výnimočných prípadoch sa môžu so zmesou metanolu a vody použiť aj aditíva, pretože tieto menia vlastnosti kolóny. V prípade chromatografov s aditívami je povinné použiť samostatnú kolónu toho istého typu. Ak zmes metanolu a vody nie je vhodná, môžu sa použiť iné zmesi organického rozpúšťadla a vody, napr. zmes etanolu a vody alebo acetonitrilu (nitrilu kyseliny etánovej) a vody.

Hodnota pH eluentu je kritická pre ionizovateľné látky. Tieto hodnoty musia patriť do operačného rozmedzia pH kolóny, ktoré leží zvyčajne medzi hodnotami 2 až 8. Odporúča sa pufrovanie. Treba dbať na to, aby sa zabránilo zrážaniu solí a poškodeniu kolóny, ku ktorému dochádza v prípade použitia niektorých organických zmesí fázy a pufru. Merania metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s nepohyblivými fázami na báze kremíka s hodnotami pH nad 8 sa neodporúčajú, pretože použitie alkalickéj pohyblivej fázy môže zapríčiniť rýchle poškodenie funkčnosti kolóny.

Rozpustené látky

Referenčné látky sa musia vyznačovať maximálnou možnou čistotou. Ak je to možné, látky alebo prípravky určené na použitie v rámci testu alebo kalibrácie sú rozpustené v pohyblivej fáze.

Podmienky skúšania

Teplota počas merania by sa nemala meniť v rozsahu väčšom ako ± 2 K (kelvin).

1.6.3.2. Meranie

Výpočet nečinnnej doby t_0

Nečinnná doba t_0 môže byť stanovená použitím buď homologického radu (napr. n-alkylmetylových ketónov), alebo nezadržaných, resp. neeluovaných organických látok alebo prípravkov (napr. tiomočoviny alebo formamidu, amidu kyseliny metánovej). Na výpočet nečinnnej doby t_0 s použitím homologického radu sa injektuje najmenej sedem členov homologického radu a stanovia sa príslušné doby zdržania. Prvotné (nespracované) doby zdržania $t(n_c + 1)$ sú graficky znázornené v diagrame ako funkcia $t_r(n_c)$ a stanovený je úsek a a sklon b regresnej rovnice:

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

(kde n_c = počet atómov uhlíka). Nečinnná doba t_0 je potom daná vzťahom:

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

Kalibračný graf

Ďalším krokom postupu je zostrojenie korelačného diagramu hodnôt $\log k$ versus $\log P$ pre príslušné referenčné látky. V praktickom postupe sa súčasne vstrekuje sada piatich až desiatich štandardných referenčných látok, ktorých hodnota $\log P$ sa nachádza v blízkosti predpokladaného rozmedzia, a stanovia sa doby zdržania, podľa možnosti na záznamovej integračnej jednotke napojenej na detekčný systém. Zodpovedajúce logaritmy kapacitných faktorov $\log k$ sa vypočítajú a nanesú do diagramu ako funkcia $\log P$ stanovenou metódou trepačkovej banky. Kalibrácia sa uskutočňuje v pravidelných časových intervaloch, a to najmenej raz denne, aby sa tak dali vziať do úvahy možné zmeny v činnosti kolóny.

Stanovenie kapacitného faktora testovanej látky

Testovaná látka sa vstrekuje do čo najmenšieho možného množstva mobilnej fázy. Stanoví sa (duplikátne) doba zdržania, čo umožní výpočet kapacitného faktora k . Z korelačného grafu referenčných látok sa dá interpolovať rozdeľovací koeficient testovanej látky. Pre veľmi nízke a veľmi vysoké rozdeľovacie koeficienty je potrebná extrapolácia. V takýchto prípadoch treba dávať mimoriadny pozor na hranice významnosti regresnej čiary.

2. ÚDAJE

Metóda trepačkovej banky

Spôľahlivosť stanovených hodnôt P sa môže overiť porovnaním stredných hodnôt duplikátnych stanovení s celkovou strednou hodnotou.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímiesi),
- keď sa dané metódy nedajú uplatniť (napr. povrchovo aktívny materiál), treba zabezpečiť vypočítanú hodnotu alebo odhad založený na jednotlivých rozpustnostiach v n-oktane a vo vode,
- všetky informácie a poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímiesi a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

V prípade metódy trepačkovej banky:

- výsledok predbežného odhadu, ak sa takýto uskutočnil,
- teplotu, pri ktorej sa hodnoty stanovovali,
- údaje o analytických postupoch uplatnených pri stanovovaní koncentrácií,
- čas a rýchlosť odstreďovania, ak sa použilo,
- namerané koncentrácie v oboch fázach pre každé stanovenie (to znamená, že dohromady sa uvedú hodnoty 12 koncentrácií),

- hmotnosť testovanej látky, objem každej fázy použitý v každej skúšobnej nádobe a celkové vypočítané množstvo testovanej látky prítomné v každej fáze po vyvážení (po dosiahnutí rovnovážneho stavu),
- vypočítané hodnoty rozdeľovacieho koeficientu (P) a stredná hodnota musia byť uvedené pre každú sadu (sériu) skúšobných podmienok, ako aj stredné hodnoty pre všetky stanovenia. Ak existujú náznaky závislosti rozdeľovacieho koeficientu od koncentrácie, táto skutočnosť sa musí taktiež uviesť v správe,
- v správe sa musí uviesť smerodajná odchýlka jednotlivých hodnôt P od ich strednej hodnoty,
- stredná hodnota P zo všetkých stanovení sa musí tiež vyjadriť ako jej logaritmus (základ 10),
- vypočítanú teoretickú hodnotu P_{ow} , keď bola táto hodnota stanovená alebo keď je nameraná hodnota $> 10^4$,
- hodnotu pH použitej vody a vodnej fázy počas pokusu,
- ak boli použité tlmivé roztoky, tak zdôvodnenie použitia tlmivých roztokov namiesto vody, ďalej zloženie, koncentráciu a hodnoty pH tlmivých roztokov, hodnotu pH vodnej fázy pred uskutočnením pokusu a po jeho ukončení.

V prípade metódy HPLC (vysokoučinnnej kvapalinovej chromatografie):

- výsledok predbežného odhadu, ak sa takýto uskutočnil,
- testované a referenčné látky a ich čistotu,
- teplotné rozmedzie jednotlivých stanovení,
- hodnoty pH, pri ktorých sa stanovenia vykonali,
- podrobnosti o analytickej a ochrannej kolóne, pohyblivej (mobilnej) fáze a detekčných prostriedkoch,
- retenčné údaje a hodnoty $\log P$ z odbornej literatúry pre referenčné látky použité v rámci kalibrácie,
- podrobnosti o zodpovedajúcej regresnej čiare ($\log k$ versus $\log P$),
- priemerné retenčné údaje a interpolovanú hodnotu P pre testovanú látku alebo prípravok,
- opis zariadenia a prevádzkových, resp. pracovných podmienok,
- eluačné profily,
- množstvá testovaných a referenčných látok zavedených do kolóny,
- nečinnú dobu a spôsob, akým sa merala.

4. ODKAZY

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

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

Dodatok 1

Výpočtové/odhadové metódy

ÚVOD

Všeobecný úvod k výpočtovým metódam, údaje a príklady sú uvedené v publikácii *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (a).

Vypočítané hodnoty P_{ow} sa môžu byť použiť týmito spôsobmi:

- na rozhodnutie o tom, ktorá z experimentálnych metód je vhodná (rozmedzie pri metóde trepačkovej banky: $\log P_{ow}$: - 2 až 4, rozmedzie pri metóde HPLC: $\log P_{ow}$: 0 až 6),
- na voľbu vhodných testových podmienok (napr. referenčných látok pre postupy HPLC, objemového pomeru n-oktanolu a vody pre metódu trepačkovej banky),
- ako laboratórna vnútorná (interná) kontrola z hľadiska výskytu možných chýb v pokusoch,
- na umožnenie odhadu hodnôt P_{ow} v prípadoch, kde sa nemôžu použiť experimentálne metódy z technických dôvodov.

ODHADOVÁ METÓDA

Predbežný odhad rozdeľovacieho koeficientu

Hodnota rozdeľovacieho koeficientu sa môže odhadnúť použitím rozpustností testovanej látky v čistých rozpúšťadlách:

Na tento odhad možno použiť tento vzťah:

$$P_{\text{odhad}} = \frac{\text{nasýtenie } c_{\text{n-oktanol}}}{\text{nasýtenie } c_{\text{voda}}}$$

VÝPOČTOVÉ METÓDY

Princíp výpočtových metód

Všetky výpočtové metódy sú založené na formálnom triedení molekuly na vhodné subštruktúry, pre ktoré sú známe spoľahlivé prírastky hodnoty $\log P_{ow}$. Hodnota $\log P_{ow}$ celej molekuly sa potom vypočíta ako súčet jej zodpovedajúcich čiastkových hodnôt plus súčet korekčných členov pre vnútromolekulové interakcie.

Zoznamy fragmentových konštánt a korekčných členov sú uvedené v (b) (c) (d) (e). Niektoré z nich sa pravidelne aktualizujú (b).

Kritériá kvality

Spôľahlivosť výpočtovej metódy vo všeobecnosti klesá s narastajúcou komplexnosťou skúmanej látky alebo prípravku. V prípade jednoduchých molekúl s nízkou molekulovou hmotnosťou a jednej alebo dvoch funkčných skupín možno predpokladať odchýlku 0,1 až 0,3 jednotiek $\log P_{ow}$ medzi výsledkami rozličných fragmentačných metód a nameranou hodnotou. V prípade komplexnejších molekúl môžu byť hranice chyby väčšie. Bude to závisieť od spoľahlivosti a dostupnosti fragmentových konštánt, ako aj od schopnosti rozoznať vnútromolekulové interakcie (napr. vodíkové väzby) a správneho použitia korekčných členov (problém je jednoduchší pri použití počítačového softvéru CLOGP-3) (b). V prípade ionizujúcich prípravkov je dôležité správne zohľadnenie náboja alebo stupňa ionizácie.

Postupy výpočtov

Hanschova π -metóda

Pôvodná hydrofóbná substituenčná konštanta, π , ktorú zaviedol Fujita a kol. (f), je definovaná ako:

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

kde $P_{ow}(\text{PhX})$ je rozdeľovací koeficient aromatického derivátu a $P_{ow}(\text{PhH})$ je rozdeľovací koeficient pôvodnej látky alebo prípravku

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

Podľa tejto definície je metóda π (π -metóda) použiteľná predovšetkým na aromatickú substitúciu. Hodnoty π pre väčší počet substituentov boli zostavené do tabuľky (b) (c) (d). Používajú sa na výpočet hodnoty $\log P_{ow}$ pre aromatické molekuly alebo subštruktúry.

Rekkerova metóda

Podľa Rekkera (g) sa hodnota $\log P_{ow}$ vypočíta týmto spôsobom:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_i (\text{interakčné členy})$$

kde f_i predstavuje konštanty rozdielnych molekulových fragmentov a a_i frekvenciu ich výskytu v skúmanej molekule. Korekčné členy môžu byť vyjadrené ako integrálny (celý) násobok jednej jedinej konštanty C_m (tzv. „magickej konštanty“). Fragmentové konštanty f_i a C_m boli stanovené zo zoznamu 1 054 experimentálnych hodnôt P_{ow} (825 prípravkov) použitím zloženej regresnej analýzy (c) (h). Stanovenie interakčných členov sa vykonáva podľa stanovených pravidiel opísaných v literatúre (e) (h) (i).

Hanschova-Leova metóda

Podľa Hanscha a Lea (c) sa hodnota $\log P_{ow}$ vypočíta z tohto vzťahu:

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

kde f_i predstavuje konštanty rozdielnych molekulových fragmentov, F_j korekčné členy a a_i , b_j príslušné frekvencie výskytu. Deriváciou z pokusných hodnôt P_{ow} bol metódou pokusov a chýb stanovený zoznam atómových a skupinových fragmentových hodnôt a zoznam korekčných členov F_j (tzv. „faktorov“). Korekčné členy boli usporiadané do niekoľkých rozdielnych tried (a) (c). Je relatívne komplikované a náročné načas zohľadniť všetky pravidlá a korekčné členy. Vyvinuté boli rôzne sady programov (b).

Kombinovaná metóda

Výpočet hodnoty $\log P_{ow}$ komplexných molekúl sa dá do značnej miery zdokonaľiť, ak sa molekula rozdelí na väčšie subštruktúry, pre ktoré existujú spoľahlivé hodnoty $\log P_{ow}$, a to buď z tabuliek (b) (c), alebo z vlastných meraní príslušného laboratória. Takéto fragmenty (napr. heterocykly, antrachinón, azobenzén) sa potom môžu kombinovať s Hanschovými hodnotami π alebo s Rekkerovými, alebo Leovými fragmentovými konštantami.

Poznámky

- i) Výpočtové metódy sa dajú použiť iba pre čiastočne alebo úplne ionizované prípravky, keď možno vziať do úvahy potrebné korekčné faktory.
- ii) Ak možno predpokladať vnútromolekulové väzby, je potrebné prirátat zodpovedajúci korekčný člen (približne + 0,6 až + 1,0 $\log P_{ow}$ jednotiek). Indikácie týkajúce sa prítomnosti takýchto väzieb možno získať zo stereomodelov príslušnej molekuly alebo zo spektroskopických údajov o nej.
- iii) Ak sú možné viaceré tautomérické formy, za základ výpočtu by sa mala použiť najpravdepodobnejšia forma.
- iv) Je potrebné pozorne sledovať všetky úpravy, resp. revidované vydania zoznamov fragmentových konštant.

Správa

Ak sa použijú výpočtové alebo odhadové metódy, potom správa z testu obsahuje nasledujúce informácie:

- opis testovanej látky (zmes, prímеси atď.),
- indikácie (údaje) týkajúce sa všetkých možných vnútromolekulových vodíkových väzieb, disociácií, nábojov a všetkých ostatných nezvyčajných efektov (napr. tautomérické),
- opis použitej výpočtovej metódy,
- identifikáciu alebo spôsob zásobovania databázy,
- zvláštnosti vo výbere (voľbe) fragmentov,
- kompletnú dokumentáciu výpočtov.

LITERATÚRA

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

Dodatok 2

Odporúčané referenčné látky pre metódu HPLC

Číslo	Referenčná látka	log P _{ow}	pK _a
1	2-butanón	0,3	
2	4acetylpyridín	0,5	
3	anilín	0,9	
4	acetanilid	1,0	
5	benzylalkohol	1,1	
6	4-metoxifenol	1,3	pK _a = 10,26
7	kyselina fenoxycetová	1,4	pK _a = 3,12
8	fenol	1,5	pK _a = 9,92
9	2,4dinitrofenol	1,5	pK _a = 3,96
10	benzonitril	1,6	
11	fenylacetonitril	1,6	
12	4metylbenzylalkohol	1,6	
13	acetofenón	1,7	
14	2nitrofenol	1,8	pK _a = 7,17
15	kyselina 3nitrobenzoová	1,8	pK _a = 3,47
16	4chlórnilín	1,8	pK _a = 4,15
17	nitrobenzén	1,9	
18	3fenylpropánol	1,9	
19	kyselina benzoová	1,9	pK _a = 4,19
20	pkrezol	1,9	pK _a = 10,17
21	kyselina škoricová	2,1	pK _a = 3,89 cis4,44 trans
22	anizol	2,1	
23	metylbenzoát	2,1	
24	benzén	2,1	
25	kyselina 3metylbenzoová	2,4	pK _a = 4,27
26	4chlórphenol	2,4	pK _a = 9,1
27	trichlóretylén	2,4	
28	atrazín	2,6	
29	etylbenzoát	2,6	
30	2,6dichlórbenzonitril	2,6	
31	kyselina 3chlórbenzoová	2,7	pK _a = 3,82
32	toluén	2,7	
33	naftalénol	2,7	pK _a = 9,34
34	2,3dichlóranilín	2,8	
35	chlórbenzén	2,8	
36	alylfenyléter	2,9	
37	brómbenzén	3,0	
38	etylbenzén	3,2	
39	benzofenón	3,2	
40	4fenylfenol	3,2	pK _a = 9,54
41	tymol	3,3	
42	1,4dichlórbenzén	3,4	
43	difenylamín	3,4	pK _a = 0,79
44	naftalén	3,6	
45	fenylbenzoát	3,6	
46	izopropylbenzén	3,7	
47	2,4,6trichlórfenol	3,7	pK _a = 6
48	Bifenyl	4,0	
49	benzylbenzoát	4,0	
50	2,4dinitro6sekbutylfenol	4,1	
51	1,2,4trichlórbenzén	4,2	
52	kyselina dodekánová	4,2	
53	difenyléter	4,2	
54	nbutylbenzén	4,5	
55	fenantrén	4,5	
56	fluorantén	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6difenylpyridín	4,9	
59	trifenylamín	5,7	
60	DDT	6,2	
Iné referenčné látky s nízkou hodnotou log P _{ow}			
1	kyselina nikotínová	-0,07	

A.9. TEPLOTA VZPLANUTIA**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Odporúča sa získať predbežné informácie o zápalnosti, resp. horľavosti látky ešte pred uskutočnením tohto testu. Postup testu sa dá aplikovať na kvapalné látky, ktorých pary môžu byť zapálené zapalovacími zdrojmi. Skúšobné metódy uvedené v tomto texte sú spoľahlivé iba pre rozmedzia teploty vzplanutia, ktoré sú špecifikované v jednotlivých metódach.

Pri voľbe metódy, ktorá sa má použiť, by sa malo uvážiť, či nemôže dôjsť k chemickým reakciám medzi látkou a nosičom vzorky.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Teplota vzplanutia je najnižšia teplota korigovaná na tlak 101,325 kPa, pri ktorej kvapalina uvoľňuje pary, za podmienok definovaných v skúšobnej metóde v takom množstve, že v skúšobnej nádobe sa vytvorí zápalná (horľavá) zmes pár a vzduchu.

Jednotky: °C

$$t = T - 273,15$$

(t v °C a T v K)

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová chemická látka. V prvom rade slúžia na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Látka sa umiestni do skúšobnej nádoby a zohrieva sa na testovaciu teplotu podľa postupu opísaného v príslušnej skúšobnej metóde. Zápalné (horľavé) pokusy sa uskutočňujú na účely zistenia, či testovaná vzorka pri počiatočnej teplote vzplanie, alebo nie.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY**1.5.1. Opakovateľnosť**

Opakovateľnosť sa mení v závislosti od rozmedzia teploty vzplanutia a od použitej skúšobnej metódy; maximum 2 °C.

1.5.2. Citlivosť

Citlivosť závisí od použitej skúšobnej metódy.

1.5.3. Špecifickosť

Špecifickosť niektorých skúšobných metód je obmedzená na určité rozmedzia teploty vzplanutia a je závislá od údajov týkajúcich sa vlastností testovanej látky (napr. vysoká viskozita).

1.6. OPIS METÓDY**1.6.1. Príprava**

Vzorka príslušnej testovanej látky sa umiestni do skúšobného prístroja podľa 1.6.3.1. a/alebo 1.6.3.2.

Kvôli bezpečnosti sa odporúča, aby sa pre látky s vysokou energiou alebo pre jedovaté látky použila metóda, v rámci ktorej sa testujú iba vzorky s malým objemom, približne 2 cm³.

1.6.2. Podmienky skúšania

Ak to zodpovedá bezpečnostným predpisom, prístroj sa postaví na miesto, kde nie je vystavený prievanu.

1.6.3. Realizácia testu**1.6.3.1. Rovnovážna metóda**

Pozri technické normy ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. Nerovnovážna metóda

Abelov prístroj:

Pozri technické normy BS 2000, časť 170, NF M 07-011, NF T 66-009.

Abelov-Penskyho prístroj:

Pozri technické normy EN 57, DIN 51755, časť 1 (pre teploty od 5 °C do 65 °C), DIN 51755, časť 2 (pre teploty pod 5 °C), NF M07-036.

Tagov prístroj:

Pozri technickú normu ASTM D 56.

Penskyho-Martensov prístroj:

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

Poznámky:

Ak sa zistí, že teplota vzplanutia, stanovená nerovnovážnou metódou v 1.6.3.2., je 0 °C ± 2 °C, 21 °C ± 2 °C alebo 55 °C ± 2 °C, mala by byť potvrdená rovnovážnou metódou pri použití toho istého prístroja.

Na oznamovanie sa smú použiť iba tie metódy, ktoré sú schopné vyvinúť teplotu vzplanutia predmetnej testovanej látky.

Na stanovenie teploty vzplanutia viskózných kvapalín (farbív, živíc a podobných látok) obsahujúcich rozpúšťadlá sa smú použiť iba prístroje a skúšobné metódy vhodné na stanovovanie teploty vzplanutia viskózných kvapalín.

Pozri technické normy ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213, časť 1.

2. ÚDAJE**3. SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- treba uviesť použitú metódu, ako aj všetky prípadné odchýlky,
- výsledky a všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. ODKAZY

Žiadne.

A.10. HORĽAVOSŤ TUHÝCH LÁTOK**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pred realizáciou tohto testu sa odporúča získať predbežné informácie o potenciálne explozívnych vlastnostiach látky.

Tento test by sa mal použiť iba v prípade práškových, granulovaných alebo pastovitých látok.

Aby neboli zahrnuté všetky látky, ktoré môžu byť zapálené, ale iba tie, ktoré horia rýchlo, alebo tie, ktorých spôsob horenia je v každom prípade mimoriadne nebezpečný, za veľmi horľavé sa považujú iba tie látky, ktorých rýchlosť horenia presahuje určitú medznú hodnotu.

Môže byť mimoriadne nebezpečné, ak sa žeravenie šíri kovovým práškom, pretože je potom veľmi ťažké zhasiť oheň. Kovové prášky treba považovať za vysokohorľavé, ak podporujú šírenie žeravenia cez hmotu v priebehu stanoveného času.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Čas horenia je vyjadrený v sekundách.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Látka sa sformuje do neprerušeneho prúžku alebo práškovej čiary v dĺžke asi 250 mm a uskutoční sa predbežný skríningový test na stanovenie toho, či po zapálení plameňom plynového horáka dôjde k šíreniu horenia plameňom, alebo tlením. Ak dôjde k šíreniu po dĺžke čiary aspoň 200 mm v priebehu stanoveného času, uskutoční sa následne kompletný testový program na stanovenie rýchlosti horenia.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓDY**1.6.1. Predbežný skríningový test**

Látka sa sformuje do neprerušeneho prúžku alebo práškovej čiary v dĺžke asi 250 mm, so šírkou 20 mm a výškou 10 mm na nehorľavej (ohňovzdornej), nepórovitej podkladovej doske s nízkou tepelnou vodivosťou.

K jednému koncu práškovej čiary sa priloží horúci plameň plynového horáka (s minimálnym priemerom 5 mm) a podrží sa, kým sa prášok nezapáli (nevznieti), alebo počas maximálne 2 minút (5 minút v prípade kovových práškov alebo práškov kovových zliatin). Treba sledovať, či sa horenie rozšíri po dĺžke 200 mm práškovej čiary v priebehu štvorminútovej testovej periódy (alebo 40-minútovej periódy v prípade kovových práškov). Ak sa látka nezapáli a spaľovanie sa nerozšíri buď horením plameňom, alebo tlením po dĺžke 200 mm práškovej čiary v priebehu štvorminútovej (alebo 40-minútovej) testovej periódy, príslušná testovaná látka sa nepovažuje za vysokohorľavú, v takom prípade sa nepožaduje jej ďalšie testovanie. Ak sa horenie látky rozšíri po 200 mm dĺžke práškovej čiary za čas kratší ako 4 minúty alebo za čas kratší ako 40 minút v prípade kovových práškov, treba uskutočniť postup uvedený v nasledujúcom texte (bod 1.6.2 a nasledujúce body).

1.6.2. Test rýchlosti horenia

1.6.2.1. Príprava

Práškové alebo granulované testované látky sa zvoľna nasypú do formy v dĺžke 250 mm s trojuholníkovitým prierezom s vnútornou výškou 10 mm a šírkou 20 mm. Na oboch stranách formy sú v pozdĺžnom smere namontované dve kovové lišty, ktoré slúžia ako bočné ohraničenie a ktoré prečnievajú 2 mm ponad vrchný okraj trojuholníkovitého prierezu (pozri obrázok). Forma sa potom zdvihne do výšky 2 cm a trikrát za sebou sa pustí, aby dopadla na tvrdý podklad, čím sa prášok utrasie. Ak je to potrebné, forma sa znova doplní práškom. Bočné kovové lišty sa potom odstránia a prebytočná testovaná látka (vo forme prášku) sa zhrnie. Na vrchnú stranu formy sa potom položí nehorľavá (ohňovzdorná), nepórovitá podkladová doska s nízkou tepelnou vodivosťou, prístroj sa obráti spodnou časťou navrch a forma sa odstráni.

Pastovité látky sa nanesú vo forme črievka s dĺžkou 250 mm a s prierezom s plochou približne 1 cm² na nehorľavú (ohňovzdornú), nepórovitú podkladovú dosku s nízkou tepelnou vodivosťou.

1.6.2.2. Podmienky skúšania

V prípade látky, ktorá je citlivá na vlhkosť, sa musí test uskutočniť v čo najkratšom čase po vyňatí látky z obalu.

1.6.2.3. Realizácia testu

Umiestnite hranicu z práškovej testovanej látky do digestora priečne na smer prúdenia vzduchu.

Rýchlosť prúdenia vzduchu musí byť dostatočná na to, aby sa zabránilo úniku spalín do ovzdušia laboratória, a počas testu by sa nemala meniť. Okolo prístroja by mala byť postavená protiprievanová zástena.

Hranica z práškovej testovanej látky sa na jednom konci zapáli pomocou horúceho plameňa plynového horáka (minimálny priemer 5 mm). Keď hranica prehorela vzdialenosť 80 mm, na úseku ďalších 100 mm sa zmeria rýchlosť horenia. Test sa opakuje šesťkrát, pokiaľ sa pozitívny výsledok nezaregistroval už skôr, pričom zakaždým sa použije čistá a chladná podkladová doska.

2. ÚDAJE

Na vyhodnotenie je smerodajný čas horenia z predbežného skríningového testu (1.6.1) a najkratší čas horenia z maximálne šiestich opakovaní hlavného testu (1.6.2.3).

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- opis látky určenej na testovanie, jej fyzikálny stav vrátane obsahu vlhkosti,
- výsledky z predbežného skríningového testu a z testu rýchlosti horenia, ak sa tento test tiež uskutočnil,
- všetky doplňujúce poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Práškovité, granulované alebo pastovité látky treba považovať za veľmi horľavé, ak čas horenia v každom teste uskutočnenom podľa skúšobného postupu opísaného v 1.6.2 je kratší ako 45 sekúnd. Kovové prášky alebo prášky kovových zliatin sa považujú za vysokohorľavé, keď sa dajú zapáliť a ak sa plameň alebo zóna reakcie rozšíri po celej dĺžke vzorky za 10 minút alebo za kratší čas.

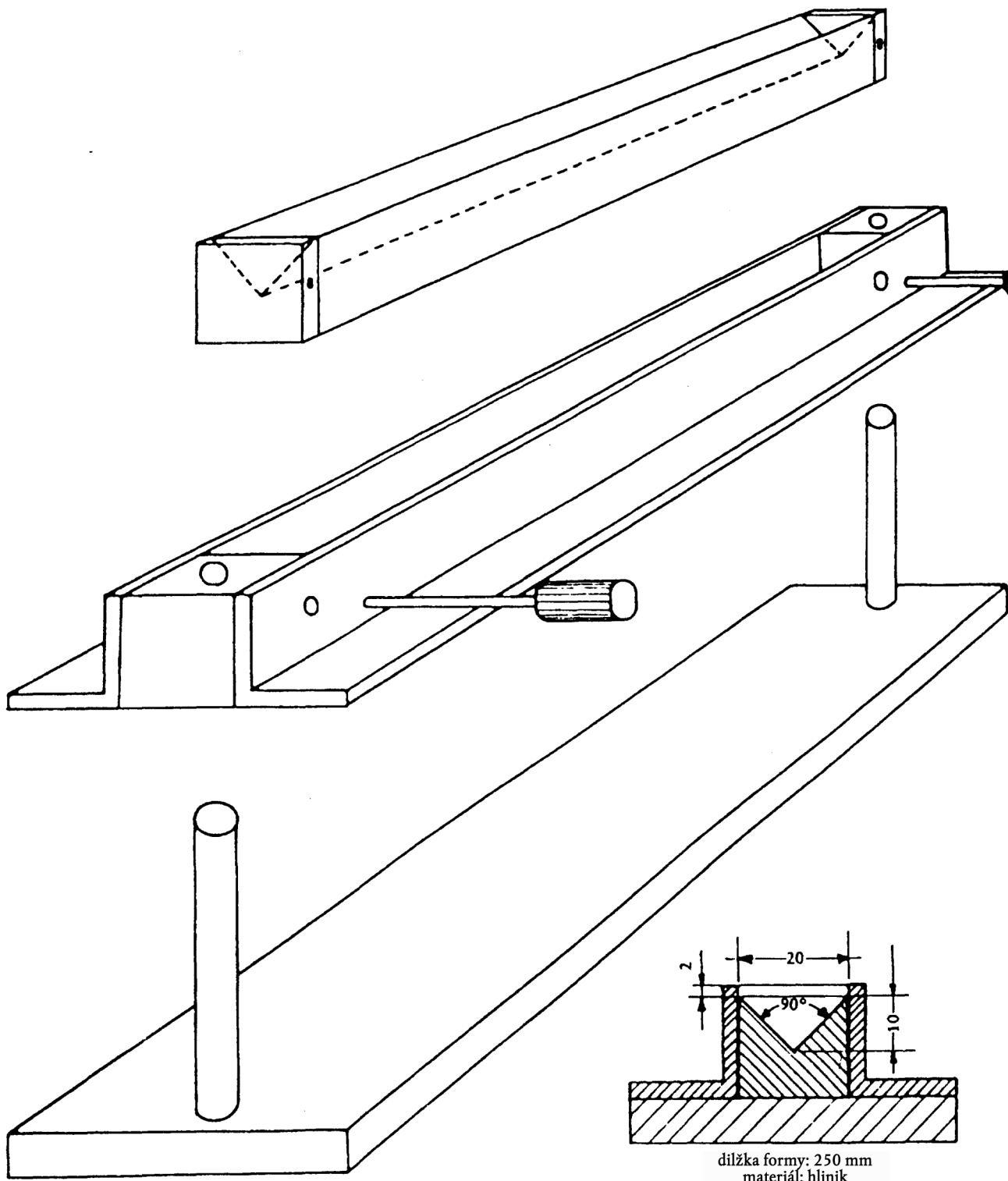
4. ODKAZY

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

Dodatok

Obrázok

Forma a príslušenstvo na prípravu hranice z praškovitej testovanej látky
(všetky rozmery sa uvádzajú v milimetroch)



A.11. HORĽAVOSŤ (PLYNY)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Táto metóda umožňuje stanovenie toho, či sú plyny zmiešané so vzduchom pri teplote miestnosti (približne 20 °C) a pri atmosférickom tlaku horľavé, a ak áno, v akom rozsahu koncentrácií. Zmesi s narastajúcimi koncentraciami plynu vo vzduchu sú vystavené elektrickej iskre a sleduje sa, či dôjde k zapáleniu (vzplanutiu).

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Rozsah zápalnosti je rozmedzie koncentrácie medzi dolnou a hornou medzou výbušnosti. Dolná a horná medza výbušnosti predstavuje tie medzné hodnoty koncentrácie horľavého plynu v prímеси so vzduchom, pri ktorých sa neobjavuje šírenie plameňa.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Koncentrácia plynu vo vzduchu sa postupne zvyšuje a zmes je vystavená pri každej koncentrácii elektrickej iskre.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓDY**1.6.1. Prístroje**

Testovacou nádobou je stĺpcovitý sklený valec s minimálnym vnútorným priemerom 50 mm a s minimálnou výškou 300 mm. Zapaľovacie elektródy sú oddelené vzdialenosťou 3 mm až 5 mm a sú umiestnené vo výške 60 mm nad dnom valca. Valec je opatrený otvorom na znižovanie tlaku. Prístroj musí byť chránený krytom, aby sa obmedzili akékoľvek škody spôsobené výbuchom.

Ako zapaľovací zdroj sa používa stojatá indukovaná iskra s 0,5-sekundovým trvaním, ktorá je generovaná z vysokonapäťového transformátora s výstupným koncovým napätím 10 až 15 kV (maximálny príkon 300 W). Príklad vhodného použiteľného prístroja je opísaný v odkazoch (2).

1.6.2. Podmienky skúšania

Test sa musí uskutočniť pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

1.6.3. Realizácia testu

S použitím dávkovacích čerpadiel sa do skleného valca napustí známa koncentrácia plynu vo vzduchu. Cez zmes sa nechá prelieť iskra a sleduje sa, či sa zo zapaľovacieho zdroja oddelí plameň a začne sa nezávisle šíriť, alebo nie. Koncentrácia plynu sa mení, resp. zvyšuje postupne po jednom objemovom percente, až kým nedôjde k zapáleniu zmesi podľa vyššie uvedeného opisu.

Ak štruktúra plynu naznačuje, že daný plyn je pravdepodobne nehorľavý a že sa dá vypočítať stechiometrická zmes so vzduchom, treba v jednopercentných krokoch testovať iba zmesi v rozmedzí od 10 % pod stechiometrickou koncentráciou do 10 % nad touto koncentráciou.

2. **ÚDAJE**

Šírenie plameňa je jediným relevantným informačným údajom na stanovenie tejto vlastnosti.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- opis použitého prístroja s uvedenými rozmermi,
- teplotu, pri ktorej sa test uskutočnil,
- testované koncentrácie a získané výsledky,
- výsledok testu: nehorľavý alebo mimoriadne horľavý plyn,
- ak sa dospelo k záveru, že testovaný plyn je nehorľavý, treba uviesť rozsah koncentrácií, v rámci ktorého bol testovaný v 1 % krokoch,
- musia byť uvedené všetky informácie a poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

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

A.12. HORLAVOSŤ (KONTAKT S VODOU)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Táto testovacia metóda sa môže použiť na stanovenie toho, či reakcia testovanej látky s vodou alebo vlhkým vzduchom vedie k vyvíjaniu nebezpečných množstiev plynu alebo plynov, ktoré môžu byť mimoriadne horľavé.

Testovacia metóda sa môže použiť pre tuhé, ako aj kvapalné látky. Táto metóda sa nedá použiť pre látky, ktoré sa spontánne zapália (vznecujú) pri kontakte so vzduchom.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Mimoriadne horľavé: látky, ktoré v kontakte s vodou alebo vzdušnou vlhkosťou uvoľňujú mimoriadne horľavé plyny v nebezpečných množstvách pri minimálnej rýchlosti 1 liter/kg za hodinu.

1.3. PRINCÍP METÓDY

Látka sa testuje podľa poradia krokov opísaných v nasledujúcich odsekoch. Ak v rámci ktoréhokoľvek kroku dôjde k zapáleniu (vznieteniu), ďalšie testovanie už nie je potrebné. Ak je známe, že testovaná látka nereaguje búrlivo s vodou, možno postúpiť rovno ku kroku 4 (1.3.4).

1.3.1. Krok 1

Testovaná látka sa umiestni do vaničky obsahujúcej destilovanú vodu pri teplote 20 °C a sleduje sa, či sa uvoľnený plyn zapáli (vznieti), alebo nie.

1.3.2. Krok 2

Testovaná látka sa umiestni pri teplote 20 °C na filtračný papier plávajúci na hladine destilovanej vody v nádobe a sleduje sa, či sa uvoľnený plyn zapáli (vznieti), alebo nie. Filtračný papier slúži výlučne na to, aby sa testovaná látka udržiavala na jednom mieste na účely zvýšenia pravdepodobnosti zapálenia (vznietenia) látky.

1.3.3. Krok 3

Z testovanej látky sa urobí kôпка približne 2 cm vysoká, s priemerom 3 cm. Do kôpky sa pridá niekoľko kvapiek vody a sleduje sa, či sa uvoľnený plyn zapáli (vznieti), alebo nie.

1.3.4. Krok 4

Testovaná látka sa zmieša s destilovanou vodou pri teplote 20 °C a rýchlosť uvoľňovania plynu sa meria sedem hodín, vždy v jedn hodinových intervaloch. Ak je rýchlosť uvoľňovania plynu po uplynutí siedmich hodín nestála alebo narastá, čas merania možno predĺžiť na maximálny čas piatich dní. Test možno kedykoľvek zastaviť, ak rýchlosť uvoľňovania plynu prekročí hodnotu 1 liter/kg za hodinu.

1.4. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓD

1.6.1. **Krok 1**1.6.1.1. *Podmienky skúšania*

Test sa uskutočňuje pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

1.6.1.2. *Realizácia testu*

Malé množstvo testovanej látky (s priemerom približne 2 mm) sa umiestni do vaničky obsahujúcej destilovanú vodu. Treba sledovať a zaznamenať, či (i) sa vôbec nejaký plyn uvoľnil (ii) a došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu. Ak došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu, tak už nie je potrebné ďalšie testovanie látky, pretože látka sa týmto považuje za nebezpečnú.

1.6.2. **Krok 2**1.6.2.1. *Prístroje*

Filtračný papier sa naplocho položí na hladinu destilovanej vody naliatú do vhodnej nádoby, napr. do odparovacej misky s priemerom 100 mm.

1.6.2.2. *Podmienky skúšania*

Test sa uskutočňuje pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

1.6.2.3. *Realizácia testu*

Malé množstvo testovanej látky (s priemerom približne 2 mm) sa umiestni do stredu filtračného papiera. Treba sledovať a zaznamenať, či (i) sa vôbec nejaký plyn uvoľnil a či (ii) došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu. Ak došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu, tak už nie je potrebné ďalšie testovanie látky, pretože látka sa týmto považuje za nebezpečnú.

1.6.3. **Krok 3**1.6.3.1. *Podmienky skúšania*

Test sa uskutočňuje pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

1.6.3.2. *Realizácia testu*

Z testovanej látky sa urobí kôпка približne 2 cm vysoká, s priemerom 3 cm, s vrúbkovaním na vrcholku kôpky. Pridá sa niekoľko kvapiek vody a sleduje sa a zaznamenáva, či (i) sa vôbec nejaký plyn uvoľnil a či (ii) došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu. Ak došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu, tak už nie je potrebné ďalšie testovanie látky, pretože látka sa týmto považuje za nebezpečnú.

1.6.4. **Krok 4**1.6.4.1. *Prístroje*

Prístroj je zostavený podľa nákresu na obrázku.

1.6.4.2. *Podmienky skúšania*

Skontrolujte testovanú látku v prepravnom obale z hľadiska prítomnosti prášku s veľkosťou častíc < 500 µm. Ak prášok tvorí viac ako 1 % hmotnosti alebo ak je vzorka drobivá, tak pred uskutočnením testu sa musí celé množstvo látky rozomlieť na prach vzhľadom na redukciu veľkosti častíc počas skladovania a manipulácie. V ostatných prípadoch sa látka testuje v takom stave, v akom ju dostali. Test sa musí uskutočniť pri teplote miestnosti (približne 20 °C) a pri normálnom atmosférickom tlaku.

1.6.4.3. Realizácia testu

Do odkvapkávajúceho lievika prístroja sa pridá 10 až 20 ml vody a do Erlenmeyerovej banky sa pridá 10 g testovanej látky. Objem uvoľneného plynu sa dá merať akýmkoľvek vhodným prostriedkom. Kohútik oddelovacieho lievika sa otvorí, aby sa voda dostala do Erlenmeyerovej banky, a zároveň sa zapnú stopky. Uvoľňovanie plynu sa meria každú hodinu počas siedmich hodín. Ak je počas tohto času uvoľňovanie plynu nestále (kolísavé) alebo ak po uplynutí tohto času uvoľňovanie plynu ešte narastá, meranie môže pokračovať ešte maximálne päť dní. Ak v ktoromkoľvek čase rýchlosť uvoľňovania plynu prekročí hodnotu 1 liter/kg/hodinu, test možno zastaviť. Tento test sa musí trojnásobne zopakovať.

Ak je identita plynu neznáma, plyn sa musí analyzovať. Keď plyn obsahuje mimoriadne horľavé zložky a nie je známe, či je celá zmes mimoriadne horľavá, je potrebné pripraviť zmes toho istého zloženia a potom ju testovať podľa metódy A.11.

2. ÚDAJE

Testovaná látka sa považuje za nebezpečnú, ak:

- dôjde k spontánnemu zapáleniu (vznieteniu) počas ktoréhokoľvek kroku skúšobného postupu alebo
- dochádza k uvoľňovaniu horľavého (vznetlivého) plynu pri rýchlosti (miere) väčšej ako 1 liter/kg látky za hodinu.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

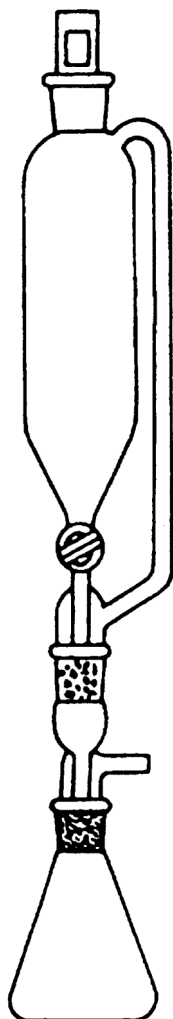
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- podrobnosti o akejkoľvek počiatočnej príprave testovanej látky,
- výsledky testu (kroky 1, 2, 3 a 4),
- identifikáciu uvoľneného plynu,
- rýchlosť (mieru) uvoľňovania plynu, ak sa uskutočňuje krok 4 (1.6.4),
- všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. ODKAZY

- (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.

*Dodatok***Obrázok**

Prístroj



A.13. SAMOZÁPALNÉ VLASTNOSTI TUHÝCH LÁTKO A KVAPALÍN**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Postup testu sa dá použiť pre tuhé alebo kvapalné látky, ktoré sa v malých množstvách samovoľne vznietia krátky čas po tom, čo sa dostali do kontaktu so vzduchom pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

Látky, ktoré musia byť vystavené pôsobeniu vzduchu počas niekoľkých hodín alebo dní pri teplote miestnosti alebo pri zvýšenej teplote, kým dôjde k ich vznieteniu, nie sú pokryté touto testovacou metódou.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Látky so sklonom k samovznieteniu sa považujú za také vtedy, ak sa vznietia alebo spôsobia zuhoľnatie za podmienok opísaných v 1.6.

Môže byť potrebné testovať aj samozápalnosť kvapalín použitím metódy A.15. Teplota samovznietenia (kvapalín a plynov).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Testovaná látka, či už tuhá, alebo kvapalná, sa pridá do inertnej nosnej látky a vystaví sa kontaktu so vzduchom pri teplote okolitého prostredia na päť minút. Ak sa kvapalné látky nevznietia, tak sa absorbujú do filtračného papiera a vystavia sa pôsobeniu vzduchu pri teplote okolitého prostredia (približne 20 °C) na päť minút. Ak sa testovaná tuhá látka alebo kvapalina vznieti alebo ak kvapalina zapáli alebo zuhoľnatí filtračný papier, testovaná látka sa považuje za látku so sklonom k samovznieteniu.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Opakovateľnosť: z bezpečnostných dôvodov na potvrdenie sklonu samovznietenia testovanej látky postačí jediný pozitívny výsledok.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Prístroje**

Porcelánová miska s priemerom približne 10 cm sa naplní kremelinou do výšky asi 5 mm pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

Poznámka:

Kremelinu alebo akúkoľvek inú porovnateľnú inertnú látku, ktorá je bežne k dispozícii, treba považovať za látku zastupujúcu zemínu, na ktorú sa v prípade nehody testovaná látka môže roztrieštiť.

Suchý filtračný papier sa požaduje na testovanie kvapalín, ktoré sa nevznietia pri kontakte so vzduchom, keď sú v kontakte s inertnou nosnou látkou.

1.6.2. Realizácia testu**a) Práškové tuhé látky**

Množstvo 1 až 2 cm³ práškovej látky určenej na testovanie sa nasype z výšky približne 1 metra na nehorľavý (ohňovzdorný) povrch a sleduje sa, či sa testovaná látka vznieti počas pádu alebo v priebehu piatich minút po spočínutí na nehorľavom povrchu.

Test sa opakuje šesťkrát za sebou, pokiaľ nedôjde k vznieteniu testovanej látky.

b) Kvapaliny

Približne 5 cm³ kvapaliny určenej na testovanie sa naleje do pripravenej porcelánovej misky a sleduje sa, či sa testovaná látka vznieti v priebehu piatich minút.

Ak v rámci šiestich opakovaných testov nedôjde k vznieteniu testovanej látky, treba vykonať nasledujúci test:

Testovaná vzorka s objemom 0,5 ml sa nanesie injekčnou striekačkou na zvlhnený filtračný papier a sleduje sa, či dôjde k zapáleniu, alebo zuhoľnateniu filtračného papiera v priebehu piatich minút od pridania testovanej kvapaliny. Test sa opakuje trikrát za sebou, pokiaľ nedôjde k zapáleniu alebo zuhoľnateniu.

2. ÚDAJE**2.1. PRÁCA S VÝSLEDKAMI**

Testovanie môže byť zastavené, len čo sa v ktoromkoľvek čiastkovom teste objaví pozitívny výsledok.

2.2. VYHODNOTENIE

Ak sa testovaná látka vznieti v priebehu piatich minút po pridaní do inertnej nosnej látky a vystavení pôsobeniu vzduchu alebo ak kvapalná testovaná látka zuhoľnatie alebo zapáli filtračný papier po jej pridaní na toto médium a po vystavení pôsobeniu vzduchu, tak sa považuje za samozápalnú.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- výsledky testov,
- všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. ODKAZY

- (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. VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Metóda schematicky opisuje spôsob testovania na účely stanovenia, či tuhá alebo pastovitá látka predstavuje nebezpečenstvo výbuchu, keď je vystavená účinku plameňa (citlivosť na teplo) alebo nárazu, alebo treniu (citlivosť na mechanické podnety), a či kvapalná látka predstavuje nebezpečenstvo výbuchu, keď je vystavená účinku plameňa alebo nárazu.

Metóda pozostáva z troch častí:

- a) testu citlivosti na teplo (1);
- b) testu citlivosti na mechanické podnety vo forme nárazu (1);
- c) testu citlivosti na mechanické podnety vo forme trenia (1).

Metóda poskytuje údaje na zhodnotenie a stanovenie pravdepodobnosti vyvolania výbuchu určitými bežnými podnetmi. Metóda nie je určená na zisťovanie skutočnosti, či určitá látka je schopná výbuchu za akýchkoľvek podmienok.

Metóda je vhodná na stanovenie toho, či príslušná látka bude predstavovať nebezpečenstvo výbuchu (citlivosť na teplo a mechanické podnety) za konkrétnych podmienok špecifikovaných v smernici. Je založená na celom rade typov prístroja, ktoré sa vo veľkej miere používajú medzinárodne (1) a ktoré dávajú účelné a jednoznačné výsledky. Platí však všeobecný názor, že metóda nie je definitívna. Ako alternatívu k špecifikovanému prístroju možno použiť aj iné prístroje, avšak za predpokladu, že tieto sú medzinárodne uznané a že ich výsledky sa dajú adekvátne zosúladiť s príslušnými výsledkami získanými pomocou špecifikovaného prístroja.

Testy sa nemusia uskutočniť, ak existujúce termodynamické informácie (napr. zlučovacie teplo, rozkladné teplo), resp. absencia určitých reaktívnych skupín (2) v štruktúrálom vzorci dôvodne potvrdzujú domnienku, že príslušná látka nie je schopná rýchleho rozkladu s tvorbou plynov alebo uvoľňovaním tepla (t. j. že materiál nepredstavuje žiadne riziko výbuchu). Pre kvapaliny sa nepožaduje test citlivosti na mechanické podnety vo forme trenia.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Výbušné látky:

Látky, ktoré v špecifikovanom prístroji môžu vybuchnúť účinkom plameňa alebo ktoré sú citlivé na nárazy alebo trenie (alebo sú citlivejšie na mechanické podnety než 1,3-dinitrobenzén v alternatívnom prístroji).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

1,3-dinitrobenzén, technický kryštalický produkt preosiaty na jemnosť častíc 0,5 mm pre metódu testovania citlivosti na trenie a nárazy.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazín (čiže RDX, hexogén, cyklonit – CAS 121-82-4), rekryštalizovaný z vodného cyklohexanónu, navlhko preosievajúci cez 250 µm a zachytávaný na 150 µm site a sušený pri teplote 103 ± 2 °C (počas 4 hodín) pre druhú sadu testov citlivosti na trenie a nárazy.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Predbežné testy sú potrebné na vytvorenie bezpečných podmienok na uskutočnenie hlavných troch testov citlivosti.

1.4.1. Testy bezpečnosti manipulácie (3)

Z bezpečnostných dôvodov sa pred uskutočnením hlavných testov veľmi malé vzorky (približne 10 mg) látky určenej na testovanie vystavia zahrievaniu bez obmedzenia v plynovom plameni v akejkoľvek vhodnej forme prístroja, nárazu udieraním kyjaničky o nákovu a treniu v akejkoľvek forme trecieho mechanizmu. Cieľom je zistiť, či predmetná látka je taká citlivá a výbušná, že predpísané testy citlivosti, obzvlášť test citlivosti na teplo, sa musia uskutočniť so zvláštnou opatrnosťou, aby sa zabránilo prípadnému zraneniu laboratórneho pracovníka.

1.4.2. Citlivosť na teplo

Metóda spočíva v zahrievaní testovanej látky v ocelevej rúre, uzavretej doštičkami s rozdielnymi priermi otvoru, na účely stanovenia, či má testovaná látka tendenciu vybuchovať v podmienkach intenzívneho tepla a definovaného obmedzenia.

1.4.3. Citlivosť na mechanické podnety (náraz)

Metóda spočíva vo vystavení testovanej látky nárazu spôsobeného telesom so špecifikovanou hmotnosťou, pusteného zo špecifikovanej výšky.

1.4.4. Citlivosť na mechanické podnety (trenie)

Metóda spočíva vo vystavení tuhých alebo pastovitých látok treniu medzi štandardnými povrchmi za špecifikovaných podmienok zaťaženia a relatívneho pohybu.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓDY**1.6.1. Citlivosť na teplo (účinnosť plameňa)****1.6.1.1. Prístroje**

Prístroj pozostáva z jednorazovo použiteľnej ocelevej rúry s opakovateľne použiteľným uzavieracím zariadením (obrázok 1), inštalovanej do zahrievacieho a ochranného zariadenia. Každá rúra je zhotovená z hlbokoťažného oceleového plechu (pozri dodatok) a má vnútorný priemer 24 mm, dĺžku 75 mm a hrúbku steny 0,5 mm. Rúry sú na otvorenom konci upravené prírubou tak, aby sa umožnilo ich uzavretie zostavou uzáveru. Zostava uzáveru pozostáva z tlakuvzdornej doštičky s otvorom uprostred, tesne primknutej k rúre použitím dvojdielného závitového spoja (matice a závitového goliera, okružia). Matica aj závitový golier sú vyrobené z chrómmangánovej ocele (pozri dodatok), ktorá je neiskrivá až do teploty 800 °C. Doštičky majú hrúbku 6 mm, sú vyrobené zo žiaruvzdornej ocele (pozri dodatok) a sú k dispozícii s rozličnými priermi otvorov.

1.6.1.2. Podmienky skúšania

Za normálnych okolností sa látka testuje v takom stave, v akom ju dostali, hoci v niektorých prípadoch, napr. ak bola zlisovaná, liata alebo iným spôsobom kondenzovaná, je potrebné ju pred testovaním rozdrviť.

V prípade tuhých látok množstvo materiálu, ktoré sa má použiť v každom teste, sa stanoví použitím predbežného prípravného postupu „nasucho“. Dechtovaná rúra sa naplní množstvom 9 cm³ testovanej látky, látka sa potom ubije silou 80 N vyvinutou na celý priečny profil rúry. Z bezpečnostných dôvodov alebo v prípade, kde fyzikálna forma látky môže byť zmenená tlakom, sa môžu použiť iné postupy jej plnenia do rúry, napr. ak je testovaná látka nadmerne citlivá na trenie, ubíjanie nepredstavuje vhodný postup. Ak je materiál stlačiteľný, pridá sa ho viac a potom sa ubíja dovtedy, kým v rúre nedosiahne úroveň 55 mm od vrchnej časti. Stanoví sa celkové množstvo použité na naplnenie rúry do výšky 55 mm od jej vrchnej časti a pridajú sa dve ďalšie doplnkové množstvá, každé ubité silou 80 N. Podľa potreby sa potom materiál ešte pridá ubíjaním alebo sa z neho odoberie tak, aby bola rúra naplnená do výšky 15 mm od jej vrchnej časti. Uskutoční sa druhé prípravné kolo „nasucho“, počnúc ubitým množstvom predstavujúcim jednu tretinu celkovej hmotnosti zistenej v prvom kole. Pri ubíjaní silou 80 N sa pridajú dve ďalšie doplnkové množstvá a podľa potreby pridaním alebo odobratím materiálu sa upraví jeho úroveň na výšku 15 mm od vrchnej časti rúry. Množstvo tuhej látky stanovené v druhom prípravnom kole „nasucho“ sa potom použije pre každý pokus. Plnenie sa uskutoční s tromi rovnakými množstvami, pričom každé sa stlačí na objem 9 cm³ vyvinutím takej sily, aká je na to potrebná. (Postup sa dá uľahčiť použitím rozperných krúžkov.)

Kvapaliny a gély sa umiestnia do rúry do výšky 60 mm, pričom pri géloch treba dávať veľký pozor na to, aby sa zabránilo tvorbe dutín v materiáli. Zospodu sa na rúru nasunie závitový golier (okružie), priloží sa doštička s potrebnou veľkosťou otvoru uprostred a po pridaní malého množstva lubrikantu na báze sírnika molybdeničitého sa naplno utiahne matica. Je dôležité skontrolovať, či nezostali zvyškové množstvá testovanej látky zachytené medzi prírubou a doštičkou alebo v závitoch.

Zohrievanie je zabezpečené propánom odoberaným z priemyselnej tlakovej fľaše, ktorá je vybavená regulátorom tlaku (60 až 70 milibarov), cez merací prístroj (plynomer) a rovnomerne distribuovaným (ako to potvrdzuje vizuálne pozorovanie plameňov vychádzajúcich z horákov) rozdeľovacím potrubím k štyrom horákam. Horáky sú rozmiestnené okolo skúšobnej komory tak, ako je to znázornené na obrázku 1 v dodatku. Štyri horáky majú celkovú spotrebu asi 3,2 litra propánu za minútu. Môžu sa použiť aj alternatívne vykurovacie plyny a horáky, ale rýchlosť ohrevu musí zodpovedať špecifikácii na obrázku 3. Pre všetky prístroje sa musí rýchlosť ohrevu periodicky kontrolovať použitím skúmaviek naplnených dibutylftalátom, ako je to znázornené na obrázku 3.

1.6.1.3. Realizácia testov

Každý test sa vykonáva dovtedy, pokiaľ sa každá rúra neroztriešti, alebo sa zahrieva až päť minút. Test s výsledným roztrieštením rúry na tri alebo viacero kusov, ktoré môžu byť v niektorých prípadoch spojené úzkymi páskami kovu, ako je to znázornené na obrázku 2, sa vyhodnocuje ako výbuch. Test, ktorého výsledkom je menej trieštivých úlomkov, alebo test, v rámci ktorého nedošlo vôbec k roztriešteniu rúry, sa považuje za test bez výsledného výbuchu.

Najprv sa uskutoční séria troch testov s uzáverovými doštičkami s priemerom otvorov 6,0 mm, a ak nedôjde k výbuchu, uskutoční sa druhá séria troch testov s uzáverovými doštičkami s priemerom otvorov 2,0 mm. Ak dôjde k výbuchu v oboch sériách testov, realizácia ďalších testov sa už nepožaduje.

1.6.1.4. Vyhodnotenie

Výsledok testu sa považuje za pozitívny, ak dôjde k výbuchu v oboch horeuvedených sériách testov.

1.6.2. Citlivosť na mechanické podnety (náraz)

1.6.2.1. Prístroje (obrázok 4)

Hlavné časti typického prístroja s padacím bucharom pozostávajú z oceľovoliatinového bloku s podkladom, nákovy, stojanu, vodiacich líst, padacích závaží, spúšťacieho mechanizmu a držiaka na vzorky. Oceľová nákova 100 mm (priemer) x 70 mm (výška) je priskrutkovaná k vrchnej strane oceľového bloku 230 mm (dĺžka) x 250 mm (šírka) x 200 mm (výška) s liatym podkladom 450 mm (dĺžka) x 450 mm (šírka) x 60 mm (výška). Stojan vyrobený z bezšvovej rúry z ťahanej ocele je upevnený v držiaku priskrutkovanom na zadnú časť oceľového bloku. Štyri skrutky zakotvujú prístroj k masívnemu betónovému kotevnému bloku s rozmermi 60 cm x 60 cm x 60 cm tak, aby vodiace líšty boli v absolútne vertikálnej polohe a aby padacie závažia po uvoľnení padalo voľne. Na použitie sú vhodné 5 kg a 10 kg závažia vyrobené z plnej ocele. Nárazová hlava každého závažia je zhotovená z kalenej ocele, HRC 60 až 63, a má minimálny priemer 25 mm.

Vzorka určená na testovanie je uzavretá v nárazovom mechanizme, ktorý pozostáva z dvoch koaxiálnych plných oceľových valcov umiestnených nad sebou v dutom valcovitom oceľovom vodiacom prstenci. Plné oceľové valce musia mať priemer 10 (- 0,003, - 0,005) mm a výšku 10 mm, musia mať leštený povrch, zaoblené hrany (polomer oblúku 0,5 mm) a tvrdosť HRC 58 až 65. Dutý valec musí mať vonkajší priemer 16 mm, leštené vrtanie s vnútorným priemerom 10 (+ 0,005, + 0,010) mm a výšku 13 mm. Nárazový mechanizmus je namontovaný na vložení nákovu (priemer 26 mm a výška 26 mm) zhotovenú z ocele a centrovanú prstencom s perforáciami, aby sa umožnil únik spalín.

1.6.2.2. Podmienky skúšania

Vzorka by mala mať objem 40 mm³ alebo objem, ktorý je vhodný pre alternatívny prístroj. Tuhé látky by sa mali testovať v suchom stave a mali by byť pripravené týmito spôsobmi:

- a) práškové látky sa preosievajú (číslo sita 0,5 mm). Všetok materiál, ktorý prepadol cez sito, sa použije na skúšobné účely;
- b) lisované, liate alebo iným spôsobom kondenzované látky sa rozdrvia na malé kúsky a preosejú sa. Na účely testovania sa použije frakcia zŕn s priemerom od 0,5 mm do 1 mm a mala by reprezentovať pôvodnú látku.

Látky, ktoré sa normálne dodávajú ako pasty, by sa mali v prípadoch, keď je to možné, testovať v suchom stave alebo v každom prípade po odstránení maximálne možného množstva riedidla, resp. rozpúšťadla. Kvapalné látky sa testujú s 1 mm medzerou medzi vrchným a spodným oceľovým valcom.

1.6.2.3. Realizácia testov

Vykoná sa séria šiestich testov s 10 kg padacím závažím púšťaným z výšky 0,40 m (40 J). Ak počas šiestich testov pri sile nárazu 40 J dôjde k výbuchu, treba pokračovať sériou ďalších šiestich testov s 5 kg padacím závažím púšťaným z výšky 0,15 m (7,5 J). V inom prístroji sa testovaná vzorka porovnáva so zvolenou referenčnou látkou použitím zavedeného postupu (napr. striedavou technikou „up and down“ atď.).

1.6.2.4. Vyhodnotenie

Výsledok testu sa považuje za pozitívny, ak dôjde k výbuchu (vyšľahnutie plameňa alebo úder sú ekvivalentné výbuchu) aspoň raz v niektorom z testov pri použití špecifikovaného nárazového prístroja alebo ak je testovaná vzorka citlivejšia ako 1,3-dinitrobenzén alebo RDX v alternatívnom teste citlivosti na náraz.

1.6.3. Citlivosť na mechanické podnety (trenie)

1.6.3.1. Prístroje (obrázok 5)

Trecí prístroj pozostáva z oceľovoliatinovej podkladovej dosky, na ktorú je namontovaný trecí mechanizmus. Tento sa skladá z fixovaného porcelánového kolíka a pohyblivej porcelánovej doštičky. Porcelánová doštička je nesená rámom, ktorý behá v dvoch vodiacich lištách. Rám je napojený na elektromotor ojnícou (spojovacou tyčou), excentrom a vhodným ozubeným prevodom tak, aby porcelánová doštička vykonala jednorazový pohyb späť a dopredu pod porcelánovým kolíkom na vzdialenosť 10 mm. Porcelánový kolík môže byť zaťažovaný silou napríklad 120 N alebo 360 N.

Ploché porcelánové doštičky sú vyrobené z bieleho technického porcelánu (hrúbka 9 µm až 32 µm) a majú rozmery 25 mm (dĺžka) x 25 mm (šírka) x 5 mm (výška). Valcovitý porcelánový kolík je takisto vyrobený z bieleho technického porcelánu a je 15 mm dlhý, má priemer 10 mm a zdrsené sférické koncové plochy s polomerom ohybu 10 mm.

1.6.3.2. Podmienky skúšania

Testovaná vzorka by mala mať objem 10 mm³ alebo objem, ktorý sa hodí pre alternatívny prístroj.

Tuhé látky sa testujú v suchom stave a sú pripravované týmito spôsobmi:

- a) práškové látky sa preosievajú (číslo sita 0,5 mm); všetok materiál, ktorý prepadol cez sito, sa použije na skúšobné účely;
- b) lisované, liate alebo iným spôsobom kondenzované látky sa rozdrvia na malé kúsky a preosejú sa; na účely testovania sa použije frakcia zŕn s priemerom <0,5 mm.

Látky, ktoré sa normálne dodávajú ako pasty, by sa mali v prípadoch, keď je to možné, testovať v suchom stave. Ak látka určená na testovanie nemôže byť pripravená v suchom stave, pasta (po odstránení maximálneho množstva rozpúšťadla) sa testuje ako 0,5 mm hrubý, 2 mm široký a 10 mm dlhý film pripravený pomocou formy.

1.6.3.3. Realizácia testov

Porcelánový kolík sa nasmeruje na testovanú vzorku a zaťaží sa. Počas uskutočňovania testu musia hubové rysy porcelánovej doštičky ležať priečne na smer pohybu. Treba dbať na to, aby porcelánový kolík spočíval priamo na testovanej vzorke, aby sa pod kolíkom nachádzalo dostatočné množstvo testovaného materiálu, a tiež na to, aby sa porcelánová doštička pod kolíkom pohybovala správnym spôsobom. V prípade pastovitých látok sa na aplikáciu testovanej látky na doštičku používa 0,5 mm hrubá šablóna s 2 x 10 mm drážkou. Porcelánová doštička musí vykonať pohyb v dĺžke 10 mm dopredu a späť pod porcelánovým kolíkom za 0,44 sekundy. Každá časť povrchu doštičky a kolíka sa smie použiť iba raz; dva konce každého kolíka teda poslúžia na dva pokusy a každý z dvoch povrchov doštičky poslúži na tri pokusy.

Séria šiestich testov sa uskutoční so zaťažením 360 N. Ak sa počas týchto šiestich testov dosiahne pozitívny výsledok, musí sa uskutočniť ďalšia séria šiestich testov so zaťažením 120 N. V inom prístroji sa vzorka porovnáva so zvolenou referenčnou látkou použitím zavedeného postupu (napr. striedavou technikou „up and down“ atď.).

1.6.3.4. Vyhodnotenie

Výsledok testu sa považuje za pozitívny, ak dôjde k výbuchu (praskanie a/alebo úder alebo vyšľahnutie plameňa sú ekvivalentné výbuchu) aspoň raz v niektorom z testov so špecifikovaným trecím prístrojom alebo ak tento výsledok zodpovedá ekvivalentným kritériám v alternatívnom teste citlivosti na trenie.

2. ÚDAJE

V zásade sa príslušná látka podľa smernice považuje za nebezpečnú z hľadiska výbušnosti vtedy, ak sa dosiahol pozitívny výsledok v rámci testu citlivosti na teplo, náraz alebo trenie.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- identifikáciu, zloženie, čistotu, obsah vlhkosti atď. testovanej látky,
- fyzikálnu formu vzorky a údaje o tom, či bola rozdrvená, nalámaná, resp. preosiata, alebo nie,
- pozorovania počas testov citlivosti na teplo (napr. hmotnosť vzorky, počet úlomkov atď.),
- pozorovania počas testov citlivosti na mechanické podnety (napr. tvorba značného množstva dymu alebo úplné rozloženie bez zvukového efektu, plamene, iskry, zvuková rana, praskanie atď.),
- výsledky z každého typu testu,
- ak sa použil alternatívny prístroj, musí sa podať vedecké zdôvodnenie, ako aj dôkaz korelácie medzi výsledkami dosiahnutými so špecifikovaným prístrojom a výsledkami dosiahnutými s ekvivalentným prístrojom,
- všetky nepostrádateľné poznámky ako odkazy na testy s podobnými produktmi, ktoré by mohli byť dôležité pre správnu interpretáciu výsledkov,
- všetky doplnkové poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA A VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Správa z testu by sa mala zmieniť o všetkých výsledkoch, ktoré sa považujú za chybné, zavádzajúce, anomálne alebo nereprezentatívne. Ak sa ktorýkoľvek z výsledkov anuluje, treba uviesť vysvetlenie a nahradiť ho výsledkom alternatívneho doplnkového testu. Pokiaľ sa anomálny výsledok nedá vysvetliť, musí sa akceptovať ako normálna hodnota a musí sa podľa toho aj použiť na klasifikovanie príslušnej testovanej látky.

4. ODKAZY

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

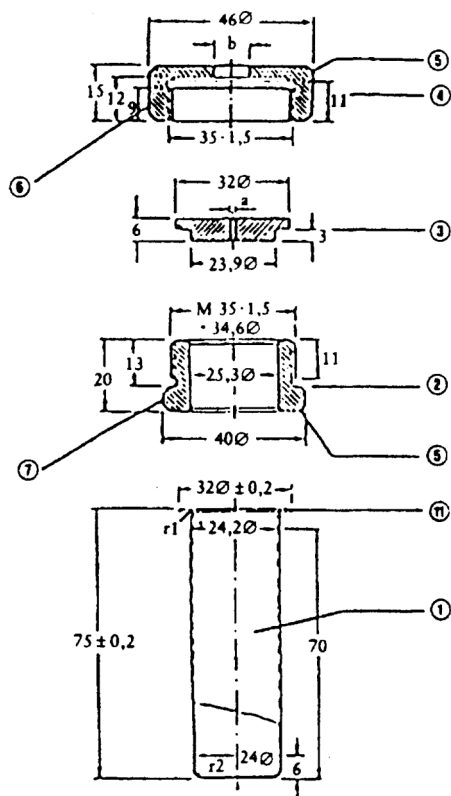
Dodatok

Príklad materiálovej špecifikácie pre test citlivosti na teplo (pozri technickú normu DIN 1623)

1. Rúra: materiálová špecifikácia č. 1.0336.505 g.
2. Uzáverová doštička s otvorom: materiálová špecifikácia č. 1.4873.
3. Závitový golier a matica: materiálová špecifikácia č. 1.3817.

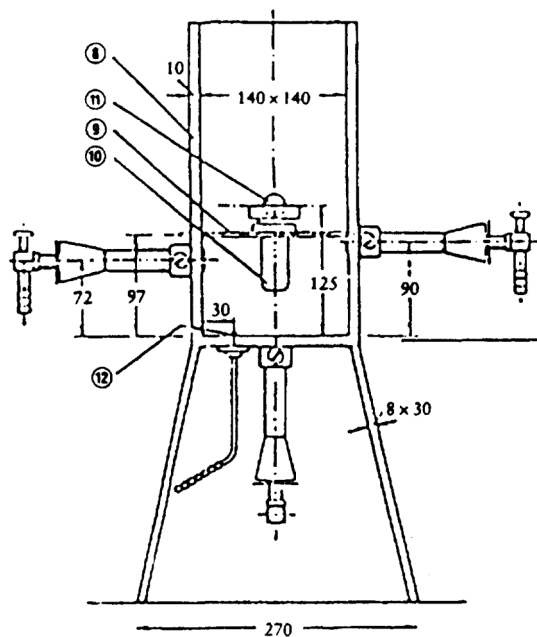
Obrázok 1

Testovací prístroj na stanovenie citlivosti na teplo
(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Obr. 1a Oceľová rúra a príslušenstvo

1. rúra
1. a) vonkajšia prírubu
2. závitový golier; závit s nízkym trením
3. uzáverová doštička s otvorom s priemerom $a = 2,0$ alebo $6,0$ mm
4. matica s otvorom s priemerom $b = 10$ mm
5. skosený povrch
6. 2 rovné plošky pre kľúč na matice veľkosti 41



Obr. 1b Zohrievacie a ochranné zariadenie

7. 2 rovné plošky pre kľúč na matice veľkosti 36
8. ochranné puzdro odolné voči črepinám
9. 2 oporné tyče pre rúru
10. zmontovaná rúra
11. poloha zadného horáka; ostatné horáky sú viditeľné
12. zapalovacia dýza

Obrázok 2

Test citlivosti na teplo

Príklady trieštenia



Žiadny výbuch



Žiadny výbuch



Výbuch



Výbuch



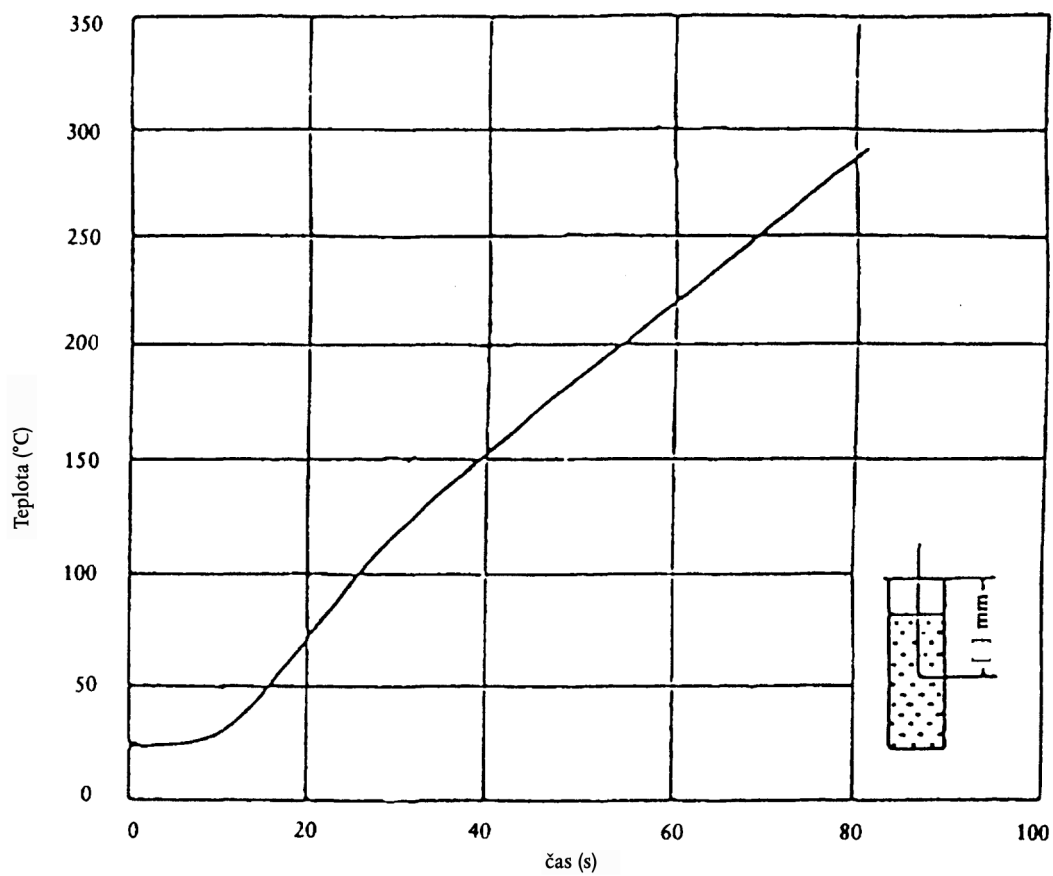
Výbuch



Výbuch

Obrázok 3

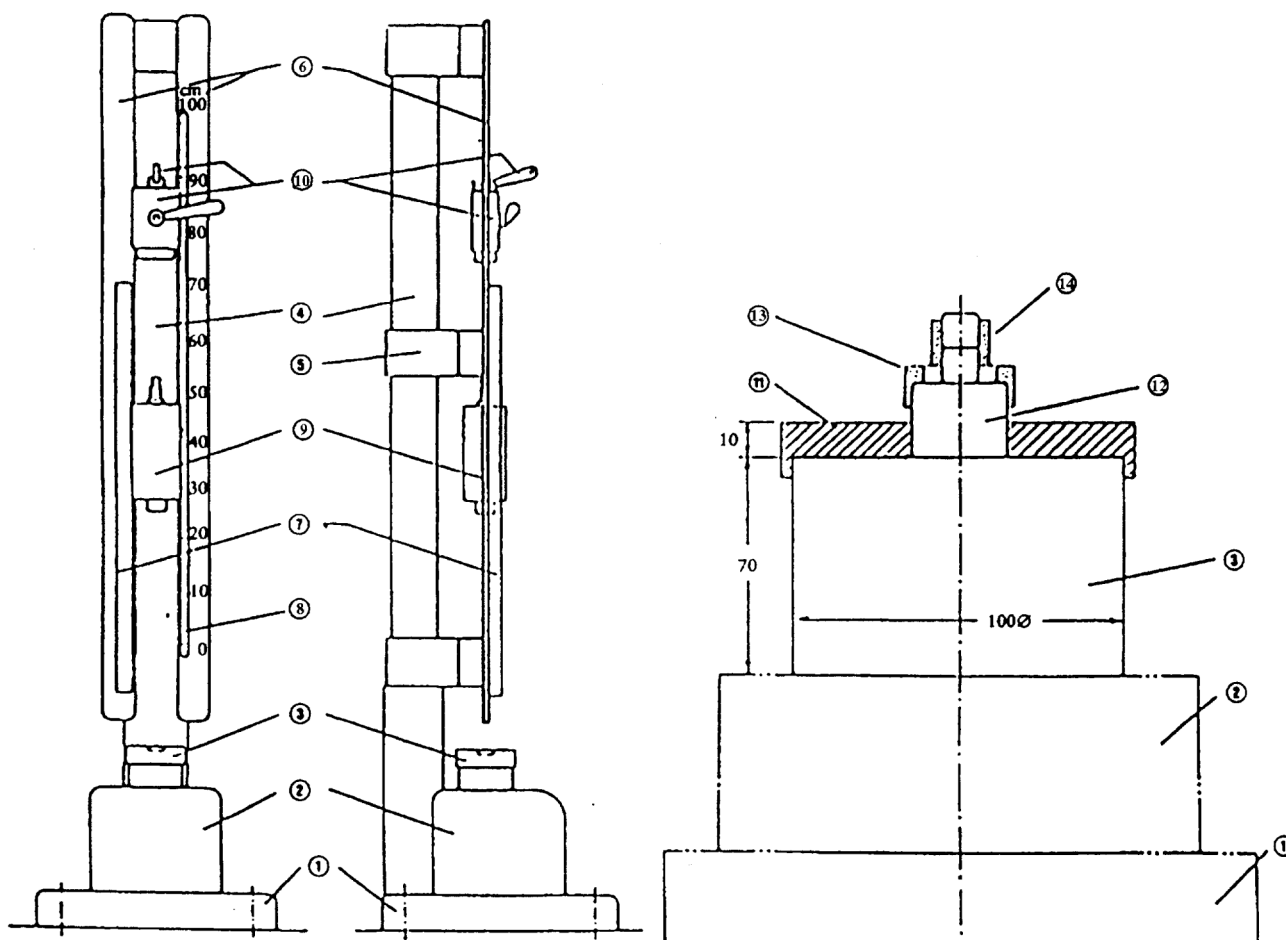
Kalibrácia rýchlosti ohrevu pre test citlivosti na teplo



Krivka teploty a času dosiahnutá zohrievaním dibutylftalátu (27 cm^3) v uzavretej rúre (uzáverová doštička s otvorom 1,5 mm) pri nastavení prietoku propánu na 3,2 l/min. Teplota sa meria Cr-Al termočlánkom s priemerom 1 mm uloženým v ochrannom plášti z nehrdzavejúcej ocele, umiestneným centrálne 43 mm pod okrajom rúry. Rýchlosť ohrevu medzi 135 °C a 285 °C by mala byť medzi 185 a 215 K/min.

Obrázok 4

Prístroj na testovanie citlivosti látok na náraz
(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Obr. 4a Padací buchar, nárys a bokorys, celkový pohľad.

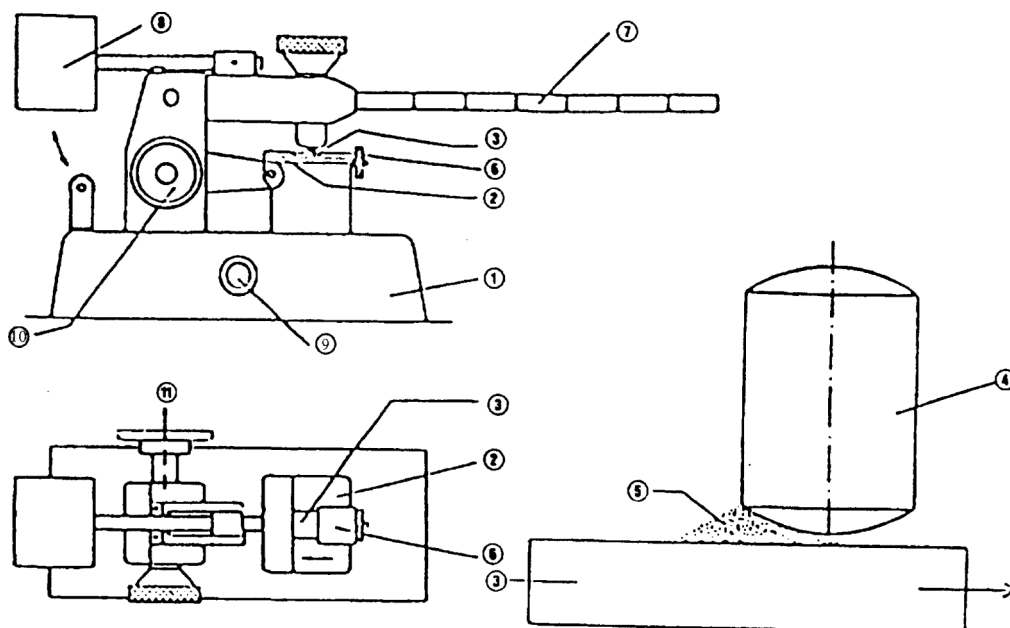
1. Základňa 450x450x60
2. Ocel'ový blok 230x250x200
3. Náková, Ø 100x70
4. Stojan
5. Stredná priečka
6. 2 vodiaca lišta
7. Ozubená tyč

Obr. č. 4b Padací buchar, spodná časť (detail).

8. Delená stupnica
9. Padací buchar
10. Upínacie spúšťačie zariadenie
11. Umiestňovacia platňa
12. Vložená náková (vymeniteľná), Ø 26x26
13. Umiestňovací krúžok s otvormi
14. Nárazový mechanizmus

Obrázok 5

Prístroj na testovanie citlivosti látok na trenie



Obr. 5a Nárys a pôdorys

1. Ocel'ová základňa
2. Pohyblivý suport
3. Porcelánová dosťička, 25x25x5 mm
4. Uchytený porcelánový kolík, priemer 10x15 mm
5. Testovaná vzorka, približné množstvo 10 mm³

Obr. 5b Východisková poloha kolika na vzorke.

6. Držiak kolika
7. Zaťažovacie rameno
8. Vyvažovacie rameno
9. Spínač
10. Koleso na nastavenie suportu do východiskovej polohy
11. Pripojenie na elektromotor

A.15. TEPLOTA SAMOVZNIETENIA (KVAPALINY A PLYNY)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Výbušné látky a látky, ktoré sa samovoľne vznecujú v kontakte so vzduchom pri teplote okolitého prostredia, by sa nemali predkladať na testovanie touto metódou. Tento testovací postup sa dá použiť v prípade plynov, kvapalín a pár, ktoré sa môžu zapáliť za prítomnosti vzduchu horúcim povrchom.

Teplota samovznietenia sa môže do značnej miery redukovať prítomnosťou katalytických prímies, povrchovým materiálom alebo väčším objemom skúšobnej nádoby.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Miera schopnosti látky samovoľne sa vznietiť sa vyjadruje teplotou samozápalu. Teplota samovznietenia predstavuje najnižšiu teplotu, pri ktorej sa testovaná látka vznieti, keď je zmiešaná so vzduchom za podmienok definovaných v skúšobnej metóde.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sú citované v technických normách (pozri 1.6.3). V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Metóda stanovuje minimálnu teplotu vnútorného povrchu uzavretého priestoru, ktorá bude mať za následok vznietenie plynu, pary alebo kvapaliny vstreknutej do tohto uzavretého priestoru.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Opakovateľnosť sa mení v závislosti od rozmedzia teplôt samovznietenia a použitej skúšobnej metódy.

Citlivosť a špecifickosť závisia od použitej skúšobnej metódy.

1.6. OPIS METÓDY**1.6.1. Prístroje**

Prístroj je opísaný v metóde uvedenej v 1.6.3.

1.6.2. Podmienky skúšania

Vzorka testovanej látky sa testuje podľa metódy uvedenej v 1.6.3.

1.6.3. Realizácia testu

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

2. ÚDAJE

V rámci testu sa zaznamenáva testovacia teplota, atmosférický tlak, množstvo testovanej vzorky a časové oneskorenie po moment, keď dôjde k vznieteniu.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- množstvo použitej vzorky, atmosférický tlak,
- použitý prístroj,
- výsledky meraní (skúšobné teploty, výsledky týkajúce sa vznietenia, zodpovedajúce časy oneskorenia),
- všetky doplnkové poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. ODKAZY

Žiadne.

A.16. RELATÍVNA TEPLOTA SAMOVZNIETENIA PRE TUHÉ LÁTKY**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Výbušné látky a látky, ktoré sa vznecujú spontánne v kontakte so vzduchom pri teplote okolitého prostredia, by sa nemali testovať touto metódou.

Účelom tohto testu je poskytnúť predbežné informácie o samozápalnosti tuhých látok pri zvýšených teplotách.

Ak sa teplo vyvinuté buď reakciou látky s kyslíkom, alebo exotermickým rozkladom nerozptýli dostatočne rýchlo do okolitého priestoru, dochádza k samozahriatiu, ktoré má za následok samovznietenie. K samovznieteniu preto dochádza vtedy, keď rýchlosť tvorby tepla presiahne rýchlosť straty tepla.

Testovací postup má význam ako predbežný skríningový test pre tuhé látky. Z hľadiska komplexného charakteru vznietenia a horenia tuhých látok by sa teplota samovznietenia stanovená podľa tejto metódy mala použiť iba na účely porovnania.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Teplota samovznietenia získaná touto metódou predstavuje minimálnu teplotu okolitého prostredia vyjadrenú v °C, pri ktorej sa za definovaných podmienok vznieti určitý objem látky.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Určitý objem látky určenej na testovanie sa umiestni do piecky pri teplote miestnosti; zaznamená sa krivka teploty a času, vzťahujúca sa na podmienky v strede testovanej vzorky, pričom teplota piecky sa pri rýchlosti ohrevu 0,5 °C za minútu zvýši na 400 °C, alebo na teplotu topenia, ak je táto nižšia. Na účely tohto testu sa teplota piecky, pri ktorej teplota testovanej vzorky dosiahne 400 °C samozahriatím, nazýva teplotou samovznietenia.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Prístroje**1.6.1.1. *Piecka*

Laboratórna piecka s programovateľnou teplotou (s objemom približne 2 litre), vybavená prirodzenou cirkuláciou vzduchu a dekompresným mechanizmom na tlmenie účinkov výbuchu. Aby sa zabránilo potenciálnemu nebezpečeniu výbuchu, musí sa dávať pozor, aby sa rozkladové plyny nedostali do kontaktu s prvkami elektrického vyhrievania.

1.6.1.2. *Kocka z drôtovej siete*

Podľa šablóny zobrazenej na obrázku 1 treba vystrihnúť kúsok drôtovej siete s otvormi 0,045 mm, vyrobenej z nehrdzavejúcej ocele. Potom treba sieť poskladať do tvaru kocky s otvorenou vrchnou stranou a zaistiť drôtom.

1.6.1.3. *Tepelné články (termočlánky)*

Vhodné tepelné články (termočlánky).

1.6.1.4. *Registračný prístroj*

Ľubovoľný dvojkanálový registračný prístroj kalibrovaný od 0 °C do 600 °C alebo na zodpovedajúce napätie.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

Látky sa testujú v takom stave, v akom boli získané.

1.6.3. **Realizácia testu**

Kocka sa naplní testovanou látkou a táto sa jemne utlačí, potom sa pridá viac testovanej látky, táto sa znova jemne utlačí a postup sa opakuje až dovtedy, kým kocka nie je úplne naplnená. Kocka sa potom zavesí do stredu piecky pri teplote miestnosti. Jeden termočlánok sa umiestni do stredu kocky a druhý medzi kocku a stenu piecky, aby zaznamenával teplotu piecky.

Počas zvyšovania teploty piecky rýchlosťou 0,5 °C za minútu na 400 °C alebo na teplotu topenia, ak je táto nižšia, sa plynulo zaznamenáva teplota piecky a teplota testovanej vzorky.

Keď sa testovaná látka vznieti (zapáli), termočlánok vzorky ukáže veľmi silný nárast teploty nad teplotu piecky.

2. **ÚDAJE**

Teplota piecky, pri ktorej teplota testovanej vzorky dosiahne hodnotu 400 °C samozahriatím, je dôležitá pre vyhodnotenie (obrázok 2).

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- opis testovanej látky,
- výsledky merania vrátane krivky teploty/času,
- všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

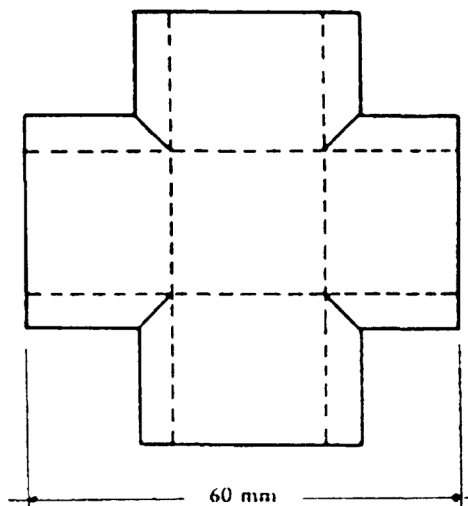
4.

ODKAZY

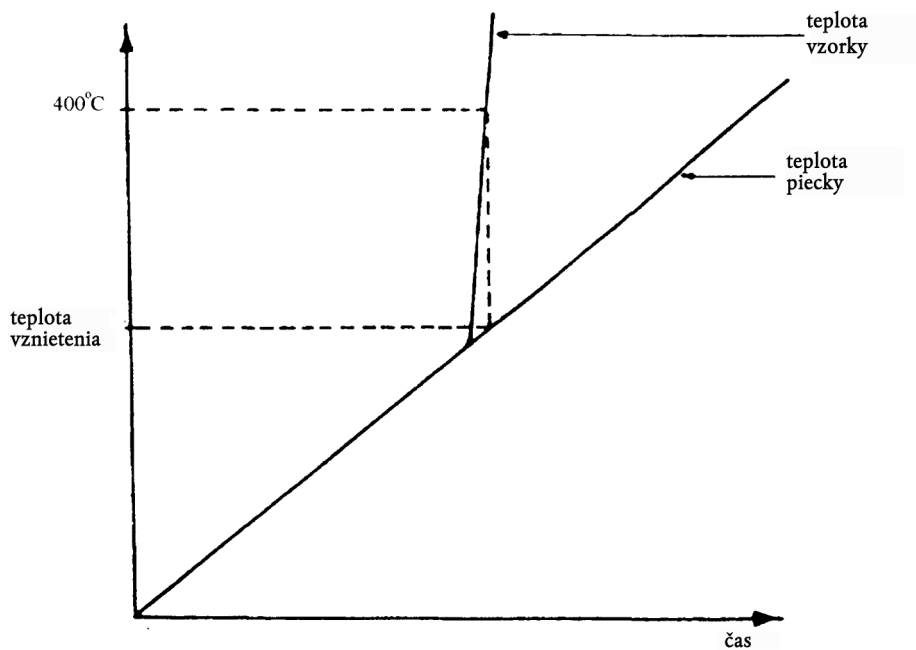
- (1) NF T 20-036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

Obrázok 1

Schéma 20 mm testovanej kocky

**Obrázok 2**

Typická krivka teploty/času



A.17. OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (TUHÉ LÁTKY)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Odporúča sa získať predbežné informácie o všetkých potenciálne výbušných vlastnostiach látky ešte pred uskutočnením testu.

Tento test sa nedá použiť pre kvapaliny, plyny, výbušné ani mimoriadne horľavé látky, ani pre organické peroxidy.

Tento test sa nemusí uskutočniť, ak preskúmanie štruktúrneho vzorca potvrdí domnienku, že príslušná látka nie je schopná exotermickej reakcie s horľavým materiálom.

Aby sa zistilo, či sa test musí uskutočniť so zvláštnymi bezpečnostnými opatreniami, treba vykonať predbežný test.

1.2. POJEM A JEDNOTKY

Čas horenia: čas reakcie vyjadrený v sekundách, potrebný na to, aby reakčná zóna prešla celou hranicou vytvorenou z testovanej látky pri dodržaní postupu opísaného v 1.6.

Rýchlosť horenia: vyjadrená v milimetroch za sekundu.

Maximálna rýchlosť horenia: najvyššia hodnota rýchlostí horenia získaná so zmesami obsahujúcimi 10 až 90 hmotnostných percent oxidantu.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Pre potreby hlavného aj predbežného testu sa ako referenčná látka používa dusičnan bárnatý.

Referenčnou zmesou je tá zmes dusičnanu bárnateho s práškovou celulórou, pripravená podľa 1.6., ktorá dosiahla najvyššiu rýchlosť horenia (zvyčajne je to zmes obsahujúca 60 hmotnostných percent dusičnanu bárnateho).

1.4. PRINCÍP METÓDY

V záujme bezpečnosti sa uskutočňuje predbežný test. Ak tento test jasne ukáže, že testovaná látka má oxidačné vlastnosti, nie je potrebné uskutočniť žiadne ďalšie testy. Ak to však nie je tak, látku treba podrobiť kompletnému testu.

V rámci kompletného testu sa látka určená na testovanie zmieša s definovanou horľavinou v rozličných pomeroch. Každá zmes sa potom sformuje do hranice, ktorá sa na jednom konci zapáli. Najvyššia stanovená, resp. zistená rýchlosť horenia sa porovná s maximálnou rýchlosťou horenia referenčnej zmesi.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Ak je to nutné, možno použiť akúkoľvek metódu drvenia, mletia alebo miešania za predpokladu, že rozdiel v maximálnej rýchlosti horenia v šiestich samostatných testoch sa nebude odchyľovať od aritmetickej strednej hodnoty o viac ako 10 %.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Príprava**1.6.1.1. *Testovaná látka*

Veľkosť častí testovanej látky treba redukovať na <0,125 mm použitím tohto postupu: testovaná látka sa preoseje, zvyšná časť (frakcia) sa pomelie a tento postup sa opakuje dovtedy, kým celé množstvo určené na testovanie neprepadlo cez sito.

Použiť možno akúkoľvek metódu mletia a preosievania, ktorá zodpovedá kritériám kvality.

Pred prípravou zmesi sa látka určená na testovanie suší pri teplote 105 °C dovtedy, kým sa nedosiahne konštantná hmotnosť. Ak je teplota rozkladu látky určenej na testovanie nižšia ako 105 °C, látka sa musí sušiť pri vhodnej nižšej teplote.

1.6.1.2. *Horľavina*

Ako horľavina sa používa prášková celulóza. Celulóza musí byť takého typu, aký sa používa v prípade chromatografie tenkej vrstvy alebo stĺpcovej chromatografie. Ako najvhodnejší sa osvedčil typ s vyše 85 % podielom dĺžky vlákien medzi 0,020 mm a 0,075 mm. Celulózový prášok sa preoseje cez sito s akosťou 0,125 mm. Počas celého testu treba používať tú istú várku celulózy.

Pred prípravou zmesi sa prášková celulóza suší pri teplote 105 °C dovtedy, kým sa nedosiahne konštantná teplota.

Ak sa v predbežnom teste použije drevitá múčka, treba pripraviť drevitú múčku z mäkkého dreva použitím tej časti materiálu, ktorá sa preosiala cez otvory sita veľkosti 1,6 mm, potom treba múčku dôkladne premiešať, sušiť pri teplote 105 °C štyri hodiny v navrstvení maximálne do výšky 25 mm. Materiál treba ochladiť a uskladniť vo vzduchotesnom obale naplnenom do maximálnej možnej miery až do času použitia, podľa možnosti do 24 hodín od ukončenia procesu sušenia.

1.6.1.3. *Zápalný zdroj*

Ako zápalný zdroj sa odporúča použiť plynový horák s horúcim plameňom (minimálny priemer 5 mm). V prípade, ak sa použije iný zápalný zdroj (napríklad pri testovaní v inertnej atmosfére), v správe sa musí uviesť jeho opis a zdôvodnenie jeho použitia.

1.6.2. **Realizácia testu***Poznámka:*

Zmesi oxidantov s celulózou alebo drevitou múčkou sa musia upravovať ako potenciálne výbušné látky a musí sa s nimi narábať s patričnou opatrnosťou.

1.6.2.1. *Predbežný test*

Vysušená látka sa dôkladne premieša s vysušenou celulózou alebo drevitou múčkou v hmotnostnom pomere 2 dielov testovanej látky a 1 dielu celulózy alebo drevitej múčky, zmes sa potom sformuje do malej hranice kónického tvaru s rozmermi 3,5 cm (priemer základne) x 2,5 cm (výška) naplnením (nie utláčaním) formy kónického tvaru (napr. skleného laboratórneho lievika s upchatou stopkou).

Hranica sa umiestni na chladnú, nehorľavú (ohňovzdornú), nepórovitú základovú platňu s nízkou tepelnou vodivosťou. Test sa musí uskutočniť v digestore, ako je to uvedené v 1.6.2.2.

Zápalný zdroj sa kontaktne priloží ku kužeľu. Pozoruje sa a zaznamená prudkosť a trvanie výslednej reakcie.

Testovanú látku treba považovať za oxidačnú, ak je reakcia prudká.

V každom takom prípade, kde sú pochybnosti o dosiahnutom výsledku, je potrebné uskutočniť kompletný hlavný test podľa opisu uvedeného nižšie.

1.6.2.2. *Hlavný test*

Pripravia sa zmesi oxidantu a celulózy obsahujúce 10 až 90 hmotnostných percent oxidantu v 10 % prírastkoch. Pre hraničné prípady treba použiť zmesi s rovnakým hmotnostným podielom oxidantu a celulózy, aby sa dosiahla presnejšia hodnota maximálnej rýchlosti horenia.

Hranica sa vytvorí pomocou formy. Forma je vyrobená z kovu, má dĺžku 250 mm a trojuholníkovitý prierez s vnútornou výškou 10 mm a vnútornou šírkou 20 mm. Po oboch stranách formy sú v pozdĺžnom smere namontované kovové lišty, ktoré slúžia ako bočné ohraničenie a ktoré prečnievajú 2 mm ponad vrchný okraj trojuholníkovitého prierezu (pozrite obrázok). Žliabok s trojuholníkovitým prierezom sa zvolna naplní mierne nad okraj testovanou zmesou. Forma sa potom zdvihne do výšky 2 cm a pustí sa, aby dopadla na tvrdý podklad, čím sa zmes utrasie. Prebytočná zmes sa zhrnie šikmo nakloneným plátkom. Odstránia sa bočné kovové lišty a zostávajúci prášok sa uhladí použitím valčeka. Na vrchnú stranu formy sa potom položí nehorľavá (ohňovzdorná), nepórovitá podkladová doska s nízkou tepelnou vodivosťou, prístroj sa obráti spodnou časťou navrch a forma sa odstráni.

Hranica z práškovej zmesi sa umiestni do digestora priečne na smer prúdenia vzduchu.

Rýchlosť prúdenia vzduchu musí byť dostatočná na to, aby sa zabránilo úniku spalín do ovzdušia laboratória, a počas testu by sa nemala meniť. Okolo prístroja by mala byť postavená protiprievanová zástena.

Kvôli hygroskopickým vlastnostiam celulózy a niektorých látok určených na testovanie by sa testy mali uskutočniť čo možno najskôr po príprave.

Dotykom plameňa sa zapáli jeden koniec hranice z práškovej zmesi.

Po tom, čo sa zóna reakcie rozšírila na počiatočnú vzdialenosť v dĺžke 30 mm, treba odmerať čas reakcie na úseku ďalších 200 mm.

Test sa uskutoční s referenčnou látkou a najmenej raz s každým stanoveným hmotnostným pomerom zmesi testovanej látky a celulózy.

Ak sa zistí, že maximálna rýchlosť horenia je podstatne vyššia než u referenčnej zmesi, test možno zastaviť. V ostatných prípadoch sa musí test opakovať päťkrát u každej z troch zmesí, ktoré dosiahli najvyššiu rýchlosť horenia.

Ak vzniklo podozrenie, že výsledok je klamlivo pozitívny, test sa musí zopakovať s použitím inertnej látky namiesto celulózy, ale s podobnou veľkosťou častíc, napríklad diatomitu. Alternatívne sa musí zmes testovanej látky s celulózou, ktorá dosiahla najvyššiu rýchlosť horenia, opakovanne testovať v inertnej atmosfére (<2 % v/v obsahu kyslíka).

2. **ÚDAJE**

Z bezpečnostných dôvodov sa musí práve maximálna rýchlosť horenia – teda nie stredná hodnota – považovať za charakteristickú oxidačnú vlastnosť testovanej látky.

Pre vyhodnotenie je dôležitá najvyššia hodnota rýchlosti horenia danej zmesi v rámci šiestich testov.

Najvyššia hodnota rýchlosti horenia pre každú zmes oproti koncentrácii oxidantu sa nanesie na graf. Z grafu sa potom vyberie maximálna rýchlosť horenia.

Šesť nameraných hodnôt rýchlosti horenia v rámci jedného skúšobného kola, získaných zo zmesi s maximálnou rýchlosťou horenia, sa nesmie odchyľovať od hodnoty aritmetického streda o viac ako 10 %, lebo inak bude potrebné zdokonaľiť metódy drvenia, mletia a miešania testovanej látky.

Treba porovnať dosiahnutú maximálnu rýchlosť horenia s maximálnou rýchlosťou horenia referenčnej zmesi (pozri 1.3).

Ak sa testy uskutočňujú v inertnej atmosfére, maximálna rýchlosť reakcie sa porovná s maximálnou rýchlosťou reakcie referenčnej zmesi v inertnej atmosfére.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- identitu, zloženie, čistotu, obsah vlhkosti atď. testovanej látky,
- všetky úpravy testovanej vzorky (napr. drvenie, mletie, sušenie...),
- druh zápalného zdroja použitého v teste,
- výsledky meraní,
- typ (formu) reakcie [napr. horenie plameňom na povrchu, horenie cez celú hmotu, všetky informácie týkajúce sa produktov (spodín) horenia (spalín)...],
- všetky doplnkové poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov vrátane opisu prudkosti reakcie (horenie plameňom, iskrenie, pomalé tlenie atď.) a približnej doby trvania v predbežnom bezpečnostnom/skríningovom teste pre testovanú, ako aj pre referenčnú látku,
- výsledky z testov s inertnou látkou, ak také existujú,
- výsledky z testov uskutočnených v inertnej atmosfére, ak také existujú.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Látku treba považovať za oxidačnú vtedy, keď:

- a) v predbežnom skríningovom teste došlo k prudkej reakcii;
- b) v hlavnom teste maximálna rýchlosť horenia testovanej zmesi je vyššia alebo sa rovná maximálnej rýchlosti horenia referenčnej zmesi celulózy a dusičnanu bárnateho.

Aby sa predišlo nesprávnym pozitívnym výsledkom, pri interpretácii výsledkov musia byť zohľadnené aj výsledky získané pri testovaní látky zmiešanej s inertným materiálom a/alebo pri testovaní v inertnej atmosfére.

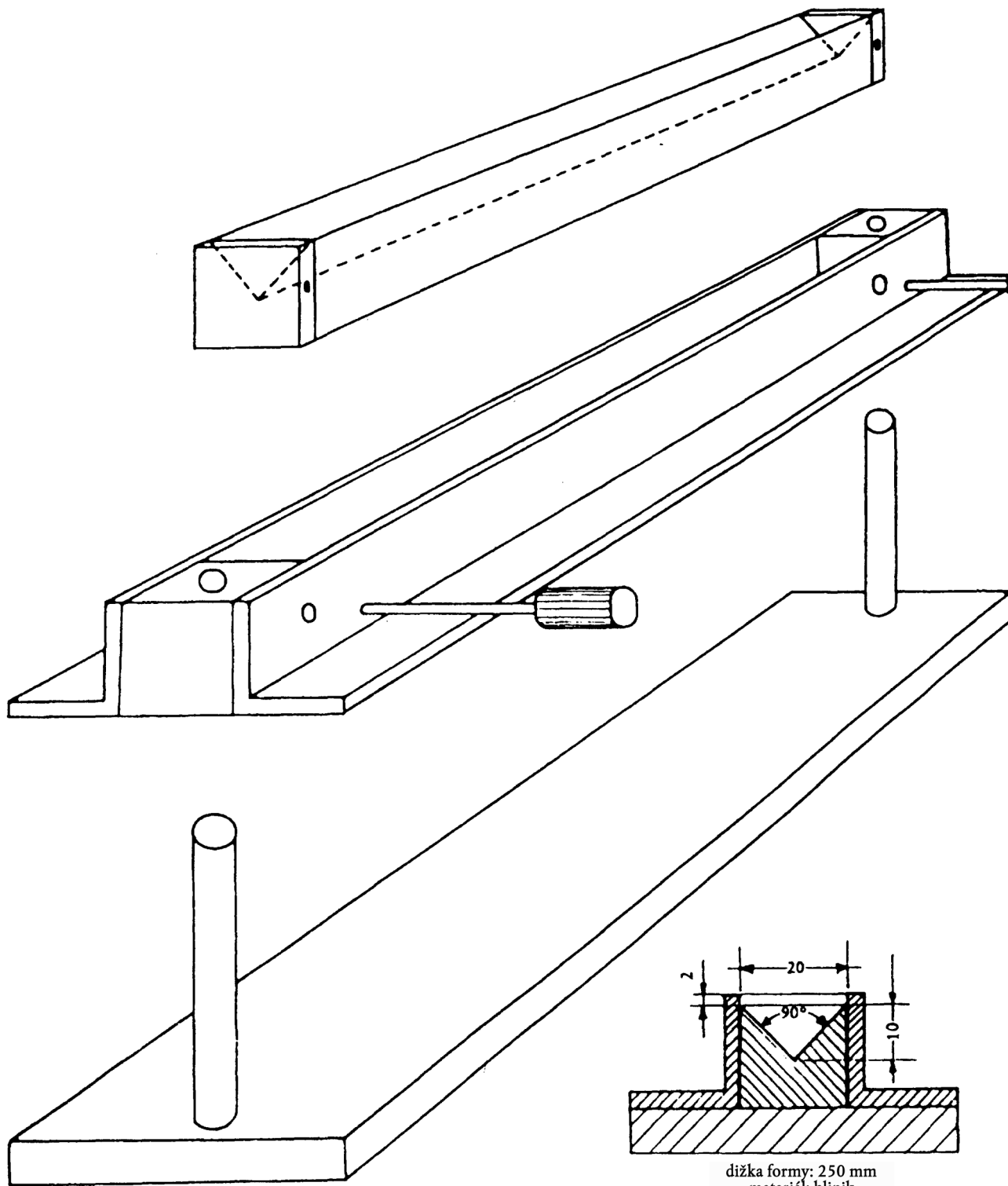
4. ODKAZY

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

Dodatok

Obrázok

Forma a príslušenstvo na prípravu hranice z práškovej skúšobnej látky
(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



dižka formy: 250 mm
materiál: hliník

ČASŤ B: METÓDY NA STANOVENIE TOXICITY

VŠEOBECNÝ ÚVOD: ČASŤ B

A. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod.

B. POJMY

- i) **Akútna toxicita** zahŕňa nepriaznivé účinky, ktoré sa prejavajú v priebehu určeného času (zvyčajne 14 dní) po podaní jednorazovej dávky látky.
- ii) **LD₅₀** (stredná letálna dávka) je štatisticky odvodená dávka látky, pri ktorej sa môže očakávať úmrtie 50 % testovaných zvierat. Hodnota LD₅₀ sa vyjadruje ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieraťa (miligramy na kilogram).
- iii) **LC₅₀** (stredná letálna koncentrácia) je štatisticky odvodená koncentrácia látky, pri ktorej sa môže očakávať úmrtie počas expozície alebo do určitého času po expozícii u 50 % testovaných zvierat za predpísaný čas. Hodnota LC₅₀ sa vyjadruje ako hmotnosť testovanej látky na štandardný objem vzduchu (miligramy na liter).
- iv) **Hodnota dávky bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL)** je maximálna veľkosť dávky alebo úroveň expozície použitá v teste, ktorá nevyvoláva žiadne zistiteľné známky toxicity.
- v) **Subakútna/subchronická toxicita** zahŕňa nepriaznivé účinky, ktoré sa prejavajú u pokusných zvierat ako dôsledok opakovanej denne podávanej dávky chemickej látky alebo ako dôsledok expozície takejto látky počas krátkoho úseku očakávanej dĺžky života pokusných zvierat.
- vi) **Maximálna tolerovateľná dávka (MTD)** je najvyššia zistená dávka so známami toxicity u zvierat bez závažnejšieho vplyvu na ich prežitie vo vzťahu k testu, na ktorý sa použila.
- vii) **Kožnou dráždivosťou** sa rozumie vyvolanie reverzných zápalových zmien na koži po aplikácii testovanej látky.
- viii) **Očnou dráždivosťou** sa rozumie vyvolanie reverzných zmien v oku po aplikácii testovanej látky na predný povrch oka.
- ix) **Kožná senzibilizácia** (alergická kontaktná dermatitída) je imunologicky vyvolaná kožná reakcia na chemickú látku.

Špecifické pojmy pre inhalačnú toxicitu

- **Aerosól** je definovaný ako častice (tuhé alebo kvapalné), homogénne rozptýlené vo vzduchu.
- **Aerodynamický priemer** je priemer gule s jednotkovou hustotou (1 g cm³), ktorá má rovnakú konečnú sedimentačnú rýchlosť ako príslušná častica.
- **Stredná veľkosť aerodynamických častíc (MMAD)** je vypočítaný aerodynamický priemer, ktorý v prípade merania hmotnosti rozdeľuje distribúciu veľkosti častíc aerosólu na dve polovice.
- **Geometrická smerodajná odchýlka (GSD)** je pomer odhadnutého 84 % percentilu a 50 % percentilu a je mierou sklonu krivky kumulatívnej distribúcie veľkosti častíc, a to za predpokladu, že veľkosť častíc má lognormálnu distribúciu.

Špecifické pojmy pre metódy fixnej dávky pri stanovení akútnej orálnej toxicity

- **Evidentná toxicita** sa vzťahuje na toxické účinky, ktoré sa prejavajú po podaní testovanej látky a ktoré sú také silné, že podanie najbližšej vyššej dávky by mohlo mať za následok úmrtie.
- **Diskriminujúca dávka** je najvyššia zo štyroch fixných veľkostí dávok, ktorú možno podať bez toho, aby došlo k úhynu (vrátane prípadov humánneho utratenia) vyvolanému látkou.

C. MUTAGENITA (vrátane predbežných skríningových testov karcinogenity)

Na predbežné posúdenie mutagénneho potenciálu látky je nevyhnutné získať informácie o dvoch ukazovateľoch, menovite o gémovej mutácii a chromozómových aberáciách.

Tieto dva ukazovatele sa vyhodnocujú nasledujúcimi testami:

- i) testami na tvorbu gémovej (bodovej) mutácie v prokaryotických bunkách, ako je *Salmonella typhimurium*; prijateľné sú tiež testy s *Escherichia coli*. Voľba medzi týmito dvomi testovacími organizmami môže závisieť od povahy chemickej látky, ktorá je testovaná;
- ii) testami na tvorbu chromozómových aberácií v cicavčích bunkách *in vitro*; prijateľná je tiež metóda *in vivo* (mikronukleový test alebo analýza metafázy buniek kostnej drene). Ak však neexistujú protiargumenty, dôrazne sa odporúčajú metódy *in vitro*.

D. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Existujú určité hranice v miere, do akej možno výsledky testov na zvieratách a testov *in vitro* priamo extrapolovať na človeka, a túto skutočnosť je potrebné brať do úvahy pri vyhodnocovaní a interpretácii testov.

Ak sú k dispozícii poznatky o nepriaznivých účinkoch na človeka, môžu byť dôležité pre stanovenie potenciálnych účinkov chemických látok na ľudskú populáciu.

E. ODKAZY NA LITERATÚRU

Toxikológia je vyvíjajúci sa experimentálny vedný odbor a ku každej téme existuje rozsiahla literatúra. Dôležité informácie možno nájsť v Smerniciach na vykonávanie OECD testov.

Dodatočné poznámky

Starostlivosť o zvieratá

Pri testovaní toxicity je dôležitá prísna kontrola podmienok prostredia a správna starostlivosť o zvieratá.

- i) Podmienky chovu

Podmienky chovu v priestoroch alebo klietkach pre pokusné zvieratá by mali vyhovovať testovaným druhom. Pre potkany, myši a morčatá sú vhodnými podmienkami teplota miestnosti 22 ± 3 °C a relatívna vlhkosť 30 až 70 %; pre králiky sa odporúča teplota 20 ± 3 °C a relatívna vlhkosť 30 až 70 %.

Niektoré experimentálne techniky sú obzvlášť citlivé na vplyv teploty a v takých prípadoch sú v opise skúšobnej metódy uvedené podrobnosti o vhodných podmienkach. Pri všetkých sledovaniach toxických účinkov by sa mali zaznamenávať údaje o teplote a vlhkosti a mali by sa monitorovať, zaznamenávať a zahrnúť do záverečnej správy o štúdií.

Pri umelom osvetlení by sa obvykle malo striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Podrobnosti o svetelnom režime by sa mali zaznamenať a zahrnúť do záverečnej správy o štúdiu.

V správach o pokusoch na zvieratách je dôležité uviesť typ použitej kletky a počet zvierat chovaných v každej kletke tak počas expozície chemickej látky, ako aj počas ktorejkoľvek ďalšej doby pozorovania.

ii) Podmienky kŕmenia

Potrava by mala spĺňať všetky požiadavky výživy pre príslušný testovací druh. Ak sa testované látky podávajú zvieratám v potrave, môže dôjsť k zníženiu nutričnej hodnoty v dôsledku vzájomného pôsobenia (interakcie) látky a zložiek potravy.

Možnosť takéhoto pôsobenia by sa mala brať do úvahy pri interpretácii výsledkov testov.

Prímesi v potrave, ktorých vplyv na toxicitu je známy, nesmú byť prítomné v koncentráciách, v ktorých by sa vplyv prejavil.

Ochrana zvierat

Pri vypracúvaní skúšobných metód sa náležitá pozornosť venovala ochrane zvierat. Niektoré príklady sú stručne uvedené nižšie, tento zoznam však nie je vyčerpávajúci. Presné znenie a/alebo podmienky je potrebné vyhľadať v texte metód:

- Na stanovenie akútnej orálnej toxicity sa zavádza alternatívna metóda, tzv. „metóda stabilnej dávky“. V tejto metóde sa úhyn nevyužíva ako špecifický skúmaný ukazovateľ. Vyžaduje menej zvierat a vedie k menšej bolesti a utrpeniu než pri klasickom stanovení akútnej orálnej toxicity.
- Počet použitých zvierat je obmedzený na vedecky prijateľné minimum: v metódach B.1 a B.3 sa na testovanie použije iba 5 zvierat rovnakého pohlavia pre jednu veľkosť dávky; na stanovenie kožnej senzibilizácie maximálnym testom na morčatách (metóda B.6) sa použije iba 10 zvierat (a iba 5 pre negatívnu kontrolnú skupinu); počet zvierat potrebných pre pozitívnu kontrolu pri testovaní mutagenity *in vivo* sa taktiež znižuje (metódy B.11 a B.12).
- Bolesť a utrpenie zvierat počas testov sa minimalizuje: je potrebné humánnym spôsobom utrátiť zvieratá prejavujúce závažné a pretrvávajúce známky utrpenia; nesmú sa podávať testované látky, o ktorých je známe, že spôsobujú výraznú bolesť a utrpenie v dôsledku žieravých a dráždivých vlastností látky (metódy B.1, B.2 a B.3).
- Testovanie s neprimerane vysokými dávkami sa obmedzuje zavádzaním limitných testov, a to nielen pri testoch akútnej toxicity (metódy B.1, B.2 a B.3), ale aj pri testoch mutagenity *in vivo* (metódy B.11 a B.12).
- Stratégia testovania dráždivosti teraz umožňuje, že test sa nemusí vykonať alebo že sa obmedzí na štúdiu s jedným zvieratom, ak sa to dá dostatočne vedecky zdôvodniť.

Takéto vedecké zdôvodnenie môže byť založené na fyzikálnochemických vlastnostiach látky, na výsledkoch založených na iných už vykonaných testoch alebo na výsledkoch spoľahlivo validovaných testov *in vitro*. Ak sa napríklad štúdia akútnej toxicity nanosením na kožu vykoná s dávkou látky zodpovedajúcou dávke v limitnom teste (metóda B.3) a nebola pozorovaná žiadna kožná dráždivosť, môže byť ďalšie testovanie kožnej dráždivosti (metóda B.4) zbytočné; materiály, ktoré v štúdiu kožnej dráždivosti (metóda B.4) vykazujú nepochybné žieravé účinky alebo silné podráždenie kože, by sa nemali ďalej testovať na očné dráždivosť (metóda B.5).

B.1 AKÚTNÁ TOXICITA (ORÁLNA)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Testovaná látka sa podáva v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám pokusných zvierat orálne gavážou, a to každej skupine jedna veľkosť dávky. Zvolené dávky možno stanoviť podľa výsledkov orientačného testu na zistenie rozmedzia dávok. Následne sa pozorujú účinky a úhyn. Zvieratá, ktoré v priebehu testu uhynuli, aj zvieratá, ktoré do konca testu prežili, sa pitvajú. Táto metóda sa používa predovšetkým pri štúdiách vykonávaných na hlodavcoch.

Je potrebné humánnym spôsobom usmrtiť zvieratá vykazujúce závažné a pretrvávajúce známky utrpenia. Nesmú sa podávať testované látky, o ktorých je známe, že spôsobujú výraznú bolesť a utrpenie v dôsledku žieravých a dráždivých vlastností látky.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS METÓDY**1.6.1. Príprava**

Najmenej päť dní pred testom sa zvieratá chovajú v takých podmienkach chovu a kŕmenia, v akých budú počas testu. Pred začatím testu sa randomizujú zdravé mladé dospelé zvieratá a priradujú k pokusným skupinám pre test na hľadanie dávky a pre hlavný test. Ak je to potrebné, tak sa testovaná látka rozpustí alebo sa suspenduje vo vhodnom vehikule. Odporúča sa podľa možnosti zvoliť v prvom rade vodný roztok a po ňom rozpustenie v rastlinnom oleji alebo iných vhodných vehikulách, alebo suspenzii. V prípade bezvodého vehikula by mali byť známe jeho toxikologické vlastnosti alebo by sa mali stanoviť pred testom alebo počas jeho vykonávania. Pri hlodavcoch by objem nemal za normálnych okolností prekročiť 10 ml/kg telesnej hmotnosti, výnimku tvoria vodné roztoky, z ktorých sa môže podávať až do 20 ml/kg. Rozdielne objemy by sa mali prispôbením koncentrácie udržiavať čo najnižšie, aby bol zabezpečený konštantný objem vo všetkých dávkach.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.1. Pokusné zvieratá**

Pokiaľ neexistujú žiadne mimoriadne dôvody, tak sa uprednostňuje potkan.

Používajú sa známe kmene pokusných zvierat. Pre každé pohlavie by nemala byť odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu viac ako $\pm 20\%$ od príslušnej strednej priemernej hodnoty každého pohlavia.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

Pre každú veľkosť dávky sa použije najmenej päť hlodavcov. Mali by byť rovnakého pohlavia. Ak sa použijú samice, musia byť nezapustené a nesmú byť gravidné. Ak existujú informácie, že jedno z pohlaví je výrazne citlivejšie, použijú sa zvieratá tohto pohlavia.

Poznámka: Ak sa v testoch akútnej toxicity používajú zvieratá vyššieho radu, než sú hlodavce, malo by sa zvážiť použitie menšieho počtu zvierat.

Dávky treba voliť opatrne a treba zaistiť, aby sa neprekročila veľkosť stredne toxické dávky. V takýchto testoch by sa nemali podávať letálne dávky testovanej látky.

1.6.2.3. Veľkosti dávok

Počet veľkostí dávok by mal byť dostatočný, najmenej tri, a majú byť vhodne odstupňované, aby vyvolali u pokusných skupín toxické účinky a mortalitu v určitom rozsahu. Získané údaje by mali byť dostatočné na zostrojenie krivky závislosti dávka-reakcia, a pokiaľ je to možné, mali by umožniť prijateľné stanovenie LD₅₀.

1.6.2.4. Limitný test

Pri použití hlodavcov možno vykonať limitný test s jednou dávkou najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti na skupinách piatich samcov a piatich samíc, a to použitím vyššie opísaných postupov. Pokiaľ podaná látka spôsobí uhynutie, je potrebné zvážiť vykonanie úplnej štúdie.

1.6.2.5. Pozorovacia doba

Pozorovacia doba by mala byť minimálne 14 dní. Doba pozorovania by sa nemala určovať dogmaticky. Mala by závisieť od druhu obrazu otravy, časového prejavu symptómov a od trvania zotavovacej fázy; pozorovacia doba sa musí predĺžiť vtedy, ak je to nevyhnutné. Časový moment, keď sa prejavia príznaky otravy a zasa odznejú, ako aj čas smrti majú význam hlavne vtedy, ak sú známe príznaky pre spomalenie úmrtnosti.

1.6.3. Postup

Pred podaním testovanej látky by zvieratá nemali byť kŕmené. Potkanom sa potrava odoberie večer pred testom; u zvierat s vyššou rýchlosťou látkovej výmeny postačí kratšie obdobie hladovania; prístup k pitnej vode nie je obmedzený. Nasledujúci deň sa zvieratá odvážia a testovaná látka sa podá gavážou v jednej dávke. Ak nemožno podať dávku naraz, možno ju podať po menších množstvách v priebehu najviac 24 hodín. Po podaní dávky sa zamedzí prístup k potrave ešte tri až štyri hodiny. Ak sa látka podáva po častiach v priebehu určitého času, môže byť podľa dĺžky expozície nevyhnutné poskytnúť zvieratám potravu a vodu.

Po podaní látky sa vykonávajú a systematicky zaznamenávajú pozorovania, pre každé zviera sa vedú samostatné záznamy. Počas prvého dňa sa by sa mali pozorovania vykonávať často.

Najmenej raz počas každého pracovného dňa sa vykonávajú dôkladné klinické vyšetrenia, iné pozorovania sa vykonávajú denne s vhodnými opatreniami na minimalizáciu strát zvierat pre štúdiu, napr. pitva alebo zmrazenie uhynutých zvierat a izolácia či utratenie slabých alebo umierajúcich zvierat. Pozorovania zahŕňajú zmeny na koži, na srsti, na očiach, na slizniciach a taktiež zmeny dýchania, krvného obehu, zmeny funkcie autonómnej a centrálnej nervovej sústavy, somatomotorickej aktivity a správania. Zvláštnu pozornosť treba venovať tremoru, kŕčom, slintaniu, hnačkám, letargii, spánku a kóme. Čas úhynu sa zaznamená čo možno najpresnejšie.

Zvieratá, ktoré v priebehu testu uhynuli, aj zvieratá, ktoré do konca testu prežili, sa pitvajú. Zaznamenávajú sa všetky makroskopické patologické nálezy. V prípade potreby sa odoberú tkanivá pre histopatologické vyšetrenie.

Vyhodnotenie toxicity u druhého pohlavia

Po ukončení testu na zvieratách jedného pohlavia sa látka podá najmenej jednej skupine piatich zvierat druhého pohlavia s cieľom zistiť, či nie sú zvieratá druhého pohlavia na testovanú látku výrazne citlivejšie. V jednotlivých prípadoch môže byť zdôvodnené použitie menšieho počtu zvierat. Ak je k dispozícii spoľahlivá informácia, že zvieratá a pohlavie, ktoré sa testuje, sú výrazne citlivejšie, môže sa testovanie na zvieratách druhého pohlavia vynechať.

2. ÚDAJE

Údaje by sa mali zhrnúť do tabuľky, pričom sa pre každú pokusnú skupinu uvedie počet zvierat na začiatku testu, čas úhynu jednotlivých zvierat, počet zvierat s inými príznakmi toxicity, opis toxických účinkov a pitevné nálezy. Stanovenie hmotnosti jednotlivých zvierat sa vykoná bezprostredne pred podaním testovanej látky, potom v týždenných intervaloch a v čase úhynu. Zmeny hmotnosti treba vypočítať a zaznamenať, ak zvieratá prežívajú dlhšie než jeden deň. Zvieratá, ktoré boli humánnym spôsobom usmrtené kvôli utrpeniu a bolesti vyvolanými podanou látkou, sa zaznamenávajú ako úhyn vyvolaný látkou. LD₅₀ sa vypočíta uznávanou metódou. Vyhodnotenie údajov by malo zahŕňať taktiež vzťah, pokiaľ existuje, medzi expozíciou zvierat testovanej látke a výskytom a stupňom všetkých abnormalít vrátane zmien správania, klinických symptómov, makroskopických lézií, zmien telesnej hmotnosti, mortality a ostatných toxických účinkov.

3. SPRÁVY**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- druhy zvierat, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.,
- skúšobné podmienky,
- veľkosti dávok (vrátane vehikula, pokiaľ sa použije) a koncentrácie,
- pohlavie zvierat, ktorým sa látka podala,
- údaje o reakcii podľa pohlavia a podľa veľkosti dávky vo forme tabuľky (t. j. počet uhynutých zvierat alebo počet zvierat, ktoré boli usmrtené, počet zvierat s príznakmi toxicity, počet exponovaných zvierat),
- čas úhynu po podaní testovanej látky, dôvody a kritériá pre humánne usmrtenie zvierat,
- všetky pozorovania,
- hodnotu LD₅₀ pre pohlavie, u ktorého sa vykonala úplná štúdia, a to pre 14-dňové pozorovania (spolu so špecifikovanou metódou výpočtu),
- 95 % interval spoľahlivosti pre LD₅₀ (ak sa dá vypočítať),
- krivku závislosti mortality od dávky a jej sklon (pokiaľ to metóda stanovenia umožňuje),
- pitevné nálezy,
- všetky histopatologické nálezy,
- výsledky všetkých testov na druhom pohlaví,
- rozbor výsledkov (zvláštnu pozornosť treba venovať vplyvu, ktorý by mohlo mať humánne usmrtenie zvierat počas testu na vypočítanú hodnotu LD₅₀),
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.1 bis AKÚTNA TOXICITA (ORÁLNA) – METÓDA STABILNEJ DÁVKY**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Akútny orálny test toxicity poskytuje informácie o negatívnych účinkoch, ktoré sú následkom podania jednej jedinej dávky testovanej látky v rámci krátkého časového rozmedzia.

Metóda stabilnej dávky sa vykonáva v dvoch stupňoch.

V prvom teste na hľadanie dávky sa postupne skúmajú účinky rozličných dávok podaných gavážou na jednotlivých zvieratách jedného jediného pohlavia. Pomocou testu na hľadanie dávky sa zisťujú údaje o vzťahu medzi dávkou a toxicitou vrátane odhadu minimálnej letálnej dávky. V normálnom prípade sa nevyšetruje v tomto prvom stupni viac ako 5 zvierat.

V hlavnom teste sa podáva testovaná látka orálne žalúdočnou sondou skupinám s 5 samčekom a 5 samicami v jednej vopred stanovenej dávke (5, 50, 500 alebo 2 000 mg/kg). Použitá dávka sa zistí z testu na hľadanie dávky a zodpovedá dávke, ktorá spôsobuje zjavnú toxicitu (pozri 1.2. Pojmy), ale nie smrť.

Po podaní sa zvieratá sledujú.

Ak prvá zvolená dávka vykazuje zjavný toxický účinok, ale nespôsobuje žiadnu smrť spôsobenú látkou, nie je potrebný ďalší test.

Ak zvolená dávka nevyvoláva žiadny zjavný toxický účinok, tak by sa mala testovaná látka nanovo testovať v ďalšej vyššej dávke. Ak zvieratá uhynú alebo si príznaky silných toxických účinkov vyžadujú predčasnú smrť zvierat, mala by sa testovaná látka znovu preskúmať v ďalšej nižšej dávke.

Tento postup umožňuje zisťovanie najvyššej neletálnej dávky, t. j. toto je najvyššia z vopred stanovených dávok, ktorá sa môže podávať bez následku smrti (vrátane predčasných úmrtí).

Zvieratá, ktoré prejavujú silné a pretrvávajúce znaky utrpenia a bolesti, možno prípadne predčasne humanne usmrtiť. Dávky testovaných látok, o ktorých je známe, že týmto spôsobom vyvolávajú na základe ich žieravých a dráždivých vlastností výrazné utrpenie a bolesti, sa nemusia testovať.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava****1.6.1.1. Pokusné zvieratá**

Pokiaľ neexistujú žiadne mimoriadne dôvody, tak sa uprednostňuje potkan.

Používajú sa známe kmene pokusných zvierat. Pre každé pohlavie by nemala byť odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu viac ako $\pm 20\%$ od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

Pred testom sa musia zvieratá aklimatizovať v časovom rozmedzí najmenej piatich dní na experimentálne chovateľské a kŕmne podmienky. Pred začatím testu sa randomizujú zdravé mladé dospelé zvieratá a priradujú k pokusným skupinám pre test na hľadanie dávky a pre hlavný test. V praxi sa môže v hlavnom teste použiť aj len jedna skupina každého pohlavia.

1.6.1.2. *Príprava a podávanie dávky*

Ak je to potrebné, tak sa testovaná látka rozpustí alebo sa suspenduje vo vhodnom vehikule. Odporúča sa podľa možnosti zvoliť v prvom rade vodný roztok a po ňom rozpustenie v rastlinnom oleji alebo iných vhodných vehikulách alebo suspenzii. Pri nevodných formulačných pomôckach musia byť známe ich relevantné toxikologické vlastnosti. Inak sa určujú pred alebo počas testu. Pri hľadavcoch by objem nemal za normálnych okolností prekročiť 10 ml/kg telesnej hmotnosti, výnimku tvoria vodné roztoky, z ktorých sa môže podávať až do 20 ml/kg. Rozdielne objemy by sa mali prispôbením koncentrácie udržiavať čo najnižšie, aby bol zabezpečený konštantný objem vo všetkých dávkach.

Pred podaním testovanej látky by zvieratá nemali dostať žiadnu potravu. Pri potkanoch by sa nemala podávať potrava celú noc, pitnú vodu možno podávať neobmedzene. Na nasledujúci deň sa zvieratá odvážia a testovaná látka sa podá v jednorazovej dávke orálne pomocou gaváže. Ak nie je možná jednorazová dávka, môže sa dávka určená na aplikáciu podávať v čiastkových dávkach maximálne 24 hodín. Po podaní testovanej látky by sa nemala podávať potrava ďalšie tri až štyri hodiny. Ak sa testovaná látka podáva v čiastkových množstvách počas dlhšieho časového rozmedzia, môže byť potrebné podať zvieratám potravu a vodu podľa dĺžky expozície medzi jednotlivými aplikáciami.

1.6.2. **Postup**

1.6.2.1. *Test na hľadanie dávky*

Účinky rozdielnych dávok sa skúmajú pri jednotlivých zvieratách. Spravidla, a ak žiadne údaje nepoukazujú na vyššiu senzibilitu samčieho pohlavia, používajú sa samičky. Dávkovanie prebieha postupne, t. j. v časovom rozmedzí 24 hodín, predtým ako sa podá dávka ďalšiemu zvieratú. Všetky zvieratá sa pozorujú počas 7 dní, či sa u nich prejavujú príznaky otravy; ak pretrvávajú mierne príznaky otravy počas celých 7 dní, predlžuje sa pozorovací čas pre dané zviera o ďalších 7 dní. Mala by sa zvoliť jedna z týchto počiatočných dávok: 5, 50, 500 alebo 2 000 mg/kg. Ak zvolená počiatočná dávka nevyvoláva žiadnu ťažkú toxicitu a ďalšou vyššou dávkou vyvolá úmrtnosť, je potrebné preskúmať jednu alebo viacero medzistupňových dávok. Tým sa umožní zozbierať údaje o dávkach vyvolávajúcich príznaky otravy, ako aj o najnižšej dávke spôsobujúcej úmrtnosť.

Treba sa snažiť o to, aby sa vyvodila počiatočná dávka z údajov o podobných látkach. Ak takéto údaje chýbajú, odporúča sa použiť ako prvú dávku 500 mg/kg. Ak po podaní počiatočnej dávky neprejavia žiadne príznaky otravy, tak sa preskúma ďalšia vyššia dávka. Ak dávka 2 000 mg/kg nespôsobí žiadnu úmrtnosť, tak sa považuje test na hľadanie následkov dávky za uzavretý a hlavný test by sa mal potom realizovať s touto dávkou. Ak si ťažké následky spôsobené počiatočnou dávkou (napr. 500 mg/kg) vyžadujú predčasné usmrtenie, podá sa nižšia dávka (napr. 50 mg/kg) inému zvieratú. Ak zviera tento test prežije, môžu sa ďalším zvieratám podať primerané dávky, ktoré sa nachádzajú medzi stanovenými dávkovaniami. Týmto postupom by sa nemalo testovať viac ako 5 zvierat.

1.6.2.2. *Hlavný test*

Pre každé zistené dávkovanie sa používa minimálne 10 zvierat (5 samčekov a 5 samičiek). Samičky nesmú byť po vrhu ani gravidné.

Základom metódy stabilnej dávky je, že sa v hlavnom teste používajú len primerané toxické dávky. Treba zabrániť podávaniu letálnych dávok testovanej látky.

Testovaná látka určená na použitie pri teste by sa mala voliť z jednej zo štyroch určených dávkovaní, teda 5, 50, 500 alebo 2 000 mg/kg. Počiatočná dávka sa volí tak, aby vyvolávala zjavné toxické účinky, ale aby nedošlo k úmrtiu vyvolanej látkou (vrátane predčasných humánnych usmrtení, náhodné úmrtia sa nepočítajú, ale mali by sa zaznamenať). Ďalší test nie je potrebný, ak táto dávka vyvoláva zjavné príznaky otravy, ale nespôsobuje žiadne úmrtie podmienené látkou.

Ak podanie zvolenej dávky nemá za následok žiadne zjavné toxické účinky, mal by sa test opakovať s ďalšou najbližšou vyššou dávkou. Zvieratá by sa mali sledovať až do konca pozorovacieho času. Ak si zjavné príznaky otravy vyžadujú predčasné humane usmrtenie zvierat alebo ak dochádza k úmrtiu spôsobenému látkou, mal by sa test opakovať s nižšou dávkou. Zvieratá, ktoré sa nemusia predčasne usmrtiť, by mali ostať naďalej pod dohľadom počas celého pozorovacieho času.

Po podaní sa jednotlivé pozorovania systematicky zaznamenávajú. Pre každé pokusné zviera sa registrujú pozorovania oddelene.

Pozorovací čas by mal byť minimálne 14 dní. Čas pozorovania by nemal byť určený dogmaticky, ale mal by závisieť od druhu obrazu otravy, časového prejavu symptómov a od trvania zotavovacej fázy. Pozorovací čas sa môže predĺžiť, ak sa to považuje za potrebné. Čas, keď sa prejavia príznaky otravy a opäť odznejú, ako aj čas smrti majú význam hlavne vtedy, ak sú poznateľné príznaky pre spomalené príznaky otravy.

V deň podania by sa malo vykonať minimálne dvakrát a v každý nasledujúci deň minimálne jedenkrát starostlivé klinické vyšetrenie. Zvieratá, ktoré zjavne trpia bolesťami alebo preukazujú silné príznaky utrpenia, treba predčasne humane usmrtiť. Ak tieto zvieratá naďalej preukazujú príznaky otravy, mali by sa počas prvých dní od podania vykonať dodatočné pozorovania. Pokus sa môže ukončiť, ak sa prvá zvolená dávka ukázala ako vysoká.

Pozorovania sa zameriavajú na zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchania a krvného obehu, autonómneho a centrálného nervového systému ako somatomotoriky a správania. Mimoriadnu pozornosť treba venovať trasu, kŕčom, slineniu, hnačkám, letargii, spánku a kóme.

Určovanie hmotnosti jednotlivých zvierat prebieha bezprostredne pred podávaním testovanej látky, jedenkrát denne počas nasledujúcich troch dní a potom v týždňových intervaloch. Zvieratá, ktoré uhynuli počas testu, a zvieratá, ktoré prežili do konca testu, sa odvážia a pitví. Všetky patologické zmeny sa musia zaprotokolovať. Ak je to potrebné, mali by sa odobrať tkanivá pre histopatologické testy.

Test druhej alebo vo výnimočných prípadoch tretej dávky môže byť potrebný podľa výsledkov predchádzajúcich dávok.

Ak testovaná látka vedie pri 5 mg/kg telesnej hmotnosti k smrti (alebo ak to test na hľadanie dávky zahŕňa), mala by sa preskúmať akútna toxicita testovanej látky.

2. ÚDAJE

Údaje z testu na hľadanie dávky a z hlavného testu sa musia zhrnúť do tabuľky. Z nej musí vyplývať pre každú testovanú dávku počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat s príznakmi otravy, počet zvierat, ktoré uhynuli počas testu alebo boli predčasne humane usmrtené, opis toxických následkov a pre hlavný test opis prípadne látkou podmienených príznakov otravy, časový priebeh príznakov otravy, ako aj sekčné nálezy. Zmeny v hmotnosti sa určujú a zaznamenávajú vtedy, ak zvieratá neprežili dlhšie ako jeden deň.

Zvieratá, ktoré boli na základe látkou podmieneného utrpenia a bolesti predčasne humane usmrtené, sa zaregistrovali ako prípady úmrtia podmienené látkou.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie, a to podľa vhodnosti pre test na hľadanie dávky, ako aj pre hlavný test:

— druhy zvierat, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.,

— podmienky testu,

- skupiny dávok (prípadne vehikulim a koncentráciu),
- kompletne výsledky všetkých testovaných dávok,
- zoznam údajov podľa pohlavia a dávky (počet použitých zvierat, zmeny telesnej hmotnosti, prípadne počet zvierat, ktoré uhynuli počas testu alebo boli humánne usmrtené, počet zvierat s príznakmi otravy, druh, stupeň a trvanie účinku),
- časový priebeh od začiatku príznakov otravy a údaje o tom, či boli nezvratné, alebo nie,
- pri uhynutých alebo humánne usmrtených zvieratách údaje o čase smrti po podaní, dôvody a kritériá na predčasné humánne usmrtenie zvierat,
- sekčné nálezy,
- všetky histopatologické nálezy,
- diskusiu o výsledkoch,
- vyhodnotenie výsledkov vrátane príznakov zjavných toxických účinkov a najvyššej neletálnej dávky zistenej počas testu.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

DÁVKA	VÝSLEDKY	INTERPRETÁCIA
5 mg/kg telesnej hmotnosti	Menej ako 100 % šanca na prežitie.	Zlúčeniny, ktoré sú VEĽMI TOXICKÉ.
	100 % šanca na prežitie; ale zjavné príznaky otravy.	Zlúčeniny, ktoré sú TOXICKÉ.
	100 % šanca na prežitie; ale žiadne príznaky otravy.	Pozri výsledky pri dávke 50 mg/kg.
50 mg/kg telesnej hmotnosti	Menej ako 100 % šanca na prežitie.	Zlúčeniny, ktoré môžu byť TOXICKÉ alebo VEĽMI TOXICKÉ. Pozri výsledky pri dávke 5 mg/kg.
	100 % šanca na prežitie; ale zjavné príznaky otravy.	Zlúčeniny, ktoré sú ŠKODLIVÉ.
	100 % šanca na prežitie; ale žiadne príznaky otravy.	Pozri výsledky pri dávke 500 mg/kg.
500 mg/kg telesnej hmotnosti	Menej ako 100 % šanca na prežitie.	Zlúčeniny, ktoré môžu byť TOXICKÉ alebo ŠKODLIVÉ. Pozri výsledky pri dávke 50 mg/kg.
	100 % šanca na prežitie; ale zjavné príznaky otravy.	Zlúčeniny, o ktorých sa usudzuje, že nemajú výraznú akútnu toxicitu.
	100 % šanca na prežitie; ale žiadne príznaky otravy	Pozri výsledky pri dávke 2 000 mg/kg.
2 000 mg/kg telesnej hmotnosti	Menej ako 100 % šanca na prežitie.	Pozri výsledky pri dávke 500 mg/kg.
	100 % šanca na prežitie; so zjavnými príznakmi otravy alebo bez nich.	Zlúčeniny, ktoré nevykazujú výraznú akútnu toxicitu.

Pozri aj všeobecný úvod, časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.2. AKÚTNA TOXICITA (INHALAČNÁ)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Je výhodné mať predbežné údaje o rozdelení častíc podľa veľkosti, o tlaku pary, o teplote tavenia, teplote vzplanutia, teplote varu a o výbušnosti látky.

Pozri aj všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Viacero skupín pokusných zvierat sa exponuje s testovanou látkou v odstupňovaných koncentráciách na určený čas, a to jedna koncentrácia na jednu skupinu. Nakoniec sa zaregistrujú pozorované následky a prípady úmrtia. Zvieratá, ktoré uhynuli počas testu, ako aj zvieratá, ktoré prežili do konca testu, sa pitvú.

Zvieratá s ťažkými a pretrvávajúcimi príznakmi utrpenia a bolesti sa môžu predčasne humánne usmrtiť. Látky, o ktorých je známe, že týmto spôsobom spôsobujú na základe svojich žieravých a silno dráždivých účinkov bolesť a utrpenie, sa nemusia testovať.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava**

Zvieratá si pred začatím testu zvykajú minimálne 5 dní na experimentálne chovateľské a krmné podmienky. Pred testom sa zdravé mladé dospelé zvieratá randomizujú a priradujú k jednotlivým testovaným skupinám. Simulovaná expozícia je potrebná len vtedy, ak si to vyžaduje použitá operatívna expozičná podmienka.

Pri tuhých testovaných látkach môže byť potrebná mikronizácia, aby sa zachovali častice vhodnej veľkosti.

Ak je to potrebné, môže sa do testovanej látky pridať vhodná pomocná látka, aby sa dosiahla potrebná koncentrácia testovanej látky v atmosfére, a v takom prípade sa musí vytvoriť kontrolná skupina, ktorá obsahuje len pomocnú látku. Ak sa k dávke pridá na zjednodušenie podania pomocná látka alebo iná prímes, musia byť známe jej relevantné toxické vlastnosti. Môžu sa použiť prípadne údaje z prechádzajúcich testov.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.1. Pokusné zvieratá**

Ak neexistujú mimoriadne dôvody, tak sa uprednostňuje potkan. Používajú sa známe kmene pokusných zvierat. Pre každé pohlavie by nemala byť odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu na začiatku testu viac ako $\pm 20\%$ od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

Pre každú koncentráciu sa musí použiť minimálne 10 hlodavcov (5 samčekov a 5 samičiek). Samičky nesmú byť po vrhu ani gravidné.

Poznámka: Pri testoch akútnej toxicity na zvieratách, ktoré patria k vyšším stavovcom, ako hlodavce, sa prihliada na použitie nižšieho počtu zvierat.

Dávky by sa mali zvoliť starostlivo a veľký dôraz treba klásť na to, aby sa neprekročili primerané toxické dávky. Pri takýchto testoch by sa malo zabrániť podávaniu testovanej látky v letálnych dávkach.

1.6.2.3. Expozičná koncentrácia

Skupiny dávok, najmenej tri, musia stačiť na zachovanie testovaných skupín s toxickými účinkami a medzami úmrtnosti podľa príslušnej klasifikácie. Získané údaje by mali byť dostačujúce na zobrazenie krivky koncentrácie a úmrtnosti, a ak je to možné, mali by umožniť prijateľné určenie LC_{50} .

1.6.2.4. Limitný test

Ak nevyvolá štvorhodinová expozícia 5 samčekoch a 5 samičiek pri koncentrácii 5 mg na liter plynu alebo tekutého aerosólu, alebo pevnej časti (alebo ak to nemožno dodržať v druhom a treťom prípade kvôli fyzikálnym alebo chemickým vlastnostiam vrátane nebezpečenstva výbuchu testovanej látky, maximálna dosiahnuteľná koncentrácia) úmrtnosť závisí od aplikovanej látky počas 14 dní, nemusí sa ďalšie testovanie považovať za nevyhnutné.

1.6.2.5. Expozičný čas

Expozičný čas by mal byť štyri hodiny.

1.6.2.6. Vybavenie

Pre testy so zvieratami by sa malo používať inhalačné zariadenie, ktoré zabezpečuje dynamický prúd vzduchu minimálne 12-krát za hodinu, ako aj adekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozloženú expozičnú atmosféru. Ak sa používa jedna komora, tak sa musí zostaviť tak, aby boli pokusné zvieratá v nej čo najmenej stlačené a aby bola expozícia maximalizovaná inhaláciou testovanej látky. Aby sa zabezpečila stabilita atmosféry v inhalačnej komore, nemal by „celkový objem“ pokusných zvierat prekročiť 5 % objemu komory. Pre expozície oblasti nosa a úst, hlavy alebo celého tela sa musia používať špeciálne inhalačné komory; obidva prvé druhy expozície majú prispieť k tomu, aby čo najviac obmedzili prijatie testovanej látky inými cestami.

1.6.2.7. Pozorovací čas

Pozorovací čas by mal byť minimálne 14 dní. Čas pozorovania by sa nemal určiť dogmaticky. Mal by závisieť od druhu obrazu otravy, časového prejavu symptómov a od trvania zotavovacej fázy; musí sa predĺžiť vtedy, ak je to nevyhnutné. Časový moment, keď sa prejavia príznaky otravy a zasa odznejú, ako aj čas smrti majú význam hlavne vtedy, ak sú známe príznaky pre spomalenú úmrtnosť.

1.6.3. Postup

Zvieratá sa musia odvážať bezprostredne pred expozíciou a po expozícii pri nastavení rovnováhy komorovej koncentrácie testovanej látky v určenej aparatúre počas štyroch hodín. Nastavenie rovnováhy by malo zaberať len veľmi málo času. Teplota by mala byť počas testu 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť vzduchu sa udržiava medzi 30 % a 70 %, s výnimkou prípadov, keď sa to nedá realizovať (napr. testy s niektorými aerosólmi). Udržiavanie ľahkého podtlaku v komore (≥ 5 mm vody) zabraňuje unikaniu testovanej látky do okolia. Počas expozície sa nepodáva žiadna potrava ani voda. Mal by sa používať vhodný systém na vytváranie a kontrolu skúšobnej atmosféry. Systém má zabezpečovať čo najrýchlejšie dosiahnutie konštantných expozičných podmienok. Komora by mala byť nastavená a obsluhovaná tak, aby sa udržalo homogénne rozdelenie skúšobnej atmosféry v komore.

Potrebné je vykonať tieto merania alebo kontroly:

- merania prietokového množstva vzduchu (priebežne);
- skutočná koncentrácia testovanej látky sa meria počas expozície v dýchacej oblasti minimálne trikrát (v niektorých druhoch atmosféry, napr. aerosóloch vo vysokej koncentrácii, môže byť potrebná častejšia kontrola). Počas expozičnej doby by sa nemala koncentrácia odkláňať o viac ako ± 15 % od strednej priemernej hodnoty. Pri niektorých aerosóloch sa takáto testovacia úroveň možno nedá dosiahnuť, v takom prípade sa akceptuje väčší rozsah rozptylu. Pre aerosóly sa musí čo možno najčastejšie robiť analýza veľkosti častíc (aspoň na jednu testovanú skupinu);
- teplota a vlhkosť vzduchu, ak je to možné, tak priebežne.

Počas expozície a po expozícii sa zvieratá pozorujú a zapisujú sa nálezy pre každé zviera. Tieto pozorovania sa počas prvého dňa vykonávajú veľmi často. Minimálne raz za každý pracovný deň by sa malo vykonať dôkladné klinické vyšetrenie, ostatné denné pozorovania a príslušné opatrenia majú mať za cieľ obmedziť stratu zvierat pre štúdiu, napríklad autopsiou alebo schladením nájdených uhynutých zvierat, alebo izoláciou, alebo humánnym usmrtením slabých a zomierajúcich zvierat.

Pozorovania by mali zahŕňať zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchania a krvného obehu, autonómneho a centrálného nervového systému, ako aj zmeny somatomotoriky a správania. Mimoriadnu pozornosť treba venovať trasu, dýchaniu, kŕčom, slineniu, hnačkám, letargii, spánku a kóme. Čas smrti sa musí zachytiť čo možno najpresnejšie. Hmotnosť jednotlivých zvierat by sa mala určovať po expozícii týždenne a v čase smrti.

Zvieratá, ktoré uhynuli počas testu, a zvieratá, ktoré prežili až do konca testu, sa pitvú s mimoriadnym ohľadom na všetky zmeny v hornom a dolnom dýchacom trakte. Všetky patologické zmeny sa musia zaprotokolovať. Ak je to potrebné, mali by sa odobrať tkanivá na histopatologické vyšetrenie.

2. ÚDAJE

Údaje by sa mali zhrnúť do tabuľky. Z nej musí vyplývať pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, čas smrti jednotlivých zvierat, počet zvierat s ďalšími príznakmi jedovatého účinku, opis toxických následkov a sekčné nálezy. Zmeny hmotnosti sa musia určiť a zapísať, pokiaľ zvieratá prežijú dlhšie ako jeden deň. Zvieratá, ktoré boli predčasne humánne usmrtené z dôvodu podmienených bolestí a utrpenia látkou, sa zaznamenávajú ako látkou podmienené prípady úmrtia. LC_{50} sa vypočítava uznanou metódou. Vyhodnotenie by malo zahŕňať, ak je to možné, vzťah medzi podanou dávkou, ako aj vznik a stupeň všetkých abnormalít vrátane zmien v správaní, klinických symptómov, ťažkých poškodení, zmien v telesnej hmotnosti, úmrtnosti a iných toxikologických následkov.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- druh zvierat, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.,
- podmienky skúšania: opis expozičného aparátu

vrátane typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému tvorby aerosólov, klimatizačného systému a druhu umiestnenia zvierat v skúšobnej komore. Musia sa opísať prístroje na meranie teploty, vlhkosti vzduchu a koncentrácie aerosólov, ako aj rozdelenie podľa veľkosti častíc.

Expozičné údaje

Tieto údaje sa musia uvádzať v tabuľke a musia sa zobrazit' uvedením stredných priemerných hodnôt a s ohľadom na odchýlky (napr. štandardná odchýlka), a ak je to možné, obsahujú tieto údaje:

- a) prietokové množstvo vzduchu v inhalačnom zariadení;
- b) teplotu a vlhkosť vzduchu;

- c) nominálnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky, ktorá bola daná do inhalačného zariadenia, vydelené objemom vzduchu);
- d) charakteristické vlastnosti vehikula, ak sa použilo;
- e) aktuálnu koncentráciu v dýchacej oblasti;
- f) strednú veľkosť aerodynamických častíc (MMAD) a geometrickú smerodajnú odchýlku (GSD);
- g) čas na nastavenie rovnováhy;
- h) expozičnú dobu;
- údaje o reakcii vo forme tabuľky, podľa pohlavia a koncentrácie (počet zvierat uhynutých a humánne usmrtených počas testu, počet zvierat prejavujúcich príznaky toxicity, počet exponovaných zvierat),
- čas smrti počas alebo po podaní testovanej látky, dôvody a kritériá na predčasné usmrcovanie zvierat,
- všetky pozorovania,
- hodnotu LC_{50} pre každé pohlavie, zistenú na konci pozorovacieho času (s udaním výpočtovej metódy),
- 95 % intervalu spoľahlivosti pre LC_{50} (tam, kde je to možné),
- krivku dávok/úmrtnosti a sklon (tam, kde to metóda stanovenia umožňuje),
- sekčné nálezy,
- všetky histopatologické nálezy,
- diskusiu výsledkov (zvláštnu pozornosť treba venovať vplyvu, aký môže mať predčasné humánne usmrtenie zvierat počas testu na vypočítanú hodnotu LC_{50}),
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.3. AKÚTNÁ TOXICITA (DERMÁLNA)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Testovaná látka sa nanáša na kožu v odstupňovaných dávkach viacerým testovaným skupinám, a to jedna dávka na jednu skupinu. Nakoniec sa registrujú pozorované príznaky otravy a prípady úmrtia. Zvieratá, ktoré uhynú počas testu, ako aj zvieratá, ktoré prežijú do konca testu, sa pitvú.

Zvieratá so silnými a pretrvávajúcimi príznakmi utrpenia a bolesti sa môžu predčasne humánne usmrtiť. Látky, o ktorých je známe, že týmto spôsobom spôsobujú svojimi žieravými alebo dráždivými účinkami výrazné bolesti a utrpenie, sa nemusia testovať.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava**

Pred testom sa zvieratá vo svojich pokusných kliebkach aklimatizujú minimálne päť dní na experimentálne chovateľské a kŕmne podmienky. Pred začatím testu sa zdravé, mladé dospelé zvieratá randomizujú a priradujú k jednotlivým testovaným skupinám. Asi 24 hodín pred začiatkom testu sa strihaním alebo holením odstráni na chrbte pokusných zvierat srst'. Pri strihaní alebo holení treba brať ohľad na to, aby sa nepoškodila koža zvierat, pretože by to viedlo k zmene priepustnosti. Minimálne 10 % plochy tela je potrebné pripraviť na aplikáciu testovanej látky. Ak sa použijú tuhé látky, ktoré možno prípadne rozdrviť na prášok, mala by sa testovaná látka dostatočne navlhčiť vodou alebo prípadne vhodnou pomocnou látkou, aby sa zabezpečil dobrý kontakt s kožou. Pri použití vehikula sa musí zohľadniť jeho vplyv na vnikanie testovanej látky do kože. Tekuté testované látky sa vo všeobecnosti používajú nezriedené.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.1. Pokusné zvieratá**

Môžu sa použiť dospelé potkany alebo králiky. Môžu sa používať aj iné zvieratá, ale ich použitie sa musí zdôvodniť. Je potrebné používať známe kmene pokusných zvierat. Pre každé pohlavie by nemala byť odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu na začiatku testu viac ako $\pm 20\%$ od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

Používajte minimálne 5 zvierat pre každú koncentráciu. Mali by byť rovnakého pohlavia. Ak sa používajú samičky, nesmú byť po vrhu gravidné. Ak existujú informácie o tom, že jedno pohlavie reaguje výrazne citlivejšie, mali by sa používať zvieratá tohto pohlavia.

Poznámka: Pri testoch akútnej toxicity na zvieratách, ktoré patria k vyššiemu rádu ako hlodavce, sa berie ohľad na použitie menšieho počtu zvierat. Dávky by sa mali voliť starostlivo a veľký dôraz by sa mal klásť na to, aby sa neprekročili primerané toxické dávky. Pri takýchto testoch by sa malo zabrániť podávaniu testovanej látky v letálnych dávkach.

1.6.2.3. Veľkosť dávok

Počet veľkostí dávok by mal byť dostatočný, najmenej tri, a dávky by mali byť vhodne odstupňované, aby vznikli skúšobné skupiny s výrazným rozsahom toxických účinkov a mortality. Pri určovaní veľkosti dávok by sa mal zohľadňovať možný žieravý alebo dráždivý účinok. Získané údaje by mali stačiť na zobrazenie krivky o účinku dávky a tam, kde je to možné, aj na prijateľné stanovenie LD₅₀.

1.6.2.4. Limitný test

Môže sa vykonať limitný test s jednou jedinou dávkou minimálne 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti na jednej skupine s 5 samčkami a 5 samičkami pri použití horeopísaného postupu. Ak sa zistia prípady úmrtia podmienené látkou, mal by sa uvážiť kompletný test.

1.6.2.5. Čas pozorovania

Čas pozorovania by mal trvať minimálne 14 dní. Nemal by však byť určený dogmaticky. Musí závisieť od druhu obrazu otravy, časového vzniku symptómov a od trvania zotavovacej fázy. Pozorovací čas sa musí predĺžiť, ak sa to ukáže nevyhnutné. Časový moment, keď vznikajú a odznievajú príznaky otravy, ich trvanie, ako aj čas smrti majú význam hlavne vtedy, ak sú poznateľné príznaky spomalenej úmrtnosti.

1.6.3. Postup

Zvieratá by sa mali chovať v klietkach jednotlivo. Testovaná látka sa nanáša jednotne na oblasť, ktorá zodpovedá asi 10 % plochy tela. Pri veľmi toxických látkach môže byť táto plocha menšia, avšak čo možno najväčšia plocha by mala byť pokrytá čo možno najtenšou a najrovnomernejšou vrstvou.

Testovaná látka musí mať počas expozičnej doby 24 hodín kontakt s kožou prostredníctvom porózneho gázového obväzu a nedráždivej náplaste. Pokusná plocha sa musí okrem toho vhodným spôsobom zakryť, aby sa zafixoval a zaistil gázový obväz a testovaná látka, aby zvieratá nemohli orálne prijímať testovanú látku. Môžu sa použiť aj prostriedky na obmedzenie slobody pohybu, aby zvieratá nemohli orálne prijímať testovanú látku, úplná imobilizácia sa však neodporúča.

Po uplynutí expozičnej doby sa odstránia zvyšky testovanej látky, pokiaľ sa dá, použitím vody alebo iným vhodným postupom na čistenie kože.

Pozorovania sa systematicky zaznamenávajú. Pre každé zviera sa vyhotovujú individuálne záznamy. Prvý deň sa pozorujú zvieratá často. Minimálne raz v pracovný deň by sa malo vykonať starostlivé klinické vyšetrenie. Ostatné denné pozorovania a príslušné opatrenia majú za cieľ obmedziť stratu zvierat pre štúdiu, napr. autopsiou alebo schladením nájdených uhynutých zvierat a izoláciou alebo humánnym usmrtením slabých alebo umierajúcich zvierat.

Pozorovania obsahujú zmeny na srsti, koži, očiach, slizniciach, zmeny dýchania a krvného obehu, autonómneho a centrálného nervového systému, ako aj somatomotoriky a správania. Mimoriadnu pozornosť treba venovať trasu, kŕčom, slineniu, hnačkám, letargii, spánku a kóme. Časový moment smrti sa musí zachytiť čo možno najpresnejšie. Zvieratá, ktoré uhynuli počas testu, a zvieratá, ktoré prežili do konca testu, sa pitvú. Všetky patologické zmeny sa musia zaprotokolovať. Ak je to potrebné, musia sa odobrať tkanivá na histopatologické vyšetrenie.

Vyhodnotenie toxicity u druhého pohlavia

Po ukončení testu so zvieratami jedného pohlavia sa podáva testovaná látka skupine minimálne s 5 zvieratami iného pohlavia, aby sa zistilo, či tieto zvieratá nereagujú citlivejšie na testovanú látku. Za určitých okolností môže byť oprávnené použitie menšieho počtu zvierat. Ak existuje dostatok dôkazov o tom, že zvieratá skúmaného pohlavia reagujú výrazne citlivejšie, možno upustiť od testu zvierat iného pohlavia.

2. ÚDAJE

Údaje sa zhrnú do tabuľky, z nej musí pre každú testovanú skupinu vyplývať počet zvierat na začiatku testu, čas smrti jednotlivých zvierat, počet zvierat prejavujúcich iné známky toxicity, opis toxických účinkov a sekčné nálezy. Hmotnosť jednotlivých zvierat sa stanoví a zaznamená krátko pred aplikáciou testovanej látky, potom v týždenných intervaloch a v čase smrti; zmeny hmotnosti treba stanoviť a zaznamenať, ak zvieratá prežívajú dlhšie než jeden deň. Zvieratá, ktoré boli humánnym spôsobom usmrtené kvôli utrpeniu a bolesti vyvolanej aplikovanou látkou, sa zaznamenávajú ako uhynutie vyvolané látkou. Hodnota LD_{50} sa vypočíta pomocou uznávanej metódy.

Vyhodnotenie údajov by malo, ak je to možné, zahŕňať vzťah medzi podávanou dávkou, ako aj vznik a stupeň všetkých abnormalít vrátane zmien v správaní, klinických symptómov ťažkých poškodení, zmien telesnej hmotnosti, úmrtnosti a iných toxikologických účinkov.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- druh zvierat, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.,
- podmienky skúšania (vrátane postupu čistenia kože a druhu obväzu – okluzívny alebo neokluzívny),
- veľkosti dávky (s vehikulom, ak sa použije, a koncentrácia),
- pohlavie exponovaných zvierat,
- údaje o reakcii vo forme tabuľky, podľa pohlavia a koncentrácie (počet zvierat uhynutých a humánne usmrtených počas testu, počet zvierat prejavujúcich príznaky toxicity, počet exponovaných zvierat),
- čas smrti po aplikácii dávky, dôvody a kritériá na predčasné usmrčovanie zvierat,
- všetky pozorovania,
- hodnotu LC_{50} pre pohlavie, u ktorého bola vykonaná úplná štúdia, stanovená pre 14-dňové pozorovanie, s uvedením metódy stanovenia,
- 95 % intervalu spoľahlivosti pre LC_{50} (tam, kde je to možné),
- krivku dávok/úmrtnosti a sklon tam, kde to metóda stanovenia umožňuje,
- sekčné nálezy,
- všetky histopatologické nálezy,
- výsledky akéhokoľvek testu na iné pohlavie,
- diskusiu o výsledkoch (zvláštnu pozornosť treba venovať vplyvu, aký môže mať predčasné humánne usmrtenie zvierat počas testu na vypočítanú hodnotu LC_{50}),
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.4. AKÚTNA TOXICITA (KOŽNÁ DRÁŽDIVOSŤ)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY**Počiatkové úvahy**

Všetky informácie, ktoré sú k dispozícii o testovanej látke, sa musia starostlivo zohľadniť, aby sa testovanie látok pri podmienkach, ktoré pravdepodobne vedú k silným reakciám, obmedzilo na minimum. Nasledujúce informácie môžu pomôcť pri odpovedi na otázku, či sa má vykonať úplný test, test len na jednom zvierati, alebo či sa nemajú vykonať žiadne ďalšie testy:

- i) Fyzikálno-chemické vlastnosti a chemická reaktivita. Pri veľmi kyslých alebo alkalických látkach (napr. preukázaná hodnota pH 2 alebo nižšia, alebo pH 11,5 alebo vyššia) sa nemusí testovať primárne dráždenie kože, ak sa dajú očakávať žieravé účinky. Taktiež treba zohľadniť alkalickú alebo kyslú rezervu.
- ii) Ak existujú jednoznačné dôkazy o silných účinkoch na základe dobre validovaných testov *in vitro*, nemusí byť potrebné vykonanie úplného testu.
- iii) Výsledky z testov akútnej toxicity. Ak bol vykonaný test akútnej toxicity dermálnej s limitovanou testovanou dávkou látky (2 000 mg/kg telesnej hmotnosti) a nepozorovalo sa žiadne dráždenie kože, môže sa za určitých okolností ukázať ďalší test na dráždenie kože ako nepotrebný a ani testovanie látok, ktoré sa pri dermálnom podávaní ukázali ako veľmi toxické, nie je potrebné.

Testovaná látka sa nanáša jednorazovou dávkou na kožu viacerých testovaných zvierat, pričom každé zviera slúži ako vlastná kontrola. Stupeň podráždenia sa po určenom čase určí a vyhodnotí a nakoniec opíše, aby sa mohlo vykonať rozsiahle posúdenie účinkov.

Zvieratá so silnými a pretrvávajúcimi príznakmi utrpenia a bolesti sa môžu predčasne humánne usmrtiť.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava**

Asi 24 hodín pred testom sa srsť na chrbte testovaných zvierat ostríhá alebo oholí.

Pri strihaní alebo holení srsti treba dbať na to, aby sa nepoškodila koža. Môžu sa používať len zvieratá so zdravou, nepoškodenou kožou.

Niektoré rasy králikov majú miesta s hustým zarastením kože, ktoré sa v určitých obdobiach roka prejavia výraznejšie. Testované látky sa nesmú nanášať na tieto husto zarastené miesta.

Ak sa realizuje test s tuhými látkami (ktoré sa v prípade potreby zomelú na jemný prášok), musí sa testovaná látka dostatočne navlhčiť vodou alebo pomocnou látkou, aby sa zabezpečil dobrý kontakt s kožou. Pri použití vehikula sa musí brať ohľad na jeho vplyv na dráždenie kože. Kvapalné testované látky sa používajú vo všeobecnosti neriedené.

1.6.2. Podmienky skúšania

1.6.2.1. Pokusné zvieratá

Hoci sa môžu používať rôzne druhy cicavcov, uprednostňuje sa králik-albín.

1.6.2.2. Počet zvierat

Ak sa na základe výsledkov predbežných testov *in vitro* alebo iných úvah predpokladá, že látka môže spôsobovať nekrózy (t. j. že je žieravá), mal by sa zväziť test len s jedným zvieraťom. Ak výsledky tohto testu nevykazujú žiadny žieravý účinok, mal by sa tento test uzavrieť minimálne s dvoma ďalšími zvieratami.

Pre úplný test sú potrebné minimálne tri zdravé dospelé zvieratá. Nie sú potrebné žiadne ďalšie zvieratá pre neexponovanú kontrolnú skupinu. Na vysvetlenie pochybných reakcií môžu byť potrebné dodatočné zvieratá.

1.6.2.3. Veľkosť dávky

Ak neexistujú žiadne mimoriadne dôvody, nanáša sa dávka 0,5 ml tekutej látky alebo 0,5 g tuhej alebo polotuhej látky na pripravenú plochu kože. Hraničné miesta neexponovanej kože každého zvieraťa slúžia ako kontrola pre test.

1.6.2.4. Čas pozorovania

Čas pozorovania by sa nemal určovať dogmaticky. Musí trvať dostatočne dlho, aby sa dala dokonale posudzovať reverzibilita alebo ireverzibilita pozorovaných účinkov, za normálnych okolností nemusí prekročiť 14 dní po aplikácii.

1.6.3. Postup

Zvieratá sa majú uchovávať jednotlivo v kliebkach. Testovaná látka sa nanáša na malú plochu kože (asi 6 cm²) a musí sa prikryť gázou, ktorá je prichytená náplastou, ktorá nedráždi kožu. V prípade kvapalín alebo niektorých pást môže byť potrebné položiť látku najprv na gázu a potom pripevniť na kožu. Počas trvania expozície by sa mala gáza voľne pridržiavať na koži pomocou vhodného okluzívneho alebo semiokluzívneho obväzu. Treba zabrániť tomu, aby sa zviera dostalo ku gázovému obväzu a aby orálne prijalo alebo inhalovalo testovanú látku.

Po uplynutí expozičnej doby sa odstráni zvyšok testovanej látky, ak je to možné, vodou alebo vhodným rozpúšťadlom bez toho, aby sa znížila reakcia alebo integrita epidermy.

Expozičná doba trvá za normálnych okolností štyri hodiny.

Ak existuje podozrenie, že testovaná látka spôsobí nekrózu (t. j. že je žieravá), mala by sa expozičná doba skrátiť (napr. na jednu hodinu alebo tri minúty). Takýto test sa môže vykonať prípadne najprv na jednom zvierati, ktorému sa, ak to nie je vylúčené z dôvodu akútnej dermálnej toxicity testovanej látky, súčasne aplikujú tri gázové tampóny. Prvý tampón sa odstráni po troch minútach. Ak sa nepozoruje žiadna ťažká reakcia kože, odstráni sa druhý tampón po hodine. Ak pozorovania v tomto časovom rozmedzí ukážu, že je potrebná štvorhodinová expozícia a že sa môže vykonať spôsobom chrániacim zviera, odstráni sa po štyroch hodinách tretí tampón a reakcia sa vyhodnotí.

V takom prípade (t. j. ak bola možná štvorhodinová expozícia) by sa mal test uzavrieť pri použití minimálne ďalších dvoch zvierat, iba ak takémuto testu protirečia etické názory (napr. ak sa po štvorhodinovej expozícii zistí nekróza).

Ak po troch minútach alebo po jednej hodine nastane prudká reakcia kože (napr. nekróza), test sa musí okamžite ukončiť.

Dlhšie expozičné doby sa môžu ohlásiť za určitých predpokladov, napr. očakávaným použitím alebo expozíciou u človeka.

1.6.3.1. Pozorovanie a vyhodnotenie

U zvierat sa pozorujú príznaky erytémov a edémov, pričom sa vyhodnocuje reakcia 60 minút a potom 24, 48 a 72 hodín po odstránení gázového tampónu. Reakcia kože sa určí a zapíše podľa škály v tabuľke. Ďalšie pozorovania sú potrebné, ak sa reverzibilita úplne nepreukázala do 72 hodín. Popri pozorovaniach dráždenia kože sa musia kompletne opísať všetky závažné zmeny, ako napr. poleptanie kože (nezvratné zmeny kože) a iné toxické účinky.

Na vysvetlenie pochybných reakcií, ktoré sú prekryté sfarbením kože testovanou látkou, sa môžu použiť také postupy ako napr. histopatologické vyšetrenie alebo meranie hrúbky vrások.

2. ÚDAJE

Údaje sa zhrnú do tabuľky. Z nej musí pre každé testované zviera vyplývať stupeň podráždenia posúdením erytémov a edému počas pozorovacieho času. Ťažké poškodenia, posúdenie stupňa a druhu podráždenia kože, reverzibility alebo žieravého účinku a všetky ostatné toxické účinky sa musia tiež zaznamenať.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, ak je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- druh zvierat, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.,
- podmienky skúšania (vrátane relevantných fyzikálno-chemických vlastností testovanej látky, postupu pri príprave a čistení kože a druhu obväzu: okluzívny alebo semiokluzívny),
- údaje o reakcii na podráždenie kože u každého jednotlivého zvieraťa pri každom pozorovaní (napr. za 1, 24, 48 a 72 hodín atď. po odstránení gázového obväzu) vo forme tabuľky,
- opis všetkých zistených vážnych zmien (lézií) vrátane žieravého účinku,
- opis stupňa a charakteru pozorovaného podráždenia a prípadne histopatologických nálezov,
- opis všetkých ostatných toxických účinkov, iných ako podráždenie kože,
- diskusiu o výsledkoch,
- vyhodnotenie výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

Dodatok

TABUĽKA: STUPNICA VYHODNOCOVANIA KOŽNEJ REAKCIE

Tvorba erytému a chrasty

	Hodnota
Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva vnímateľný)	1
Zreteľne viditeľný erytém	2
Mierny až ťažký erytém	3
Ťažký erytém (silné začervenanie) alebo tvorba chrasty (hlboké poranenia), znemožňujúce posúdenie erytému	4

Tvorba edému

Žiadny edém	0
Veľmi ľahký edém (sotva vnímateľný)	1
Ľahký edém (okraje plochy sú zreteľné, plocha je ohraničená zreteľným vyvýšením)	2
Mierny edém (okraje plochy sú vyvýšené asi o 1 mm)	3
Ťažký edém (zdurené vyššie ako 1 mm a presahujúce za hranice exponovanej plochy)	4

B.5. AKÚTNÁ TOXICITA (OČNÁ DRÁŽDIVOSŤ)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Počiatočné úvahy

Všetky informácie, ktoré sú k dispozícii o testovanej látke, sa musia starostlivo brať do úvahy, aby sa na minimum obmedzilo testovanie látok pri podmienkach, ktoré pravdepodobne vedú k silným reakciám. Z tohto hľadiska môžu byť užitočné tieto informácie:

- i) Fyzikálno-chemické vlastnosti a chemická reaktivita. Veľmi kyslé alebo alkalické skúšobné látky, ktoré majú hodnotu pH 2 alebo nižšiu, alebo pH 11,5 alebo vyššiu, sa nemusia testovať, ak sa dajú predpokladať silné poškodenia. Alkalická alebo kyslá rezerva sa musí tiež zohľadniť.

- ii) Výsledky z dobre validovaných alternatívnych štúdií látky, ktoré vykázali žieravé alebo silno dráždivé vlastnosti, by sa nemali ďalej testovať na dráždivosť očí, pretože sa môže vychádzať z toho, že takéto látky môžu v teste, v ktorom sa aplikovala táto metóda, vyvolať silné účinky na očiach.
- iii) Výsledky zo štúdií na podráždenosť kože. Látky, ktorých žieravé alebo silnodráždivé vlastnosti boli v štúdií na podráždenie kože jednoznačne podložené, sa nemusia ešte špeciálne testovať na dráždivosť očí, pretože sa vychádza z toho, že takéto testované látky môžu vyvolávať silné účinky na očiach.

Testovaná látka sa podáva u každého zvieraťa jednorazovou dávkou do jedného oka, neošetrené oko slúži ako kontrola. Druh podráždenia sa meria v určitých časových intervaloch, vyhodnocuje a nakoniec opisuje, aby sa mohlo vykonať kompletne posúdenie účinku. Čas pozorovania by sa mal odmerať tak, aby sa dala úplne zhodnotiť reverzibilita alebo ireverzibilita vzniknutého účinku.

Zvieratá prejavujúce silné a pretrvávajúce známky utrpenia a bolesti sa môžu predčasne humánne usmrtiť.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. **Príprava**

U každého predbežne vybraného pokusného zvieraťa sa 24 hodín pred testom vyšetrí obidve oči. Zvieratá, u ktorých sa zistí podráždenie očí, očná chyba alebo poškodenie rohovky, sa z testu vylúčia.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

1.6.2.1. *Pokusné zvieratá*

Hoci sa môžu používať rozličné druhy pokusných zvierat, odporúča sa test vykonať s použitím zdravého dospelého kráľika-albína.

1.6.2.2. *Počet zvierat*

Malo by sa uvažovať o teste s jedným testovaným zvieraťom, ak sa dajú predpokladať výrazné účinky. Ak výsledok tohto testu na králikovi poukazuje na to, že látka pôsobí pri použití opísaného postupu silno dráždivo (reverzibilný účinok) alebo žieravo (nereverzibilný účinok) na oči, možno upustiť od testu očnej dráždivosti na ďalších zvieratách. Príležitostne možno vykonať ďalší test na dodatočných zvieratách na vyšetrovanie špeciálnych aspektov.

V prípade testov s viac ako jedným zvieraťom sa musia použiť minimálne tri zvieratá. Ďalšie zvieratá môžu byť potrebné na vysvetlenie nejasných nálezov.

1.6.2.3. *Veľkosť dávky*

Na testovanie kvapalín sa používa dávka 0,1 ml. V prípade tuhých látok, pást a partikulárnych látok by malo mať použité množstvo objem 0,1 ml alebo hmotnosť 0,1 g testovanej látky (hmotnosť sa musí vždy zaznamenať). Ak ide o tuhú alebo hrubozrnnú látku, musí sa rozomlieť na prach. Objem partikulárnych látok sa určuje až po opatrnom zhutňovaní, napr. trepaním meracej nádoby.

U látok prítomných v aerosólových rozstrekovačoch s čerpadlom alebo pod tlakom sa kvapalina vypudí a 0,1 ml látky sa zhromaždí a instiluje do oka podľa opisu pre kvapaliny.

1.6.2.4. *Čas pozorovania*

Čas pozorovania by sa nemal určovať dogmaticky. Musí byť dostatočne dlhý, aby sa dala vyhodnotiť reverzibilita alebo ireverzibilita pozorovaných účinkov, ale za normálnych okolností nemusia prekročiť 21 dní po aplikácii instilácii.

1.6.3. Postup

Zvieratá by sa mali chovať jednotlivo v kliebkach. Testovaná látka sa aplikuje do slzného vaku spojivky jedného oka každého zvieraťa po ľahkom nadvihnutí viečka od očnej guľe. Viečka sa potom asi na sekundu ľahko stlačia, aby sa zabránilo vytečeniu testovanej látky. Druhé, neošetrené oko slúži ako kontrola.

Ak sa dá predpokladať, že látka môže spôsobiť nepomerne silné bolesti, môže sa pred aplikáciou testovanej látky použiť lokálne anestetikum. Druh, koncentrácia a čas aplikácie lokálneho anestetika sa musia zvoliť veľmi starostlivo, aby sa zabezpečilo, že jeho použitím nevzniknú žiadne významné rozdiely v reakcii na testovanú látku. Neošetrené oko by sa malo umŕtviť podobným spôsobom.

Oči testovaných zvierat by sa nemali vymyť skôr ako 24 hodín po aplikácii. Po 24 hodinách sa môže vykonať výplach očí, ak sa to považuje za vhodné.

Pre látky, ktoré pri tomto testovanom postupe spôsobujú podráždenie, sa môžu indikovať dodatočné testy na králikovi, pri ktorých sa mu oči vypláchnu krátko po aplikácii testovanej látky. V takýchto prípadoch sa odporúča použiť troch králikov. Pol minúty po nakvapkaní látky sa oči králika vymývajú pol minúty, pričom sa množstvo a rýchlosť toku volí tak, aby nedošlo k žiadnemu poraneniu.

1.6.3.1. Pozorovanie a vyhodnotenie

Oči sa musia vyšetriť po 1, 24, 48 a 72 hodinách. Ak sa po 72 hodinách neprejavia žiadne očné lézie, môže sa test ukončiť.

Čas pozorovania treba predĺžiť, pokiaľ pretrvávajú postihnutie rohovky alebo iné príznaky podráždenia oka, aby sa posúdil vývoj zmien a ich reverzibilita alebo ireverzibilita. Popri pozorovaní rohovky, dúhovky a spojivky sa zaznamenávajú a uvedú aj iné zistené lézie. Stupeň reakcie oka treba pri každom vyšetrení zaznamenať (podľa tabuľky). (Vyhodnotenie reakcie oka pripúšťa rôzne možnosti interpretácie. Ako pomôcka pre skúšobné laboratóriá a pre tých, ktorí vykonávajú interpretáciu pozorovaní, môžu poslúžiť ilustrované pokyny na vyhodnocovanie očnej dráždivosti.)

Zisťovanie reakcií sa môže uľahčiť použitím binokulárnej lupy, ručnej štrbinovej lampy, očného mikroskopu alebo iných vhodných zariadení. Po zapísaní pozorovaní po 24 hodinách sa môžu oči jedného alebo všetkých králikov vyšetriť s fluoresceínom.

2. ÚDAJE

Údaje sa zhrnú do tabuľky, pričom sa pre každé jednotlivé zviera uvedie stupeň podráždenia v určenom čase pozorovania. Uvedie sa opis stupňa a povahy podráždenia, prítomnosť závažných lézií a všetky mimoočné účinky, ktoré boli pozorované.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- údaje o zvieratách (druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.),
- podmienky skúšania (vrátane relevantných fyzikálno-chemických vlastností testovanej látky),
- vo forme tabuľky údaje o dráždivých/žieravých účinkoch u jednotlivých zvierat v časových intervaloch pozorovania (napr. po 1, 24, 48 a 72 hodinách),
- opis všetkých zistených závažných lézií,
- podrobný opis stupňa a druhu zisteného podráždenia alebo žieravého účinku vrátane postihnutej oblasti rohovky a reverzibility,

- opis metódy na vyhodnotenie podráždenia po 1, 24, 48 a 72 hodinách (napr. ručná štrbinová lampa, očný mikroskop, fluoresceín),
 - opis ostatných zistených mimoočných lokálnych účinkov,
 - diskusiu o výsledkoch,
 - vyhodnotenie výsledkov.
- 3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA
- Pozri všeobecný úvod, časť B (D).
4. **ODKAZY**
- Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

Dodatok

STUPNICA OČNÝCH LÉZIÍ

Rohovka

Nepriehľadnosť: stupeň nepriehľadnosti (vyšetria sa najviac nepriehľadné oblasti)

Nepriehľadnosť nie je prítomná	0
Rozptýlené alebo difúzne oblasti nepriehľadnosti (iné ako slabé zastrenie normálneho lesku), detaily dúhovky jasne viditeľné	1
Ľahko identifikovateľná priehľadná oblasť, detaily dúhovky ľahko zastreté	2
Prítomnosť zóny opalescencie, detaily dúhovky nie sú viditeľné, obrys zrenice sotva viditeľný	3
Úplná nepriehľadnosť rohovky, dúhovka nie je vôbec viditeľná	4

Dúhovka

Normálna	0
Nepravidelná štruktúra dúhovky, prekrvenie, opuchy, prekrvenie alebo nastrieknutie ciev okolo rohovky, akákoľvek kombinácia uvedených účinkov, reakcia na svetlo je zachovaná (prípadne omeškaná)	1
Reakcia na svetlo nie je prítomná, hemoragia a rozsiahle poškodenie (jeden alebo všetky uvedené účinky)	2

Spojivka

Začervenanie [poľa najzávažnejšej zmeny pozorovanej na viečkovej (palpebrálnej) alebo bulbárnej spojivke v porovnaní s kontrolným okom]

Cievna kresba normálna	0
Nastrieknutie niektorých ciev výraznejšie	1
Ťažké rozlíšenie jednotlivých ciev, difúzna karmínovočervená farba	2
Difúzna sýtočervená farba	3
<i>Opuch: viečka a/alebo niktiačných membrán</i>	
Opuch nie je prítomný	0
Všetky opuchy nad normálom (vrátane niktiačných membrán)	1
Výrazný opuch s čiastočnou everziou (vyvrátením) viečka	2
Opuch spôsobujúci uzavretie viečok na polovicu	3

B.6. SENZIBILIZÁCIA POKOŽKY**1. METÓDA****1.1. ÚVOD****POZNÁMKY**

Citlivosť a schopnosť testov zistiť potenciál senzibilizátorov ľudskej pokožky sa považujú v systéme klasifikácie toxicity v spojitosti s ochranou verejného zdravia za dôležité faktory.

Neexistuje žiadna jednorazová testovacia metóda, ktorá by dostatočne identifikovala všetky látky s potenciálnym senzibilizačným účinkom na ľudskú pokožku a ktorá by bola vhodná pre všetky látky.

Pri voľbe testu sa berú do úvahy také faktory, ako sú fyzikálne vlastnosti látky, vrátane jej schopnosti prenikať do pokožky.

Vyvinuli sa dva typy testov, pri ktorých sa používajú morčatá, a to testy s adjuvansom, v ktorých je alergický stav zosilňovaný rozpustením alebo suspendovaním látky v kompletnom Freundovom adjuvansu (FCA), a testy bez pomocnej látky.

Testy s adjuvansmi sú pravdepodobne presnejšie v predpovedaní pravdepodobného senzibilizačného účinku látky na ľudskú pokožku než metódy bez použitia Freundovho kompletného adjuvansu, a preto sa aj uprednostňujú.

Často používaným typom adjuvansového testu je maximalizačný test na morčatách (GPMT). Hoci sa na zistenie potenciálu látky spôsobujúcej precitlivosť pokožky používajú aj iné metódy, GPMT sa medzi adjuvansovými metódami uprednostňuje.

Pri väčšine skupín chemických látok sa neadjuvansové metódy (uprednostňuje sa Buehlerov test) považujú za menej citlivé.

V určitých prípadoch môžu existovať príčiny pre výber Buehlerovho testu, v ktorom sa využíva miestna aplikácia namiesto intradermálneho vstrekovania využívaného maximalizačným testom na morčatách (GPMT). Pri použití Buehlerovho testu je nevyhnutné vedecké zdôvodnenie jeho použitia.

V tejto metóde je opísaný maximalizačný test na morčatách (GPMT) a Buehlerov test. Iné metódy sa môžu použiť za predpokladu, že sú dostatočne validované a vedecky zdôvodnené.

Bez ohľadu na použité metódy musí sa citlivosť kmeňa morčiat použitého na testovanie senzibilizácie pokožky v pravidelných (šestimesačných) intervaloch kontrolovať s použitím známych miernych až stredne silných senzibilizujúcich látok a musí sa získať dostatočný počet pozitívnych reakcií.

Pozri aj všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJEM

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Odporúčajú sa tieto látky, podľa potreby zriadené, ako aj akékoľvek ďalšie senzibilizujúce látky uvedené v literatúre alebo patriace do skupiny testovanej látky.

— p-fenyléndiamín
— 2,4-dinitrochlórbenzén
— dichróman didraselný
— neomycínsulfát
— síran nikelnatý

číslo CAS 106503
číslo CAS 97-00-7
číslo CAS 7778-50-9
číslo CAS 1405-10-3
číslo CAS 7786-81-4

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNÝCH METÓD

Po počiatočnej expozícii testovanej látky („indukčné“ obdobie) sú zvieratá približne dva týždne po poslednej indukčnej expozícii podrobia „provokačnej“ dávke testovanej látky s cieľom zistiť, či bol vyvolaný stav precitlivenosti. Senzibilizácia sa stanoví skúmaním kožnej reakcie na provokačnú expozíciu.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNÝCH METÓD

1.6.1. **Maximalizačný test na morčatách (GPMT)**1.6.1.1. *Príprava*

Vykoná sa náhodný výber zdravých mladých albinotických morčiat, ktoré sa zaradia do jednotlivých pokusných a kontrolných skupín. Pred aplikáciou látky sa v lopatkovej oblasti odstráni srst strihaním alebo holením. Treba dbať na to, aby nedošlo k poškodeniu kože.

1.6.1.2. *Podmienky skúšania*

1.6.1.2.1. Pokusné zvieratá

Použijú sa bežne používané laboratórne albinotické kmene morčata s hmotnosťou menšou ako 500 g.

1.6.1.2.2. Počet a pohlavie

Možno použiť samcov aj samice. Ak sa použijú samice, musia byť nezapustené a nesmú byť gravidné. V exponovanej skupine sa použije minimálne 10 zvierat a v kontrolnej skupine najmenej 5 zvierat. Použitie menšieho počtu zvierat sa musí zdôvodniť. V prípade nejasných výsledkov môže byť histopatologickým vyšetrením uľahčené rozhodnutie, či sa má test zopakovať s ďalšou sadou zvierat.

Ak nie je možné dospieť ku konečnému záveru, či látka je, alebo nie je senzibilizujúca, odporúča sa vykonať test s ďalšími zvieratami, tak aby bolo v experimentálnej skupine celkom 20 zvierat a v kontrolnej skupine 10 zvierat.

1.6.1.2.3. Veľkosti dávok

Koncentrácia testovanej látky sa upraví na úroveň, ktorá vyvoláva isté známky podráždenia kože, ale ktorú zvieratá dobre znášajú v každej indukčnej fáze.

Ako provokačná koncentrácia sa použije maximálna koncentrácia, ktorá u nesenzibilizovaných zvierat nevyvoláva žiadne podráždenie kože.

Tieto koncentrácie možno stanoviť v obmedzenej predbežnej štúdii (na dvoch alebo troch zvieratách).

1.6.1.2.4. Doba pozorovania

Počas indukčného obdobia sa vykonávajú pozorovania s cieľom zistiť možné dráždivé účinky. Po ukončení provokačnej expozície sa 24 a 48 hodín po odstránení náplasti zaznamená reakcia kože.

1.6.1.3. *Postup*

Zvieratá sa odvážia pred začatím testu a po jeho ukončení. Z lopatkovej oblasti sa odstráni srst. Postup má dve štádiá:

1.6.1.3.1. Indukcia

0. deň – exponovaná skupina

Nasledujúce dvojice subkutánných injekcií, každá po 0,1 ml, sa symetricky podľa stredovej čiary podávajú do lopatkovej oblasti zbavenej srsti:

Injekcia 1:	0,1 ml Freundovho kompletného adjuvansu (FCA) zmiešaného s vodou alebo fyziologickým roztokom v pomere 1: 1.
Injekcia 2:	0,1 ml testovanej látky, podľa potreby vo vhodnom vehikule.
Injekcia 3:	0,1 ml testovanej látky v FCA.

Pri injekcii 3 sa látky rozpustné vo vode rozpustia v 0,05 ml vody a 0,05 ml nezriedeného FCA. Látky rozpustné v tukoch alebo nerozpustné látky sa zmiešajú s nezriedeným FCA.

Konečná koncentrácia testovanej látky pre injekciu 3 má byť rovnaká ako pre injekciu 2.

Injekcie 1 a 2 sa aplikujú blízko seba a čo najbližšie k hlave, zatiaľ čo injekcia 3 smerom ku kaudálnej časti skúšobnej plochy.

0. deň – kontrolná skupina

Nasledujúce dvojice subkutánných injekcií sa podávajú do rovnakých miest ako u exponovaných zvierat:

Injekcia 1:	0,1 ml Freundovho kompletného adjuvansu (FCA) zmiešaného s vodou alebo fyziologickým roztokom v pomere 1: 1.
Injekcia 2:	0,1 ml samotného vehikula.
Injekcia 3:	0,1 ml vehikula v FCA.

6. deň – kontrolná a exponovaná skupina

Ak látka nedráždi kožu, natrie sa testovacia plocha po ostrihaní a/alebo oholení 0,5 ml 10 % nátrium-dodecylsulfátu vo vazelíne s cieľom vyvolania miestneho podráždenia.

7. deň – exponovaná skupina

Testovacia plocha sa opäť zbaví srsti. Testovanou látkou vo vhodnom vehikule (voľba vehikula by mala byť zdôvodnená; tuhé látky sa jemne rozomelú a vmiešajú do vhodného vehikula; kvapaliny možno aplikovať priamo) sa napustí filtračný papier (2 × 4 cm), ktorý sa priloží na testovaciu plochu a udržiava sa v styku s kožou pomocou okluzívneho obväzu 48 hodín.

7. deň – kontrolná skupina

Testovacia plocha sa opäť zbaví srsti. Samotné vehikulum sa podobným spôsobom naniesie na testovaciu plochu a udržiava sa na nej pomocou okluzívneho obväzu 48 hodín.

1.6.1.3.2. P r o v o k á c i a

21. deň

Boky exponovaných aj kontrolných zvierat sa zbavia srsti. Na jeden bok zvieraťa sa aplikuje testovaná látka na náplasti alebo v komôrke a na druhý bok sa rovnakým spôsobom aplikuje samotné vehikulum.

Náplasti sa udržiavajú v styku s kožou pomocou okluzívneho obväzu 24 hodín.

Kontrolná skupina sa exponuje rovnakým spôsobom.

23. a 24. deň

- 21 hodín po odstránení náplastí sa provokačná plocha vyčistí, podľa potreby sa z nej odstráni srst',
- o tri hodiny neskôr (48 hodín od začiatku aplikácie provokačnej dávky) sa vykoná pozorovanie a zaznamená sa kožná reakcia,
- 24 hodín (po 72 hodinách) po tomto pozorovaní sa vykoná druhé pozorovanie a zaznamená sa.

Na účely objasnenia výsledkov získaných pri prvej provokácii by sa mala zvážiť možnosť vykonania druhej provokácie, a to približne o týždeň neskôr a podľa potreby s novou kontrolnou skupinou exponovanou výlučne vehikulu.

1.6.1.3.3. Pozorovanie a vyhodnotenie

Všetky kožné reakcie a neobvyklé nálezy, ktoré sú dôsledkom indukčných a provokačných postupov, sa zaznamenávajú a uvedú v správe.

Na objasnenie pochybných reakcií alebo účinkov maskovaných zafarbením kože testovanou látkou možno použiť také techniky, ako je histopatologické vyšetrenie alebo meranie hrúbky kožnej vrstvy.

1.6.2. Böhlerov test

1.6.2.1. Príprava

Vykoná sa náhodný výber zdravých mladých albinotických morčiat, ktoré sa zaradia do jednotlivých pokusných a kontrolných skupín. Pred aplikáciou látky sa v lopatkovej oblasti odstráni srst' strihaním alebo holením. Treba dbať na to, aby nedošlo k poškodeniu kože.

1.6.2.2. Testovacie podmienky

1.6.2.2.1. Pokusné zvieratá

Použijú sa bežne používané laboratórne albinotické kmene morčata s hmotnosťou menšou ako 500 g.

1.6.2.2.2. Počet a pohlavie

Možno použiť samcov aj samice. Ak sa použijú samice, musia byť nezapustené a nesmú byť gravidné. V exponovanej skupine sa použije minimálne 20 zvierat a v kontrolnej skupine najmenej 10 zvierat. Použitie menšieho počtu zvierat sa musí zdôvodniť. V prípade nejasných výsledkov môže byť histopatologickým vyšetrením uľahčené rozhodnutie, či sa má test zopakovať s ďalšou sadou zvierat.

1.6.2.2.3. Veľkosti dávok

Koncentrácia testovanej látky sa pre každú indukčnú fázu upraví na najvyššiu úroveň, ktorú zvieratá dobre systémovo znášajú a ktorá v prípade dráždivých látok vyvoláva u väčšiny zvierat mierne až stredné podráždenie. Ako provokačná koncentrácia sa použije maximálna koncentrácia, ktorá u nesenzibilizovaných zvierat nevyvoláva podráždenie kože. Tieto koncentrácie možno stanoviť v obmedzenej predbežnej štúdií (na dvoch alebo troch zvieratách).

1.6.2.2.4. Doba pozorovania

V priebehu indukčného obdobia sa vykonávajú pozorovania s cieľom zistiť možné dráždivých účinky. Po ukončení provokačnej expozície sa 24 hodín a 48 hodín po odstránení náplasti, t. j. 30 a 54 hodín po začiatku aplikácie, zaznamenáva reakcia kože.

1.6.2.3. Postup

Zvieratá sa odvážia pred začatím testu a po jeho ukončení.

Postup má dve štádiá:

1.6.2.3.1. Indukcia

0. deň – exponovaná skupina

Jeden bok sa zbaví srsti. Tampón sa nasýti 0,5 ml testovanej látky vo vhodnom vehikule (voľba vehikula by sa mala zdôvodniť; ak je to vhodné, možno kvapaliny aplikovať priamo). Aplikuje sa priamo na testovaciu plochu a udržiava sa v styku s kožou okluzívnou náplastou alebo komôrkou a vhodným obvazom 6 hodín.

0. deň – kontrolná skupina

Jeden bok sa zbaví srsti. Samotné vehikulum sa podobným spôsobom nanesie na testovaciu plochu. Udržiava sa v styku s kožou okluzívnou náplastou alebo komôrkou a vhodným obvazom 6 hodín.

7. a 14. deň

Rovnaká aplikácia ako v 0. deň sa na rovnakej skúšobnej ploche (podľa potreby zbavenej srsti) vykoná v 7. a 14. deň.

1.6.2.3.2. Provokácia

28. deň

Druhý bok exponovaných a kontrolných zvierat sa zbaví srsti. Okluzívna náplast alebo komôrka obsahujúca 0,5 ml testovanej látky v maximálnej nedráždivej koncentrácii sa aplikuje na zadnú časť boku exponovaných zvierat. Na prednú časť boku sa taktiež aplikuje okluzívna náplast alebo komôrka len so samotným vehikulom.

Okluzívne náplaste sa udržiavajú v styku s kožou vhodným obvazom 6 hodín.

Expozícia kontrolnej skupiny sa vykoná rovnakým spôsobom.

29. a 30. deň

- 21 hodín po odstránení náplasti sa exponovaná plocha vyčistí, podľa potreby sa z nej odstráni srst,
- o tri hodiny neskôr (30 hodín po začiatku aplikácie provokačnej dávky) sa vykoná pozorovanie reakcie kože a zaznamená sa,
- 24 hodín po tomto pozorovaní (po 54 hodinách od začiatku aplikácie provokačnej dávky) sa vykoná druhé pozorovanie a zaznamená sa.

1.6.2.3.3. Pozorovanie a vyhodnotenie

Všetky kožné reakcie a neobvyklé nálezy, ku ktorým došlo v dôsledku indukčných a provokačných postupov, sa zaznamenajú a uvedú v správe.

Na objasnenie pochybných reakcií alebo účinkov maskovaných sfarbením kože testovanou látkou možno použiť také techniky, ako je histopatologické vyšetrenie alebo meranie hrúbky kožnej vrásky.

2. ÚDAJE (test GPMT a Buehlerov test)

Údaje sa zhrnú do tabuľky, pričom sa pre každé zviera uvedie reakcia kože pri každom pozorovaní.

3. SPRÁVA (test GPMT a Buehlerov test)

3.1. SPRÁVA Z TESTU (test GPMT a Buehlerov test)

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- použitý kmeň morčiat,
- podmienky skúšania, koncentrácie vehikula a testovanej látky použité pri indukcii a provokácii,

- počet, vek a pohlavie zvierat,
- hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku a na konci testu,
- každé pozorovanie vykonané na každom zvierati vrátane systému vyhodnocovania, ak sa použil,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA (test GPMT a Buehlerov test)

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.7. TOXICITA PO 28-DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE (ORÁLNA)

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Niekoľkým skupinám experimentálnych zvierat sa denne orálne aplikuje testovaná látka v odstupňovaných dávkach spôsobom, pri ktorom sa každej skupine podáva jedna dávka počas 28-dňového obdobia. Počas obdobia podávania sa zvieratá denne pozorujú s cieľom zistiť znaky toxicity. Pitva sa uskutoční na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas testovania, ako aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. **Príprava**

Najmenej päť dní pred začatím testu sa zvieratá chovajú v takých podmienkach chovu a kŕmenia, v akých budú aj počas testu. Pred začatím testu sa vykoná náhodný výber zdravých mladých zvierat, ktoré sa zaradia do pokusných skupín. Testovanú látku možno podávať potravou, gavážou, v kapsliach alebo v pitnej vode. Všetkým zvieratám by sa mali dávky podávať počas celého pokusného obdobia rovnakou metódou. Ak sa na uľahčenie podávania dávok použilo vehikulum alebo iné prísady, malo by o nich byť známe, že nemajú toxické účinky. V prípade potreby možno použiť už existujúce údaje.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.4.2.1. Pokusné zvieratá**

Ak neexistujú dôvody proti, uprednostňovaným druhom je potkan. Používajú sa mladé zdravé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov a s podávaním látky by sa malo najlepšie začať, pokiaľ sú potkany mladšie ako šesť týždňov a v každom prípade nie staršie ako osem týždňov.

Na začiatku testu by nemalo rozpätie odchýlok hmotností použitých zvierat prekročiť ± 20 % príslušnej strednej hodnoty.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

Pre každú veľkosť dávky sa použije najmenej 10 zvierat (päť samičiek a päť samcov). Samičky musia byť nezapustené a nesmú byť gravidné. Ak sa medzitým plánuje usmrcovanie zvierat, ich množstvo sa zvyšuje o plánovaný počet zvierat, ktoré sa usmrtia pred ukončením štúdie. Môže sa použiť sprievodná skupina najviac 10 zvierat (päť z každého pohlavia), ktorej sa aplikuje vyššia dávka počas 28 dní a sleduje sa reverzibilita, perzistencia alebo oneskorenie toxických účinkov počas 14 dní po ukončení aplikácie. Takisto sa používa sprievodná skupina 10 kontrolných zvierat (päť z každého pohlavia).

1.6.2.3. Veľkosti dávok

Bežne sa používajú tri testované a jedna kontrolná skupina. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej látky. Ak sa pri aplikovaní testovanej látky používa vehikulum, kontrolná skupina ho musí dostať v najvyššom objeme, v akom sa používa v testovaných skupinách. Maximálna veľkosť dávky by mala mať za následok toxické účinky, ale nemala by spôsobiť žiadne uhynutie, alebo by mala mať za následok malý počet uhynutí. Minimálna veľkosť dávky by nemala vyvolať žiadne známky toxicity. Ak je k dispozícii použiteľný odhad expozície človeka, mala by ju minimálna veľkosť dávky prekračovať. V ideálnom prípade by mala stredná veľkosť dávky vyvolať minimálne pozorovateľné toxické účinky. Ak sa použije viac ako jedna stredná veľkosť dávky, mali by sa veľkosti líšiť tak, aby vyvolali odstupňované toxické účinky. V skupinách s minimálnou a strednou veľkosťou dávky a v kontrolnej skupine by mal byť výskyt uhynutí nízky, aby bolo možné vykonať zmysluplné hodnotenie výsledkov.

Ak sa testovaná látka podáva v potrave, môže sa použiť buď konštantná koncentrácia (v ppm alebo v mg/kg potravy), alebo konštantné dávkovanie vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierata; použitá možnosť musí byť špecifikovaná. Ak sa látka aplikuje gavážou, malo by sa tak stať každý deň približne v rovnakom čase a dávkovanie by malo byť pravidelne (týždenne alebo každých štrnásť dní) prispôbené tak, aby bolo konštantné vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierata.

1.6.2.4. Limitný test

Ak 28-dňová štúdia vykonaná spôsobom opísaným nižšie nepreukáže žiadne toxické účinky pri dávke 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti za deň alebo pri väčšej dávke zodpovedajúcej novej expozícii človeka, ak je táto známa, nie je ďalšie testovanie nutné. U látok s nízkou toxicitou je dôležité zaistiť, aby množstvo a iné vlastnosti testovanej látky pri podávaní v potrave neovplyvňovali bežné nutričné požiadavky.

1.6.2.5. Čas pozorovania

Zvieratá sa pozorujú denne a zaznamenávajú sa príznaky toxicity vrátane času ich nástupu, stupňa a trvania. Zaznamenáva sa čas uhynutia a čas, keď sa príznaky toxicity objavia a keď zmiznú.

1.6.3. Postup

Testovaná látka sa zvieratám podáva najlepšie sedem dní v týždni počas 28 dní. Zvieratá v satelitnej skupine určené na následné pozorovania by nemali byť ďalších 14 dní exponované, aby sa posúdilo zotavenie z toxických účinkov alebo ich pretrvávanie.

Pozorovania zahŕňajú zmeny na koži, srsti, očiach, slizniciach a taktiež zmeny dýchania, krvného obehu, zmeny funkcie autonómnej a centrálnej nervovej sústavy, somatomotorickej aktivity a správania. Raz týždenne sa vykonávajú merania spotreby potravy (a vody, ak sa testovaná látka podáva v pitnej vode) a zvieratá sa raz týždenne odvážia.

Pravidelné pozorovanie zvierat je nevyhnutné na to, aby sa zaistilo, že u zvierat pokiaľ možno nebude dochádzať k stratám napr. v dôsledku kanibalizmu, autolýzy tkanív alebo chybného zaradenia. Po ukončení štúdie sa všetky zvieratá z iných než satelitných skupín, ktoré prežili, podrobia pitve. Zvieratá v agónii a zvieratá, ktoré sa trápia alebo trpia bolesťou, sa ihneď vyradia, humanne utratia a pitvu.

Na konci skúšobného obdobia sa u všetkých zvierat, vrátane kontrolných, vykonajú tieto vyšetrenia:

1. hematologické vyšetrenie: stanoviť aspoň hematokrit, koncentráciu hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenciálny počet leukocytov a zrážanlivosť krvi;
2. biochemické vyšetrenie krvi: stanovenie aspoň jedného parametra funkcie pečene a ľadvín: alanínaminotransferáza v sére (predtým známa ako glutamát-pyruváttransamináza), aspartátaminotransferáza séra (predtým známa ako glutamát-oxalacetáttransamináza), močovínový dusík, albumín, kreatinín, celkový bilirubín a celkové bielkoviny v sére.

Medzi iné stanovenia, ktoré môžu byť potrebné na úplné toxikologické vyhodnotenie, patrí stanovenie vápnika, fosforu, chloridov, sodíka, draslíka, glukózy nalačno, analýza lipidov, hormónov, acidobazickej rovnováhy, metemoglobínu, aktivity cholinesterázy.

Ďalšie biochemické analýzy sa môžu v prípade potreby použiť na širšie vyšetrenie pozorovaných účinkov.

1.6.3.1. Pitva

U všetkých zvierat použitých v štúdiu sa vykoná celková pitva. Aspoň pečeň, ľadviny, nadľadviny a semenníky sa v čo najkratšom čase po pitve odvážia vo vlhkom stave, aby sa predišlo ich vysychaniu. Orgány a tkanivá (pečeň, obličky, slezina, semenníky, nadobličky, srdce a všetky orgány s léziami alebo zmenami veľkosti) treba uchovávať vo vhodnom médiu s ohľadom na neskoršie histopatologické vyšetrenia.

1.6.3.2. Histopatologické vyšetrenie

U skupiny, ktorej bola podaná najväčšia dávka, a u kontrolnej skupiny sa vykoná histologické vyšetrenie všetkých uchovaných orgánov a tkanív. Orgány a tkanivá, u ktorých sa v skupine s najväčšou dávkou objavia poškodenia spôsobené testovanou látkou, sa podrobia vyšetreniu aj u všetkých skupín s menšími dávkami. U zvierat zo všetkých satelitných skupín sa vykoná histologické vyšetrenie so zvláštnym dôrazom na orgány a tkanivá, na ktorých sa pozorovali účinky pri ostatných exponovaných skupinách.

2. ÚDAJE

Údaje sa zhrnú do tabuľky, pričom sa pre každú exponovanú skupinu uvedie počet zvierat na začiatku testu a počet zvierat, ktoré vykazujú jednotlivé typy lézií.

Všetky pozorované výsledky sa vyhodnotia vhodnou štatistickou metódou. Použiť možno akúkoľvek uznávanú štatistickú metódu.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- živočíšny druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, stravu atď.,
- podmienky skúšania,
- veľkosti dávok (vrátane vehikula, ak sa použilo) a koncentrácie,
- údaje o toxických účinkoch podľa pohlavia a veľkosti dávky,
- ak je to možné, veľkosť dávky, pri ktorej nedochádza k účinkom,
- čas uhynutia počas štúdie alebo či zvieratá prežili do konca testu,
- toxické a iné účinky,
- čas pozorovania každej neobvyklej známky a jej ďalší vývoj,
- údaje o spotrebe potravy a o telesnej hmotnosti,
- vykonané hematologické vyšetrenia a všetky výsledky,
- vykonané klinické biochemické vyšetrenia a všetky výsledky,
- pitevné nálezy,
- podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,
- štatistické spracovanie výsledkov tam, kde je to možné,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.8. TOXICITA PO 28-DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE (INHALAČNÁ)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Je užitočné mať vopred k dispozícii údaje o distribúcii veľkosti častíc, o tlaku pary, teplote topenia, teplote varu, teplote vzplanutia a prípadne o výbušnosti látky.

Pozri aj všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Viacere skupiny pokusných zvierat sú denne vystavené na určitý čas testovanej látke v odstupňovaných koncentráciách na 28 dní, pričom sa použije jedna koncentrácia pre každú skupinu. Ak sa použije pomocná látka, aby sa vytvorila vhodná koncentrácia testovanej látky v atmosfére, musí sa nasadiť kontrolná skupina s pomocnou látkou. Počas trvania testu sa zvieratá denne pozorujú aby sa zistili symptómy toxických účinkov. Zvieratá, ktoré uhynú počas testu, a zvieratá, ktoré prežili do konca testu, sa pitvú.

1.5 KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava**

Zvieratá si pred začatím testu zvykajú minimálne 5 dní na experimentálne chovateľské a krmné podmienky. Pred testom sa mladé zdravé zvieratá randomizujú a priradujú k potrebnému počtu skupín. Ak je to potrebné, môže sa k testovanej látke pridať vhodné vehikulum, aby sa získala želaná koncentrácia testovanej látky vo vzduchu. Ak sa na zjednodušenie podávania použije vehikulum alebo iná prísada, musí byť o nej známe, že nemá toxické účinky. Na tento účel sa môžu prípadne použiť údaje z predošlých testov.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.1. Pokusné zvieratá**

Ak neexistujú mimoriadne dôvody proti, mali by sa vykonávať testy s potkanmi. Používajú sa zdravé mladé zvieratá známych testovaných kmeňov.

Odchýlka telesnej hmotnosti zvierat pre daný test by nemala byť na začiatku testu viac ako ± 20 % od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

Pre každú veľkosť dávky sa použije najmenej 10 zvierat (päť samičiek a päť samcov). Samičky musia byť nezapustené a nesmú byť gravidné. Ak sa medzitým plánuje usmrcovanie zvierat, ich množstvo sa zvyšuje o plánovaný počet zvierat, ktoré sa usmrtia pred ukončením štúdie. Môže sa použiť sprievodná skupina najviac 10 zvierat (päť z každého pohlavia), ktorej sa aplikuje vyššia dávka počas 28 dní, a sleduje sa reverzibilita, perzistencia alebo oneskorenie toxických účinkov počas 14 dní po ukončení aplikácie. Takisto sa používa sprievodná skupina 10 kontrolných zvierat (päť z každého pohlavia).

1.6.2.3. Expozičná koncentrácia

Musia sa zvoliť minimálne tri koncentrácie, ako aj jedna kontrolná skupina, alebo ak bola použitá pomocná látka, jedna kontrolná skupina s pomocnou látkou (podľa koncentrácie pomocnej látky pri najvyššej expozičnej koncentrácii). Odhladiť od expozície s testovanou látkou, ošetrujú sa zvieratá kontrolnej skupiny takisto ako pokusné zvieratá. Najvyššia koncentrácia sa volí tak, aby v každom prípade vznikli toxické účinky, ale aby zvieratá neuhynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia dávka nesmie vyvolať žiadne príznaky toxicity. Ak existujú použiteľné odhady o výške expozície u človeka, tak by najnižšia koncentrácia nemala prekročiť túto hodnotu. Podľa možnosti by mala stredná koncentrácia spôsobovať len malé zistiteľné toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzikoncentrácie, tak by sa mali voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov. V skupinách s nízkou a strednou koncentráciou, ako aj v kontrolných skupinách by mal byť počet prípadov úmrtí nízky, aby sa umožnilo výrazné vyhodnotenie výsledkov.

1.6.2.4. Expozičná doba

Denná expozičná doba by mala byť šesť hodín, na základe špecifických požiadaviek sa môže prípadne ukázať, že sú nutné aj iné časové intervaly.

1.6.2.5. Vybavenie

Pre testy so zvieratami by sa malo používať inhalačné zariadenie, ktoré umožňuje dynamické prúdenie vzduchu s výmenou vzduchu minimálne 12-krát za hodinu, aby sa zabezpečil adekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozdelená expozičná atmosféra. Ak sa používa komora, tak sa zostaví tak, aby boli pokusné zvieratá čo najmenej stlačené a aby bola maximalizovaná expozícia testovanej látke inhaláciou. Na zabezpečenie stability atmosféry v inhalačnej komore by nemal celkový „objem“ pokusných zvierat zásadne prekročiť 5 % objemu komory. Používajú sa expozície oronazálnej oblasti, hlavy a celého tela v inhalačných komorách; prvé dva druhy expozície slúžia na obmedzenie príjmu testovanej látky inými cestami.

1.6.2.6. Čas pozorovania

U pokusných zvierat sa počas celého času pozorovania neexponovanej fázy denne sledujú symptómy toxických účinkov. Nástup smrti a čas, keď sa prejavia symptómy a keď zaniknú, sa musia zachytiť.

1.6.3. Postup

Zvieratá sú vystavované testovanej látke denne 5 až 7 dní za týždeň počas 28 dní. Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, by mali byť nasledujúcich 14 dní bez expozície, aby sa zistila reverzibilita toxických efektov alebo ich pretrvávanie. Teplota by mala byť počas testu 22 ± 3 °C.

Ideálna relatívna vlhkosť by mala byť 30 % a 70 % s výnimkou prípadov, keď sa to nedá uskutočniť (napr. testy s určitými aerosólmi). Udržiavanie ľahkého podtlaku v komore (≤ 5 mm vodného stĺpca) zabráňuje unikaniu testovanej látky do okolia. Počas expozície sa nepodáva ani krmivo, ani voda.

Mal by sa používať dynamický inhalačný systém s vhodným analytickým postupom na určovanie koncentrácie. Na zachovanie použiteľných expozičných koncentrácií sa odporúča vykonať predbežný test. Prietokové množstvo vzduchu sa nastaví tak, aby boli podmienky skúšania v celej expozičnej komore jednotné. Systém má zabezpečovať čo najrýchlejšie dosiahnutie konštantných expozičných podmienok.

Je potrebné vykonať tieto merania a kontroly:

- a) meranie prietokového množstva vzduchu (priebežne);
- b) skutočná koncentrácia testovanej látky sa meria v dýchacej oblasti. Počas dennej expozičnej doby sa nesmie koncentrácia odchyľovať od priemernej hodnoty o viac ako $\pm 15\%$. V prípade niektorých aerosólov sa však táto testovaná hladina nedá dosiahnuť. V takom prípade sa akceptuje väčší rozsah rozptylu. Počas celého trvania testu sa udržiava konštantná koncentrácia zo dňa na deň. Pre aerosóly sa musí minimálne raz do týždňa vykonať analýza veľkosti častíc pre každú testovanú skupinu;
- c) teplota a vlhkosť vzduchu (priebežne).

Zvieratá sa pozorujú počas a po expozícii a všetky nálezy u každého zvieraťa sa zapisujú. Všetky zvieratá sa musia denne pozorovať, zapisovať príznaky toxických účinkov, v rámci toho aj čas vzniku, ako aj stupeň a trvanie. Pozorovania zvierat by sa mali týkať hlavne zmien na koži, srsti, očiach a slizniciach, dýchaní, krvnom obehu, autonómnom a centrálnom nervovom systéme, ako aj na somatomotorike a na správaní. Príjem potravy a hmotnosť zvierat sa určuje každý týždeň. Pravidelné pozorovanie zvierat je potrebné, aby sa zabezpečilo, že zvieratá sa navzájom neusmrtia (kanibalizmus), že neuhynú v dôsledku autolýzy tkanív alebo chyby pri premiestňovaní. Po ukončení testu sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou satelitnej skupiny, pitvú. Uhynuté zvieratá, ako aj zvieratá, pri ktorých sa zistili silné príznaky utrpenia a bolesti, sa musia okamžite izolovať a humánne usmrtiť a podrobiť pitve.

Na konci testu sa podrobia všetky zvieratá, vrátane kontrolných, nasledujúcim testom:

- i) hematologickému vyšetreniu, ktoré by malo zahŕňať minimálne určovanie hodnoty hematokrytu a koncentrácie hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenciálny počet leukocytov, ako aj hemokoagulačné testy;
- ii) klinicko-biochemickej analýze krvi, na posúdenie funkcie pečene a obličiek by sa mal určiť minimálne jeden z týchto parametrov: alanín-amino-transferáza (skôr známa ako sérumpyruvát-transamináza), aspartát-aminotransferáza (skôr známa ako sérumglutamát-oxalacetát-transamináza), močovínový dusík, albumín, celkový bilirubín a celkové bielkoviny v sére.

Ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť prípadne potrebné na adekvátne toxikologické vyhodnotenie, zahŕňajú: vápnik, fosfor, chlorid, sodík, draslík, glukózu nalačno, lipidy, hormóny, rovnováhu medzi kyselinami a zásadami, methemoglobín, aktivitu cholinesterázy.

Dodatočné klinicko-biochemické analýzy môžu byť potrebné na rozšírenie skúmania pozorovaných toxických účinkov.

1.6.3.1. Pitva

Na všetkých zvieratách, ktoré sa zúčastnili na teste, sa vykoná dôkladná pitva. Minimálne pečeň, obličky, nadobličky, pľúca a semenníky sa čo najskôr po sekcii odvážia vo vlhkom stave, aby sa zabránilo ich vysychaniu. Orgány a tkanivá (dýchacie orgány, pečeň, obličky, slezina, semenníky, nadobličky, srdce, ako aj všetky orgány s makroskopickými zmenami alebo zmenami vo veľkosti) sa uchovávajú vo vhodnom médiu s ohľadom na neskoršie histopatologické vyšetrenia. Pľúca sa odstraňujú v intaktnom stave, odvážia sa a ošetrí vhodným fixatívom na zachovanie pľúcnej štruktúry.

1.6.3.2. Histopatologické vyšetrenie

U všetkých zvierat skupiny s najvyššou dávkou, ako aj u zvierat kontrolnej skupiny (kontrolných skupín) sa musí vykonať histologické vyšetrenie konzervovaných orgánov a tkanív. Všetky orgány a tkanivá, ktoré vykázali v skupine s najvyššou dávkou poškodenia podmienené testovanou látkou, sa musia vyšetriť aj vo všetkých ostatných skupinách s nízkou dávkou. U zvierat satelitnej skupiny sa musia s veľkou pozornosťou vyšetriť tie orgány a tkanivá, pri ktorých sa v iných ošetrovaných skupinách prejavili toxické účinky.

2. ÚDAJE

Údaje sa zhrnú do tabuľky. Z nej musí pre každú dávkovú skupinu a kontrolnú skupinu vyplývať počet zvierat na začiatku testu a počet zvierat s jednotlivými formami poškodenia lézií.

Všetky získané výsledky sa vyhodnocujú vhodnou štatistickou metódou. Môže sa použiť akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. **SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, ak je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— živočíšny druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.,

— podmienky skúšania:

Opis expozičného aparátu vrátane zostavy, typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému na výrobu aerosólov, klimatizačného systému, spracovania odpadového vzduchu a prípadne druhu umiestnenia zvierat v skúšobnej komore. Je potrebné opísať prístroje na meranie teploty, vlhkosti vzduchu a prípadne konštanty koncentrácie aerosólov a granulometrického zloženia.

Expozičné údaje:

Tieto údaje sa zhrnú do tabuľky a znázornia sa pri uvedení priemerných stredných hodnôt a s ohľadom na odchýlky (napr. smerodajnej odchýlky), a ak je to možné, mali by obsahovať tieto údaje:

- a) prietokové množstvo vzduchu v inhalačnom zariadení;
- b) teplotu a vlhkosť vzduchu;
- c) nominálnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky, ktoré sa dalo do inhalačného zariadenia, vydelené objemom vzduchu);
- d) charakter vehikula, ak sa použilo;
- e) skutočnú koncentráciu v dýchacej oblasti;
- f) stredný aerodynamický hmotnostný priemer (MMAD) a geometrickú smerodajnú odchýlku (GSD);

— údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a koncentrácie,

— čas smrti počas testu alebo údaj, či zvieratá prežili test,

— toxické alebo iné účinky, „no-effect level“,

— čas pozorovania jednotlivých príznakov toxického účinku a ich ďalší priebeh,

— údaje o kŕmení a telesnej hmotnosti,

— použité hematologické testy a ich výsledky,

— použité klinicko-biologické testy a ich výsledky,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické vyhodnotenie výsledkov tam, kde je to možné,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. **VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA**

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.9. TOXICITA PO 28-DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE (DERMÁLNA)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Testovaná látka sa nanáša na kožu denne v odstupňovaných dávkach viacerým skupinám pokusných zvierat, a to jedna dávka na jednu skupinu počas 28 dní. Počas trvania testu sa zvieratá denne pozorujú, aby sa zistili symptómy toxických účinkov. Zvieratá, ktoré uhynú počas testu, ako aj zvieratá, ktoré prežijú do konca testu, sa pitvú.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava**

Zvieratá si pred začatím testu zvykajú minimálne 5 dní na experimentálne chovateľské a krmné podmienky. Pred testom sa zdravé mladé zvieratá randomizujú a priradujú k jednotlivým exponovaným a kontrolným skupinám. Krátko pred začatím testu sa strihá srst' na chrbte pokusných zvierat. Oholenie srsti je tiež možné, ale dalo by sa vykonať 24 hodín pred začatím testu. Opakované strihanie a holenie je zvyčajne potrebné približne v týždňových intervaloch. Je potrebné dbať na to, aby sa nepoškodila koža. Na aplikáciu sa musí pripraviť minimálne 10 % povrchu kože. Pri určovaní oblasti určenej na ostrihanie aplikačnej plochy sa zohľadňuje hmotnosť zvierat. Ak sa používajú tuhé látky, ktoré sa môžu jemne rozomlieť na prášok, mala by byť testovaná látka dostatočne navlhčená vodou alebo tam, kde je to potrebné, vhodným vehikulom, aby sa zabezpečil dobrý kontakt s kožou. Tekuté testované látky sa vo všeobecnosti používajú nezriedené. Aplikácia sa vykonáva denne, 5 až 7 dní za týždeň.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.1. Pokusné zvieratá**

Môže sa použiť dospelý potkan, králik alebo morča. Môžu sa použiť aj iné druhy, ich použitie sa však musí zdôvodniť.

Odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu by nemala byť na začiatku testu viac ako ± 20 % od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

Pre každú veľkosť dávky sa používa minimálne 10 zvierat (5 samčekov a 5 samičiek) so zdravou, nepoškodenou kožou. Samičky musia byť nezapustené a nesmú byť gravidné. Ak sa majú počas testu humánne usmrtiť zvieratá, tak sa musí celkový počet zvierat zvýšiť o počet zvierat, ktoré majú byť humánne usmrtené, ešte pred koncom testu. Okrem toho sa môže exponovať satelitná skupina s 10 zvieratami (5 zvierat na pohlavie) počas 28 dní s najvyššou dávkou a počas nasledujúcich 14 dní bez ošetrovania sa dbá na reverzibilitu, pretrvávajúce alebo oneskorené prejav toxických účinkov. Používa sa tiež satelitná skupina s 10 kontrolnými zvieratami (5 zvierat na pohlavie).

1.6.2.3. Veľkosti dávok

Musia sa zvoliť minimálne tri dávky, ako aj jedna kontrolná skupina, alebo ak sa použije pomocná látka, kontrolná skupina s pomocnou látkou. Čas pôsobenia by mal trvať minimálne 6 hodín denne. Aplikácia testovanej látky by sa mala vykonávať v ten istý čas každý deň a prispôbenie dávky telesnej hmotnosti sa vykonáva v stanovených intervaloch (raz týždenne alebo dvakrát týždenne), aby sa zachovala konštantná hladina dávky v relácii k telesnej hmotnosti. Odhliadnuc od aplikácie testovanej látky, zvieratá kontrolnej skupiny sa ošetrojú rovnakým spôsobom ako pokusné zvieratá. Ak sa na uľahčenie aplikácie použije vehikulum, tak sa kontrolnej skupine podáva vehikulum rovnakým spôsobom ako exponovaným zvieratám, a to v množstve, aké dostane skupina s najvyššou dávkou. Najvyššia dávka sa volí tak, aby sa v každom prípade prejavili toxické efekty, ale aby zvieratá neuhynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia dávka by nemala vyvolávať žiadne príznaky toxicity. Ak existujú použiteľné odhady o výške expozície u človeka, tak by mala najnižšia dávka túto hodnotu prekračovať. Podľa možnosti by mala stredná dávka spôsobovať len malé toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzidávky, tak sa majú voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov. V skupinách s nízkou alebo strednou dávkou, ako aj v kontrolných skupinách by mal byť počet úmrtí nízky, aby sa zabezpečilo kvalitné vyhodnotenie výsledkov.

Ak aplikácia testovanej látky vedie k silným podráždeniam kože, mala by sa koncentrácia znížiť, čo môže pri vysokej dávke viesť k zníženiu alebo vynechaniu ostatných toxických účinkov. Ak sa okrem toho koža veľmi poškodila, je za určitých okolností potrebné prerušiť test a nanovo ho realizovať s nižšími koncentraciami.

1.6.2.4. Limitný test

Ak pri realizácii predčasnej štúdie podanie dávky 1 000 mg/kg alebo vyššej dávky, ktorá zodpovedá možnej expozícii u človeka, nespôsobí žiadne toxické účinky, nie je potrebný ďalší test.

1.6.2.5. Čas pozorovania

U všetkých zvierat sa denne pozorujú symptómy toxických účinkov. Smrť a čas vzniku a zániku symptómov sa musia zaznamenať.

1.6.3. Postup

Zvieratá sa musia udržiavať jednotlivo v klietkach. Testovanú látku dostávajú sedem dní do týždňa počas 28 dní. Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, by mali byť ďalších 14 dní bez ošetrovania, aby sa pozorovala reverzibilita alebo pretrvávajúce toxických účinkov. Expozičná doba je minimálne šesť hodín denne.

Testovaná látka sa nanáša jednotne na oblasť, ktorá zodpovedá asi 10 % povrchu tela. Pri veľmi toxických látkach sa môže ošetrovať plocha menšia, ale väčšia plocha by mala byť exponovaná čo možno s najtenšou a najrovnomernejšou vrstvou.

Testovaná látka sa počas expozičnej doby udržiava v kontakte s kožou pomocou gázového obväzu a jednej náplaste. Pokusná plocha sa musí okrem toho zakryť vhodným spôsobom, aby sa gázový obväz a testovaná látka prichytili a zabránilo sa orálnemu prijatiu testovanej látky. Môžu sa použiť aj prostriedky na obmedzenie slobody pohybu, avšak úplná imobilizácia sa neodporúča. Ako alternatíva sa môže použiť „manžeta na krk“.

Po uplynutí expozičnej doby sa, pokiaľ je to možné, odstráni zvyšok testovanej látky, a to použitím vody alebo iným vhodným postupom na čistenie kože.

Všetky zvieratá sa musia denne sledovať a zapisovať príznaky toxických účinkov vrátane času vzniku, ako aj stupňa a trvania. Sledovania sa majú zameriavať hlavne na zmeny na koži, srsti, očiach a slizniciach, dýchaní, krvnom obeh, autonómnom a centrálnom nervovom systéme, ako aj na somatomotorike a na správaní. Príjem potravy a hmotnosť zvierat sa určujú každý týždeň. Pravidelné pozorovanie zvierat je potrebné, aby sa dalo čo najlepšie zabezpečiť, aby zvieratá neuhynuli počas testu na kanibalizmus, autolýzu tkanív alebo chybu pri premiestňovaní. Po ukončení testu sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou satelitnej skupiny, pitvú. Hynúce zvieratá, ako aj zvieratá, u ktorých sa zistili silné príznaky utrpenia alebo bolesti, sa musia okamžite oddeliť, humánne usmrtiť a pitvať metódou prijateľnou pre zvieratá.

Na konci testu sa musia všetky zvieratá, vrátane kontrolných zvierat, podrobiť nasledujúcim vyšetreniam:

- 1) hematologickému vyšetreniu, ktoré by malo zahŕňať aspoň určovanie hodnoty hematokrytu a koncentrácie hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenciálny počet leukocyto, ako aj hemokoagulačné parametre;
- 2) klinicko-biochemickej analýze krvi: na posúdenie funkcie pečene a obličiek by sa mal určiť minimálne jeden z týchto parametrov: alanín-amino-transferáza (skôr známa ako sérum-glutamát-pyruvát-transamináza), asparta-aminotransferáza (skôr známa ako sérum-glutamát-oxalacetát-transamináza), močovníkový dusík, albumín, kreatinín, celkový bilirubín a celkové bielkoviny v sére.

Ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť potrebné na adekvátne toxikologické vyhodnotenie, zahŕňajú: vápnik, fosfor, chlorid, sodík, draslík, glukózu nalačno, lipidy, hormóny, rovnováhu medzi kyselinami a zásadami, methemoglobín a aktivitu cholinesterázy.

Tam, kde je to potrebné, sa môžu využiť dodatočné klinicko-biochemické analýzy na rozšírenie skúmania pozorovaných účinkov.

1.6.4. Pitva

Na všetkých zvieratách, ktoré sa zúčastnili na teste, sa vykoná kompletná autopsia. Aspoň pečeň, obličky, nadobličky a semenníky, sa čo najskôr po sekcii odvážia vlhké, aby sa zabránilo ich vysychaniu. Orgány a tkanivá, t. j. neexponovaná a exponovaná koža, pečeň, obličky, slezina, semenníky, nadobličky, srdce a cieľové orgány (orgány s makroskopickými zmenami alebo zmenami veľkosti), sa uchovávajú vo vhodnom médiu na možné neskoršie histopatologické vyšetrenie.

1.6.5. Histopatologické vyšetrenia

U všetkých zvierat skupiny s najvyššou dávkou, ako aj u zvierat kontrolnej skupiny sa musí vykonať histologické vyšetrenia konzervovaných orgánov a tkanív. Všetky orgány a tkanivá, ktoré vykazujú v skupinách s najvyššou dávkou poškodenia podmienené testovanou látkou, sa musia vyšetriť aj v ostatných skupinách s nižšou dávkou. U zvierat satelitnej skupiny sa musia veľmi dôkladne vyšetriť tie orgány a tkanivá, v ktorých sa u ostatných exponovaných skupín prejavili príznaky otravy.

2. ÚDAJE

Údaje sa zhrnú do tabuľky, z ktorej musí byť jasný počet zvierat pre každú testovanú skupinu a kontrolnú skupinu na začiatku testu a počet zvierat s jednotlivými formami poškodenia.

Všetky zistené výsledky sa vyhodnocujú vhodnou štatistickou metódou. Môže sa použiť akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- údaje o zvieratách (druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.),
- podmienky skúšania (vrátane druhu obväzu: okluzívny alebo neokluzívny),
- veľkosti dávky (vrátane vehikula, ak sa použilo) a koncentráciu,
- tam, kde je to možné, „no effect-level“,
- údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a koncentrácie,
- čas smrti počas testu alebo údaj, či zvieratá test prežili do konca testu,
- toxické a iné účinky,
- čas pozorovania jednotlivých príznakov toxických účinkov, ich ďalší priebeh,
- údaje o kŕmení a telesnú hmotnosť,
- hematologické testy a ich výsledky,
- klinicko-biochemické testy a ich výsledky,
- pitevné nálezy,
- podrobný opis histopatologických nálezov,
- štatistické vyhodnotenie výsledkov,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.10. MUTAGENITA („IN VITRO“ CYTOGENETICKÝ TEST NA CICA VCOCH)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJEM

Pozri všeobecný úvod, časť B (C).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Tento *in vitro* cytogenetický test je krátkodobým testom mutagenity na detekciu štrukturálnych chromozómových aberácií v kultivovaných bunkách cicavcov. Je možné použiť kultúry stabilizovaných bunkových línií, ako aj primárne bunkové kultúry. Po expozícii testovanej látky za prítomnosti aj neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému sa do bunkovej kultúry aplikuje mitotický jed, napr. kolchicín, na akumuláciu buniek v štádiu mitózy podobnom metafáze (metafáza C). Bunky sa vo vhodnom čase zozbierajú a pripravujú sa chromozómové preparáty. Preparáty sa zafarbia a metafázové bunky sa analyzujú z hľadiska prítomnosti chromozómových abnormalít.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava****1.6.1.1. Bunky**

Používajú sa stabilizované bunkové línie alebo kultúry primárnych buniek, napr. bunky škrečka čínskeho alebo ľudské lymfocyty. Pred aplikáciou na bunky sa testovaná chemická látka rozpustí v kultivačnom médiu alebo vo vhodnom vehikule.

1.6.1.2. Metabolický aktivačný systém

Bunky sa exponujú testovanej látke v prítomnosti, ako aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. Najčastejšie používaným systémom je kofaktorom dotovaná postmitochondriálna frakcia pripravená z pečeni hlodavcov, spracovaná činidlami indukujúcimi enzýmy.

1.6.2. Podmienky skúšania

Počet kultúr:

Pre každý experimentálny bod sa používajú najmenej dve kultúry.

Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol:

Ako negatívna kontrola sa používa rozpúšťadlo (ak nie je rozpúšťadlom kultivačné médium alebo voda), aktivačná zmes z pečenejých enzýmov, aktivačná zmes z pečenejých enzýmov v rozpúšťadle a neupravená kultúra.

V každom experimente sa použije pozitívna kontrola; ak sa na aktiváciu testovanej chemickej látky použije zmes na metabolickú aktiváciu z pečeneých enzýmov, musí sa ako pozitívna kontrola použiť látka, ktorá preukázateľne vyžaduje metabolickú aktiváciu.

Veľkosť dávky:

Použijú sa najmenej tri dávky testovanej látky pokrývajúce rozpätie najmenej jedného rádu dávky. Najvyššia dávka by mala blokovať mitotickú aktivitu asi o 50 % alebo vykazovať iné známky cytotoxicity. Ak látka nie je toxická, mala by sa testovať až na medzu rozpustnosti alebo do maximálnej koncentrácie 5 mg/ml.

Kultivačné podmienky:

Použije sa vhodné kultivačné médium a kultivačné podmienky (napr. teplota, kultivačná nádoba, koncentrácie CO₂ a vlhkosť).

1.6.3. Postup

1.6.3.1. *Príprava kultúr:*

Stabilizované bunkové línie: bunky sa získajú z kmeňových kultúr (napr. trypsináciou alebo strepávaním), nasadia sa vo vhodnej hustote do kultivačných nádob a inkubujú pri 37 °C.

Ľudské lymfocyty: ku kultivačnému médiu obsahujúcemu fytohemaglutinín, teľacie fetálne sérum a antibiotiká sa pridá úplne heparinizovaná krv a inkubuje sa pri 37 °C.

1.6.3.2. *Expozícia kultúr testovanej látky*

i) *Expozícia bez zmesi na metabolickú aktiváciu z pečeneých enzýmov*

Je potrebné, aby všetky expozície, pokiaľ je to možné, pokrývali najmenej jeden celý bunkový cyklus, a plány fixácie musia zaistiť analýzu buniek z prvej mitózy po expozícii v rôznych štádiách cyklu.

Pokiaľ expozícia nepokrýva celý bunkový cyklus, zvolia sa rôzne doby fixácie tak, aby sa odobrali vzorky buniek, ktoré boli behom expozície v rôznych fázach bunkového cyklu, t. j. G₁, S a G₂.

Testované chemické látky sa pridávajú ku kultúram stabilizovaných bunkových línií v exponenciálnej fáze rastu. Kultúry ľudských lymfocytov sa exponujú, keď sú čiastočne synchronizované.

ii) *Expozícia so zmesou na metabolickú aktiváciu z pečeneých enzýmov*

Na účely expozície by mala byť testovaná látka prítomná spolu s aktivačným systémom čo možno najdlhšie, bez toho, aby pritom vyvolávala toxické účinky na bunky. Pokiaľ nie je možné expozíciu vykonať tak, aby pokrývala celé trvanie bunkového cyklu, pretože prítomnosť testovanej látky by vyvolala v bunkách toxické účinky, zvolia sa doby fixácie tak, aby boli odobrané vzorky, ktoré boli behom expozície v rôznych fázach bunkového cyklu, t. j. G₁, S a G₂.

Zber buniek:

Pred zberom sa na bunkové kultúry počas vhodnej doby aplikuje inhibítor deliaceho vretienka. Každá kultúra sa k analýze chromozómov zberá a spracúva samostatne. Potrebné sú najmenej dve doby zberu. Odporúča sa, aby k prvému zberu došlo v dobe zodpovedajúcej koncu bunkového cyklu a k druhému neskôr. Tým sa pokryjú všetky fázy bunkového cyklu a počíta sa aj s jeho prípadným oneskorením.

1.6.3.3. *Príprava chromozómových preparátov*

Príprava preparátov na analýzu chromozómov zahŕňa hypotonizáciu buniek, ich fixáciu, naniesenie na podložné sklíčko a zafarbenie buniek.

Analýza:

Najmenej 100 dobre rozprestrených metafáz sa pre každú kultúru analyzuje na chromozómové aberácie. Podložné sklíčka sa pred analýzou kódujú. U ľudských lymfocytov sa analyzujú len metafázy obsahujúce 46 centromerov.

V stabilizovaných bunkových líniiach sa vyhodnocujú len metafázy, pri ktorých sa počet centromerov nelíši od modálneho počtu o viac než ± 2 centromere.

Okrem toho treba pre každú veľkosť dávky treba vyhodnotiť mitotický index alebo prípadne iný ukazovateľ cytotoxicity.

2. ÚDAJE

Údaje sa spracujú do tabuľky. Chromatídové aberácie (gapy, zlomy, výmeny), chromozómové aberácie (napr. gapy, zlomy, dvojbodky, prstence, dicentrické a polycentrické) a počet aberantných metafáz (vrátane gapov a bez gapov) sa uvedú samostatne pre všetky exponované a kontrolné kultúry.

Údaje sa vyhodnotia vhodnými štatistickými metódami.

Výsledky sa musia porovnať so súbežnými negatívnymi kontrolami.

Vykonajú sa najmenej dva nezávislé experimenty. Ak je to vedecky zdôvodniteľné, môže stačiť jeden experiment. Nie je nevyhnutné vykonávať druhý experiment tým istým spôsobom ako prvý experiment. Na získanie výstižnejších údajov môže byť, naopak, vhodnejšie niektoré podmienky skúšania pozmeniť.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- použité bunky,
- podmienky skúšania: zloženie média, koncentráciu CO₂, teplotu pri inkubácii, inkubačnú dobu, veľkosti dávok, dobu expozície, dobu pôsobenia použitého inhibítora deliaceho vretena a jeho koncentráciu, typ metabolického aktivačného systému, pozitívne a negatívne kontroly,
- počet bunkových kultúr,
- počet analyzovaných metafáz (údaje sa uvedú zvlášť pre každú kultúru),
- mitotický index alebo iné známky cytotoxicity,
- typ a počet aberácií zvlášť pre každú exponovanú a kontrolnú kultúru, modálny počet chromozómov v použitých stabilizovaných bunkových líniiach,
- štatistické vyhodnotenie,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.11. MUTAGENITA („IN VIVO“ CYTOGENETICKÝ TEST KOSTNEJ DRENE CICAVCOV, ANALÝZA CHROMOZÓMOV)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJEM

Pozri všeobecný úvod, časť B (C).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Tento *in vivo* cytogenetický test je krátkodobým testom mutagenity na zistenie štrukturálnych chromozómových aberácií. Zvyčajne sa vyhodnocujú chromozómové aberácie v prvých mitózach po expozícii. V prípade chemických mutagénov je väčšina indukovaných aberácií chromatídového typu.

V tejto metóde sa používajú bunky kostnej drene cicavcov, ktorým sa vhodnou cestou aplikuje testovaná látka a ktoré sa v určitých časových intervaloch usmrťia. Pred usmrtením sa zvieratám aplikuje mitotický jed, napr. kolchicín, na kumuláciu buniek v štádiu mitózy podobnom metafáze (metafáza c). Z buniek sa pripraví preparáty chromozómov sušené na vzduchu, tie sa zafarbí a metafázy sa analyzujú pod mikroskopom na chromozómové aberácie.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava**

Testované látky sa rozpustia vo fyziologickom roztoku. Pokiaľ sú v ňom nerozpustné, rozpustia sa alebo suspendujú vo vhodných vehikuloch.

Použijú sa čerstvo pripravené roztoky testovanej látky. Ak sa na uľahčenie dávkovania použije vehikulum, nesmie interferovať s testovanou látkou ani pôsobiť toxicky.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.2. Pokusné zvieratá**

Používajú sa hlodavce, napr. potkany, myši alebo škrečkovia čínski. Vykoná sa náhodný výber zdravých mladých dospelých zvierat, ktoré sa rozdelia do experimentálnych a kontrolných skupín.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

V každej experimentálnej aj kontrolnej skupine sa použije najmenej päť samíc a päť samcov. Pokiaľ sa v pláne experimentu predpokladá viac intervalov sledovania po expozícii, usmrť sa v každom z nich 10 zvierat na skupinu.

Pre pozitívnu kontrolnú skupinu stačí jeden odber.

1.6.2.3. *Spôsob aplikácie*

Testované látky sa obvykle aplikujú len raz. Na základe toxikologických informácií možno realizovať opakované aplikácie. Môžu sa však použiť iba vtedy, ak testovaná látka nevykazuje žiadne cytotoxické účinky na bunky kostnej drene. Medzi obvyklé spôsoby aplikácie patrí orálne podanie a intraperitoneálna injekcia. Podľa potreby môžu byť vhodné aj iné spôsoby aplikácie.

1.6.2.4. *Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol*

Na pozitívnu kontrolu sa používa látka, o ktorej je známe, že spôsobuje *in vivo* chromozómové aberácie; súčasťou každého experimentu je tiež negatívna kontrolná skupina (s rozpúšťadlom).

1.6.2.5. *Veľkosť dávky*

V základnom kroku sa používa jedna dávka testovanej látky, pričom ide o maximálnu tolerovanú dávku alebo takú dávku, ktorá vyvoláva určité príznaky cytotoxicity (napr. čiastočnú inhibíciu mitózy).

Maximálnou (limitnou) dávkou pri „netoxických“ zlúčeninách, ktorých účinok sa má po jednorazovej aplikácii vyhodnotiť, je 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti.

Pokiaľ sa použije opakované dávkovanie, limitnou dávkou je 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti na deň.

Použiť možno aj ďalšie dávky, ak sú na to vedecké dôvody.

Pokiaľ test slúži na overenie, mali by sa použiť najmenej dve ďalšie veľkosti dávok.

1.6.3. **Postup**

Test sa môže vykonať dvoma spôsobmi:

- i) Zvieratám sa jednorazovo aplikuje maximálna tolerovaná dávka. Bunky sa prvýkrát odoberú 24 hodín po aplikácii. Ak sú výsledky v tejto fáze jasne pozitívne, nie je ďalší odber buniek nutný. Ak sú však výsledky negatívne alebo dvojznačné vzhľadom na to, že kinetika bunkového cyklu môže byť ovplyvnená testovanou látkou, vykonajú sa ďalšie dva odbery, jeden skôr, druhý neskôr, v primeranom odstupe v rozmedzí 6 až 48 hodín.

Pokiaľ sa použijú ďalšie veľkosti dávok, vykoná sa odber v najcitlivejších intervaloch, alebo ak nie sú známe, 24 hodín po aplikácii.

- ii) Pokiaľ z informácií o farmakokinetike a metabolizme vyplýva, že sú vhodné opakované aplikácie, možno ich použiť, a odber vzoriek by sa mal vykonať 6 a 24 hodín po poslednej aplikácii.

Príprava kostnej drene:

Pred usmrtením sa zvieratám intraperitoneálne vstrekuje vhodná dávka mitotického jedu, aby sa získal dostatočný počet buniek, ktoré sú v metafáze c. Kostná dreň sa získa z oboch stehenných kostí zvierat, a to vypláchnutím izotonickým roztokom bezprostredne po usmrtení zvierat. Po vhodnom hypotonickom spracovaní sa bunky fixujú a nanesú na podložné sklíčko. Po vysušení na vzduchu sa zafarbí.

Analýza:

Podložné sklíčko sa pred mikroskopickou analýzou kódujú. Na jedno zviera sa vyšetrí najmenej 50 dobre rozprestrených metafáz s úplným počtom centromerov na štruktúrne chromozómové aberácie. Okrem toho je možné pre každé zviera stanoviť mitotický index.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa spracujú do tabuľky. Chromatídové aberácie a izochromatídové aberácie (gapy, zlomy, výmeny) a mitotické indexy, pokiaľ boli zistené, sa uvedú zvlášť pre jednotlivé exponované aj kontrolné zvieratá. Uvedú sa taktiež stredné hodnoty a smerodajné odchýlky pre každú experimentálnu a kontrolnú skupinu. Údaje sa vyhodnotia vhodnými štatistickými metódami.

3. **SPRÁVA**

3.1. **SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- druh, kmeň a vek použitých pokusných zvierat,
- počet zvierat každého pohlavia v experimentálnych a kontrolných skupinách,
- skúšania: podrobný opis expozície a plánu odberu vzoriek, veľkosti dávok, dobu pôsobenia použitého mitotického jedu a jeho koncentráciu,
- počet analyzovaných metafáz na jedno zviera,
- mitotický index, pokiaľ bol stanovený,
- typ a počet aberácií uvedený zvlášť pre každé exponované a kontrolné zviera,
- známky toxicity v priebehu štúdie,
- štatistické vyhodnotenie,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. **VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA**

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.12. MUTAGENITA (TEST MIKROJADIER)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJEM

Pozri všeobecný úvod, časť B (C).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Test mikrojadier je krátkodobý *in vivo* test na zistenie poškodenia chromozómov alebo poškodenia mitotického aparátu chemickými látkami u cicavcov. Základom tohto testu je zvýšený výskyt mikrojadier v polychromatických erytrocytoch exponovaných zvierat v porovnaní s kontrolnými zvieratami.

Mikrojadrá sa tvoria z fragmentov chromozómov alebo celých chromozómov omeškaných v mitóze. Pri vývoji erytrocytov z erytroblastov je jadro vytlačené, zatiaľ čo mikrojadro môže zostať v cytoplazme. V tomto teste sa vyhodnocujú mladé polychromatické erytrocyty z kostnej drene laboratórnych cicavcov, ktorým bola vhodnou cestou aplikovaná testovaná látka. Kostná dreň sa extrahuje a rozotrením sa pripraví preparáty, ktoré sa zafarbia. Pod mikroskopom sa zistí počet mikrojadier v polychromatických erytrocytoch a stanoví sa pomer polychromatických erytrocytov k normochromatickým erytrocytom.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava**

Testované chemické látky sa rozpustia v izotonickom roztoku. Pokiaľ sú v ňom nerozpustné, rozpustia sa alebo suspendujú vo vhodných vehikuloch. Ak sa použije vehikulum, nesmie interferovať s testovanou látkou ani pôsobiť toxicky. Obvykle sa používajú čerstvo pripravené roztoky testovanej látky.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.1. Pokusné zvieratá**

Odporúča sa používať myši, možno však používať aj iné cicavce. Vykoná sa náhodný výber zdravých mladých dospelých zvierat, ktoré sa zaradia do jednotlivých experimentálnych a kontrolných skupín.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

V každej experimentálnej aj kontrolnej skupine sa použije najmenej päť samíc a päť samcov. Pokiaľ sa v pláne experimentu predpokladá viac intervalov spracovania po expozíciu, usmrť sa v každom intervale spracovania 10 zvierat na skupinu. Pre pozitívnu kontrolnú skupinu stačí jeden odber.

1.6.2.3. *Spôsob aplikácie*

Testované látky sa obvykle aplikujú len raz. Na základe toxikologických informácií možno realizovať opakované aplikácie. Môžu sa však použiť iba vtedy, ak testovaná látka nevykazuje žiadne cytotoxické účinky na bunky kostnej drene. Medzi obvyklé spôsoby aplikácie patrí orálne podanie a intraperitoneálna injekcia. Podľa potreby môžu byť vhodné aj iné spôsoby aplikácie.

1.6.2.4. *Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol*

V každom experimente sa použijú pozitívne, ako aj negatívne (s rozpúšťadlom) kontroly.

1.6.2.5. *Veľkosť dávky*

V základnom kroku sa používa jedna dávka testovanej látky, pričom ide o maximálnu tolerovanú dávku alebo takú dávku, ktorá vyvoláva určité príznaky cytotoxicity (napr. zmenou pomeru polychromatických a normochromatických erytrocytov).

Maximálnou (limitnou) dávkou pri „netoxických“ zlúčeninách, ktorých účinok po jednorazovej aplikácii sa má vyhodnotiť, je 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti.

Pokiaľ sa použije opakované dávkovanie, limitnou dávkou je 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti na deň.

Použiť možno aj ďalšie dávky, ak sú na to vedecké dôvody.

Pokiaľ test slúži na overenie, mali by sa použiť najmenej dve ďalšie veľkosti dávok.

1.6.3. **Postup**

Test sa môže vykonať dvoma spôsobmi:

- i) Zvieratám sa jednorazovo aplikuje maximálna tolerovaná dávka. Odbery by sa mali vykonať v okamihu najvyššej reakcie pri teste, ktorý sa však môže pri rôznych látkach líšiť. Preto sa kostná dreň odoberá najmenej dvakrát, nie však skôr ako 12 hodín a nie neskôr ako 48 hodín po aplikácii.

Pokiaľ sa použijú ďalšie veľkosti dávok, vykoná sa odber v najcitlivejších intervaloch, alebo ak nie sú známe, 24 hodín po aplikácii.

- ii) Pokiaľ z informácií o farmakokinetike a metabolizme vyplýva, že sú vhodné opakované aplikácie, možno ich použiť, odber vzoriek by sa mal vykonať najskôr 12 hodín po poslednej aplikácii.

Príprava kostnej drene

Kostná dreň sa získa z oboch stehenných kostí zvierat, a to vypláchnutím izotonickým roztokom bezprostredne po usmrtení zvierat. Po vhodnom hypotonickom spracovaní sa bunky fixujú a nanesú na podložné sklíčko. Po vysušení na vzduchu sa zafarbí.

Analýza:

Podložné sklíčka sa pred mikroskopickou analýzou kódujú. Na stanovenie výskytu mikrojadier sa analyzuje najmenej 1 000 polychromatických erytrocytov na jedno zviera.

Pomer normochromatických erytrocytov a polychromatických erytrocytov sa stanoví pre každé zviera z 1 000 erytrocytov.

2. ÚDAJE

Údaje sa spracujú do tabuľky. Pre všetky exponované zvieratá aj pre kontrolné zvieratá sa zvlášť uvedie počet vyhodnotených polychromatických erytrocytov, počet polychromatických erytrocytov s mikrojadrami, percento buniek s mikrojadrami a pomer normochromatických a polychromatických erytrocytov. Uvedú sa taktiež stredné hodnoty a smerodajné odchýlky pre každú experimentálnu a kontrolnú skupinu. Údaje sa vyhodnotia vhodnými štatistickými metódami.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- druh, kmeň a vek použitých pokusných zvierat,
- počet zvierat každého pohlavia v experimentálnych a kontrolných skupinách,
- podmienky skúšania: podrobný opis expozície a plánu odberu vzoriek, veľkosti dávok, údaje o toxicite, negatívne a pozitívne kontroly,
- kritériá na vyhodnocovanie mikrojadier,
- ak je to možné, vzťah dávky a účinku,
- známky toxicity v priebehu štúdie,
- štatistické vyhodnotenie,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.13. MUTAGENITA (ESCHERICHIA COLI – SKÚŠKA REVERZNEJ MUTÁCIE)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJEM

Pozri všeobecný úvod, časť B (C).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Reverzný systém kmeňov *Escherichia coli* vyžadujúcich tryptofan (trp) je mikrobiálny systém, v ktorom sa meria reverzia $\text{trp}^- \rightarrow \text{trp}^+$ indukovaná chemickými látkami, ktoré spôsobujú zámeny báz v genóme organizmu.

Baktérie sa vystavia pôsobeniu testovanej látky za prítomnosti systému metabolickej aktivácie a bez nej. Po primeranej inkubačnej dobe na minimálnom médiu sa spočítajú kolónie revertantov a porovnajú sa s počtom kolónií spontánnych revertantov v neexponovanej kontrolnej kultúre a/alebo v kontrolnej kultúre s prídavkom rozpúšťadla.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Test možno vykonať dvoma metódami: (1) metódou s predbežnou inkubáciou a (2) priamou miskovou skúškou, pri ktorej sa baktérie a testovaná látka zmiešajú s vrchným agarom a vylejú na povrch misky so selektívnym médiom.

1.6.1. Príprava**1.6.1.1. Baktérie**

Baktérie sa kultivujú pri teplote 37 °C do neskorej exponenciálnej alebo do skorej stacionárnej fázy. Približná hustota buniek má byť 10^8 – 10^9 buniek na 1 ml.

1.6.1.2. Metabolická aktivácia

Baktérie sa exponujú testovanej látke za prítomnosti, ako aj za neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. Najčastejšie používaným systémom je kofaktorom dotovaná postmitochondriálna frakcia pripravená z pečene hlodavcov, upravená činidlami indukujúcimi enzýmy.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.1. Testované kmene**

Používajú sa tri kmene – WP2, WP2 uvr A a WP2 uvr A pKM 101. Použijú sa uznávané metódy prípravy a uchovávanía kmeňových kultúr. Musia sa kontrolovať rastové požiadavky a genetická identifikácia kmeňov, ich citlivosť na UV žiarenie a na mitomycín C a rezistencia kmeňa WP2 uvr A pKM 101 voči ampicilínu. Kmene by taktiež mali poskytovať spontánne revertanty v očakávaných rozpätiach frekvencie.

1.6.2.2. Média

Pre rast a selekciu mutantov sa používa vhodné selektívne médium spolu s vhodným vrchným agarom.

1.6.2.3. Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol

Súbežne sa musia použiť neexponované kontroly a kontroly s rozpúšťadlom. Pozitívne kontroly sa musia vykonať aj na tieto dva účely:

i) Na potvrdenie citlivosti bakteriálnych kmeňov.

Pre testy bez metabolickej aktivácie možno použiť ako pozitívnu kontrolu metylmetánsulfonát, 4-nitrochinolín1oxid alebo 1etyl1nitrozomočovinu.

ii) Na zaistenie aktivity zodpovedajúcich metabolických aktivačných systémov.

Ako pozitívna kontrolná látka na overenie fungovania metabolického aktivačného systému vo všetkých kmeňoch je vhodný 2aminoantracén. Pokiaľ je to možné, mala by sa použiť pozitívna kontrola, ktorá patrí k rovnakej triede chemických látok ako testovaná látka.

1.6.2.4. Množstvo testovanej látky na jednu miskú

Testuje sa najmenej päť rôznych množstiev testovanej látky s intervalmi medzi miskami rovnajúcimi sa približne polovici dielika logaritmickú stupnice. Látky sa testujú až po medzu rozpustnosti alebo toxicity. Toxicita sa preukáže znížením počtu spontánnych revertantov, zníženým rastom pozadia alebo stupňom prežitia v exponovaných kultúrach. Netoxické látky sa testujú až do koncentrácie 5 mg na miskú, než ich možno považovať za negatívne.

1.6.2.5. Podmienky inkubácie

Misky sa inkubujú 48 až 72 hodín pri teplote 37 °C.

1.6.3. Postup

Pri priamom miskovom teste bez metabolickej aktivácie sa k 2,0 ml vrchného agaru pridá testovaná látka a 0,1 ml čerstvej bakteriálnej kultúry. Pri testoch s metabolickou aktiváciou sa po pridaní testovanej látky a baktérií pridá k vrchnému agaru 0,5 ml aktivačnej zmesi s vhodným množstvom postmitochondriálnej frakcie. Obsah každej skúmavky sa premieša a vyleje na povrch misky so selektívnym médiom. Vrchný agar sa nechá stuhnúť a misky sa inkubujú 48 až 72 hodín pri teplote 37 °C. Po uplynutí inkubačnej doby sa zistí počet revertantných kolónií na miskú.

Pri metóde s predbežnou inkubáciou sa pripraví zmes z testovanej látky, 0,1 ml čerstvej bakteriálnej kultúry a vhodného množstva aktivačnej zmesi alebo rovnakého množstva pufráčného roztoku a po určitý čas sa predbežne inkubuje, než sa pridá 2 ml vrchného agaru. Ďalší postup je rovnaký ako pri miskovej metóde.

Pri oboch metódach sa nasadia najmenej tri misky na jednu koncentráciu.

2. ÚDAJE

Uvedú sa počty revertantných kolónií na miskú pre kontrolné série, ako aj pre exponované série. Pre testovanú chemickú látku, ako aj pre kontroly sa uvedú jednotlivé hodnoty počtu kolónií na miskú, stredná hodnota počtu revertantných kolónií na miskú a smerodajné odchýlky.

Údaje sa vyhodnotia vhodnými štatistickými metódami.

Vykonajú sa najmenej dva nezávislé experimenty. Nie je nevyhnutné vykonávať druhý experiment tým istým spôsobom ako prvý experiment. Na získanie výstižnejších údajov môže byť, naopak, vhodnejšie niektoré podmienky skúšania pozmeniť.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- baktérie, použitý kmeň,
- podmienky skúšania: veľkosti dávky, toxicitu, zloženie médií, postupy spracovania (predbežná inkubácia, inkubácia), metabolický aktivačný systém, referenčné látky, negatívne kontroly,
- jednotlivé počty kolónií na miskú, strednú hodnotu počtu revertantných kolónií na miskú, smerodajnú odchýlku, ak je to možné, vzťah dávka/účinnosť,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

B.14. MUTAGENITA (SALMONELLA TYPHIMURIUM – SKÚŠKA REVERZNEJ MUTÁCIE)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJEM

Pozri všeobecný úvod, časť B (C).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Reverzný systém kmeňov *Salmonella typhimurium* vyžadujúcich histidín (his) je mikrobiálny systém, v ktorom sa meria reverzia $his^- \rightarrow his^+$ indukovaná chemickými látkami, ktoré spôsobujú substitúcie báz alebo posunové mutácie v genóme organizmu.

Baktérie sa vystavia pôsobeniu testovanej látky za prítomnosti systému metabolickej aktivácie a bez nej. Po primeranej inkubačnej dobe na minimálnom médiu sa spočítajú kolónie revertantov a porovnajú sa s počtom kolónií spontánnych revertantov v neexponovanej kontrolnej kultúre a/alebo v kontrolnej kultúre s prídavkom rozpúšťadla.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava****1.6.1.1. Baktérie**

Čerstvé kultúry baktérií sa kultivujú pri teplote 37 °C do neskorej exponenciálnej alebo do skorej stacionárnej fázy. Približná hustota buniek má byť $10^8 - 10^9$ buniek na 1 ml.

1.6.1.2. Metabolická aktivácia

Baktérie sa exponujú testovanej látke za prítomnosti, ako aj za neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. Najčastejšie používaným systémom je kofaktorom dotovaná postmitochondriálna frakcia pripravená z pečene hlodavcov, upravená činidlami indukujúcimi enzýmy.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.1. Testovacie kmene**

Používajú sa najmenej štyri kmene – TA 1535, TA 1537 alebo TA 97, TA 98 a TA 100; navyše možno použiť ďalšie kmene ako TA 1538 a TA 102. Použijú sa uznávané metódy prípravy a uchovávanía kmeňových kultúr. Musia sa kontrolovať rastové požiadavky a genetická identifikácia kmeňov, ich citlivosť na UV žiarenie a na kryštálovú violet a ich rezistencia voči ampicilínu. Kmene by taktiež mali poskytovať spontánne revertanty v očakávaných rozpätiach frekvencie.

1.6.2.2. *Médiá*

Používa sa vhodné selektívne médium spolu s vhodným vrchným agarom.

1.6.2.3. *Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol*

Súbežne sa musia použiť neexponované kontroly a kontroly s rozpúšťadlom. Pozitívne kontroly sa musia vykonať aj na tieto dva účely:

i) Na potvrdenie citlivosti bakteriálnych kmeňov.

Pre testy bez metabolickej aktivácie možno použiť tieto zlúčeniny:

Kmene	Látky používané na reverziu
TA 1535, TA 100	azid sodný
TA 1538, TA 98, TA 97	2nitrofluorén
TA 1537	9aminoakridín
TA 102	(2-fenylpropán-2-yl)hydroperoxid (kuménhydroperoxid)

ii) Na zaistenie aktivity zodpovedajúcich metabolických aktivačných systémov.

Ako pozitívna kontrolná látka na overenie fungovania metabolického aktivačného systému vo všetkých kmeňoch je vhodný 2aminoantracén. Pokiaľ je to možné, mala by sa použiť pozitívna kontrola, ktorá patrí k rovnakej triede chemických látok ako testovaná látka.

1.6.2.4. *Množstvo testovanej látky na jednu miskú*

Testuje sa najmenej päť rôznych množstiev testovanej látky s intervalmi medzi miskami rovnajúcimi sa približne polovici dielika logaritmickej stupnice. Látky sa testujú až po medzu rozpustnosti alebo toxicity. Toxicita sa preukáže znížením počtu spontánnych revertantov, zníženým rastom pozadia alebo stupňom prežitia v exponovaných kultúrach. Netoxické látky sa testujú až do koncentrácie 5 mg na miskú, než ich možno považovať za negatívne.

1.6.2.5. *Podmienky inkubácie*

Misky sa inkubujú 48 až 72 hodín pri teplote 37 °C.

1.6.3. **Postup**

Pri priamom miskovom teste bez metabolickej aktivácie sa k 2,0 ml vrchného agaru pridá testovaná látka a 0,1 ml čerstvej bakteriálnej kultúry. Pri testoch s metabolickou aktiváciou sa po pridaní testovanej látky a baktérií pridá k vrchnému agaru 0,5 ml aktivačnej zmesi s vhodným množstvom postmitochondriálnej frakcie. Obsah každej skúmavky sa premieša a vyleje na povrch misky so selektívnym médiom. Vrchný agar sa nechá stuhnúť a misky sa inkubujú 48 až 72 hodín pri teplote 37 °C. Po uplynutí inkubačnej doby sa zistí počet revertantných kolónií na miskú. Pri metóde s predbežnou inkubáciou sa pripraví zmes z testovanej látky, 0,1 ml čerstvej bakteriálnej kultúry a vhodného množstva aktivačnej zmesi alebo rovnakého množstva pufračného roztoku a po určitý čas sa predbežne inkubuje, než sa pridá 2 ml vrchného agaru. Ďalší postup je rovnaký ako pri miskovej metóde.

Pri oboch metódach sa nasadia najmenej tri misky na jednu koncentráciu.

2. **ÚDAJE**

Uvedú sa počty revertantných kolónií na miskú pre kontrolné série, ako aj pre exponované série.

Pre testovanú chemickú látku, ako aj pre kontroly sa uvedú jednotlivé hodnoty počtu kolónií na miskú, stredná hodnota počtu revertantných kolónií na miskú a smerodajné odchýlky.

Údaje sa vyhodnotia vhodnými štatistickými metódami.

Vykonávajú sa najmenej dva nezávislé experimenty. Nie je nevyhnutné vykonávať druhý experiment tým istým spôsobom ako prvý experiment. Na získanie výstižnejších údajov môže byť, naopak, vhodnejšie niektoré podmienky skúšania pozmeniť.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- baktérie, použitý kmeň,
- podmienky skúšania: veľkosti dávky, toxicitu, zloženie médií, postupy spracovania (predbežná inkubácia, inkubácia), metabolický aktivačný systém, referenčné látky, negatívne kontroly,
- jednotlivé počty kolónií na miskú, strednú hodnotu počtu revertantných kolónií na miskú, smerodajnú odchýlku, ak je to možné, vzťah dávka/účinok,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod, časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod, časť B (E).

ČASŤ C: METÓDY NA STANOVENIE EKOTOXICITY**C.1. AKÚTNA TOXICITA NA RYBÁCH****1. Metóda****1.1. ÚVOD**

Účelom tohto testu je stanoviť akútnu letálnu toxicitu látky pre ryby v sladkej vode. Tak ako je to len možné, je výhodné mať informácie o rozpustnosti vo vode, tlaku pár, chemickej stabilite, disociačných konštantách a biodegradabilite látky, aby tieto informácie pomohli pri výbere najvhodnejšej skúšobnej metódy (statická, semistatická alebo prietoková), ktorá uspokojivo zaistí konštantné koncentrácie testovanej látky počas testu.

Ďalšie informácie (napr. štruktúrny vzorec, stupeň čistoty, druh a percentuálne zastúpenie nečistôt, prítomnosť a množstvo aditív a rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda) sa tiež berú do úvahy pri plánovaní testu a pri vyhodnotení výsledkov.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Akútna toxicita je rozpoznateľný nepriaznivý účinok indukovaný v organizme počas krátkeho času (dni) expozície látky. V tomto teste je akútna toxicita vyjadrená ako stredná letálna koncentrácia (LC_{50}), čo je taká koncentrácia vo vode, pri ktorej uhynie 50 % rýb z testovaného súboru počas kontinuálnej expozície, ktorá musí byť predtým určená.

Všetky koncentrácie testovanej látky sú uvedené v hmotnosti na objem (mg/liter). Môžu byť tiež vyjadrené ako hmotnosť na hmotnosť ($mg \cdot kg^{-1}$).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa môžu testovať na účely demonštrovania, že za laboratórnych skúšobných podmienok nedošlo k významnej zmene reakcie testovaných druhov.

Pre tento test nie sú špecifikované žiadne referenčné látky.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Limitný test možno vykonať pri koncentrácii 100 mg/liter na dôkaz, že hodnota LC_{50} je väčšia ako táto koncentrácia.

Ryby sú exponované testovanej látke pridanej do vody v rozsahu rôznych koncentrácií počas 96 hodín. Úmrtnosť sa zaznamenáva minimálne v 24-hodinových intervaloch, a ak je to možné, koncentrácie spôsobujúce 50 % úmrtnosť rýb (LC_{50}) sa vypočítajú v každom pozorovacom čase.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Kritériá kvality sa aplikujú pri limitnom teste, ako aj pri úplnej skúšobnej metóde.

Úmrtnosť v kontrolách nesmie presiahnuť 10 % (alebo jednu rybu, ak sa použilo menej ako 10 rýb) na konci testu.

Koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť vyššia ako 60 % z celkovej hodnoty pri saturácii vzduchom.

Koncentrácie testovanej látky sa budú udržiavať v rámci 80 % pôvodných koncentrácií počas celého testu.

Pre látky, ktoré sú ľahko rozpustné v testovacom médiu a ktoré tvoria stabilné roztoky, napríklad tie, ktoré nebudú vo významnej miere prchavé, nebudú sa rozkladať, hydrolyzovať ani adsorbovať, ich počiatočná koncentrácia sa môže považovať za ekvivalentnú k nominálnej koncentrácii. Musí byť dokázané, že koncentrácie sa udržiavali počas celého testu a kritériá kvality sa dodržali.

Pre látky, ktoré sú:

- i) slabo rozpustné v testovacom médiu alebo
- ii) schopné vytvárať stabilné emulzie alebo disperzie, alebo
- iii) nestabilné vo vodných roztokoch,

počiatočná koncentrácia sa bude považovať za koncentráciu meranú v roztoku (alebo ak to nie je technicky možné, meranú vo vodnom stĺpci) na začiatku testu. Koncentrácia sa stanoví až po vytvorení rovnováhy, ale pred použitím testovaných rýb.

Vo všetkých týchto prípadoch sa musia vykonať ďalšie merania počas testu, aby sa potvrdili aktuálne expozičné koncentrácie alebo aby sa dodržali kritériá kvality.

pH hodnota by sa nemala meniť viac ako v rozsahu jednej jednotky.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Môžu sa použiť tri typy postupov:

Statický test:

Test toxicity, v ktorom nedochádza k žiadnemu toku testovaného roztoku. (Roztoky zostávajú nezmenené počas trvania testu.)

Semistatický test:

Test bez toku testovaného roztoku, ale s pravidelnými obnoveniami testovaných roztokov po určitom období (napr. 24 hodinách).

Prietokový test:

Test toxicity, v ktorom sa voda neustále obnovuje v skúšobných komorách a testovaná látka alebo prípravok sa transportuje vodou používanou na obnovu skúšobného média.

1.6.1. Reagenty

1.6.1.1. Roztoky testovaných látok

Zásobné roztoky požadovanej sily sa pripravujú rozpustením látky v deionizovanej vode alebo vode podľa 1.6.1.2.

Zvolené koncentrácie na testovanie sa pripravujú zriedením zásobného roztoku. Ak sa testujú vysoké koncentrácie, potom sa látka môže rozpustiť priamo vo vode.

Látky by sa normálne mali testovať len po limit rozpustnosti. Pri niektorých látkach (napr. látky s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo vysokou hodnotou P_{ow} alebo tie, ktoré sú schopné tvoriť stabilné disperzie namiesto pravých roztokov vo vode) je prijateľné testovať koncentrácie nad limitom rozpustnosti látky, aby sa zaistilo, že bola dosiahnutá maximálna rozpustná/stabilná koncentrácia. Avšak je dôležité, aby táto koncentrácia nejakým spôsobom nenarušovala testovací systém (napr. film látky na povrchu vody, ktorý bráni oxidácii vody atď.).

Ultrazvuková disperzia, organické rozpúšťadlá, emulzifikátory alebo dispergujúce látky možno použiť ako pomocku pri príprave zásobných roztokov látok s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo ako pomocku pri dispergovaní týchto látok v testovacom médiu. Keď sa použijú takéto pomocné látky, potom všetky testované koncentrácie majú obsahovať rovnaké množstvo pomocnej látky a mala by sa vykonať dodatočná kontrola, pri ktorej sú ryby vystavené rovnakej koncentrácii pomocnej látky, aká je použitá v skúšobných sériách. Koncentrácia takýchto pomocných látok by mala byť minimalizovaná, ale v žiadnom prípade by nemala presahovať 100 mg/liter skúšobného média.

Test je potrebné vykonať bez úpravy pH. Ak dochádza k výraznej zmene pH, odporúča sa, aby sa test zopakoval s úpravou pH a výsledky sa zaznamenali. V takomto prípade by sa nemala úprava pH hodnoty zásobného roztoku podľa pH hodnoty vodného roztoku, pokiaľ na to nie je špeciálny dôvod, urobiť. Na tento účel sa odporúča HCl a NaOH. Nadstavenie pH hodnoty je potrebné vykonať takým spôsobom, aby sa koncentrácia testovanej látky v zásobnom roztoku významne nezmenila. Akúkoľvek chemickú reakciu alebo fyzikálnu precipitáciu testovanej látky alebo prípravku počas úpravy hodnoty pH je potrebné uviesť v záznamoch v správe z testu.

1.6.1.2. *Voda pre chov rýb a na riedenie*

Môže sa použiť pitná voda (nekontaminovaná potenciálne škodlivou koncentráciou chlóru, ťažkými kovmi alebo inými látkami), prírodná voda dobrej kvality alebo rekonštituovaná voda (pozri dodatok I). Odporúča sa použiť vodu s celkovou tvrdosťou v rozsahu 10 až 250 mg/liter (ako CaCO_3) a s pH hodnotou v rozmedzí 6,0 až 8,5.

1.6.2. **Prístroje**

Všetky prístroje musia byť vyrobené z chemicky inertného materiálu.

- automatický zriedňovací systém (pre prietokový test),
- prístroj na meranie koncentrácie kyslíka,
- zariadenie na stanovenie tvrdosti vody,
- adekvátny prístroj na kontrolu teploty,
- pH meter.

1.6.3. **Testované ryby**

Ryby by mali byť zdravé a bez akýchkoľvek zjavných znetvorení.

Druh rýb sa vyberie len na základe praktických kritérií, ako je ich dobrá dostupnosť počas celého roka, vhodné udržiavanie, vhodnosť na testovanie, relatívna citlivosť na látky alebo prípravky, ako aj každý ekonomický, biologický alebo ekologický faktor, ktorý má nejaký význam. Potrebu porovnateľnosti získaných údajov a existujúcu medzinárodnú harmonizáciu (odkaz 1) je tiež nutné brať do úvahy pri výbere druhu rýb.

Zoznam druhov rýb, ktoré sa odporúčajú pre tento test, je uvedený v dodatku 2; odporúčanými druhmi sú daniel pruhovaný a pstruh dúhový.

1.6.3.1. *Chov*

Testované ryby majú byť z jednej zásoby podobnej dĺžky a veku. Musia sa udržiavať najmenej 12 dní za týchto podmienok:

dávkovanie:

vhodné pre systém (recirkulácia alebo prietok) a druh rýb,

voda:

pozri 1.6.1.2,

svetlo:

12 až 16 hodín osvetlenia denne,

koncentrácia rozpusteného kyslíka:

najmenej 80 % hodnoty nasýtenia vzdušným kyslíkom,

kŕmenie:

trikrát za týždeň alebo denne, s prerušením 24 hodín pred začiatkom testu.

1.6.3.2. Úmrtnosť (*mortalita*)

Po 48-hodinovej počiatočnej perióde sa zaznamenáva úmrtnosť, pričom sa aplikujú tieto kritériá:

— viac ako 10 % populácie v priebehu siedmich dní:

zrušenie celej násady,

— medzi 5 % až 10 % populácie:

udržiavacia perióda sa predĺži o ďalších sedem dní. Ak nedôjde k ďalším úmrtiam, násada je prijateľná, inak sa zruší,

— menej ako 5 % populácie:

násada je prijateľná.

1.6.4. Adaptácia

Predtým ako sa ryby použijú v teste, musia sa adaptovať aspoň sedem dní na vodu tej istej kvality a teploty, aká sa použije pri teste.

1.6.5. Testovací postup

Definitívnemu testovaniu môže predchádzať vyhľadávací test, aby sa získala informácia o rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú v hlavnom teste.

Vykonáva sa jedna kontrola bez testovanej látky, a ak je to možné, tiež sa vykonáva jedna kontrola obsahujúca pomocnú látku, navyše k testovaným sériám.

V závislosti od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej látky alebo prípravku sa vyberie statický, semistatický alebo prietokový test ako vhodný, tak aby spĺňal kritériá kvality.

Ryby sú exponované látke tak, ako je uvedené nižšie:

— trvanie: 96 hodín,

— počet zvierat: aspoň 7 na každú koncentráciu,

— nádrže: vhodnej kapacity vo vzťahu k odporúčenej náplni,

— dávkovanie: maximálne dávkovanie 1 g/liter sa odporúča pre statický a semistatický test, pri prietokovom systéme je prijateľné aj vyššie dávkovanie,

— testovaná koncentrácia: aspoň päť koncentrácií líšiacich sa konštantným faktorom nepresahujúcim 2,2 a tak, ako je to možné, zaberajúcich rozsah od 0 % do 100 % úmrtnosti,

— voda: pozri 1.6.1.2,

— svetlo: 12 až 16 hodín osvetlenia denne,

— teplota: vhodná pre príslušný druh (pozri dodatok 2), ale len v rozsahu ± 1 °C pre každý jednotlivý test,

— koncentrácia rozpusteného kyslíka: nie menej ako 60 % hodnoty nasýtenia vzdušným kyslíkom pri danej teplote,

— kŕmenie: žiadne.

Ryby sa skontrolujú po prvých 2 až 4 hodinách a v 24-hodinových intervaloch. Ryby sa považujú za mŕtve, ak nevykazujú žiadnu reakciu po dotyku na chvostovú stopku a nie sú viditeľné žiadne dýchacie pohyby. Mŕtve ryby sa odstránia a zaznamená sa úmrtnosť.

Zaznamenávajú sa aj viditeľné abnormality (napr. strata rovnováhy, zmeny v plávaní, zmeny v dýchaní, pigmentácia atď.).

Denne sa musí vykonať meranie pH, rozpusteného kyslíka a teploty.

Limitný test

Pri použití postupov opísaných v tejto metóde limitný test sa môže vykonať pri koncentrácii 100 mg/l, aby sa demonštrovalo, že LC_{50} je väčšia ako táto koncentrácia.

Ak sú vlastnosti látky také, že sa nemôže dosiahnuť koncentrácia 100 mg/liter v testovanom roztoku, limitný test sa vykoná pri koncentrácii rovnjej rozpustnosti látky (alebo pri maximálnej koncentrácii, pri ktorej dochádza k tvorbe stabilnej disperzie) v použitom médiu (pozri tiež bod 1.6.1.1).

Limitný test by sa mal vykonať použitím 7 až 10 rýb s rovnakým počtom rýb v kontrole. (Z binomickej teórie vyplýva, že pri použití 10 rýb s nulovou úmrtnosťou je 99,9 % spoľahlivosť, že LC_{50} je väčšia ako koncentrácia použitá v limitnom teste. Pri 7, 8 alebo 9 rybách za nulovej úmrtnosti je prinajmenšom 99 % spoľahlivosť, že LC_{50} je väčšia ako použitá koncentrácia.)

Pri výskyte úmrtnosti sa musí vykonať kompletná štúdia. Ak sa pozorujú subletálne účinky, tieto by sa mali zaznamenať.

2. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Pre každú periódu expozície, keď boli zapísané pozorovania (24, 48, 72 a 96 hodín), sa zaznamenáva percentuálna úmrtnosť oproti príslušnej koncentrácii na semilogaritmickom papieri.

Keď je to možné, pre každý pozorovací čas by sa mali odhadnúť LC_{50} a limity spoľahlivosti ($p = 0,05$) použitím štandardných postupov, tieto hodnoty sa zaokrúhľia na jedno alebo väčšinou dve platné číslice (príklady zaokrúhľenia na dve číslice: 173,5 na 170, 0,127 na 0,13 a 1,21 na 1,2).

V tých prípadoch, keď sklon krivky koncentrácia/percentá je príliš strmý a neumožňuje výpočet LC_{50} , stačí grafický odhad tejto hodnoty.

Keď v dvoch po sebe nasledujúcich koncentráciách v pomere 2,2 dochádza len k 0 % a 100 % úmrtnosti, tieto dve hodnoty stačia na indikovanie rozsahu, do ktorého patrí LC_{50} .

Ak sa pozoruje, že nemožno udržať stabilitu ani homogenitu testovanej látky, toto by sa malo zaznamenať a výsledky by sa mali interpretovať so zvýšenou pozornosťou.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- informácie o testovaných rybách (vedecký názov, kmeň, dodávateľ, predbežné ošetrovanie, veľkosť a počet rýb použitých pri každej testovanej koncentrácii),
- zdroj vody a jej hlavné chemické charakteristiky (pH, tvrdosť, teplota),
- v prípade látky s nízkou rozpustnosťou metódy prípravy zásobného a skúšobného roztoku,
- koncentráciu všetkých pomocných látok,

- zoznam použitých koncentrácií a všetky dostupné informácie týkajúce sa stability testovanej látky alebo prípravku pri daných koncentráciách v testovanom roztoku,
- použité metódy a získané výsledky, ak sa vykonala analýza látky alebo prípravku,
- výsledky limitného testu, ak sa vykonal,
- dôvody na výber testu a detaily použitého skúšobného postupu (napr. statický, semi-statický, dávkovanie, informácia o prevzdušňovaní, dávkovanie rýb a pod.),
- opis skúšobného zariadenia,
- režim osvetlenia,
- koncentráciu rozpusteného kyslíka, pH hodnoty a teploty skúšobných roztokov každých 24 hodín,
- dôkaz, že boli splnené kritériá kvality,
- tabuľku uvádzajúcu kumulatívnu úmrtnosť pri každej koncentrácii a kontrolu (a tiež kontrolu s pomocnou látkou, ak je to potrebné) pri všetkých odporučených pozorovacích časoch,
- graf závislosti koncentrácia/percentá na konci testu,
- ak je to možné, hodnoty LC_{50} pri každom z odporučených pozorovacích časov (s 95 % limitom spoľahlivosti),
- štatistické postupy použité pri stanovení hodnôt LC_{50} ,
- výsledky získané s referenčnou látkou, ak sa použila;
- najvyššiu testovanú koncentráciu nespôsobujúcu úmrtnosť počas celého testu,
- najnižšiu testovanú koncentráciu spôsobujúcu 100 % úmrtnosť počas celého testu.

4. ODKAZY

- (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. Method for calculating an LC50. 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.

Dodatok 1

Rekonštituovaná voda

Príklad vhodnej rozpúšťacej vody

Všetky chemické látky musia byť analytickej čistoty.

Voda má byť destilovaná, dobrej kvality alebo deionizovaná s vodivosťou menej ako 5 μScm^{-1} .

Prístroj na destiláciu vody nesmie obsahovať žiadne časti vyrobené z medi.

Zásobné roztoky

CaCl ₂ · 2 H ₂ O (dihydrát chloridu vápenatého):	11,76 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (heptahydrát síranu horečnatého):	4,93 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	
NaHCO ₃ (hydrouhličitan sodný):	2,59 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	
KCl (chlorid draselný):	0,23 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	

Rekonštituovaná rozpúšťacia voda

Zmiešajte 25 ml z každého zo štyroch zásobných roztokov a doplňte do 1 litra vodou.

Prevzdušňujte, pokiaľ sa koncentrácia rozpusteného kyslíka nebude rovnáť koncentrácii nasýtenia vzdušným kyslíkom.

Hodnota pH by mala byť 7,8 $\pm$ 0,2.

Ak je to potrebné, upravte pH s NaOH (hydroxidom sodným) alebo s HCl (kyselinou chlorovodíkovou).

Takto pripravená rozpúšťacia voda sa nechá stáť asi 12 hodín a nesmie sa ďalej prevzdušňovať.

Celkové množstvo Ca a Mg iónov v tomto roztoku je 2,5 mmol na liter. Pomer Ca: Mg iónov je 4: 1 a pomer Na: K iónov je 10: 1. Celková alkalita roztoku je 0,8 mmol na liter.

Žiadna odchýlka pri príprave rozpúšťacej vody nesmie zmeniť zloženie ani vlastnosti vody.

Dodatok 2

Druhy rýb odporučených na testovanie

Odporučený druh	Odporučený rozsah teplôt pri teste (°C)	Odporučená celková dĺžka rýb (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton – Buchanan), dánio pruhované	20 až 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), Fathead minnow	20 až 24	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), kapor obyčajný	20 až 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck a Schlegel 1850), halančík japonský	20 až 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), pávie očko	20 až 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque, Linneaus 1758), slnečnica modrá	20 až 24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988), pstruh dúhový	12 až 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), jalec zlatý	20 až 24	6,0 ± 2,0

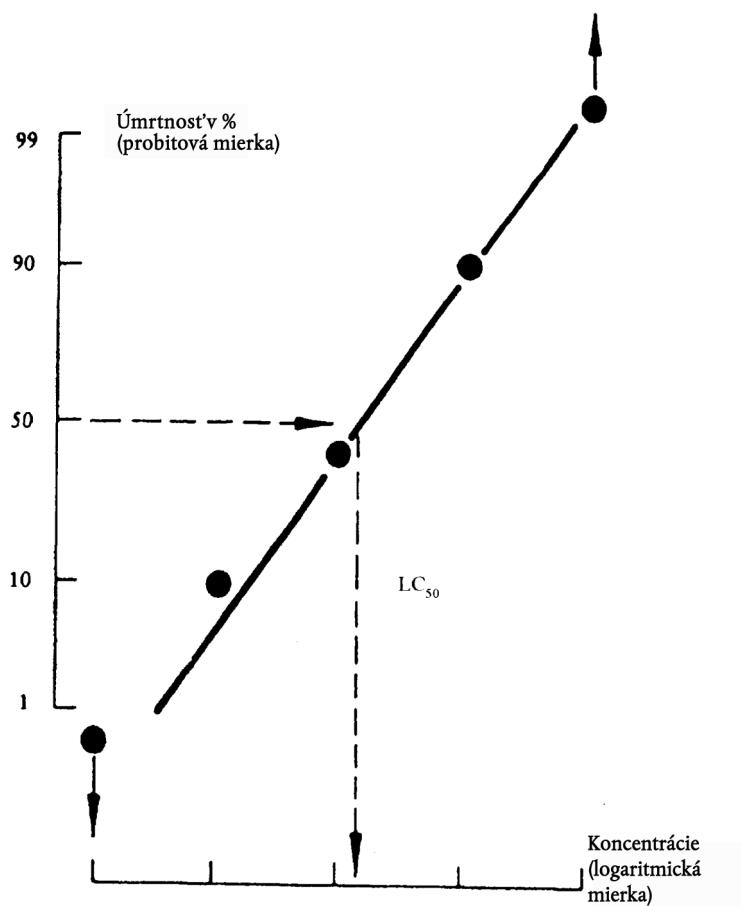
Získavanie rýb

Ryby uvedené v zozname vyššie sa dajú veľmi dobre chovať a sú dostupné počas celého roka. Dajú sa dobre rozmnožovať a chovať na rybárskych farmách alebo v laboratóriu, za kontrolovaných podmienok, čo sa týka ochorení a parazitov, takže testované zvieratá sú zdravé a známeho rodičovského pôvodu. Tieto ryby sú dostupné v mnohých častiach sveta.

Dodatok 3

Príklad krivky závislosti mortality, vyjadrenej v percentách, od koncentrácie

Príklad stanovenia LC_{50} na pravdepodobnostnom logaritmickom papieri



C.2. AKÚTNA TOXICITA NA DAFNÍACH**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Účelom tohto testu je stanoviť strednú efektívnu koncentráciu látky pre imobilizáciu (EC_{50}) dafnie v sladkej vode. Ak je to možné, je žiaduce mať informácie o rozpustnosti vo vode, tlaku pár, chemickej stabilite, disociačných konštantách a biodegradabilite látky pred začiatkom testu.

Ďalšie informácie [napr. štruktúrny vzorec, stupeň čistoty, druh a percentuálne zastúpenie nečistôt, prítomnosť a množstvo aditív (prísad) a rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda] sa tiež berú do úvahy pri plánovaní testu a pri interpretácii výsledkov.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Požiadavka na stanovenie LC_{50} pre dafnie sa považuje za splnenú stanovením EC_{50} podľa tejto skúšobnej metódy.

Akútna toxicita je vyjadrená v tomto teste ako stredná efektívna koncentrácia (EC_{50}) imobilizácie. Je to koncentrácia, v termínoch pôvodných hodnôt, ktorá imobilizuje 50 % dafníí v testovanej násade počas kontinuálnej periódy expozície, ktorá musí byť uvedená.

Imobilizácia:

Dafnie, ktoré nie sú schopné plávať počas 15 sekúnd po opatrnom premiešaní skúšobnej nádoby, sa považujú za imobilné.

Všetky koncentrácie testovanej látky sú uvedené v hmotnosti na objem (mg na liter). Môžu byť tiež vyjadrené v hmotnosti na hmotnosť ($mg \cdot kg^{-1}$).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa môžu testovať s cieľom preukázať, že v laboratórnych skúšobných podmienkach nedošlo k významnej zmene citlivosti testovaných druhov.

Súhrn výsledkov kruhového testu EHS s použitím štyroch rozličných látok uvedených v dodatku 2.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Limitný test sa vykoná pri 100 mg na liter, aby sa preukázalo, že EC_{50} je väčšia ako táto koncentrácia.

Dafnie sú exponované testovanej látke pridanej do vody v rôznych koncentráciách počas 48 hodín. Ak sa použije kratší test, potom sa zdôvodní v záverečnej správe z testu.

Za inak rovnakých podmienok testu a pri zodpovedajúcom rozsahu koncentrácie testovanej látky rozdielne koncentrácie testovanej látky vykazujú rozdielne priemerné stupne účinku na schopnosť plávania dafníí. V dôsledku rozdielnych koncentrácií odlišné percento dafníí nie je viac schopné plávať na konci testu. Koncentrácie spôsobujúce 0 % alebo 100 % imobilizáciu sa zistia priamo z pozorovania testu. Hodnota EC_{50} sa stanoví výpočtom po 48 hodinách, ak je to možné.

Pre túto metódu sa používa statický test, a preto sa skúšobné roztoky neobnovujú počas trvania doby expozície.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Kritériá kvality sa aplikujú na limitný test aj na kompletnú testovaciu metódu.

Imobilizácia pri kontrolách nesmie presahovať 10 % na konci testu.

Testované dafnie nesmú byť v kontrolných skupinách zachytené na povrchu vody.

Je žiaduce, aby koncentrácia rozpusteného kyslíka v skúšobných nádobách zostala nad 3 mg na liter počas celého testu. Avšak za žiadnych okolností by sa koncentrácia rozpusteného kyslíka nemala znížiť pod 2 mg na liter.

Koncentrácia testovanej látky sa bude udržiavať v rámci 80 % pôvodnej koncentrácie počas celého testu.

Pre látky, ktoré sú ľahko rozpustné v testovacom médiu a ktoré tvoria stabilné roztoky, napr. tie, ktoré nebudú vo významnej miere prchavé, nebudú sa rozkladať, hydrolyzovať ani adsorbovať, sa ich počiatočná koncentrácia môže považovať za ekvivalentnú k nominálnej koncentrácii. Musí byť dokázané, že koncentrácie sa udržiavali počas celého testu a kritériá kvality sa dodržali.

Pre látky, ktoré sú:

- i) slabo rozpustné v testovacom médiu alebo
- ii) schopné vytvárať stabilné emulzie alebo disperzie, alebo
- iii) nestabilné vo vodných roztokoch,

sa počiatočná koncentrácia bude považovať za koncentráciu meraní v roztoku (alebo ak to nie je technicky možné, meraní vo vodnom stĺpci) na začiatku testu. Koncentrácia sa stanoví až po vytvorení rovnováhy, ale pred uvedením testovaných organizmov.

Vo všetkých týchto prípadoch sa musia vykonať ďalšie merania počas testu, aby sa potvrdili aktuálne expozičné koncentrácie alebo aby sa dodržali kritériá kvality.

Hodnota pH by sa nemala meniť viac ako v rozsahu jednej jednotky.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. Reagenty

1.6.1.1. Roztoky testovaných látok

Zásobné roztoky požadovanej sily sa pripravujú rozpustením látky v deionizovanej vode alebo vo vode podľa 1.6.1.2.

Zvolené koncentrácie na testovanie sa pripravujú zriedením zásobného roztoku. Ak sa testujú vysoké koncentrácie, potom možno látku rozpustiť priamo vo vode.

Látky by sa normálne mali testovať len po limit rozpustnosti. Pri niektorých látkach (napr. látkach s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo vysokou hodnotou P_{ow} alebo tie, ktoré sú schopné tvoriť stabilné disperzie namiesto pravých roztokov vo vode) je prijateľné testovať koncentrácie nad limitom rozpustnosti látky, aby sa zaistilo, že sa dosiahla maximálna rozpustná/stabilná koncentrácia. Je dôležité, aby táto koncentrácia nejakým spôsobom nenarušovala testovací systém (napr. film látky na povrchu vody, ktorý bráni okysličovaniu vody a pod.).

Ultrazvuková disperzia, organické rozpúšťadlá, emulzifikátory alebo dispergujúce látky sa môžu použiť ako pomôcka pri príprave zásobných roztokov látok s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo ako pomôcka pri dispergovaní týchto látok v testovacom médiu. Ak sa použijú takéto pomocné látky, potom všetky testované koncentrácie majú obsahovať rovnaké množstvo pomocnej látky a mala by sa vykonať dodatočná kontrola, pri ktorej sú dafnie vystavené rovnakej koncentrácii pomocnej látky, aká sa používa v skúšobných sériách. Koncentrácia takýchto pomocných látok by mala byť minimalizovaná, ale v žiadnom prípade by nemala presahovať 100 mg na liter skúšobného média.

Test je potrebné vykonať bez úpravy pH. Ak dochádza k výraznej zmene pH, odporúča sa, aby sa test zopakoval s úpravou pH a výsledky sa zaznamenali. V takomto prípade by sa mala upraviť pH hodnota zásobného roztoku podľa pH hodnoty vodného roztoku, pokiaľ nie je špeciálny dôvod tak neurobiť. Na tento účel sa odporúča HCl a NaOH. Úpravu pH hodnoty je potrebné vykonať takým spôsobom, aby sa koncentrácia testovanej látky v zásobnom roztoku výrazne nezmenila. Akúkoľvek chemickú reakciu alebo fyzikálnu precipitáciu testovanej látky alebo prípravku počas úpravy hodnoty pH je potrebné uviesť v správe z testu.

1.6.1.2. Používaná (testovacia) voda

V tomto teste sa používa rekonštituovaná voda [pozri dodatok 1 a odkaz (2): ISO 6341]. Aby sa vyhlo potrebe aklimatizácie pred testom, odporúča sa, aby voda používaná na kultiváciu bola podobnej kvality (pH, tvrdosť) ako voda použitá pri testovaní.

1.6.2. Prístroje

Mali by sa použiť normálne laboratórne prístroje a zariadenia. Zariadenie, ktoré prichádza do kontaktu s testovanými roztokmi, by prednostne malo byť zo skla:

- prístroj na meranie koncentrácie kyslíka (s mikroelektrodou alebo s iným vhodným zariadením na meranie rozpustného kyslíka v nízkoobjemových vzorkách),
- adekvátny prístroj na meranie a udržiavanie teploty,
- pH meter,
- zariadenie na stanovenie tvrdosti vody.

1.6.3. Testované organizmy

Daphnia magna je preferovaný testovací druh, hoci *Daphnia pulex* je tiež povolená. Pokusné zvieratá by mali byť mladšie ako 24-hodinové na začiatku testu, laboratórne rozmnožované, zdravé a so známym pôvodom (napr. chov, akékoľvek predchádzajúce ošetrenie atď.).

1.6.4. Testovací postup

Konečnému testu môže predchádzať vyhľadávací test, aby sa získala informácia o rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú v hlavnom teste.

Vykonáva sa jedna kontrola bez testovanej látky, a ak je to relevantné, tiež sa vykonáva jedna kontrola obsahujúca pomocnú látku, navyše k testovaným sériám.

Dafnie sú exponované chemickou látkou tak, ako je uvedené nižšie:

- *trvanie*: uprednostňuje sa 48 hodín,
- *počet zvierat*: aspoň 20 zvierat na každú testovanú koncentráciu, pričom sa uprednostňuje rozdelenie do štyroch násad po piatich zvieratách alebo dvoch násad po desiatich zvieratách,
- *dávkovanie*: aspoň 2 ml skúšobného roztoku by mali pripadať na každé zviera,
- *testovacia koncentrácia*: testovací roztok by mal byť pripravený tesne pred jeho použitím, a to prednostne bez použitia iného rozpúšťadla ako vody. Koncentrácie sa pripravujú v geometrických sériách, pričom pomer koncentrácií nepresahuje 2,2. Koncentrácie, pri ktorých dochádza k 0 % a 100 % imobilizácii po 48 hodinách, ako aj k imobilizácii medzi týmito okrajovými hodnotami, umožňujúcimi výpočet EC₅₀ po 48 hodinách, by sa mali testovať spolu s kontrolami,
- *voda*: pozri 1.6.1.2,
- *svetlo*: voliteľné je cyklické striedanie svetla a tmy,
- *teplota*: testovacia teplota by mala byť medzi 18 °C a 22 °C, ale pre každý jednotlivý test by mala byť konštantná v rozsahu ±1 °C,

- *prevzdušňovanie*: testovací roztok nesmie byť prevzdušňovaný (prebublávaný),
- *kŕmenie*: žiadne.

Hodnota pH a koncentrácia kyslíka v kontrolách a vo všetkých testovaných koncentráciách by sa mali merať na konci testu, pH testovaného roztoku by sa nemalo meniť.

Prchavé látky by sa mali testovať v kompletne naplnenej uzavretej nádobe, dostatočne veľkej na to, aby sa zabránilo nedostatku kyslíka.

Dafnie sa kontrolujú aspoň po 24 hodinách expozície a opäť po 48 hodinách expozície.

Limitný test

Pri použití postupov opísaných v tejto skúšobnej metóde sa môže limitný test vykonať pri koncentrácii 100 mg na liter, aby sa preukázalo, že EC_{50} je väčšia ako táto koncentrácia.

Ak sú vlastnosti látky také, že sa nemôže dosiahnuť koncentrácia 100 mg na liter v testovanom roztoku, limitný test by sa mal vykonať pri koncentrácii rovnjej rozpustnosti látky (alebo pri maximálnej koncentrácii, pri ktorej dochádza k tvorbe stabilnej disperzie) v použitom médiu (pozri tiež bod 1.6.1.1).

Limitný test by sa mal vykonať s 20 dafniami rozdelenými do dvoch alebo štyroch násad, s rovnakými počtami v kontrolách. Ak dôjde k výskytu imobilizácie, potom sa musí vykonať kompletná štúdia.

2. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Pre každú periódu, v ktorej boli zaznamenávané pozorovania (24 a 48 hodín), sa vynesie závislosť percentuálnej úmrtnosti pre každú periódu expozície oproti koncentrácii na semilogaritmickom papieri.

Ak je to možné, pre každý pozorovací čas by sa mali odhadnúť EC_{50} a limity spoľahlivosti ($p = 0,05$) použitím štandardných postupov, tieto hodnoty sa zaokrúhľia na jedno alebo väčšinou dve platné číslice (príklady zaokrúhľenia na dve číslice: 173,5 na 170, 0,127 na 0,13 a 1,21 na 1,2).

V tých prípadoch, keď sklon krivky koncentrácia/percentá je príliš strmý a neumožňuje výpočet EC_{50} , stačí grafický odhad tejto hodnoty.

Keď v dvoch po sebe nasledujúcich koncentráciách v pomere 2,2 dochádza len k 0 % a 100 % úmrtnosti, tieto dve hodnoty stačia na indikovanie rozsahu, do ktorého patrí EC_{50} .

Ak sa pozoruje, že nemožno udržať stabilitu alebo homogenitu testovanej látky, toto by sa malo zaznamenať a výsledky by sa mali interpretovať so zvýšenou pozornosťou.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- informácie o testovanom organizme (vedecký názov kmeňa, dodávateľ alebo zdroj, akékoľvek predbežné ošetrovanie, metóda chovu – vrátane zdroja, druh a množstvo potravy, režim kŕmenia,
- zdroj vody a jej hlavné chemické charakteristiky (pH, teplota, tvrdosť),
- v prípade látky s nízkou rozpustnosťou vo vode metódy prípravy zásobného a skúšobného roztoku,
- koncentráciu pomocných látok,
- zoznam použitých koncentrácií a všetky dostupné informácie týkajúce sa stability testovanej látky pri daných koncentráciách v testovanom roztoku,

- použité metódy a získané výsledky, ak bola vykonaná analýza látky,
- výsledky limitného testu, ak bol vykonaný,
- opis skúšobného zariadenia,
- režim osvetlenia,
- koncentrácia rozpusteného kyslíka, pH hodnoty a teploty skúšobných roztokov,
- dôkaz, že boli splnené kritériá kvality,
- tabuľka uvádzajúca kumulatívnu imobilizáciu pri každej koncentrácii a kontrolu (a tiež kontrolu s pomocnou látkou, ak je to potrebné) pri všetkých odporučených pozorovacích časoch (24 h a 48 h),
- graf závislosti koncentrácia/percentá na konci testu,
- ak je to možné, hodnoty EC_{50} pri každom z odporučených pozorovacích časov (s 95 % limitom spoľahlivosti),
- štatistické postupy použité pri stanovení hodnôt EC_{50} ,
- výsledky získané s referenčnou chemickou látkou, ak sa použila,
- najvyššiu testovanú koncentráciu nespôsobujúcu imobilizáciu počas celého testu,
- najnižšiu testovanú koncentráciu spôsobujúcu 100 % úmrtnosť počas celého testu.

4. ODKAZY

- (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.

Dodatok 1

Rekonštituovaná voda

Príklad vhodnej rozpúšťacej vody (podľa ISO 6341)

Všetky chemické látky musia byť analytickej čistoty.

Voda má byť destilovaná, dobrej kvality alebo deionizovaná s vodivosťou menej ako $5 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Prístroj na destiláciu vody nesmie obsahovať žiadne časti vyrobené z medi.

Zásobné roztoky

CaCl ₂ · 2 H ₂ O (dihydrát chloridu vápenatého):	11,76 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (heptahydrát síranu horečnatého):	4,93 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	
NaHCO ₃ (hydrouhličitan sodný):	2,59 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	
KCl (chlorid draselný):	0,23 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	

Rekonštituovaná rozpúšťacia voda

Zmiešajte 25 ml z každého zo štyroch zásobných roztokov a doplňte do 1 litra vodou.

Prevzdušňujte, pokiaľ sa koncentrácia rozpusteného kyslíka nebude rovnať hodnote pri nasýtení vzduchom.

Hodnota pH má byť 7,8 ± 0,2.

Ak je to potrebné, upravte pH s NaOH (hydroxidom sodným) alebo s HCl (kyselinou chlorovodíkovou).

Takto pripravená rozpúšťacia voda sa nechá stáť asi 12 hodín a nesmie sa ďalej prevzdušňovať.

Celkové množstvo Ca a Mg iónov v tomto roztoku je 2,5 mmol na liter. Pomer Ca: Mg iónov je 4: 1 a pomer Na: K iónov je 10: 1. Celková alkalita roztoku je 0,8 mmol na liter.

Žiadna odchýlka pri príprave rozpúšťacej vody nesmie zmeniť zloženie ani vlastnosti vody.

Dodatok 2

Súhrn výsledkov kruhového testu EHS vykonaného v roku 1978 (taktiež citovaný v odkaze 2).

Upozornenie: účelom tohto kruhového testu bolo stanovenie EC₅₀ za 24 hodín.

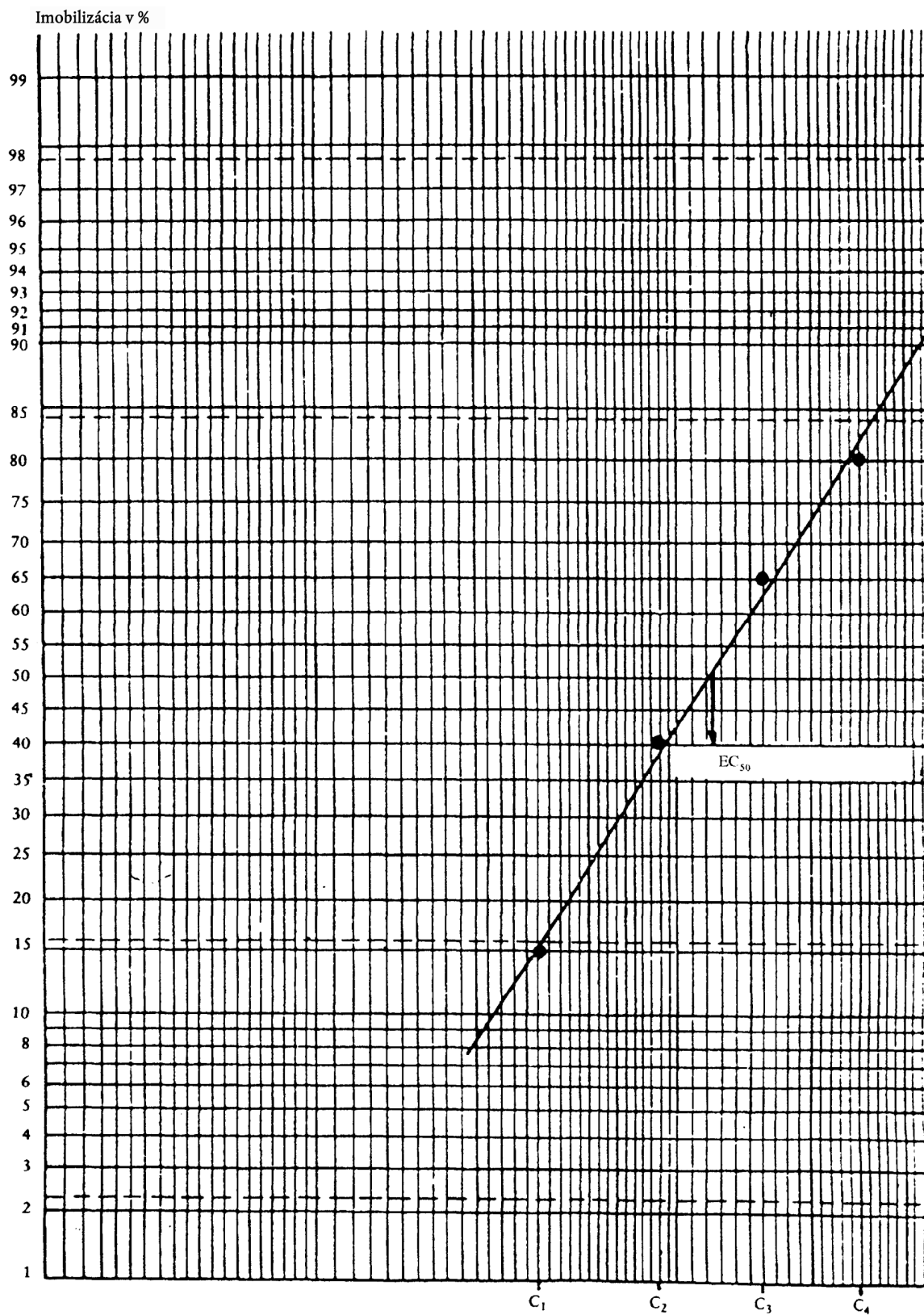
Použité látky:

1. dvojchróman draselný;
2. kyselina tetrapropylbenzensulfonová;
3. tetrapropylbenzensulfonan sodný;
4. 2,4,5-trichlórfenoxyoctan draselný.

Látka	Počet zúčastnených laboratórií	Počet výsledkov na výpočet	Stredná hodnota 24-hodínovej EC ₅₀ mg/l
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

Dodatok 3

Príklad závislosti percentuálnej imobilizácie od koncentrácie

Príklad stanovenia EC_{50} použitím pravdepodobnostného logaritmickeho papiera

C.3. TEST INHIBÍCIE RASTU RIAS**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Účelom tohto testu je stanoviť účinky látky na rast jednobunkových zelených rias. Relatívne krátke (72 hodín) testy môžu zhodnotiť účinky na niekoľkých generáciách. Táto metóda môže byť prispôbena na použitie s niekoľkými druhmi jednobunkových rias, v takomto prípade musí byť uvedený opis použitej metódy spolu s uvedením výsledkov v správe z testu.

Táto metóda sa najľahšie použije pre látky rozpustné vo vode, kde je pravdepodobné, že v podmienkach testu zostanú vo vode.

Metóda sa môže použiť pre látky, ktoré priamo neinterferujú s meraním rastu rias.

Pokiaľ je to len možné, je žiaduce mať informácie o rozpustnosti vo vode, tlaku pár, stabilite, disociačných konštantách a biodegradabilite látky pred začiatkom testu.

Ďalšie informácie [napr. štruktúrny vzorec, stupeň čistoty, druh a percentuálne zastúpenie nečistôt, prítomnosť a množstvo aditív (prísad) a rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda] sa tiež berú do úvahy pri plánovaní testu a pri interpretácii výsledkov.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Bunková hustota: počet buniek na mililiter.

Rast: prírastok bunkovej hustoty počas trvania testu.

Rýchlosť rastu: prírastok bunkovej hustoty na jednotku času.

EC_{50} v tejto metóde je koncentrácia testovanej látky, ktorá spôsobí 50 % zníženie rastu ($E_b C_{50}$) alebo rýchlosti rastu ($E_r C_{50}$) vzhľadom na kontrolu.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku): v tejto metóde je to najvyššia testovaná koncentrácia, pri ktorej sa nepozoruje výrazná inhibícia rastu vzhľadom na kontrolu.

Všetky koncentrácie testovanej látky sú uvedené v hmotnosti na objem (mg na liter). Môžu byť tiež vyjadrené v hmotnosti na hmotnosť ($mg \cdot kg^{-1}$).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa môžu testovať s cieľom preukázať, že v laboratórnych skúšobných podmienkach nedošlo k významnej zmene citlivosti testovaných druhov.

Ak sa použije referenčná látka, potom by mali byť v správe z testu uvedené výsledky, ktoré sa s touto látkou dosiahli. Dvojchróman draselný sa môže použiť ako referenčná látka, ale jeho farba môže ovplyvňovať kvalitu a intenzitu svetla pre bunky a tiež spektrofotometrické stanovenia, ak sa použijú. Dvojchróman draselný sa použil v medzinárodnom inter-laboratórnom teste [pozri odkaz (3) a dodatok 2].

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Limitný test sa môže vykonať pri 100 mg na liter, aby sa preukázalo, že EC_{50} je väčšia ako táto koncentrácia.

Exponenciálne rastúce kultúry vybraných zelených rias sú exponované rôznym koncentráciám testovanej látky počas niekoľkých generácií v definovaných podmienkach.

Testované roztoky sa inkubujú počas 72 hodín. Bunková hustota sa v každom roztoku meria aspoň každých 24 hodín. Stanoví sa inhibícia rastu vzhľadom na kontrolnú kultúru.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Kritériá kvality sa aplikujú na limitný test aj na kompletnú testovaciu metódu.

Hustota buniek v kontrolných kultúrach by mala vzrásť aspoň o faktor 16 počas troch dní.

Koncentrácie testovanej látky sa budú udržiavať v rámci 80 % pôvodných koncentrácií počas celého testu.

Pre látky, ktoré sú ľahko rozpustné v testovacom médiu a ktoré tvoria stabilné roztoky, napr. tie, ktoré nebudú vo významnej miere prchavé, nebudú sa rozkladať, hydrolyzovať ani adsorbovať, sa ich počiatočná koncentrácia môže považovať za ekvivalentnú k nominálnej koncentrácii. Musí sa dokázať, že koncentrácie sa udržiavali počas celého testu a kritériá kvality sa dodržali.

Pre látky, ktoré sú:

- i) slabo rozpustné v testovacom médiu alebo
- ii) schopné vytvárať stabilné emulzie alebo disperzie, alebo
- iii) nestabilné vo vodných roztokoch,

sa bude počiatočná koncentrácia považovať za koncentráciu meraní na začiatku testu. Koncentrácia sa stanoví až po vytvorení rovnováhy.

Vo všetkých týchto prípadoch sa musia vykonať ďalšie merania počas testu, aby sa potvrdili aktuálne expozičné koncentrácie alebo aby sa dodržali kritériá kvality.

Je známe, že počas testu sa môže významné množstvo testovanej látky vniesť do biomasy rias. Preto s cieľom preukázania súladu s vyššie uvedenými kritériami kvality je potrebné brať do úvahy množstvo látky vnesenej do biomasy rias, ako aj látky v roztoku (alebo ak to nie je technicky možné, merané vo vodnom stĺpci). Avšak stanovenie koncentrácie látky v biomase rias môže predstavovať významné technické problémy, súlad s kritériami kvality sa môže preukázať tak, že sa testuje nádoba s najväčšou koncentráciou látky, ale bez rias, a meria sa koncentrácia v roztoku (alebo ak to nie je technicky možné, merané vo vodnom stĺpci) na začiatku a na konci testu.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. Reagenty

1.6.1.1. Roztoky testovaných látok

Zásobné roztoky požadovanej sily sa pripravujú rozpustením látky v deionizovanej vode alebo vode podľa 1.6.1.2.

Zvolené skúšobné koncentrácie sa pripravujú pridaním vhodných objemov ku kultúram rias (pozri dodatok 1). Látky sa testujú len po limit rozpustnosti. Pri niektorých látkach (napr. látkach s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo vysokou hodnotou P_{ow} alebo tých, ktoré sú schopné tvoriť stabilné disperzie namiesto pravých roztokov vo vode) je prijateľné testovať koncentrácie nad limitom rozpustnosti látky, aby sa zaistilo, že sa dosiahla maximálna rozpustná/stabilná koncentrácia. Je však dôležité, aby táto koncentrácia nejakým spôsobom nenarušovala testovací systém (napr. film látky na povrchu vody, ktorý bráni okysličovaniu vody atď.).

Ultrazvuková disperzia, organické rozpúšťadlá, emulzifikátory alebo dispergujúce látky sa môžu použiť ako pomôcka pri príprave zásobných roztokov látok s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo ako pomôcka pri dispergovaní týchto látok v testovacom médiu. Keď sa použijú takéto pomocné látky, potom všetky testované koncentrácie majú obsahovať rovnaké množstvo pomocných látok a mali by sa vykonať dodatočné kontroly pri rovnakých koncentráciách pomocných látok, aké sa použijú v skúšobných sériách. Koncentrácia takýchto pomocných látok by mala byť minimalizovaná, ale v žiadnom prípade by nemala presahovať 100 mg na liter skúšobného média.

Test je potrebné vykonať bez úpravy pH. Ak dochádza k výraznej zmene pH, odporúča sa, aby sa test zopakoval s úpravou pH a výsledky sa zaznamenali. V takomto prípade by mala byť upravená pH hodnota zásobného roztoku podľa pH hodnoty vodného roztoku, pokiaľ nie je špeciálny dôvod tak neurobiť. Na tento účel sa odporúča HCl a NaOH. Úpravu pH hodnoty je potrebné vykonať takým spôsobom, aby sa koncentrácia testovanej látky v zásobnom roztoku výrazne nezmenila. Akúkoľvek reakciu alebo fyzikálne vyžrážanie testovanej látky počas úpravy hodnoty pH je potrebné uviesť v správe z testu.

1.6.1.2. Skúšobné médium

V teste by sa mala použiť destilovaná voda dobrej kvality alebo deionizovaná voda s vodivosťou menšou ako $5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Prístroj na destiláciu vody nesmie obsahovať žiadne časti vyrobené z medi.

Odporúča sa použiť toto médium.

Pripravajú sa štyri zásobné roztoky podľa tejto tabuľky. Zásobné roztoky sa sterilizujú membránovou filtráciou alebo autoklavovaním a skladujú sa v tme pri 4°C . Zásobný roztok č. 4 by mal byť sterilizovaný iba membránovou filtráciou. Tieto zásobné roztoky sa zriedia, aby sa dosiahla finálna koncentrácia živín v skúšobných roztokoch.

Živina	Koncentrácia v zásobnom roztoku		Konečná koncentrácia v testovacom roztoku	
Zásobný roztok č. 1: makroživiny				
NH ₄ Cl	1,5	g·l ⁻¹	15	mg·l ⁻¹
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2	g·l ⁻¹	12	mg·l ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8	g·l ⁻¹	18	mg·l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	g·l ⁻¹	15	mg·l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,16	g·l ⁻¹	1,6	mg·l ⁻¹
Zásobný roztok č. 2: Fe-EDTA				
FeCl ₃ ·6H ₂	80	mg·l ⁻¹	0,08	mg·l ⁻¹
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100	mg·l ⁻¹	0,1	mg·l ⁻¹
Zásobný roztok č. 3: stopové prvky				
H ₃ BO ₃	185	mg·l ⁻¹	0,185	mg·l ⁻¹
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415	mg·l ⁻¹	0,415	mg·l ⁻¹
ZnCl ₂	3	mg·l ⁻¹	3 × 10 ⁻³	mg·l ⁻¹
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5	mg·l ⁻¹	1,5 × 10 ⁻³	mg·l ⁻¹
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01	mg·l ⁻¹	10 ⁻⁵	mg·l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7	mg·l ⁻¹	7 × 10 ⁻³	mg·l ⁻¹
Zásobný roztok č. 4: NaHCO ₃				
NaHCO ₃	50	g·l ⁻¹	50	mg·l ⁻¹

Hodnota pH média je po vytvorení rovnováhy so vzduchom približne 8.

1.6.2. Prístroje:

- Normálne laboratórne vybavenie.
 - Skúšobné banky vhodného objemu (napr. 250 ml kónické banky sú vhodné, ak je objem skúšobného roztoku 100 ml). Všetky skúšobné banky by mali byť identické, čo sa týka materiálu aj rozmerov.
 - Prístroj na kultiváciu. Miestnosť alebo miesto, v ktorom sa môže udržiavať teplota v rozmedzí 21 °C až 25 °C s presnosťou ± 2 °C a môže byť zabezpečené stále, rovnomerné osvetlenie v spektrálnom rozmedzí 400 nm až 700 nm. Ak riasy v kontrolných kultúrach dosiahli odporučený stupeň rastu, môže sa predpokladať, že podmienky pre rast, vrátane intenzity osvetlenia, sú adekvátne.
- Odporúča sa použiť, pri priemernej úrovni skúšobných roztokov, intenzitu svetla v rozsahu 60 až 120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (35 až 70 $\times 10^{18}$ fotónov $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), keď sa meria v rozsahu 400 nm až 700 nm s použitím vhodného receptora. V prípade meracieho prístroja kalibrovaného v „luxoch“, je ekvivalentný rozsah od 6 000 lx do 10 000 lx.
- Osvetlenie možno zabezpečiť štyrmi až siedmimi 30 W žiarivkami univerzálneho typu s bielym svetlom (farebná teplota je približne 4 300 K) pri vzdialenosti 0,35 m od kultúry rias.
- Meranie hustoty buniek by sa malo vykonať s použitím priamej metódy na počítanie živých buniek, napr. mikroskopom s počítacou komôrkou. Môžu sa však použiť aj iné postupy (fotometria, turbidimetria a pod.), ak sú dostatočne citlivé a ak dostatočne dobre korelujú s hustotou buniek.

1.6.3. Testované organizmy

Odporúča sa použiť rýchlorašúce druhy zelených rias, vhodné na kultivovanie a testovanie. Odporúčajú sa tieto druhy:

- *Selenastrum capricornutum*, napr. ATCC 22662 alebo CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, napr. 86.81 SAG.

Poznámka:

ATCC = American Type Culture Collection (U.S.A.)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (U.K.)

SAG = Collection of algal culture (Göttingen, F.R.G.)

Ak sa použije iný kmeň, je to potrebné uviesť v správe z testu.

1.6.4. Testovací postup

Koncentračný rozsah, v ktorom je pravdepodobné prejavovanie účinkov, sa stanoví na základe výsledkov z vyhodňovacieho testu.

Dve merania rastu (biomasy a stupňa rastu) môžu mať za výsledok úplne rozdielne merania inhibície rastu; obe by sa mali použiť vo vyhodňovacom teste rozsahu, aby sa zaistilo, že geometrický nárast koncentrácií umožní určenie $E_b C_{50}$ a $E_r C_{50}$.

Počiatočná hustota buniek

Odporúča sa, aby počiatočná hustota buniek bola v skúšobnej kultúre približne 10^4 buniek/ml, ak sa použije *Selenastrum capricornutum* a *Scenedesmus subspicatus*. V prípade iných skúšobných druhov sa použije podobná koncentrácia biomasy.

Koncentrácie testovanej látky

Pripraví sa aspoň päť koncentrácií v geometrickej sérii v koncentračnom pomere nepresahujúcom 2,2. Najnižšia testovaná koncentrácia by nemala vykazovať žiadny pozorovateľný účinok na rast rias. Najvyššia testovaná koncentrácia by mala inhibovať rast aspoň na 50 % vzhľadom na kontrolu a v najlepšom prípade by mala úplne zastaviť rast.

Paralelky a kontroly

Každú koncentráciu je potrebné testovať v troch paralelkách. Použijú sa tri paralelky na kontrolu bez testovanej látky, a ak je to potrebné, aj tri paralelky na kontrolu s pomocnou látkou. Ak je to oprávnené, potom sa môže test pozmeniť tak, že sa zvýši počet testovaných koncentrácií a zníži sa počet paraleliiek na koncentráciu.

Realizácia testu

Testované kultúry obsahujúce vhodné koncentrácie testovanej látky a vhodné množstvo inokula rias sa pripraví pridaním potrebného množstva zásobných roztokov testovanej látky k vhodnému množstvu pripravenej kultúry rias (pozri dodatok 1).

Kultivačné banky sa umiestnia v kultivačnom prístroji za trepania. Bunky rias sa udržiavajú v suspenzii trepaním, miešaním alebo prebublávaním so vzduchom, aby sa zlepšila výmena plynov a redukovali sa zmeny pH v testovacom roztoku. Kultúry by sa mali udržiavať pri teplote v rozmedzí 21 °C až 25 °C s presnosťou ± 2 °C.

Hustota buniek v každej banke sa stanoví aspoň 24, 48, a 72 hodín po začatí testu. Filtrované médium, ktoré sa používa na rast rias, obsahujúce vhodnú koncentráciu testovanej látky alebo prípravku, sa použije na stanovenie pozadia, ak sa používa na meranie hustoty buniek iná metóda ako priame spočítavanie.

Hodnota pH sa meria na začiatku testu a tiež po uplynutí 72 hodín.

Hodnota pH kontrol by sa nemala normálne odchyľovať viac ako 1,5 jednotky počas celého testu.

Testovanie prchavých látok

V súčasnosti nie je všeobecne prijatý spôsob testovania prchavých látok alebo prípravkov. Keď je o látke známe, že má tendenciu sa odparovať, potom sa môžu použiť uzavreté skúšobné banky so zväčšeným priestorom pre plynnú fázu. Pri výpočte objemu priestoru pre plynnú fázu je potrebné brať do úvahy možnosť nedostatku CO₂. Boli navrhnuté obmeny tejto metódy [pozri odkaz (4)].

Mali by sa vykonať testy na stanovenie množstva látky ostávajúcej v roztoku a odporúča sa mimoriadna pozornosť pri interpretácii výsledkov testov s prchavými látkami alebo prípravkami v uzavretých systémoch.

Limitný test

Limitný test sa môže vykonať pri koncentrácii 100 mg na liter, aby sa preukázalo, že EC₅₀ je väčšia ako táto koncentrácia. Použijú sa postupy opísané v tejto skúšobnej metóde.

Ak sú vlastnosti látky také, že sa nemôže dosiahnuť koncentrácia 100 mg na liter v testovanom roztoku, limitný test by sa mal vykonať pri koncentrácii rovnjej rozpustnosti látky (alebo pri maximálnej koncentrácii, pri ktorej dochádza k tvorbe stabilnej disperzie) v použitom médiu (pozri tiež bod 1.6.1.1).

Limitný test by sa mal vykonať minimálne v troch opakovaniach s rovnakým počtom kontrol. V limitnom teste by sa mali použiť dve merania rastu (biomasa a rýchlosť rastu).

Ak sa v limitnom teste zistí pokles priemernej biomasy alebo rýchlosti rastu rovný alebo väčší ako 25 % oproti kontrole, potom by sa mal vykonať kompletný test.

2. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Nameraná bunková hustota v testovaných kultúrach a kontrolách je uvedená v tabuľke spolu s koncentraciami testovanej látky a časmi merania. Pre každú skúšanú koncentráciu látky a pre kontrolu zostrojí rastová krivka v podobe grafu logaritmu strednej hustoty buniek v závislosti od času (0 – 72 hodín).

Na stanovenie vzťahu koncentrácie a účinku by sa mali použiť dva nasledujúce prístupy. Niektoré látky môžu pri nízkych koncentráciách stimulovať rast. Do úvahy sa však berú len údaje indikujúce inhibíciu medzi 0 % a 100 %.

2.1. POROVNANIE PLÔCH POD RASTOVÝMI KRIVKAMI

Plocha medzi rastovými krivkami a horizontálnou líniou $N = N_0$ sa môže vypočítať podľa vzorca

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

kde:

A = plocha;

N_0 = počet buniek/ml v čase t_0 (začiatok testu);

N_1 = nameraný počet buniek/ml pri t_1 ;

N_n = nameraný počet buniek/ml v čase t_n ;

t_1 = čas prvého merania od začiatku testu;

t_n = čas n-tého merania od začiatku testu;

n = počet vykonaných meraní od začiatku testu.

Percentuálna inhibícia rastu buniek pri každej koncentrácii testovanej látky (I_A) sa vypočíta podľa vzorca:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

kde

A_c = plocha medzi rastovou krivkou kontroly a horizontálnou líniou $N = N_0$;

A_t = plocha medzi rastovou krivkou pri koncentrácii t a horizontálnou líniou $N = N_0$.

Hodnoty I_A sa nanesú na semilogaritmický papier alebo na semilogaritmickoprobítový papier oproti príslušným A koncentráciám (koncentrácie sa nanášajú na logaritmickú stupnicu). Ak sa použije probítový papier, tak sa bodmi preloží priamka od oka alebo vypočítaním regresie.

Hodnota EC_{50} sa získa z regresnej čiary odčítaním koncentrácie, ktorá zodpovedá 50 % inhibície ($I_A = 50\%$). Aby sa táto hodnota označila jednoznačne vo vzťahu k tejto výpočtovej metóde, navrhuje sa používanie symbolu $E_{bC_{50}}$. Je nevyhnutné, aby $E_{bC_{50}}$ bola označená vhodnou expozičnou dobou, napr. $E_{bC_{50}}(0 - 72 \text{ hodín})$.

2.2. POROVNANIE RÝCHLOSTÍ RASTU

Priemerná špecifická rýchlosť rastu (μ) pre exponenciálne rastúce kultúry sa môže vypočítať ako:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

kde t_0 je čas na začiatku testu.

Alternatívne sa zistí priemerná špecifická rýchlosť rastu zo smernice regresnej priamky v závislosti $\ln N$ oproti času.

Percentuálna inhibícia špecifickej rýchlosti rastu pri každej koncentrácii testovanej látky ($I_{\mu t}$) sa vypočíta podľa vzorca:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

kde

μ_c = stredná špecifická rýchlosť rastu v kontrole;

μ_t = stredná špecifická rýchlosť rastu pri testovanej koncentrácii t .

Percentuálne zníženie priemernej špecifickej rýchlosti rastu pri každej koncentrácii testovanej látky v porovnaní s kontrolnou hodnotou sa vynesie oproti logaritmu koncentrácie. Hodnota EC_{50} sa môže odčítať z výsledného grafu. Na jednoznačné označenie EC_{50} vypočítanej touto metódou sa navrhuje používanie symbolu $E_{rC_{50}}$. Doby merania musia byť uvedené, napr. ak sa merania vykonali v čase medzi 0. a 72. hodinou, uvedie sa symbol $E_{rC_{50}}$ (0 – 72 hodín).

Poznámka: špecifická rýchlosť rastu je vyjadrená v logaritmoch a malé zmeny v rýchlosti rastu môžu viesť k veľkým zmenám v biomase. E_bC a E_rC hodnoty nie sú preto číselne porovnateľné.

2.3. VÝPOČET HODNOTY NOEC

Koncentrácia bez pozorovaného účinku sa stanoví vhodným štatistickým postupom na porovnanie vzoriek (napr. analýza variácií a Dunnettov test) s použitím jednotlivých hodnôt paraleliiek v oblastiach pod rastovými krivkami A (pozri bod 2.1) alebo špecifickými stupňami rastu μ (pozri bod 2.2).

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- testovaná látka: údaje na identifikáciu látky alebo prípravku,
- testovaný organizmus: pôvod, laboratórnu kultúru, číslo kmeňa, metódu kultivácie,
- podmienky skúšania:
 - dátum začiatku a konca testu a jeho dobu,
 - teplotu,
 - zloženie média,
 - kultivačný prístroj,
 - hodnotu pH roztokov na začiatku a na konci testov (je potrebné podať vysvetlenie, ak sa pozorovali odchýlky pH väčšie ako 1,5 jednotky),
 - vehikulum (pomocné rozpúšťadlo) a metódu, ktorá sa použila na rozpustenie testovanej látky a koncentráciu vehikula v testovaných roztokoch,
 - intenzitu a kvalitu svetla,
 - testované koncentrácie (namerané alebo nominálne),
- výsledky:
 - bunkovú hustotu v každej banke v každom meranom bode a metódu na meranie bunkovej hustoty,
 - stredné hodnoty bunkovej hustoty,
 - rastové krivky,
 - hodnoty EC a metódu výpočtu,
 - grafické znázornenie vzťahu koncentrácie a účinku,
 - NOEC,
 - iné pozorované účinky.

4. ODKAZY

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*“, in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.
- (3) ISO 8692 – Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- (4) S. Galassi and M. Vighi – Chemosphere, 1981, vol. 10, 1123 – 1126.

Dodatok 1

Príklad postupu na kultiváciu rias**Všeobecné pozorovania**

Účelom kultivácie na základe predloženého postupu je získať kultúry rias na testovanie toxicity.

Aby sa zabezpečilo, že kultúry rias nie sú kontaminované baktériami, mali by sa použiť vhodné metódy (ISO 4833). Axenické kultúry môžu byť vhodné, ale nevyhnutné sú kultúry s jedným druhom rias.

Všetky činnosti by sa mali vykonať v sterilných podmienkach, aby sa zamedzilo kontaminácii baktériami a inými riasami. Kontaminované kultúry by mali byť odstránené.

Postupy na získanie kultúr rias*Príprava živných roztokov (médii):*

Médium sa môže pripraviť zriedením koncentrovaných zásobných roztokov živín. Na prípravu tuhého média sa pridá 0,8 % agaru. Použitie médium by malo byť sterilné. Sterilizácia autoklávaním môže viesť k strate NH_3 .

Kmeňová kultúra:

Kmeňové kultúry sú malé kultúry rias, ktoré sa pravidelne prenášajú do čerstvého média, aby sa použili ako počiatočný testovací materiál. Ak sa kultúry nepoužívajú pravidelne, naočkujú sa do skúmaviek na šikmý agar. Potom sa prenášajú do čerstvého média aspoň raz za dva mesiace.

Kmeňové kultúry sa kultivujú v kónických bankách obsahujúcich vhodné médium (objem okolo 100 ml). Prenos raz týždenne sa vyžaduje, ak sa riasy inkubujú pri teplote 20 °C pri kontinuálnom osvetlení.

Prenesie sa také množstvo „starej“ kultúry so sterilnou pipetou do banky s čerstvým médium, aby počiatočná koncentrácia rýchlo rastúceho druhu bola asi 100-násobne menšia ako v starej kultúre.

Rýchlosť rastu druhu môže byť stanovená z rastovej krivky. Ak je toto známe, možno určiť hustotu, pri ktorej by sa mala kultúra preniesť do nového média. To sa musí vykonať skôr, ako kultúra dosiahne stacionárnu fázu rastu.

Prípravná kultúra:

Prípravná kultúra je určená na to, aby poskytla potrebné množstvo rias na inokuláciu testovaných kultúr. Prípravná kultúra je inkubovaná za podmienok testu a použije sa, pokiaľ je ešte v exponenciálnom raste, normálne po inkubačnej perióde asi počas troch dní. Kultúry rias obsahujúce deformované alebo abnormálne bunky sa musia odstrániť.

Dodatok 2

Technická norma ISO 8692 – Kvalita vody – Inhibičný test rastu rias v sladkej vode so *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* uvádza tieto výsledky laboratórnych testov zo 16 laboratórií pri testovaní dvojchrómanu draselného:

	Stredné hodnoty (mg/l)	Rozsah (mg/l ¹)
$E_r C_{50}$ (0 – 72 h)	0,84	0,60 až 1,03
$E_b C_{50}$ (0 – 72 h)	0,53	0,20 až 0,75

C.4. STANOVENIE „LAHKEJ“ BIODEGRADOVATEĽNOSTI

ČASŤ I. VŠEOBECNÉ ÚVAHY

I.1. ÚVOD

Opísaných je šesť metód, ktoré umožňujú skríning látok a prípravkov na ľahkú biodegradovateľnosť v aeróbnom vodnom médiu:

- a) Úbytok rozpusteného organického uhlíka (DOC) Die-Away (Metóda C.4-A).
- b) Modifikovaný skríningový test podľa OECD – DOC Die-Away (Metóda C.4-B).
- c) Vývoj oxidu uhličitého (CO₂) (Modifikovaný Sturmov test) (Metóda C.4-C).
- d) Manometrická respirometria (Metóda C.4-D).
- e) Test uzavretej fľaše (Metóda C.4-E).
- f) MITI (Ministerstvo medzinárodného obchodu a priemyslu – Japonsko) (Metóda C.4-F).

Všeobecné zamerania všetkých šiestich testov sú uvedené v časti I metódy. Položky, ktoré sú špecifické pre jednotlivé metódy, sú uvedené v častiach II až VII. Prílohy obsahujú pojmy, vzorce a návody.

Medzilaboratórny porovnávaci test OECD, vykonaný v roku 1988, ukázal, že metódy poskytujú zhodné výsledky. V závislosti od fyzikálneho charakteru látky, ktorá má byť testovaná, sa však môže dávať prednosť určitej metóde.

I.2. VÝBER VHODNEJ SKÚŠOBNEJ METÓDY

Informácie o rozpustnosti látky alebo prípravku, tlaku pár a adsorpčných charakteristikách sú nevyhnutné pri výbere najvhodnejšej metódy. Mal by byť známy chemický vzorec alebo štruktúra, aby sa dali vypočítať a/alebo skontrolovať namerané hodnoty parametrov, napr. ThOD, ThCO₂, DOC, TOC, COD (pozri prílohy I a II).

Testované chemické látky, ktoré sú rozpustné vo vode v koncentrácii aspoň 100 mg/l sa môžu hodnotiť všetkými metódami, pokiaľ nie sú prchavé a neadsorbujú sa. Pre látky alebo prípravky, ktoré sú slaboz rozpustné vo vode, prchavé alebo sa adsorbujú, sú vhodné metódy uvedené v tabuľke č. 1. Spôsob, akým sa má zaobchádzať so slaboz rozpustnými a prchavými látkami alebo prchavými prípravkami je opísaný v prílohe III. Stredne prchavé látky alebo prchavé prípravky sa môžu testovať DOC Die-Away metódou, ak sa zabezpečí dostatok priestoru pre plynnú fázu v skúšobných nádobách (ktoré by mali byť vhodne uzavreté). V takomto prípade sa musí vykonať abiotická kontrola umožňujúca zistenie fyzikálnych strát.

Tabuľka 1: Aplikovateľnosť skúšobných metód

Test	Analytická metóda	Vhodnosť pre chemické látky, ktoré sú:		
		slabo rozpustné	prchavé	adsorbujúce
DOC Die-Away	rozpustený organický uhlík	—	—	+/-
modifikovaný OECD Die-Away	rozpustený organický uhlík	—	—	+/-
Vývoj CO ₂	respirometria: uvoľňovanie CO ₂	+	—	+
manometrická respirometria	manometrická respirometria: spotreba kyslíka	+	+/-	+
uzavretá fľaša	respirometria: rozpustený kyslík	+/-	+	+
MITI	respirometria: spotreba kyslíka	+	+/-	+

Na interpretáciu získaných výsledkov sa požadujú informácie o čistote alebo relatívnom zastúpení jednotlivých zložiek testovaného materiálu, obzvlášť keď sú výsledky malé alebo na okraji detekcie.

Informácie týkajúce sa toxicity testovanej látky alebo prípravku pre baktérie (príloha IV) môžu byť veľmi užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácií a môžu byť nevyhnutné pre správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie.

I.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Na účely kontroly postupu sa testujú referenčné látky alebo prípravky, ktoré spĺňajú kritériá ľahkej biodegradovateľnosti, ich zaradením vo vhodnej banke paralelne k normálnemu testu.

Vhodnými látkami sú: anilín (čerstvo destilovaný), octan sodný, benzoan sodný. Tieto referenčné látky sa degradujú v týchto metódach, a to aj v prípade, ak sa úmyselne nepridalo inokulum.

Odporúča sa, aby za referenčnú látku bola vyhladaná taká, ktorá je ľahko biodegradovateľná, ale vyžaduje prídavok inokula. Navrhnutý bol hydroftalát draselný, ale je potrebné získať viac informácií o tejto látke, skôr ako môže byť prijatá za referenčnú látku.

Pri respirometrických testoch môže byť ovplyvnená spotreba kyslíka látkami obsahujúcimi dusík procesom nitrifikácie (pozri prílohy II a V).

I.4. PRINCÍP SKÚŠOBNÝCH METÓD

Roztok alebo suspenzia testovanej látky v minerálnom médiu sa inokuluje a inkubuje v aeróbnych podmienkach v tme alebo za rozptýleného svetla. Množstvo DOC v testovanom roztoku by sa vzhľadom na inokulum malo udržiavať tak nízko, ako je to len možné v porovnaní s množstvom DOC vzhľadom na testovanú látku. Berie sa zreteľ na endogénnu aktivitu inokula tým, že sa vykonávajú paralelne slepé testy s inokulom, ale bez testovanej látky, hoci endogénna aktivita buniek v prítomnosti látky nebude presne súhlasiť s endogénnou aktivitou v kontrole. Referenčná látka sa testuje paralelne, aby sa kontrolovala činnosť postupov.

Degradácia sa vo všeobecnosti sleduje stanovením parametrov, ako sú DOC, tvorba CO_2 a spotreba kyslíka, a merania sa vykonávajú v dostatočných časových intervaloch, aby to umožnilo identifikovať začiatok a koniec biodegradácie. Pri použití automatických respirometrov je meranie kontinuálne. Hodnota DOC sa niekedy meria navyše k inému parametru, ale zvyčajne sa to robí len na začiatku a na konci testu. Takisto sa môžu použiť špecifické chemické analýzy na hodnotenie primárnej degradácie testovanej látky a stanovenie koncentrácie akéhokoľvek vzniknutého medziproduktu (povinné v MITI teste).

Test trvá za normálnych okolností 28 dní. Test sa však môže ukončiť pred uplynutím 28 dní, ak biodegradčná krivka dosiahla stacionárnu úroveň aspoň pri troch stanoveniach. Testy sa tiež môžu predĺžiť, ak z tvaru krivky vyplýva, že biodegradácia sa síce začala, ale ešte nedosiahla stacionárnu úroveň na 28. deň.

I.5. KRITÉRIÁ KVALITY

I.5.1. Reprodukovateľnosť

Stanovenia by sa mali vykonať aspoň v dvoch paralelkách, a to kvôli charakteru biodegradácie a zmesových bakteriálnych kultúr použitých ako inokulum.

Je všeobecnou skúsenosťou, že čím väčšia koncentrácia mikroorganizmov sa na začiatku pridá k skúšobnému médiu, tým menšie rozdiely sú medzi paralelkami. Kruhové testy ukázali, že môže dochádzať k veľkým rozdielom medzi výsledkami získanými v rôznych laboratóriách, ale normálne je dobrá zhoda v prípade ľahko biodegradovateľných látok.

I.6.1. Voda na prípravu roztokov

Používa sa deionizovaná alebo destilovaná voda neobsahujúca inhibičné koncentrácie toxických látok (napr. ióny Cu^{++}). Musí obsahovať menej ako 10 % organického uhlíka, ktorý sa nachádza v testovanom materiáli. Vysoká čistota skúšobnej vody je nevyhnutná, aby sa eliminovali vysoké hodnoty slepého pokusu. Kontaminácia môže pochádzať z vnútorných nečistôt, iontomeniča a lyzovaných baktérií a rias. Pre každú sériu testov použite len úplne totožnú vodu z jednej sady, ktorá je skontrolovaná analýzou DOC. Takáto kontrola nie je nutná pri teste uzavretej fľaše, ale spotreba kyslíka vo vode musí byť nízka.

I.6.2. Zásobné roztoky minerálnych zložiek

Na prípravu skúšobných roztokov sa pripravujú zásobné roztoky minerálnych zložiek vhodnej koncentrácie. Tieto zásobné roztoky sa môžu použiť (pri rozdielnych faktoroch zriedenia) pre metódy DOC Die-Away, modifikovaného skríningového testu OECD, vývoja CO_2 , manometrickej respirácie, testu uzavretej fľaše. Zriedovacie faktory a špecifická príprava minerálneho média pre test MITI sú uvedené pod hlavičkou špecifických testov.

Zásobné roztoky Pripravujú sa tieto zásobné roztoky s použitím reagentov analytickej čistoty.

- | | | |
|----|--|---------|
| a) | Dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Hydrogénfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Hydrogénfosforečnan disodný dihydrát, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 33,40 g |
| | Chlorid amónny, NH_4Cl | 0,50 g |
| | Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter. Hodnota pH roztoku musí byť 7,4. | |
| b) | Chlorid vápenatý bezvodý, CaCl_2 | 27,50 g |
| | alebo chlorid vápenatý dihydrát, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 36,40 g |
| | Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter. | |
| c) | Síran horečnatý heptahydrát, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter. | |
| d) | Chlorid železitý hexahydrát, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter. | |

Poznámka: aby nebolo potrebné pripravovať tento roztok tesne pred jeho použitím, pridajte jednu kvapku koncentrovanej HCl alebo 0,4 g EDTA na liter.

I.6.3. Zásobné roztoky chemických látok a prípravkov

Podľa vhodnosti napríklad rozpustíte 1 až 10 g testovanej alebo referenčnej látky, alebo prípravku v deionizovanej vode a doplníte do 1 litra, ak rozpustnosť presahuje 1g/l. Inak pripravte zásobný roztok v minerálnom médiu alebo pridajte látku alebo prípravok priamo do minerálneho média. O zaobchádzaní s menej rozpustnými látkami alebo prípravkami pozri prílohu III, v teste MITI (Metóda C.4-F) sa však nepoužívajú ani rozpúšťadlá, ani emulzifikátory.

I.6.4. Inokulá

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: napríklad z aktivovaného kalu, kanalizačného výtoku (bez chlóru), povrchových vôd, pôdy alebo ich zmesí. Ak sa používa aktivovaný kal pre testy DOC Die-Away, vývoj CO_2 a manometrická respirometria, odoberie sa z čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú najmä odpadové splaškové vody z domácností. Inokulá z iných zdrojov dávajú rozptýlenejšie výsledky. Zriedenejšie inokulum bez kalových vločiek je potrebné pre testy: modifikovaný skríningový OECD a test uzavretej fľaše, pričom uprednostňovaným zdrojom je sekundárny výtok z čističky odpadových vôd spracúvajúcej splaškové vody z domácností alebo laboratórna jednotka. Inokulum pre test MITI sa získava zo zmesi zdrojov a je opísané pod hlavičkou tohto špecifického testu.

I.6.4.1. *Inokulum z aktivovaných kalov*

Odoberie sa čerstvá vzorka aktivovaného kalu z prevzdušňovacieho tanku čističky odpadových vôd alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú prevažne domáce splaškové vody. Odstránia sa hrubé častice, a ak je to nutné, použije sa jemné sitko a potom sa udržiava kal v aeróbnych podmienkach.

Alternatívne sa ponechá kal sedimentovať alebo sa odstredí (napr. 10 minút pri 1 100 g) po odstránení všetkých hrubých častíc. Odstráni sa supernatant. Kal sa môže premyť v minerálnom médiu. Suspenduje sa koncentrovaný kal v minerálnom médiu, aby sa získala koncentrácia tuhých častíc 3 až 5 g/l, a prevzdušňuje sa, pokiaľ je to potrebné.

Kal sa odoberie zo správne pracujúcej čističky. Ak sa musí kal odobrať z vysokostupňovej čističky alebo je možné, že obsahuje inhibítory, mal by sa premyť. Po dôkladnom premiešaní sa sedimentuje alebo odstredí resuspendovaný kal, odstráni sa supernatant a premytý kal znovu resuspenduje v ďalšom objeme minerálneho média. Tento postup sa opakuje, pokiaľ sa z kalu neodstráni nadbytok substrátu alebo inhibítor.

Z resuspendovaného alebo neošetreného kalu sa odoberie vzorka tesne pred použitím na stanovenie sušiny suspendovaných tuhých látok.

Ďalšou alternatívou je homogenizácia aktivovaného kalu (3 – 5 g suspendovaných tuhých látok/l). Kal sa prevzdušňuje v mechanickom mixéri 2 minúty pri strednej rýchlosti. Zmiešaný kal sa nechá sedimentovať 30 minút alebo ak je to potrebné, aj dlhšie, a dekantuje sa kvapalinou na nižšie použitie ako inokulum v množstve 10 ml/l minerálneho média.

I.6.4.2. *Ostatné zdroje inokula*

Inokulum sa môže získať zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky spracúvajúcej prevažne domáce splaškové vody. Odoberie sa čerstvá vzorka a počas prepravy sa udržiava prevzdušňovaním. Nechá sa sedimentovať asi 1 hodinu alebo sa prefiltruje cez hrubý filtračný papier a udržiava sa kvapalina po odstránení sedimentu alebo filtrát v aeróbnom stave, pokiaľ je to potrebné. Tento typ inokula sa môže použiť až do objemu 100 ml na 1 liter minerálneho média.

Ďalším zdrojom inokula je povrchová voda. V tomto prípade sa odoberie vzorka z vhodnej povrchovej vody, napr. rieky, jazera a udržiava sa v aeróbnom stave. Ak je to potrebné, koncentruje sa inokulum filtráciou alebo odstredením.

I.6.5. **Aklimatizácia inokula**

Inokulum sa môže aklimatizovať na experimentálne podmienky, ale nie predadaptované k testovanej látke alebo prípravku. Aklimatizácia pozostáva z prevzdušňovania aktivovaného kalu v minerálnom médiu alebo v sekundárnom výtoku počas 5 až 7 dní pri teplote testovania. Aklimatizácia niekedy zlepšuje presnosť skúšobných metód tým, že znižuje hodnoty slepých pokusov. Za nevyhnutné sa to považuje v prípade aklimatizácie inokula v rámci testu MITI.

I.6.6. **Abiotické kontroly**

Skontroľuje sa možnosť abiotickej degradácie testovanej látky stanovením odstránenia DOC, spotreby kyslíka alebo vývoja oxidu uhličitého v sterilných kontrolách neobsahujúcich inokulum. Sterilizuje sa filtráciou cez membránu (0,2 až 0,45 mikrometra) alebo prídavkom vhodnej toxikkej látky vo vhodnej koncentrácii. Ak sa použije membránová filtrácia, odoberie sa vzorka asepticky, aby sa udržala sterilita. Pokiaľ adsorpcia testovanej látky alebo prípravku to vopred nevylučuje, testy, ktoré merajú biodegradáciu ako odstránenie DOC, obzvlášť s inokulom z aktivovaného kalu, by mali zahŕňať abiotickú kontrolu, ktorá sa inokuluje a sterilizuje jedom.

1.6.7. Počet baniek

Počet baniek v typickom teste je uvedený pod hlavičkou každého testu.

Môžu sa použiť tieto typy baniek:

Testovacia suspenzia: obsahujúca testovanú látku a inokulum.

Inokulový slepý pokus: obsahujúci len inokulum.

Kontrola postupu: obsahujúca referenčnú látku a inokulum.

Abiotická sterilná kontrola: obsahujúca testovanú látku (pozri I.6.6).

Kontrola adsorpcie: obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizujúcu látku.

Kontrola toxicity: obsahujúca testovanú látku, referenčnú látku a inokulum.

Stanovenie v skúšobnej suspenzii a inokulovom slepom pokuse sa vykoná paralelne. Odporúča sa tiež vykonať stanovenia aj v iných bankách paralelne.

Toto sa však nemôže vždy uskutočniť. Je potrebné zaistiť, aby sa odobrali dostatočné vzorky alebo vykonalo vhodné odčítanie, umožňujúce, aby sa zhodnotilo percentuálne odstránenie v 10-dňovom okne.

1.7. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Pri výpočte D_t , percentuálnej degradácie, sa použijú stredné hodnoty paralelných meraní parametrov v testovaných nádobách a v inokulovom slepom pokuse. Vzorce sú uvedené v častiach o špecifických testoch. Pribeh degradácie sa zobrazí graficky a vyznačí sa 10-dňové okno. Vypočíta sa a uvedie percentuálne odstránenie, ktoré sa dosiahlo na konci 10-dňového okna, a hodnota stacionárnej úrovne alebo na konci testu, podľa toho, čo je vhodné.

V respirometrických testoch látky obsahujúce dusík môžu ovplyvniť spotrebu kyslíka kvôli prebiehajúcej nitrifikácii (pozri prílohy II a V).

1.7.1. Degradácia meraná pomocou stanovenia DOC

Percentuálna degradácia D_t v každom čase, keď bola odobraná vzorka, by sa mala vypočítať oddelene pre banky obsahujúce testovanú látku použitím strednej hodnoty meraní DOC, aby sa mohla posúdiť platnosť testu (pozri I.5.2). To sa vypočíta na základe tejto rovnice:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

kde:

D_t = % degradácie v čase t ;

C_o = stredná počiatočná koncentrácia DOC v inokulovanom kultivačnom médiu obsahujúcom testovanú látku (mg DOC/l);

C_t = stredná koncentrácia DOC v inokulovanom kultivačnom médiu obsahujúcom testovanú látku v čase t (mg DOC/l);

C_{bo} = stredná počiatočná koncentrácia DOC v slepom pokuse inokulovaného minerálneho média (mg DOC/l);

C_{bt} = stredná koncentrácia DOC v slepom pokuse inokulovaného minerálneho média v čase t (mg DOC/l).

Všetky koncentrácie sú namerané experimentálne.

I.7.2. Degradácia meraná s použitím špeciálnych analýz

Keď sú dostupné špecifické analytické údaje, primárna biodegradácia sa vypočíta z tejto rovnice:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kde:

D_t = percentuálna degradácia v čase t , normálne po 28 dňoch;

S_a = zvyškové množstvo testovanej látky v inokulovanom médiu na konci testu (mg);

S_b = zvyškové množstvo testovanej látky v slepom pokuse s vodou/médiom, ku ktorému sa pridala len testovaná látka (mg).

I.7.3. Abiotická degradácia

Ak sa použije abiotická sterilná kontrola, vypočíta sa percento abiotickej degradácie s použitím tejto rovnice:

$$\text{abiotická degradácia v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kde:

$C_{s(o)}$ = koncentrácia DOC v sterilnej kontrole, deň 0;

$C_{s(t)}$ = koncentrácia DOC v sterilnej kontrole, deň t .

I.8. SPRÁVA

Správa z testu by mala mať, ak je to možné, tieto informácie:

- testované a referenčné chemické látky a ich čistotu,
- podmienky skúšania,
- inokulum: povahu a miesto odobrania, koncentráciu a jeho predprípravu,
- pomer a povahu priemyselného odpadu prítomného v splaškových vodách, ak známa,
- dobu trvania testu a jeho teplotu,
- v prípade slaboz rozpustných testovaných látok alebo prípravkov ich úpravu,
- aplikovanú testovaciu metódu, mali by byť uvedené vedecké dôvody a vysvetlenia pri akejkoľvek zmene postupu,
- súbor údajov,
- pozorované javy inhibície,
- každú pozorovanú abiotickú degradáciu,
- špecifické chemické analytické údaje, ak sú dostupné,
- analytické údaje o medziproduktoch, ak sú dostupné,
- graf závislosti percentuálnej degradácie oproti času pre testovanú a referenčnú látku, lag fázu, degradačnú fázu, 10-dňové okno a sklon by mali byť jasne uvedené (príloha I). Ak bol test v súlade s kritériami kvality, tak sa stredné hodnoty percentuálnej degradácie v bankách obsahujúcich testovanú látku môžu použiť na tvorbu grafu,
- percentuálne vyjadrenie odstránenia po 10-dňovom okne a v stacionárnej fáze alebo na konci testu.

ČASŤ II. ÚBYTOK ROZPUSTENÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKA (DOC DIE- AWAY) (Metóda C.4-A)**II.1. PRINCÍP METÓDY**

Známy objem inokulovaného minerálneho média so známou koncentráciou testovanej látky (10 až 40 mg DOC/l) ako nominálny jediný zdroj organického uhlíka sa prevzdušňuje za tmy alebo pri difúznom svetle pri teplote 22 ± 2 °C.

Degradácia sa sleduje pomocou analýzy DOC v častých intervaloch počas 28 dní. Stupeň biodegradácie sa vypočíta vyjadrením koncentrácie odstráneného DOC (upravené na kontrolu bez inokula) ako percento počiatočnej koncentrácie. Stupeň primárnej biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy na začiatku a na konci inkubácie.

II.2. OPIS METÓDY**II.2.1. Prístroje**

- a) Kónické banky, napr. 250 ml až 2 litre, v závislosti od potrebného objemu pre analýzu DOC.
- b) Trepačka prispôbená na kónické banky, a to s automatickým temperovaním teploty, alebo umiestnená v miestnosti so stabilnou teplotou a s dostatočným výkonom, aby zabezpečila aeróbne podmienky vo všetkých bankách.
- c) Filtračné zariadenie s vhodnými membránami.
- d) Analyzátor DOC.
- e) Prístroj na stanovenie rozpusteného kyslíka.
- f) Odstredivka.

II.2.2. Príprava minerálneho média

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmieša sa 10 ml roztoku (a) s 800 ml vody, pridá po 1 ml roztokov (b) až (d) a doplní do 1 litra vodou.

II.2.3. Príprava a prekondicionovanie inokula

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaný kal, kanalizačný výtok, povrchové vody, pôda alebo ich zmesi.

Pozri: I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

II.2.4. Príprava baniek

Ako príklad sa do dvojlitrových kónických baniek s obsahom 800 ml minerálneho média pridajú vhodné objemy zásobných roztokov testovanej a referenčnej látky do oddelených baniek, aby sa získala koncentrácia ekvivalentná 10 až 40 mg DOC/l. Skontroluje sa pH hodnoty, a ak je to potrebné, upraví sa na hodnotu 7,4. Inokulujú sa banky s aktivovaným kalom alebo iným zdrojom inokula (pozri bod I.6.4), aby sa získala koncentrácia suspendovaných tuhých častíc menšia ako 30 mg/l. Pripravajú sa tiež inokulové kontroly v minerálnom médiu, ale bez testovanej látky alebo referenčnej chemickej látky.

Ak je to potrebné, použite jednu nádobu na skontrolovanie možného inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku inokulovaním roztoku obsahujúceho v minerálnom médiu porovnateľné koncentrácie testovanej aj referenčnej chemickej látky.

Ak je to potrebné, použite tiež ďalšiu sterilnú banku, aby sa skontrolovalo, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku chemickej látky (pozri I.6.6).

Okrem toho, ak existuje podozrenie, že sa testovaná látka alebo prípravok značne adsorbujú na sklo, kal atď., vykoná sa predbežné hodnotenie, aby sa stanovil pravdepodobný rozsah adsorpcie a tak aj vhodnosť testu pre látku alebo prípravok (pozri tabuľku 1). Pripraví sa banka obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizačné činidlo.

Doplňa sa objemy vo všetkých bankách na 1 liter s minerálnym médiom a po premiešaní sa odoberie vzorka z každej banky na stanovenie počiatočnej koncentrácie DOC (pozri prílohu II.4). Otvory baniek sa prikryjú napr. hliníkovou fóliou takým spôsobom, aby sa umožnila voľná výmena vzduchu medzi bankou a okolitou atmosférou. Potom sa vložia nádoby do trepačky a vykoná sa test.

II.2.5. Počet baniek v typickom teste

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

A odporúča sa a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola na adsorpciu.

Banka 8: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

II.2.6. Realizácia testu

Počas celého testu sa meria koncentrácia DOC v každej banke, v paralelkách, v známych časových intervaloch, dostatočne často, aby bolo možné stanoviť začiatok 10-dňového okna a percento odstránenia na konci 10-dňového okna. Odoberie sa len minimálny objem testovanej suspenzie, nevyhnutný na každé stanovenie.

Pred odberom vzorky sa doplnia straty vyparovaním z banky pridaním vody (I.6.1) v potrebnom množstve, ak je to nutné. Dôkladne sa premieša kultivačné médium pred odberom vzorky a zaistí sa, aby sa materiál, ktorý je prilepený k stenám nádob, rozpustil alebo suspendoval pred odobratím vzoriek. Po odobratí vzoriek sa ihneď filtrujú cez membránu alebo sa odstredia (pozri prílohu II.4). Filtrované alebo odstredené vzorky sa analyzujú v ten istý deň alebo sa skladujú pri teplote 2 – 4 °C maximálne 48 hodín alebo pod - 18 °C dlhší čas.

II.3. ÚDAJE A SPRÁVA

II.3.1. Spracovanie výsledkov

Percento degradácie v čase t sa vypočíta tak, ako je uvedené v I.7.1 (stanovenie DOC) a prípadne podľa I.7.2 (špecifická analýza).

Všetky výsledky sa zaznamenávajú na poskytnutý záznamník údajov.

II.3.2. Platnosť výsledkov

Pozri I.5.2.

II.3.3. Správa

Pozri I.8.

II.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

TEST DOC DIE-AWAY**1. LABORATÓRIUM****2. DÁTUM ZAČIATKU TESTU****3. TESTOVANÁ LÁTKA**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: mg/l chemickej látky.

Počiatočná koncentrácia v médiu, t_0 : mg/l chemickej látky.

4. INOKULUM

Zdroj:

Vykonaná úprava:

Predkondicionovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/l.

5. STANOVENIE UHLÍKA

Analýzátor uhlíka:

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testovaná látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, stredná hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, stredná hodnota $C_{b(t)}$					
Inokulový slepý pokus bez testovanej chemickej látky	3	c_1					
		c_2					
		c, stredná hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, stredná hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VYHODNOTENIE ZÁKLADNÝCH ÚDAJOV

Banka č.		Degradácia v % po n dňoch				
		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				
Stredná hodnota ⁽¹⁾	$D = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(¹) Z hodnôt D₁ a D₂ by sa nemal robiť priemer, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku alebo prípravok a kontroly toxicity.

7. ABIOTICKÁ KONTROLA (nepovinná)

	Čas (dni)	
	0	t
Koncentrácia DOC (mg/l) v sterilnej kontrole	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. ŠPECIÁLNA CHEMICKÁ ANALÝZA (nepovinná)

	Zvyškové množstvo testovanej chemickej látky na konci testu (mg/l)	Primárna degradácia v %
Sterilná kontrola	S _b	
Inokulované skúšobné médium	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČASŤ III. MODIFIKOVANÝ SKRÍNINGOVÝ TEST OECD (metóda C.4-B)

III.1. PRINCÍP METÓDY

Odmeraný objem minerálneho média, obsahujúci známu koncentráciu testovanej látky (10 až 40 mg DOC/l), ako nominálny jediný zdroj organického uhlíka sa inokuluje s 0,5 ml odtoku z čistiarne odpadových vôd na liter média. Zmes sa prevzdušňuje v tme alebo pri difúznom osvetlení pri teplote 22 ± 2 °C.

Degradácia sa sleduje pomocou analýzy DOC v častých intervaloch počas 28 dní. Stupeň biodegradácie sa vypočíta vyjadrením koncentrácie odstráneného DOC (upravené na kontrolu bez inokula) ako percento počiatočnej koncentrácie. Stupeň primárnej biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy na začiatku a na konci inkubácie.

III.2. OPIS METÓDY

III.2.1. **Prístroje**

- a) Kónické banky, napr. 250 ml až 2 litre, v závislosti od potrebného objemu pre analýzu DOC.
- b) Trepačka prispôbená na kónické banky, a to s automatickým temperovaním teploty alebo umiestnená v miestnosti so stabilnou teplotou a s dostatočným výkonom, aby zabezpečila aeróbne podmienky vo všetkých bankách.
- c) Filtračné zariadenie s vhodnými membránami.
- d) Analyzátor DOC.
- e) Prístroj na stanovenie rozpusteného kyslíka.
- f) Odstredivka.

III.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmieša sa 10 ml roztoku (a) s 80 ml vody, pridá po 1 ml roztokov (b) až (d) a doplní sa do 1 litra vodou.

Táto metóda používa len 0,5 ml inokula na liter, a preto môže vzniknúť potreba fortifikácie média stopovými prvkami a rastovými faktormi. To sa dosiahne pridaním 1 ml z týchto roztokov na liter konečného média:

Roztok stopových prvkov:

Síran mangánatý tetrahydrát, $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
Kyselina boritá, H_3BO_3	57,2 mg
Síran zinočnatý heptahydrát, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
Heptamolybdenan hexaamónny, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	34,7 mg
Chelát Fe (FeCl_3 s kyselinou etyléndiamíntetraoctovou)	100,0 mg
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	

Vitamínový roztok:

Kvasničný extrakt	15,0 mg
-------------------	---------

Kvasničný extrakt rozpustite v 100 ml vody. Sterilizujte filtráciou cez 0,2-mikrónovú (μm) membránu alebo pripravte čerstvý roztok.

III.2.3. **Príprava a prekondicionovanie inokula**

Inokulum sa môže získať zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú prevažne domáce splaškové vody. Pozri I.6.4.2 a I.6.5.

Použije sa 0,5 ml na liter minerálneho média.

III.2.4. **Príprava baniek**

Ako príklad pridajte 800 ml minerálneho média do 2-litrových kónických baniek a pridajte vhodné objemy zásobných roztokov testovanej a referenčnej látky do oddelených baniek, aby sa získala koncentrácia ekvivalentná 10 až 40 mg DOC/liter. Skontrolujte pH hodnoty, a ak je to potrebné, upravte ich na 7,4. Inokulujte banky s kanalizačným výtokom 0,5 ml/liter (pozri I.6.4.2). Tiež pripravte inokulové kontroly v minerálnom médiu, ale bez testovanej alebo referenčnej látky.

Ak je to potrebné, použite jednu nádobu na skontrolovanie možného inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku inokulovaním roztoku obsahujúceho v minerálnom médiu porovnateľné koncentrácie testovanej aj referenčnej chemickej látky. Ak je to potrebné, použite tiež ďalšiu sterilnú banku, aby sa skontrolovalo, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku chemickej látky (pozri I.6.6).

Okrem toho, ak existuje podozrenie, že sa testovaná látka alebo prípravok značne adsorbujú na sklo, kal atď., vykoná sa predbežné hodnotenie, aby sa stanovil pravdepodobný rozsah adsorpcie a tak aj vhodnosť testu pre látku alebo prípravok (pozri tabuľku 1). Pripraví sa banka obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizačné činidlo.

Doplňa sa objemy vo všetkých bankách na 1 liter s minerálnym médiom a po premiešaní sa odoberie vzorka z každej banky na stanovenie počiatočnej koncentrácie DOC (pozri prílohu II.4). Otvory baniek sa prikryjú napr. hliníkovou fóliou takým spôsobom, aby sa umožnila voľná výmena vzduchu medzi bankou a okolitou atmosférou. Potom sa vložia nádoby do trepačky a vykoná sa test.

III.2.5. Počet baniek v typickom teste

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

A odporúča sa a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola na adsorpciu.

Banka 8: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

III.2.6. Realizácia testu

Počas celého testu sa meria koncentrácia DOC v každej banke, v paralelkách, v známych časových intervaloch, dostatočne často, aby bolo možné stanoviť začiatok 10-dňového okna a percento odstránenia na konci 10-dňového okna. Odoberie sa len minimálny objem testovanej suspenzie, nevyhnutný na každé stanovenie.

Pred odberom vzorky sa doplnia straty vyparovaním z banky pridaním vody (I.6.1) v potrebnom množstve, ak je to nutné. Dôkladne sa premieša kultivačné médium pred odberom vzorky a zaistí sa, aby sa materiál, ktorý je prilepený k stenám nádob, rozpustil alebo suspendoval pred odobratím vzoriek. Po odobratí vzoriek sa ihneď filtrujú cez membránu alebo sa odstredia (pozri prílohu II.4). Filtrované alebo odstredené vzorky sa analyzujú v ten istý deň alebo sa skladujú pri teplote 2 – 4 °C maximálne 48 hodín alebo pod – 18 °C dlhší čas.

III.3. ÚDAJE A SPRÁVA

III.3.1. Spracovanie výsledkov

Percento degradácie v čase t sa vypočíta tak, ako je uvedené v I.7.1 (stanovenie DOC) a prípadne podľa I.7.2 (špecifická analýza).

Všetky výsledky sa zaznamenávajú na poskytnutý záznamník údajov.

III.3.2. Platnosť výsledkov

Pozri I.5.2.

III.3.3. Správa

Pozri I.8.

III.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

MODIFIKOVANÝ SKRÍNINGOVÝ TEST OECD**1. LABORATÓRIUM****2. DÁTUM ZAČIATKU TESTU****3. TESTOVANÁ LÁTKA**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: mg/l chemickej látky

Počiatočná koncentrácia v médiu, t_0 : mg/l chemickej látky

4. INOKULUM

Zdroj:

Vykonaná úprava:

Predkondicionovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/l.

5. STANOVENIE UHLÍKA

Analýzátor uhlíka:

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l ¹)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testovaná látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, stredná hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, stredná hodnota $C_{b(t)}$					
Inokulový slepý pokus bez testovanej chemickej látky	3	c_1					
		c_2					
		c, stredná hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, stredná hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VYHODNOTENIE ZÁKLADNÝCH ÚDAJOV

Banka č.		Degradácia v % po n dňoch				
		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				
Stredná hodnota ⁽¹⁾	$D = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(¹) Z hodnôt D₁ a D₂ by sa nemal robiť priemer, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku alebo prípravok a kontroly toxicity.

7. ABIOTICKÁ KONTROLA (nepovinná)

	Čas (dni)	
	0	t
Koncentrácia DOC (mg/l) v sterilnej kontrole	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. ŠPECIÁLNA CHEMICKÁ ANALÝZA (nepovinná)

	Zvyškové množstvo testovanej chemickej látky na konci testu (mg/l)	Primárna degradácia v %
Sterilná kontrola	S _b	
Inokulované skúšobné médium	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČASŤ IV. VÝVOJ OXIDU UHLIČITÉHO (CO₂) (Metóda C.4-C)**IV.1. PRINCÍP METÓDY**

Odmeraný objem inokulovaného minerálneho média, obsahujúceho známu koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (10 až 20 mg DOC alebo TOC/l) ako nominálneho jediného zdroja organického uhlíka sa prevzdušňuje prechodom vzduchu neobsahujúceho CO₂ v kontrolovaných podmienkach za tmy alebo pri difúznom osvetlení. Degradácia sa meria počas 28 dní stanovovaním uvoľňovaného CO₂, ktorý sa zachytáva v hydroxide bárnatom alebo hydroxide sodnom a ktorý sa meria titráciou zvyškového hydroxidu alebo ako anorganický uhlík. Množstvo produkovaného CO₂ z testovanej látky alebo prípravku (upravené na hodnotu slepého inokulového pokusu) sa vyjadrí ako percento ThCO₂. Stupeň biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy DOC vykonanej na začiatku a na konci inkubácie.

IV.2. OPIS METÓDY**IV.2.1. Prístroje**

- a) 2- až 5-litrové banky, vybavené s aeračnou trubicou, dosahujúcou takmer na dno nádoby a výstupnou trubicou;
- b) magnetické miešadlá, keď sa hodnotia slabo rozpustné látky alebo prípravky;
- c) fľaše na absorbovanie plynu;
- d) zariadenie na kontrolu a meranie prietoku vzduchu;
- e) prístroj na odstránenie CO₂ pri príprave vzduchu, ktorý neobsahuje CO₂; prípadne sa môže použiť zmes kyslíka neobsahujúceho CO₂ a dusíka neobsahujúceho CO₂ z plynových fliaš v správnom pomere (20 % O₂: 80 % N₂);
- f) zariadenie na stanovenie CO₂, a to buď titráciou, alebo nejakým analyzátorom anorganického uhlíka;
- g) zariadenie na membránovú filtráciu (nepovinné);
- h) analyzátor DOC (nepovinné).

IV.2.2. Príprava minerálneho média

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 10 ml roztoku (a) s 800 ml vody, pridajte po 1 ml roztokov (b) až (d) a doplňte vodou do 1 litra.

IV.2.3. Príprava a prekondicionovanie inokula

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaný kal, kanalizačný výtok, povrchové vody, pôda alebo ich zmesi.

Pozri I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

IV.2.4. Príprava baniiek

Ako príklad sa uvádzajú nasledujúce objemy a hmotnosti pre 5-litrové banky obsahujúce 3 litre suspenzie. Ak sa použijú menšie objemy, tieto hodnoty je potrebné podľa nich upraviť, ale je potrebné zaistiť, aby bolo možné presne merať vytváraný oxid uhličitý.

Do každej 5-litrovej banky pridajte 2 400 ml minerálneho média. Pridajte vhodný objem pripraveného aktivovaného kalu (pozri I.6.4.1 a I.6.5) tak, aby získaná koncentrácia suspendovaných tuhých častíc nepresiahla 30 mg/l v konečnej 3-litrovej inokulovanej zmesi.

Alternatívne najskôr zriedte pripravený kal v minerálnom médiu na suspenziu s koncentráciou 500 až 1 000 mg/l pred pridaním daného objemu do 5-litrovej banky tak, aby sa získala koncentrácia 30 mg/l; to zaisťuje väčšiu presnosť. Môžu použiť aj iné zdroje inokula (pozri I.6.4.2).

Cez noc prevzdušňujte tieto inokulované zmesi so vzduchom, ktorý neobsahuje CO_2 , aby sa odstránil CO_2 zo systému.

Oddelene pridajte testovaný materiál a referenčnú látku v známom objeme zásobných roztokov, použite paralelky v koncentráciách za prídavku látky alebo prípravku 10 až 20 mg DOC alebo TOC/l, nechajte niektoré banky bez prídavku látky alebo prípravku ako inokulové kontroly. Slabo rozpustné testované látky pridajte priamo do baniek v takom množstve alebo objeme, ako je uvedené v prílohe III.

Ak je to potrebné, použite jednu banku na kontrolu inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku pridaním testovanej aj referenčnej látky alebo prípravku v tej istej koncentrácii, aká je v ostatných bankách.

Takisto, ak je to potrebné, použite ďalšiu sterilnú banku na kontrolu, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku látky alebo prípravku (pozri I.6.6). Sterilizujte prídavkom jedovatej látky vo vhodnej koncentrácii.

Doplňte objemy suspenzií vo všetkých bankách na 3 litre pridaním minerálneho média, ktoré sa predtým prevzdušnilo vzduchom neobsahujúcim CO_2 . Prípadne sa môžu odobrať vzorky na analýzu DOC (pozri prílohu II.4) a/alebo na špecifickú analýzu. Pripojte absorpčné fľaše na výstupy z baniek.

Ak sa použije hydroxid bárnatý, sériovo spojte tri absorpčné fľaše, každú obsahujúcu 100 ml 0,0125 M roztoku hydroxidu bárnateho ku každej 5-litrovej banke. Roztoky nesmú obsahovať zrazeniny síranov a uhličitánov a ich sila sa musí stanoviť tesne pred použitím. Ak sa použije hydroxid sodný, pripojte dve fľaše, z ktorých druhá bude určená na demonštráciu, že sa všetok CO_2 absorboval v prvej fľaši. Absorpčné fľaše, na ktoré sedia uzávery sérových fliaš, sú bežne dostupné. Pridajte 200 ml 0,05 M NaOH do každej fľaše, čo stačí na absorbovanie všetkého CO_2 , ktorý sa môže vyvinúť pri úplnej degradácii testovanej látky. Roztok NaOH, aj keď je čerstvo pripravený, bude obsahovať stopy uhličitánov; to sa koriguje stanovením uhličitánu v slepom pokuse.

IV.2.5. Počet baniek v typickom teste

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia,.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

A odporúča sa a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola toxicity.

Banka 7: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

IV.2.6. Realizácia testu

Začnite test prebublávaním vzduchu bez CO_2 cez suspenziu pri prietoku 30 až 100 ml/min. Periodicky odoberajte vzorky absorbenta CO_2 na analýzu obsahu CO_2 . Odporúča sa počas prvých desiatich dní vykonávať analýzy každý druhý alebo tretí deň a potom každý piaty deň až do 28. dňa, takže sa obdobie 10-dňového okna môže identifikovať.

Na 28. deň odoberte vzorky (voliteľné) na stanovenie DOC a/alebo špecifickú analýzu, merajte pH suspenzie a pridajte 1 ml koncentrovanej HCl do každej banky, prevzdušnite banky cez noc, aby sa odstránil CO_2 prítomný v testovaných suspenziách. Na 29. deň vykonajte posledné analýzy uvoľneného CO_2 .

V dňoch merania CO₂ odpojte najbližšiu fľašu s Ba(OH)₂ k banke a titrujte roztok hydroxidu s 0,05 M HCl s použitím fenolftaleínu ako indikátora. Posuňte zostávajúce fľaše bližšie k banke a pripojte novú fľašu s absorbentom obsahujúcu 100 ml čerstvého roztoku 0,0125 M Ba(OH)₂ na koniec série fliaš. Vykonaajte titrácie, ak sú potrebné, napr. keď sú zrazeniny viditeľné v prvej fľaši, ale predtým ako sú viditeľné v druhej fľaši alebo aspoň raz za týždeň. Ďalšou možnosťou je použitie NaOH ako absorbenta, v tomto prípade (v závislosti od charakteristiky použitého analyzátora uhlíka) odoberte striekačkou malú vzorku roztoku NaOH z absorpčnej fľaše bližšej k banke. Injektujte vzorku do časti IC analyzátora uhlíka na priamu analýzu uvoľneného CO₂.

Analyzujte obsah druhej záchytnej fľaše len na konci testu, aby sa korigovala hodnota na prípadne prenesený CO₂.

IV.3. ÚDAJE A SPRÁVA

IV.3.1. Spracovanie výsledkov

Množstvo zachyteného CO₂ v absorbente sa pri titrácii určuje podľa rovnice:

$$\text{mgCO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

kde

V = objem HCl použitý na titráciu 100 ml absorbenta (ml);

C_B = koncentrácia roztoku Ba(OH)₂ (M);

C_A = koncentrácia roztoku HCl (M),

ak je C_B 0,0125 M a C_A je 0,05 M, titrácia 100 ml Ba(OH)₂ je 50 ml a hmotnosť CO₂ je daná podľa rovnice:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl titrované} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Preto sa v takomto prípade konvertuje objem titrovanej HCl na vytvorený CO₂ v mg faktorom 1,1.

Vypočítajte hmotnosti vytvoreného CO₂ samotným inokulom a inokulom v prítomnosti testovanej látky alebo prípravku s použitím príslušných hodnôt titrácií, potom rozdiel je hmotnosť vytvoreného CO₂ zo samotnej testovanej látky alebo prípravku.

Napríklad ak samotné inokulum má spotrebu na titráciu 48 ml a inokulum v prítomnosti testovanej látky má spotrebu 45 ml,

$$\text{CO}_2 \text{ z inokula} = 1,1 \times (50 - 48) = 2,2 \text{ mg}$$

$$\text{CO}_2 \text{ z inokula v prítomnosti testovanej látky} = 1,1 \times (50 - 45) = 5,5 \text{ mg,}$$

a preto hmotnosť vytvoreného CO₂ z testovanej látky alebo prípravku je 3,3 mg.

Percento biodegradácie sa vypočíta z rovnice:

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{mg vytvoreného CO}_2 \times 100}{\text{ThCO}_2 \times \text{mg pridanej testovanej látky alebo prípravku}}$$

alebo

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{mg vytvoreného CO}_2 \times 100}{\text{mg pridaného TOC v teste} \times 3,67}$$

kde 3,67 je konverzný faktor (44/12) pre uhlík na oxid uhličitý.

Získajte percentuálnu degradáciu po každom časovom intervale pridaním percenta z vypočítaných hodnôt ThCO₂ pre každý deň až do času, keď sa merala.

Pre absorbent NaOH vypočítajte množstvo uvoľneného CO₂, vyjadrené ako IC (mg), vynásobením koncentrácie IC v absorbente objemom absorbentu.

Percento degradácie sa vypočíta podľa rovnice:

$$\% \text{ ThCO}_2 = \frac{\text{mg IC z testovanej banky} - \text{mg IC zo slepého pokusu}}{\text{mg TOC pridané ako testovaná látka alebo prípravok}} \times 100$$

Odstránenie DOC (nepovinné) sa vypočíta podľa I.7. Zaznamenajte tieto a ostatné výsledky do uvedenej karty údajov.

IV.3.2. **Platnosť výsledkov**

Obsah IC v suspenzii testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu na začiatku testu musí byť menší ako 5 % TC a celková tvorba CO₂ v inokulovom slepom pokuse na konci testu by nemala normálne presahovať 40 mg/l média. Ak sú hodnoty väčšie ako 70 mg CO₂/liter, potom by sa mali kriticky posúdiť údaje aj experimentálna technika.

Pozri tiež I.5.2.

IV.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

IV.4. **KARTA ÚDAJOV**

Príklad záznamníka údajov je uvedený nižšie.

TEST VÝVOJA OXIDU UHLIČITÉHO

1. LABORATÓRIUM

2. DÁTUM ZAČIATKU TESTU

3. TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: mg/liter chemickej látky

Počiatočná koncentrácia v médiu: mg/liter chemickej látky

Celkový C pridaný do banky: mg C,

ThCO₂: mg CO₂

4. INOKULUM

Zdroj:

Úprava:

Prekondicionovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/liter.

5. TVORBA OXIDU UHLIČITÉHO A DEGRADOVATELNOSŤ

Metóda: Ba(OH)₂/NaOH/iné

Čas (dni)	CO ₂ vytvorený v teste (mg)		CO ₂ veidošanās no tukšā parauga (mg)		Celkové množstvo CO ₂ (priemer v teste mínus priemer v teste naslepo) (mg)		%ThCO ₂ $\frac{\text{celkový CO}_2}{\text{ThCO}_2} \times 100$		
	1	priemer	3	priemer	1	2	1	2	priemer
	2		4						
0									
n ₁									
n ₂									
n ₃									
28									

Poznámka: podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčné chemické látky a na kontrolu toxicity.

6. ANALÝZA UHLÍKA (nepovinná)

Analyzátor uhlíka:

Čas (dni)	Test naslepo (mg/l)	Testovaná látka (mg/l)
0	C _{b(0)}	C ₀
28 (¹)	C _{b(t)}	C _t
(¹) alebo na konci kultivácie		

$$\% \text{ odstráneného DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_0 - C_{b(0)}} \right) \times 100$$

7. ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA (nepovinné)

$$\% \text{ abiotickej degradácie} = \frac{\text{CO}_2 - \text{tvorba CO}_2 \text{ v sterilnej banke po 28 dňoch (mg)}}{\text{ThCO}_2(\text{mg})} \times 100$$

ČASŤ V. TEST MANOMETRICKEJ RESPIROMETRIE (Metóda C.4-D)**V.1. PRINCÍP METÓDY**

Známy objem inokulovaného minerálneho média, obsahujúci známu koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (100 mg/liter testovanej látky, aby sa dosiahla koncentrácia aspoň 50 až 100 mg ThOD/liter) ako jediného nominálneho zdroja organického uhlíka, sa mieša v uzavretej banke pri konštantnej teplote (± 1 °C alebo presnejšie) počas 28 dní. Spotreba kyslíka sa stanoví meraním množstva kyslíka (produkovaného elektrolyticky), ktoré vyžaduje udržiavanie konštantného objemu plynu v respirometrickej banke, alebo zo zmien v objeme alebo tlaku (alebo ich kombinácia) v prístroji. Vyvinutý oxid uhličitý sa absorbuje v roztoku KOH alebo iného vhodného absorbenta. Množstvo kyslíka odobraného testovanou látkou alebo prípravkom (upravené na spotrebu inokulového slepého pokusu, ktorý prebieha paralelne) sa vyjadří ako percento z ThOD alebo CHSK. Primárna biodegradácia sa môže prípadne tiež vypočítať z dodatočnej špecifickej analýzy vykonanej na začiatku a na konci inkubácie a z úplnej biodegradácie na základe analýzy DOC.

V.2. OPIS METÓDY**V.2.1. Prístroje**

- a) vhodný respirometer;
- b) prístroj na udržiavanie a kontrolu teploty (± 1 °C alebo presnejšie);
- c) zostava pre membránovú filtráciu (nepovinné);
- d) analyzátor uhlíka (nepovinné).

V.2.2. Príprava minerálneho média

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 10 ml roztoku (a) s 800 ml vody, pridajte po 1 ml roztokov (b) až (d) a doplňte vodou do 1 litra.

V.2.3. Príprava a prekondicionovanie inokula

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaného kalu, kanalizačného výtoku, povrchových vôd, pôdy alebo ich zmesí.

Pozri I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

V.2.4. Príprava baniek

S použitím zásobných roztokov pripravte v oddelených sadách 100 mg roztoky testovanej látky alebo prípravku a referenčnej látky/liter (ktoré poskytujú aspoň 50 až 100 mg ThOD/liter).

Vypočítajte ThOD na základe tvorby amónnych solí, pokiaľ nedochádza k nitrifikácii, keď by výpočet mal byť založený na tvorbe dusičnanov (pozri prílohu II.2).

Stanovte hodnoty pH, a ak je to potrebné, upravte ich na $7,4 \pm 0,2$.

Slabo rozpustné látky alebo prípravky by sa mali pridať neskôr (pozri nižšie).

Ak sa má stanoviť toxicita testovanej látky alebo prípravku, pripravte roztok v minerálnom médiu, ktorý obsahuje súčasne testovanú látku alebo prípravok aj referenčnú látku v tých istých koncentráciách ako v jednotlivých roztokoch.

Ak sa vyžaduje meranie fyzikálno-chemickej spotreby kyslíka, pripravte roztok testovanej látky alebo prípravku, normálne 100 mg ThOD/liter, ktorý bol sterilizovaný prídavkom vhodnej toxikkej látky (pozri I.6.6).

Umiestnite pripravené objemy roztokov testovanej a referenčnej látky alebo prípravku aspoň do dvoch paralelných baniek. Do ďalších baniek pridajte len minerálne médium (na inokulové kontroly), a ak sa to vyžaduje, zmes roztoku testovanej a referenčnej látky alebo prípravku a sterilného roztoku.

Ak je testovaná chemická látka slabo rozpustná, pridajte ju priamo na hmotnostnom alebo objemovom základe alebo postupujte podľa prílohy III. Pridajte KOH pelety alebo iný absorbent do častí určených na absorpciu CO₂.

V.2.5. Počet baniek v typickom teste

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

A odporúča sa, ak je to potrebné:

Banka 6: Sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola toxicity.

Banka 8: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

V.2.6. Realizácia testu

Zohrejte nádoby na požadovanú teplotu a inokulujte ich s pripraveným aktivovaným kalom alebo iným zdrojom inokula tak, aby koncentrácia suspendovaných tuhých častíc nepresiahla 30 mg/liter. Zložte zariadenie, zapnite miešadlo, skontrolujte vzduchotesnosť a začnite meranie spotreby kyslíka. Zvyčajne nie je potrebná iná starostlivosť, ako získať potrebné údaje a vykonať dennú kontrolu správnosti teploty a miešania.

Vypočítajte spotrebu kyslíka z údajov, ktoré sa zistili v pravidelných a častých intervaloch, podľa metód uvedených výrobcom zariadenia. Na konci inkubácie, normálne po 28 dňoch, odmerajte pH obsahu baniek, najmä ak spotreba kyslíka bola nízka alebo väčšia ako ThOD_{NH4} (pre chemické látky obsahujúce dusík).

Ak je to potrebné, odoberte vzorky z respirometrických baniek na začiatku a na konci na analýzu DOC alebo špecifickej látky alebo prípravku (pozri prílohu II.4). Pri počiatočnom odbere zaistite, aby zostávajúci objem testovanej suspenzie v banke bol známy. Ak sa kyslík spotrebúva testovanou látkou obsahujúcou dusík, stanovte nárast koncentrácie dusitanov a dusičnanov počas 28 dní a vypočítajte korekciu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou (príloha V).

V.3. ÚDAJE A SPRÁVA

V.3.1. Spracovanie výsledkov

Vydeľte spotrebu kyslíka (mg) testovanou látkou alebo prípravkom po danom čase (upravené na spotrebu kyslíka kontrolným inokulovým slepým pokusom po rovnakom čase) hmotnosťou použitej testovanej látky alebo prípravku. Tak sa získa BSK, vyjadrená ako mg kyslíka/mg testovanej látky alebo prípravku, t. j.:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg spotreby O}_2 \text{ testovanej látky} - \text{mg spotreby O}_2 \text{ slepého pokusu}}{\text{mg testovanej látky alebo prípravku v banke}}$$

$$= \text{mg O}_2 \text{ na mg testovanej látky alebo prípravku.}$$

Vypočítajte percento biodegradácie buď z rovnice:

$$\% \text{ biodegradácie} = \% \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg BSK (mg O}_2/\text{mg látky alebo prípravku)})}{\text{ThOD (mg O}_2/\text{mg ThOD (mg O}_2/\text{mg látky alebo prípravku)})} \times 100$$

alebo z rovnice:

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2/\text{mg BSK (mg O}_2/\text{mg látky alebo prípravku)})}{\text{ThOD (mg O}_2/\text{mg CHSK (mg O}_2/\text{mg látky alebo prípravku)})} \times 100$$

Je potrebné poznamenať, že tieto dve metódy nemusia nutne poskytovať rovnakú hodnotu, uprednostňuje sa použitie prvej metódy.

Pre testované látky alebo prípravky obsahujúce dusík použite vhodné ThOD (NH_4 alebo NO_3) podľa toho, čo je známe alebo sa očakáva o výskyte nitrifikácie (pozri prílohu II.2). Ak dôjde k výskytu nitrifikácie, ale nie úplnej, vypočítajte úpravu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentrácii dusitanov a dusičnanov (príloha V).

Ak sú vykonané voliteľné stanovenia organického uhlíka a/alebo špecifickej látky alebo prípravku, vypočítajte percento degradácie podľa I.7 tejto metodiky.

Zaznamenajte všetky výsledky na pripojený záznamník údajov.

V.3.2. **Platnosť výsledkov**

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse je normálne 20 až 30 mg O_2 na liter a nemala by presahovať 60 mg/liter za 28 dní. Hodnoty vyššie ako 60 mg/liter vyžadujú kritické prehodnotenie údajov a experimentálnych techník. Ak pH hodnota je mimo rozsahu 6 až 8,5 a spotreba kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom je menšia ako 60 %, potom by sa mal test zopakovať s nižšou koncentráciou testovanej látky.

Pozri tiež I.5.2.

V.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

V.4. **KARTA ÚDAJOV**

Príklad záznamníka údajov je uvedený ďalej.

TEST MANOMETRICKEJ RESPIROMETRIE

1. LABORATÓRIUM

2. DÁTUM ZAČIATKU TESTU

3. TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: mg/liter

Počiatočná koncentrácia v médiu, C_0 : mg/liter

Objem v skúšobnej banke (V): ml

ThOD alebo CHSK: mg O_2 /mg testovanej látky (NH_4 , NO_3)

4. INOKULUM

Zdroj:

Úprava:

Prekondicionovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/liter.

5. SPOTREBA KYSLÍKA: BIODEGRADOVATELNOSŤ

		Čas (dni)											
		0		7		14			21			28	
Spotreba O ₂ (mg) testovanou látkou	1												
	2												
	a, priemer												
Spotreba O ₂ (mg) v teste naslepo	3												
	4												
	b, priemer												
Korigovaná BSK (mg)	(a ₁ - b _m)												
	(a ₂ - b _m)												
BSK na mg te- stovanej látky	$\frac{(a_1 - b)}{C_0 V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_0 V}$												
Rozklad v % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D ₁ (a ₁)												
	D ₂ (a ₂)												
	Priemer (!)												
V = objem média v skúšobnej banke													

(!) Nemal by sa urobiť priemer z hodnôt D₁ a D₂, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobná tabuľka sa môže použiť pre referenčnú chemickú látku a na kontrolu toxicity.

6. KOREKCIA NA NITRIFIKÁCIU (pozri prílohu V).

Deň	0	28	Rozdiel
i) Koncentrácia dusičnanov (mg N na liter)			(N)
ii) Kyslíkový ekvivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii) Koncentrácia dusitanov (mg N na liter)			(N)
iv) Kyslíkový ekvivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii + iv) Celkový kyslíkový ekvivalent	—	—	

7. ANALÝZA UHLÍKA (nepovinné)

Analýzátor uhlíka:

Čas (dni)	Test naslepo (mg/l)	Testovaná látka (mg/l)
0	(C _{blo})	(C ₀)
28 (!)	(C _{blt})	(C _t)
(!) alebo na konci inkubácie		

$$\% \text{ DOC \% odstráneného DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{\text{blt}}}{C_o - C_{\text{blo}}} \right) \times 100$$

8. ŠPECIFICKÁ CHEMICKÁ LÁTKA (nepovinné)

S_b = koncentrácia vo fyzikálno-chemickej (sterilnej) kontrole po 28 dňoch

S_a = koncentrácia v inokulovanej banke po 28 dňoch.

$$\% \text{ biodegradácie} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA (nepovinné)

a = spotreba kyslíka (O_2) v sterilných bankách po 28 dňoch (mg)

$$\text{spotreba kyslíka na mg testovanej látky alebo prípravku} = \frac{a}{C_o V}$$

(pozri oddiely 1 a 3)

$$\% \text{ abiotickej degradácie} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

ČASŤ VI. TEST UZAVRETEJ FIAŠE (Metóda C.4-E)

VI.1. Princíp skúšobnej metódy

Roztok testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu, 2 až 5 mg/liter, sa inokuluje s relatívne malým počtom mikroorganizmov zo zmesovej populácie a udržiava sa v úplne plných, uzavretých fľašiach v tme za konštantnej teploty. Degradácia sa sleduje analýzou rozpusteného kyslíka počas 28-dňového obdobia. Množstvo spotrebovaného kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom, upravené na spotrebu inokulového slepého pokusu, ktorý sa testuje paralelne, sa vyjadrí ako percento ThOD alebo CHSK.

VI.2. OPIS METÓDY

VI.2.1. Prístroje

- fľaše BSK so sklenenými uzávermi, napr. 250 až 300 ml;
- vodný kúpeľ alebo inkubátor na udržiavanie fliaš pri konštantnej teplote (± 1 °C alebo presnejšie) s vylúčením svetla;
- veľké sklenené fľaše (2- až 5-litrové) na prípravu média na naplnenie fliaš BSK;
- kyslíková elektróda a prístroj alebo zariadenie a reagenty na Winklerovu titráciu.

VI.2.2. Príprava minerálneho média

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 1 (jeden) ml roztokov (a) až (d) a doplňte vodou do 1 litra.

VI.2.3. Príprava inokula

Inokulum sa normálne získa zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré prevažne spracúvajú domáce splaškové vody. Alternatívnym zdrojom inokula je povrchová voda. Používa sa jedna kvapka (0,05 ml) až 5 ml filtrátu na liter média, môžu byť potrebné pokusy na zistenie optimálneho objemu pre daný výtok (pozri I.6.4.2 a I.6.5).

VI.2.4. Príprava baniek

Aspoň 20 minút intenzívne prevzdušňujte minerálne médium. Pripravte každú testovaciu sériu z minerálneho média z tej istej zásoby. Vo všeobecnosti je médium pripravené na použitie až po 20 hodinách státia pri teplote testovania. Stanovte koncentráciu rozpusteného kyslíka na účely kontroly, pri 20 °C by mala byť hodnota okolo 9 mg/liter. Vykonajte všetky prenosy a plnenia vzduchom nasýteného, bubliny neobsahujúceho média, napr. s použitím sifónu.

Pripravte paralelné skupiny BSK fliaš na stanovenie testovanej a referenčnej látky na simultánne experimentálne série. Zostavte dostatočný počet BSK fliaš vrátane inokulového slepého pokusu, tak aby bolo možné meranie spotreby kyslíka aspoň v dvoch paralelkách v požadovaných skúšobných intervaloch, napr. po 0, 7, 14, 21 a 28 dňoch. Viac fliaš sa môže vyžadovať na zaistenie identifikácie 10-dňového okna.

Pridajte kompletne prevzdušené minerálne médium do veľkých fliaš tak, aby boli naplnené asi do jednej tretiny. Potom pridajte vhodné množstvo zásobných roztokov testovanej látky alebo prípravku a referenčnej látky do osobitných veľkých fliaš tak, aby konečná koncentrácia látky alebo prípravku nepresahovala 10 mg/liter. Do ďalšej veľkej fľaše obsahujúcej kontrolný slepý pokus nepridávajte žiadne látky ani prípravky.

Aby sa zaistilo, že aktivita inokula nie je limitovaná, koncentrácia rozpusteného kyslíka nesmie byť v BSK fľašiach nižšia ako 0,5 mg/liter. To limituje koncentráciu testovanej látky alebo prípravku asi na 2 mg/liter. Avšak v prípade slabo degradovateľných látok alebo prípravkov a látok alebo prípravkov s nízkou hodnotou ThOD sa môže použiť koncentrácia 5 až 10 mg/liter. V niektorých prípadoch sa odporúča testovať paralelne pri dvoch rozdielnych koncentráciách, napríklad 2 mg/liter a 5 mg/liter. Normálnym spôsobom vypočítajte ThOD na základe tvorby amónnych solí, ale ak sa vie alebo očakáva, že bude prebiehať nitrifikácia, je potrebné vypočítať túto hodnotu na základe tvorby dusičnanov (ThOD_{NO3}; pozri prílohu II.2). Ak však nitrifikácia nie je úplná, ale predsa prebieha, je potrebné vykonať korekciu na zmeny v koncentrácii dusitanov a dusičnanov stanovených analýzou (pozri prílohu V).

Ak je potrebné testovať toxicitu testovanej látky alebo prípravku (v prípade napríklad zistenej nízkej biodegradovateľnosti), sú potrebné ďalšie série fliaš.

Pripravte ďalšiu veľkú fľašu obsahujúcu prevzdušené minerálne médium (asi do jednej tretiny jej objemu) a testovanú látku alebo prípravok a referenčnú látku v rovnakých konečných koncentráciách, aké sú v ostatných veľkých fľašiach.

Inokulujte roztoky vo veľkých fľašiach so sekundárnym výtokom (jedna kvapka alebo asi 0,05 ml až 5 ml/liter) alebo iným zdrojom, ako je riečna voda (pozri I.6.4.2). Nakoniec doplňte roztoky na objem s prevzdušeným minerálnym médiom s použitím hadičky dosahujúcej až na dno fľaše, aby sa dosiahlo riadne premiešanie.

VI.2.5. Počet baniek v typickom teste

V typickom teste sa použijú tieto fľaše:

aspoň 10 fliaš obsahujúcich testovanú látku alebo prípravok a inokulum (testovaná suspenzia);

aspoň 10 fliaš obsahujúcich len inokulum (inokulový slepý pokus);

aspoň 10 fliaš obsahujúcich referenčnú látku a inokulum (kontrola postupu);

a ak je to nutné, 6 fliaš obsahujúcich testovanú látku alebo prípravok, referenčnú látku a inokulum (kontrola toxicity). Aby sa však zaistila identifikácia 10-dňového okna, bol by potrebný približne dvojnásobný počet fliaš.

VI.2.6. Realizácia testu

Ihneď rozdeľte každý pripravený roztok do príslušnej skupiny BSK fliaš s použitím hadičky zo spodnej štvrtiny (nie z dna) vhodne veľkej fľaše, tak aby všetky BSK fľaše boli úplne naplnené. Jemne trasením odstráňte všetky vzduchové bubliny. Okamžite analyzujte v nulovom čase rozpustený kyslík Winklerovou alebo elektródovou metódou. Obsah fliaš sa môže zakonzervovať pre neskoršiu analýzu Winklerovou metódou pridaním síranu manganatého a hydroxidu sodného (prvý Winklerov reagent). Uskladnite starostlivo uzavreté fľaše obsahujúce zafixovaný kyslík ako hnedý hydratovaný oxid manganitý v tme pri teplote 10 až 20 °C nie dlhšie ako 24 hodín pred vykonaním zostávajúcich krokov Winklerovej metódy. Uzavrite zostávajúce paralelné fľaše tak, aby sa zaistilo, že nie sú uzavreté žiadne vzduchové bubliny, a inkubujte za tmy pri teplote 20 °C. Každá séria musí byť spolu s kompletnou paralelnou sériou na stanovenie slepého pokusu inokulovaného média. Odoberte aspoň po dve fľaše zo všetkých sérií na analýzu rozpusteného kyslíka v časových intervaloch (aspoň týždenne) počas 28-dňovej inkubácie.

Týždenné odbery vzoriek umožnia hodnotenie percentuálneho odstránenia v 14-dňovom okne, avšak odbery každé 3 až 4 dni by mali umožniť identifikovať 10-dňové okno, čo by vyžadovalo dvojnásobok fliaš.

Pre testované látky obsahujúce dusík by sa mali vykonať korekcie na spotrebu kyslíka prípadnou nitrifikáciou. Aby sa toto vykonalo, použite metódu kyslíkovej elektródy na stanovenie koncentrácie rozpustného kyslíka a potom odoberte vzorku z BSK fľaše na analýzu dusitanov a dusičnanov. Z nárastu koncentrácie dusitanov a dusičnanov vypočítajte spotrebovaný kyslík (pozri prílohu V).

VI.3. ÚDAJE A SPRÁVA

VI.3.1. Spracovanie výsledkov

V prvom rade vypočítajte BSK získaný po každej časovej perióde odpočítaním spotreby kyslíka (mg O₂/liter) v inokulovom slepom pokuse od spotreby kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom. Vydeľte túto upravenú spotrebu koncentráciou (mg/liter) testovanej látky alebo prípravku, aby sa získala špecifická hodnota BSK ako mg kyslíka na mg testovanej látky alebo prípravku. Vypočítajte percento biodegradovateľnosti vydelením špecifickej hodnoty BSK so špecifickou hodnotou ThOD (vypočítanou podľa prílohy II.2) alebo CHSK (stanovené analýzou, pozri prílohu II.3), potom:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg spotreby O}_2 \text{ testovanej} - \text{mg spotreby O}_2 \text{ slepého pokusu}}{\text{BSK}} =$$

$$= \text{mg O}_2 \text{ na mg testovanej látky alebo prípravku}$$

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg BSK (mg O}_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg ThOD (mg O}_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}} \times 100$$

alebo

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg BSK (mg O}_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}}{\text{COD (mg O}_2\text{/mg CHSK (mg O}_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}} \times 100$$

Je potrebné poznamenať, že tieto dve metódy nemusia nutne poskytovať rovnakú hodnotu, uprednostňuje sa použitie prvej metódy.

Pre testované látky obsahujúce dusík použite vhodné ThOD (NH₄ alebo NO₃) podľa toho, čo je známe alebo sa očakáva o výskyte nitrifikácie (pozri prílohu II.2). Ak dôjde k výskytu nitrifikácie, ale nie úplnej, vypočítajte úpravu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentrácii dusitanov a dusičnanov (príloha V).

VI.3.2. Platnosť výsledkov

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse by nemala presahovať 1,5 mg rozpusteného O₂/liter po 28 dňoch. Hodnoty vyššie ako táto vyžadujú prehodnotenie a posúdenie experimentálnych techník. Počas celého testu by sa nemala zvyšková koncentrácia kyslíka znížiť pod 0,5 mg/liter. Takéto nízke hladiny kyslíka sú platné, len ak metódy stanovenia rozpustného kyslíka sú schopné presne merať takéto nízke koncentrácie.

Pozri tiež I.5.2.

VI.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

VI.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený ďalej.

TEST UZAVRETEJ FLAŠE

1. LABORATÓRIUM

2. DÁTUM ZAČIATKU TESTU

3. TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: mg/liter

Počiatočná koncentrácia vo fľaši: mg/liter

ThOD alebo CHSK: mg O₂/mg testovanej látky

4. INOKULUM

Zdroj:

Úprava:

Prekondicionovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia v reakčnej zmesi: mg/liter

5. STANOVENIE ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA

Metóda: Winklerova/elektrodová

Analýzy baniek

Doba inkubácie (d)			Rozpustený kyslík (mg/l)			
			0	n ₁	n ₂	
Test naslepo (bez chemickej látky)	1	C ₁				
	2	C ₂				
Priemer	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testovaná chemická látka	1	a ₁				
	2	a ₂				
Priemer	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Poznámka: Podobná tabuľka sa môže použiť pre referenčnú látku a na kontrolu toxicity.

6. KOREKCIA NA NITRIFIKÁCIU (pozri prílohu V)

Doba inkubácie (d)	0	n ₁	n ₂	n ₃
i) Koncentrácia dusičnanov (mg N na liter)				
ii) Zmena koncentrácie dusičnanov (mg N na liter)	—			
iii) Kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			
iv) Koncentrácia dusitanov (mg N na liter)				
v) Zmena koncentrácie dusitanov (mg N na liter)	—			
vi) Kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			
iii + vi) Celkový kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			

7. SPOTREBA ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA: % DEGRADÁCIE

	Spotreba po n dňoch (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
BANKA 1: $(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})$				
BANKA 2: $(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})$				
BANKA 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{koncentrácia látky} \times \text{ThOD látky}}$				
BANKA 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{koncentrácia látky} \times \text{ThOD látky}}$				
$\% D \text{ priemer}^{(1)} = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(¹) Nepočítajte priemer, ak je výrazný rozdiel medzi paralelkami.

m_{t0} = hodnota v skúšobnej banke v čase 0

m_{tx} = hodnota v skúšobnej banke v čase x

m_{b0} = stredná hodnota slepého pokusu v čase 0

m_{bx} = stredná hodnota slepého pokusu v čase x

Tiež aplikujte korekciu na nitrifikáciu z iii + vi v oddiele 6.

8. SPOTREBA ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA V SLEPOM POKUSE

Spotreba kyslíka v slepom pokuse: $(m_{b0} - m_{b28})$ mg/liter. Táto spotreba je dôležitá pre platnosť testu. Mala by byť menšia ako 1,5 mg/liter.

ČASŤ VII. TEST M.I.T.I. (Metóda C.4-F)**VII.1. PRINCÍP METÓDY**

Spotreba kyslíka v miešanom roztoku alebo suspenzii testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu, inokulovanom so špeciálne kultivovanými, neadaptovanými mikroorganizmami sa meria automaticky počas 28 dní v tmavom, uzavretom respirometri pri teplote 25 ± 1 °C. Vyvíjaný oxid uhličitý sa absorbuje nátrónovým vápnom. Biodegradovateľnosť je vyjadrená v percentách spotreby kyslíka (korigované na spotrebu slepého pokusu) z teoretickej spotreby (ThOD). Percento primárnej biodegradovateľnosti sa tiež vypočíta z dodatočnej špecifickej analýzy vykonanej na začiatku a na konci inkubácie a prípadne z analýzy DOC.

VII.2. OPIS METÓDY**VII.2.1. Prístroje**

- a) automatický elektrolytický BSK-meter alebo respirometer, normálne vybavený 6 fľašami s 300 ml objemu a nádobami obsahujúcimi absorbent CO_2 ;
- b) miestnosť s konštantnou teplotou a/alebo vodný kúpeľ s teplotou 25 ± 1 °C alebo presnejšie;
- c) zariadenie na membránovú filtráciu (nepovinné);
- d) analyzátor uhlíka (nepovinné).

VI.2.2. Príprava minerálneho média

S použitím látok analytickej čistoty a vody pripravte tieto zásobné roztoky (I.6.1):

- | | | |
|----|--|---------|
| a) | Dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Hydrogénfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Hydrogénfosforečnan dvojsodný dodekahydrát, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ | 44,60 g |
| | Chlorid amónny, NH_4Cl | 1,70 g |
| | Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter. | |
| | Hodnota pH roztoku musí byť 7,2. | |
| b) | Síran horečnatý heptahydrát, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter. | |
| c) | Chlorid vápenatý bezvodý, CaCl_2 | 27,50 g |
| | Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter. | |
| d) | Chlorid železitý hexahydrát, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter. | |

Odoberte 3 ml z každého roztoku (a), (b), (c) a (d) a doplňte do 1 litra.

VII.2.3. Príprava inokula

Získajte čerstvé vzorky z najmenej desiatich miest, najmä z oblastí, kde sú použité a rozptýlené rozličné látky alebo prípravky. Z miest, ako sú čističky odpadových vôd, čističky vôd priemyselného odpadu, rieky, jazerá, more, zhromaždíte 1 liter vzorky kalu, povrchovej pôdy, vody atď. a zmiešajte ich spolu. Po odstránení plávajúcich látok a odstátí upravte hodnotu pH supernatantu na $\text{pH } 7 \pm 1$ s hydroxidom sodným (NaOH) alebo s kyselinou fosforečnou (H_3PO_4).

Použite vhodný objem filtrovaného supernatantu na naplnenie nádoby s aktivovaným kalom a prevzdušňujte kvapalinu asi 23,5 hodiny. Tridsať minút po zastavení prevzdušňovania oddel'te asi jednu tretinu objemu supernatantu a pridajte rovnaký objem roztoku (pH 7) obsahujúceho 0,1 % glukózy, peptonu a dihydrofosforečnanu draselného k usadenému materiálu a znovu začnite prevzdušňovanie. Opakujte tento postup raz denne. Kalová jednotka musí fungovať podľa správnej praxe: výtok by mal byť číry, teplota by sa mala udržiavať na 25 ± 2 °C, hodnota pH má byť 7 ± 1 , kal by sa mal dobre sedimentovať, dostatočné prevzdušňovanie by malo udržiavať zmes stále aeróbnou, mali by byť prítomné prvky a aktivita kalu by sa mala testovať referenčnou látkou aspoň každé tri mesiace. Nepoužite kal ako inokulum skôr ako po jednom mesiaci, ale už nie po štyroch mesiacoch. Preto odoberte vzorku aspoň z 10 miest v pravidelných intervaloch, raz za tri mesiace.

Aby sa udržala rovnaká aktivita čerstvého a starého kalu, zmiešajte filtrovaný supernatant aktivovaného kalu, ktorý sa používa s rovnakým objemom filtrovaného supernatantu z čerstvo zhromaždenej zmesi z 10 miest, a kultivujte kombinovanú zmes, ako je vyššie uvedené. Použite kal ako inokulum po 18 až 24 hodinách po pridaní živín.

VII.2.4. **Príprava baniek**

Prípravte týchto 6 baniek:

Banka č. 1: testovaná látka alebo prípravok vo vode, 100 mg/liter.

Banka č. 2, 3 a 4: testovaná látka alebo prípravok v minerálnom médiu, 100 mg/liter.

Banka č. 5: referenčná látka alebo prípravok (napr. anilín) v minerálnom médiu 100 mg/liter.

Banka č. 6: samotné minerálne médium.

Slabo rozpustné testované chemické látky pridajte priamo, a to podľa ich hmotnosti alebo objemu, alebo s nimi zaobchádzajte podľa toho, ako je to uvedené v prílohe III, okrem toho by sa nemali pridať rozpúšťadlá ani emulzifikátory. Pridajte absorbent CO₂ do všetkých príslušných nádob. Upravte hodnotu pH v bankách č. 2, 3 a 4 na 7,0.

VII.2.5. **Realizácia testu**

Inokulujte banky č. 2, 3 a 4 (testované suspenzie), č. 5 (kontrola aktivity) a č. 6 (inokulový slepý pokus) s malým objemom inokula tak, aby sa dosiahla koncentrácia suspendovaných tuhých častíc 30 mg/l. Žiadne inokulum sa nepridáva do banky č. 1, ktorá slúži ako abiotická hodnota. Zložte zariadenie, skontrolujte vzduchotesnosť, zapnite miešadlá a začnite meranie spotreby kyslíka bez prístupu svetla. Denne kontrolujte teplotu, miešadlá a coulometrický záznamník spotreby kyslíka a zaregistrujte akékoľvek zmeny farby obsahov baniek. Odčítajte spotrebu kyslíka pre šesť baniek priamo pomocou vhodnej metódy, napr. zo šesťbodového zapisovača, ktorá poskytuje krivku BSK. Na konci inkubácie, normálne po 28 dňoch, odmerajte hodnotu pH obsahu baniek a stanovte koncentráciu zvyškovej testovanej látky alebo prípravku a akéhokoľvek medziproduktu a v prípade vo vode rozpustných látok vo vode koncentráciu DOC (pozri prílohu II.4). Zvláštna pozornosť sa musí venovať prchavým chemickým látkam. Ak sa predpokladá nitrifikácia, stanovte koncentráciu dusičnanov a dusitanov, ak je to možné.

VII.3. **ÚDAJE A SPRÁVA**

VII. **3.1. Spracovanie výsledkov**

Vydeľte spotrebu kyslíka (mg) testovanou látkou alebo prípravkom, po danom čase upravené na spotrebu kyslíka kontrolným inokulovým slepým pokusom po rovnakom čase, hmotnosťou použitej testovanej látky alebo prípravku. Tak sa získa BSK vyjadrený ako mg kyslíka/mg testovanej chemickej látky, t. j.

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg spotreby O}_2 \text{ testovanou látkou} - \text{mg spotreby O}_2 \text{ slepého pokusu látkou}}{\text{mg testovanej látky alebo prípravku v banke}}$$

$$= \text{mg O}_2 \text{ na mg testovanej látky alebo prípravku.}$$

Percentuálna biodegradácia sa potom získa z:

$$\% \text{ biodegradácie} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{BSK} (\text{mg O}_2/\text{mg látky alebo prípravku}))}{\text{ThOD} (\text{mg O}_2/\text{ThOD} (\text{mg O}_2/\text{mg látky alebo prípravku}))} \times 100$$

Pre zmesi vypočítajte ThOD z elementárnej analýzy tak ako pre jednotlivé látky alebo prípravky. Použite vhodný ThOD (ThOD_{NH4}, ThOD_{NO3}) podľa toho, či nedochádza k nitrifikácii, alebo nitrifikácia prebieha kompletne (pozri prílohu II.2). Ak však nitrifikácia prebieha, ale je neúplná, vykonajte korekciu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentráciách dusitanov a dusičnanov (príloha V).

Vypočítajte percento primárnej biodegradácie zo straty špecifickej (parentálnej, pôvodnej) látky alebo prípravku (pozri I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

Ak došlo k strate testovanej látky alebo prípravku v banke č. 1, merajúcej fyzikálno-chemické odstránenie, uveďte to v správe a použite koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (S_b) po 28 dňoch v tejto banke na výpočet percenta biodegradácie.

Ak sa vykonajú stanovenia DOC (nepovinné), vypočítajte percento konečnej biodegradácie z:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100 \%$$

ako je opísané pod bodom I.7.1. Ak došlo k strate DOC v banke č. 1, merajúcej fyzikálno-chemické odstránenie, použite koncentráciu DOC v tejto banke na výpočet percenta biodegradácie.

Zaznamenajte všetky výsledky na pripojený záznamník údajov.

VII.3.2. Platnosť výsledkov

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse je normálne 20 až 30 mg O₂ na liter a nemala by presahovať 60 mg/liter za 28 dní. Hodnoty vyššie ako 60 mg/liter vyžadujú kritické prehodnotenie údajov a experimentálnych techník. Ak je pH hodnota mimo rozsahu 6 až 8,5 a spotreba kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom je menšia ako 60 %, potom by sa mal test zopakovať s nižšou koncentráciou testovanej látky.

Pozri tiež I.5.2.

Ak percento degradácie anilínu, vypočítané zo spotreby kyslíka, nepresahuje 40 % po 7 dňoch a 65% po 14 dňoch, test sa považuje za platný.

3.3. Správa

Pozri I.8.

VII.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

TEST MITI (I)

1. LABORATÓRIUM

2. DÁTUM ZAČIATKU TESTU

3. TESTOVANÁ LÁTKA

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: mg/liter chemickej látky.

Počiatočná koncentrácia v médiu C_o : mg/liter chemickej látky.

Objem reakčnej zmesi, V: ml.

ThOD: mg O_2 /liter.

4. INOKULUM

Miesta odberu vzoriek kalu:

- | | |
|--------|---------|
| 1. ... | 6. ... |
| 2. ... | 7. ... |
| 3. ... | 8. ... |
| 4. ... | 9. ... |
| 5. ... | 10. ... |

Koncentrácia suspendovaných tuhých častíc v aktivovanom kale po aklimatizácii so syntetickým výtokom = ... mg/liter.

Objem aktivovaného kalu na liter konečného média = ... ml.

Koncentrácia kalu v konečnom médiu = ... mg/liter.

5. SPOTREBA KYSLÍKA: BIODEGRADOVATELNOSŤ

Typ použitého respirometra:

			Čas (dni)				
			0	7	14	21	28
Spotreba O_2 (mg) testovanou látkou	a_1						
	a_2						
	a_3						
Spotreba O_2 (mg) v teste naslepo	b						
Korigovaná spotreba O_2 (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
BSK na mg testovanej látky	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	Banka 1					
		Banka 2					
		Banka 3					
Rozklad v % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Priemer ⁽¹⁾					

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku.

⁽¹⁾ Nepočítajte priemer, ak je výrazný rozdiel medzi paralelkami.

6. ANALÝZA UHLÍKA (nepovinné)

Analyzátor uhlíka:

Banka	DOC				% odstráneného DOC	Priemer
	Nameraná hodnota		Korigovaná hodnota			
Voda + testovaná látka	a				—	—
Kal + testovaná látka	b1		b1 – c			
Kal + testovaná látka	b2		b2 – c			
Kal + testovaná látka	b3		b3 – c			
Kontrolný test naslepo	c		—		—	—

$$\% \text{ odstráneného DOC} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. ÚDAJE ZO ŠPECIFICKEJ CHEMICKEJ ANALÝZY

	Zvyškové množstvo testovanej chemickej látky na konci testu	degradácia v %
Test naslepo s vodou	S_b	
Inokulované médium	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ degradácie} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Vypočítajte % degradácie pre banky a1, a2 a a3.

8. POZNÁMKY

Ak je to možné, mala by sa pripojiť krivka závislosti BSK od času

PRÍLOHA I

SKRATKY A POJMY

- DO: Rozpustený kyslík (mg/liter) je koncentrácia rozpusteného kyslíka vo vodnej vzorke.
- BSK: Biochemická spotreba kyslíka (g) je množstvo spotrebovaného kyslíka mikroorganizmami počas metabolizovania testovanej látky alebo prípravku, tiež vyjadrené ako g spotrebovaného kyslíka na g testovanej chemickej látky (pozri metódu C.5).
- CHSK: Chemická spotreba kyslíka (g) je množstvo spotrebovaného kyslíka počas oxidácie testovanej látky alebo prípravku v teplom, okyslenom dvojchrómane; umožňuje meranie množstva prítomnej oxidovateľnej látky; tiež vyjadruje spotrebovaný kyslík v g na g testovanej látky alebo prípravku (pozri metódu C.6).
- DOC: Rozpustený organický uhlík je organický uhlík prítomný v roztoku alebo ten, ktorý prechádza cez 0,45-mikrometrový filter alebo ostáva v supernatante po odstredení pri 40 000 m.s⁻² ($\pm 4\ 000$ g) počas 15 minút.
- ThOD: Teoretická spotreba kyslíka (mg) je teoretické množstvo kyslíka, ktoré sa požaduje na kompletnú oxidáciu látky alebo prípravku; vypočíta sa z molekulového vzorca (pozri prílohu II.2) a je tiež vyjadrená v mg kyslíka potrebných na mg testovanej látky.
- ThCO₂: Teoretický oxid uhličitý (mg) je vypočítané množstvo oxidu uhličitého, ktoré sa vytvorí zo známeho alebo odmeraného obsahu uhlíka v testovanej látke alebo prípravku, keď je kompletne mineralizovaná; je tiež vyjadrený v mg oxidu uhličitého uvoľneného z mg testovanej látky alebo prípravku.
- TOC: Celkový organický uhlík vzorky je súhrn organického uhlíka v roztoku a v suspenzii.
- IC: Anorganický uhlík.
- TC: Celkový uhlík je súhrn organického a anorganického uhlíka prítomného vo vzorke.

Primárna biodegradácia:

je zmena v štruktúre látky, spôsobená biologickým účinkom, ktorá má za následok stratu špecifickej vlastnosti tejto látky.

Úplná biodegradácia (aeróbna):

je taká dosiahnutá úroveň degradácie, keď testovanú látku alebo prípravok úplne spotrebujú mikroorganizmy, čoho výsledkom je tvorba oxidu uhličitého, vody, minerálnych solí a nových mikrobiálnych bunkových zložiek (biomasy).

Ľahko biodegradovateľné:

je dohodnutá klasifikácia chemických látok, ktoré prešli cez určité špecifické skriningové testy na úplnú biodegradovateľnosť; tieto testy sú také prísne, že sa predpokladá, že takéto látky alebo prípravky sa budú rýchlo a úplne biodegradovať vo vodnom prostredí v aeróbných podmienkach.

Inherentne (prirodzene) biodegradovateľné:

klasifikácia chemických látok, pre ktoré existuje jednoznačný dôkaz ich biodegradácie (primárnej alebo úplnej) v každom uznanom teste na biodegradovateľnosť.

Odbúrateľnosť:

je poddajnosť látok, aby boli odbúrané počas biologického čistenia odpadovej vody bez škodlivého ovplyvnenia normálneho priebehu procesov čistenia. Všeobecne možno konštatovať, že ľahko biodegradovateľné látky sú odbúrateľné, ale to sa už nedá konštatovať o všetkých vnútorne biodegradovateľných látkach. Do odbúrania môžu byť zapojené aj abiotické procesy.

Fáza lag:

je čas od inokulácie, v teste Die-Away, po dosiahnutie aspoň 10 % degradácie. Fáza lag je často veľmi variabilná a slabo reprodukovateľná.

Doba trvania degradácie:

je čas od konca fázy lag až po čas, kým sa nedosiahne 90 % degradácia.

10-dňové okno:

je 10 dní nasledujúcich po dosiahnutí 10 % degradácie.

PRÍLOHA II

VÝPOČET A STANOVENIE VHODNÝCH SUMÁRNYCH PARAMETROV

Určité sumárne parametre sa budú vyžadovať v závislosti od zvolenej metódy. Nasledujúca časť opisuje odvodenie týchto hodnôt. Použitie týchto parametrov je opísané pri jednotlivých metódach.

1. Obsah uhlíka

Obsah uhlíka sa vypočíta zo známeho elementárneho zloženia alebo sa stanoví elementárnou analýzou testovanej látky.

2. Teoretická spotreba kyslíka (ThOD)

Teoretická spotreba kyslíka (ThOD) sa môže vypočítať, ak je známe elementárne zloženie alebo stanovené elementárnou analýzou. Je pre látku



bez nitrifikácie

$$\text{ThOD}_{\text{NH}_4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{\text{MW}} \text{mg/mg}$$

alebo s nitrifikáciou,

$$\text{ThOD}_{\text{NH}_3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{\text{MW}} \text{mg/mg}$$

3. Chemická spotreba kyslíka (CHSK)

Chemická spotreba kyslíka (CHSK) je stanovená podľa metódy C.6.

4. Rozpustený organický uhlík (DOC)

Rozpustený organický uhlík (DOC) je v súlade s pojmi organický uhlík každej látky alebo prípravku, alebo zmesi vo vode prechádzajúci cez 0,45-mikrometrový filter.

Vzorky z testovaných nádob sa odoberajú a filtrujú okamžite vo filtračnom prístroji s použitím vhodného membránového filtra. Prvých 20 ml (množstvo sa môže zredukovať, keď sa používajú malé filtre) sa odstráni. Objemy 10 až 20 ml alebo nižšie, ak sú injektované (objem závisí od požadovaného množstva pre analyzátor uhlíka), sa nechávajú na analýzu uhlíka. Koncentrácia DOC sa stanoví pomocou analyzátora organického uhlíka, ktorý je schopný presne merať koncentráciu uhlíka ekvivalentnú alebo nižšiu ako 10 % počiatočnej koncentrácie DOC použitej v teste.

Filtrované vzorky, ktoré sa nemôžu analyzovať v ten istý pracovný deň, sa môžu chrániť skladovaním v chladničke pri teplote 2 – 4 °C počas 48 hodín alebo pri teplote pod - 18 °C počas dlhšieho obdobia.

Poznámky:

Membránové filtre sú často impregnované povrchovo aktívnymi látkami kvôli hydrofilizácii. Takto filter môže obsahovať až niekoľko mg rozpustného organického uhlíka, ktorý by interferoval so stanovením biodegradability. Surfaktanty a iné rozpustné organické látky alebo prípravky sa odstraňujú z filtrov varom v deionizovanej vode trikrát po jednej hodine. Filtre sa potom môžu skladovať vo vode jeden týždeň. Ak sa použijú jednorazové filtre, je vždy potrebné sa presvedčiť, či neuvolňujú rozpustný organický uhlík.

V závislosti od typu membránového filtra sa môže testovaná látka alebo prípravok zachytávať adsorpciou. Preto môže byť vhodné uistiť sa, že sa testovaná látka alebo prípravok nezachytáva na filtri.

Odstreďovanie pri 40 000 m.s⁻² (4 000 g) počas 15 minút možno použiť na rozlíšenie TOC od DOC namiesto filtrácie. Metóda nie je vhodná pri počiatočnej koncentrácii menšej ako 10 mg DOC/liter, pretože nie sú odstránené všetky baktérie alebo uhlík ako súčasť bakteriálnej plazmy je znovu rozpustený.

LITERATÚRA

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p. 65.
- Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.
- DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfes (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13 (1), 169.

PRÍLOHA III

VYHODNOCOVANIE BIODEGRADOVATELNOSTI SLABO ROZPUSTNÝCH LÁTOK

Pri testoch biodegradovateľnosti slabo rozpustných látok je potrebné venovať pozornosť týmto požiadavkám.

Kým homogénne kvapaliny budú len zriedkavo predstavovať problém pri odbere vzoriek, odporúča sa, aby tuhé materiály boli homogenizované vhodným spôsobom, aby sa tak zabránilo chybám spôsobeným nehomogénnosťou. Špeciálnu pozornosť treba venovať v prípade požiadaviek na reprezentatívne vzorky niekoľkých miligramov zo zmesi látok alebo prípravkov, alebo látok s veľkým množstvom nečistôt.

Počas testov sa môžu použiť rôzne spôsoby miešania. Pozornosť by sa mala venovať len dostatočnému miešaniu, aby sa látka alebo prípravok udržiavali dispergované a aby sa zabránilo prehrievaniu, nadmernému peneniu a prílišným mechanickým silám.

Môže sa použiť emulzifikátor, ktorý zabezpečuje stabilnú disperziu látky alebo prípravku. Nemal by byť toxický pre baktérie a nesmie byť biodegradovateľný alebo spôsobovať penenie v podmienkach testu.

Pre rozpúšťadlá platia rovnaké kritériá ako pre emulzifikátor.

Neodporúča sa použitie pevných nosičov pre tuhé testované látky, ale môžu byť vhodné pre olejovité látky.

Pri použití pomocných látok, ako emulzifikátorov, rozpúšťadiel a nosičov, by sa mal vykonať slepý pokus s pomocnou látkou.

Každý z troch respirometrických testov CO₂, BSK, MITI sa môže použiť na výskum biodegradability slaborozpustných látok alebo prípravkov.

LITERATÚRA

- de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.
- Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

PRÍLOHA IV

VYHODNOCOVANIE BIODEGRADOVATEĽNOSTI CHEMICKÝCH LÁTOK, PRI KTORÝCH EXISTUJE PODOZRENIE, ŽE SÚ TOXICKÉ PRE INOKULUM

Ak sa v teste ľahkej biodegradovateľnosti sa ukáže, že látka alebo prípravok nie sú biodegradovateľné, odporúča sa tento postup, ak je potrebné zistiť, či ide o inertnú látku, alebo dochádza k inhibícii (Reynolds et al., 1987).

Na testovanie toxicity a biodegradovateľnosti by sa mali použiť podobné alebo rovnaké inokulá.

Na vyhodnotenie toxicity látky alebo prípravku, skúmaných v testoch ľahkej biodegradovateľnosti, je vhodné použiť jeden z týchto testov alebo ich kombináciu: test inhibície aktivovaný kalom (inhibičný respirometrický test v aktívnom kale – smernica 88/302/EHS), BSK a/alebo metódy inhibície rastu.

Ak sa chceme vyhnúť inhibícii následkom toxicity, odporúča sa, aby koncentrácie testovanej látky použitej pri testovaní ľahkej biodegradovateľnosti boli menšie ako 1/10 hodnôt EC₅₀ (alebo menšie ako hodnoty EC₂₀) získaných pri testovaní toxicity. Nie je pravdepodobné, aby látky s hodnotou EC₅₀ väčšou ako 300 mg/liter mali toxické účinky v teste ľahkej biodegradovateľnosti.

Hodnoty EC₅₀ menšie ako 20 mg/liter môžu pravdepodobne predstavovať vážne problémy pri následnom testovaní. Mali by sa použiť nízke skúšobné koncentrácie, ale potom je nutné použiť presný a citlivý test „uzavretej fľaše“ alebo použiť materiál označený ¹⁴C. Prípadne aj aklimatizované inokulum umožňuje použitie vyšších koncentrácií testovanej látky. Avšak v tomto prípade sa stráca špecifické kritérium testu ľahkej biodegradovateľnosti.

LITERATÚRA

- Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

PRÍLOHA V

KOREKCIA NA SPOTREBU KYSLÍKA PRI INTERFERENCII NITRIFIKÁCIOU

Chyby spôsobené tým, že sa nitrifikácia neberie do úvahy pri hodnotení spotreby kyslíka pri teste biodegradovateľnosti látok neobsahujúcich dusík, sú okrajové (nie väčšie ako 5 %), a to aj v prípade, keď dochádza k rozdielnej oxidácii amóniového dusíka v teste a v slepom pokuse. V prípade testovaných látok, ktoré obsahujú dusík, však môže dôjsť k vážnym chybám.

Ak došlo k nekompletnej nitrifikácii, pozorovaná spotreba kyslíka reakčnou zmesou môže byť upravená na množstvo kyslíka použitého na oxidáciu amónia na dusitany a dusičnany, ak sú zmeny v koncentrácii dusitanov a dusičnanov počas inkubácie stanovené na základe týchto rovníc:



Celkovo:



Z rovnice (1), spotreba kyslíka, 28 g dusíka obsiahnutého v chloride amónnom (NH_4Cl), ktorý je oxidovaný na dusitan, je 96 g, t. j. faktor 3,43 (96/28). Rovnakým spôsobom z rovnice (3), spotreba kyslíka, 28 g dusíka, ktorý je oxidovaný na dusičnan, je 128 g, t. j. faktor 4,57 (128/28).

Vzhľadom na to, že reakcie sa postupne vykonávajú rôznymi druhmi baktérií, je možné, aby koncentrácia dusitanov stúpala alebo klesala; v druhom prípade by malo dochádzať k ekvivalentnej tvorbe dusičnanov. Takto kyslík spotrebovaný pri tvorbe dusičnanov je 4,57-násobkom vzrastu koncentrácie dusičnanov a kyslík spojený s tvorbou dusitanov je 3,43-násobkom vzrastu koncentrácie dusitanov alebo s poklesom jeho koncentrácie strata kyslíka je - 3,43-násobkom poklesu koncentrácie.

To znamená:

$$\text{O}_2 \text{ spotrebovaný na tvorbu dusičnanov} = 4,57 \times \text{nárast koncentrácie dusičnanov} \quad (4)$$

a

$$\text{O}_2 \text{ spotrebovaný na tvorbu dusitanov} = 3,43 \times \text{nárast koncentrácie dusitanov} \quad (5)$$

a

$$\text{O}_2 \text{ spotrebovaný pri strate dusitanov} = - 3,43 \times \text{pokles koncentrácie dusičnanov} \quad (6)$$

Takže:

$$\text{O}_2 \text{ spotrebovaný nitrifikáciou} = \pm 3,43 \times \text{zmena v koncentrácii dusitanov} + 4,57 \times \text{nárast koncentrácie dusičnanov} \quad (7)$$

a preto

$$\text{O}_2 \text{ spotrebovaný na oxidáciu C} = \text{celková pozorovaná spotreba} - \text{spotreba pri nitrifikácii} \quad (8)$$

Ak je alternatívne stanovený len celkový oxidovaný dusík, spotreba kyslíka nitrifikáciou sa môže považovať v prvom priblížení ako 4,57 x nárast oxidovaného dusíka.

Opravená hodnota spotreby kyslíka na oxidáciu C sa potom porovná s ThOD NH_3 vypočítanou podľa prílohy II.

C.5 DEGRADÁCIA – BIOCHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Účelom metódy je meranie biochemickej spotreby kyslíka (BSK) tuhými alebo kvapalnými organickými látkami.

Údaje získané týmto testom sú vhodné pre látky rozpustné vo vode; avšak aspoň principiálne sa môžu testovať aj látky prchavé a slabo rozpustné vo vode.

Metóda je použiteľná len pre také testované organické materiály, ktoré neinhibujú baktérie pri koncentrácii použitej v teste. Ak testovaný materiál nie je rozpustný pri testovanej koncentrácii, môžu sa použiť špeciálne opatrenia ako ultrazvuková dispergácia, aby sa dosiahla dobrá dispergácia testovaného materiálu.

Informácie o toxicite látky alebo prípravku môžu byť užitočné na interpretáciu nízkych výsledkov a pri výbere vhodných skúšobných koncentrácií.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Biochemická spotreba kyslíka (BSK) je definovaná ako množstvo rozpusteného kyslíka, ktoré si vyžaduje špecifikovaný objem roztoku látky na proces biochemickej oxidácie za predpísaných podmienok.

Výsledky sú vyjadrené v gramoch biochemickej spotreby kyslíka na gramy testovanej látky.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Je žiaduce použiť vhodnú referenčnú látku na skontrolovanie aktivity inokula.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Vopred stanovené množstvo látky, rozpustené alebo dispergované v dobre prevzdušnenom vhodnom médiu, sa inokuluje s mikroorganizmami a inkubuje pri konštantnej, definovanej okolitej teplote za tmy.

Biochemická spotreba kyslíka je stanovená rozdielom v obsahu rozpusteného kyslíka na začiatku a na konci testu. Test musí trvať aspoň 5 dní, ale nie dlhšie ako 28 dní.

Hodnota slepého pokusu sa musí stanoviť paralelným meraním za neprítomnosti testovanej látky.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Stanovenie biologickej spotreby kyslíka sa nemôže považovať za platné stanovenie biodegradovateľnosti látky. Tento test sa môže považovať len za skríningový test.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Predbežný roztok alebo disperzia látky sa pripraví s cieľom získať takú koncentráciu biochemickej spotreby kyslíka, ktorá bude kompatibilná s použitou metódou. Biochemická spotreba kyslíka sa potom stanoví akoukoľvek vhodnou vnútroštátnou alebo medzinárodnou štandardizovanou metódou.

2. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Biochemická spotreba kyslíka nachádzajúca sa v predbežnom roztoku sa vypočíta podľa vybraných normalizovaných metód a prevedie sa na gramy biochemickej spotreby kyslíka (BSK) na gram testovanej látky.

3. SPRÁVA

V správe z testu sa uvedie použitá metóda.

Biochemická spotreba kyslíka by mala byť strednou hodnotou (priemerom) aspoň z troch platných meraní.

Všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov, sa musia uviesť obzvlášť s ohľadom na nečistoty, fyzikálny stav, toxické účinky a vnútorné zloženie látky, ktoré by ovplyvňovalo výsledky.

Použitie prídavkov na inhibíciu biochemickej nitrifikácie sa musí takisto uviesť.

4. ODKAZY

Zoznam štandardizovaných metód, napríklad:

NF T 90 – 103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. DEGRADÁCIA – CHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Účelom tejto metódy je meranie chemickej spotreby kyslíka tuhých alebo kvapalných organických látok štandardným spôsobom v stanovených laboratórnych podmienkach.

Informácie o vzorci látky budú potrebné pri vykonaní tohto testu a pri interpretácii získaných výsledkov (napr. halogenidy, železnaté soli organických zlúčenín, organochlórové zlúčeniny).

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Chemická spotreba kyslíka je mierou oxidovateľnosti látky vyjadrená v ekvivalentných množstvách kyslíka oxidujúceho reagentu spotrebúvaného látkou v stanovených laboratórnych podmienkach.

Výsledok je vyjadrený v gramoch chemickej spotreby kyslíka na gram testovanej látky.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nie je potrebné použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. Referenčné látky slúžia na kalibráciu metódy z času na čas, aby sa umožnilo porovnanie výsledkov, keď sa použije ďalšia metóda.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Vopred stanovené množstvo látky, rozpustené alebo dispergované vo vode, sa oxiduje dvojchrómanom draselným v médiu obsahujúcom silný roztok kyseliny sírovej a síranu strieborného ako katalyzátora pod refluxom 2 hodiny. Zvyškový dvojchróman je stanovený titráciou so štandardizovaným síranom železnatoamónnym.

V prípade látok obsahujúcich chlór sa pridáva síran ortuťnatý (*) na zníženie interferencie chlóru.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Vzhľadom na dohodnuté podmienky stanovenia je chemická spotreba kyslíka (CHSK) „ukazovateľom oxidovateľnosti“ a ako taký sa používa ako praktická metóda na meranie organickej hmoty.

V tomto teste môžu rušiť chloridy; na stanovenie CHSK môžu mať takisto vplyv anorganické redukčné a oxidačné látky.

Niektoré cyklické látky a mnoho prchavých látok (napr. nižšie mastné kyseliny) nie sú úplne oxidovateľné týmto testovacím postupom.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Pripraví sa počiatočný roztok alebo disperzia látky tak, aby sa dosiahla chemická spotreba kyslíka (CHSK) od 250 do 600 mg/l.

Poznámky:

V prípade slabo rozpustných a nedispergovateľných látok sa približne také množstvo práškovej látky alebo kvapaliny, ktoré zodpovedá 5 mg chemickej spotreby kyslíka, naváži a dá do experimentálneho prístroja s vodou.

Chemická spotreba kyslíka (CHSK) sa často a špeciálne v prípade slabo rozpustných látok stanoví výhodne rôznymi modifikáciami tejto metódy, napr. v uzavretom priestore s vyrovnávaním tlaku (K. Kelkenberg, 1975). V tejto modifikácii látok, ktoré sú len ťažko stanoviteľné konvenčnou metódou – napríklad kyselina octová – sa môžu často úspešne kvantifikovať. Avšak táto metóda zlyháva v prípade pyridínu. Ak sa koncentrácia dvojchrómanu draselného, ako je uvedená v odkaze (1), zvýši na 0,25N (0,0416 M), priame naváženie 5 mg až 10 mg látky je uľahčené, čo je nevyhnutné pre stanovenie chemickej spotreby kyslíka slabo rozpustných látok vo vode [odkaz (2)].

Chemická spotreba kyslíka sa stanoví akoukoľvek vnútroštátnou alebo medzinárodnou štandardizovanou metódou.

2. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Chemická spotreba kyslíka obsiahnutá v experimentálnej banke sa vypočíta podľa vybranej normalizovanej metódy a konvertuje sa na gramy chemickej spotreby kyslíka na gram testovanej látky.

(*) S roztokmi obsahujúcimi ortuťnaté soli sa po použití zaobchádza tak, aby nedošlo k prieniku ortuti do životného prostredia.

3. **SPRÁVA**

V správe z testu sa uvedie odkaz na použitú metódu.

Chemická spotreba kyslíka by mala byť strednou hodnotou aspoň z troch platných meraní. Všetky informácie a poznámky, ktoré sú relevantné pre interpretáciu výsledkov, sa uvedú s ohľadom na nečistoty, fyzikálny stav, toxické účinky a vnútorné vlastnosti látky (ak sú známe), ktoré by ovplyvňovali výsledky.

Použitie síranu ortuťnatého na minimalizovanie interferencie chloridu sa musí tiež uviesť.

4. **ODKAZY**

1. Kelkengerg, 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.

Zoznam štandardizovaných metód, napríklad:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of chemical oxygen demand (CHSK) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3: Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060: Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

C.7 DEGRADÁCIA – ABIOTICKÁ DEGRADAČNÁ HYDROLÝZA AKO FUNKCIA pH

1. **METÓDA**

Metóda je upravená smernicou na vykonávanie OECD testov (1).

1.1. **ÚVOD**

Hydrolýza je dôležitou reakciou kontrolujúcou abiotickú degradáciu. Táto reakcia je relevantná pre látky s nízkou biodegradabilitou a môže mať vplyv na pretrvávajúce látky v životnom prostredí.

Väčšina hydrolytických reakcií je pseudoprvého poriadku, a preto polčas reakcie je závislý od koncentrácie, čo umožňuje extrapoláciu výsledkov zistených pri koncentráciách použitých v laboratóriu na podmienky životného prostredia.

Navyše sa uvádza niekoľko príkladov (2) ukazujúcich súlad medzi výsledkami v čistej a prírodnej vode pre niekoľko druhov chemických látok a prípravkov.

Je účelné mať predbežné informácie o tlaku pár látky na vykonanie tohto testu.

Táto metóda je aplikovateľná len pre rozpustné látky vo vode. Nečistoty môžu ovplyvniť výsledky.

Hydrolytické správanie chemických látok alebo prípravkov sa skúma pri pH hodnotách (pH 4 až 9), ktoré sa vyskytujú v životnom prostredí najčastejšie.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Hydrolyzou sa rozumie reakcia chemickej látky alebo prípravku RX s vodou. Túto reakciu možno znázorniť prostou výmenou skupiny X za skupinu OH:



Rýchlosť, ktorou koncentrácia RX klesá, je daná rovnicou:

$$\text{rýchlosť} = k [\text{H}_2\text{O}] \cdot [\text{RX}] \quad [2]$$

Keďže je voda prítomná voči testovanej chemickej látke vo veľkom prebytku, označuje sa obvykle tento typ reakcie ako reakcia pseudoprvého rádu, v ktorej sa pozoruje rýchlostná konštanta daná vzťahom:

$$k_{\text{pozorov.}} = k \times [\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

Táto konštanta môže byť vyjadrená pre jednu hodnotu pH a jednu teplotu T s použitím výrazu:

$$k_{\text{pozorov.}} = \frac{2,303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

kde:

t = čas,

C₀ = koncentrácia látky v čase nula (0),

C_t = koncentrácia látky v čase t a

2,303 = premenný faktor medzi prirodzeným a desiatkovým logaritmom.

Koncentrácie sú vyjadrené v g/liter alebo v móloch na liter.

Rozmer tejto konštanty k_{pozorov.} je (čas)⁻¹.

„Polčas“ t_{1/2} je definovaný ako čas potrebný na zníženie koncentrácie testovanej látky na 50 %, t. j.:

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

Z výrazov (4) a (5) môže byť preukázané, že:

$$t_{1/2} = 0,693/k_{\text{pozorov.}} \quad [6]$$

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nie je potrebné použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. Slúžia najmä na kontrolu účinnosti metódy, aby sa umožnilo porovnanie s výsledkami z inej metódy.

Ako referenčné látky sa použili tieto látky (1):

kyselina acetylsalicylová (aspirín);

kyselina fosforotiová 0,0-dietyl 0-[6-metyl-2-(1-metyletyl)4-pyrimidinyl]ester (Dimpylate, Diazinon).

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Látka sa rozpustí vo vode pri nízkej koncentrácii; pH a teplota sa kontrolujú.

Pokles koncentrácie látky v závislosti od času sa sleduje akoukoľvek vhodnou analytickou metódou.

Logaritmus koncentrácie sa vynesie oproti času, a ak je závislosť priamková, rýchlostná konštanta prvého poriadku sa môže získať zo sklonu krivky (pozri bod 2).

Ak nemožno stanoviť rýchlostnú konštantu priamo pre určitú teplotu, potom možno stanoviť túto konštantu s použitím Arrheniovho vzťahu, ktorý udáva teplotnú závislosť rýchlostnej konštanty. Z lineárnej závislosti logaritmu rýchlostnej konštanty, ako je stanovená pri vhodnej teplote ako recipročná funkcia absolútnej teploty, K, možno extrapolovať hodnotu rýchlostnej konštanty, ktorá sa nedala priamo získať.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Ako je to uvedené v odkaze (2), merania rýchlostných konštánt hydrolyzy pri 13 triedach organických štruktúr môžu dosahovať vysokú presnosť.

Opakovateľnosť závisí obzvlášť od kontroly pH a teploty a môže ju ovplyvňovať prítomnosť mikroorganizmov a v špeciálnych prípadoch koncentrácia rozpusteného kyslíka.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. **Reagenty**1.6.1.1. *Tlmivé roztoky*

Test sa vykonáva pri troch hodnotách pH: 4,0, 7,0 a 9,0.

Na tento účel sa pripravujú tlmivé roztoky s použitím látky alebo prípravku reakčnej čistoty a z destilovanej alebo deionizovanej sterilnej vody. Niektoré príklady tlmivých roztokov sú uvedené v dodatku.

Použitý tlmivý roztok môže ovplyvniť rýchlosť hydrolyzy; ak sa toto preukáže, potom sa zvolí iný tlmivý roztok. V odkaze (2) sa odporúča použiť bórátové alebo acetátové tlmivé roztoky namiesto fosfátových.

Ak pH hodnota tlmivého roztoku nie je známa pri teplote, ktorá sa používa pri teste, tak pH hodnota sa stanoví kalibrovaným pH metrom pri zvolenej teplote s presnosťou $\pm 0,1$ jednotky pH.

1.6.1.2. *Skúšobné roztoky*

Testovaná látka sa rozpustí vo vybranom tlmivom roztoku a jej koncentrácia nesmie presahovať 0,01 M alebo polovicu saturačnej koncentrácie podľa toho, ktorá hodnota je nižšia.

Použitie organických rozpúšťadiel, ktoré sa miešajú s vodou, sa odporúča len pre látky, ktoré sú slabo rozpustné vo vode.

Množstvo rozpúšťadla by malo byť menšie ako 1 % a nemalo by interferovať s hydrolytickým procesom.

1.6.2. Prístroje

Používajú sa uzavreté sklenené fľaše, pričom na mieste zábrusu sa nesmie nachádzať žiadna mastnota.

Ak je chemická látka alebo tlmivý roztok prchavý alebo ak sa test vykonáva pri zvýšenej teplote, potom sa uprednostňuje použitie skúmaviek zatavených alebo inak uzavretých a s obmedzeným priestorom nad roztokom.

1.6.3. Analytická metóda

Metóda musí byť špecifická, aby umožnila stanovenie testovanej látky alebo prípravku pri testovanej koncentrácii, a môže sa skladať z niektorej kombinácie vhodných analytických techník.

Použitie analytickej metódy závisí od povahy látky a analytická metóda musí byť dostatočne presná a citlivá, aby preukázala 10 % pokles pôvodnej koncentrácie.

1.6.4. Podmienky skúšania

Testy sa vykonávajú v termostaticky kontrolovanom uzavretom priestore v kúpeli s konštantnou teplotou s odchýlkou $\pm 0,5$ °C od zvolenej teploty. Teplota sa udržiava a meria v rozsahu $\pm 0,1$ °C. Vplyv fotolýzy by mali vylúčiť vhodné prostriedky.

V prípade látok, ktoré sú ľahko oxidovateľné je nevyhnutné vylúčiť rozpustený kyslík (napr. prebublaním s dusíkom alebo argónom počas 5 minút pred prípravou roztoku).

1.6.5. Testovací postup

1.6.5.1. Predbežný test

Pre všetky látky sa vykoná predbežný test pri teplote $50 \pm 0,5$ °C pri troch hodnotách pH: 4,0, 7,0 a 9,0. Vykoná sa dostatočný počet meraní, aby bolo možné určiť, či je pre každú pH hodnotu pri teplote 50 °C polčas reakcie ($t_{1/2}$) nižší ako 2,4 hodiny, alebo že menej ako 10 % hydrolyzy sa pozorovalo po piatich dňoch. [Možno odvodiť, že tieto hodnoty zodpovedajú, buď polčasom reakcií nižším ako jeden deň, alebo väčším ako jeden rok v podmienkach bližších podmienkam životného prostredia (25°C)]. Ak predbežný test ukáže, že 50 % alebo viac testovanej látky zhydrolyzovalo počas 2,4 hodiny pri teplote 50 °C alebo že menej ako 10 % látky zhydrolyzovalo po piatich dňoch pri každej z troch hodnôt pH (4, 7 a 9), nie sú potrebné ďalšie testy.

V ostatných prípadoch a pre jednotlivé pH hodnoty, pre ktoré táto podmienka nebola

splnená, sa vykoná test 1.

1.6.5.2. Test 1

Test 1 sa vykonáva pri jednej teplote; uprednostňuje sa teplota $50 \pm 0,5$ °C pri sterilných podmienkach pri tých hodnotách pH, pre ktoré z predbežného testu vyplynula nutnosť ďalšieho testovania.

Vyberie sa dostatočný počet vzoriek (najmenej štyri), aby sa pokryl rozsah 20 % až 70 % hydrolyzy na testovanie správania pseudoprvého rádu pri špecifikovaných hodnotách pH.

Pre každú hodnotu pH, pri ktorej sa test 1 vykoná, sa stanoví rád reakcie.

Odhad rýchlostnej konštanty pri teplote 25 °C:

Rozhodnutie o tom, ako experimentálne pokračovať, závisí od toho, či sa preukáže z testu 1, že reakcia je, alebo nie je pseudoprvého rádu.

V prípade, že nie je možné s určitosťou preukázať z testu 1, že nejde o reakciu pseudoprvého rádu, vykonajú sa ďalšie experimenty, ako je to opísané v teste 2.

Ak sa môže bezpečne preukázať z testu 1, že reakcia je pseudoprvého rádu, potom sa vykonajú ďalšie experimenty, ako je to opísané v teste 3. [Alternatívne možno v špeciálnych podmienkach vypočítať rýchlostné konštanty pri teplote 25 °C z konštánt pri teplote 50 °C vypočítaných na základe výsledkov z testu 1 (pozri 3.2)].

1.6.5.3. Test 2

Tento test sa vykoná pri každej hodnote pH, pre ktorú sa jeho vykonanie ukázalo ako nevyhnutné na základe výsledkov testu 1, a to:

— buď pri jednej teplote nižšej ako 40 °C, alebo

— pri dvoch teplotách nad 50 °C, medzi ktorými je rozdiel aspoň 10 °C.

Pri každej hodnote pH a pri každej teplote, pri ktorej sa má vykonať test 2, sa v primeraných intervaloch zvolí najmenej šesť bodov tak, že stupeň hydrolyzy bude v oblasti 20 až 70 %.

Stanovenie sa vykonáva duplicitne pre jednu hodnotu pH a jednu teplotu. Ak sa test 2 vykonáva pri dvoch teplotách nad 50 °C, duplicitné meranie sa prednostne vykonáva pri nižšej z týchto dvoch teplôt.

Grafický odhad polčasu ($t_{1/2}$) sa vykoná pre každú hodnotu pH a teplotu, pri ktorých sa test 2 vykoná.

1.6.5.4. Test 3

Tento test sa vykoná pri každej hodnote pH, pre ktorú sa jeho vykonanie ukázalo na základe výsledkov testu 1 nevyhnutným, a to:

— buď pri jednej teplote nižšej ako 40 °C, alebo

— pri dvoch teplotách nad 50 °C, medzi ktorými je rozdiel aspoň 10 °C.

Pre každú hodnotu pH a teplotu, pri ktorej sa test 3 vykoná, sa vyberú tri body, prvý v čase 0 a druhý a tretí, keď je stupeň hydrolyzy väčší ako 30 %, a vypočíta sa konštanta k_{pozor} a $t_{1/2}$.

2. ÚDAJE

Pre charakterizáciu reakcie pseudoprvého rádu sa môžu získať hodnoty k_{pozor} pre každú hodnotu pH a každú teplotu v testoch zo závislostí logaritmu koncentrácie oproti času s použitím výrazu:

$$k_{\text{pozor}} = -\text{sklon} \times 2,303 \quad [7]$$

Navyše, $t_{1/2}$ sa môže vypočítať podľa rovnice [6].

Tam, kde je to vhodné, sa určí $k_{25\text{ }^{\circ}\text{C}}$ s použitím Arrheniovej rovnice.

Pre charakteristiku reakcií, ktoré nie sú pseudoprvého rádu, pozri 3.1.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- špecifikáciu látky,
- všetky výsledky získané s referenčnými látkami,
- princíp a detaily použitej analytickej metódy,
- pre každý test: hodnotu pH, zloženie tlmivého roztoku a tabuľku všetkých údajov týkajúcich sa času a koncentrácie,
- pre reakciu pseudoprvého rádu hodnoty k_{pozor} a $t_{1/2}$ a postup pri ich výpočte,
- pre reakcie, ktoré nie sú pseudoprvého rádu, výsledky závislosti logaritmu koncentrácie oproti času,
- všetky informácie a pozorovania potrebné na interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Prijateľné hodnoty rýchlostných konštánt (pri teplote 25 °C) testovaných látok sa vypočítajú za predpokladu, že už existujú experimentálne hodnoty aktivačnej energie pre homológy testovanej látky, a za predpokladu, že sa môže dôvodne predpokladať, že aktivačná energia testovanej látky má veľkosť rovnakého poriadku.

4. **ODKAZY**

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.

*Dodatok***TLMIVÉ ROZTOKY**A. **CLARK A LUBS**

Hodnoty pH, uvádzané v týchto tabuľkách, sa vypočítali z potenciálnych meraní s použitím Sørensenových štandardných rovníc. Skutočné hodnoty pH sú o 0,04 jednotiek väčšie ako tabuľkové hodnoty.

Zloženie	pH
0,1 M hydroftalát draselný + 0,1 N HCl pri 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalátu doplniť do 100 ml	3,8
0,1 M hydroftalát draselný + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalátu doplniť do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalátu doplniť do 100 ml	4,2
0,1 M dihydrofosforečnan draselný ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu doplniť do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu doplniť do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu doplniť do 100 ml	7,2

0,1 M H_3BO_3 v 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH pri 20 °C

16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny boritej doplniť do 100 ml 8,8

21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny boritej doplniť do 100 ml 9,0

26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny boritej doplniť do 100 ml 9,2

B. **KOLTHOFF A VLEESHOUWER**

Zloženie pH

0,1 M citran monodraselný + 0,1 N NaOH pri 18 °C (treba pridať malý kryštál tymolu na zabránenie rastu plesní)

2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu doplniť do 100 ml 3,8

9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu doplniť do 100 ml 4,0

16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu doplniť do 100 ml 4,2

C. **SÖRENSEN**

0,05 M borax + 0,1 N HCl

Zloženie		pH			
ml boraxu	ml HCl	Sørensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M borax + 0,1 N NaOH

Zloženie		pH			
ml boraxu	ml NaOH	Sørensen 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