384L0449

19.9.84 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* Nr L 251/1

KOMMISSIONENS DIREKTIV

av den 25 april 1984

om anpassning till tekniska framsteg för sjätte gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen

(84/449/EEG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 67/548/EEG av den 27 juni 1967 om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen[1], ändrat för sjätte gången genom rådets direktiv 79/831/EEG[2], särskilt artikel 19, 20 och 21 i detta, och

med beaktande av följande:

I artikel 3.1 i direktiv 79/831/EEG fastställs att ämnenas och preparatens fysikalisk-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet skall bestämmas enligt de metoder som redovisas i bilaga 5.

I artikel 19 i direktiv 79/831/EEG av den 18 september 1979 föreskrivs att bilaga 5 skall ingå i förfarandet; detta berör Kommittén för anpassning till tekniska framsteg. Vederbörlig hänsyn skall särskilt tas till sådana metoder som behöriga internationella organisationer har erkänt och rekommenderat.

Bestämmelserna i detta direktiv har tillstyrkts av Kommittén för anpassning till teknisk utveckling av direktiven om avskaffande av tekniska handelshinder för farliga ämnen och preparat.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Texten i bilaga 5 till direktiv 67/548/EEG ersätts härmed av texten i bilagan till detta direktiv.

Artikel 2

Medlemsstaterna skall anta och före den 1 juli 1985 offentliggöra de bestämmelser som är nödvändiga för att följa detta direktiv och skall omedelbart underrätta kommissionen om detta. Bestämmelserna skall börja tillämpas senast den 1 juli 1986.

Artikel 3

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 25 april 1984.

På kommissionens vägnar
Karl-Heinz NARJES
Ledamot av kommissionen

---

[1] EGT nr L 196, 16.8.1967, s. 1.
[2] EGT nr L 259, 15.10.1979, s. 10.

BILAGA

I bilagan anges testmetoder för bestämning av de fysikalisk-kemiska, toxikologiska och ekotoxikologiska egenskaper som finns upptagna i bilagorna 7 och 8 till direktiv 79/831/EEG. Metoderna är baserade på test och rekommendationer av behöriga internationella organ (särskilt OECD).

Om sådana metoder inte funnits tillgängliga har nationella standarder eller vetenskapligt erkända metoder använts. Generellt skall test utföras med ämnet som det marknadsförs. Det bör uppmärksammas att orenheter kan påverka testresultaten.

Om metoderna i denna bilaga inte är lämpliga för undersökning av en viss egenskap, skall anmälaren motivera varför en alternativ metod har använts.

Djurförsök och studier skall utföras enligt nationella bestämmelser varvid hänsyn skall tas till humana principer och den internationella utvecklingen inom området för djurens välbefinnande.

Om det finns likvärdiga testmetoder skall den metod väljas som använder det lägsta antalet försöksdjur.

INNEHÅLL

		Sid
DEL A: METODER FÖR BESTÄMNING AV FYSIKALISK-KEMISKA EGENSKAPER		6
A. 1.	Smältpunkt/smältintervall	6
A. 2.	Kokpunkt/kokpunktsintervall	15
A. 3.	Relativ densitet	22
A. 4.	Ångtryck	27
A. 5.	Ytspänning	39
A. 6.	Vattenlöslighet	46
A. 7.	Fettlöslighet	55
A. 8.	Delningskoefficient	59
A. 9.	Flampunkt	63
A. 10.	Brandfarlighet (fasta ämnen)	65
A. 11.	Brandfarlighet (gaser)	68
A. 12.	Brandfarlighet (ämnen och preparat som vid kontakt med vatten eller fuktig luft utvecklar mycket brandfarliga gaser i farliga mängder)	70
A. 13.	Brandfarlighet (fasta ämnen och vätskor)	74
A. 14.	Explosiva egenskaper	76
A. 15.	Självantändlighet (bestämning av den temperatur vid vilken flyktiga vätskor och gaser självantänds)	86
A. 16.	Självantändlighet (fasta ämnen — bestämning av den relativa själv-antändningstemperaturen)	88
A. 17.	Oxiderande egenskaper	91
DEL B: METODER FÖR BESTÄMNING AV TOXICITET		96
Allmän inledning		96
B. 1.	Akut toxicitet (oralt upptag)	98
B. 2.	Akut toxicitet (inandning)	101
B. 3.	Akut toxicitet (upptag genom huden)	105
B. 4.	Akut toxicitet (hudirritation)	108
B. 5.	Akut toxicitet (ögonirritation)	111
B. 6.	Akut toxicitet (hudsensibilisering)	115
B. 7.	Subakut toxicitet (oralt upptag)	120
B. 8.	Subakut toxicitet (inandning)	124
B. 9.	Subakut toxicitet (upptag genom huden)	129
B. 10.	Andra effekter — Mutagenicitet (cytogenetiskt test på däggdjur *in vitro*)	133
B. 11.	Andra effekter — Mutagenicitet (benmärgstest på däggdjur *in vivo*, cytogeniskt test, kromosomanalys)	136
B. 12.	Andra effekter — Mutagenicitet (mikronukleärt test)	139
B. 13.	Andra effekter — Mutagenicitet (*Eschericia coli* — omvänt mutationstest)	142
B. 14.	Andra effekter — Mutagenicitet (*Salmonella typhimurium* — omvänt mutationstest)	145
DEL C: METODER ATT BESTÄMMA EKOTOXICITET		148
C. 1.	Akut toxicitet för fisk	148
C. 2.	Akut toxicitet för *Daphnia*	157
C. 3.	Nedbrytning — biotisk nedbrytning: modifierat OECD-screening-test	162
C. 4.	Nedbrytning — biotisk nedbrytning: modifierat AFNOR-test NF T 90/302	172
C. 5.	Nedbrytning — biotisk nedbrytning: modifierat Sturm-test	181
C. 6.	Nedbrytning — biotisk nedbrytning: closed bottle test	190
C. 7.	Nedbrytning — biotisk nedbrytning: modifierat MITI-test	201
C. 8.	Bionedbrytning — biokemiskt syrebehov	214
C. 9.	Nedbrytning — kemiskt syrebehov	216
C. 10.	Nedbrytning — abiotisk nedbrytning: hydrolys som en funktion av pH-värde	218

DEL A: METODER FÖR BESTÄMNING AV FYSIKALISK-KEMISKA EGENSKAPER

A.1. SMÄLTPUNKT/SMÄLTPUNKTSINTERVALL

1. METOD

De beskrivna metoderna är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1. Inledning

De beskrivna metoderna och apparaterna skall användas vid bestämning av kemiska ämnens smältpunkt, utan någon begränsning beträffande deras renhetsgrad.

Valet av metod beror på arten av det ämne som skall undersökas.

Den avgörande faktorn är följaktligen om ämnet kan pulvriseras lätt, med svårighet, eller inte alls.

För vissa ämnen är det mera ändamålsenligt att bestämma frys- eller stelningspunkten och i riktlinjerna finns även standarder för dessa bestämningar.

1.2. Definitioner och enheter

Smältpunkten definieras som den temperatur då fasövergången från fast till flytande tillstånd äger rum vid normalt atmosfäriskt tryck.

Denna temperatur motsvarar idealt temperaturen vid stelnings- eller fryspunkten.

Eftersom fasövergången för många ämnen äger rum i ett stort temperaturintervall, kallas den ofta för smältpunktsintervallet.

Omvandling av enheter (K till °C):

$t = T - 273{,}15$

med t i °C, T i K.

1.3. Referensämnen

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas till att från tid till annan kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

Vissa referensämnen finns upptagna i hänvisningarna (se hänvisning 2).

1.4. Testmetodsprincip

Temperaturen (temperaturintervallet) vid fasövergången från fast till flytande tillstånd bestäms. I praktiken bestäms temperaturen vid begynnande smältning och vid slutlig smältning under uppvärmning av ett prov av testämnet vid atmosfäriskt tryck. Tre typer av metoder beskrivs, nämligen kapillärmetoden, värmebordsmetoden och fryspunktsbestämning.

1.4.1. *Kapillärmetoden*

1.4.1.1. Smältpunktsanordningar med vätskebad

Ett kapillärrör fylls med en liten, tätt packad mängd av det finmalda ämnet. Röret uppvärms tillsammans med en termometer och temperaturstegringen justeras till mindre än 1 K/min under själva smältningen. Temperaturen vid begynnande och slutlig smältning bestäms.

1.4.1.2. Metallblock

Enligt beskrivningen under 1.4.1.1, utom att kapillärröret och termometern är placerade i ett uppvärmt metallblock och kan iakttas genom hål i blocket.

1.4.1.3. Bestämning med fotocell

Provet i kapillärröret uppvärms automatiskt i en metallcylinder. En ljusstråle riktas genom ämnet via ett hål i cylindern och på en exakt inställd fotocell. Vid smältning ändras de flesta ämnens optiska egenskaper från ogenomskinlighet till genomskinlighet. Ljusstyrkan som når fotocellen ökar, varvid en stoppsignal sänds till en digital indikator som visar temperaturen hos en platinmotståndstermometer som är placerad i värmekammaren. Denna metod kan inte användas för vissa starkt färgade ämnen.

1.4.2. *Värmebord*

1.4.2.1. Koflers värmebänk

Koflers värmebänk består av två elektriskt uppvärmda metallstycken med olika värmeledningsförmåga och är så utformad att dess temperaturgradient i längdriktningen är nästan linjär. Värmebänkens temperaturområde kan spänna från 283 K till 543 K och dess särskilda anordning för temperaturavläsning omfattar en löpare med visare och flagga, särskilt utformade för den aktuella bänken. Smältpunkten bestäms genom att det aktuella ämnet läggs i ett tunt lager direkt på värmebänkens ovansida. Efter några sekunder utvecklas en skarp skiljelinje mellan den flytande och den fasta fasen. Skiljelinjens temperatur avläses genom att visaren inställs på linjen.

1.4.2.2. Smältmikroskop

Flera värmebord med mikroskop används vid bestämning av smältpunkten på mycket små provmängder. I de flesta värmeborden mäts temperaturen med ett känsligt termoelement men ibland används även kvicksilvertermometrar. En typisk smältpunktsanordning bestående av värmebord med mikroskop är utrustad med en värmekammare som innehåller en metallplatta på vilken provet placeras på ett objektglas. I metallplattans mitt finns ett hål genom vilket ljus kan erhållas från mikroskopets belysningsspegel. När anordningen används är kammaren stängd medelst en glasplatta för att förhindra tillträde av luft till arbetsområdet.

Uppvärmningen av provet regleras med en reostat. Krävs mycket exakta mätningar kan polariserat ljus användas för optiskt anisotropa ämnen.

1.4.2.3. Meniskmetoden

Denna metod används endast för polyamider.

Bestämning av den temperatur vid vilken förskjutningen av en silikonmenisk, som är innesluten mellan ett värmebord och ett täckglas som vilar på det undersökta polyamidprovet, iakttas visuellt.

1.4.3. *Metod för bestämning av fryspunkt*

Provet fylls i ett särskilt provrör och placeras i en apparat för bestämning av kristalliseringspunkten. Provet omrörs försiktigt och oavbrutet under avkylningen och temperaturen avläses och antecknas var 30 sekund. När temperaturen är konstant vid flera avläsningar registreras denna temperatur (med korrektion för termometerfel) som kristalliseringspunkten.

1.5. **Kvalitetskriterier**

I tabellen nedan anges de olika metodernas lämplighet och noggrannhet vid bestämning av smältpunkt/smältpunktsintervall.

TABELL: METODERNAS LÄMPLIGHET

A. **Kapillärmetoder**

Mätmetod	Ämnen som kan pulvriseras	Ämnen som inte lätt pulvriseras	Temperaturområde	Ungefärlig maximal exaktheti(1)	Anmärkningar
Smältpunktsanordning med vätskebad	Ja	Några få	273 till 573 K	± 0,3 K	Standard finns JIS K 0064
Smältpunktsanordning med metallblock	Ja	Några få	293 till 573 K	± 0,5 K	Standard finns ISO 1218 (E)
Bestämning med fotocell	Ja	Flera med hjälp av anordningar	253 till 573 K	± 0,1 K	

(1) Beroende på typ av instrument och ämnets renhetsgrad.

B. **Värmebord och frysmetoder**

Mätmetod	Ämnen som kan pulvriseras	Ämnen som inte lätt pulvriseras	Temperaturområde	Ungefärlig maximal exaktheti(1)	Anmärkningar
Koflers värmebänk	Ja	Nej	283 till 543 K	± 1,0 K	Standard finns ANSI/ASTM D 3451-76
Smältmikroskop	Ja	Några få	273 till 573 K (upp till 1773 K)	± 0,5 K	Standard finns DIN 53736
Meniskmetod	Nej	Endast för polyamider	293 till 573 K	± 0,5 K	Standard finns ISO 1218 (E)
Fryspunktsmetoder	För flytande ämnen	För flytande ämnen	223 till 573 K	± 0,5 K	Standard finns, t.ex BS 4699

(1) Beroende på typ av instrument och ämnets renhetsgrad.

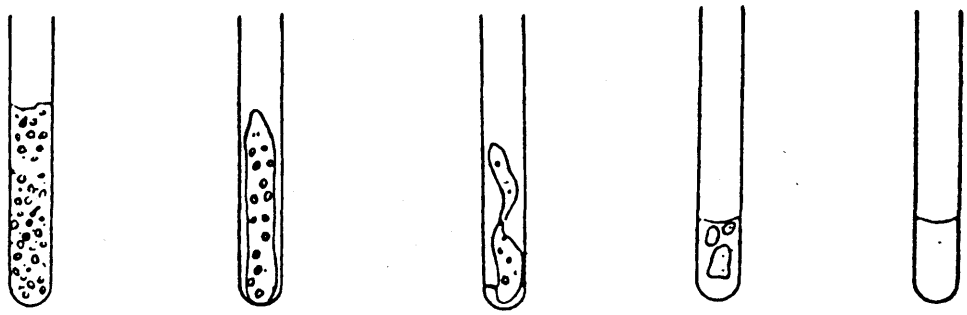
1.6. **Metodbeskrivning**

Förfarandena vid nästan alla testmetoderna finns beskrivna i internationella och nationella standarder (se tillägg 1).

1.6.1. *Kapillärrörsmetoder*

Fint pulvriserade ämnen utvisar vid långsam uppvärmning vanligtvis ett smältningsförlopp enligt figur 1.

Figur 1



Steg A Steg B Steg C Steg D Steg E

Steg A (Begynnande smältning, våtpunkt): Fina droppar fördelar sig jämnt över kapillärrörets innervägg.

Steg B (Krympningspunkt): Ett mellanrum uppstår mellan provet och innerväggen till följd av att provet krymper vid smältning.

Steg C (Sjunkningspunkt): Det krympta provet börja sjunka mot botten och övergår i flytande form.

Steg D (Flytpunkt): En hel menisk bildas vid ytan men en avsevärd del av provet består fortfarande av fast ämne.

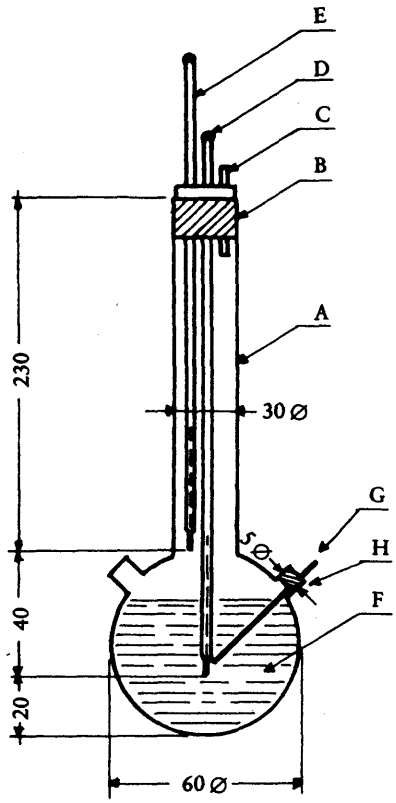
Steg E (Slutlig smältning): Det finns inga fasta partiklar.

Vid bestämning av smältpunkten antecknas temperaturen vid begynnande och slutlig smältning.

1.6.1.1. Smältpunktsanordningar med vätskebad

Figur 2 visar ett exempel på en standardiserad smältpunktsapparat (JIS K 0064) av glas. Alla mått är angivna i mm.

Figur 2



A: Mätkärl
B: Korkpropp
C: Lufthål
D: Termometer
E: Hjälptermometer
F: Badvätska
G: Kapillärrör av glas, längd 80—100 mm, innerdiameter 1,0 ± 0,2 mm, väggtjocklek 0,2–0,3 mm.
H: Sidorör

Badvätska:

Lämplig vätska skall väljas bland följande, beroende på smältpunkt. Flytande paraffin för smältpunkter upp till 473 K, koncentrerad svavelsyra eller silikonolja för smältpunkter upp till 573 K.

För smältpunkter över 523 K kan en blandning bestående av tre viktdelar svavelsyra och två viktdelar kaliumsulfat användas.

Termometer:

Endast termometrar som uppfyller kraven enligt följande eller likvärdiga standarder bör användas: ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Förfarande:

Det torra ämnet pulvriseras fint i en mortel och fylls i kapillärröret, som är tillslutet i ena änden, till en höjd av ungefär 3 mm efter tät packning. För att få ett jämnt packat prov skall kapillärröret falla från en höjd på ungefär 700 mm genom ett lodrätt glasrör och ned på ett urglas.

Det fyllda kapillärröret placeras i badet så att den mittersta delen av termometerns kvicksilverkula nuddar den del av kapillärröret där provet finns. Oftast förs kapillärröret in i apparaten när badets temperatur är ungefär 10 K under smältpunkten.

Badvätskan uppvärms så att temperaturhöjningen blir ungefär 3 K/min. Vätskan skall röras om. När temperaturen är ungefär 10 K under förväntad smältpunkt justeras temperaturhöjningen till högst 1 K/min.

Beräkning:

Smältpunkten beräknas enligt nedan:

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

där:

T = korrigerad smälttemperatur (K)

T_D = temperaturavläsning av termometer D (K)

T_E = temperaturavläsning av termometer E (K)

n = antal gradindelningar av den utstående delen av termometer Ds kvicksilverpelare.

1.6.1.2. Metallblock

Apparaten består av följande:

— ett cylindriskt metallblock, vars översta del är ihålig och bildar en kammare (se figur 3),

— en metallpropp med två eller flera hål som gör det möjligt att föra in rör i metallblocket,

— ett uppvärmningssystem för metallblocket, t.ex. kan ett elektriskt motstånd vara inneslutet i blocket,

— en reostat för reglering av energitillförseln, om elektrisk uppvärmning används,

— fyra fönster av värmebeständigt glas på kammarens sidovägg, placerade diametralt och vinkelrätt mot varandra. Framför ett av dessa fönster finns en lupp monterad för iakttagelse av kapillärröret. De tre andra fönstren används till att belysa kammarens insida med hjälp av lampor,

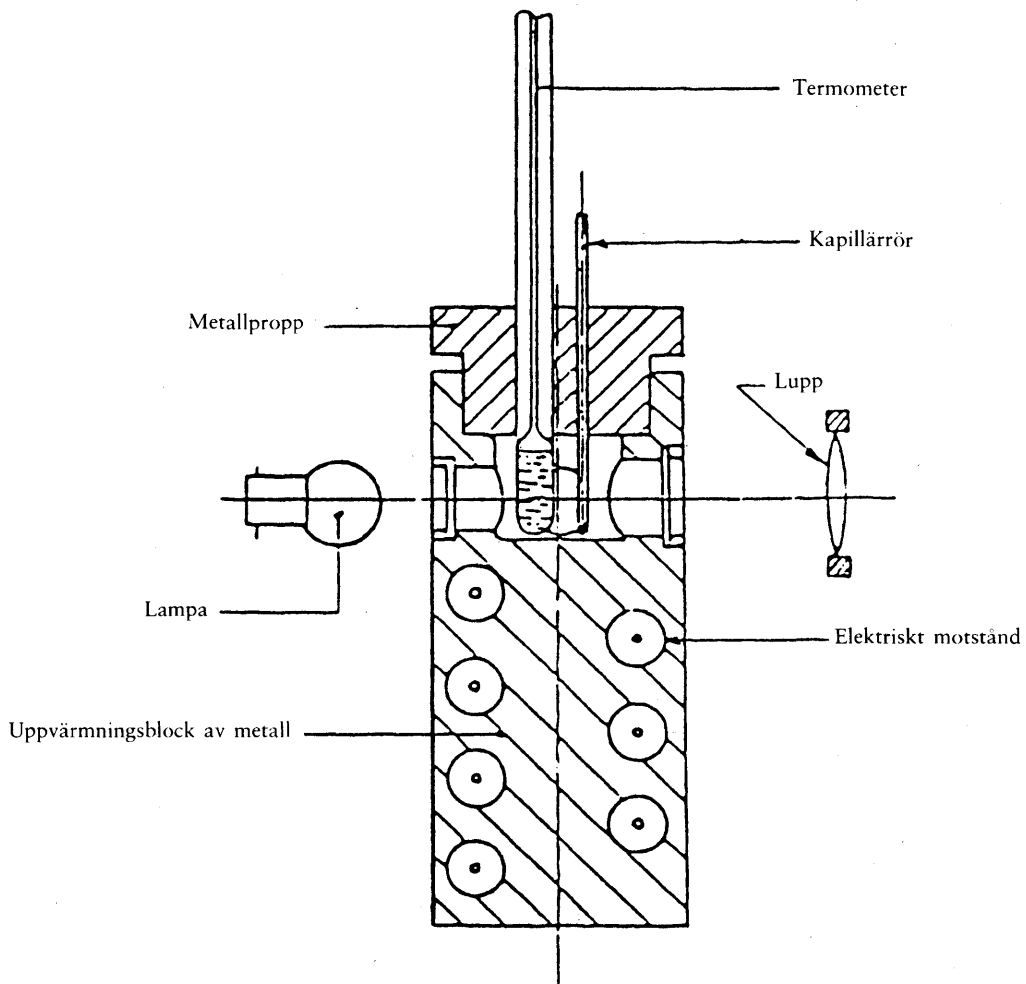
— ett kapillärrör av värmebeständigt glas, tillslutet i ena änden (se 1.6.1.1).

Termometer:

Se standarder i punkt 1.6.1.1.

Även termoelektriska instrument med jämförbar noggrannhet kan användas.

Figur 3



Förfarande:

Se 1.6.1.1. I detta fall görs ingen termometerkorrektion. Den avlästa temperaturen utvisar smältpunkten.

1.6.1.3. Bestämning med fotocell

Apparatur och förfarande:

Apparaturen består av en metallkammare med ett automatiskt uppvärmningssystem. Tre kapillärrör fylls enligt 1.6.1.1 och placeras i ugnen.

Fem linjära temperaturhöjningar kan användas till att kalibrera apparaturen och lämplig temperaturhöjning justeras elektriskt med en förvald konstant och linjär hastighet. Skrivare visar den faktiska ugnstemperaturen och smältpunkten för ämnet i kapillärrören.

1.6.2. *Värmebord*

1.6.2.1. Koflers värmebänk

Se tillägg.

1.6.2.2. Smältmikroskop

Se tillägg.

1.6.2.3. Meniskmetoden (polyamider)

Se tillägg.

Uppvärmningshastigheten vid smältpunkten skall vara lägre än 1 K/min.

1.6.3. *Metoder för bestämning av fryspunkten*

Se tillägg.

2. DATA

I vissa fall är det nödvändigt med termometerkorrektion.

3. RAPPORTERING

Den använda metoden skall uppges.

Den angivna smältpunkten är medelvärdet av minst två bestämningar, som ligger inom gränserna för den ungefärliga noggrannheten (se tabell). En uppskattning av noggrannheten skall tillhandahållas. Om skillnaden mellan temperaturen vid begynnande och slutlig smältning ligger inom gränsvärdena för metodens noggrannhet, anges temperaturen vid smältningens slutstadium som smältpunkten, eller också rapporteras båda temperaturerna.

Vissa ämnen bryts ned eller sublimeras innan smältpunkten nås. Om så sker skall det rapporteras.

Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras, i synnerhet vad gäller orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 102*, Decision of the Council C(81)30 final.

2) IUPAC, Physiochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, *Pure and applied chemistry*, vol. 48, 1976, s. 505-515.

Tillägg

Ytterligare tekniska uppgifter kan inhämtas i t.ex. följande standarder:

1. **Kapillärmetoder**

1.1. *Smältpunktsanordningar med vätskebad*

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

1.2. *Smältpunktsanordningar med metallblock*

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (e)	Plastics — polyamides — determination of "melting point"

2. **Värmebord**

2.1. *Koflers värmebänk*

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

2.2. *Smältmikroskop*

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. *Meniskmetoden (polyamider)*

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 du polyamides. Détermination du point de fusion Méthode du ménisque

3. **Metoder att bestämma fryspunkten**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for determination of melting point of petroleum wax (Cooling curve)
DIN 10319	Bestimmung des Gefrierpunktes von Milch

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

A. 2. KOKPUNKT/KOKPUNKTSINTERVALL

1. METOD

De beskrivna metoderna är baserade på OECDs riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1. **Inledning**

De metoder och anordningar som beskrivs här kan tillämpas på vätskor, förutsatt att dessa inte genomgår en kemisk reaktion under kokpunkten (t.ex. autooxidation, omordning, nedbrytning, osv.). Metoderna kan tillämpas på rena och orena vätskor.

Särskild vikt läggs vid den metod som utnyttjar bestämning med fotocell, därför att med denna metod är det möjligt att bestämma både smält- och kokpunkten. Dessutom kan dessa mätningar göras automatiskt.

Den "dynamiska metoden" har den fördelen att den också kan användas till att bestämma ångtrycket, och det är inte nödvändigt att korrigera koktemperaturen till normalt tryck (101,325 kPa) eftersom trycket kan justeras under mätningen. För närvarande är denna metod emellertid inte automatiserad.

Anmärkningar

Orenheters effekt på bestämningen av kokpunkten beror i hög grad på arten av orenhet. Effekten kan bli betydande om provet innehåller ett mycket flyktigt lösningsmedel.

Det undersökta provets sammansättning ändras från mätning till mätning på grund av att lågkokande beståndsdelar förflyktigas. Under sådana omständigheter erhålls kontinuerligt stegrade värden.

1.2. **Definitioner och enheter**

Standardkoktemperatur definieras som den temperatur vid vilken en vätskas mättade ångtryck är detsamma som standardtrycket.

Den mätta kokpunkten är beroende av det atmosfäriska trycket. Detta beroende kan beskrivas kvantitativt genom Clausius-Clapeyrons formel:

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

där:

p = ämnets ångtryck i Pascal

ΔH_v = dess förångningsvärme i J mol^{-1}

R = den universella molära gaskonstanten

= 8,31 J mol^{-1} K^{-1}

(Temperaturen T uttrycks i K).

Temperaturen vid kokpunkten (koktemperaturen) anges i förhållande till det omgivande trycket under mätningen.

Omvandling:

Tryck (enheter: kPa)

100 Kpa = 1 bar = 0,1 MPa (enheten "bar" är fortfarande tillåten men rekommenderas inte).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr (enheterna "mm Hg" och "Torr" är inte tillåtna).

Temperatur (enheter: K)

t = T - 273,15

(t i °C, och T i K).

1.3. **Referensämnen**

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas till att från tid till annan kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultat.

Vissa kalibreringsämnen finns upptagna i tillägget.

1.4. **Testmetodsprincip**

Alla metoder för bestämning av kokpunkten (kokpunktsintervallet) är baserade på mätning av koktemperaturen. Fem metoder beskrivs.

1.4.1. *Bestämning med hjälp av ebulliometer*

Ebulliometern utvecklades ursprungligen till molekylviktsbestämning genom kokpunktshöjningar, men den lämpar sig även för exakt bestämning av kokpunkter. En mycket enkel apparat beskrivs i ASTM D 1120-72 (se tillägg). I denna apparat uppvärms vätskan under jämviktsbetingelser i atmosfäriskt tryck tills den kokar.

1.4.2. *Dynamisk metod*

Med denna metod mäts ångans förtätningstemperatur med hjälp av ett termoelement i återloppet vid kokning. Med denna metod kan trycket varieras.

1.4.3. *Destillationsmetod för bestämning av kokpunkt och kokpunktsintervall*

Denna metod medför destillering av vätskan, mätning av ångans förtätningstemperatur och bestämning av destillatmängden.

1.4.4. *Siwoloboffs metod*

Ett prov uppvärms i ett provrör som är nedsänkt i vätska i ett värmebad. Ett sammangjutet kapillärrör med en luftbubbla i den nedre änden sänks ned i provröret.

Här bestäms den temperatur vid vilken en jämn ström av bubblor strömmar ut ur kapillärröret eller den temperatur vid vilken bubbelströmmen upphör och vätskan plötsligt börjar stiga i kapillärröret (Siwoloboff).

1.4.5. *Bestämning med fotocell*

Genom att följa Siwoloboffs princip kan man göra en automatisk fotoelektrisk mätning med användning av de stigande bubblorna.

1.5 **Kvalitetskriterier**

I tabell 1 anges de olika metodernas lämplighet och noggrannhet vid bestämning av kokpunkt/kokpunktsintervall.

1.6. **Metodbeskrivning**

Förfarandet vid några testmetoder finns beskrivna i internationella och nationella standarder (se tillägg).

1.6.1. *Ebulliometer*

Se tillägg.

1.6.2. *Dynamisk metod*

Se testmetod A.4 för bestämning av ångtrycket.

Koktemperaturen, som observeras vid ett anbringat tryck på 101,325 kPa, antecknas.

1.6.3. *Destillationsprocess (kokpunktsintervall)*

Se tillägg.

TABELL 1: JÄMFÖRELSE AV METODERNA

Mätmetod	Ungefärlig noggrannhet	Anmärkningar
Ebulliometer	± 1,4 K (över 373 K)(1)(2) ± 2,5 K (över 373 K)(1)(2)	Standard finns ASTM D 1120-72(1)
Dynamisk metod	± 0,5 K(2)	
Destillationsprocess (kokpunktsintervall)	± 0,5 K	Standard finns t.ex. ISO/R 918 DIN 53171 BS 4591/71
Siwoloboffs metod	± 1 K till ± 2 K(2)	
Bestämning med fotocell	± 0,3 K (vid 373 K)(2)	

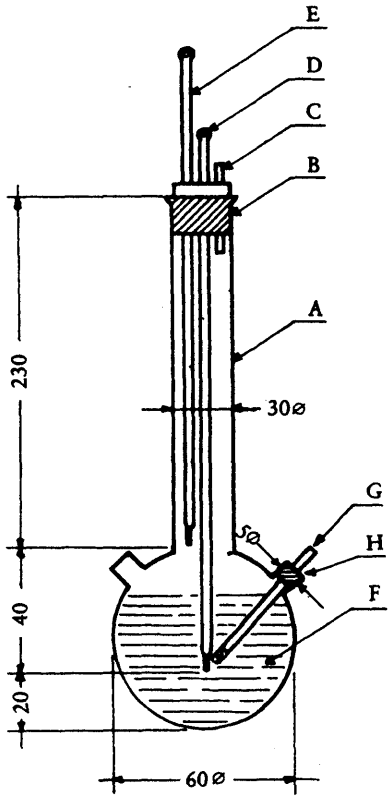
(1) Denna noggrannhet gäller endast den enkla anordning som beskrivits i t.ex. ASTM D 1120-72; den kan förbättras med mera avancerade ebulliometeranordningar.
(2) Gäller endast rena ämnen.

1.6.4. *Siwoloboffs metod*

Provet uppvärms i en smältpunktsapparat i ett provrör med en diameter på ungefär 5 mm (figur 1).

I figur 1 visas en typ av standardiserad smält- och kokpunktsapparat (JIS K 0064) (gjord av glas, alla måttangivelser i mm).

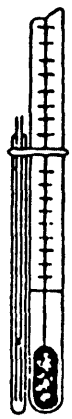
Figur 1



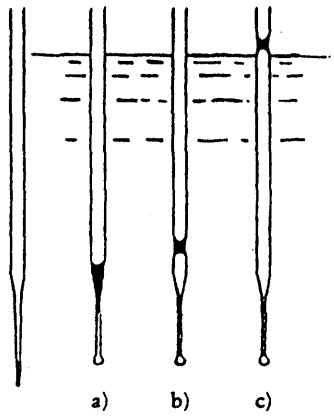
A: Mätkärl
B: Propp
C: Lufthål
D: Termometer
E: Hjälptermometer
F: Badvätska
G: Provrör, högst 5 mm ytterdiameter; kapillärrör, längd, ungefär 100 mm, innerdiameter, ungefär 1 mm, väggtjocklek, ungefär 0,2–0,3 mm.
H: Sidorör

Ett kokkapillärrör, som är tillslutet ungefär 1 cm ovanför den nedre änden, placeras i provröret. Provet fylls så högt upp att den tillslutna delen av kapillärröret befinner sig under vattenytan. Provröret med kapillärröret fästs vid termometern med ett gummiband eller med ett stöd från sidan (se figur 2).

Figur 2
Siwoloboffs princip



Figur 3
Modifierad princip



Badvätskan väljs utifrån koktemperatur. Vid temperaturer upp till 573 K kan svavelsyra eller silikonolja användas. Flytande paraffin kan endast användas upp till 473 K. Uppvärmningen av badvätskan skall i början regleras till en temperaturhöjning på 3 K/min. Badvätskan skall röras om. Vid ungefär 10 K under förväntad kokpunkt sänks värmen så att temperaturhöjningen blir mindre än 1 K/min. När koktemperaturen närmar sig börjar bubblor stiga upp från kapillärröret.

Kokpunkten är den punkt när bubbelströmmen, vid ögonblicklig nedkylning, upphör och vätska plötsligt börjar stiga i kapillärröret. Den motsvarande termometeravläsningen är ämnets kokpunkt.

I den modifierade principen (figur 3) bestäms kokpunkten i ett kapillärrör avsett för smältpunktsbestämning, som sträcks till en finspetsig tråd, ungefär 2 cm lång (a) och en liten provmängd sugs upp. Den öppna änden av det fina kapillärröret tillsluts genom smältning på så vis att en liten luftbubbla blir kvar i änden. Vid uppvärmning i smältpunktsapparaten (b) utvidgar sig luftbubblan. Kokpunkten är den temperatur vid vilken ämnesproppen når upp till ytan av badvätskan. (c)

1.6.5 *Bestämning med fotocell*

Provet uppvärms i ett kapillärrör i ett uppvärmt metallblock.

En ljusstråle riktas via lämpliga hål i blocket genom ämnet mot en exakt inställd fotocell.

När provets temperatur ökar stiger enstaka luftbubblor från kokkapillärröret. När koktemperaturen är nådd ökar antalet bubblor kraftigt. Detta leder till att styrkan ändras på det ljus som är riktat mot fotocellen och en stoppsignal sänds till en indikator som visar temperaturen på en motståndstermometer av platina som är placerad i blocket.

Denna metod är särskilt användbar därför att den medger bestämningar under rumstemperatur ned till 253,15 K (- 20 °C) utan ändring av apparaturen. Instrumentet skall bara placeras i ett kylrum eller kylbad. Exakt hur kokpunkten bestäms framgår av instrumentets handbok.

2. DATA

Vid små avvikelser från normalt tryck (högst ± 5 kPa) omräknas kokpunktstemperaturer till T_n med användning av följande formel av Sidney-Young:

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

där:

Δp = (101,325 — p) observera förtecknet

p = trycket mätt i kPa

f_T = kokpunktens ändringstakt med trycket i K/kPa

T = avläst koktemperatur i K

T_n = koktemperatur korrigerad till normalt tryck i K

Temperaturkorrektionsfaktorerna, f_T, och formler för ungefärlig beräkning av dessa, finns i ovannämnda internationella och nationella standarder för ett flertal ämnen.

Exempelvis anger DIN 53171 följande grova korrigeringar för lösningsmedel som ingår i färger:

TABELL 2: TEMPERATURKORREKTIONSFAKTORER f_T

Temperatur T (K)	Korrigeringsfaktor 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. RAPPORTERING

Den använda metoden skall anges. Den rapporterade kokpunkten är medelvärdet av minst två bestämningar, som ligger inom gränserna för den ungefärliga noggrannheten som anges i tabell 1. Om bestämningarna inte är reproducerbara skall andra metoder övervägas.

De uppmätta kokpunkterna och deras medelvärden skall anges och det eller de tryck vid vilka mätningarna gjordes skall anges i kPa.

Trycket bör helst ligga i närheten av normaltrycket. Om ett ämne kokar över ett temperaturintervall skall detta intervall anges. För alla resultat skall beräknad noggrannhet anges.

Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras, i synnerhet vad gäller orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

4. HÄNVISNINGAR

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

Tillägg

Ytterligare tekniska uppgifter kan inhämtas t.ex. i följande standarder:

1. **Ebulliometer**

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Destillationsprocess (kokpunktsintervall)**

ISO/R 918	Test method for distillation (distillation field and distillation range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siederverlaufes

1.4.4.

A. 3. RELATIV DENSITET

1. METOD

De beskrivna metoderna är baserade på OECDs riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1. **Inledning**

De beskrivna metoderna för bestämning av relativ densitet kan användas för fasta kroppar och vätskor, utan någon begränsning beträffande deras renhetsgrad. De olika metoder som får användas finns angivna i tabell 1.

1.2. **Definitioner och enheter**

Fasta ämnens och vätskors relativa densitet (D_4^{20}) är förhållandet mellan det undersökta ämnets vikt per volymenhet, bestämd vid 20 °C och vikten per samma volymenhet vatten, bestämd vid 4 °C. Den relativa densiteten har ingen dimension.

Ett ämnes densitet (p) är kvoten av vikten, m, och dess volym, v.

I SI-enheter anges densiteten i kg/m3.

1.3. **Referensämnen (se hänvisning 1 och 2)**

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne skall undersökas.

Referensämnen skall först och främst användas till att från tid till annan kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultat.

1.4. **Testmetodsprincip**

Fyra metoder används.

1.4.1. *Flottörmetoder*

1.4.1.1 Hydrometer (för vätskor)

Tillräckligt noggranna och snabba densitetsbestämningar kan göras med flytande hydrometrar, med vilka en vätskas densitet kan härledas från nedsänkningsgraden som avläses på en skala.

1.4.1.2. Hydrostatisk balans (för vätskor och fasta ämnen)

Skillnaden mellan provets vikt mätt i luft och i vatten kan användas till att bestämma dess densitet.

För fasta ämnen är den mätta densiteten endast representativ för just det prov som har använts vid bestämningen. När densiteten hos vätskor skall bestämmas vägs först en kropp med känd volym, v, i luft och sedan i vätskan.

1.4.1.3. Metod med nedsänkt kula (för vätskor) (se hänvisning 3)

Med denna metod bestäms en vätskas densitet utifrån skillnadenmellan vätskans vikt före och efter nedsänkning av en kula med känd volym i testvätskan.

1.4.2. *Pyknometermetoder*

Pyknometrar av olika utformning och med kända volymer kan användas till fasta ämnen och vätskor. Densiteten beräknas utifrån viktskillnaden mellan den fulla och den tomma pyknometern och dess kända volym.

1.4.3. *Luftjämförelsepyknometer* (för fasta ämnen)

Densiteten hos ett fast ämne, oavsett form, kan bestämmas vid rumstemperatur med en gasjämförelsepyknometer. Ämnets volym mäts i luft eller en inert gas i en cylinder med varierbar kalibrerad volym. Densiteten beräknas genom att vikten mäts efter volymbestämningen.

1.4.4. *Oscillerande densitometer* (se hänvisning 4, 5 och 6)

En vätskas densitet kan bestämmas med en oscillerande densitometer. En mekanisk oscillator i form av ett U-rör sätts i vibration vid en viss frekvens som är beroende på oscillatorns vikt. När ett prov införs ändras oscillatorns resonansfrekvens. Apparaturen skall kalibreras med två vätskor med känd densitet.

Dessa vätskor skall helst väljas så att deras densiteter spänner över hela det område som skall mätas.

1.5. **Kvalitetskriterier**

I tabellen anges de olika metodernas lämplighet för bestämning av densitet.

Den i ISO-standarder angivna noggrannheten avser endast rena ämnen.

1.6 **Metodbeskrivning**

I tillägget finns en lista över standarder, som kan tjäna som exempel, och i vilka ytterligare tekniska uppgifter kan inhämtas.

Testen skall utföras vid 20 °C, och minst två mätningar skall göras.

2. **DATA**

Se standarder.

3. **RAPPORTERING**

Den använda metoden/standarden skall uppges.

Den relativa densiteten (D_4^{20}) skall anges enligt definitionen i 1.2. tillsammans med det mätta ämnets fysiska tillstånd.

Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras, i synnerhet vad gäller orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

TABELL: METODERNAS LÄMPLIGHET

Mätmetod		Densitet		Maximal dynamisk viskositet	Anmärkningar
		Fasta	Vätskor		
1.4.1.1	Hydrometer		×	5 Pa s	ISO 387
1.4.1.2	Hyrostatisk balans				ISO/R 1185 (A)
	a) fasta ämnen	×		5 Pa s	ISO/R 91 och R 758
	b) vätskor		×		
1.4.1.3	Metod med nedsänkt kula		×	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2	Pyknometer				ISO/R 3507
	a) fasta ämnen	×		500 Pa s	ISO/R 1183 (B)
	b) vätskor		×		ISO/R 758
1.4.3	Luftjämförelsepyknometer	×			DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
1.4.4	Oscillerande densitometer		×	5 Pa s	

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 109*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, *Pure and applied chemistry*, vol. 48, 1976, s. 508.

3) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, *Technisches Messen tm*, vol. 11, 1979, s. 427—430.

4) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, *Elektronik*, vol. 19, 1970, s. 297—302.

5) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, *Die Pharmazeutische Industrie*, vol. 37, 1975, s. 717—726.

6) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, *Brauwissenschaft*, vol. 9, 1976, s. 253—255.

Tillägg

Ytterligare tekniska uppgifter kan inhämtas i t.ex. följande standarder:

1.	**Flottörmetoder**	
1.1.	*Hydrometer*	
	DIN 12790	Aräometer; allgemeine Bestimmungen
	ISO 387	
	DIN 12791	Teil I: Dichte-Aräometer; Grundserien, Ausführung, Justierung und Anwendung
		Teil II: Dichte-Aräometer, Normgrö?en, Bezeichnungen
	ISO/R 649	
	DIN 12793	Laborgeräte aus Glas: Sucharäometer für Vormessung und rohe Betriebsmessung
1.2	*Hydrostatisk balans*	
	För fasta ämnen:	
	ISO R 1183	Method A: Methods för determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
	ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
	DIN 53479	Prüfung von Kunststoffen und Elastomeren; Bestimmung der Dichte
	För vätskor:	
	ISO R 91	ISO R 758
	DIN 51757	Prüfung von Mineralölen und verwandten Stoffen; Bestimmung der Dichte
	ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 och 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	*Metod med nedsänkt kula*	
	DIN 53217	Prüfung von Anstrichstoffen; Bestimmung der Dichte mit dem Pyknometer (Der Zustand für die Tauchkugelmethode soll 1981 veröffentlicht werden.)
2.	**Pyknometermetoder**	
2.1.	*För vätskor*	
	ISO 3507	Pyknometrar
	ISO/R 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
	DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (för icke-flyktiga vätskor som inte är för viskösa)
	DIN 12798	Lipkin pycnonmeter (för vätskor med kinematisk viskositet under 100.10^{-6} ms^{-1} vid 15 °C)

	DIN 12800	Sprengel pycnometer (för vätskor enligt DIN 12798)
	DIN 12801	Reischauer pycnometer (för vätskor med kinematisk viskositet under 100.10^{-6} ms^{-1} vid 20 °C, särskilt lämplig även för kolväten och vattenlösningar samt för vätskor med högre ångtryck, cirka 1 bar vid 90 °C)
	DIN 12806	Hubbard pycnometer (för alla typer av viskösa vätskor som inte har för högt ångtryck, särskilt även för färg, lacker och bitumen)
	DIN 12807	Bingham pycnometer (för vätskor enligt DIN 12801)
	DIN 12808	Jaulmes pycnometer (särskilt för etanol-vattenblandningar)
	DIN 12809	Pyknometer mit eingeschliffenem Thermometer und Seitenkapillaren (für nicht besonders viskose Flüssigkeiten)
	DIN 53217	Prüfung von Anstrichtstoffen; Bestimmung der Dichte mit dem Pyknometer
	DIN 51757	Punkt 7: Prüfung von Mineralölen und verwandten Stoffen; Bestimmung der Dichte
	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 of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method
2.2.	*För fasta ämnen*	
	ISO/R 1183	Metod B i Method for Determining the Density and Relative Density of Plastics excluding Cellular Plastics
	DIN 19683	Bestimmung der Dichte von Böden
3.	**Luftjämförelsepyknometer**	
	DIN 55990	Teil 3 Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen: Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

A. 4. ÅNGTRYCK

1. METOD

De beskrivna metoderna är baserade på OECDs riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1. **Inledning**

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets struktur, smältpunkt och kokpunkt.

Det finns inte någon enskild metod som kan användas över hela ångtrycksområdet. Därför rekommenderas flera metoder för mätning av ångtryck från $>10^{-3}$ till 10^5 Pa.

Orenheter inverkar normalt på ångtrycket. Orenheters inverkan på bestämningen av ångtrycket beror i hög grad på arten av orenhet. Om provet innehåller ett mycket flyktigt lösningsmedel kan effekten bli avsevärd.

1.2 **Definitioner och enheter**

Ett ämnes ångtryck definieras som mättnadstrycket över ett fast ämne eller en vätska. Vid den termodynamiska jämvikten är ångtrycket av ett rent ämne en funktion enbart av temperaturen.

Den SI-enhet för tryck som skall användas är Pascal (Newton/m).

Tidigare använda enheter med omvandlingsfaktorer:

1 Torr (mm Hg) = 1,333 x 10 Pa

1 atmosfär (fysiskt atm) = 1,013 x 10^5 Pa

1 atmosfär (tekniskt at) = 9,81 x 10^4 Pa

1 bar = 10^5 Pa

SI-enheten för temperatur är Kelvingrader (K).

1.3. **Referensämnen**

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas till att från tid till annan kontrollera metodens prestanda och till att möjliggöra en jämförelse av resultat när en annan metod tillämpas.

1.4. **Testmetodsprincip**

Till bestämning av ångtrycket föreslås fem metoder som kan tillämpas i olika ångtrycksområden. För varje metod bestäms ångtrycket vid olika temperaturer. I ett begränsat temperaturområde är logaritmen för ett rent ämnes ångtryck en linjär funktion av det inverterade värdet av temperaturen.

1.4.1. *Dynamisk metod*

Med den dynamiska metoden mäts den koktemperatur som motsvarar ett givet tryck.

Rekommenderat område:

10^3 upp till 10^5 Pa, mellan 20 och 100°C.

Denna metod har även rekommenderats till kokpunktsbestämning och kan användas i detta syfte upp till 350°C.

1.4.2. *Statisk metod*

I den statiska processen, vid termodynamisk jämvikt, bestäms det ångtryck som bildas i ett slutet system vid en given temperatur.

Denna metod lämpar sig för fasta ämnen och vätskor bestående av en eller flera komponenter.

Rekommenderat område:

10 upp till 10^5 Pa, mellan 0 och 100°C.

1.4.3. *Isoteniskop*

Denna standardiserade metod är också en statisk metod men den lämpar sig vanligtvis inte för flerkomponentssystem. Ytterligare information finns i ASTM metod D-2879-75.

Rekommenderat område:

från 100 till 10^5 Pa, mellan 0 och 100°C.

1.4.4. *Ångtrycksjämvikt*

Mängden ämne som avgår ur en cell per tidsenhet genom en öppning av känd storlek, bestäms under vakuumbetingelser så att mängden ämne som återvänder till cellen är försumbar (t.ex. genom att mäta den puls som en ångstråle framkallar på en känslig våg eller genom att mäta viktförlusten).

Rekommenderat område:

10^{-3} till 1 Pa, mellan 0 och 100°C.

1.4.5. *Gasmättnadsmetod*

En ström av inert bärargas leds över ämnet så att den mättas med sin ånga varefter ångan samlas upp i en lämplig fälla. Mätning av den mängd material som transporteras av en känd mängd bärargas används till att beräkna ångtrycket vid en given temperatur.

Rekommenderat område:

upp till 1 Pa.

1.5 **Kvalitetskriterier**

De olika metoderna att bestämma ångtrycket jämförs med avseende på tillämpning, repeterbarhet, reproducerbarhet, mätområde, befintlig standard. Detta görs i följande tabell.

1.6.1.2. Mätförfarande

Ångtrycket mäts genom bestämning av provets kokpunkt vid olika angivna tryck mellan ungefär 10^3 och 10^5 Pa. En jämn temperatur under konstant tryck anger att kokpunkten (jämviktskokpunkten, om det är en blandning) är nådd. Skummande ämnen kan inte mätas med denna metod.

Vid mätning skall alla delar av glas först rengöras noggrant och torkas och därefter evakueras under gasballast. Därefter införs ämnet i apparaturen. Om fasta ämnen inte är i pulverform kan problem uppstå vid påfyllningen, men detta kan undvikas genom uppvärmning av kylvattensmanteln. Efter påfyllning sammanflänsas apparaten och ämnet avgasas. Lägsta önskat tryck inställs och uppvärmningssystemet kopplas på. Samtidigt ansluts termoelementet eller motståndstermometern till en skrivare. Jämvikt har nåtts när en konstant koktemperatur kan avläsas vid ett visst konstant tryck. Efter notering av denna jämviktspunkt ställs ett tryck in. Processen fortsätter på detta sätt tills 10^5 Pa har uppnåtts (totalt ungefär 5–10 mätpunkter). I kontrollsyfte skall jämviktspunkter upprepas vid avtagande tryck.

1.6.2 *Statisk mätning*

1.6.2.1. Apparatur

En typisk mätapparat (figur 2) omfattar såväl ett uppvärmnings- och ett kylsystem, bestående av glas och metall, för att förse provet med en reglerad temperatur, som utrustning för inställning och mätning av tryck och temperatur.

Provkammaren har på ena sidan en högvakuumventil av rostfritt stål, och på andra sidan ett U-rör innehållande lämplig manometervätska. Den andra änden av U-röret är ansluten till ett tvärstycke, med en gren till vakuumpumpen, en annan till kvävecylinder och en tredje till tryckmätaren.

För att ge provet en kontrollerad temperatur placeras hela provkammaren, inklusive ventiltallriken och en tillräckligt stor del av U-röret (av praktiska skäl upp till ventiltallrikens höjd) i därför avsett bad med konstant temperatur. Temperaturen mäts med ett termoelement eller en motståndstermometer mycket nära provkammarens utsida och kan registreras.

Flytande kväve eller en blandning av kolsyresnö och alkohol är lämplig för underkylning av provet. För mätning vid låga temperaturer används en ultrakryostat.

En lämplig pump används till att evakuera apparaten till erforderligt tryck.

Ett ämnes ångtryck mäts vanligtvis indirekt via en nollindikator. Denna nollindikator kan vara ett U-rör innehållande en vätska, som angivits nedan, eller bland annat, en membranmanometer. I ett temperaturreglerat bad flyttar ångtrycket vätskan i U-röret ur jämviktsläget. Kväve leds nu in i apparaten från en ansluten kvävecylinder via en ventil för att kompensera effekten av ångtrycket och föra tryckmätaren tillbaka till noll. Det kvävetryck som krävs för detta avläses på en precisionstryckmätare, som befinner sig vid rumstemperatur, och motsvarar ämnets ångtryck vid motsvarande konstanta temperatur. Beroende på tryckområdet och ämnets kemiska beteende, kan olika vätskor, t.ex. kvicksilver, silikonolja eller ftalater, användas som vätska i U-röret för att balansera nolljämvikten.

Kvicksilver kan användas från atmosfäriskt tryck ned till 10^2 Pa, silikonoljor och ftalater också under 10^2 Pa ned till 10 Pa; membranmanometern kan även användas under 10^{-1} Pa.

1.6.2.2. Mätförfarande

Före mätningen skall alla delar av apparaten i figur 2 rengöras noggrant med lösningsmedel och därefter torka i vakuum. U-röret fylls med önskad vätska, som före påfyllning skall avgasas vid förhöjd temperatur.

Efter påfyllning av ämnet sammanflänsas apparaten och provkammaren underkyls tillräckligt. Med ventilen över provkammaren i öppet läge pumpas därefter den inneslutna luften ut ur apparaten i flera minuter. Därefter stängs ventilen ovanför ämnet, provet kyls till vald temperatur, varvid den därav följande förskjutningen av kolonnerna iakttas och vid behov kompenseras med kväve till nolläge, tills konstant temperatur har uppnåtts. Därefter underkyls provkammaren igen. Om resttryck observeras i underkylt tillstånd beror detta antingen på att luft, som finns i provet, frigörs under uppvärmningsprocessen och kan tappas ut, eller på att nedkylningstemperaturen inte är tillräckligt låg. Flytande kväve skall då användas som kylmedel.

När provet är tillräckligt avgasat bestäms ångtryckets temperaturberoende med tillräckligt små temperaturintervall.

1.6.3. *Isoteniskop*

En fullständig beskrivning av denna metod finns i hänvisning 2. Mätanordningens princip framgår av figur 3. I likhet med den statiska metoden, som beskrivits i 1.6.2., lämpar sig isoteniskopet för undersökning av fasta ämnen eller vätskor.

När det gäller vätskor fungerar själva ämnet som vätskan i hjälpmanometern. När det gäller fasta ämnen används, beroende på tryck och temperaturområde, de manometervätskor som angivits i 1.6.2. För vätskor fylls isoteniskopets klot med testämnet som avgasas under kokning vid förhöjd temperatur.

Samtidigt destilleras en del av vätskan ut ur klotet, kondenseras i det övre nedkylda klotet och vänder tillbaka till U-röret. När detta är tillräckligt fyllt med avgasad vätska förs det lägre klotet med U-röret i ett termostatiskt reglerat bad upp till den valda temperaturen och det ångtryck som då uppstår mäts indirekt, precis som i den i 1.6.2. beskrivna metoden.

När det gäller fasta ämnen fylls den avgasade manometervätskan in i utbuktningen på isoteniskopets långa arm. Därefter påfylls det fasta ämne, som skall undersökas, i det nedre klotet och avgasas vid förhöjd temperatur. Sedan lutas isoteniskopet så att manometervätskan kan flyta in i U-röret. Mätningen av ångtrycket som en funktion av temperaturen görs enligt 1.6.2

1.6.4. *Ångtrycksvåg*

1.6.4.1 Apparatur

I litteraturen (se hänvisning 1) beskrivs flera olika apparatutformningar. Den som beskrivs här illustrerar de principer som används. Ett antal delar visas i figur 4, nämligen bottenplatta och gasklocka, en pump med vakuummätare och utrustning för mätning av ångtrycket genom visarutslag. Följande inbyggda utrustning monteras på bottenplattan:

— En avdunstningsugn med fläns och rotationsmatning. Avdunstningsugnen är ett platt, cylindriskt kopparkärl. (Ugnen kan även vara gjord av glas och omgiven av en kopparvägg.) Den sitter i en kopparhållare som är fastskruvad på ett stycke rostfritt stål vid dess nedre utskjutande kant. Stycket av rostfritt stål är i sin tur monterat på bottenplattan med hjälp av en fläns så att det kan vridas kring ugnens axel. Uppvärmningen ombesörjs av en värmeslinga som är placerad inuti stycket av rostfritt stål och följaktligen åtskilt från vakuumkammaren.

— Ugnslocket är gjort av koppar och har tre avdunstningsöppningar med olika tvärsnitt, inbördes förskjutna 90°C. Genom att vrida ugnen kan önskad ugnsöppning eller ett mellanläge placeras under springan i kylaren, som är excentriskt belägen i förhållande till ugnen, och på så sätt riktas molekylstrålen mot vågskålen eller avleds den. Ett termoelement eller en motståndstermometer monteras i ugnsväggen för mätning av temperaturen.

— Balansvågen är ett vridspoleinstrument. Visaren är ersatt av ett litet rör på vilket vågbalken och motvikten är monterade. Vågbalken har en utbytbar vågskål gjord av ett tunt stycke guldpläterad aluminium. En 0,1 mm tjock konstantantråd, på vilken kalibreringsvikter kan placeras, är fäst ungefär mitt i vågbalken. Ångtrycket kan registreras med ett fotoelektriskt nollpunktsinstrument.

— En cylindrisk mässingsbehållare omger vågskålen på alla sidor utom de två springorna för vågbalkens rörelse och en snäv öppning för molekylstrålens ingång. Värmeavledning till yttersidan ombesörjs av en kopparstång uppe på mässingsbehållaren och leds via ett rör av rostfritt stål som går genom bottenplattan och är värmeisolerad från denna. Kopparstången nedsänks i en Dewar-flaska, som innehåller flytande kväve, under bottenplattan.

1.6.4.2. Mätförfarande

Kopparugnen fylls med ämnet, locket stängs och plåtens öppning, avskärmning och kylaren förs över ugnen. Klockan monteras och vakuumpumparna startas. Det slutliga trycket innan mätningen påbörjas är ungefär 10^{-4} Pa. Från 10^{-2} Pa och under startar nedkylningen av kylboxen.

Efter en stund kommer vågen att ha nått en tillräckligt låg temperatur så att den utströmmande ångstrålen kan kondensera på vågskålen. Denna kondensation frambringar en signal på den anslutna skrivaren. Denna signal kan användas på två sätt: med den särskilda apparat som beskrivs här bestäms ångtrycket direkt från trycket på vågskålen (molekylvikten behövs inte). Samtidigt bestäms den kondenserade vikten och avdunstningshastigheten kan därför beräknas utifrån deponeringstiden. Detta gäller mera de vanligare apparaterna. Ångtrycket kan även beräknas utifrån avdunstningshastigheten och molekylvikten med användning av Hertz-ekvationen:

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

där:

G = avdunstningshastighet (kg/s m^2)

M = molekylvikt (g/mol)

T = temperatur (K)

R = universell molgaskonstant (J/mol K)

p = ångtryck (Pa)

När erforderligt vakuum har uppnåtts börjar serien av mätningar vid den lägsta önskade mättemperaturen. Den nödvändiga öppningen öppnas och ångstrålen passerar avskärmningen, som är direkt monterad över locket, och träffar sedan den nedkylda vågskålen. Vågskålen är så dimensionerad att hela strålen uppsamlas i dess cosinusformade spridning. Ångstrålens moment framkallar en kraft på vågskålen där kondensationen äger rum på dess nedkylda yta. Till följd av ångstrålens kraft kommer vågbalken att avvika från jämviktstillståndet. I slutet av vågbalken finns en liten tapp som registreras optiskt via ett prismasystem och två fotodioder. En ansluten styrkrets reglerar därefter och återställer momentant vågbalken till balanserat tillstånd. Det vridmoment som erfordras registreras och motsvarar efter kontrollvägning ämnets ångtryck.

För ytterligare mätningar ökas temperaturen med små intervaller tills den högsta önskade temperaturen är uppnådd. Provet nedkyls sedan igen och en andra ångtryckskurva kan registreras. De två serierna är endast reproducerbara om det mätta provet är tillräckligt rent. Om den tredje testomgången inte bekräftar resultaten från den andra omgången är det möjligt att ämnet bryts ned i det mätta temperaturområdet.

1.6.5. *Gasmättnadsmetod*

1.6.5.1. Apparatur

En typisk apparat som används till detta test består av ett antal komponenter, som visas i figur 5, och beskrivs nedan (se hänvisning 1).

Inert gas:

Bärargasen får ej reagera kemiskt med provämnet. Kväve är vanligtvis tillfyllest för detta syfte men ibland kan andra gaser krävas. Den använda gasen skall vara torr (se figur 5, position 4): Givare. Relativ fuktighet).

Flödesreglering:

Ett lämpligt gasregleringssystem erfordras för att säkerställa ett konstant och väljbart flöde genom mättnadskolonnen.

Fällor för uppsamling av ånga

Dessa är beroende av det aktuella provets egenskaper och den valda analysmetoden. Ångan skall infångas kvantitativt och i en form som medger efterföljande analys. För vissa provämnen lämpar sig fällor innehållande vätskor som hexan eller etylenglykol. För andra kan fasta absorptionsmedel användas.

Värmeväxlare:

För mätning vid olika temperaturer kan det vara nödvändigt att inkludera en värmeväxlare i utrustningen.

Mättnadskolonn:

Provämnet appliceras i form av lösningsbeläggning på ett lämpligt inert bärarmaterial. Det belagda bärarmaterialet packas i mättnadskolonnen, vars dimensioner och flödeshastighet skall vara sådana att en fullständig mättnad av bärargasen säkerställs. Mättnadskolonnen skall vara termostatreglerad. För mätningar vid temperaturer över 20 °C skall stycket mellan mättnadskolonnen och fällorna uppvärmas för att förhindra kondensation av provämnet.

1.6.5.2. Mätförfarande

Förberedelse av mättnadskolonnen:

En upplösning av provämnet i ett mycket flyktigt lösningsmedel tillsätts till en lämplig mängd bärarmaterial. Tillräckligt med provämne skall tillsättas för att upprätthålla mättnaden så länge testet pågår. Lösningsmedlet avdunstar helt i luft eller i en roterande förångare och det noggrant blandade materialet tillsätts till mättnadskolonnen. Efter termostatreglering av provet leds kväve genom apparaten.

Mätning:

Fällorna ansluts till kolonnens utlopp och tiden registreras. Flödeshastigheten kontrolleras i början och med jämna mellanrum under testet med en bubbelmätare (eller fortlöpande med en masseflödesmätare).

Trycket vid utgången till mättnadskolonnen skall mätas. Detta kan göras antingen

a) genom att en tryckmätare insätts mellan mättnadskolonnen och fällorna (detta på grund av ökat dödutrymme och adsorptionsyta), eller

b) genom att bestämma tryckdropparna över det använda systemet av fällor som funktion av flödeshastigheten i ett separat test (eventuellt inte så lyckat för vätskefällor).

Den tid som krävs till uppsamling av den mängd provämne som behövs för de olika analysmetoderna, bestäms vid preliminära försök eller genom uppskattningar. Innan ångtrycket beräknas vid en given temperatur skall preliminära försök göras för att bestämma den maximala flödeshastighet som mättar bärargasen helt med ämnets ånga. Detta säkerställs om bärargasen leds genom mättnadskolonnen tillräckligt sakta så att en lägre hastighet inte ger ett större beräknat ångtryck.

Vilken analysmetod som skall användas bestäms av arten av det ämne som skall undersökas (t.ex. gaskromatografi eller gravimetri).

Mängden ämne som transporteras till en känd volym bärargas bestäms.

1.6.5.3. Beräkning av ångtryck

Ångtrycket beräknas utifrån ångans densitet, (m/V), genom ekvationen:

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

där:

p = ångtryck (Pa)

m = vikt av adsorberat provämne (g)

V = volym mättad gas (m^3)

R = universell molgaskonstant (J/mol K)

T = temperatur (K)

M = molekylvikt (g/mol).

De mätta volymerna skall korrigeras för tryck- och temperaturskillnader mellan flödesmätaren och den termostatreglerade mättnadskolonnen. Om flödesmätaren är placerad nedströms från ångfällan kan det vara nödvändigt med korrigeringar för att ta hänsyn till eventuella avdunstade beståndsdelar från fällorna (se hänvisning 1).

2. DATA

Ångtrycket från någon av föregående metoder skall bestämmas vid minst två temperaturer. För att kontrollera ångtryckskurvans linearitet är det önskvärt med tre eller flera bestämningar i området 0—50 °C.

3. RAPPORTERING

Följande uppgifter skall om möjligt ingå i rapporten:

Exakt specificering av ämnet (identitet och orenheter):

— Minst två värden för ångtryck och temperatur, helst i området 0—50 °C. Den skall vidare innehålla alla rådata och en kurva över log p, som funktion av 1/T. Dessutom skall en beräkning av ångtrycket vid 20—25 °C anges.

Om en övergång (tillståndsändring, nedbrytning) iakttas, skall följande uppgifter antecknas:

— förändringens art,

— temperatur vid vilken förändringen inträffar vid atmosfäriskt tryck,

— ångtryck vid 10 och 20 °C under övergångstemperaturen och 10 och 20 °C över denna temperatur (såvida inte övergången sker från fast ämne till gas).

Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras.

Den använda metoden skall uppges.

4. HÄNVISNINGAR

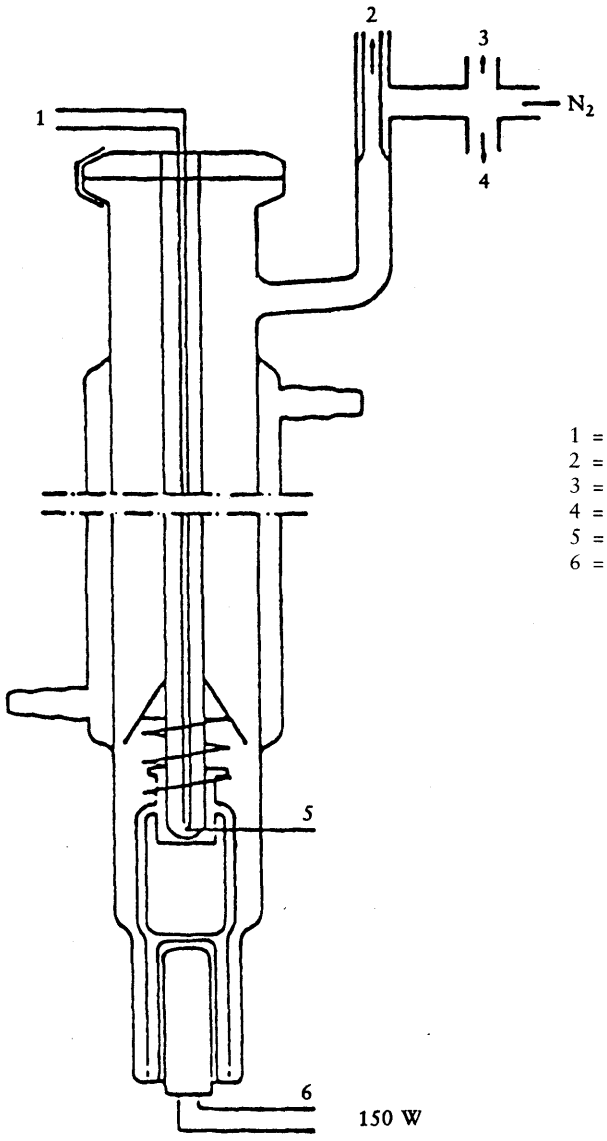
1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 104*, Decision of the Council C(81) 30 final.

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

Tillägg

Figur 1

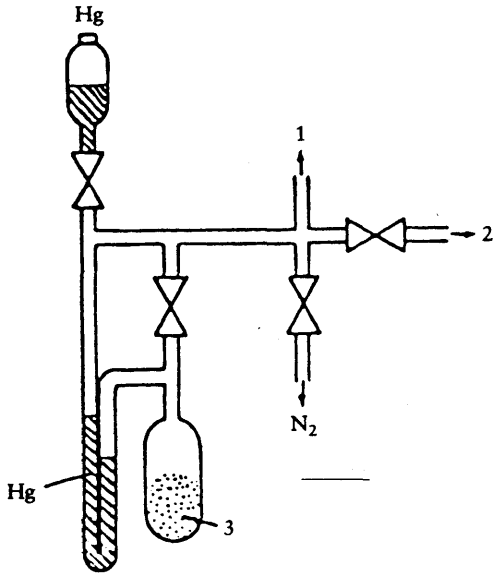
Apparat för bestämning av ångtryckskurvan enligt den dynamiska metoden



1 = Termoelement
2 = Vakuumbuffertvolym
3 = Tryckmätare
4 = Vakuum
5 = Mätpunkt
6 = Värmelement cirka 150 W

Figur 2

Apparat för bestämning av ångtryckskurvan enligt den statiska metoden

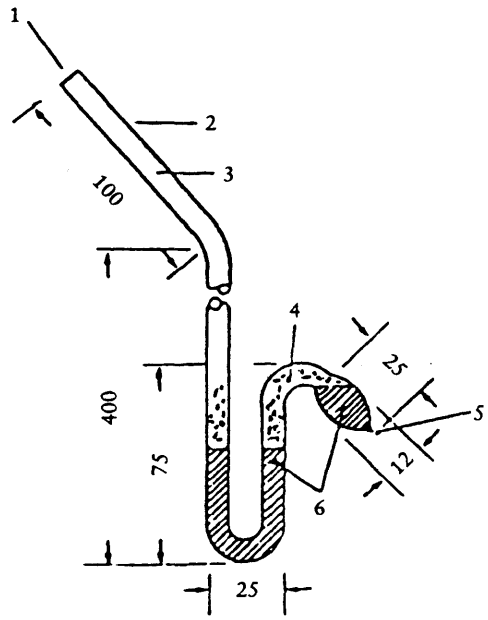


1 = Tryckmätare
2 = Vakuum
3 = Prov

Figur 3

Isoteniskop

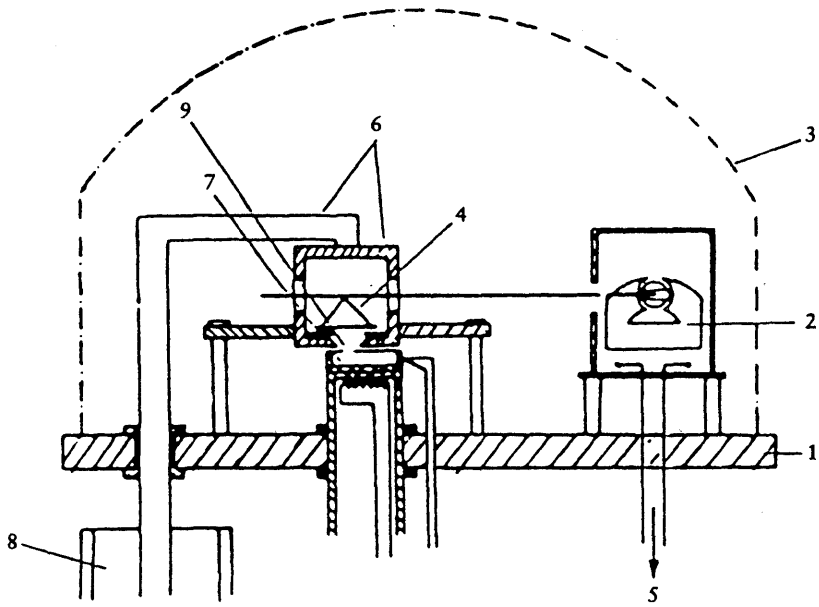
(se hänvisning 2).



1 = Tryckreglerings- och mätsystem
2 = Rör 8 mm ytterdiameter
3 = Torrt kväve i trycksystemet
4 = Ånga av provet
5 = Liten spets
6 = Flytande prov

Figur 4

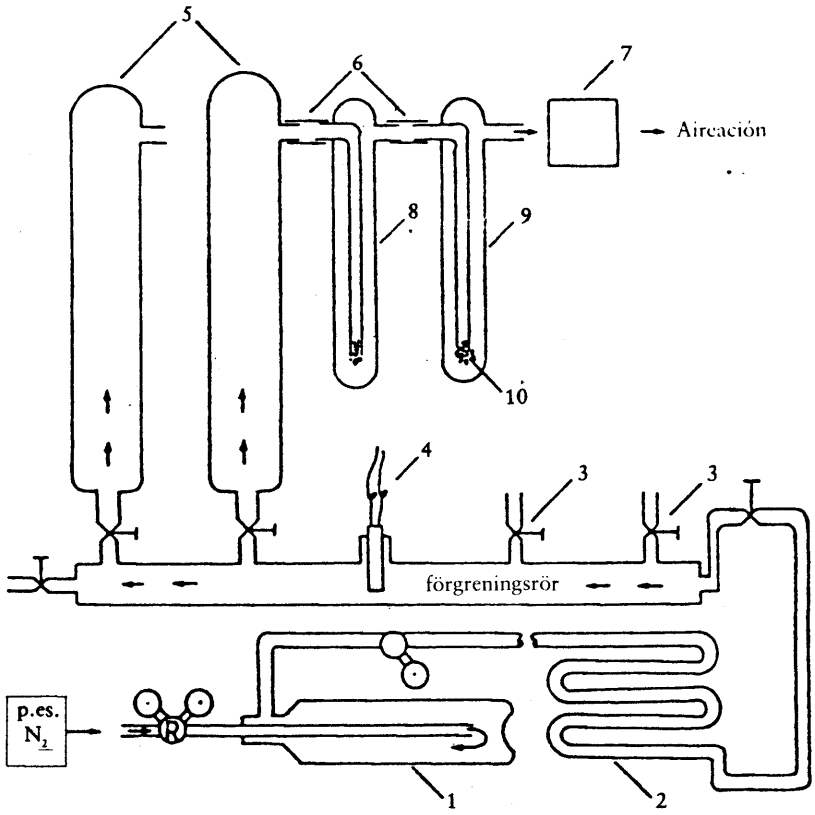
Apparat för bestämning av ångtryckskurvan enligt ångtrycksvågsmetoden



1 = Bottenplatta
2 = Vridspoleinstrument
3 = Gasklocka
4 = Balansvåg med vågskål
5 = Vakuummätare
6 = Kylbox och kylstång
7 = Avdunstningsugn
8 = Dewarflaska med flytande kväve
9 = Skärm

Figur 5

Exempel på ett flödessystem för bestämning av ångtryck genom gasmättnadsmetoden



1 = Flödesregulator
2 = Värmeväxlare
3 = Nålventiler
4 = Givare för relativ fuktighet
5 = Mättnadskolonner
6 = Teflon-förband
7 = Flödesmätare
8 = Fälla (absorber)
9 = Oljefälla
10 = Frittat bubbelrör

A. 5. YTSPÄNNING

1. METOD

De beskrivna metoderna är baserade på OECDs riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1 Inledning

De beskrivna metoderna skall användas för mätning av ytspänningen hos vattenlösningar.

Vid utförande av dessa test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets löslighet i vatten, dess struktur, hydrolysegenskaper och kritiska micellbildningskoncentration.

Följande metoder kan tillämpas på de flesta kemiska ämnen, utan någon begränsning beträffande renhetsgrad.

Mätningen av ytspänningen med ringtensiometermetoden är begränsad till vattenlösningar med en dynamisk viskøsitet på mindre än 200 m Pa S.

1.2 Definitioner och enheter

Den fria ytentalpin per ytareaenhet kallas ytspänning. Ytspänningen anges som:

N/m (SI-enhet) eller

mN/m (SI-underenhet).

1 N/m = 10^3 dyn/cm

1 mN/m = dyn/cm i det gamla CGS-systemet.

1.3 Referensämnen

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas till att från tid till annan kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

I hänvisningarna 1 och 2 anges referensämnen som täcker ett stort antal ytspänningar.

1.4 Testmetodsprinciper

Metoderna är baserade på mätning av den största vertikala kraft som behöver utövas på en bygel eller ring i kontakt med vätskeytan av ett prov som skall undersökas i ett mätkärl för att bryta denna kontakt, eller den vertikala kraft som behöver utövas på en platta vars ena kant har kontakt med vätskeytan, för att lösgöra film som har bildats.

1.5 Kvalitetskriterier

Dessa metoder kan ge större noggrannhet än vad som sannolikt kommer att krävas vid miljöbetingade undersökningar.

1.6 Metodbeskrivning

1.6.1 *Plattmetoden*

Se ISO-304 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2 *Bygelmetoden*

Se ISO 304 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3 *Ringmetoden*

Se ISO 304 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4 *OECD-harmoniserad ringmetod*

1.6.4.1 Apparat

Denna mätning kan göras med tensiometrar som är kommersiellt tillgängliga och består av följande delar:

— flyttbart provbord,

— kraftmätningssystem,

— mätkropp (ring),

— mätkärl.

1.6.4.1.1 Flyttbart provbord

Det flyttbara provbordet används som stöd till det temperaturreglerade kärl som innehåller den vätska som skall undersökas, och som tillsammans med kraftmätningssystemet är monterat på ett stativ.

1.6.4.1.2 Kraftmätningssystem

Kraftmätningssystemet (se figur 1) är placerat över provbordet. Osäkerheten vid kraftmätningen får inte vara större än $\pm 10^{-6}$ N, motsvarande en felmarginal på ± 0,1 mg vid mätning av en vikt. Oftast är mätskalan på kommersiellt tillgängliga tensiometrar kalibrerad i mN/m så att ytspänningen kan avläsas direkt i mN/m med en noggrannhet på 0,1 mN/m.

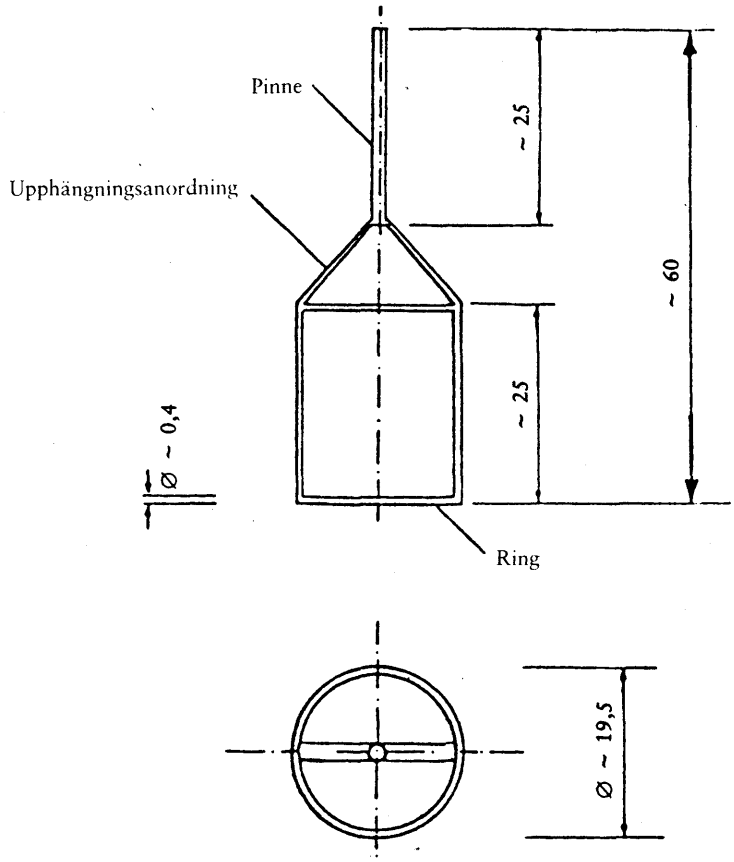
1.6.4.1.3 Mätkropp (ring)

Ringen är vanligtvis gjord av en tråd av platina-iridium, ungefär 0,4 mm tjock och med en medelomkrets på 60 mm. Trådringen är upphängd horisontellt på en pinne av metall och en upphängningsanordning av tråd, som utgör anslutningen till kraftmätningssystemet (se figur).

Figur

Mätkropp

(Alla mått är angivna i mm)



1.6.4.1.4. Mätkärl

Mätkärlet som innehåller provlösningen som skall mätas skall vara ett temperaturreglerat glaskärl. Det skall vara så utformat att temperaturen på provlösningen och gasfasen ovanför dess yta förblir konstant under mätningen så att provet inte kan avdunsta. Cylindriska glaskärl med en innerdiameter på minst 45 mm kan användas.

1.6.4.2. Iordningställande av apparaturen

1.6.4.2.1. Rengöring

Glaskärl skall rengöras noggrant. Vid behov skall de diskas med varm kromsvavelsyra och därefter med sirapsliknande fosforsyra (83—98 % per vikt H_3PO_4), sedan noggrant sköljas i kranvatten och slutligen diskas i omdestillerat vatten tills en neutral reaktion erhålls. Slutligen skall de torkas eller sköljas med en del av den provvätska som skall mätas.

Ringen skall först sköljas noggrant i vatten för att avlägsna eventuella vattenlösliga ämnen. Därefter skall den nedsänkas hastigt i kromsvavelsyra, tvättas i omdestillerat vatten tills en neutral reaktion erhålls och slutligen upphettas hastigt över en metanollåga.

Anmärkning:

Förorening med ämnen som inte löses eller förstörs av kromsvavelsyra eller fosforsyra, t.ex. silikoner, skall avlägsnas medelst lämpligt organiskt lösningsmedel.

1.6.4.2.2 Kalibrering av apparaten

Kalibreringen av apparaten består i att nollpunkten kontrolleras och justeras så att instrumentets indikering medger en tillförlitlig avläsning i mN/m.

Montering:

Apparaten skall planriktas, t.ex med användning av ett vattenpass på tensiometerns fot, varefter nivåskruvarna på foten justeras.

Nollpunktsjustering:

När ringen har monterats på apparaten men innan den nedsänks i vätskan, skall tensiometerindikeringen justeras till noll och ringen kontrolleras så att den är parallell med vätskeytan. För detta ändamål kan vätskeytan användas som spegel.

Kalibreringar:

Själva provkalibreringen kan göras medelst en av följande två metoder:

a) Användning av en vikt: förfarande med användning av ryttare av känd vikt, mellan 0,1 och 1,0 g, som placeras på ringen. Kalibreringsfaktorn Φ_a med vilken alla instrumentavläsningar skall multipliceras, skall bestämmas enligt följande ekvation 1:

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad \text{Ekvation 1}$$

där:

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

m = ryttarens vikt (g)

g = tyngdacceleration (981 cm . s^{-2} vid havsytan)

b = ringens medelomkrets (cm)

σ_a = tensiometeravläsningen efter placering av ryttaren på ringen (mN/m).

b) Användning av vatten: förfarande med användning av rent vatten vars ytspänning vid t.ex. 23°C är lika med 72,3 mN/m. Denna metod är snabbare än viktkalibreringen men risken finns alltid att vattnets ytspänning har ändrats genom förorening av ytaktiva substanser.

Kalibreringsfaktorn Φ_b, med vilken alla instrumentavläsningar skall multipliceras, skall bestämmas enligt följande ekvation 2:

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad \text{Ekvation 2}$$

där:

σ_o = i litteraturen angivet värde för vattens ytspänning (mN/m)

σ_g = mätt värde för vattnets ytspänning (mN/m)

båda vid samma temperatur.

1.6.4.3 Iordningställande av provet

Vattenlösningar skall framställas med erforderliga koncentrationer av de ämnen som skall undersökas. Vattenlösningarna får inte innehålla några olösta ämnen.

Lösningarna skall hållas vid en konstant temperatur (± 0,5°C). Eftersom en lösnings ytspänning i mätkärlet ändras över tiden skall flera mätningar göras vid olika tidpunkter och en kurva ritas över

ytspänning som en funktion av tiden. När ytspänningen inte längre ändras har ett jämviktstillstånd uppnåtts.

Damm och gasformig förorening av andra ämnen påverkar mätningen. Arbetet skall därför göras under skyddskåpa.

1.6.5 *Testbetingelser*

Mätningen skall göras vid ungefär 20°C och hållas inom ± 0,5°C.

1.6.6. *Testförfarande*

De lösningar som skall mätas skall påfyllas i det noggrant rengjorda kärlet varvid skumning skall undvikas. Mätkärlet placeras på apparatens provbord. Bordsytan med mätkärlet skall höjas tills ringen är helt nedsänkt i den lösning som skall mätas. Därefter skall bordsytan sänkas gradvis och jämt (med en hastighet av ungefär 0,5 cm/min) för att lösgöra ringen från ytan tills den största kraften har uppnåtts. Det vätskelager som vidhäftar ringen får ej avlägsnas från ringen. När mätningen är gjord skall ringen åter nedsänkas helt i lösningen och mätningen upprepas tills dess att ett konstant ytspänningsvärde erhålls. Den tid som går åt från överföring av lösningen till mätkärlet och tills mätningen görs skall antecknas för varje bestämning. Avläsningar skall göras vid den största kraft som behövs för att lösgöra ringen från vätskans yta.

2. DATA

För att beräkna ytspänningen skall det på apparaten i mN/m avlästa värdet först multipliceras med kalibreringsfaktor Φ_a eller Φ_b (beroende på vilken kalibreringsmetod som används). Detta ger endast ett ungefärligt värde som skall korrigeras.

Harkins och Jordan (3) har empiriskt bestämt korrektionsfaktorer för ytspänningsvärden som är bestämda med ringmetoden. Dessa faktorer är beroende av ringens mått, vätskans densitet och dess ytspänning.

Eftersom det är mödosamt att för varje enskild mätning bestämma korrektionsfaktorn utifrån Harkins och Jordans tabeller, kan man vid beräkning av ytspänningen hos vattenlösningar använda den förenklade metoden att avläsa de korrigerade ytspänningsvärdena direkt i tabellen. (Interpolation skall användas för avläsningar som ligger mellan tabellvärdena.)

TABELL: KORREKTION AV DEN MÄTTA YTSPÄNNINGEN

Endast för vattenlösningar, p ≈ 1 g/cm³

R = 9,55 mm (genomsnittlig ringradie)

r = 0,185 mm (ringtrådsradie)

Experimentellt värde (mN/m)	Korrigerat värde (mN/m)	
	Viktkalibrering (se 1.6.4.2.2. a)	Vattenkalibrering (se 1.6.4.2.2. b)
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,1	—
78	73,2	—

Denna tabell är sammanställd efter Harkins-Jordans korrektion och liknar den som finns i DIN-standarden (DIN 53914) för vatten och vattenlösningar (densitet p = 1 g/cm³) och är avsedd för en kommersiellt tillgänglig ring med måtten R = 9,55 mm (genomsnittlig ringradie) och r = 0,185 mm (ringtrådsradie). Tabellen ger korrigerade värden för ytspänning som mätts efter kalibrering med vikt eller vatten.

Alternativt kan ytspänningen utan föregående kalibrering beräknas enligt följande formel:

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

där:

F = kraften mätt på dynamometern när filmen bryts

R = ringens radie

f = korrektionsfaktorn (1)

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använd metod: ISO eller OECD-harmoniserad ringtensiometermetod.

— Använd typ av vatten eller lösning.

— Exakt specificering av ämnet (identifiering och orenheter).

— Mätresultat: ytspänning (avläsning) med uppgift om både enskilda avläsningar och deras aritmetiska medelvärde och det korrigerade medelvärdet (med hänsyn tagen till apparatfaktorn och korrektionstabellen).

— Lösningens koncentration.

— Testtemperatur.

— Den använda lösningens ålder, särskilt tidsåtgången mellan framställning och mätning av lösningen.

— Beskrivning av ytspänningens tidsberoende efter överföring av lösningen till mätkärlet.

— Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras, i synnerhet med avseende på orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 115*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) *Pure and applied chemistry*, vol. 48, 1976, s. 511.

3) Harkins, W.D., Jordan, H. F., *J. Amer. Chem. Soc.*, vol. 52, 1939, s. 1751.

A. 6. VATTENLÖSLIGHET

1. METOD

De beskrivna metoderna är baserade på OECDs riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1. Inledning

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets strukturformel, ångtryck, dissociationskonstant och hydrolys (som en funktion av pH-värdet).

Det finns inte någon enskild metod som kan användas över hela vattenlöslighetsområdet.

Metoden kan inte tillämpas på flyktiga ämnen.

De två testmetoderna som beskrivs nedan täcker hela löslighetsområdet:

— Den ena metoden, som tillämpas på väsentligen rena ämnen med låg löslighet ($>10^{-2}$ gram per liter) som är stabila i vatten, kallas "kolonnelueringsmetoden".

— Den andra metoden, som tillämpas på väsentligen rena ämnen med högre löslighet ($<10^{-2}$ gram per liter) som är stabila i vatten, kallas "kolvmetoden".

Det undersökta ämnets vattenlöslighet kan i hög grad påverkas av närvaron av orenheter.

1.2. Definition och enheter

Ett ämnes löslighet i vatten anges av mättnadskoncentrationen av ämnet i vatten vid en viss temperatur. Lösligheten i vatten anges i viktenhet per volym lösning. SI-enheten är kg/m^3 (gram per liter kan också användas).

1.3. Referensämnen

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas till att från tid till annan kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

1.4. Testmetodsprincip

Den ungefärliga mängd som behövs av provet och tiden som krävs för att uppnå mättnadskoncentrationen skall bestämmas i ett enkelt förberedande test.

1.4.1 *Kolonnelueringsmetoden*

Denna metod är baserad på eluering av provämnet med vatten från en mikrokolonn, som är fylld med ett inert bärarmaterial, t.ex. glaspärlor, kiselgel eller sand och ett överskott av provämnet. Vattenlösligheten bestäms när eluatets viktkoncentration är konstant. Detta visas genom en koncentrationsplatå som en funktion av tiden.

1.4.2 *Kolvmetoden*

Med denna metod löses ämnet (fasta ämnen skall vara pulvriserade) i vatten vid en temperatur något över testtemperaturen. När mättnad har uppnåtts avkyls blandningen och hålls under omrörning vid testtemperaturen så länge som krävs för att uppnå jämvikt (se hänvisning 2). Därefter bestäms ämnets viktkoncentration i vattenlösningen, som inte får innehålla olösta partiklar, med lämplig analysmetod.

1.5. **Kvalitetskriterier**

1.5.1. *Repeterbarhet*

För kolonnelueringsmetoden kan 30 % uppnås, och för kolvmetoden 15 %.

1.5.2. *Sensitivitet*

Sensitiviteten är beroende på analysmetoden, men bestämningar av viktkoncentrationer ned till minst 10^{-6} gram per liter kan göras.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Testbetingelser*

Testet skall helst utföras vid 20 ± 0,5°C. Om lösligheten misstänks vara temperaturberoende (< 3 % per°C), skall test göras även vid två andra temperaturer, som ligger minst 10°C över respektive under den först valda temperaturen. I detta fall skall temperaturen regleras till ± 0,1°C. Den valda temperaturen skall hållas konstant i alla relevanta delar av utrustningen.

1.6.2. *Förberedande test*

Till cirka 0,1 g av provet (fasta ämnen skall vara pulvriserade) i ett 10 ml graderat mätglas med glaspropp tillsätts stegvis ökade mängder destillerat vatten vid rumstemperatur enligt tabellen nedan:

0,1 g lösligt i "x" ml vatten	0,1	0,5	1	2	10	100	>100
Ungefärlig löslighet (gram per liter)	>1000	1000—2000	200—100	100—50	50—10	10—1	< 1

Efter varje tillsättning av angiven mängd vatten skakas blandningen kraftigt i 10 minuter och kontrolleras visuellt så att det inte finns några olösta delar av provet. Om provet eller delar av det efter tillsättning av 10 ml vatten fortfarande inte är löst, skall innehållet i mätglaset överföras till ett 100 ml mätglas, som därefter fylls med vatten upp till 100 ml och omskakas. Vid lägre löslighet kan det ta avsevärt längre tid att lösa upp ett ämne (24 timmar bör medges). I tabellen är den ungefärliga lösligheten angiven under den volym av tillsatt vatten i vilken fullständig lösning av provet inträffar. Om ämnet fortfarande inte verkar vara löst skall ytterligare utspädning göras för att säkerställa att kolonneluerings- eller kolvmetoden kan användas.

1.6.3 *Kolonnelueringsmetoden*

1.6.3.1 Bärarmaterial, lösningsmedel och elueringsmedel

Till kolonnelueringsmetoden skall ett inert bärarmaterial användas, t.ex. glaspärlor eller kiseldioxid. Ett lämpligt flyktigt lösningsmedel av analytisk reagenskvalitet skall användas till att överföra provämnet till bärarmaterialet. Som eluerings- eller lösningsmedel skall användas omdestillerat vatten från glas- eller kvartsapparaten.

Anmärkning:

Vatten direkt från en organisk jonbytare får ej användas.

1.6.3.2 Laddning av bärarmaterial

Ungefär 600 mg bärarmaterial vägs upp och överförs till en 500 ml rundbottnad kolv.

En lämplig, beräknad mängd av provämnet löses i det valda lösningsmedlet. En lämplig mängd av provlösningen tillsätts till bärarmaterialet. Lösningsmedlet skall avdunstas fullständigt i t.ex. en rotationsindunstare; i annat fall uppnås inte vattenmättnad av bäraren till följd av fördelningseffekter på bärarmaterialets yta.

Laddningen av bärarmaterial kan orsaka problem (felaktiga resultat) om provämnet avsätts som en olja eller i en annan kristallfas. Problemet skall undersökas experimentellt.

Låt det laddade bärarmaterialet ligga i blöt i ungefär två timmar i cirka 5 ml vatten, och tillsätt därefter suspensionen till mikrokolonnen. Alternativt kan det torra laddade bärarmaterialet tillsättas mikrokolonnen, som har fyllts med vatten, och därefter får det vila i ungefär två timmar tills jämvikt har uppnåtts.

Testförfarande

Elueringen av ämnet från bärarmaterialet kan utföras på ett av två olika sätt:

— cirkulationspump (se figur 1)

— nivåkärl (se figur 4).

1.6.3.3 Kolonnelueringsmetoden med cirkulationspump

Apparatur

En schematisk uppställning av ett typiskt system återfinns i figur 1. En lämplig mikrokolonn visas i figur 2, även om valfri storlek kan användas, förutsatt att den uppfyller kriterierna för reproducerbarhet och sensitivitet. Kolonnen skall ha ett tomt utrymme på minst fem bäddvolymer vatten plus minst fem prover. Alternativt kan storleken minskas om mer lösningsmedel tillsätts som ersättning för de första fem bäddvolymerna, som avlägsnas med orenheter.

Kolonnen skall anslutas till en cirkulationspump med kapacitet att styra flöden på cirka 25 ml/timme. Pumpen ansluts med kopplingar av polytetrafluoreten och/eller glas. När kolonnen och pumpen ihopkopplats skall det vara möjligt att ta prover av eluatet och att hålla det tomma utrymmet i jämvikt vid atmosfäriskt tryck. Kolonnmaterialet stöds med en liten (5 mm) glasullspropp, som även fyller funktionen att filtrera ut partiklar. Cirkulationspumpen kan vara t.ex. en peristaltisk pump (noggrannhet skall iakttas så att slangmaterialet inte utsätts för förorening och/eller adsorption) eller en membranpump.

Mätförfarande

Flödet genom kolonnen startas. Flödeshastigheten bör vara ungefär 25 ml/timme (cirka 10 bäddvolymer/timme för den beskrivna kolonnen). De första fem bäddvolymerna (minimum) kasseras för att avlägsna vattenlösliga orenheter. Därefter körs cirkulationspumpen tills jämvikt har uppnåtts, dvs. när fem på varandra följande prover ger koncentrationer som slumpmässigt inte avviker mer än ± 30 %. Dessa prov skall vara åtskilda från varandra med tidsintervaller som motsvarar genomloppet av minst 10 bäddvolymer elueringsmedel.

1.6.3.4 Kolonnelueringsmetod med nivåkärl

Apparat (se figur 4 och 3)

Nivåkärl: Anslutningen till nivåkärlet görs med användning av ett slipat glasövergångsstycke som kopplas med en PTFE-slang. Flödeshastigheten bör vara ungefär 25 ml/timme. Successiva fraktioner av eluatet skall samlas och analyseras enligt den valda metoden.

Mätförfarande

Fraktioner från det mittersta elueringsområdet, där koncentrationerna är konstanta (± 30 %) vid minst fem på varandra följande fraktioner, används för bestämning av lösligheten i vatten.

En andra körning görs med hälften så hög flödeshastighet som vid det första försöket. Om resultaten av de två körningarna överensstämmer är testet tillfredsställande. Om lösligheten är större vid testet med lägre flödeshastighet, skall man fortsätta att halvera flödeshastigheten tills två på varandra följande test ger samma löslighet.

I båda fallen (varvid cirkulationspump eller nivåkärl används) skall fraktionernas innehåll av kollodialt material kontrolleras genom test för Tyndall-effekten (ljusspridning). Förekomst av sådana partiklar innebär att resultaten är ogiltiga och testet skall upprepas med förbättringar av kolonnens filtreringsfunktion. Varje provs pH-värde skall registreras. En andra körning skall göras vid samma temperatur.

1.6.4 *Kolvmetoden*

1.6.4.1 Apparatur

Till kolvmetoden behövs följande material:

— vanliga laboratorieglas och -instrument,

— lämplig anordning för omskakning av lösningar under reglerade konstanta temperaturer,

— en centrifug (helst termostatreglerad), om detta behövs för emulsioner, och

— utrustning för analytisk bestämning.

1.6.4.2 Mätförfarande

Mängden material som behövs för att mätta önskad volym vatten beräknas utifrån det förberedande testet. Volymen vatten som behövs är beroende av analysmetoden och löslighetsområdet. Ungefär fem gånger den materialmängd som bestämts enligt ovan beräknas för var och en av tre glasbehållare med glasproppar (t.ex. centrifugglas, kolvar). Den valda volymen vatten tillsätts i varje kärl, och kärlen tillsluts helt. De tillslutna kärlen omskakas därefter vid 30°C. (En skaknings- eller omrörningsanordning som kan fungera vid konstant temperatur skall användas, t.ex. magnetomrörning i ett termostatreglerat bad). Efter en dag tas det ena kärlet bort och får stå i 24 timmar vid testtemperaturen och skall omskakas då och då för att återuppnå jämvikt. Därefter centrifugeras innehållet i kärlet vid rumstemperatur och föreningens koncentration i den klara vattenfasen bestäms enligt lämplig analysmetod. De två andra kolvarna skall, efter att i två respektive tre dagar ha uppnått en första jämvikt vid 30°C, behandlas likadant. Om koncentrationsresultaten från minst två av kärlen överensstämmer med den erforderliga reproducerbarheten, är testet tillfredsställande. Om resultaten från kärl 1, 2 och 3 visar en tendens att ge stigande värden, skall hela testet upprepas med användning av längre tider för uppnående av jämvikt.

Varje provs pH-värde skall registreras.

1.6.5 *Analys*

Helst skall en ämnesspecifik analysmetod användas till dessa bestämningar, eftersom små mängder av lösliga orenheter kan orsaka stora fel i den uppmätta lösligheten. Exempel på sådana metoder är: gas- eller vätskekromatografi, titreringsmetod, fotometrisk metod, voltametrisk metod.

2. DATA

2.1 **Kolonnelueringsmetoden**

Medelvärdet och standardavvikelsen skall beräknas för minst fem på varandra följande prov, tagna vid mättnadsplatån.

2.2 **Kolvmetoden**

De enskilda resultaten för var och en av tre kolvar skall anges, och för de resultat som bedöms vara konstanta (repeterbarhet mindre än 15 %) skall medelvärdet beräknas och anges i viktenheter per volym lösning. Om lösligheten är mycket hög (<100 gram per liter) kan det bli nödvändigt att använda densiteten till att omvandla viktenheter till volymenheter.

3. RAPPORTERING

3.1 **Kolonnelueringsmetoden**

Rapporten skall om möjligt innehålla uppgifter om resultaten av det förberedande testet plus följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (identifiering och orenheter).

— Varje provs koncentrationer, flödeshastigheter och pH-värde.

— Medelvärde och standardavvikelse för minst fem prov från varje körnings mättnadsplatå.

— Genomsnittet för de två successiva, acceptabla körningarna.

— Vattnets temperatur under mättnadsprocessen.

— Använd analysmetod.

— Arten av det använda bärarmaterialet.

— Laddning av bärarmaterialet.

— Använt lösningsmedel.

— Belägg för eventuell kemisk instabilitet hos ämnena vid testet och den använda metoden.

— Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

3.2 **Kolvmetoden**

Rapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (identifiering och orenheter).

— Enskilda analytiska bestämningar och, om fler än ett värde bestämdes, genomsnittet för varje kolv.

— Varje provs pH-värde.

— Genomsnittet av värdet för de olika kolvar som överensstämde.

— Testtemperaturen.

— Använd analysmetod.

— Belägg för eventuell kemisk instabilitet hos ämnena vid testet och den använda metoden.

— Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

4. HÄNVISNINGAR

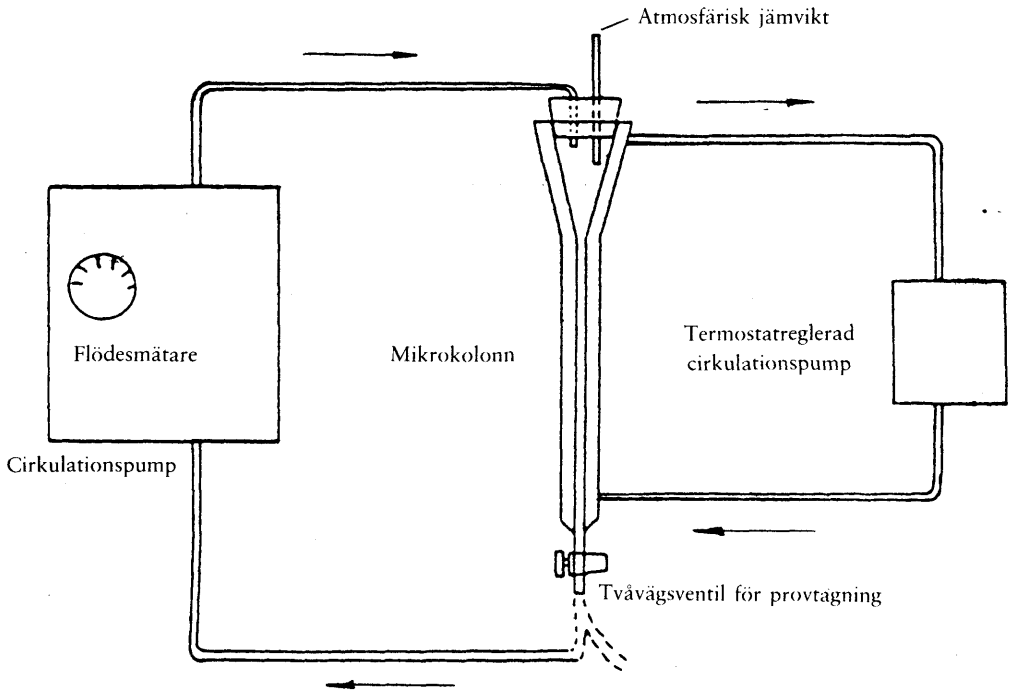
1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 105*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 116*, Decision of the Council C(81) 30 final.

Tillägg

Figur 1

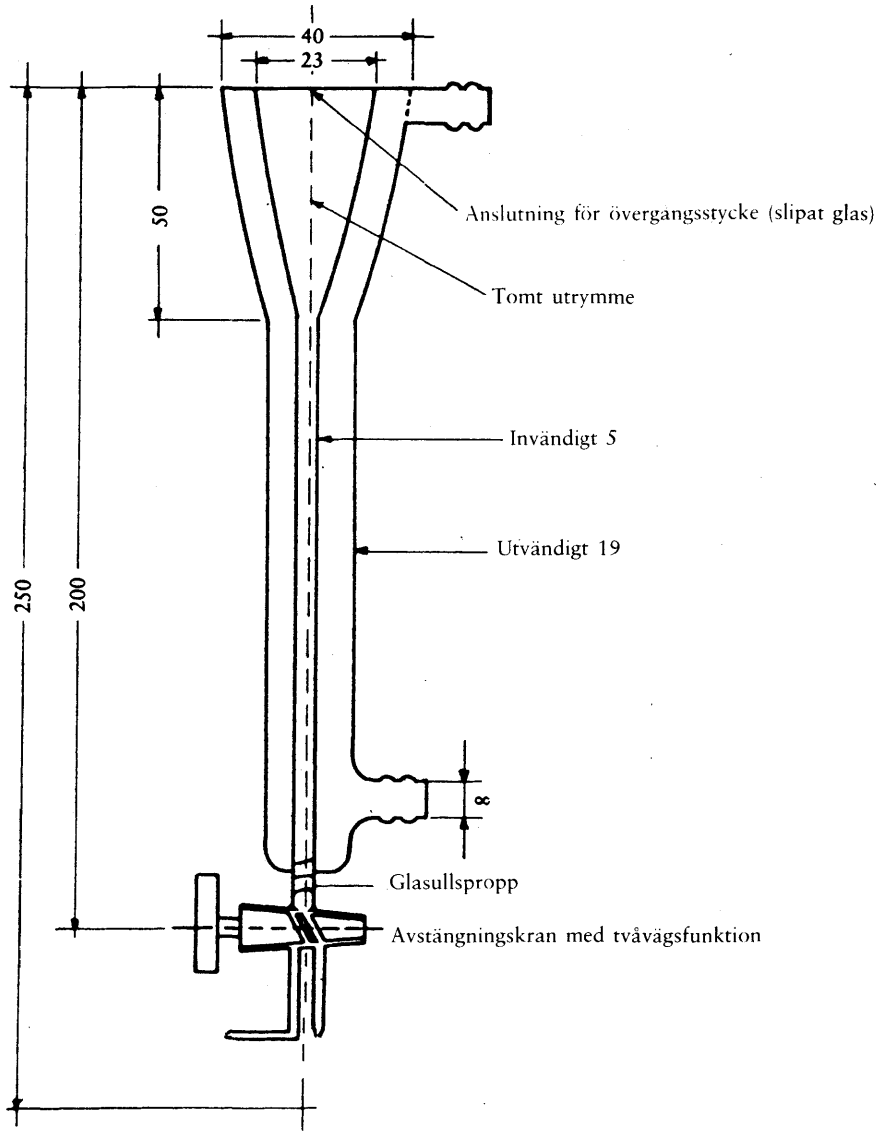
Schematisk försöksapparatur



Figur 2

En typisk mikrokolonn

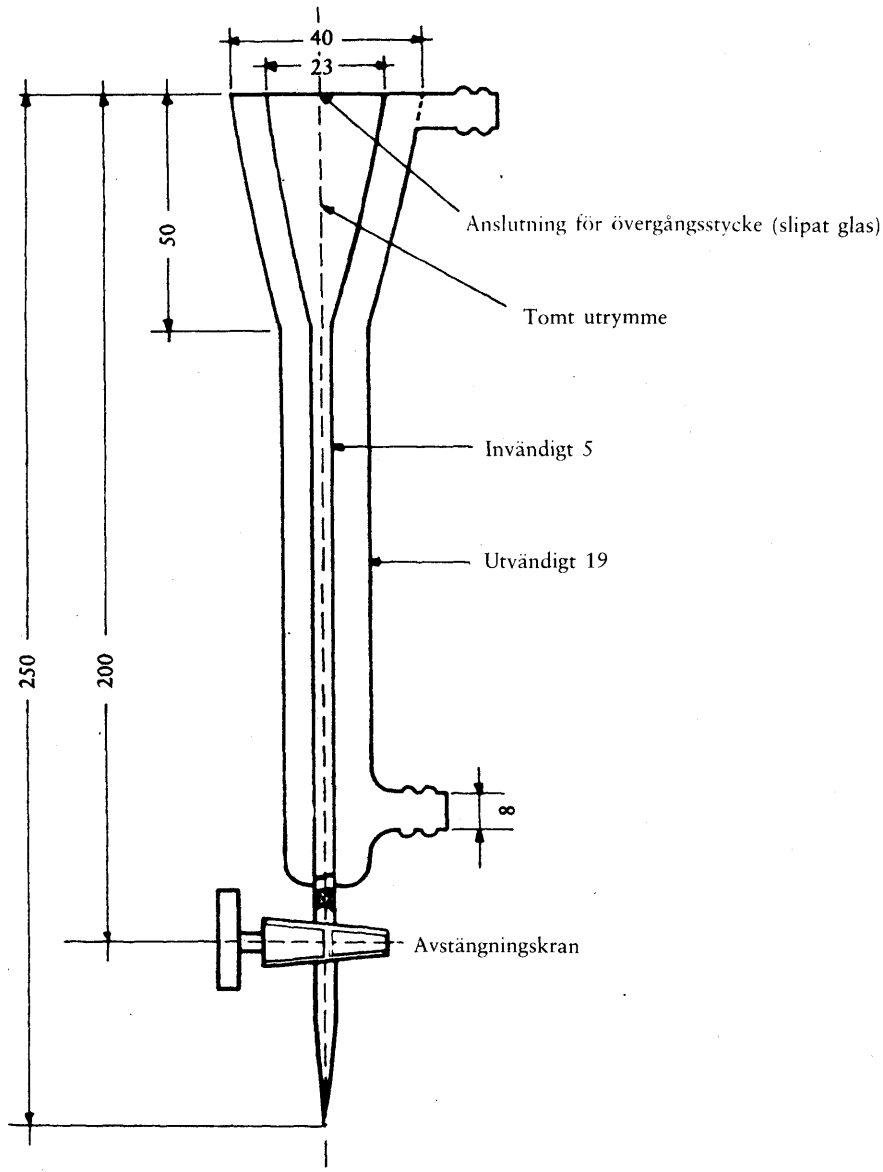
(Alla mått i mm)



Figur 3

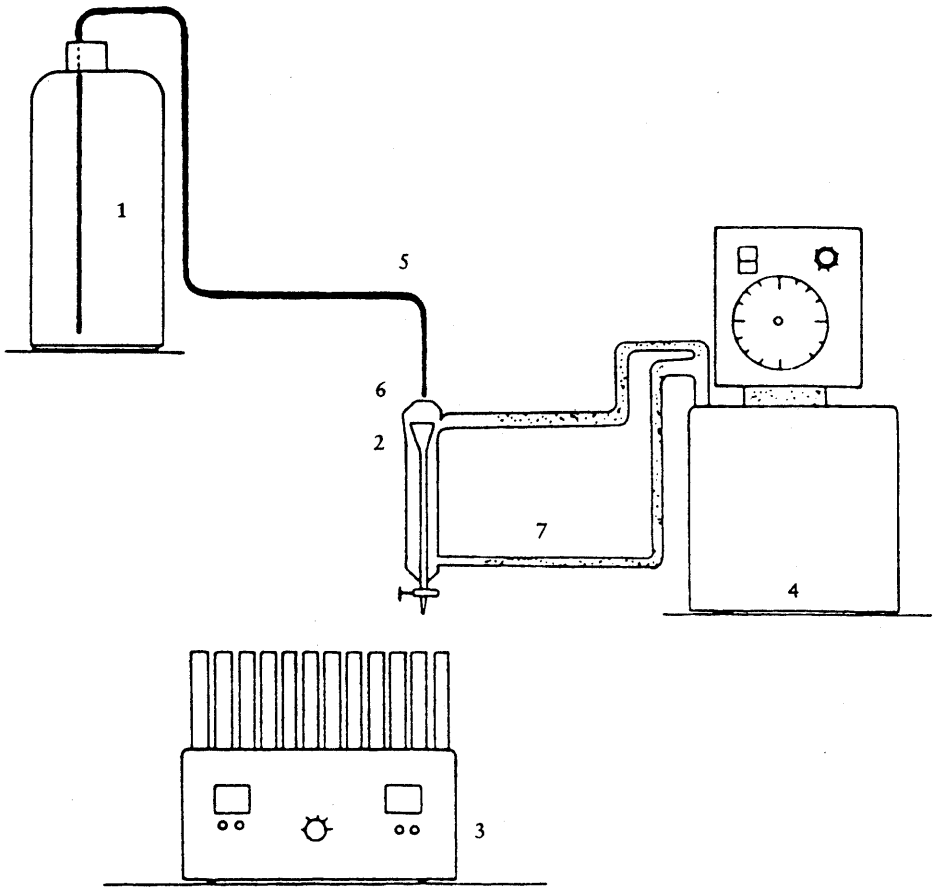
En typisk mikrokolonn

(Alla mått i mm)



Figur 4

Försöksapparatur för bestämning av löslighet i vatten av svårlösliga, svagt flyktiga ämnen



1 = Nivåkärl (t.ex. 2,5 l kemisk kolv)
2 = Kolonn (se figur 3)
3 = Fraktionssamlare
4 = Termostat
5 = Teflonslang
6 = Slipad glaspropp
7 = Vattenslang (mellan termostat och kolonn, innerdiameter: ca 8 mm)

A. 7 FETTLÖSLIGHET

1. METOD

Den beskrivna metoden är baserad på OECDs riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1. Inledning

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets delningskoefficient, vattenlöslighet, strukturformel och stabilitet vid 50°C. Metoden tillämpas endast på ämnen som är väsentligen rena, som är stabila vi 50°C och som inte är nämnvärt flyktiga under samma betingelser.

Metoden lämpar sig inte för ämnen som reagerar med triglycerider.

1.2. Definitioner och enheter

Den viktfraktion av ett ämne som bildar en homogen fas med ett flytande fett (olja) utan att ge upphov till kemiska reaktioner, definieras som fettlösligheten. Maximum av en sådan viktfraktion kallas mättad viktfraktion och är en funktion av temperaturen.

Ett ämnes mättade viktfraktion skall anges i milligram per 100 gr standardfett vid 37°C ± 0,5°C.

Följande förhållande föreligger mellan lösligheten i gram per 100 g lösning (S') och lösligheten i gram per 100 g lösningsmedel (S):

$$S = \frac{100 \times S'}{100 - S'} \text{ gram per 100 g standardfett}$$

Multiplikation av S-värdet med 1 000 ger milligram per 100 g standardfett.

1.3 Referensämnen

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas till att från tid till annan kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

1.4 Testmetodsprinciper

Ämnet tillsätts till ett flytande "standardfett" och omröres. Tillräcklig mängd av ämnet skall tillsättas för att säkerställa ett överskott. Den lösta mängden testämne skall bestämmas enligt en lämplig analysmetod.

1.5 Kvalitetskriterier

1.5.1 *Specificitet*

Repeterbarheten av mätningen är för närvarande okänd.

Resultat skall gälla standardfetter och är av betydelse för relativt rena ämnen. Redan vid 37°C kan fetter bilda emulsioner eller fina suspensioner med fasta ämnen. Eftersom dessa inverkar på efterföljande bestämning av viktfraktionen, skall bildandet av dessa undvikas.

1.6 **Metodbeskrivning**

1.6.1 *Förberedelse*

1.6.1.1 Apparatur

Följande utrustning krävs:

— vanliga laboratorieglas

— våg

— centrifug med termostat

— en omrörare som kan användas i kombination med ett system för temperaturreglering

— termostat

1.6.1.2 Standardfetter

Det är nödvändigt att standardfetter används. Dessa standardfetter skall vara lätta att definiera och ett exempel på ett sådant standardfett återfinns i tillägget.

1.6.1.3 Förberedande test

Ett förenklat förberedande test skall göras för att bestämma den ungefärliga mängd av ämnet som behövs för att uppnå den mättade viktfraktionen vid testtemperaturen (37°C).

Anmärkning:

När det gäller fasta ämnen kan den hastighet med vilken mättnadsjämvikten uppnås, vara mycket beroende av partikelstorleken. Av detta skäl skall sådana material vara pulvriserade.

1.6.1.4 Förberedande av ämnet

Beräkna åtta prov i 50 ml kolvar. Normalt bör varje prov bestå av dubbla mängden som behövs för mättnad enligt den bestämning som har gjorts i det förberedande provet.

När beräknad mängd, ungefär 25 g, flytande och blandat standardfett har tillsatts i de med omrörare utrustade kolvarna, tillsluts dessa tätt med slipade glasproppar. Hälften (grupp I) omröres vid 30°C och den andra hälften (grupp II) vid ungefär 50°C, båda grupperna i minst en timme.

1.6.2 *Testbetingelser*

Bestämningen av fettlösligheten utförs vid 37°C ± 0,5°C.

1.6.3 *Mätförfarande*

Rör om innehållet i kolvarna i båda grupperna vid 37°C ± 0,5°C tills det är ordentligt blandat.

Hur lång omrörningstid som krävs kan inte förutses generellt. När det gäller flytande ämnen kan mättnad uppnås på några minuter; för fasta ämnen kan det ta timmar. Vanligtvis behövs inte mer än tre timmars omrörning. Därefter avbryts omrörningen för två av kolvarna i båda grupperna. Dessa två kolvar skall stå i minst en timme vid 37°C för att den olösta mängden av ämnet skall separeras och för att en homogen fas skall kunna bildas. Emulsions- eller suspensionsbildning (Tyndall-effekt) skall förhindras med lämplig metod, t.ex. termostatreglerad centrifugering.

Innehållet i den tredje och fjärde kolven i båda grupperna skall röras om i minst 24 timmar innan kolvarna får stå i en timme vid 37°C ± 0,5°C.

Anmärkning:

Om inget bottensediment (för fasta ämnen) har bildats eller ingen fasseparation (för flytande ämnen) har inträffat efter denna tidsperiod, skall testet upprepas med en större mängd av ämnet.

1.6.4 *Analys*

Till analysen tas ett prov från varje mättad fettfas. Detta prov vägs och viktfraktionen bestäms.

Lämplig analysmetod kan användas antingen direkt eller efter extraktion med vatten eller ett organiskt lösningsmedel eller annan separationsteknik.

Exempel på sådana metoder:

— spektrofotometri,

— gas- eller vätskekromatografi,

— voltametri.

2. DATA

Om signifikanta skillnader i resultaten föreligger, antingen till följd av under- eller övermättnad, eller korta och långa tidsperioder, skall testet upprepas med längre omrörningstider.

3. RAPPORTERING

Rapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (identifiering och orenheter).

— Exakt specificering av fettet (t.ex. beskrivning, egenskaper, ursprung, sammansättning).

— Analysmetod, avvikelser och särskilda företeelser.

Resultaten skall utvärderas enligt ovanstående beskrivning och utgör del av testrapporten. Om inga signifikanta skillnader förelåg mellan de olika värden som iakttagits i milligram per 100 gr, skall de enskilda resultaten, medelvärdet och standardavvikelsen rapporteras. Om det föreligger signifikanta skillnader, även efter förnyat test, skall endast de enskilda resultaten rapporteras.

Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras.

4. HÄNVISNINGAR

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

Tillägg

EXEMPEL FÖR STANDARDFETTER

I följande tabell visas sammansättningen av typiska standardfetter.

Fettsyrefördelning

Antal C-atomer i fettsyredelen	6	8	10	12	14	16	18	annat
GLC-ytor (%)	0,5	7,5	10,3	50,4	13,9	7,6	8,6	1

Glyceridfördelning

Totalt antal C-atomer i fettsyredelen	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
GLC-ytor (%)	0,1	0,3	1,0	2,3	4,9	10,9	13,9	21,1	16,1	11,7	9,8	4,4	2,2	1,1	0,2

Renhet

Monoglyceridinnehåll (enzymatiskt)	≤ 0,1 %
Diglyceridinnehåll (enzymatiskt)	≤ 0,4 %
Ej förtvålningsbart innehåll	≤ 0,1 %
Wijs tal	≤ 0,5 %
Syretal	0,02 %
Vatteninnehåll (K. Fischer)	≤ 0,1 %
Klar smältpunkt	28,5 °C

Typiskt absorptionsspektrum (lagertjocklek d = 1 cm, jämförelse: vatten, 35°C)

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

Minst 10 % ljusöverföring vid 303 nm.

Detta fettliknande ämne är en syntetisk blandning av mättade triglycerider med en fettsyre- och triglyceridfördelning som liknar den hos kokosnötfett.

A. 8. DELNINGSKOEFFICIENT

1. METOD

De beskrivna metoderna är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1. Inledning

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets delningskoefficient, vattenlöslighet och ytspänning.

Metoden tillämpas endast på väsentligen rena ämnen som är lösliga i vatten och n-oktansyra. Den kan inte användas till ytaktiva material.

1.2. Definitioner och enheter

Delningskoefficienten (P) definieras som förhållandet mellan jämviktskoncentrationerna (c_i) för ett ämne som lösts i ett tvåfassystem bestående av två i stort sett icke blandbara lösningsmedel. För n-oktansyra och vatten är

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{n-oktansyra}}}{C_{\text{vatten}}}$$

Delningskoefficienten (P) är således kvoten av två koncentrationer och uttrycks vanligtvis i form av dess logaritm för basen 10 (log P).

1.3. Referensämnen

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas till att från tid till annan kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

1.4. Testmetodsprinciper

För att kunna bestämma delningskoefficienten skall jämvikt ha uppnåtts mellan alla samverkande komponenter i systemet, och koncentrationerna av de ämnen som lösts i de två faserna skall bestämmas. Om man studerar litteraturen i detta ämne framgår det att det finns ett flertal olika tekniker som kan användas till att lösa detta problem, det vill säga en noggrann blandning av de två faserna som sedan skall separeras för bestämningen av jämviktskoncentrationen för testämnet.

1.5. Kvalitetskriterier

1.5.1. *Repeterbarhet*

För att säkerställa en exakt delningskoefficient skall dubbla bestämningar göras under tre olika testbetingelser, varvid såväl mängden av det angivna ämnet samt förhållandet mellan lösningsmedlens volymer kan varieras. Bestämningen av delningskoefficientens värden uttryckta som deras allmänna logaritmer skall ligga inom ± 0,3 logaritmenheter.

1.5.2. *Sensitivitet*

Metodens mätområde bestäms av analysförfarandets detektionsgräns, som bör vara tillräcklig för att medge bestämning av värden för P_{ow} upp till 10^5 när koncentrationen av det lösta ämnet i endera fasen inte är större än 0,01 mol per liter.

1.5.3. *Specificitet*

Nernsts delningslag gäller endast vid konstant temperatur, tryck och pH-värde för utspädda lösningar. Den kan endast tillämpas på ett rent ämne som fördelats mellan två rena lösningsmedel. Om flera olika lösta ämnen förekommer i den ena eller i båda faserna samtidigt, kan detta påverka resultaten.

Dissociation eller association av de lösta molekylerna resulterar i avvikelser från Nernsts fördelningslag. Sådana avvikelser framgår av det faktum att fördelningskoefficienten blir beroende av lösningens koncentration.

På grund av de många inblandade jämvikterna skall denna metod inte tillämpas på joniserbara föreningar med mindre att korrigering görs. (För sådana föreningar bör övervägas om inte buffertlösningar skall användas i stället för vatten.)

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Preliminär uppskattning av delningskoefficienten*

Delningskoefficientens värde kan uppskattas antingen genom en enkel beräkning (2) eller genom användning av testämnenas lösligheter i de rena lösningsmedlen (1):

Härvid erhålls:

$$P_{\text{uppskattat}} = \frac{\text{mättnad } C_{\text{n-oktansyra}}}{\text{mättnad } C_{\text{vatten}}}$$

Alternativt kan en grov bestämning av delningskoefficienten göras genom ett förenklat förberedande test.

1.6.2. *Förberedelser*

n-oktansyra: Delningskoefficienten skall bestämmas med användning av reagenser med mycket hög analytisk renhetsgrad.

Vatten: Destillerat eller omdestillerat vatten från glas- eller kvartsappara

1.6.2.3. Testämne

För att vidmakthålla en viktbalans under testet framställs en stamlösning i n-oktansyra med en viktkoncentration mellan 1 och 100 mg/ml. Innan stamlösningen används för bestämning av delningskoefficienten skall dess faktiska viktkoncentration bestämmas exakt. Denna lösning skall förvaras under stabila betingelser.

1.6.3. *Testbetingelser*

Testtemperaturen skall hållas konstant (± 1°C) och ligga i området 20—25°C.

1.6.4. *Mätförfarande*

1.6.4.1. Uppnående av fördelningsjämvikt

Två testkärl innehållande erforderliga, exakt mätta mängder av de två lösningsmedlen och den erforderliga mängden stamlösning, skall förberedas för varje testbetingelse.

Delarna n-oktansyra skall mätas per volym. Testkärlen skall antingen placeras i en lämplig skakapparat eller skakas för hand. En rekommenderad metod är att snabbt vrida centrifugglaset 180° kring dess tväraxel så att all instängd luft stiger upp genom de två faserna.

1.6.4.2. Fasseparation

För att separera faserna skall blandningen centrifugeras. Detta skall göras i en laboratoriecentrifug som hålls vid rumstemperatur, eller, om icke temperaturreglerad centrifug används, skall centrifugglasen minst en timme före analysen bringas i jämvikt med testtemperaturen.

1.6.5. *Analys*

För bestämningen av delningskoefficienten är det nödvändigt att bestämma koncentrationerna av testämnet i båda faserna. Detta kan man göra genom att för varje testbetingelse ta en alikvot av vardera fasen från varje glas och analysera dessa enligt det valda förfarandet. Den totala mängden ämne som finns i båda faserna skall beräknas och jämföras med den mängd ämne som ursprungligen tillsattes.

Från vattenfasen skall provtagning ske på så sätt att man minimerar risken att ta med spår av n-oktansyra: en glasspruta med avtagbar kanyl kan användas till att ta prov från vattenfasen. Sprutan skall först fyllas delvis med luft. Luften skall försiktigt pressas ut medan kanylen förs genom n-oktansyrafasen. En lämplig volym av vattenfasen dras upp i sprutan. Sprutan dras snabbt bort från lösningen och kanylen avlägsnas. Innehållet i sprutan kan sedan användas som vattenprovet. Koncentrationen i de två separerade faserna skall helst bestämmas med en ämnesspecifik metod. Exempel på fysisk-kemiska bestämningar som kan vara lämpliga är:

— fotometriska metoder

— gaskromatografi

— högtrycksvätskekromatografi.

2. **DATA**

Om det mätta P_{ow} är större än 10^4 rekommenderas att resultaten jämförs med ett beräknat P_{ow}-värde, som t.ex. erhållits genom den metod som anges i hänvisning 3.

Tillförlitligheten av de bestämda P-värdena kan prövas genom en jämförelse mellan medelvärdena för de dubbla bestämningarna och det totala medelvärdet.

3. RAPPORTERING

Rapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (identifiering och orenheter).

— Temperatur vid bestämningen.

— Data om de analysförfaranden som används vid bestämning av koncentrationerna.

— De mätta koncentrationerna i båda faserna för varje bestämning. (Detta innebär att totalt 12 koncentrationer skall anges.)

— Vikten på testämnet, volymen av varje fas som har använts i varje testkärl och den totala beräknade mängden testämne som finns i varje fas efter uppnående av jämvikt.

— De beräknade värdena för delningskoefficienten (P) och medelvärdet skall rapporteras för varje uppsättning testbetingelser, liksom medelvärdet för alla bestämningar. Om det finns tecken på att delningskoefficienten är koncentrationsberoende, skall detta anges i rapporten.

— Standardavvikelsen för enskilda P-värden runt deras medelvärde bör rapporteras.

— Medelvärdet för P för alla bestämningar skall också uttryckas som dess logaritm (bas 10).

— Det beräknade teoretiska P_{ow}, när detta värde har bestämts eller när det mätta värdet är $<10^4$.

— pH-värdet i vattnet som har använts och i vattenfasen under testet.

— Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultat.

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 107*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 107*, reference 2, Decision of the Council C(81) 30 final.

3) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 107*, reference 10, Decision of the Council C(81) 30 final.

A. 9. FLAMPUNKT

1. METOD

1.1. Inledning

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets brandfarlighet. Testförfarandet kan tillämpas på flytande ämnen i det tillstånd de förekommer i på marknaden, vars ångor kan antändas av antändningskällor. De testmetoder som beskrivs i denna text är endast tillförlitliga för de flampunktsområden som anges för de enskilda metoderna.

1.2. Definitioner och enheter

Flampunkten är den lägsta temperatur, korrigerad vid ett tryck av 101,325 kPa, vid vilken testvätskan i ett slutet testkärl, under de betingelser som definieras för testmetoden, utvecklar ånga i sådan mängd att en brandfarlig ång-luftblandning bildas i testkärlet.

Enheter: °C

$t = T - 273{,}15$

(t i °C och T i K)

1.3 Referensämnen

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas till att från tid till annan kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

1.4 Testmetodsprinciper

Ämnet placeras i ett testkärl som gradvis uppvärms tills ångan når tillräckligt hög koncentration i luften för att bilda en brandfarlig blandning, som kan antändas.

1.5 Kvalitetskriterier

1.5.1 *Repeterbarhet*

Repeterbarheten varierar med flampunktsområde och använd testmetod: högst ± 2°C.

1.5.2 *Sensitivitet*

Sensitiviteten är beroende av använd testmetod.

1.5.3 *Specificitet*

Vissa testmetoders specificitet är begränsad till vissa flampunktsområden och avhängiga av ämnesrelaterade egenskaper (t.ex. hög viskositet).

1.6 Metodbeskrivning

1.6.1 *Förberedelser*

Ett prov av testämnet placeras i en testapparat enligt 1.6.3.1. och/eller 1.6.3.2.

1.6.2 *Testbetingelser*

Apparaten skall helst stå dragfritt.

1.6.3 *Testförfarande*

1.6.3.1 Jämviktsmetoden

Se ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2 Icke-jämviktsmetoden

Abel-apparat:

Se BS 2000 part 170, NF M07-011, NF T66-009.

Abel-Pensky-apparat:

Se (EN 57), DIN 51755 del 1 (för temperaturer från 5–65°C), DIN 51755 del 2 (för temperaturer under 5°C), NF M07-036.

Tag-apparat:

Se ASTM D 56, ISO 2719.

Pensky-Martens-apparat:

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

Anmärkningar:

Om flampunkten, bestämd med en icke-jämviktsmetod enligt 1.6.3.2., konstateras vara: 0 ± 2°C, 21 ± 2°C, 55 ± 2°C, skall den bekräftas med en jämviktsmetod under användning av samma apparat.

Endast de metoder som kan utvisa flampunktstemperaturen får användas till en anmälan.

För att bestämma flampunkten för viskösa vätskor (färger, gummiarter och liknande) som innehåller lösningsmedel, får endast användas apparatur och testmetoder som lämpar sig för bestämning av flampunkten för viskösa vätskor.

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

2. DATA

3. RAPPORTERING

Rapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (identifiering och orenheter).

— Den använda metoden skall anges liksom eventuella avvikelser.

— Resultaten och alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten, skall rapporteras.

4. HÄNVISNINGAR

Inga.

A. 10 BRANDFARLIGHET (FASTA ÄMNEN)

1. METOD

1.1. Inledning

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets potentiellt explosiva egenskaper.

Testet skall endast tillämpas på pulverformiga, granulära och pastaaktiga ämnen.

För att inte ta med alla ämnen som kan antändas, utan endast de som brinner snabbt eller de som på ett eller annat sätt har särskilt farliga egenskaper vid förbränning, anses endast de ämnen vars förbränningshastighet överstiger ett visst gränsvärde, vara mycket brandfarliga. Vidare anses även metallpulver, som kan upphettas till glödning, vara mycket brandfarliga om glödningen breder ut sig genom provet. Sådan glödning, och de därmed förenade svårigheterna att släcka en brand, är huvudskälet till att metallpulver är särskilt farliga. Vanliga släckningsmedel som koldioxid och/eller vatten kan öka risken avsevärt.

1.2. Definitioner och enheter

Bränntid uttrycks i sekunder.

1.3 Referensföreningar

Inte angivna.

1.4 Testmetodsprincip

Ämnet, i dess kommersiella tillstånd, formas till en 250 mm lång hög. Därefter skall försök göras att antända provet under de betingelser som definierats i 1.6.3., varvid bränntiden skall mätas.

1.5 Kvalitetskriterier

1.6 Metodbeskrivning

1.6.1 *Förberedelse*

Om ämnet är pulverformigt eller granulärt fylls produkten, i dess kommersiella form, löst packat i en form. Formen skall vara gjord av metall, ha en längd på 250 mm och en triangelformad tvärsnittssektion med en invändig höjd på 10 mm och en invändig bredd på 20 mm. På ömse sidor om formen monteras i längdriktningen en sidoavgränsande metallplatta, som skjuter ut 2 mm ovanför den triangelformade tvärsnittssektionen (figur). Formen får sedan falla tre gånger från 2 cm höjd på en fast yta. Om så behövs fylls formen på igen. Därefter tas de sidoavgränsande metallplattorna bort och överskottsämne skrapas bort. En icke-brännbar och icke-porös platta läggs över formen, apparaten vänds upp och ned och formen avlägsnas.

Pastaaktiga ämnen breds ut på en icke-brännbar yta i form av ett 250 mm långt rep med en tvärsnittsyta på ungefär 1 cm.

En lämplig antändningskälla, t.ex. en liten låga eller en varmtråd med en temperatur på lägst 1 000°C, används till att antända högen i ena änden.

1.6.2 *Testbetingelser*

Om ämnet är fuktkänsligt skall testet utföras så snabbt som möjligt efter det att ämnet har avlägsnats från behållaren.

1.6.3 *Testförfarande*

Antänd ena änden av högen. När 80 mm av högen har bränts skall brännhastigheten över de nästa 100 mm mätas. Testet skall utföras sex gånger, varje gång på ett rent kallt underlag.

2. DATA

Värdena för brännтiden, som bestämts vid sex test, är nödvändiga för utvärderingen.

3. RAPPORTERING

3.1 Rapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (identifiering och orenheter).

— En beskrivning av ämnet som skall undersökas, dess fysiska tillstånd, inklusive fukthalt.

— Mätresultaten.

— Alla ytterligare upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

3.2 **Tolkning av resultaten**

Pulverformiga, granulära eller pastaaktiga ämnen skall anses vara mycket brandfarliga om brännтiden vid ett av de sex testen, som utförts enligt det i 1.6. beskrivna testförfarandet, är kortare än 45 sekunder.

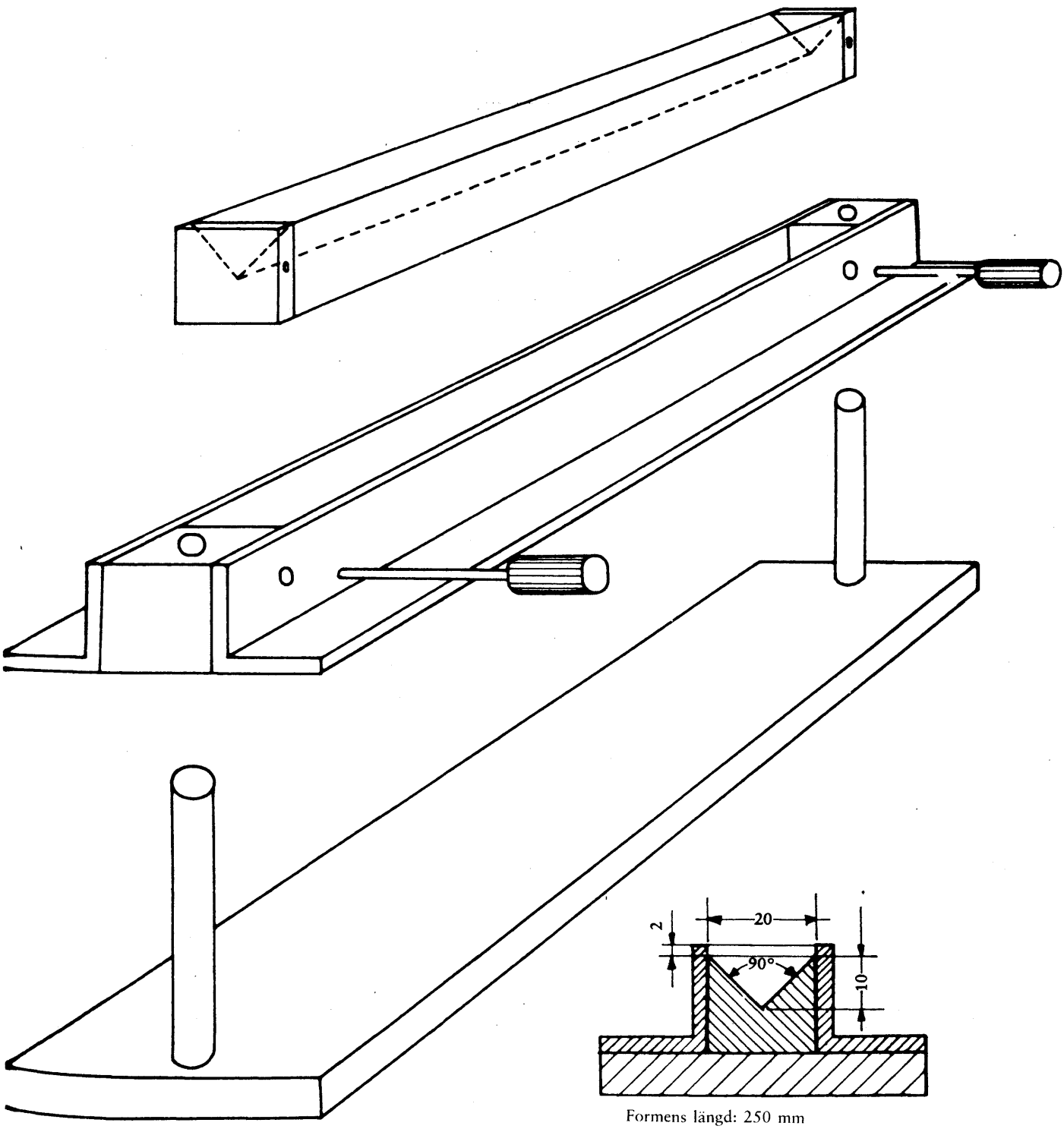
4. HÄNVISNINGAR

Inga.

Tillägg

Figur

Form och tillbehör för anordning av testhögen
(Alla mått i mm)



Formens längd: 250 mm

Material: Aluminium

A. 11. BRANDFARLIGHET (GASER)

1. METOD

1.1 Inledning

Denna metod gör det möjligt att bestämma om gaser, blandade med luft vid rumstemperatur och atmosfäriskt tryck, har ett brandfarlighetsområde. Blandningar med ökande koncentrationer av testgasen i luft utsätts för en elektrisk gnista varvid iakttas om antändning sker.

1.2 Definitioner och enheter

Brandfarlighetsområdet är koncentrationsområdet mellan den nedre och övre explosionsgränsen. De nedre och övre explosionsgränserna är de koncentrationsgränser av den brandfarliga gasen i en blandning med luft vid vilken en flamma inte breder ut sig.

1.3. Referensämne

Inte angivet.

1.4. Testmetodsprincip

Koncentrationen av gas i luft ökas stegvis och för varje steg utsätts blandningen för en elektrisk gnista.

1.5. Kvalitetskriterier

Inte angivna.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Apparatur*

Testkärlet består av en upprättstående glascylinder med en inre diameter på minst 50 mm och en höjd på minst 300 mm. Antändningselektroderna är placerade 3–5 mm från varandra och 60 mm ovanför cylinderns botten. Cylindern är utrustad med en tryckutlösningsöppning. Apparaten skall avskärmas för att begränsa eventuell explosionsskada.

Som antändningskälla används en stående induktionsgnista med en varaktighet på 0,5 sek. Denna gnista genereras av en högspänningstransformator med en utgångsspänning på 10–15 kV (högsta ingångseffekt 300 W).

1.6.2. *Testbetingelser*

Detta test skall utföras vid rumstemperatur.

1.6.3. *Testförfarande*

Med användning av proportioneringspumpar införs en känd koncentration av gas i glascylindern. En gnista förs genom blandningen och därvid iakttas om en flamma lösgör sig från antändningskällan och självständigt breder ut sig. Gaskoncentrationen varieras i steg på 1 % volym tills antändning sker enligt beskrivningen ovan.

2. DATA

Förekomsten av flamutbredning är den enda datauppgiften av betydelse för bestämning av denna egenskap.

3. RAPPORTERING

Rapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (identifiering och orenheter).

— En beskrivning av den använda apparaturen med måttangivelser.

— Rumstemperaturen vid vilken testet gjordes.

— Undersökta koncentrationerna och erhållna resultat.

— Testresultaten: icke-brandfarlig gas eller mycket brandfarlig gas.

— Om slutsatsen blir "icke-brandfarlig", skall anges att alla koncentrationer har undersökts genom att koncentrationen stegvis har ökats med 1 %, från 0 till 100 %.

— Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras.

4. HÄNVISNINGAR

Inga.

A. 12. BRANDFARLIGHET (ÄMNEN OCH PREPARAT SOM VID KONTAKT MED VATTEN ELLER FUKTIG LUFT UTVECKLAR MYCKET BRANDFARLIGA GASER I FARLIGA MÄNGDER)

1. METOD

1.1. Inledning

Denna testmetod kan användas till att bestämma om ett ämnes reaktion med vatten leder till utveckling av en farlig mängd gas eller gaser som kan vara mycket brandfarliga eller giftiga.

Testmetoden kan tillämpas på både fasta och flytande ämnen. Denna metod kan inte tillämpas på ämnen som antänds spontant i kontakt med luft.

1.2. Definitioner och enheter

Mycket brandfarliga: Ämnen och preparat som i kontakt med vatten eller fuktig luft utvecklar mycket brandfarliga gaser i farliga mängder med en lägsta hastighet på 1 liter/kg per timme. Vid denna gränssättning har hänsyn inte tagits till en gas giftighet.

1.3. Testmetodsprincip

Ämnet undersöks enligt den metod som steg för steg beskrivs nedan. Om antändning sker vid något steg behövs inget ytterligare test.

1.3.1. *Steg 1*

Testämnet placeras i ett tråg innehållande destillerat vatten vid 20°C och därvid iakttas om den utvecklade gasen antänds eller inte.

1.3.2. *Steg 2*

Testämnet placeras på ett filtrerpapper som flyter på ytan av en skål innehållande destillerat vatten vid 20°C, varvid antecknas om den utvecklade gasen antänds eller inte. Filtrerpapperet fyller endast funktionen att hålla ämnet kvar på plats för att öka möjligheten till antändning.

1.3.3. *Steg 3*

Testämnet formas till en hög, ungefär 2 cm hög och med 3 cm diameter. Ett par droppar vatten tillförs högen och därvid antecknas om den utvecklade gasen antänds eller inte.

1.3.4. *Steg 4*

Testämnet blandas med destillerat vatten vid 20°C och gasutvecklingshastigheten mäts under sju timmar med 1-timmesintervaller. Om utvecklingshastigheten är oregelbunden, eller ökar efter sju timmar, skall mättiden förlängas till högst fem dagar. Testet kan avbrytas om hastigheten vid något tillfälle överstiger 1 liter/kg per timme.

1.4. **Referensämne**

Inte angivet.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Inte angivna.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Steg 1*

1.6.1.1. Testbetingelser

Testämnet används i det tillstånd det förekommer på marknaden och testet utförs vid rumstemperatur (ca 20°C).

1.6.1.2. Testförfarande

En liten mängd (ungefär 2 mm diameter) av testämnet skall placeras i ett tråg innehållande destillerat vatten. Härvid iakttas om a) gas utvecklas och b) om gasen antänds. Om gasen antänds behöver ämnet inte undersökas ytterligare eftersom ämnet betraktas som farligt.

1.6.2. *Steg 2*

1.6.2.1. Utrustning

Ett filtrerpapper flyter på ytan av destillerat vatten i lämpligt kärl, t.ex. en avdunstningsskål med 100 mm diameter.

1.6.2.2. Testbetingelser

Testämnet används som det marknadsförs och testet utförs vid rumstemperatur (ca 20°C).

1.6.2.3. Testförfarande

En liten mängd av testämnet (ungefär 2 mm diameter) placeras i mitten av ett filtrerpapper. Härvid iakttas om a) gas utvecklas och b) om gasen antänds. Om gasen antänds behöver ämnet inte undersökas ytterligare eftersom ämnet betraktas som farligt.

1.6.3. *Steg 3*

1.6.3.1. Testbetingelser

Testämnet används som det marknadsförs och testet utförs vid rumstemperatur.

1.6.3.2. Testförfarande

Testämnet formas till en hög, ungefär 2 cm hög och med 3 cm diameter, med en liten fördjupning i toppen. Ett par droppar vatten tillsätts i fördjupningen och härvid iakttas om a) gas utvecklas och b) om gasen antänds. Om gasen antänds behöver ämnet inte undersökas ytterligare eftersom ämnet betraktas som farligt.

1.6.4. *Steg 4*

1.6.4.1. Apparatur

Apparaturen monteras enligt figuren (se tillägg).

1.6.4.2. Testbetingelser

Undersök behållaren, i vilken testämnet finns, för pulver > 500 μm (partikelstorlek). Om pulvret utgör mer än 1 % viktprocent av den totala mängden, eller om provet är sprött, skall hela ämnet malas till pulver innan det undersöks för att medge en minskning av partikelstorleken under lagring och hantering. I övrigt skall ämnet användas i kommersiellt tillstånd. Testet skall utföras vid rumstemperatur (20°C) och atmosfäriskt tryck.

1.6.4.3. Testförfarande

Vatten tillsätts i apparatens dropptratt, och tillräcklig mängd av ämnet, högst 25 g, för att utveckla mellan 100 och 250 cm^3 gas, vägs upp och placeras i den koniska kolven. Den gasvolym som utvecklas kan mätas med lämplig metod. Kranen på dropptratten öppnas för att släppa in vattnet i den koniska kolven och ett stoppur startas. Den tid det tar all gas att utvecklas antecknas, och om möjligt bör avläsningar göras under tiden. Detta test skall utföras tre gånger.

Om gasens kemiska identitet är okänd skall gasen analyseras. Om gasen innehåller mycket brandfarliga komponenter och det är okänt om hela blandningen är mycket farlig, skall en blandning med samma sammansättning framställas och undersökas enligt testmetoden (A. 11).

2. DATA

En antändning eller utveckling av mycket brandfarlig gas med högre hastighet än 1 liter/kg per timme vid tre försök räcker för att testämnet skall anses vara farligt (1.6.1, 1.6.2 och 1.6.3).

3. RAPPORTERING

Rapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Exakt specificering och beskrivning av ämnet som det erhölls (t.ex. färg, partikelstorlek och fysiskt tillstånd).

— All inledande behandling av testämnet.

— Testresultaten.

— Den utvecklade gasens kemiska identitet.

— Gasens utvecklingshastighet (1.6.4.)

— Eventuella ytterligare upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

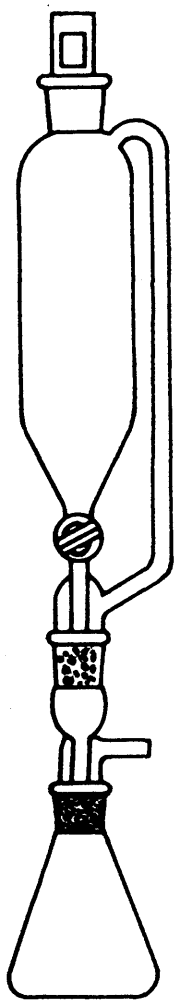
1) ISO 1773.

2) OECD, Paris, *Preliminary test guideline for the determination of substances which give off highly inflammable gases in dangerous amounts on contact with water*, A 80/28, final report of the OECD chemical testing programme.

3) UN Doc. No ST/SG/AC10/1 rev. 1.

Tillägg

Figur
Apparatur



A. 13. BRANDFARLIGHET (FASTA OCH FLYTANDE ÄMNEN)

1. METOD

1.1. Inledning

Vid utförande av dessa test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets självantändlighet. Testförfarandet kan tillämpas på fasta och flytande ämnen i det tillstånd de förekommer på marknaden, som i små mängder antänds spontant kort tid efter det att de har kommit kontakt med luft vid rumstemperatur.

Ämnen som inte omfattas av denna testmetod är sådana som kräver timmar eller dagar vid rumstemperatur innan de självantänds, eller sådana som behöver utsättas för avsevärt högre temperatur innan de självantänds.

1.2. Definitioner och enheter

Vätskor och fasta ämnen anses vara mycket brandfarliga om de antänds minst en gång under sex test under de betingelser som beskrivs i 1.6.

Det kan även vara nödvändigt att undersöka vätskors självantändlighet med metod A. 15: Självantändlighet: bestämning av den temperatur vid vilken flyktiga vätskor och gaser självantänds.

1.3. Referensämnen

Inte angivna.

1.4 Testmetodsprincip

Ämnet får i fem minuter vara i kontakt med luft vid en temperatur av 25 ± 10°C. Om ämnet antänds anses det vara mycket brandfarligt.

1.5. Kvalitetskriterier

Repeterbarhet: Av säkerhetsskäl räcker det med endast ett positivt resultat av sex test för att ämnet skall bedömas vara mycket brandfarligt.

1.6 Metodbeskrivning

1.6.1. *Apparatur*

En porslinskopp, diameter cirka 10 cm, fylls med kiselgurhaltig jord upp till ungefär 5 mm höjd vid rumstemperatur.

Anmärkning

Kiselgurhaltig jord eller annat jämförbart inert ämne som är allmänt tillgängligt skall anses vara representativt för jord på vilken testämnet kan spillas ut vid en olyckshändelse.

1.6.2. *Testförfarande*

a) Pulverformiga fasta ämnen

1—2 cm^3 av det pulverformiga testämnet hälls från cirka 1 m höjd på en icke brännbar yta, varvid iakttas om ämnet antänds under fallet eller innan det har gått fem minuter efter det att det har lagt sig.

b) Vätskor

Cirka 5 cm^3 av testvätskan hälls i den förberedda porslinskoppen, varvid iakttas om ämnet antänds inom fem minuter.

2. DATA

Resultaten av sex test är av betydelse för utvärderingen.

3. RAPPORTERING

Rapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— En beskrivning av testämnet.

— Testresultaten.

4. HÄNVISNINGAR

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

A. 14. EXPLOSIVA EGENSKAPER

1. METOD

1.1. Inledning

Metoden innefattar ett testschema för att bestämma om ett fast, flytande eller pastaaktigt ämne eller preparat utgör en explosionsfara om det utsätts för påverkan av en öppen låga (värmesensitivitet) eller slag- eller friktionspåverkan (sensitivitet för mekanisk påverkan).

Metoden består av tre delar:

a) test av värmesensitiviteten,

b) test av mekanisk sensitivitet avseende slagpåverkan,

c) test av mekanisk sensitivitet avseende friktion.

Metoden ger data till utvärdering av sannolikheten att en explosion skall initieras av vissa vanliga stimuli. Metoden är inte avsedd att säkerställa om ett ämne eller preparat kan respektive inte kan explodera under vilka betingelser som helst. Den är inte heller avsedd för bestämning av i vilken grad begynnande nedbrytning kan utvecklas till att orsaka explosion av hela provet.

Metoden är lämplig för att bestämma om ett ämne eller preparat utgör en explosionsfara (värme- och mekanisk sensitivitet) under de särskilda betingelser som anges i direktivet. Testen saknar relevans om det enligt föreliggande termodynamiska uppgifter (bildningsvärme, nedbrytningsvärme, frånvaro av vissa reaktiva grupper (se hänvisning 1) i strukturformeln) är ställt utom rimligt tvivel att ämnet eller preparatet inte kan brytas ned, bilda gaser och frigöra värme mycket snabbt (dvs. materialet utgör inte någon explosionsrisk). Det erkänns att metoden inte är definitiv. Den omfattar ett antal valda, specificerade apparaturer, som är allmänt använda internationellt och som vanligtvis ger meningsfulla resultat.

Den person som utför testen kan välja att använda alternativ apparatur i de tre angivna metoderna, förutsatt att det är vetenskapligt motiverat och att apparaturen är internationellt erkänd. I så fall skall vederbörande bestämma korrelationen mellan de egna resultaten och de resultat som erhållits med den angivna apparaturen.

1.2. Definitioner och enheter

Explosiva:

Ämnen och preparat som kan explodera när de utsätts för en öppen låga eller som är mer känsliga för slag och friktion än dinitrobensen.

1.3. Referensämne

M-dinitrobensen, teknisk kristallin produkt, för friktions- och slagmetoden.

1.4. Testmetodsprincip

Ett förberedande screentest är nödvändigt för att fastställa säkra betingelser för utförandet av de tre sensitivitetstesten:

1.4.1. *Förberedande screentest*

Mycket små prov (cirka 10 mg) av ämnet eller preparatet utsätts för upphettning, utan att vara inneslutna, med lågan från en bunsenbrännare, för slagpåverkan i lämplig typ av apparatur och friktionspåverkan medelst en hammare mot ett städ eller någon typ av friktionsmaskin. Syftet är att fastställa om ämnet är så sensitivt och explosivt att de föreskrivna sensitivitetstesten skall utföras med särskilda försiktighetsåtgärder för att undvika att den som utför testen skadas.

1.4.2. *Värmesensitivitet*

Metoden innebär att ämnet eller preparatet uppvärms i ett stålrör under varierande grad av inneslutning, som åstadkoms medelst dysplattor med öppningar med olika diameter, för att bestämma om ämnet eller preparatet är benäget att explodera under betingelser med termisk belastning.

1.4.3. *Mekanisk sensitivitet (slagpåverkan)*

Metoden innebär att ämnet eller preparatet utsätts för slagpåverkan från en fallhammare mot ett stålstäd.

1.4.4. *Mekanisk sensitivitet (friktion)*

Metoden innebär att ämnet eller preparatet utsätts för friktion mellan standardytor under specificerade betingelser för belastning och relativ rörelse.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Inte angivna.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Apparatur*

1.6.1.1. Värmesensitivitet (effekt av öppen låga)

Stålröret tillverkas av djupdragen stålplåt (se tillägg) genom en dragningsprocess. Det har en innerdiameter av 24 mm, en längd på 75 mm och en väggtjocklek på 0,5 mm. I den öppna änden är röret försett med en fläns för tillslutning av röret (figur 1). Röret är försett med en tryckömotståndskraftig rund dysplatta med ett centralt hål och denna platta är stadigt fäst vid röret medelst ett tvådelat skruvförband. Dysplattan (se figur 1) är 6 mm tjock och tillverkad av värmebeständigt kromstål (se tillägg).

Den som utför testet har tillgång till ett antal dysplattor med öppningar med olika diametrar (1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ... mm) för att bestämma i vilken grad ämnet eller preparatet utgör en explosionsfara. Skruvförbandet (figur 1) är tillverkat av krom-manganstål (se tillägg) som är gnistfritt upp till 800°C. Stålrören används endast till ett test.

1.6.1.2. Mekanisk sensitivitet (slagpåverkan)

En typisk fallhammarapparatur består huvudsakligen av ett gjutstålsblock (grått gjutgods) med fot och städ, pelare, gejder, fallvikt och en utlösningsmekanism. Stålblocket, 230 mm (djup) x 250 mm (bredd) x 200 mm (höjd) med en gjuten fot, 450 mm (djup) x 450 mm (bredd) x 60 mm (höjd), uppbär det påskruvade stålstädet, 100 mm (diameter) x 70 mm (höjd). På baksidan av stålblocket är hållaren fastskruvad och i denna fästes pelaren, som består av det heldragna stålröret, 90 mm (ytterdiameter) och 70 mm (innerdiamter). Fyra skruvar, som är förankrade i ett massivt betongblock, 60 x 60 x 60 cm, håller fallhammaren på ett sådant sätt att skenorna är absolut lodräta och

fallvikten lätt kan styras. Fallhammarens massavikt skall vara 10 kg. Vikten består av massivt stål. Den skall ha en slagyta av anlöpt stål, HRC 60—63, och en minsta diameter på 25 mm. Testen skall utföras med en fallhöjd på 0,4 m.

Provet, som skall testas, placeras i en matrisanordning bestående av två massiva koaxiala cylindrar av stål, den ena ovanför den andra, med en ihålig stålcylinder som styrring. De massiva stålcylindrarna skall vara 10 (-0,003, — 0,005) mm i diameter och 10 mm höga och ha polerade ytor, rundade kanter (rundningsradie 0,5 mm) och en hårdhet på HRC 58–65. Den ihåliga cylindern skall ha en ytterdiameter på 16 mm, en polerad urborrning på 10 (+0,005, +0,010) mm och en höjd på 13 mm. Om en explosion inträffar skall stålcylindrarna och den ihåliga cylindern inte användas till ytterligare test. Matrisanordningen monteras på ett mellanstäd, 26 mm (diameter) x 26 mm (höjd), tillverkat av stål, och centrerad medelst en centreringsring med en låsring för att avlägsna rökgaserna från explosionen.

1.6.1.3. Mekanisk sensitivitet (friktion)

Friktionsapparaturen består av en bottenplatta av gjuten stål (grått gjutgods) på vilken själva friktionsanordningen är monterad, bestående av en fast porslinspinne och rörliga porslinsplåtar. Porslinsplåten är fäst i en glidbar vagga som rör sig mellan två skenor. Vaggan drivs via en drivstång, en excentrisk trissa och en överföringsväxel av en elektrisk motor på sådant sätt att porslinsplåten rörs under porslinspinnen med en bakåt- och framåtgående rörelse på 10 mm. Porslinspinnen skall belastas med 360 newton (N).

Porslinsplattorna är tillverkade av vitt tekniskt porslin och har dimensionerna 25 mm (längd) x 25 mm (bredd) x 5 mm (höjd). Plattornas båda friktionsytor uppruggas (uppruggningsdjup 9 μ—32 μ) före uppvärmning, genom att gnidas med en svamp.

Även den cylindriska porslinspinnen är tillverkad av vitt tekniskt porslin. Den är 15 mm lång, har en innerdiameter på 10 mm och uppruggade sfäriska ändytor med en rundingsradie på 10 mm.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Värmesensitivitet (effekt av öppen låga)

Ämnet, i den fysiska form i vilket det skall levereras, fylls i röret till en höjd av 60 mm i tre lika stora portioner. Varje portion sammanpressas försiktigt genom att en kraft på 80 newton anbringas på ytan med hjälp av en passande träkolv, något mindre än röret. Vid ett geléaktigt ämne skall försiktighet iakttas för att undvika luftbubblor under påfyllning.

1.6.2.2. Mekanisk sensitivitet (slagpåverkan)

Ämnet testas i torrt tillstånd. Provet skall ha en volym på 40 mm^3, eller en volym som passar till den aktuella apparaturen. För fasta ämnen, undantaget pastor, gäller följande:

a) Pulverformiga ämnen siktas (siktstorlek 0,5 mm); allt som har passerat sikten används till testet.

b) Pressade, gjutna eller på annat sätt sammanpressade ämnen sönderdelas och siktas, siktfraktioner från 0,5—1 mm används vid testet.

Vid flytande ämnen pressas den övre stålcylindern ner tills den befinner sig på 1 mm avstånd från den nedre cylindern, och hålls kvar i detta läge.

1.6.2.3. Mekanisk sensitivitet (friktion)

Ämnet testas i torrt tillstånd. Provet skall ha en volym på 10 mm^3. För fasta ämnen, utom pastor, gäller följande:

a) Pulverformiga ämnen siktas (siktstorlek 0,5 mm); allt som har passerat sikten används vid testet.

b) pressade, gjutna eller på annat sätt sammanpressade ämnen sönderdelas och siktas, siktfraktioner > 0,5 mm diameter används vid testet.

1.6.3. *Testförfarande*

1.6.3.1. Värmesensitivitet (effekt av öppen låga)

Uppvärmning görs med propan från en vanlig glasflaska, försedd med en tryckregulator (500 mbar), genom en mätare och fördelas genom ett förgreningsrör till de fyra brännarna. De fyra brännarna förbrukar 3,2 liter propan per minut. Om andra gaser används till uppvärmningen skall man välja lämpliga brännare, gasförbrukning och luftintag så att jämförbara mätningar med inerta ämnen (sand, dibutylftalat), ger liknande temperatur-/tidskurvor som vid uppvärmning med propan i de fyllda rören.

Brännarna placeras runt testkammaren, se figur 2.

Brännarna justeras på så sätt att spetsen av lågans inre blå kon nästan tangerar röret. Testet skall utföras i en stålkammare med mått enligt figur 2.

Måtten för propanbrännarna återfinns i figur 3a och 3b. Två serier om tre test är obligatoriska. Vid den första serien används en dysplatta med ett 2 mm hål, och vid den andra används en hålstorlek som är större än 2 mm (t.ex. 6 mm) i diameter.

Om en explosion inträffar under de första serierna (2 mm-hål) är det onödigt att fortsätta med fler serier. Om en explosion inte inträffar efter fem minuter avbryts testet.

1.6.3.2. Mekanisk sensitivitet (slagpåverkan)

I den beskrivna slagapparaturen utförs sex test i vilka den 10 kg tunga massan får falla från 0,4 m. I andra apparaturer jämförs provet med m-dinitrobensen med användning av det fastställda förfarandet (tvåslagsteknik osv.).

1.6.3.3. Mekanisk sensitivitet (friktion)

Porslinspinnen anbringas på testprovet och vikten hängs på. När testet utförs skall slipmärkena på porslinsplattan som åstadkommits av svampen ligga tvärs emot rörelseriktningen. Kontrollera noggrant att pinnen vilar på provet, att tillräckligt med testämne ligger under pinnen och även att plattan rör sig korrekt under pinnen. Under porslinspinnen skall porslinsplattan flyttas fram och tillbaka, 10 mm i båda riktningarna, under loppet av 0,44 sekunder. Varje del av ytan får endast användas för ett test.

2. DATA

2.1. Behandling av resultaten

Testet kan avbrytas så snart som ett positivt resultat uppnås i ett av testen.

2.2. Utvärdering

Ett ämne eller preparat anses i princip utgöra en explosionsfara i direktivets bemärkelse om

a) en explosion inträffar (dvs. röret sprängs i tre eller fler fragment) inom det fastställda antalet test av värmesensitivitet, eller

b) en explosion (eldutveckling är likvärdigt med explosion) inträffar minst en gång under sex test med den beskrivna slagapparaturen eller provet är mer sensitivt än m-dinitrobensen i ett alternativt slagpåverkanstest, eller

c) en explosion (knaster eller eldutveckling är likvärdigt med explosion) inträffar minst en gång under sex test med den beskrivna friktionsapparaturen eller provet är mer sensitivt än m-dinitrobensen i ett alternativ friktionstest.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— identitet, sammansättning, renhet, fukthalt osv. för det testade ämnet eller preparatet,

— provets fysiska form och om det har siktats eller inte,

— iakttagelser under testen (typ av reaktion, gnistor, låga, explosion, antal fragment osv.),

— resultat för varje test,

— om alternativ apparatur har använts skall detta motiveras vetenskapligt och tecken på korrelation mellan resultat som erhållits med beskriven apparatur och de som erhållits med likvärdig apparatur, skall anges,

— alla relevanta kommentarer, t.ex. hänvisning till test med liknande produkter, som kan vara av betydelse för en korrekt tolkning av resultaten.

3.2. Tolkning och utvärdering av resultat

I testrapporten skall nämnas alla resultat som anses vara falska, avvikande eller icke representativa. Om något resultat inte skulle tas under övervägande, skall en förklaring ges och resultaten av ett alternativt eller kompletterande test anges.

Ibland kan resultatet vara ett tekniskt fel som har samband med ämnets fysiska form eller flyktiga art under testet. I sådana fall är det bra att känna till vilket resultat man skulle uppnå om ämnet eller preparatet har den form i vilken det skall släppas ut på marknaden. Alternativa test kan möjligen ge upplysningar om detta. Om ett avvikande resultat inte kan förklaras på detta sätt skall det godtas för vad det är och i enlighet därmed användas vid klassificering av ämnet eller preparatet.

4. HÄNVISNINGAR

1) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, London, Butterworths, 1979, s. 60-63.

2) Koenen, H., Ide, K. H., öber die PrÜfung explosiver Stoffe, I. Ermittlung der Reibempfindlichkeit, Explosive Stoffe, vol. 3, 1955, s. 57-65 och 89-93.

3) Koenen, H., Ide, K. H., öber die PrÜfung explosiver Stoffe, III. Ermittlung der Empfindlichkeit explosiver Stoffe gegen thermische Beanspruchung in einer Erhitzungskammer mit verschiedenen definierten Offnungen (Stahlhusen verfahren), Explosive Stoffe, vol. 4, 1956, s. 119-125, och 143-148.

4) Koenen, H., Ide, K. H., Haupt, W., öber die PrÜfung explosiver Stoffe, IV. Ermittlung der Schlagemfindlichkeit explosiver Stoffe von fester, flÜssiger und gelatinoser Beschaffenheit, Explosive Stoffe, vol. 6, 1958, s. 178-189, 202-214 och 223-235.

5) ONU, 1980, December, United Nations Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods (Doc. ST/SG/AC/.10/5/Add. 3, Table 4.3).

Tillägg

Exempel på materialspecifikation

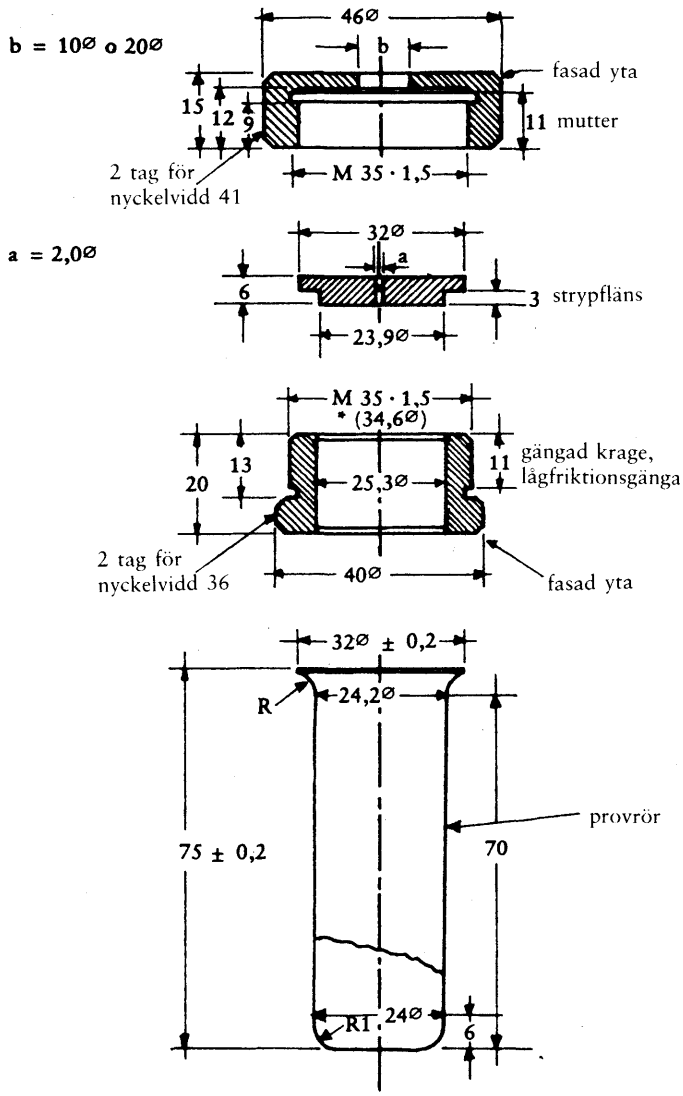
1) Materialspecifikation nr. 1.0336.505 g, i enlighet med DIN 1623, blad 1.

2) Materialspecifikation nr. 1.4873, i enlighet med blad "Stahl-Eisen-Werkstoff" 490-52.

3) Materialspecifikation nr. 1.3817, i enlighet med blad "Stahl-Eisen-Werkstoff" 490-52.

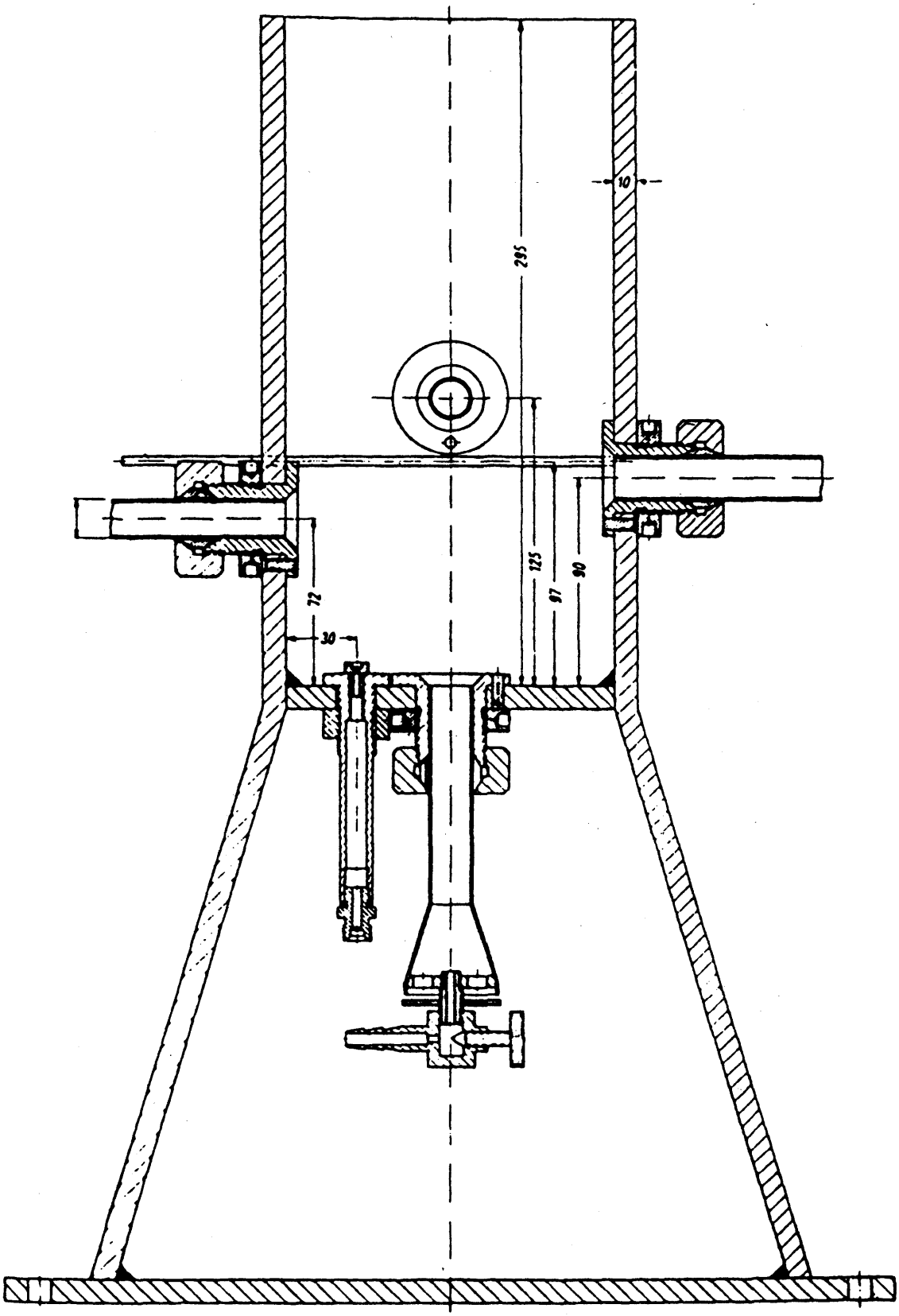
Figur 1

(Alla mått i mm)



Figur 2

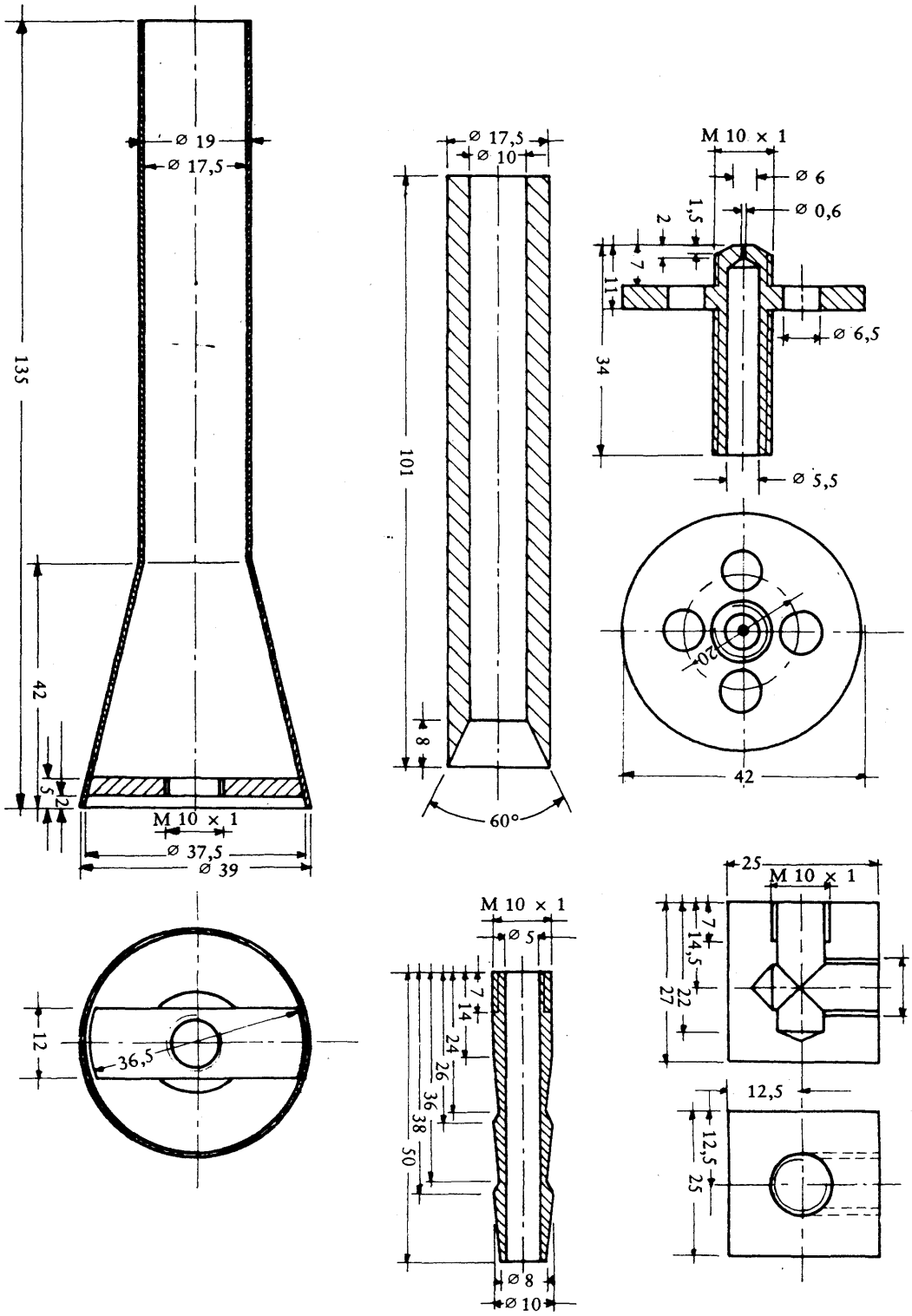
(Alla mått i mm)



Figur 3a

Material: mässing

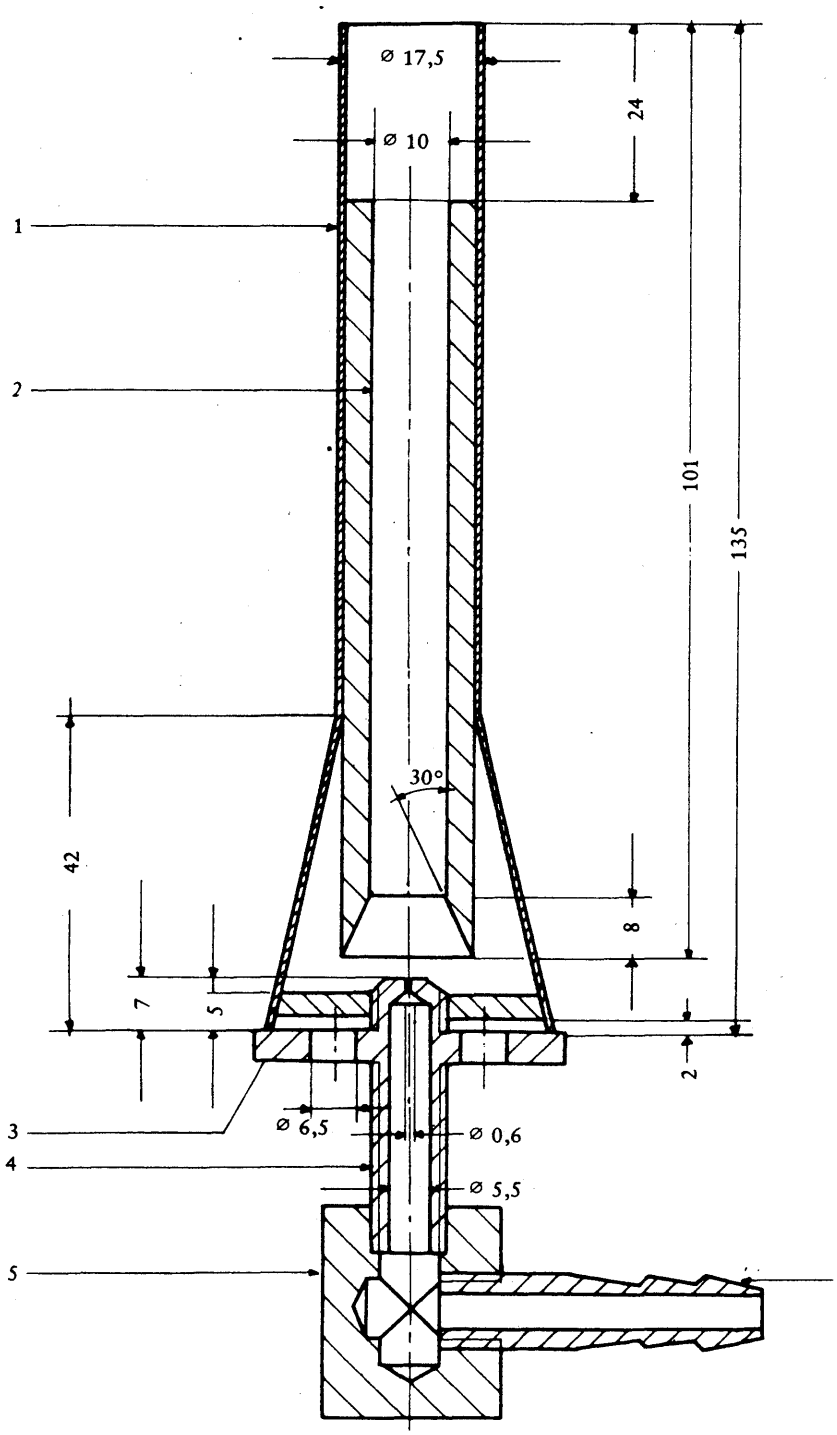
(Alla mått i mm)



Figur 3b

Material: mässing

(Alla mått i mm)



A. 15. SJÄLVANTÄNDLIGHET (BESTÄMNING AV DEN TEMPERATUR VID VILKEN FLYKTIGA VÄTSKOR OCH GASER SJÄLVANTÄNDS)

1. METOD

1.1 Inledning

Det är värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets självantändlighet. Testförfarandet får tillämpas på gasformiga och flyktiga flytande ämnen, marknadsförda, som i närvaro av luft antingen själva eller genom sina ångor kan antändas av en varm yta. Självantändningstemperaturen kan minskas avsevärt vid förekomst av katalytiska orenheter.

1.2. Definitioner och enheter

Graden av självantändlighet uttrycks som självantändningstemperaturen. Självantändningstemperaturen är den lägsta temperatur vid vilken testämnet antänds när det blandas med luft under de betingelser som definierats för testmetoden.

1.3. Referensämnen

Inte angivna.

1.4. Testmetodsprincip

Gasers och ångors självantändlighet bestäms med användning av den apparatur som beskrivs i IEC 79-4.

1.5. Kvalitetskriterier

Repeterbarheten varierar beroende på självantändlighetens temperaturområde och den använda testmetoden (högst ± 5°C).

Sensitiviteten beror på den använda testmetoden.

Specificiteten beror på den använda testmetoden.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Apparatur*

Apparaturen finns beskriven i den metod som avses i 1.6.3.

1.6.2. *Testbetingelser*

Ett prov av testämnet undersöks enligt den metod som avses i 1.6.3.

1.6.3 *Testförfarande*

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

2. DATA

Anteckna testtemperaturen, atmosfäriskt tryck, mängden använt prov, tidsintervall innan antändning sker.

3. RAPPORTERING

Rapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Exakt specifikation av ämnet (identifiering och orenheter).

— Mängden använt prov, atmosfäriskt tryck.

— Mätresultaten (testtemperaturer, resultat beträffande antändning, motsvarande tidsintervall).

— Alla ytterligare upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

4. HÄNVISNINGAR

Inga.

A. 16. SJÄLVANTÄNDLIGHET (FASTA ÄMNEN — BESTÄMNING AV DEN RELATIVA SJÄLVANTÄNDNINGSTEMPERATUREN)

1. METOD

1.1. Inledning

Explosiva ämnen och ämnen som antänds spontant vid kontakt med luft vid rumstemperatur, skall inte användas vid detta test.

Syftet med detta test är att få preliminära uppgifter om fasta ämnens självantändlighet vid förhöjda temperaturer.

Om den värme som utvecklas, antingen genom ämnets reaktion på syre eller genom exoterm nedbrytning, inte avges tillräckligt snabbt till omgivningen inträffar en självuppvärmning som leder till självantändning. Självantändning inträffar således när värmeproduktionens hastighet överstiger värmeförlustens hastighet.

Testförfarandet är värdefullt som ett förberedande screentest för fasta ämnen. Med tanke på det komplicerande förhållandet vid antändning och förbränning av fasta ämnen, skall självanötändningstemperaturen som bestäms enligt denna metod endast användas i jämförande syfte.

1.2. Definitioner och enheter

Den självantändningstemperatur som erhållits med denna metod är den lägsta omgivningstemperatur, uttryckt i °C, vid vilken en viss volym av ett ämne självantänds under definierade betingelser.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

En viss volym av testämnet placeras i en ugn vid rumstemperatur; temperatur-/tidskurvan avseende betingelserna i provets mitt registreras medan temperaturen i ugnen ökas till 400°C med en hastighet av 0,5°C per minut. Den ugnstemperatur vid vilken provets temperatur uppnår 400°C genom självuppvärmning, kallas i detta test självantändningstemperaturen.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Apparatur*

1.6.1.1. Ugn

En temperaturprogrammerad laboratorieugn (volym ca 2 liter) utrustad med naturlig luftcirkulation och explosionssäkring. För att undvika en eventuell explosionsrisk skall det säkerställas att nedbrytningsgaser inte kan komma i kontakt med de elektriska värmeelementen.

1.6.1.2 Kub av ståltrådsnät

En bit rostfritt ståltrådsnät med 0,045 mm maskor skärs till enligt mallen i figur 1 (se tillägg). Nätet viks och fästs ihop med tråd till kuber som är öppna på ovansidan.

1.6.1.3 Termoelement

Passande termoelement.

1.6.1.4 Skrivare

Valfri tvåkanalsskrivare som är kalibrerad från 0–600°C eller motsvarande spänning.

1.6.2 *Testbetingelser*

Ämnen testas i sin kommersiella form.

1.6.3 *Testförfarande*

Kuben fylls med testämnet och slås med lätta slag varefter ytterligare ämne tillsätts tills kuben är helt fylld. Provet hängs därefter upp i mitten av ugnen vid rumstemperatur. Ugnstemperaturen registreras medelst ett termoelement som är placerat mitt i kuben och ett annat som är placerat mellan kuben och ugnsväggen.

Ugnens och provets temperaturer avläses fortlöpande medan ugnstemperaturen ökas till 400°C eller till det fasta ämnets smältpunkt, om denna är lägre, med en hastighet av 0,5°C per minut.

När ämnet antänds visar termoelementet i provet en mycket kraftig temperaturhöjning över ugnstemperaturen.

2. DATA

Den ugnstemperatur vid vilken provets temperatur uppnår 400°C genom självuppvärmning, är av betydelse för utvärderingen (se figur 2 i tillägget).

3. RAPPORTERING

Rapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— En beskrivning av ämnet som skall testas.

— Mätresultaten inklusive temperatur-tidskurvor.

— Alla andra upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

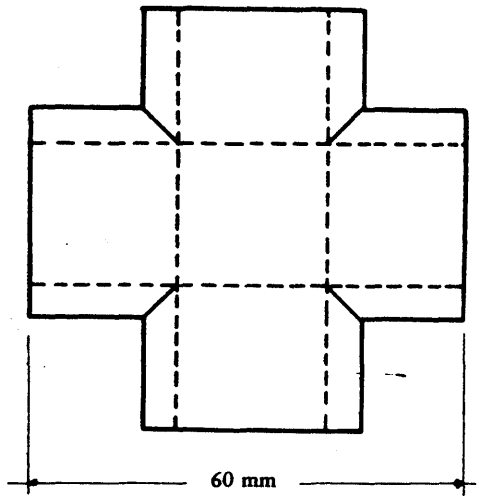
4. HÄNVISNINGAR

Inga.

Tillägg

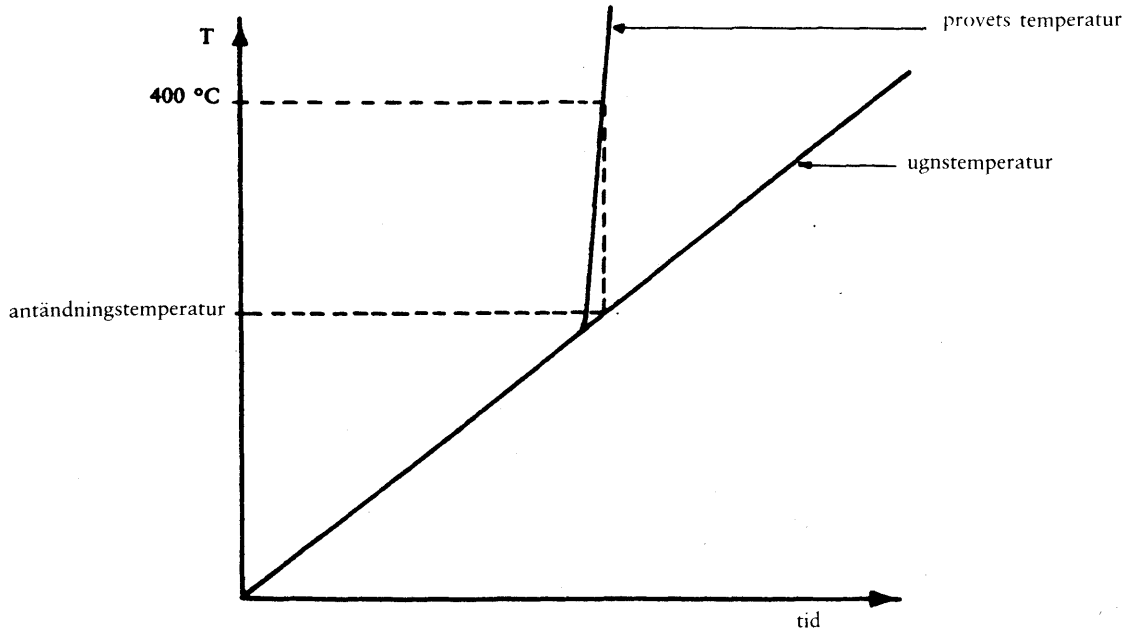
Figur 1

Mall till 20 mm testkub



Figur 2

Typisk temperatur-tidskurva



A. 17. OXIDERANDE EGENSKAPER

1. METOD

1.1. Inledning

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets potentiellt explosiva egenskaper och toxicitet.

Testet får inte tillämpas på vätskor och gaser, explosiva eller mycket brandfarliga ämnen, organiska peroxider eller brännbara fasta ämnen som är benägna att smälta under testbetingelser.

Detta test är inte av betydelse om en undersökning av strukturformeln fastslår utom rimligt tvivel att ämnet eller preparatet inte kan reagera exotermt med ett brännbart material.

För att säkerställa om testet skall utföras med iakttagande av särskilda försiktighetsåtgärder, skall ett förberedande test utföras.

1.2. Definitioner och enheter

Bränntid: reaktionstid, i sekunder, som åtgår till reaktionszonens färd längs en hög, enligt det förfarande som beskrivs i 1.6.

Brännhastighet: uttryckt i mm per sekund.

Maximal brännhastighet: det högsta värdet för brännhastigheter som erhållits för blandningar innehållande 10—90 viktprocent av det oxiderande ämnet.

1.3. Referensämne

Bariumnitrat (analytisk kvalitet) används som referensämne för testet och det förberedande testet.

Kaliumbikromat får också användas i det förberedande testet.

Särskilda försiktighetsåtgärder skall vidtas vid hantering av kaliumbikromat.

Referensblandningen är den blandning av bariumnitrat och cellulosapulver som framställts enligt 1.6. och som har den maximala brännhastigheten (vanligtvis en blandning med 60 viktprocent bariumnitrat).

1.4. Testmetodsprincip

Av säkerhetsskäl utförs ett förberedande test. Detta test är tillräckligt om det klart utvisar att testämnet eller testpreparatet har oxiderande egenskaper. Om så inte är fallet skall ämnet eller preparatet underkastas ytterligare test.

Vid det ytterligare testet skall testämnet och ett definierat brännbart ämne blandas i olika proportioner. Varje blandning formas sedan till en hög som antänds i ena änden. Den maximala brännhastigheten bestäms därefter och jämförs med referensblandningens maximala brännhastighet.

1.5. Kvalitetskriterier

Om så behövs kan valfri malnings- och blandningsmetod användas, förutsatt att skillnaden mellan den maximala brännhastigheten i de sex separata testen inte avviker mer än 10 % från det aritmetiska medelvärdet.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Förberedande test*

Ämnet, i dess kommersiella form, torkas och blandas något så när med det torkade cellulosapulvret eller trämjöl i proportionerna 2 viktdelar av testämnet till 1 viktdel cellulosa eller trämjöl. Blandningen formas till en liten konformad hög med måtten 3,5 cm (basens diameter) x 2,5 cm (höjd) genom att en konliknande form (t.ex. ett laboratorieglastratt vars pip är tillsluten) fylls, utan att packas.

Högen placeras på en kall ogenomtränglig icke ledande yta över antändningskällan, som består av en inert metalltråd, t.ex. av platina eller nickel (som kan uppvärmas elektriskt till ungefär 1 000°C). Denna metalltråd placeras ungefär 1 mm ovanför testytan och sträcker sig över den konformade högens bas. Testet skall utföras i ett dragskåp som i 1.6.3.

Antändningskällan kopplas på och får vara påslagen. Kraften och varaktigheten av den påföljande reaktionen iakttas och registreras.

Ämnet eller preparatet anses vara oxiderande om reaktionen är kraftfull.

Vid alla tillfällen när resultatet är tveksamt skall hela testförfarandet enligt nedan slutföras.

1.6.2. *Förberedelse*

1.6.2.1. Testämne

Reducera testprovet till en partikelstorlek > 0,125 mm enligt följande:

Sikta testämnet i dess kommersiella tillstånd; mal återstående fraktion, upprepa förfarandet tills hela testfraktionen har passerat sikten.

Valfri malnings- och siktningsmetod som uppfyller kvalitetskriterierna får användas.

Innan blandningen framställs skall ämnet torkas vid 105°C tills konstant vikt har uppnåtts. Om testämnets nedbrytningstemperatur är lägre än 105°C skall ämnet torkas vid en passande lägre temperatur.

1.6.2.2. Brännbart ämne

Cellulosapulver används som brännbart ämne. Cellulosan skall vara av den typ som används vid tunnskiktskromatografi eller kolonnkromatografi. En typ, där mer än 85 % av fiberlängderna ligger mellan 0,020 och 0,075 mm, har visat sig vara lämplig. Cellulosapulvret passerar genom en sikt med en maskstorlek på 0,125 mm.

Innan blandningen framställs skall ämnet torkas vid 105°C tills konstant vikt har uppnåtts.

Om trämjöl används i det förberedande testet skall ett barrvedsmjöl tillredas genom att den del som passerar en sikt med maskstorleken 1 600 μm insamlas, blandas noggrant och sedan torkas vid 105°C i fyra timmar i ett högst 25 mm tjockt lager. Låt det kylas ned och förvara det i en lufttät behållare, fylld till brädden, tills det skall användas, helst inom 24 timmar efter torkning.

1.6.2.3. Blandning

Blandningen av oxiderande ämne och cellulosa, innehållande 10—90 viktprocent oxiderande ämne, framställs i steg om 10 %. I gränsfall skall mellanblandningar av oxiderande ämne och cellulosa användas för att få fram en noggrannare maximal brännhastighet.

Anmärkning

Blandningar av oxiderande ämnen och cellulosa skall behandlas som potentiellt explosiva och hanteras med vederbörlig försiktighet.

Högen byggs upp med användning av en form, som är tillverkad av metall, har en längd på 250 mm, och en triangelformad tvärsnittssektion med en inre höjd på 10 mm och en inre bredd på 20 mm. På båda sidor om formen monteras i längdriktningen två sidoavgränsande metallplåtar som skjuter upp 2 mm ovanför den triangelformade tvärsnittssektionens övre kant (figur). Denna anordning fylls löst och med råge av blandningen. Efter det att formen har fått falla en gång från 2 cm höjd på en fast yta skrapas återstående överskottsämne bort med en skråställd platta. Därefter avlägsnas sidoavgränsningarna och resterande pulver slätas ut med en kavel. En icke-brännbar plåt placeras sedan ovanpå formen, apparaturen vänds och formen avlägsnas.

1.6.2.4. Antändningskälla

Som antändningskälla används lågan från en gasbrännare eller en platinatråd som uppvärmts elektriskt till cirka 1 000°C.

1.6.3. *Testförfarande*

Högen placeras i dragskåpet tvärs över luftdragets riktning.

Lufthastigheten skall vara så hög att den förhindrar att rökgaser släpps ut till laboratoriet och skall inte varieras under testet. En dragskärm skall placeras runt apparaturen.

Eftersom cellulosan och testämnena är hygroskopiska skall testet utföras så snabbt som möjligt.

Tänd på ena änden av högen genom att beröra den med lågan eller den glödande platinatråden.

Mät reaktionstiden över 200 mm efter det att reaktionszonen har förflyttat sig de första 30 mm.

Testet utförs med referensämnet. Därefter utförs testet minst en gång med varje serie av blandningar av testämnet och cellulosa.

Om den maximala brännhastigheten konstateras vara signifikant högre än referensämnets, kan testet avbrytas. I annat fall skall testet upprepas fem gånger med de tre blandningar som gav de högsta brännhastigheterna.

2. DATA

Av säkerhetsskäl skall den maximala brännhastigheten — inte medelvärdet — anses vara testämnets karakteristiska oxiderande egenskap.

Det högsta värdet för brännhastighet som erhålls vid en testomgång med sex test av en given blandning är relevant för utvärderingen.

Rita en kurva över det högsta värdet för brännhastighet för varje blandning som en funktion av dess innehåll av oxiderande medel.

Bestäm den maximala brännhastigheten utifrån kurvan.

De sex mätta värdena för brännhastighet, som vid en testomgång erhållits för blandningen med den maximala brännhastigheten, får inte avvika mer än 10 % från det aritmetiska medelvärdet. I annat fall skall malnings- och blandningsmetoderna förbättras.

Jämför den erhållna maximala brännhastigheten med referensblandningens maximala brännhastighet (se 1.3.).

3. RAPPORTERING

3.1. **Testrapport**

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— En beskrivning av testämnet.

— All behandling av testprovet (t.ex. malning, torkning, ...)

— Mätresultaten.

— Reaktionssättet (t.ex. brinnande låga vid ytan, genombränning av hela massan, alla uppgifter om förbränningsprodukter, ...).

— Alla ytterligare upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten, inbegripet en beskrivning av kraften (lågor, gnistor, rök, långsamt pyrande glöd osv.) och ungefärlig varaktighet som iakttagits vid det förberedande säkerhets-screeningtestet för både test- och referensämne.

3.2. **Tolkning av resultaten**

Ett ämne skall anses vara ett oxiderande ämne om

a) det under det förberedande testet inträffar en kraftig reaktion,

b) det under testet konstateras att blandningens maximala brännhastighet är högre än eller lika med den maximala brännhastigheten för referensblandningen av cellulosa och bariumnitrat.

4. HÄNVISNINGAR

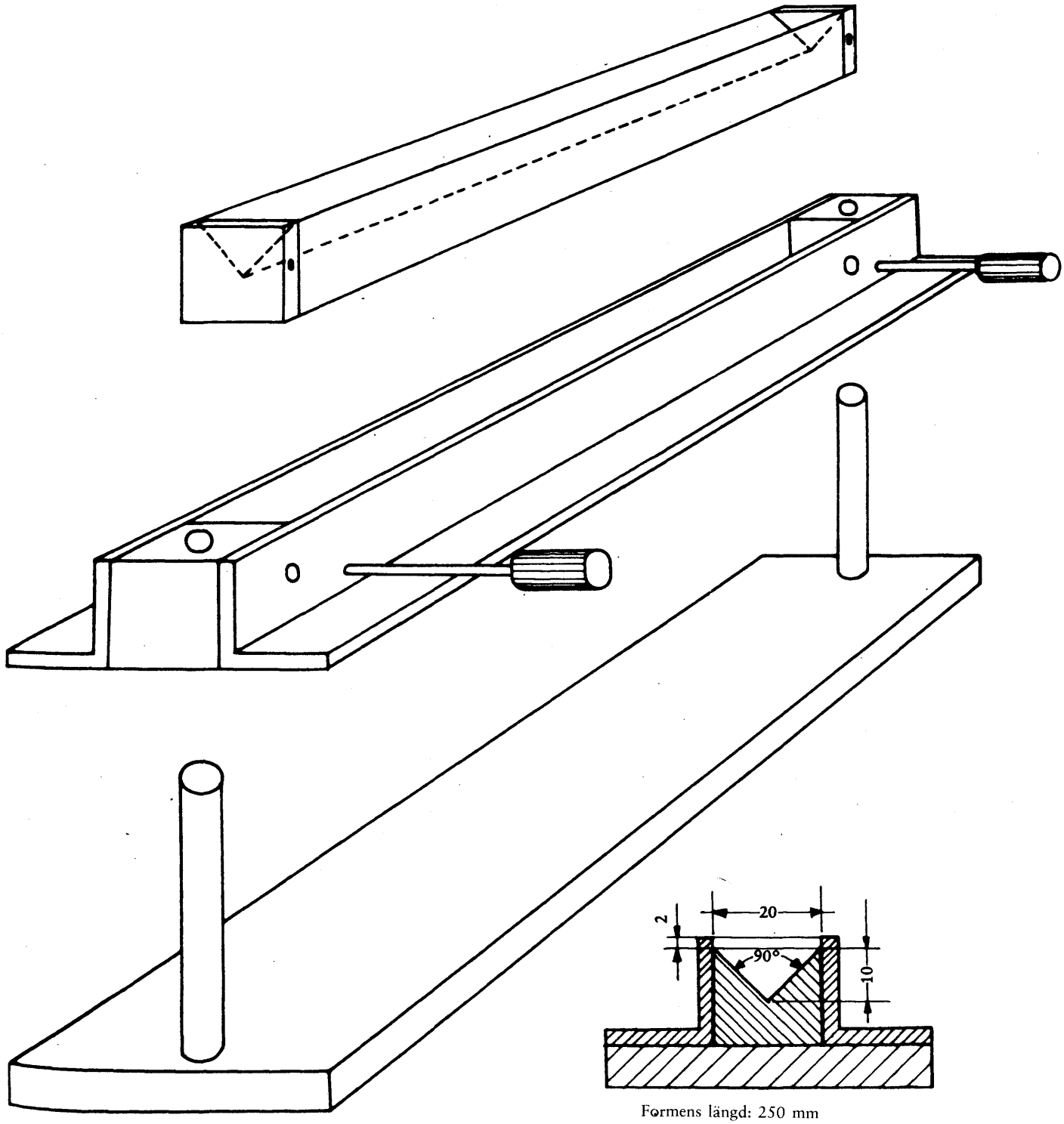
Inga.

Tillägg

Figur

Form och tillbehör för iordningställande av högen

(Alla mått i mm)



Formens längd: 250 mm
Material: aluminium

DEL B: METODER FÖR BESTÄMNING AV TOXICITET

ALLMÄN INLEDNING: DEL B

A. INLEDNING

Se Allmän inledning

B. DEFINITIONER

a) *Akut toxicitet* omfattar de skadliga effekter som uppträder inom en given tid (vanligen 14 dagar), efter tillförsel av en enda dos av ett ämne.

b) LD_{50} (median letal dos) är en statistiskt fastställd enstaka dos av ett ämne som kan förväntas leda till döden för 50 % av djuren som tillförts dosen. Ett LD_{50}-värde uttrycks som vikt testämne per viktenhet försöksdjur (mg/kg).

c) LC_{50} (median letal koncentration) är en statistiskt fastställd koncentration av ett ämne som kan förväntas leda till döden, under exponering eller inom en bestämd tid efter exponering, för 50 % av de djur som har exponerats i en bestämd tid. LC_{50}-värdet uttrycks som vikt testämne per standardvolymluft (mg/l).

d) *Ingen toxisk effektnivå* är den högsta dos- eller exponeringsnivå som används i ett försök som inte ger några påvisbara skadliga effekter.

e) *Subakut/subkronisk toxicitet* omfattar de skadliga effekter som uppträder hos försöksdjur till följd av upprepad daglig dosering med, eller exponering för, en kemikalie under en kort tid av deras förväntade livslängd.

f) *Maximal tolererad dos (MTD)* är den högsta dosnivå som framkallar tecken på toxicitet utan att i någon högre grad påverka överlevnaden i det försök i vilket den används, t.ex. i studier av karcinogenicitet beroende på andra effekter än tumörer.

g) *Hudirritation* är framkallandet av reversibla inflammatoriska förändringar i huden efter applicering av testämnet.

h) *Ögonirritation* är framkallandet av reversibla förändringar i ögonen efter det att ett testämne applicerats på ögats främre yta.

i) *Hudsensibilisering* (allergisk kontaktdermatit) är en immunologiskt utlöst kutan reaktion på ett ämne.

C. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Det finns gränser för hur långt resultat av djurförsök och undersökningar *in vitro* kan extrapoleras direkt till människan och detta skall man komma ihåg vid utvärdering och tolkning av försök.

När humandata finns anses dessa vara mer relevanta för bestämningen av kemiska ämnens potentiella effekter på människan.

MUTAGENICITET (inbegripet pre-screeningtest för karcinogenicitet)

För den inledande bedömningen av ett ämnes mutagenicitetspotential är det nödvändigt att inhämta information om två kategorier av slutpunkter, nämligen genmutation och kromosomförändringar.

Dessa två slutpunkter utvärderas med följande försök:

a) Test av produktionen av gen(punkt)mutationer i prokaryotiska celler som *Salmonella typhimurium*; även *Escheria coli* kan användas i test. Valet mellan dessa två testorganismer kan vara beroende av arten av det kemiska ämne som skall testas.

b) Test av produktionen av kromosomförändringar hos däggdjursceller som odlas *in vitro*; även ett *in vivo*-förfarande (mikronukleärt test eller analys av metafasen för benmärgsceller) kan användas.

D. LITTERATURHÄNVISNINGAR

Toxikologi är en experimentell vetenskap under utveckling och det finns en omfattande litteratur om de olika ämnen som den behandlar. Uppgifter av betydelse kan hittas i OECDs riktlinjer för undersökning av kemikalier.

Kompletterande anmärkningar

Djurvård

Sträng kontroll av testmiljön och korrekta djurhållningsmetoder är nödvändiga vid toxicitetstest.

a) Djurhållning

Miljön i försöksdjurens rum eller burar skall vara avpassade efter djurarten. Lämpliga betingelser för gnagare är en rumstemperatur på 22 ± 3°C och en relativ luftfuktighet på 30—70 %. För kaniner och marsvin bör temperaturen hållas vid 20 ± 3°C med en relativ luftfuktighet på 30—70 %.

Vissa testmetoder är särskilt känsliga för temperatureffekter och i dessa fall ingår detaljuppgifter om lämpliga betingelser i metodbeskrivningen. I alla undersökningar av toxiska effekter skall temperaturen och luftfuktigheten kontrolleras, registreras och anges i den slutliga testrapporten.

Om artificiell belysning används skall dygnsrytmen normalt vara 12 timmar ljus, 12 timmar mörker. Detaljuppgifter om belysningsrytmen skall registreras och anges i den slutliga testrapporten.

I rapporter om djurförsök är det viktigt att ange typen av bur som har använts och antalet djur i varje bur, både under exponering för det kemiska ämnet och under en påföljande observationstid.

b) Utfodring

Fodret skall uppfylla alla näringsmässiga krav som kan ställas för den djurart som används i försöket. Om testämnena tillförs djuren via fodret kan näringsvärdet sjunka till följd av en samverkan mellan ämnet och någon beståndsdel i fodret.

Möjligheten av en sådan reaktion skall övervägas vid tolkning av testresultaten.

I fodret får inte finnas störande koncentrationer av föroreningar som man vet påverkar toxiciteten.

B. 1. AKUT TOXICITET (ORALT UPPTAG)

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet tillförs oralt genom magsond i graderade doser till flera grupper av försöksdjur, varvid varje grupp ges en bestämd dos. Därefter observeras effekter och dödsfall. Djur som dör under försöket skall obduceras, och i slutet av försöket obduceras de överlevande djuren. Denna metod är huvudsakligen avsedd för studier av gnagare.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas friska könsmogna djur slumpmässigt i behandlingsgrupper. Om så behövs löses eller uppslammas testämnet i lämplig vehikel. Om det är möjligt rekommenderas att vattenlösning används i första hand, i andra hand en lösning i vegetabilisk olja, och därefter en möjlig lösning i andra vehiklar eller i en suspension. Om inte vattenhaltiga vehiklar används skall vehikelns relevanta toxiska egenskaper vara kända eller också skall de bestämmas före eller under försöket. Hos gnagare skall volymen normalt inte överstiga 10 ml/kg kroppsvikt, utom för vattenlösningar då 20 ml/kg kan användas. Genom att justera koncentrationerna kan en konstant volym säkerställas vid alla dosnivåer och skillnader i testvolymen minimeras.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Försöksdjur

Om det inte finns kontraindikationer är råttan förstahandsvalet.

De vanligen nyttjade laboratoriestammarna skall användas. För både han- och honkön gäller att vikten hos djur som används i ett försök inte får avvika mer än ± 20 % från en rimlig genomsnittsvikt.

1.6.2.2. Antal och kön

Minst 10 gnagare (fem honor och fem hanar) används på varje dosnivå. Honorna får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga.

1.6.2.3. Dosnivåer

Till försöket skall användas ett tillräckligt antal dosnivåer, minst tre, som skall vara så valda att man uppnår en gradering av de toxiska effekterna och av dödligheten i behandlingsgrupperna. Datauppgifterna skall vara tillräckliga för framställning av en dos-responskurva och, om möjligt, för att medge en rimlig bestämning av LD_{50}.

1.6.2.4. Gränstest

En giltig uppskattning av ett testämnes akuta orala toxicitet erhålls i de flesta fall om det inom 14 dagar efter en dos på 5 000 mg/kg i den behandlade gruppen (fem djur av vardera könet) inte finns några ämnesrelaterade dödsfall.

1.6.2.5. Observationstid

Observationstiden skall vara minst 14 dagar. Observationstiden skall emellertid inte vara strikt fastställd utan skall bestämmas utifrån de toxiska reaktionerna, tidpunkten för deras uppträdande och återhämtningsperiodens längd. Den kan följaktligen förlängas när detta anses nödvändigt. Tidpunkten vid vilken tecken på toxicitet uppträder respektive försvinner och tidpunkten för dödsfall är viktiga, särskilt om det finns en tendens till att sena dödsfall inträffar.

1.6.3. *Förfarande*

Djur skall fasta innan ämnet tillförs. Råttor skall inte utfodras natten före tillförsel av ämnet; för djur med högre ämnesomsättning är det lämpligt med en kortare fasteperiod. Djuren skall ha obegränsad tillgång till vatten.

Påföljande dag skall djuren vägas och testämnet tillföras gruppvis i en enda dos med magsond.

Om det inte är möjligt att ge hela dosen på en gång kan den tillföras i mindre fraktioner över högst 24 timmar. Sedan ämnet tillförts kan foder undanhållas djuren i ytterligare tre till fyra timmar. Om en dos tillförs i fraktioner över en period kan det, beroende på periodens längd, bli nödvändigt att ge djuren foder och vatten. Efter tillförsel observeras djuren och iakttagelserna registreras systematiskt för varje enskilt djur. Den första dagen skall täta observationer göras.

En grundlig klinisk undersökning skall göras minst en gång varje arbetsdag, andra observationer skall göras dagligen och lämpliga åtgärder skall vidtas för att minimera förlust av djur som ingår i studien, t.ex. skall djur som hittas döda obduceras eller nedfrysas och svaga eller döende djur skall isoleras eller avlivas. Observation av djuren i burarna skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon och slemhinnor och även respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Särskild uppmärksamhet skall ägnas åt observation av skälvningar, kramper, salivavsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Tidpunkten för dödsfall skall registreras så noggrant som möjligt.

Djur som dör under försöket skall obduceras och i slutet av försöket obduceras överlevande djur. Alla makroskopiska patologiska förändringar skall registreras. När det är indicerat skall vävnadsprov tas för histopatologisk undersökning.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp skall anges antal djur i början av försöket, tidpunkten för enskilda djurs dödsfall, antal djur som visar andra tecken på toxicitet, beskrivning av toxiska effekter och obduktionsfynd. De enskilda försöksdjurens vikt skall bestämmas och registreras omedelbart innan testämnet tillförs, varje vecka därefter och vid dödsfall. Viktförändringar skall registreras om överlevnaden är längre än en dag efter tillförseln. LD_{50} skall bestämmas enligt en vedertagen metod. Utvärderingen av data skall omfatta eventuellt samband mellan djurens

exponering för testämnet och incidensen och svårighetsgraden av alla abnormiteter, inklusive beteendemässiga och kliniska abnormiteter, makroskopiska lesioner, ändringar av kroppsvikt, dödlighet och eventuella andra toxikologiska effekter.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv.

— Testbetingelser.

— Dosnivåer (med angivande av vehikel, om sådan används, och koncentrationer.

— Tabelluppställning av responsdata efter kön och dosnivå (dvs. antal döda djur, antal djur som uppvisar tecken på toxicitet, antal exponerade djur).

— Dödstidpunkt efter dosering.

— Observation av djuren i buren.

— LD_{50}-värde för varje kön bestämt efter 14 dagar (med angivande av bestämningsmetod).

— 95 % tillförlitlighetsintervall för LD_{50}.

— Dos-dödlighetskurva och lutning (om bestämningsmetoden medger detta).

— Obduktionsfynd.

— Eventuella histopatologiska fynd.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

B. 2. AKUT TOXICITET (INANDNING)

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Flera grupper av försöksdjur exponeras under en angiven period för testämnet i graderade koncentrationer, en bestämd koncentration per grupp. Därefter observeras effekter och dödsfall. Djur som dör under försöket skall obduceras och i slutet av försöket obduceras överlevande djur.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas friska könsmogna djur slumpmässigt i erforderligt antal behandlingsgrupper. De behöver inte utsättas för simulerad exponering om detta inte indiceras av den typ av exponeringsapparatur som används.

Vid behov kan lämplig vehikel tillsättas till testämnet för att göra det lättare att uppnå en lämplig koncentration av testämnet i atmosfären. I sådana fall skall försöket omfatta en kontrollgrupp som exponeras för vehikeln. Om vehikel eller annan additiv substans används för att underlätta dosering skall det vara påvisat att dessa inte framkallar toxiska effekter. Här kan tidigare insamlade data användas, om så bedöms vara lämpligt.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Försöksdjur

Om det inte finns kontraindikationer är råttan förstahandsvalet. De vanligen nyttjade laboratoriestammarna skall användas. För både han- och honkön gäller att vikten hos djur som används i ett försök inte får avvika mer än ± 20 % från en rimlig genomsnittsvikt.

1.6.2.2. Antal och kön

Minst 10 gnagare (fem honor och fem hanar) används på varje koncentrationsnivå. Honorna får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga.

1.6.2.3. Exponeringskoncentrationer

Till försöket skall användas ett tillräckligt antal exponeringskoncentrationer, minst tre, som skall vara så valda att man får en gradering av de toxiska effekterna och av dödligheten i behandlingsgrupperna. Datauppgifterna skall vara tillräckliga för framställning av en koncentrations-/dödlighetskurva och, om möjligt, för att medge en rimlig bestämning av LC_{50}.

1.6.2.4. Gränstest

Om fem han- och fem hondjur exponeras för 20 mg per liter av en gas eller 5 mg per liter av en aerosol eller ett finfördelat ämne i fyra timmar (eller, om detta inte är möjligt på grund av ämnets fysiska eller kemiska, inbegripet explosiva, egenskaper, den högsta uppnåbara koncentrationen) och detta inom 14 dagar inte har lett till några ämnesrelaterade dödsfall, kan det anses vara överflödigt med ytterligare försök.

1.6.2.5. Exponeringstid

Den lägsta exponeringstiden är fyra timmar.

1.6.2.6. Utrustning

Djuren skall testas med inhalationsutrustning som utformats så att den upprätthåller en dynamisk luftcirkulation med minst 12 luftväxlingar per timme, för att säkerställa en tillräcklig syrehalt och en jämnt fördelad exponeringsatmosfär. Om exponeringskammare används skall den vara så utformad att trängseln bland försöksdjuren minimeras och exponeringen för testämnet genom inandning maximeras. Som en allmän regel för att säkerställa en stabil atmosfär i en kammare, skall försöksdjurens totala "volym" inte överstiga 5 % av exponeringskammarens volym. Exponeringen kan göras genom kammare för mun-näsa, enbart huvudet eller hela försöksdjurets kropp; vid användning av de två första metoderna kan man minska möjligheten att testämnet upptas via andra vägar.

1.6.2.7. Observationstid

Observationstiden skall vara minst 14 dagar. Observationstiden skall emellertid inte vara strikt fastställd utan skall bestämmas utifrån de toxiska reaktionerna, tidpunkten för deras uppträdande och återhämtningsperiodens längd. Den kan följaktligen förlängas när detta anses nödvändigt. Tidpunkten vid vilken tecken på toxicitet uppträder respektive försvinner och tidpunkten för dödsfall är viktiga, särskilt om det finns en tendens till att sena dödsfall inträffar.

1.6.3. *Förfarande*

Omedelbart före exponering skall djuren vägas varefter de exponeras för testkoncentrationen i den aktuella apparaturen i minst fyra timmar, efter det att jämvikt har uppnåtts för koncentrationen i kammaren. Jämvikt skall uppnås på kort tid. Temperaturen under försöket skall hållas vid 22 ± 3°C. Under ideala betingelser skall den relativa luftfuktigheten hållas mellan 30 % och 70 %, men i vissa fall (t.ex. test med aerosoler) kan detta vara praktiskt ogenomförbart. Under exponeringen skall djuren undanhållas foder och vatten. Ett dynamiskt respirationssystem med ett lämpligt analytiskt kontrollsystem skall användas. Ett försökstest rekommenderas för att fastställa lämpliga exponeringskoncentrationer. Systemet skall vara sådant att det så snabbt som möjligt går att säkerställa stabila exponeringsbetingelser. Lufthastigheten skall justeras för att säkerställa att betingelserna är homogena i hela exponeringskammaren.

Mätning eller kontroll skall göras av:

a) Lufthastighet (fortlöpande).

b) Den faktiska koncentrationen av testämnet mätt i respirationszonen. Under exponeringsperioden skall koncentrationen inte avvika mer än ± 15 % från den genomsnittliga koncentrationen. En sådan kontrollnivå kan emellertid var omöjlig att uppnå vid test med stoft och vissa aerosoler, och i sådana fall kan större avvikelser accepteras. För finfördelade ämnen och aerosoler skall analys göras så ofta som möjligt, minst en gång, för att bestämma fördelningen av partikelstorleken.

c) Temperatur och luftfuktighet.

d) Under och efter exponering skall observationer göras och registreras systematiskt för varje enskilt djur. Den första dagen skall täta observationer göras. En grundlig klinisk undersökning skall göras minst en gång varje arbetsdag, andra observationer skall göras dagligen och lämpliga åtgärder skall vidtas för att minimera förlust av djur som ingår i studien, t.ex. skall djur som hittas döda obduceras eller nedfrysas och svaga eller döende djur skall isoleras eller avlivas.

   Observation av djuren i burarna skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon, slemhinnor, respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Särskilt uppmärksamhet skall ägnas åt observation av andningsbeteende, skälvningar, kramper, salivavsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Tidpunkten för dödsfall skall registreras så noggrant som möjligt. De enskilda djurens vikt skall bestämmas varje vecka efter exponeringen och vid dödsfall.

   Djur som dör under försöket skall obduceras och i slutet av försöket skall överlevande djur obduceras, särskilt med avseende på eventuella förändringar av övre och nedre andningsvägarna. Alla makroskopiska patologiska förändringar skall registreras. När det är indicerat skall vävnadsprov tas för histopatologisk undersökning.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp skall anges antal djur i början av försöket, tidpunkten för enskilda djurs dödsfall, antal djur som visar andra tecken på toxicitet, beskrivning av toxiska effekter och obduktionsfynd. De enskilda försöksdjurens vikt skall bestämmas och registreras om överlevnaden överstiger en dag efter exponeringen. LC_{50} skall bestämmas enligt en vedertagen metod. Utvärderingen av data skall omfatta eventuellt samband mellan djurens exponering för testämnet och incidensen och svårighetsgraden av alla abnormiteter, inklusive beteendemässiga och kliniska abnormiteter, makroskopiska lesioner, ändringar av kroppsvikt, dödlighet och eventuella andra toxikologiska effekter.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv.

— Testbetingelser.

— Beskrivning av exponeringsapparaturen, inklusive utformning, typ, dimensioner, luftkälla, system för framställning av finfördelade ämnen och aerosoler, metod att konditionera luften och sätt att hålla djuren i en försökskammare när sådan används.

  Utrustning för mätning av temperatur, luftfuktighet och finfördelade aerosolers koncentration och storlek skall beskrivas.

Exponeringsdata

Dessa skall ställas upp i tabellform och presenteras med medelvärden och ett spridningsmått (t.ex. standardavvikelse) och skall, om möjligt, omfatta:

a) lufthastighet genom inhalationsutrustningen,

b) luftens temperatur och fuktighet,

c) nominella koncentrationer (total mängd testämne som tillförts inhalationsutrustningen, dividerat med luftvolymen);

d) typ av vehikel, om sådan används;

e) faktiska koncentrationer i försökets respirationszon;

f) partiklarnas medianstorlek;

g) jämviktsperiod;

h) exponeringstid.

— Tabelluppställning av responsdata efter kön och exponeringsnivå (dvs. antal döda djur, antal djur som uppvisar tecken på toxicitet, antal exponerade djur).

— Dödstidpunkt under eller efter exponering.

— Observation av djuren i bur.

— LC_{50}-värde för varje kön bestämt i slutet av observationsperioden (med angivande av bestämningsmetod).

— 95 % tillförlitlighetsintervall för LC_{50}.

— Dos-/dödlighetskurva och lutning (om bestämningsmetoden medger detta).

— Obduktionsfynd.

— Eventuella histopatologiska fynd.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

B. 3. AKUT TOXICITET (UPPTAG GENOM HUDEN)

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet appliceras i graderade doser på huden till flera grupper av försöksdjur, en bestämd dos per grupp. Därefter observeras effekter och dödsfall. Djur som dör under försöket skall obduceras och i slutet av försöket obduceras överlevande djur.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelserna vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas friska könsmogna djur slumpmässigt i behandlingsgrupper. Ungefär 24 timmar före testet skall päls avlägsnas från djurens rygg genom klippning eller rakning. Vid klippning eller rakning skall försiktighet iakttas så att huden inte skadas, vilket kan ändra dess genomtränglighet. Minst 10 % av kroppsytan skall göras klar för applicering av testämnet. Vid test av fasta ämnen, som får pulvriseras om det är lämpligt, skall testämnet fuktas tillräckligt med vatten eller, vid behov med lämplig vehikel, för att säkerställa god kontakt med huden. När vehikel används skall hänsyn tas till vehikelns inverkan på testämnets penetrering av huden. Flytande testämnen används vanligen outspädda.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Försöksdjur

Vuxna råttor eller kaniner får användas. Andra arter kan användas men i så fall skall detta motiveras. De vanligen nyttjade laboratoriestammarna skall användas. För både han- och honkön gäller att vikten hos djur som används i ett försök inte får avvika mer än ± 20 % från en rimlig genomsnittsvikt.

1.6.2.2. Antal och kön

Minst 10 djur (fem honor och fem hanar) med frisk, oskadad hud skall användas på varje dosnivå. Honorna får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Användning av ett mindre antal djur kan ibland vara motiverat, särskilt beträffande kaniner.

1.6.2.3. Dosnivåer

Till försöket skall användas ett tillräckligt antal dosnivåer, minst tre, som skall vara så valda att man får en gradering av de toxiska verkningarna och av dödligheten i behandlingsgrupperna. När dosnivåerna bestäms skall hänsyn tas till eventuellt irriterande eller frätande effekter. Datauppgifterna skall vara tillräckliga för framställning av en dos-/responskurva och, om möjligt, för att medge en rimlig bestämning av LD_{50}.

1.6.2.4. Gränstest

Om vid ett förberedande test en dos på 2 000 mg/kg appliceras på fem han- och fem hondjurs oskadade hud och detta inom 14 dagar inte medför ämnesrelaterade dödsfall, kan det anses vara överflödigt med ytterligare försök med andra dosnivåer.

1.6.2.5. Observationsperiod

Observationstiden skall vara minst 14 dagar. Observationstiden skall emellertid inte vara strikt fastställd utan skall bestämmas utifrån de toxiska reaktionerna, tidpunkten för deras uppträdande och återhämtningsperiodens längd. Den kan följaktligen förlängas när detta anses nödvändigt. Tidpunkten vid vilken tecken på toxicitet uppträder respektive försvinner och tidpunkten för dödsfall är viktiga, särskilt om det finns en tendens till att sena dödsfall inträffar.

1.6.3. *Förfarande*

Djuren skall hållas i var sin bur. Testämnet skall appliceras jämnt över ett område som motsvarar ungefär 10 % av den totala kroppsytan. Vid användning av kraftigt toxiska ämnen kan en mindre yta täckas, men ämnet skall appliceras på ytan i ett så tunt och jämnt lager som möjligt.

Testämnen skall hållas i kontakt med huden med ett poröst gasförband och icke hudirriterande tejp under en 24 timmar lång exponeringstid. Testytan skall vidare täckas på lämpligt sätt för att säkerställa att gasförbandet och testämnet hålls på plats så att djuren inte kan svälja testämnet. För att förhindra att djuren intar testämnet kan rörelsehindrande anordningar användas, men total immobilisering rekommenderas inte.

I slutet av exponeringsperioden skall resterande testämne avlägsnas, i lämpliga fall med vatten eller med annan lämplig metod för rengöring av huden.

Observationer skall registreras systematiskt när de görs. Varje enskilt djur skall registreras separat. Den första dagen skall täta observationer göras. En grundlig klinisk undersökning skall göras minst en gång varje arbetsdag, andra observationer skall göras dagligen och lämpliga åtgärder skall vidtas för att minimera förlust av djur som ingår i studien, t.ex. skall djur som hittas döda obduceras eller nedfrysas och svaga eller döende djur skall isoleras eller avlivas.

Observation av djuren i burarna skall omfatta pälsförändringar, behandlad hud, ögon och slemhinnor, respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Särskilt uppmärksamhet skall ägnas åt observation av skälvningar, kramper, salivavsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Tidpunkten för dödsfall skall registreras så noggrant som möjligt. Djur som dör under försöket skall obduceras och i slutet av försöket skall överlevande djur obduceras. Alla makroskopiska patologiska förändringar skall registreras. När det är indicerat skall vävnadsprov tas för histopatologisk undersökning.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp skall anges antal djur i början av försöket, tidpunkten för enskilda djurs dödsfall, antal djur som visar andra tecken på toxicitet, beskrivning av toxiska effekter och obduktionsfynd. De enskilda försöksdjurens vikt skall bestämmas och registreras omedelbart innan testämnet appliceras, därefter varje vecka och vid dödsfall. Viktförändringar skall beräknas och registreras om överlevnaden överstiger en dag efter applicering av testämnet. LD_{50} skall bestämmas enligt en erkänd metod.

Utvärderingen av data skall omfatta eventuellt samband mellan djurens exponering för testämnet och incidensen och svårighetsgraden av alla abnormiteter, inklusive beteendemässiga och kliniska abnormiteter, makroskopiska lesioner, ändringar av kroppsvikt, dödlighet och eventuella andra toxikologiska effekter.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv.

— Testbetingelser (inklusive metod för hudrengöring).

— Dosnivåer (med angivande av vehikel, om sådan används, och koncentrationer).

— Tabelluppställning av responsdata efter kön och dosnivå (dvs. antal döda djur, antal djur som uppvisar tecken på toxicitet, antal exponerade djur).

— Dödstidpunkt efter dosering.

— Observation av djuren i bur.

— LD_{50}-värde för varje kön bestämt efter 14 dagar med angivande av bestämningsmetod.

— 95 % tillförlitlighetsintervall för LD_{50} (där detta är möjligt).

— Dos-dödlighetskurva och lutning (om bestämningsmetoden medger detta).

— Obduktionsfynd.

— Eventuella histopatologiska fynd.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

B. 4. AKUT TOXICITET

HUDIRRITATION

1. **METOD**

1.1 **Inledning**

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2 **Definition**

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3 **Referensämnen**

Inga.

1.4. **Testmetodsprincip**

Testämnet appliceras i en engångsdos på huden på ett antal försöksdjur, som vart och ett fungerar som sin egen kontroll. Efter ett visst intervall bedöms och klassificeras graden av irritation. En fullständig utvärdering görs med en detaljerad beskrivning av effekterna. Observationer skall göras under tillräckligt lång tid för att möjliggöra en fullständig utvärdering av de observerade effekternas reversibilitet.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Inga.

1.6 **Metodbeskrivning**

1.6.1 *Förberedelser*

Ungefär 24 timmar innan testet inleds skall päls avlägsnas från försöksdjurens rygg genom klippning eller rakning.

Vid klippning eller rakning skall försiktighet iakttas så att huden inte skadas. Endast djur med frisk oskadad hud skall användas.

Vid test av fasta ämnen (som i nödvändiga fall får pulvriseras), skall testämnet fuktas tillräckligt med vatten eller om så behövs med lämplig vehikel för att säkerställa god kontakt med huden. När vehikel används skall hänsyn tas till vehikelns effekt på hudirritation som testämnet kan ge upphov till. Flytande testämnen används vanligen outspädda.

Starkt sura eller alkaliska testämnen behöver inte undersökas primärt för hudirritation, då deras frätande egenskaper är förutsägbara. Det behöver inte heller vara nödvändigt att undersöka ämnen som har visat sig vara mycket giftiga vid upptag genom huden.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Försöksdjur

Även om flera däggdjursarter kan användas som försöksdjur är albinokaninen förstahandsvalet.

1.6.2.2 Antal djur

Minst tre friska könsmogna djur används. Det kan bli nödvändigt att använda fler djur för att klarlägga osäkra responser.

1.6.2.3 Dosnivå

Om inga kontraindikationer finns appliceras 0,5 ml flytande eller 0,5 ml halvfast testämne på hudområdet. Det är inte nödvändigt att använda en kontrollgrupp med obehandlade djur. Intilliggande, obehandlade hudområden på varje djur fungerar som kontroll.

1.6.2.4 Observationsperiod

Observationsperioden skall inte vara strikt fastställd. Den skall vara tillräckligt lång för att medge en fullständig utvärdering av de observerade effekternas reversibilitet eller irreversibilitet. Den behöver normalt inte överskrida 14 dagar efter applicering.

1.6.3 *Förfarande*

Djuren skall hållas i var sin bur. Testämnet skall appliceras på ett litet hudområde (ungefär 6 cm) som täcks med en liten kompress som hålls på plats med icke hudirriterande tejp. När flytande testämnen och vissa pastor används kan det vara nödvändigt att applicera testämnet på kompressen som därefter placeras på huden. Under exponeringsperioden skall kompressen hållas i lös kontakt med huden medelst ett lämpligt semi-ocklusivförband. I vissa fall kan det emellertid vara lämpligt att överväga användning av ett ocklusivförband. Djuren skall vara förhindrade att komma åt kompressen så att de därigenom kan svälja/inandas testämnet.

Exponeringstiden är fyra timmar. Vid misstanke om att ämnet kan framkalla en allvarlig hudreaktion (dvs. vara frätande) skall exponeringstiden minskas (t.ex. till en timme eller tre minuter).

Om en allvarlig hudreaktion iakttas vid kortare exponeringstid än fyra timmar behöver testet inte upprepas med fyra timmars exponeringstid. Längre exponeringar kan vara indikerade under vissa betingelser, t.ex. om detta motiveras av människans förväntade användning och exponering. I slutet av exponeringstiden skall kvarblivande testämne avlägsnas, i lämpliga fall med vatten eller med lämpligt lösningsmedel, utan att den aktuella responsen eller överhuden påverkas.

1.6.3.1 Observation och klassificering

Djuren skall observeras för tecken på hudrodnad och ödem och responsen skall registreras efter 30—60 minuter samt 24, 48 och 72 timmar efter borttagande av kompressen. Hudirritation klassificeras och registreras enligt systemet i tabell 1. Det kan vara nödvändigt med ytterligare observationer för att fastställa reversibilitet. Utöver observationen av irritationen skall eventuella allvarliga skador som frätsår (irreversibel förstörelse av hudvävnad) och andra toxiska effekter beskrivas till fullo.

2. **DATA**

Data skall ställas upp i tabellform och för varje enskilt djur skall anges klassificering av hudrodnad och ödem under hela observationsperioden. Alla allvarliga skador, graden och arten av irritationen, reversibilitet och frätsår samt eventuella andra toxiska effekter skall registreras.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv.

— Testbetingelser (inklusive det aktuella kemiska ämnets fysisk-kemiska egenskaper och metoden att förbereda och rengöra huden).

— Tabelluppställning av irritationsresponsen hos varje enskilt djur för varje observationstillfälle (t.ex. efter 1, 24, 48 och 72 timmar osv. efter borttagande av kompressen).

— Beskrivning av alla allvarliga skador som observerats, inklusive frätsår.

— Beskrivning av graden och arten av irritation som observerats och alla histopatologiska fynd.

— Beskrivning av alla toxiska effekter utöver hudirritation.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

Tillägg

TABELL: GRADERING AV HUDREAKTION

Hudrodnad och sårskorpebildning

	Värde
Ingen hudrodnad	0
Mycket liten hudrodnad (knappt diagnosticerbar)	1
Väldefinierad hudrodnad	2
Medelsvår till allvarlig hudrodnad	3
Allvarlig hudrodnad (rödbetsröd) till viss sårskorpebildning (djupgående skador)	4

Ödembildning

Ingetödem	0
Mycket litet ödem (knappt diagnosticerbart)	1
Litet ödem (väldefinierat område avgränsat av otvetydig svullnad)	2
Medelsvårt ödem (avgränsat av 1 mm svullnad)	3
Allvarligt ödem (mer än 1 mm svullnad och utbredning utanför exponeringsområdet)	4

B. 5. AKUT TOXICITET

ÖGONIRRITATION

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet instilleras i en engångsdos i ena ögat på ett antal försöksdjur. Det obehandlade ögat används som kontroll. Efter vissa intervaller bedöms och klassificeras graden av irritation. En fullständig utvärdering görs med en detaljerad beskrivning av effekterna. Observationer skall göras under tillräckligt lång tid för att göra det möjligt att utvärdera om de observerade effekterna är helt reversibla eller irreversibla.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

Inom 24 timmar innan testet inleds skall en noggrann undersökning göras av båda ögonen på varje uttaget försöksdjur. Djur som företer ögonirritation, ögondefekter eller tidigare hornhinneskador skall inte användas. Starkt alkaliska eller sura testämnen och ämnen som vid en tidigare hudirritationsstudie eller annat test har visat sig vara uttryckligen frätande, behöver inte testas för ögonirritation.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Försöksdjur

Även om många olika däggdjursarter kan övervägas som försöksdjur rekommenderas användning av friska könsmogna albinokaniner.

1.6.2.2. Antal djur

Minst tre djur skall används. Det kan bli nödvändigt att använda fler djur för att klarlägga osäkra responser.

1.6.2.3. Dosnivå

Vid test av flytande ämnen används en dos på 0,1 ml. Vid test av fasta ämnen, pastor och finfördelade fasta ämnen skall den använda mängden ha en volym på 0,1 ml eller en vikt på ungefär 0,1 g (vikten skall alltid registreras). Fasta och pulverformiga testämnen mals till fina stoftpartiklar. Volymen av finfördelade ämnen skall mätas efter lätt sammanpackning, t.ex. genom lätta slag på mätkärlet.

1.6.2.4. Observationsperiod

Observationsperioden skall inte vara strikt fastställd. Den skall vara tillräckligt lång för att medge en utvärdering av de observerade effekternas reversibilitet eller irreversibilitet. Den behöver normalt inte överskrida 21 dagar efter instillation.

1.6.3. *Förfarande*

Djuren skall hållas i var sin bur. På varje djur instilleras testämnet i ena ögats bindhinnesäck medan nedre ögonlocket försiktigt hålls borta från ögongloben. Därefter skall ögonlocken mjukt hållas slutna i ungefär en sekund för att förhindra att ämnet rinner ut. Det obehandlade ögat fungerar som kontroll.

Försöksdjurens ögon skall inte sköljas på 24 timmar efter instillation av testämnet. Efter 24 timmar kan sköljning göras om det bedöms lämpligt.

Om ett ämne i denna test har visat sig vara irriterande kan undersökning göras av värdet av att skölja ögat för att minska irritationen eller andra skadeverkningar. I sådana fall rekommenderas användning av sex kaniner. Fyra sekunder efter instillation av testämnet sköljs ögonen på tre kaniner och 30 sekunder efter instillation av testämnet sköljs ögonen på resterande tre kaniner. För båda grupperna skall ögonen sköljas i fem minuter med en vätskevolym och ett vätskeflöde som inte skadar ögat.

1.6.3.1. Observation och gradering

Ögonen skall undersökas efter 1, 24, 48 och 72 timmar. Om det inte finns några tecken på irritation efter 72 timmar kan studien avslutas.

Vid ihållande hornhinneskada eller annan ögonirritation kan det vara nödvändigt med förlängd observationstid för att bestämma utvecklingen av skadorna och deras reversibilitet eller irreversibilitet. Utöver observationerna av hornhinnan, regnbågshinnan och bindhinnan skall eventuella andra observerade skador registreras och rapporteras. Graderingen av ögats reaktion (se tabell) skall registreras vid varje undersökning. Graderingen av ögats responser är föremål för olika tolkningar. För att underlätta för försökslaboratorier och personal som utför och tolkar observationerna kan en illustrerad vägledning om ögonirritationer användas.

Undersökning av reaktioner kan underlättas medelst en binokulär lupp, handhållen spaltlampa, biomikroskop och andra lämpliga instrument. Efter registrering av de första 24 timmarnas observationer kan ögonen på ett antal eller samtliga kaniner undersökas ytterligare medelst fluorescein.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje enskilt djur skall anges en granskning av ögonirritation vid ett givet observationstillfälle. En beskrivning av graden och arten av irritation, förekomsten av allvarliga skador och eventuella andra effekter som har observerats utöver dem på ögat, skall rapporteras.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Data om djuret (art, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv.).

— Testbetingelser (inklusive relevanta fysisk-kemiska egenskaper hos testämnet).

— Tabelluppställning av irritations-frätresponsen hos varje enskilt djur för varje obserövationstillfälle (t.ex. efter 1, 24, 48 och 72 timmar).

— Beskrivning av alla allvarliga skador som observerats.

— Redogörelse för graden och arten av irritation eller frätsår som observerats, inklusive reversibilitet.

— Beskrivning av metod som använts för att klassificera irritationen efter 1, 24, 48 och 72 timmar (t.ex. handhållen spaltlampa, biomikroskop, fluorescein).

— Beskrivning av eventuellt registrerade lokala effekter utanför ögat.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

Tillägg

TABELL: GRADERING AV ÖGONSKADOR

Hornhinnan

Grumling: grad av grumlighet (bedömning av det grumligaste området)	
Ingen sårbildning eller grumling	0
Spridda eller diffusa grumliga områden (annat än en lätt avmattning av normal glans), regnbågshinnan klar och synlig	1
Omedelbart skönjbart genomskinligt område, lätt fördunkling av regnbågshinnans detaljer	2
Pärlemorskimrande område, detaljerna i regnbågshinnan inte synliga, pupillstorleken knappt skönjbar	3
Grumlig hornhinna, regnbågshinnan inte skönjbar genom grumligheten	4

Regnbågshinnan

Normal	0
Markant djupare rugae, kongestion, svullnad, måttlig hyperemi omkring hornhinnan, eller injektion, ett eller flera av dessa symptom, regnbågshinnan reagerar fortfarande på ljus (trög reaktion är positiv)	1
Ingen reaktion på ljus, blödning, makroskopisk förstörelse (ett eller flera av dessa symptom)	2

Bindhinnan

Rodnad (avser ögonlocks- och ögonglobsbindhinna, hornhinna och regnbågshinna)	
Normala blodkärl	0
Vissa blodkärl tydligt hyperemiska (injicerade)	1
Diffus, högröd färg, enskilda kärl inte klart skönjbara	2
Diffus blodröd färg	3
Kemos: ögonlock och/eller blinkhinnor	
Ingen svullnad	0
Onormal svullnad (inklusive blinkhinnor)	1
Tydlig svullnad med partiell utåtvridning av ögonlocken	2
Svullnad med halvt slutna ögonlock	3
Svullnad med ögonlocken mer än halvt slutna	4

B. 6. AKUT TOXICITET

HUDSENSIBILISERING

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip/Maximeringstest på marsvin

Efter en första exponering för ett testämne (*induktionsperioden*) utsätts djuren, två veckor efter den sista induktionsexponeringen, för en provokationsmängd av testämnet för att fastställa om hypersensibilitet har framkallats. Sensibilisering bestäms genom undersökning av hudens reaktion på provokationsexponeringen.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

Unga friska djur (under ett år gamla) fördelas slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. Före testet rakas eller klipps pälsen bort från skulderområdet. Försiktighet skall iakttas för att inte skada huden.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Försöksdjur

Som försöksdjur används albinomarsvin.

1.6.2.2 Antal och kön

Han- och/eller hondjur kan användas. Om honor används får de inte ha fött ungar och de får inte vara dräktiga. 20 djur används i behandlingsgruppen och minst 10 i kontrollgruppen. Om färre djur används skall detta motiveras.

1.6.2.3. Dosnivåer

Koncentrationen av testämnet anpassas till den högsta nivå som djuren har tolererat väl i varje induktionsstadium.

Provokationskoncentrationen skall inte framkalla några tecken på hudirritation hos icke-sensibiliserade djur. Dessa koncentrationer kan bestämmas i en mindre pilotstudie (t.ex. med två eller tre djur).

1.6.2.4. Observationsperiod

Under induktionsperioden skall huden observeras för möjliga irritationseffekter. 48 och 72 timmar efter provokationsexponeringen registreras hudreaktionerna.

1.6.3. Förfarande

Djuren vägs innan testet inleds och när det har avslutats. Pälsen avlägsnas från skulderområdet. Förfarandet består av två stadier:

1.6.3.1. Induktion

Dag 0 — behandlingsgrupp

Följande intradermala injektioner ges parvis i skulderområdet varvid varje injektionspar placeras på vardera sidan om mittlinjen.

1. 0,1 ml Freunds kompletta adjuvans (FCA).

2. 0,1 ml testämne, i lämpliga fall i vehikel.

3. 0,1 ml testämne i FCA.

Injektionerna 1 och 2 ges tätt efter varandra och närmast huvudet. Injektion 3 placeras i den bakersta delen av testområdet.

Dag 0 — kontrollgrupp

Följande intradermala injektioner ges parvis på samma ställen som ovannämnda.

1. 0,1 ml FAC.

2. 0,1 ml vehikel.

3. 0,1 ml vehikel i FCA.

Dag 7 — behandlingsgrupp

Pälsen avlägsnas åter från testområdet. Testämnet i lämplig vehikel (är det fråga om vätskor kan dessa påföras direkt) fördelas över ett filtrerpapper som placeras på testområdet. Filtrerpapperet hålls på plats och i kontakt med huden medelst lämpligt förband i 48 timmar.

Dag 7 — kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas åter från testområdet. Enbart vehikeln appliceras på samma sätt på testområdet och hålls i kontakt med huden medelst lämpligt förband i 48 timmar.

1.6.3.2. Provokation

Dag 21

Pälsen avlägsnas från flanken på djuren i behandlings- och kontrollgruppen. På försöksdjurens vänstra flank anbringas en lapp eller kammare innehållande testämnet och på höger flank anbringas en lapp eller kammare med enbart vehikeln.

Lapparna hålls i kontakt med huden medelst lämpliga förband i 24 timmar.
Kontrollgruppen exponeras på samma sätt.

Dag 23 och 24.

— 21 timmar efter borttagande av lappen rengörs provokationsområdet och rakas vid behov.

— Tre timmar därefter (48 timmar från provokationsexponeringens början) observeras och registreras hudens reaktion.

— 24 timmar efter denna observation görs en andra observation (72 timmar) och registreras även den.

För att klargöra resultaten från den första provokationen kan en andra provokation, vid behov med en ny kontrollgrupp med vehikelexponering, övervägas ungefär en vecka efter den första exponeringen.

1.6.3.3. Observation och gradering

Alla hudreaktioner och ovanliga fynd efter induktions- och provokationsförfaranden skall antecknas och rapporteras.

2. **DATA**

Data skall ställas upp i tabellform och för varje djur anges hudreaktionerna för varje observationstillfälle.

3. **RAPPORTERING**

3.1. **Testrapport**

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använd marsvinsstam.

— Testbetingelser.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Varje djurs vikt vid testets början och slut.

— Varje enskild observation av varje djur, inklusive klassificeringssystem om sådant använts.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B (punkt D).

Anmärkningar

Maximeringstest på marsvin (GPMT) är ett mycket använt test av adjuvanstyp. Även om ett antal metoder (se tillägget) kan användas för att upptäcka ett ämnes potential att framkalla en sensibiliserande hudreaktion, anses GPMT vara förstahandsmetoden (referensmetoden). Denna metods känslighet och förmåga att upptäcka för människans hud potentiellt sensibiliserande ämnen anses vara av stor betydelse i ett klassificeringssystem för toxicitet av betydelse för folkhälsan. Ett eventuellt val av ett alternativt test skall vara motiverat av kriterier som säkerställer dess giltighet. Ett av dessa kriterier kan vara en förväntad respons på standardallergener som 2,4-dinitroklorbensen eller p-fenylendiamin eller något annat verksamt sensibiliserande ämne som lämpar sig för den grupp av ämnen som undersöks.

Det finns inte någon enskild testmetod som kan användas för att med säkerhet identifiera alla ämnen med potentiellt sensibiliserande effekt på människans hud och som kan användas för alla ämnen.

Sådana faktorer som ämnets fysiska egenskaper, inklusive dess förmåga att tränga igenom huden och det sätt på vilket ämnet kommer i kontakt med de människor som förmodas bli utsatta för det, skall övervägas vid valet av testmetod. Test med marsvin kan delas in i test av adjuvanstyp, varvid ett allergiskt tillstånd förstärks genom att testämnet upplöses eller uppslammas i Freunds kompletta adjuvans (FCA), och test av icke-adjuvanstyp. I vissa fall kan det finnas goda skäl att välja ett test som medför lokal applicering snarare än intradermal injektion, som vid maximeringstestet på marsvin. Även här skall hänsyn tas till testämnets fysiska egenskaper och de betingelser under vilka människan förmodas bli utsatt för ämnet.

Oavsett vilken metod som används skall sensibiliseringen hos den marsvinsstam som används till hudsensibiliseringstest kontrolleras med jämna intervaller (sex månader) medelst användning av kända starka och medelstarka sensibiliserande ämnen, och ett tillfredsställande antal positiva responser skall uppnås.

Tillägg

	Draize	Freunds kompletta adjuvans (FCA)	Mauer optimering	Buehler	Öppet epikutant test	Spjälkad adjuvans
Djurart	Marsvin	Marsvin	Marsvin	Marsvin	Marsvin	Marsvin
Administrationssätt	intradermalt (ic)	intradermalt (id)	intradermalt (id)	epikutant (ek)	epikutant (ek)	id och ek
Antal i testgrupp	20	8–10	10–10	10–20	6–8	10–20
Antal testgrupper	1	1	1	1	1–6	1
Antal i kontrollgrupp	20	8–10	10–10	10–20	6–8	10–20
Administrationssätt vid induktionsexponering	id	id	id	dermalt	dermalt	id och dermalt
Antal exponeringar	10	5	9	3	20 eller 21	4
Exponeringsperiod	—	—	24 tim	6 tim var	fortlöpande	48 tim var
Lapptyp	—	—	—	sluten	öppen	sluten
Testgrupp(er) TÄ(1)	TÄ(1)	TÄ i FCA	TÄ i FCA	TÄ	TÄ	TÄ1
Kontrollgrupp	—	FCA enbart	—	—	vehikel (v) enbart	—
Plats	vänster flank	höger flank	rygg	vänster flank	höger flank	skuldra
Frekvens	varannan dag	varannan dag	varannan dag	var 7 dag	dagligen	0, 2, 4, 7 dag
Duration	0–18 dagar	0–8 dagar	0–21 dagar	0–14 dagar	0–20 dagar	0–7 dagar
Koncentration	2–10 ggr sa mycket som vid första	samma hela tiden	0,1 ml à 0,1 %	samma hela tiden	samma per grupp, olika för grupperna	samma hela tiden
Provokationsexponering						
Administrationssätt	id	dermalt	id	dermalt	dermalt	dermalt
Antal exponeringar	1	2	2	1	2	1
Dag(ar)	35	22 och 35	14 och 28	28	21 och 35	20
Exponeringsperiod	—	—	24 tim	6 tim	—	24 tim
Lapptyp	—	öppen	—	sluten	öppen	sluten
Testgrupp(er) TÄ	TÄ	TÄ	TÄ	TÄ	TÄ	TÄ
Kontrollgrupp	TÄ	TÄ	TÄ	TÄ	TÄ	TÄ
Plats	höger flank	vänster flank	rygg, ny plats	höger flank	vänster flank	skuldra
Koncentration	samma som första	4 olika	0,1 ml à 0,1 %	samma som första	4 olika	halv induktion
Utvärdering (tim efter provokation)	24, 48	23, 48, 72	24	24, 48	24, 48 och/eller 72	24, 48

(1) TÄ = Testämne

B. 7. SUBAKUT TOXICITET (ORALT UPPTAG)

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet tillförs oralt dagligen i graderade doser till flera grupper av försöksdjur, varvid varje grupp ges en bestämd dos i 28 dagar. Under doseringsperioden observeras djuren dagligen för tecken på toxicitet. Djur som dör under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas och obduceras de överlevande djuren.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

I minst fem dagar före testet skall djuren hållas under testbetingelserna vad beträffar miljö och utfodring. Före testet fördelas friska könsmogna djur slumpmässigt i behandlingsgrupper. Testämnena kan tillföras via fodret, medelst magsond, i kapslar eller i dricksvattnet. Administrationssättet skall vara detsamma för alla djur under hela behandlingsperioden. Om vehikel eller annan tillsats används för att underlätta doseringen skall det vara fastställt att den inte framkallar några toxiska effekter. I lämpliga fall kan tidigare insamlade data användas.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Försöksdjur

Om det inte finns kontraindikationer är råttan förstahandsvalet. De vanligen nyttjade laboratoriestammarna med unga friska djur skall användas. Helst skall doseringen påbörjas innan råttorna är sex veckor gamla, men under alla omständigheter innan de är åtta veckor gamla. Vid testets början får vikten hos de aktuella djuren inte avvika mer än ± 20 % från en rimlig genomsnittsvikt.

1.6.2.2. Antal och kön

Minst 10 gnagare (fem honor och fem hanar) används på varje dosnivå. Honorna får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av djur under testet skall det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt skall avlivas innan studien slutförs. Dessutom kan en satellitgrupp bestående av 10 djur (fem av vardera könet) tillföras den högsta dosen i 28 dagar och därefter observeras i 14 dagar efter testet för reversibilitet, persistens eller fördröjt uppträdande av toxiska effekter.

1.6.2.3. Dosnivåer

Till testet skall användas minst tre dosnivåer samt en kontrollgrupp. Djuren i kontrollgruppen skall behandlas på samma sätt som djuren i behandlingsgruppen, bortsett från att de inte skall tillföras testämnet. Om vehikel används för att underlätta dosering skall kontrollgruppen tillföras vehikeln på samma sätt som behandlingsgrupperna. Vidare skall vehikeln tillföras kontrollgruppen i samma mängd som emottas av försöksdjuren i gruppen som ges den högsta dosnivån. Den högsta dosnivån skall ge toxiska effekter men inga, eller få, dödsfall. Den lägsta dosnivån skall inte ge några tecken på toxicitet. Om det finns en användbar uppskattning av människans exponering för ämnet skall den lägsta nivån vara högre än denna. Helst skall medeldosen ge minsta möjliga observerbara toxiska effekter. Om fler än en medeldos används skall dosnivåerna väljas på ett sådant sätt att en gradering av de toxiska effekterna erhålls. I grupperna som utsätts för låg- och medeldoser och i kontrollgruppen skall antalet dödsfall hållas på en låg nivå för att utvärderingen av resultaten skall vara meningsfylld.

Om testämnet tillförs via fodret kan man använda antingen en konstant koncentration (ppm eller mg/kg i fodret) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet skall anges. För ett ämne som tillförs medelst magsond skall dosen ges vid samma tid varje dag och dosnivåerna skall justeras med jämna mellanrum (var eller varannan vecka) så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt.

1.6.2.4. Gränstest

Om det vid ett 28 dagar långt test enligt nedan beskriven metod fastställs att en dosnivå på 1 000 mg/kroppsvikt/dag, eller en högre dosnivå om detta motiveras av kunskaper om den exponering som människan eventuellt utsätts för, inte ger några tecken på toxiska effekter, kan ytterligare test anses vara överflödiga. Om ämnen med låg toxicitet tillförs via fodret är det viktigt att säkerställa att mängderna av och egenskaperna hos det aktuella testämnet inte påverkar de normala näringsmässiga kraven.

1.6.2.5. Observationstid

Alla djuren skall observeras dagligen och tecken på toxicitet skall registreras tillsammans med tidpunkten då de uppträdde samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten då tecken på toxicitet uppträder och försvinner skall registreras.

1.6.3. *Förfarande*

Den ideala doseringen är att testämnet tillförs dagligen, sju dagar i veckan under 28 dagar. Djur i en eventuell satellitgrupp som planerats för uppföljning skall observeras i ytterligare 14 dagar utan någon behandling så att det kan fastställas om de toxiska effekterna försvinner eller om de håller i sig.

Observation av djuren i burarna skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon och slemhinnor och även respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Foderförbrukningen (och vattenkonsumtionen om testämnet tillförs via dricksvattnet) skall mätas varje vecka och djuren skall vägas en gång i veckan.

Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för att säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testet avlivas och obduceras alla överlevande djur utom djuren i satellitgruppen. Så snart döende djur upptäcks skall dessa avlägsnas och obduceras.

I slutet av testet skall alla djur inklusive kontrollgruppen genomgå följande undersökning:

1. Hematologi omfattande minst hematokrit, hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning och differentialräkning av leukocyter samt ett mått på koaguleringsförmågan.

2. Klinisk biokemisk analys av blodet omfattande minst en lever- och njurfunktionsparameter: alanin-aminotransferas (tidigare kallat glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminas, GPT), serum-aspartat-aminotransferas (tidigare kallat glutaminsyra-oxalättiksyra-transaminas, GOT), och urinämne, kväve, äggviteämnen, blod-kreatinin, totalt bilirubin och totalt serumprotein.

Andra bestämningar som kan vara nödvändiga för en adekvat toxikologisk utvärdering är kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, glukos efter fasta, lipidanalys, hormoner, syra/basbalansen, methemoglobin och kolinesterasaktivitet.

Ytterligare kliniska biokemiska analyser kan vid behov utföras för att vidare utreda de observerade effekterna.

1.6.3.1. Makroskopisk undersökning

Alla försöksdjur skall genomgå en fullständig makroskopisk undersökning. Lever, njurar, binjurar och testiklar skall vägas våta så snart som möjligt efter dissektion för att undvika uttorkning. Organ och vävnader (lever, njurar, binjurar och hjärta samt andra organ som företer allvarliga skador eller storleksförändringar) skall förvaras i lämpligt medium för eventuell senare histopatologisk undersökning.

1.6.3.2. Histopatologisk undersökning

Histologisk undersökning skall göras av bevarade organ och vävnader från högdosgruppen och kontrollgruppen. Organ och vävnader, hämtade från gruppen som fått den högsta dosnivån, som uppvisar defekter som kan tillskrivas testämnet, skall undersökas i alla grupper som fått lägre dos. Djur i en eventuell satellitgrupp skall genomgå histologisk undersökning, särskilt de organ och vävnader som har utvisat effekter i de övriga behandlingsgrupperna.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp anges antal djur i början av testet och antal djur som företer varje typ av skada.

Alla observerade resultat skall utvärderas medelst lämplig statistisk metod. Alla vedertagna statistiska metoder kan användas.

3. RAPPORTERING

3.1. **Testrapport**

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv.

— Testbetingelser.

— Dosnivåer (med angivande av vehikel, om sådan används, och koncentrationer.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos.

— Icke toxisk dos, om sådan har fastställts.

— Tidpunkten för dödsfall under testet eller överlevnad till slutet av testet.

— Toxiska och andra effekter.

— Tidpunkten för observation av varje abnormt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Hematologiska undersökningar och alla resultat.

— Kliniska biokemiska analyser och alla resultat.

— Obduktionsfynd.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Statistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

B. 8. SUBAKUT TOXICITET (INANDNING)

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Flera grupper av försöksdjur exponeras dagligen i 28 dagar för testämnet i graderade koncentrationer, en bestämd koncentration per grupp. Om vehikel används för att underlätta framtagning av lämplig koncentration av testämnet i luften, skall kontrollgrupp som utsätts för vehikeln användas. Under administrationsperioden observeras djuren dagligen för tecken på toxicitet. Djur som dör under testet skall obduceras och i slutet av testet avlivas och obduceras överlevande djur.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

I minst fem dagar före testet skall djuren hållas under testbetingelser med hänsyn till miljö och utfodring. Före testet fördelas friska könsmogna djur slumpmässigt i erforderligt antal grupper. Vid behov skall en lämplig vehikel tillsättas till testämnet för att underlätta framtagning av lämplig koncentration av ämnet i luften. Om vehikel eller annan tillsats används för att underlätta dosering skall det vara fastställt att den inte framkallar några toxiska effekter. I lämpliga fall kan tidigare insamlade data användas.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Försöksdjur

Om det inte finns kontraindikationer är råttan förstahandsvalet. De vanligen nyttjade laboratoriestammarna med unga friska djur skall användas.

Vid testets början får vikten hos de aktuella djuren inte avvika mer än ± 20 % från en rimlig genomsnittsvikt.

1.6.2.2. Antal och kön

Minst 10 djur (fem honor och fem hanar) skall ingå i varje grupp. Honorna får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av djur under testet skall det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt skall avlivas innan studien slutförs. Dessutom kan en satellitgrupp bestående av 10 djur (fem av vardera könet) tillföras den högsta koncentrationen i 28 dagar och därefter observeras i 14 dagar efter testet för reversibilitet, persistens eller fördröjt uppträdande av toxiska effekter.

1.6.2.3 Exponeringskoncentration

Till testet används minst tre koncentrationsnivåer och en kontrollgrupp eller en kontrollgrupp som tillförs vehikeln (i en koncentration som svarar mot den högsta koncentrationen av vehikeln). Djuren i kontrollgruppen skall behandlas på samma sätt som djuren i öbehandlingsgruppen, bortsett från att de inte skall tillföras testämnet. Den högsta koncentrationsnivån skall ge toxiska effekter men inga, eller få dödsfall. Den lägsta koncentrationsnivån skall inte ge några tecken på toxicitet. Om det finns en användbar uppskattning av människans exponering för ämnet skall den lägsta nivån vara högre än denna. Helst skall medelkoncentrationen ge minsta möjliga observerbara toxiska effekter. Om fler än en medelkoncentration används skall koncentrationsnivåerna väljas på ett sådant sätt att en gradering av de toxiska effekterna erhålls. I grupperna som utsätts för låg- och medelkoncentrationer och i kontrollgruppen skall antalet dödsfall hållas på en låg nivå för att utvärderingen av resultaten skall vara meningsfylld.

1.6.2.4. Exponeringstid

Durationen av den dagliga exponeringen skall vara sex timmar men andra perioder kan behövas för att uppfylla särskilda krav.

1.6.2.5. Utrustning

Djuren skall testas i inhalationsapparatur som är så utformad att den upprätthåller en dynamisk luftcirkulation med minst 12 luftväxlingar per timme för att säkerställa en tillräcklig syrehalt och en jämt fördelad exponeringsluft. Om exponeringskammare används skall den vara så utformad att trängseln bland försöksdjuren minimeras och exponeringen för testämnet genom inandning maximeras. Som en allmän regel för att säkerställa en stabil atmosfär i kammaren, skall försöksdjurens totala "volym" inte överstiga 5 % av exponeringskammarens volym. Exponeringen kan göras genom kammare för mun-näsa, enbart huvudet eller hela försöksdjurets kropp; vid användning av de två första metoderna kan man minska möjligheten att testämnet upptas via andra vägar.

1.6.2.6. Observationstid

Under hela testet och återhämtningsperioden skall försöksdjuren observeras dagligen för tecken på toxicitet. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten då tecken på toxicitet uppträder och försvinner skall registreras.

1.6.3. *Förfarande*

Djuren exponeras för testämnet dagligen, fem à sju dagar i veckan i 28 dagar. Djur i en eventuell satellitgrupp som planerats för uppföljning skall observeras i ytterligare 14 dagar utan någon behandling så att det kan fastställas om de toxiska effekterna försvinner eller om de håller i sig. Testtemperaturen skall hållas vid 22 ± 3°C.

Under ideala betingelser skall den relativa luftfuktigheten hållas mellan 30 och 70 %, men i vissa fall (t.ex. test av aerosoler) kan detta vara praktiskt ogenomförbart. Foder och vatten skall undanhållas djuren under exponeringen.

Till testet används ett dynamiskt inhalationssystem med lämpligt analytisk kontrollsystem för att säkerställa exponeringskoncentrationen. Ett provtest rekommenderas för att fastställa lämpliga exponeringskoncentrationer. Luftcirkulationen skall justeras för att säkerställa homogena betingelser i hela exponeringskammaren. Systemet skall vara av en sådan beskaffenhet att stabila exöponeringsbetingelser uppnås så snart som möjligt.

Mätning eller kontroll skall göras av:

a) Lufthastigheten (fortlöpande).

b) Den faktiska koncentrationen av testämnet mätt i respirationszonen. Under den dagliga exponeringsperioden skall koncentrationen inte avvika mer än ± 15 % från den genomsnittliga koncentrationen. En sådan kontrollnivå kan emellertid var omöjlig att uppnå vid test med damm och vissa aerosoler, och i sådana fall kan större avvikelser accepteras. Under hela testet skall de dagliga koncentrationerna hållas så konstanta som möjligt. För finfördelade ämnen och aerosoler skall analys göras så ofta som det är nödvändigt för att fastställa om partikelstorleken är jämnt fördelad.

c) Temperatur och luftfuktighet.

d) Under och efter exponering görs systematiska observationer som registreras för varje enskilt djur. Alla djur skall observeras dagligen och tecken på toxicitet registreras tillsammans med tidpunkten då de uppträdde samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Observation av djuren i burarna skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon och slemhinnor och även respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Djurens skall vägas varje vecka och vidare rekommenderas att foderförbrukningen mäts per vecka. Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för att säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testet avlivas och obduceras alla överlevande djur utom djuren i satellitgruppen. Så snart döende djur upptäcks skall dessa avlägsnas och obduceras.

I slutet av testet skall alla djur inklusive kontrollgruppen genomgå följande undersökning:

a) Hematologi omfattande minst hematokrit, hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning och differentialräkning av leukocyter samt ett mått på koaguleringsförmågan.

b) Klinisk biokemisk analys av blodet omfattande minst en lever- och njurfunktionsparameter: alanin-aminotransferas (tidigare kallat glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminas, GPT), serum-aspartat-aminotransferas (tidigare kallat glutaminsyra-oxalättiksyra-transaminas, GOT), och urinämne, kväve, äggviteämnen, blod-kreatinin, totalt bilirubin och totalt serumprotein.

Andra bestämningar som kan vara nödvändiga för en adekvat toxikologisk utvärdering är kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, glukos efter fasta, lipidanalys, hormoner, syra/basbalansen, metahemoglobin och kolinesterasaktivitet.

Ytterligare kliniska biokemiska analyser kan vid behov utföras för att vidare utreda de observerade effekterna.

1.6.3.1 Makroskopisk undersökning

Alla försöksdjur skall genomgå en fullständig makroskopisk undersökning. Lever, njurar, binjurar och testiklar skall vägas våta så snart som möjligt efter dissektion för att undvika uttorkning. Organ och vävnader (andningsvägarna, lever, njure, mjälte, binjurar, hjärta och andra organ som företer allvarliga skador eller storleksförändringar) skall förvaras i lämpligt medium för eventuell senare histopatologisk undersökning. Näs-svalgrummet och lungor skall tas ut hela och oskadade, vägas och behandlas med lämpligt fixativ för att säkerställa att lungstrukturen bibehålls. Perfusion med ett fixativ anses vara ett effektivt förfarande.

1.6.3.2 Histopatologisk undersökning

Histologisk undersökning skall göras av bevarade organ och vävnader från högkoncentrationsgruppen och kontrollgruppen/grupperna. Organ och vävnader, hämtade från gruppen som fått den högsta koncentrationen, som uppvisar defekter som kan tillskrivas testämnet, skall undersökas i alla grupper som fått lägre dos. Djur i en eventuell satellitgrupp skall genomgå histologisk undersökning, särskilt de organ och vävnader som har utvisat effekter i de övriga behandlingsgrupperna.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp anges antal djur i början av testet och antal djur som företer varje typ av skada.

Alla observerade resultat skall utvärderas medelst lämplig statistisk metod. Alla vedertagna statistiska metoder kan användas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv.

— Testbetingelser:

Beskrivningav exponeringsapparaturen, inklusive utformning, typ, mått, luftkälla, system för att generera partiklar och aerosoler, metod för konditionering av luften, behandling av utpumpad luft och metoden att hålla djuren i en exponeringskammare, om sådan används. Utrustningen för att mäta temperatur, luftfuktighet och i förekommande fall aerosolkoncentrationers eller partikelstorlekars stabilitet, skall beskrivas.

Exponeringsdata:

Dessa skall ställas upp i tabellform med angivande av medelvärden och ett spridningsmått (t.ex. standardavvikelse) och skall om möjligt omfatta:

a) lufthastighet genom inhalationsutrustningen,

b) luftens temperatur och fuktighet,

c) nominella koncentrationer (total mängd testämne som tillförts inhalationsutrustningen, dividerat med luftvolymen);

d) typ av vehikel, om sådan använts;

e) faktiska koncentrationer i testets andningszon;

f) partiklarnas medianstorlek (i lämpliga fall).

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och koncentration.

— Tidpunkten för dödsfall under testet eller överlevnad till slutet av testet.

— Beskrivning av toxiska och andra effekter.

— Tidpunkten för observation av varje abnormt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Gjorda hematologiska undersökningar och alla resultat.

— Gjorda kliniska biokemiska analyser och alla resultat.

— Obduktionsfynd.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Statistisk behandling av resultaten när detta är möjligt.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

B. 9. SUBAKUT TOXICITET (UPPTAG GENOM HUDEN)

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet appliceras dagligen i graderade doser på huden till flera grupper av försöksdjur, varvid varje grupp ges en bestämd dos i 28 dagar. Under appliceringsperioden observeras djuren dagligen för tecken på toxicitet. Djur som dör under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas och obduceras de överlevande djuren.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

I minst fem dagar före testet skall djuren hållas under testbetingelser med hänsyn till miljö och utfodring. Före testet fördelas friska könsmogna djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. Omedelbart innan testet inleds skall päls klippas bort från försöksdjurens rygg. Om pälsen rakas bort skall detta göras ungefär 24 timmar före testet. Upprepad klippning eller rakning behöver vanligtvis göras ungefär varje vecka. När pälsen klipps eller rakas bort skall försiktighet iakttas så att huden inte skadas. Minst 10 % av kroppsytan skall göras klar för applicering av testämnet. Vid fastställande av vilket och hur stort område som skall förberedas skall hänsyn tas till djurets kroppsvikt. Vid test av fasta ämnen, som får pulvriseras om det är lämpligt, skall testämnet fuktas tillräckligt med vatten eller, vid behov med lämplig vehikel, för att säkerställa god kontakt med huden. Flytande testämnen används vanligen outspädda. Testämnet appliceras dagligen fem till sju dagar i veckan.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Försöksdjur

Vuxna råttor, kaniner eller marsvin får användas. Andra arter kan användas men i så fall skall detta motiveras. Vid testets början får vikten hos de aktuella djuren inte avvika mer än ± 20 % från en rimlig genomsnittsvikt.

1.6.2.2. Antal och kön

Minst 10 djur (fem honor och fem hanar) med frisk hud skall användas på varje dosnivå. Honorna får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Användning av ett mindre antal djur kan ibland vara motiverat, särskilt beträffande kaniner. Vid planenligt avlivande av djur under testet skall det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt skall avlivas innan studien slutförs. Dessutom kan en satellitgrupp bestående av 10 djur (fem av vardera könet) tillföras den högsta dosnivån i 28 dagar och därefter observeras i 14 dagar efter testet för reversibilitet, persistens eller fördröjt uppträdande av toxiska effekter.

1.6.2.3. Dosnivåer

Till testet skall användas minst tre dosnivåer samt en kontrollgrupp eller en vehikelkontroll, om vehikel används. Testämnet skall appliceras vid samma tid varje dag och justeras dosnivåerna skall de justeras med jämna mellanrum (var eller varannan vecka) så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Djuren i kontrollgruppen skall behandlas på samma sätt som djuren i behandlingsgruppen, bortsett från att de inte skall tillföras testämnet. Om vehikel används för att underlätta dosering skall kontrollgruppen tillföras vehikeln på samma sätt som behandlingsgrupperna. Vidare skall vehikeln tillföras kontrollgruppen i samma mängd som emottas av försöksdjuren i gruppen som ges den högsta dosnivån. Den högsta dosnivån skall ge toxiska effekter men inga eller få dödsfall. Den lägsta dosnivån skall inte ge några tecken på toxicitet. Om det finns en användbar uppskattning av människans exponering för ämnet skall den lägsta nivån vara högre än denna. Helst skall medeldosen ge minsta möjliga observerbara toxiska effekter. Om fler än en medeldos används skall dosnivåerna väljas på ett sådant sätt att en gradering av de toxiska effekterna erhålls. I grupperna som utsätts för låg- och medeldoser och i kontrollgruppen skall antalet dödsfall hållas på en låg nivå för att utvärderingen av resultaten skall vara meningsfylld.

Om appliceringen av testämnet ger allvarlig hudirritation skall koncentrationerna sänkas, vilket kan medföra att andra toxiska effekter minskar eller uteblir på högsta dosnivån. Om huden har skadats allvarligt kan det bli nödvändigt att avsluta det pågående testet och påbörja en ny med lägre koncentrationer.

1.6.2.4. Gränstest

Om det vid ett förberedande test fastställs att en dosnivå på 1 000 mg/kg, eller en högre dosnivå om detta motiveras av kunskap om människans möjliga exponering, inte ger några toxiska effekter kan ytterligare test anses vara överflödiga.

1.6.2.5. Observationsperiod

Försöksdjuren skall observeras dagligen för tecken på toxicitet. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten då tecken på toxicitet uppträder skall registreras.

1.6.3. *Förfarande*

Djuren skall hållas i var sin bur. Den ideala doseringen är att djuren utsätts för testämnet sju dagar i veckan i 28 dagar. Djur i en eventuell satellitgrupp som planerats för uppföljning skall observeras i ytterligare 14 dagar utan tillförsel av testämnet så att det kan fastställas om de toxiska effekterna försvinner eller om de håller i sig. Exponeringstiden skall vara minst sex timmar per dag.

Testämnet skall appliceras jämt över ett område som motsvarar ungefär 10 % av den totala kroppsytan. Med starkt toxiska ämnen kan testområdet vara mindre men så stor del av området som möjligt skall täckas med ett så tunt och jämnt fördelat lager som möjligt.

Under exponeringen skall testämnet hållas i kontakt med huden medelst ett poröst gasförband och icke hudirriterande tejp. Testområdet skall vidare täckas på lämpligt sätt så att gasförbandet och

testämnet hålls på plats och djuren inte kan inta testämnet. För att förhindra intag av testämnet kan rörelsehindrande anordningar användas men total immobilisering rekommenderas inte.

I slutet av exponeringsperioden skall kvarvarande testämne avlägsnas, om så är lämpligt med användning av vatten eller någon annan passande metod att rengöra huden.

Alla djuren skall observeras dagligen och tecken på toxicitet skall registreras tillsammans med tidpunkten då de uppträdde samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Observation av djuren i burarna skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon och slemhinnor och även respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Djurens skall vägas varje vecka och vidare rekommenderas att foderförbrukningen mäts per vecka. Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för att säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testet avlivas och obduceras alla överlevande djur utom djuren i satellitgruppen. Så snart döende djur upptäcks skall dessa avlägsnas och obduceras.

I slutet av testet skall alla djur inklusive kontrollgruppen genomgå följande undersökning:

1. Hematologi omfattande minst hematokrit, hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning och differentialräkning av leukocyter samt ett mått på koaguleringsförmågan.

2. Klinisk biokemisk analys av blodet omfattande minst en lever- och njurfunktionsparameter: alanin-aminotransferas (tidigare kallat glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminas, GPT), serum-aspartat-aminotransferas (tidigare kallat glutaminsyra-oxalättiksyra-transaminas, GOT), och urinämne, kväve, äggviteämnen, blod-kreatinin, totalt bilirubin och totalt serumprotein.

Andra bestämningar som kan vara nödvändiga för en adekvat toxikologisk utvärdering är kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, glukos efter fasta, lipidanalys, hormoner, syra/basbalansen, metahemoglobin och kolinesterasaktivitet.

Ytterligare kliniska biokemiska analyser kan vid behov utföras för att vidare utreda de observerade effekterna.

1.6.4 *Makroskopisk undersökning*

Alla försöksdjur skall genomgå en fullständig makroskopisk undersökning. Lever, njurar, binjurar och testiklar skall vägas våta så snart som möjligt efter dissektion för att undvika uttorkning. Organ och vävnader, dvs. obehandlad och behandlad hud, lever, njure och målorgan (de organ som företer allvarliga skador eller storleksförändringar) skall förvaras i lämpligt medium för eventuell senare histopatologisk undersökning.

1.6.5 *Histopatologisk undersökning*

Histologisk undersökning skall göras av bevarade organ och vävnader från högdosgruppen och kontrollgruppen. Organ och vävnader, hämtade från gruppen som fått den högsta dosnivån, som uppvisar defekter som kan tillskrivas testämnet, skall undersökas i alla grupper som fått lägre dos. Djur i satellitgruppen skall genomgå histologisk undersökning, särskilt de organ och vävnader som har utvisat effekter i de övriga behandlingsgrupperna.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp anges antal djur i början av testet och antal djur som företer varje typ av skada.

Alla observerade resultat skall utvärderas medelst lämplig statistisk metod. Alla vedertagna statistiska metoder kan användas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Data om djuren (art, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv).

— Testbetingelser:

— Dosnivåer (inklusive vehikel, om sådan använts) och koncentrationer.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos.

— Icke toxisk dos, om sådan har fastställts.

— Tidpunkten för dödsfall under testet eller överlevnad till slutet av testet.

— Toxiska och andra effekter.

— Tidpunkten för observation av varje abnormt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Hematologiska undersökningar och alla resultat.

— Kliniska biokemiska analyser och alla resultat.

— Obduktionsfynd.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Statistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

B. 10. ANDRA EFFEKTER — MUTAGENICITET

CYTOGENETISKT TEST PÅ DÄGGDJUR *IN VITRO*

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Det cytogenetiska testet *in vitro* är ett korttids mutagenicitetstest för upptäckt av strukturella kromosomförändringar i odlade däggdjursceller. Kulturer från etablerade cellstammar kan användas såväl som primära cellkulturer. Cellkulturerna exponeras för testämnet med och utan leverenzymaktiveringsblandning (en post-mitokondrial fraktion som kompletterats med en ko-faktor) och behandlas därefter med spindelfiberinhibitorer, t.ex. kolchicin, för att celler skall ackumuleras i ett metafasliknande mitosstadium (c-metafas). Cellerna skördas vid lämpliga tidpunkter och prepareras för kromosomanalys. Preparaten färgas och celler i metafasen analyseras för kromosomförändringar.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

Testämnen tillsätts i ett odlingsmedium eller upplöses i lämpliga vehiklar innan cellerna exponeras. Etablerade cellstammar eller primära cellkulturer används, t.ex. celler från kinesisk hamster och humana lymfocyter.

1.6.2. *Testbetingelser*

Antal kulturer:

Minst två kulturer används för varje försöksmoment.

Negativ och positiv kontrollkultur:

Som negativ kontrollkultur används lösningsmedel (om lösningsmedlet inte är kulturmediet eller vatten), leverenzymaktiveringsblandning och lösningsmedel samt helt obehandlade kulturer.

I varje försök ingår en positiv kontrollkultur: om leverenzymaktiveringsblandning används för att aktivera testämnet skall den positiva kontrollkulturen utgöras av en förening som man vet kräver metabolisk aktivering.

Dosnivå:

Minst tre dosnivåer av testämnet skall användas över minst ett logaritmiskt dosintervall, varvid den högsta dosen skall hämma den miotiska aktiviteten med ungefär 50 %.

Odlingsbetingelser:

Lämpligt kulturmedium och lämpliga inkubationsbetingelser (t.ex. temperatur, odlingskärl, CO_2-koncentrationer och fuktighet) skall användas.

1.6.3. *Testförfarande*

1.6.3.1. Beredning av kulturer

Etablerade cellstammar: Celler tas från stamceller (t.ex. genom att de trypsinbehandlas eller skakas av) varefter de sås med passande täthet i odlingskärl och inkuberas vid 37°C.

Humana lymfocyter: Heparinerat helblod tillsätts till ett kulturmedium innehållande fytohemagglutinin, fetalt kalvserum och antibiotika. Blandningen inkuberas vid 37°C.

1.6.3.2. Behandling av kulturerna med testämnet

i) Behandling utan leverenzymaktiveringsblandning.

Varje behandling skall minst pågå i en hel cellcykel och fixeringsintervall skall fastställas för att säkerställa att celler som har behandlats på olika stadier i cykeln analyseras under den första mitosen efter behandlingen.

Om behandlingen pågår kortare tid än en hel cellcykel skall en serie fixeringstidpunkter fastställas för att säkerställa att celler som befinner sig i olika stadier tas ut, dvs, G_1, S och G_2, under behandlingen.

Testämnet tillsätts till kulturer av etablerade cellstammar medan de befinner sig i den exponentiella tillväxtfasen. Humana lymfocytkulturer behandlas medan de är i ett semisynkront tillstånd.

Om testämnet ändrar cellcykelns längd skall fixeringsintervallet ändras i motsvarande grad.

ii) Behandling med leverenzymaktiveringsblandning

Vid behandlingen skall testämnet plus aktiveringssystemet vara tillstädes så länge som möjligt utan att utöva någon toxisk effekt på cellerna. Om denna behandling av toxiska skäl inte pågår under en hel cellcykel skall en serie fixeringstidpunkter fastställas för att säkerställa att celler som befinner sig i olika stadier tas ut, dvs, G_1, S och G_2, under behandlingen.

Skörd av celler:

Cellkulturerna behandlas med spindelfiberinhibitorer en eller två timmar innan de skördas. Skörd och kromosompreparering skall göras separat för varje kultur.

1.6.3.3. Kromosompreparering

Kromosompreparering omfattar hypoton-behandling av cellerna, fixering, utstrykning på objektglas och färgning.

Analys:

Minst 100 väl fördelade metafaser per odling analyseras för kromosomförändringar. Objektglasen kodas före analys. Vid humana lymfocyter analyseras endast metafaser innehållande 46 centromerer.

Vid etablerade cellstammar analyseras endast metafaser innehållande ± 2 centromerer i förhållande till modaltalet.

2. DATA

Data ställs upp i tabellform. Avvikelser av kromatid typ (gap, brott, translokationer), kromosom typ (gap, brott, minutes, ringar, dicentromerer, polycentromerer) och antalet avvikande metafaser (inklusive och exklusive hål) registreras separat för alla behandlade kulturer och kontrollkulturer. Data utvärderas medelst lämpliga statistiska metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapporten

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använda celler.

— Testbetingelser: sammansättning av mediet, CO_2, koncentration, inkubationstemperatur, inkubationstid, dosnivåer, behandlingstid, varaktigheten av behandlingen med och koncentrationen av använd spindelinhibitor, typ av leverenzymaktiveringsblandning som använts, positiva och negativa kontroller.

— Antal analyserade metafaser (data anges separat för varje kultur).

— Miotiskt index.

— Typ av och antal avvikelser anges separat för varje behandlad kultur och kontrollkultur, och de använda etablerade cellstammarnas modaltal.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

B. 11. ANDRA EFFEKTER — MUTAGENICITET

BENMÄRGSTEST PÅ DÄGGDJUR *IN VIVO* — CYTOGENETISKT TEST, KROMOSOMANALYS

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Detta cytogenetiska test *in vivo* är ett korttids mutagenicitetstest för upptäckt av strukturella kromosomförändringar. Kromosomförändringar utvärderas vanligtvis i samband med den första mitosen efter exponering. Merparten av de avvikelser som framkallas av kemiska mutagener är av kromatid typ.

I metoden används benmärgsceller från däggdjur som exponeras för testämnen på ändamålsenligt sätt och sedan avlivas med följdriktiga intervaller. Före avlivning behandlas djuren vidare med en spindelfiberinhibitor, t.ex. kolchicin för att celler skall ackumuleras i ett metafasliknande stadium av mitosen (c-metafas). Lufttorkade kromosompreparat från cellerna bereds och färgas, och metafaserna analyseras mikroskopiskt för kromosomförändringar.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

Testämnen upplöses i vanlig saltlösning. Ämnen som inte är lösliga i saltlösning skall lösas eller uppslammas i lämplig vehikel.

Nyligen framställda lösningar av testämnet skall användas. Vehikel som används för att underlätta dosering får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska effekter.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Försöksdjur

Gnagararter används, t.ex. råttor, möss eller kinesiska hamstrar. Unga, friska och könsmogna djur fördelas slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

1.6.2.2 Antal och kön

Minst fem hon- och fem handjur skall ingå i varje behandlingsgrupp och i varje kontrollgrupp. Följaktligen skall 10 djur avlivas per tidsperiod och grupp, om testet omfattar flera testtillfällen efter behandlingen.

1.6.2.3. Administrationssätt

Testämnen skall vanligen administreras endast en gång. På basis av toxikologisk information kan ett schema fastställas med upprepad behandling. Upprepad behandling kan emellertid inte användas om testämnet inte har cytotoxisk effekt på benmärg. Vanligtvis administreras testämnet oralt eller genom intraperitoneal injicering. Även andra administrationssätt kan användas.

1.6.2.4. Användning av negativa och positiva kontroller

Som positiv kontroll används en förening som har påvisats framkalla kromosomförändringar *in vivo* och i varje test ingår även en negativ (lösningsmedelskontrollgrupp).

1.6.2.5. Dosnivå

I basförsöksomgången används endast en dos av testämnet, nämligen den maximalt tolererade dosen som ger en viss cytotoxicitet (t.ex. partiell hämning av mitosen).

Ytterligare dosnivåer kan användas om detta motiveras av vetenskapliga skäl.

Om testet utförs i verifieringssyfte kan minst två ytterligare dosnivåer användas.

1.6.3. *Testförfarande*

Testet kan utföras på två sätt:

a) Försöksdjuren behandlas en gång med den maximalt tolererade dosen. Prov tas tre gånger efter behandling. Den viktigaste provtagningen görs efter 24 timmar, men eftersom testämnet kan påverka cellcykelkinetiken skall provtagning göras en gång före och en gång efter 24 timmar vid lämpliga intervaller mellan 6—48 timmar.

   Om ytterligare dosnivåer används skall prov tas vid de särskilt känsliga intervallerna, eller om dessa inte är kända, 24 timmar efter behandling.

b) Om farmakokinetiska och metaboliska uppgifter pekar på att ett schema med upprepad behandling bör användas, kan exponeringen ske i upprepade doser varvid prov skall tas 6 och 24 timmar efter den sista behandlingen.

Benmärgspreparering:

Före avlivning skall försöksdjuren ges en intraperitoneal injektion med lämplig dos av spindelfiberinhibitor för att ett tillräckligt antal celler i c-metafasen skall erhållas. Benmärg hämtas från båda lårbenen på nyligen avlivade djur genom sköljning med en isoton lösning. Efter lämplig hypoton behandling fixeras cellerna och stryks ut på objektglas. Efter lufttorkning färgas objektglasen.

Analys:

Objektglas kodas före mikroskopisk analys. Minst 50 väl fördelade metafaser med komplett antal centromerer analyseras per djur för strukturella kromosomförändringar. Vidare kan miotiskt index fastställas för varje djur.

2. DATA

Data presenteras i tabellform. Avvikelser av kromatid och isokromatid typ (gap, brott, ötranslokationer) och miotiska index, där sådana fastställts, anges separat för alla försöks- och kontrolldjur. Dessutom skall medelvärden och standardavvikelser anges för varje behandlad grupp och för varje kontrollgrupp. Data utvärderas medelst lämpliga statistiska metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam och djurens ålder.

— Antal djur av vardera könet i behandlings- och kontrollgrupper.

— Testbetingelser: detaljerad beskrivning av provtagningsschema, dosnivåer, behandlingens varaktighet och koncentration av använd spindelinhibitor.

— Antal analyserade metafaser per djur.

— Miotiska index, där sådana fastställts.

— Typer av och antal avvikelser angivna separat för varje behandlat djur och varje kontrolldjur.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

B. 12. ANDRA EFFEKTER — MUTAGENICITET

MIKRONUKLEÄRT TEST

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Det mikronukleära testet är ett korttidstest på däggdjur *in vivo* för upptäckt av kromosomskada eller skada av den miotiska apparaten förorsakad av kemikalier. Utgångspunkten för detta test är en ökning av antalet mikronuclei i de polykromatiska erytrocyterna hos behandlade djur jämfört med kontrollerna.

Mikronuclei bildas av kromosomfragment eller hela kromosomer som släpar efter i mitosen. Om erytroblaster utvecklas till erytrocyter stöts cellkärnan ut medan mikronucleus kan bibehållas i cytoplasman. I detta test används unga polykromatiska erytrocyter från benmärgen hos försöksdjur som på lämpligt sätt exponeras för testämnet. Benmärgen extraheras till utstryckspreparat som färgas. Polykromatiska erytrocyter räknas för micronuclei och förhållandet mellan polykromatiska och normokromatiska erytrocyter fastställs.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

Testämnen upplöses i isoton lösning. Ämnen som inte är lösliga i isotona lösningar skall lösas eller uppslammas i lämplig vehikel. Vehikel som används för att underlätta dosering får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska effekter. Normalt skall nyligen framställda lösningar av testämnet användas.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Försöksdjur

Möss rekommenderas men även andra däggdjur kan användas. Unga, friska och könsmogna djur fördelas slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

1.6.2.2 Antal och kön

Minst fem hon- och fem handjur skall ingå i varje behandlingsgrupp och i varje kontrollgrupp. Följaktligen skall 10 djur avlivas per tidsperiod och grupp om testet omfattar flera testtillfällen efter behandlingen.

1.6.2.3. Administrationssätt

Testämnen skall vanligen administreras endast en gång. På basis av toxikologisk information kan ett schema fastställas med upprepad behandling. Upprepad behandling kan emellertid inte användas om testämnet inte har cytotoxisk effekt på benmärg. Vanligtvis administreras testämnet oralt eller genom intraperitoneal injicering. Även andra administrationssätt kan användas.

1.6.2.4. Användning av negativa och positiva kontroller

Både positiva och negativa (lösningsmedelskontroller) skall användas i varje test.

1.6.2.5. Dosnivå

I basförsöksomgången används endast en dos av testämnet, nämligen den maximalt tolererade dosen som ger en viss cytotoxicitet, t.ex. genom att förhållandet mellan polykromatiska och normokromatiska erytrocyter ändras.

Ytterligare dosnivåer kan användas om detta motiveras av vetenskapliga skäl.

Om testet utförs i verifieringssyfte kan minst två ytterligare dosnivåer användas.

1.6.3. *Testförfarande*

Testet kan utföras på två sätt:

a) Försöksdjuren behandlas en gång med den maximalt tolererade dosen. Provtagning skall ske vid de tidpunkter då en maximal respons förväntas, vilket varierar beroende på testämne. Om maximal dos används skall benmärgsprover tas tre gånger, första gången tidigast 12 timmar efter behandling och därefter med lämpliga intervaller, dock inte senare än 72 timmar efter behandlingen.

   Om ytterligare dosnivåer används skall prov tas vid den maximalt känsliga perioden, eller om den inte är känd, 24 timmar efter behandling.

b) Om farmakokinetiska och metaboliska uppgifter pekar på att ett schema med upprepad behandling bör användas, kan doseringen upprepas och prov tas minst tre gånger, första gången tidigast 12 timmar efter den sista behandlingen och därefter med lämpliga intervaller, dock inte senare än 72 timmar efter behandlingen.

Benmärgspreparering:

Benmärg tas från båda lårbenen på nyligen avlivade djur genom sköljning med fetalt kalvserum. Cellerna sedimenteras genom centrifugering och supernatanten kasseras. Droppar av den homogena cellsuspensionen placeras på objektglas och breds ut som ett utstryksprepparat. Efter lufttorkning färgas objektglasen.

Analys:

Objektglas kodas före mikroskopisk analys. Minst 1 000 polykromatiska erytrocyter per djur undersöks för förekomst av mikronuclei.

Förhållandet mellan normokromatiska och polykromatiska erytrocyter bestäms för varje djur genom att totalt 1 000 erytrocyter räknas.

2. DATA

Data presenteras i tabellform. Antalet räknade erytrocyter, antalet polykromatiska erytrocyter med mikronuclei och procenttalet celler med mikronuclei anges separat för varje försöks- och kontrolldjur tillsammans med förhållandet mellan normokromatiska och polykromatiska erytrocyter. Medelvärden och standardavvikelser skall också anges för varje behandlings- och kontrollgrupp. Data utvärderas medelst lämpliga statistiska metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. **Testrapport**

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam och djurens ålder.

— Antal djur av vardera könet i behandlings- och kontrollgrupper.

— Testbetingelser: detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsschema, dosnivåer, uppgifter om toxicitet och negativa och positiva kontroller.

— Kriterier för räkning av micronuclei.

— Förhållandet mellan dos och effekt, när detta är möjligt.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

B. 13. ANDRA EFFEKTER — MUTAGENICITET

ESCHERICHIA COLI — OMVÄNT MUTATIONSTEST

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Reversionssystemet *Escherichia coli* tryptofan (trp) är ett mikrobialt test som mäter reversionen trp^- trp^+ genom kemikalier som orsakar basförändringar i organismens genom.

Bakterier exponeras för testämnen med och utan metabolisk aktivering. Efter en lämplig inkubationsperiod i minimalt medium räknas de tillbakamuterande kolonierna och jämförs med antalet spontana revertanter i en obehandlad kontrollkultur och/eller en kontrollkultur med lösningsmedel.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Följande metoder kan användas vid utförande av testet: 1) förinkubationsperioden; och 2) direkt inkorporering, varvid bakterier och testämne blandas med toppagar och hälls ut över en selektiv agarplatta.

1.6.1. *Förberedelser*

1.6.1.1. Bakterier

Bakterier odlas vid 37°C till den sena exponentiella eller den tidiga stationära tillväxtfasen. Celltätheten skall vara ungefär 10^8—10^9 celler per milliliter.

1.6.1.2. Metabolisk aktivering

Bakterier exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av lämplig leverenzymaktiveringsblandning (en post-mitokondrial fraktion som kompletterats med en ko-faktor), framställd från möss eller råttor som förbehandlats med enzyminducerande medel.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Teststammar

Tre stammar, WP2, WP2 uvr A och WP2 uvr A pKM 101 skall användas. Vedertagna metoder att odla och bevara stamkulturer skall användas. Stammarnas tillväxtkrav och genetiska identitet, deras känslighet för UV-strålning eller mitomycin C och motståndskraften mot ampicillin i stam WP2 uvr A pKM 101 skall kontrolleras. Stammarna skall även ge spontana revertanter inom förväntade frekvensområden.

1.6.2.2. Media

Ett lämpligt medium för utveckling och selektion av mutanter används med en lämplig toppagar.

1.6.2.3. Användning av negativa och positiva kontroller

Obehandlade kontroller och kontroller med lösningsmedel skall användas jämsides. Positiva kontroller skall göras i två syften:

i) För att bekräfta bakteriestammarnas känslighet.

Metyl-metan-sulfonat, 4-nitrokinolinoxid eller etylnitrosurea kan användas som positiva kontroller för test utan metabolisk aktivering.

ii) För att säkerställa aktiviteten hos det använda metaboliska systemet.

En positiv kontroll för aktiviteten hos ett metaboliskt system för alla stammar är 2-öaminoantracen. Om det finns en positiv kontroll av samma kemiska klass som testämnet skall denna användas.

1.6.2.4. Mängd testämne per platta

Minst fem olika mängder av testämnet skall undersökas, med semilogaritmiska intervaller mellan plattorna. Ämnen testas upp till gränsen för löslighet eller toxicitet. Toxicitet påvisas av en reduktion av antalet spontana revertanter, av plattans djupgenomskinlighet eller av graden av överlevnad hos behandlade kulturer. Icke-toxiska kemikalier skall testas upp till 5 mg per platta innan testämnet kan betraktas som negativt.

1.6.2.5. Inkubationsbetingelser

Plattorna inkuberas i 48—72 timmar vid 37°C.

1.6.3. *Testförfarande*

Vid användning av metoden med direkt inkorporering av plattan utan enzymaktivering skall ämnet och 0,1 ml färsk bakteriekultur tillsättas till 2,0 ml toppagar. Vid test med metabolisk aktivering tillsätts 0,5 ml leverenzymaktiveringsblanding innehållande lämplig mängd post-mitokondrial fraktion till toppagaren efter tillsättning av testämnet och bakterier. Innehållet i varje provrör blandas och hälls ut över en platta med selektiv agar. Toppagaren får stelna och plattorna inkuberas vid 37°C i 48—72 timmar. I slutet av inkubationsperioden räknas de tillbakamuterade kolonierna per platta.

Vid förinkubationsmetoden förinkuberas en blandning av testämnet, 0,1 ml färsk bakteriekultur och lämplig mängd leverenzymaktiveringsblandning eller samma mängd buffert innan 2,0 ml toppagar tillsätts. Alla andra förfaranden är desamma som för inkorporeringsmetoden.

Vid båda metoderna skall all uthällning göras på minst tre plattor.

2. DATA

Antalet tillbakamuterade kolonier per platta rapporteras för både kontroll- och behandlingsserier. Enskilda platträkningar, medelantalet tillbakamuterade kolonier per platta och standardavvikelser skall anges för det testade ämnet och kontrollerna. Alla resultat skall bekräftas genom ett oberoende test. Data skall utvärderas medelst lämpliga statistiska metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapporten

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använda bakteriestammar.

— Testbetingelser: dosnivåer, toxicitet, sammansättning av media, behandlingsförfaranden (förinkubation, inkubation), leverenzymaktiveringsblandning, referensämnen, negativa kontroller.

— De enskilda plattornas räkning, medeltalet tillbakamuterade kolonier per platta, standardavvikelse, förhållandet mellan dos och effekt när detta är möjligt.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

B. 14. ANDRA EFFEKTER — MUTAGENICITET

SALMONELLA TYPHIMURIUM — OMVÄNT MUTATIONSTEST

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Reversionssystemet *Salmonella typhimurium* histidin (his) är ett mikrobialt test som mäter reversionen *his*$^-$ → *his*$^+$ genom kemikalier som orsakar bassubstitutioner eller frameshiftmutationer i organismens genom.

Bakterier exponeras för testämnen med och utan metabolisk aktivering och placeras på plattor med minimalt medium. Efter en lämplig inkubationsperiod räknas de tillbakamuterande kolonierna och jämförs med antalet spontana revertanter i en obehandlad kontrollkultur och/eller en kontrollkultur med lösningsmedel.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelser*

1.6.1.1. Bakterier

Färska bakteriekulturer odlas vid 37°C till den sena exponentiella eller den tidiga stationära tillväxtfasen. Celltätheten skall vara ungefär 10^8 — 10^9 celler per milliliter.

1.6.1.2. Metabolisk aktivering

Bakterier exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av lämplig leverenzymaktiveringsblandning (en post-mitokondrial fraktion som kompletterats med en ko-faktor), framställd från möss eller råttor som förbehandlats med enzyminducerande medel.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Teststammar

Minst fyra stammar, TA 1535, TA 1537, TA 98 och TA 100 skall användas. Det finns även andra lämpliga stammar, t.ex.TA 1538. Vedertagna metoder att bereda och bevara stamkulturer s[illegible]ll

användas. Stammarnas tillväxtkrav och genetiska identitet, deras känslighet för UV-strålning och kristallviolett och motståndskraften mot ampicillin skall kontrolleras. Stammarna skall även ge spontana revertanter inom förväntade frekvensområden.

1.6.2.2. Media

Ett lämpligt selektivt medium används med en lämplig toppagar.

1.6.2.3. Användning av negativa och positiva kontroller

Obehandlade kontroller och kontroller med lösningsmedel skall användas jämsides. Positiva kontroller skall göras i två syften:

i) För att bekräfta bakteriestammarnas känslighet.

Följande föreningar kan användas för test utan metabolisk aktivering:

Stammar	*Reverterar med*
TA 1535, TA 100	Natriumazid
TA 1538, TA 98	2-nitrofluoren
TA 1537	9-aminoakridin

ii) För att säkerställa aktiviteten hos det använda metaboliska systemet.

En positiv kontroll för aktiviteten hos ett metaboliskt system för alla stammar är 2-öaminoantracen. Om det finns en positiv kontroll av samma kemiska klass som testämnet skall denna användas.

1.6.2.4. Mängd testämne per platta

Minst fem olika mängder av testämnet skall undersökas, med semilogaritmiska intervaller mellan plattorna. Ämnen testas upp till gränsen för löslighet eller toxicitet. Toxicitet påvisas av en reduktion av antalet spontana revertanter, av plattans djupgenomskinlighet eller av graden av överlevnad hos behandlade kulturer. Icke-toxiska kemikalier skall testas upp till 5 mg per platta innan testämnet kan betraktas som negativt.

1.6.2.5. Inkubationsbetingelser

Plattorna inkuberas i 48—72 timmar vid 37°C.

1.6.3. *Testförfarande*

Vid användning av metoden med direkt inkorporering av plattan utan enzymaktivering skall testämnet och 0,1 ml färsk bakteriekultur tillsättas till 2,0 ml toppagar. Vid test med metabolisk aktivering tillsätts 0,5 ml leverenzymaktiveringsblanding innehållande lämplig mängd post-mitokondrial fraktion till toppagaren efter tillsättning av testämnet och bakterier. Innehållet i varje provrör blandas och hälls ut över en platta med selektiv agar. Toppagaren får stelna och plattorna inkuberas vid 37°C i 48—72 timmar. I slutet av inkubationsperioden räknas de tillbakamuterade kolonierna per platta. Vid användning av förinkubationsmetoden förinkuberas en blandning av testämnet, 0,1 ml färsk bakteriekultur och lämplig mängd leverenzymaktiveringsblandning eller samma mängd buffert innan 2,0 ml toppagar tillsätts. Alla andra förfaranden är desamma som för inkorporeringsmetoden.

Vid båda metoderna skall all uthällning göras på minst tre plattor.

2. DATA

Antalet tillbakamuterade kolonier per platta rapporteras för både kontroll- och behandlingsserier.

Enskilda platträkningar, medelantalet tillbakamuterade kolonier per platta och standardavvikelser skall anges för det testade ämnet och kontrollerna.

Alla resultat skall bekräftas genom ett oberoende test.

Data skall utvärderas medelst lämpliga statistiska metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapporten

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använda bakteriestammar.

— Testbetingelser: dosnivåer, toxicitet, sammansättning av media, behandlingsförfaranden (förinkubation, inkubation), leverenzymaktiveringsblandning, referensämnen, negativa kontroller.

— De enskilda plattornas räkning, medeltalet tillbakamuterade kolonier per platta, standardavvikelse, förhållandet mellan dos och effekt när detta är möjligt.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B (punkt C).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (punkt D).

DEL C: METODER ATT BESTÄMMA EKOTOXICITET

C. 1. AKUT TOXICITET FÖR FISK

1. METOD

1.1 Inledning

Såvitt möjligt är det värdefullt att känna till testämnets löslighet i vatten, ångtryck, kemiska stabilitet, dissociationskonstanter och bionedbrytbarhet för att underlätta valet av den mest lämpliga testmetoden (statisk, semistatisk eller genomströmning) för att säkerställa tillfredsställande konstanta koncentrationer av testämnet under hela testperioden.

Vid planeringen och tolkningen av testresultaten skall hänsyn tas till andra uppgifter som är nödvändiga, t.ex. strukturformel, renhetsgrad, arten av och procenttalet signifikanta orenheter, förekomst och mängder av tillsatser och n-oktanol/vattendelningskoefficienten.

1.2. Definitioner och enheter

Akut toxicitet är de märkbara ogynnsamma effekter som på kort tid (dagar) framkallas hos en organism som exponeras för ett ämne. I detta test uttrycks akut toxicitet som median letal koncentration (LC_{50}), dvs. den koncentration i vatten som medför att 50 % av fiskarna i en försöksgrupp dör inom en sammanhängande exponeringsperiod. Exponeringstiden skall anges.

Alla koncentrationer av testämnet anges i vikt per volym (milligram per liter), även uttryckt som vikt per vikt (delar per miljon).

1.3. Referensämnen

Ett referensämne kan användas för att visa att försöksdjurens respons inte har ändrats signifikant under testbetingelserna i laboratoriet.

Inga referensämnen finns angivna för detta test.

1.4. Testmetodsprincip

Fisken exponeras för testämnet (testämnena) som i en rad koncentrationer tillsätts vattnet under minst 48 timmar, helst 96 timmar. Dödligheten registreras med högst 24 timmars mellanrum och om så är möjligt beräknas de koncentrationer som vid varje observationstillfälle har medfört att 50 % av fisken (LC_{50}) har dött.

1.5. Kvalitetskriterier

Dödligheten i kontrollgruppen får inte överstiga 10 % i slutet av testet.

Under hela testet skall syrekoncentrationen vara högre än 60 % av luftmättnadsvärdet.

Det skall finnas bevis, antingen från analys eller från de kemiska egenskaperna hos det använda testsystemet, på att tillfredsställande koncentrationer av testämnet har hållits under testperioden (t.ex. lägst 80 % av den initiala koncentrationen).

1.6. **Metodbeskrivning**

Tre typer av förfaranden kan användas:

Statiskt test:

Toxicitetstest med vattenorganismer utan något genomflöde av testlösningen. (Lösningar förblir oförändrade under hela testet.)

Semistatiskt text:

Test utan genomflöde av lösningen men där testlösningar regelbundet byts ut helt efter längre perioder (t.ex. 24 timmar).

Genomströmningstest:

Toxicitetstest i vilket vattnet i testkamrarna förnyas hela tiden och där testämnet transporteras med det vatten som används till att förnya testmediet.

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Lösningar av testämnen

Stamlösningar av erforderlig styrka framställs genom att testämnet upplöses i avjoniserat vatten eller vatten enligt 1.6.1.2

Stamlösningar av ämnen med låg vattenlöslighet kan framställas genom ultraljudsdispersion eller om så behövs genom användning av organiska lösningsmedel, emulgeringsmedel eller dispergermedel. Om sådana tillsatsämnen används skall kontrollfisken exponeras för samma koncentration av tillsatsämnet som används i den högsta koncentrationen av testämnet. Koncentrationen av sådana tillsatser får inte överstiga 0,1 g per liter.

De valda testkoncentrationerna framställs genom utspädning av stamlösningen. Om höga koncentrationer testas kan ämnet lösas direkt i utspädningsvattnet.

Testet skall göras utan justering av pH-värdet. Om det finns tecken på en markant förändring av Ph-värdet rekommenderas att testet upprepas med pH-justering och att resultaten rapporteras. I detta fall skall pH-värdet i stamlösningen justeras efter pH-värdet i utspädningsvattnet, om det inte finns särskilda skäl som talar mot detta. HCl och NaOH är förstahandsvalen för detta ändamål. Denna pH-justering skall göras på ett sådant sätt att testämnets koncentration i stamlösningen inte ändras i någon signifikant grad. Om justeringen medför någon kemisk reaktion eller fysisk utfällning av testämnet skall detta rapporteras.

1.6.1.2. Vatten till förvaring och utspädning

Dricksvatten (som inte är förorenat av farliga koncentrationer av klor, tungmetaller eller andra ämnen), naturligt förekommande vatten av god kvalitet eller rekonstituerat vatten (se tillägg 1) kan användas. Vatten med en total hårdhet på mellan 50 och 250 mg per liter (som $CaCO_3$) och med ett Ph-värde av 6,0—8,5 är att föredra.

1.6.2. *Apparatur*

All apparatur skall vara tillverkad av kemiskt inert material:

— Automatiskt utspädningssystem (till genomströmningstestet).

— Syremätare.

— Utrustning för bestämning av vattnets hårdhet.

— Lämplig apparatur för temperaturkontroll.

— pH-mätare.

1.6.3. *Testfisk*

En eller flera arter kan väljas av laboratoriepersonalen som utför testet.

Förslagsvis kan de arter som ska användas väljas efter viktiga praktiska kriterier, som t.ex. att de är lätt tillgängliga under hela året, enkla att hålla, lämpliga för testet, har en relativ känslighet, samt kan ekonomiska, biologiska eller ekologiska faktorer vara av betydelse.

I tillägg 2 rekommenderas fiskarter som är lämpliga för test.

1.6.3.1. Förvaring

Testfisk skall helst komma från ett enda bestånd och vara av ungefär samma längd och ålder. Fisken skall förvaras i minst 12 dagar under följande betingelser:

— Kar:

Minst 300 liter rekommenderas för kallvattensfisk och minst 100 liter för varmvattensfisk.

— Belastning:

Anpassad efter systemet (cirkulation eller genomströmning) och fiskarterna.

— Vatten:

Se punkt 1.6.1.2.

— Ljus:

12—16 timmar ljus per dag.

— Koncentrationen upplöst syre:

Minst 80 % luftmättnadsvärdet.

— Utfodring:

Tre gånger per vecka eller varje dag, sista gången 24 timmar innan testet inleds.

1.6.3.2. Dödlighet

Efter 48 timmars acklimatisering registreras dödligheten och följande kriterier tillämpas:

— Högre än 10 % av populationen på sju dagar: hela partiet kasseras.

— Mellan 5 och 10 % av populationen: observationsperioden förlängs med ytterligare sju dagar. Om inga fler dödsfall inträffar kan partiet accepteras, i annat fall kasseras det.

— Lägre än 5 % av populationen: partiet kan accepteras.

1.6.4. *Acklimatisering*

All fisk skall i minst sju dagar före testet exponeras för vatten av samma kvalitet och med samma temperatur som vattnet som skall användas i testet.

1.6.5. *Testförfarande*

Innan det slutliga testet görs kan ett inledande test göras för att fastställa vilka koncentrationsintervaller som skall användas i huvudtestet.

Förutom behandlingsgrupperna omfattar testet en kontrollgrupp som inte får testämnet utan tillsatsämne om det är lämpligt.

Koncentrationerna får inte sjunka mer än 20 % under testperioden. Beroende på testämnets fysiska och kemiska egenskaper skall ett statiskt, semistatiskt eller genomströmningstest väljas så att detta krav blir uppfyllt.

Fisk exponeras för testämnet enligt beskrivningen nedan:

— Varaktighet:

Minst 48 timmar men helst 96 timmar.

— Antal djur:

Minst 10 per koncentration.

— Kar:

Med passande kapacitet i förhållande till den rekommenderade belastningen.

— Belastning:

För statisk och semistatiska test rekommenderas 1,0 g per liter som maximal belastning. För genomströmningssystem kan större belastning accepteras.

— Testade koncentrationer:

En kontroll och minst 5 koncentrationer som skiljer sig från varandra med en konstant faktor på högst 1,8 och täcker intervallet 0—100 % dödlighet.

— Vatten:

Se 1.6.1.2.

— Ljus:

12—16 timmar ljus per dag.

— Temperatur:

Lämplig för arten (tillägg 2) men inom ± 1°C i ett visst test.

— Koncentration av upplöst syre:

Inte mindre än 60 % av luftmättnadsvärdet vid den valda temperaturen.

— Utfodring:

Ingen.

Fisken besiktas efter de första 2–4 timmarna och minst var 24 timme. Fisk anses vara död om beröring av stjärtfenan inte framkallar någon reaktion och inga andningsrörelser kan iakttas. Död fisk avlägsnas när den upptäcks och dödsfall registreras.

Register förs över synliga abnormiteter (t.ex. förlust av jämvikten, ändrat simbeteende, öandningsfunktion, pigmentering osv.).

Mätningar av Ph, upplöst syre och temperatur skall göras dagligen.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Rita in den procentuella dödligheten för varje rekommenderad exponeringsperiod mot koncentrationen på logaritmiskt sannolikhetspapper. Använd ögonmått till att rita en linje till punkterna och avläs koncentrationen som motsvarar 50 % respons (se tillägg 3).

Detta är en uppskattningen av LC_{50} för den aktuella exponeringsperioden.

När tillräckligt med data har erhållits kan mediankoncentrationen LC_{50} och dess konfidensgränser ($p = 0,05$) uppskattas medelst standardförfaranden.

LC_{50}-värdet skall avrundas till en (eller högst två) signifikanta siffror.

I de fall där koncentrations-procentresponskurvans lutning är för brant för att medge en beräkning av LC_{50} räcker det med en grafisk uppskattning av detta värde.

Om två på varandra följande koncentrationer med ett förhållande på 1,8 endast ger 0 och 100 % dödlighet, räcker dessa två värden för att ange inom vilket område LC_{50} ligger.

Om det framgår att det inte går att hålla testämnet stabilt eller homogent skall detta rapporteras och försiktighet skall iakttas vid tolkningen av resultaten.

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall om möjligt innehålla:

— Uppgifter om testorganismen (vetenskapligt namn, stam, leverantör, eventuell förbehandling, storlek och antal som använts för varje koncentration).

— En lista över de koncentrationer som använts och alla tillgängliga uppgifter om testämnets stabilitet vid koncentrationerna i testlösningen.

— Beskrivning av testutrustningen.

— Om kemiska analyser görs skall metoder och resultat rapporteras.

— Källan till utspädningsvattnet och viktiga kemiska egenskaper (Ph, hårdhet, temperatur).

— Koncentrationen av eventuella tillsatsämnen.

— För ämnen med låg vattenlöslighet anges metod att framställa stam- och testlösning.

— Skälen till valet av och detaljer om använt testförfarande (t.ex. testets varaktighet, statisk, semistatisk, doseringstakt, genomströmningstakt, eventuell syrsättning, fiskbelastning osv.).

— Ljusbetingelser.

— Högsta testade koncentration som inte medför dödsfall inom testperioden.

— Lägsta testade koncentrationen som medför 100 % dödlighet inom testperioden.

— Kumulativ dödlighet för varje koncentration och kontrollprov (eller kontroll med tillsatsämne om sådant behövs) vid de rekommenderade observationstiderna.

— LC_{50}-värden för varje rekommenderad observationstid (om möjligt med 95 % konfidensgränser).

— Statistiska förfaranden som använts vid bestämning av LC_{50}-värdena.

— Grafisk framställning av denna responskurva över koncentration/procent i slutet av testet.

— Om möjligt lutningen av responskurvan över koncentration/procent i slutet av testet och dess 95 % konfidensgränser.

— Testlösningens koncentration av upplöst syre, pH-värden och temperatur var 24 timme.

— Om referensämne har använts skall erhållna resultat anges.

— Bevis på att kvalitetskriterierna har uppfyllts.

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 203*, Decision of the Council C(81) 30 final.

Tillägg 1

Rekonstituterat vatten

Exempel på lämpligt utspädningsvatten

Alla kemikalier skall vara av analytisk renhetsgrad.

Vattnet skall vara destillerat vatten av god kvalitet eller avjoniserat vatten med en ledningsförmåga på mindre än $5 \mu Scm^{-1}$

Stamlösningar

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (kalciumklorid dihydrat): 11,76 g

Upplös i vatten så att 1 liter erhålls.

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnesiumsulfat heptahydrat): 4,93 g

Upplös i vatten så att 1 liter erhålls.

$NaHCO_3$ (natriumhydrogenkarbonat): 2,59 g

Upplös i vatten så att 1 liter erhålls.

KCl (kaliumklorid): 0,23 g

Upplös i vatten så att 1 liter erhålls.

Rekonstituerat utspädningsvatten

Blanda 25 ml av de fyra stamlösningarna med vatten så att 1 liter erhålls.

Syrsätt tills koncentrationen av upplöst syre är lika med luftmättnadsvärdet.

Ph skall vara 7,9 ± 0,3.

Justera vid behov pH-värdet med NaOH (natriumhydroxid) eller HCl (saltsyra).

Det således framställda utspädningsvattnet sätts åt sidan i 12 timmar och skall inte syrsättas ytterligare.

Summan av Ca- och Mg-jonerna i denna lösning är 2,5 mmol per liter. Förhållandet mellan Ca- och Mg-jonerna är 4:1 och mellan Na- och K-jonerna 10:1. Den totala alkaliniteten hos denna lösning är 0,8 mmol per liter.

Avvikelser vid framställningen av utspädningsvattnet får inte ändra vattnets sammansättning eller egenskaper.

Tillägg 2

Fiskarter som rekommenderas till test

Rekommenderade arter	Rekommenderad temperaturintervall (°C)	Rekommenderad total längd på testdjur (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Sebrafisk	20–24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) Fathead minnow	20–24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linné 1758) Karp	20–24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) Red killifish	20–24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20–24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Linné 1758) Bluegill	20–24	5,0 ± 2,0
Salmo gairdneri (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Regnbåge	13–17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linné 1758) Guldfisk	20–24	6,0 ± 2,0

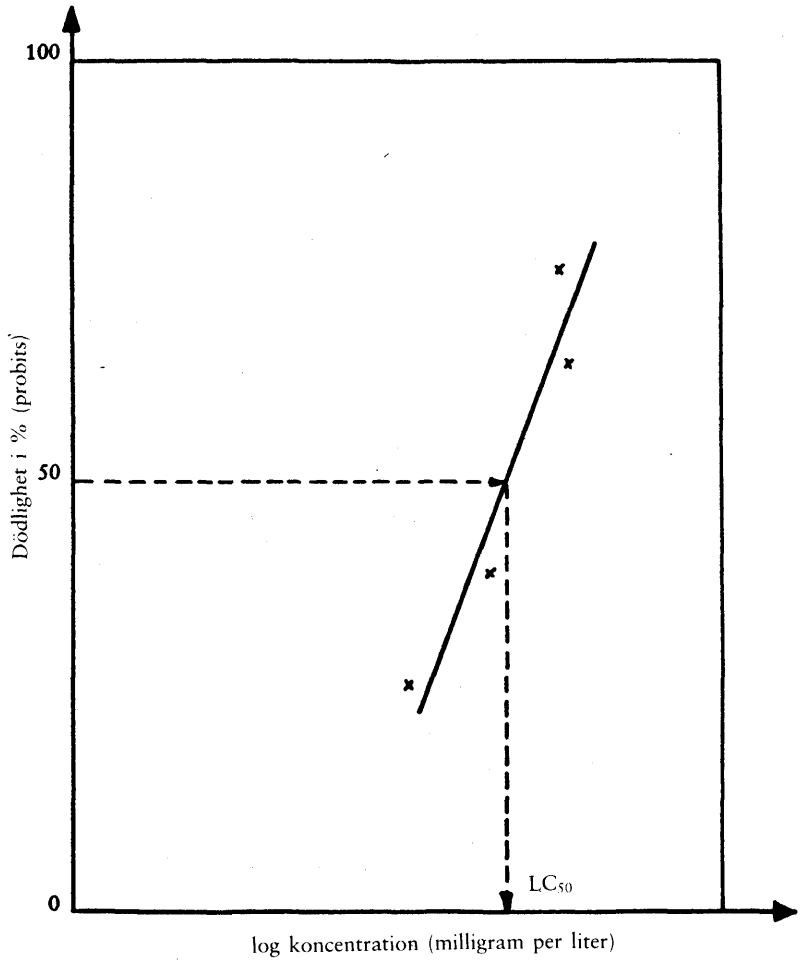
Hopsamling

Ovan angivna fiskar är lätta att odla och/eller är lätt tillgängliga året runt. De kan förädlas och odlas i fiskdammar eller i laboratorier under sjukdoms- och parasitkontrollerade betingelser så att testdjuren är friska och av känd härstamning. Dessa fiskar finns i många delar av världen.

Tillägg 3

Exempel på koncentration: procent dödlighet

Exempel på bestämning av LC_{50} på log-probit-papper



Tillägg 4

Exempel på standardförfaranden

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 203,* Decision of the Council, C(81) 30 final.

2) ISO/TC/147/SC 5/WG/3. — *Draft proposal for screening chemicals and products for acute toxicity to fish using a static, semi-static or flow-through method,* Document 7436/I, II, III, 1980/06/15 ISO/DP.

3) Eidgenössiches Departament des Innern, Schweiz: *Richtlinien fÜr Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmetoden* — Del II 1974.

4) DIN *Testverfahren mit Wasserorganismen,* 38 412 (L1) und L (15).

5) AFNOR, *Determination del la toxicité aigue d'une substance vis-à-vis de Brachydanio rerio,* T90-303.

6) JIS K 0102, *Acute toxicity test for fish.*

7) *Degradability, ecotoxicity and bioaccumulation. The determination of the possible effects of chemicals and wastes of the aquatic environment,* volumes I and II, Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands 1980.

8) Environmental Protection Agency, 1975, *Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians,* The committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009.

9) Environmental Protection Agency, January 1978, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012.

10) Environmental Protection Agency, *Toxic Substance Control,* 16 March 1979, part IV.

11) *Standard methods for the examination of water and wastewater,* 14th edition, 1975, APHA-AWWA-WPCF.

12) Commission of the European Communities, *Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish,* EEC Study D.8368, 22 March 1979.

13) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, *J. Pharm, Exp. Therap.,* vol. 96, 1949, s. 99.

C. 2. AKUT TOXICITET FÖR *DAPHNIA*

1. METOD

1.1. Inledning

Såvitt möjligt är det värdefullt att känna till testämnets löslighet i vatten, ångtryck, kemiska stabilitet, dissociationskonstanter och bionedbrytbarhet innan testet påbörjas.

Vid planeringen och tolkningen av testresultaten skall hänsyn tas till andra uppgifter, t.ex. strukturformel, renhetsgrad, arten av och procenttalet signifikanta orenheter, förekomst och mängder av tillsatser och n-oktanol/vattendelningskoefficienten.

1.2. Definitioner och enheter

De krav som ställ i direktivet på LC_{50} för *Daphnia* skall anses vara uppfyllda genom att EC_{50} bestäms enligt denna testmetod.

I detta test uttrycks akut toxicitet som median effektiv koncentration (EC_{50}) för immobilisering. Det är den koncentration (uttryckt genom initiala värden) som medför att 50 % av *Daphnia* i en försöksgrupp dör inom loppet av en 24-timmars exponeringsperiod. 48-timmars EC_{50} för immobilisering kan även bestämmas om det är praktiskt möjligt.

Immobilisering:

Djur som inte kan simma 15 sekunder efter en försiktig omrörning i testkärlet anses vara immobila.

Alla koncentrationer av testämnet uttrycks som vikt per vikt (delar per miljon).

1.3. Referensämnen

Ett referensämne kan användas för att visa att försöksarternas känslighet inte har ändrats signifikant under testbetingelserna i laboratoriet.

Inga referensämnen finns angivna för detta test.

1.4. Testmetodsprincip

Daphnia exponeras för testämnet som i en rad koncentrationer tillsätts vattnet under minst 24 timmar. Vid behov kan exponeringstiden förlängas till 48 timmar.

Under identiska testbetingelser i ett lämpligt koncentrationsintervall påverkas *Daphnias*$_{50}$ genomsnittliga simförmåga i olika grad av olika koncentrationer av ett testämne. Olika koncentrationer resulterar i olika procentandelar *Daphnia* som i slutet av testet inte längre kan simma. De koncentrationer som leder till 0 eller 100 % immobilisering avläses direkt vid observationerna under testet medan 24-timmars EC_{50} (eller 48-timmars EC_{50}) om möjligt bestäms genom beräkning.

Ett statiskt system används för denna metod vilket innebär att testlösningarna inte förnyas under exponeringsperioden.

1.5. Kvalitetskriterier

Immobiliseringen i kontrollgruppen får inte överstiga 10 % i slutet av testet.

I slutet av testet får syrekoncentrationen inte vara lägre än 2 mg per liter.

Daphnia som ingår i testet får inte fångas upp av vattenytan, åtminstone inte i kontrollgruppen.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Lösningar av testämnen

Stamlösningar av erforderlig styrka framställs genom att testämnet upplöses i avjoniserat vatten eller vatten enligt 1.6.1.2

Stamlösningar av ämnen med låg vattenlöslighet kan framställas genom ultraljudsdispersion eller om så behövs genom användning av organiska lösningsmedel, emulgeringsmedel eller dispergermedel. Om sådana tillsatsämnen används skall kontroll-*Daphnia* exponeras för samma koncentration av tillsatsämnet som används i den högsta koncentrationen av testämnet. Koncentrationen av sådana tillsatser får inte överstiga 0,1 g per liter.

De valda testkoncentrationerna framställs genom utspädning av stamlösningen. Om höga koncentrationer testas kan ämnet lösas direkt i utspädningsvattnet.

Testet skall göras utan justering av pH-värdet. Om det finns tecken på en markant förändring av pH-värdet rekommenderas att testet upprepas med pH-justering och att resultaten rapporteras. I detta fall skall pH-värdet i stamlösningen justeras efter pH-värdet i utspädningsvattnet, om det inte finns särskilda skäl som talar mot detta. HCl och NaOH är förstahandsvalen för detta ändamål. Denna pH-justering skall göras på ett sådant sätt att testämnets koncentration i stamlösningen inte ändras i någon signifikant grad. Om justeringen medför någon kemisk reaktion eller fysisk utfällning av testämnet skall detta rapporteras.

1.6.1.2. Odlings- och utspädningsvatten

Allt vatten som lämpar sig för odling av *Daphnia*, vare sig det är naturligt eller rekonstituerat vatten (se tillägg) kan användas i detta test. För att undgå den nödvändiga acklimatiseringen före testet rekommenderas att odlingsvattnet håller samma kvalitet som det odlingsvatten som används i testet.

1.6.2. *Apparatur*

Normal laboratorieapparatur och -utrustning skall användas. Utrustning som kommer i kontakt med testlösningarna skall helst vara helt tillverkad av glas:

— Syremätare (med mikroelektrod eller annan lämplig utrustning för mätning av upplöst syre i prover med låg volym).

— Lämplig apparatur för temperaturkontroll.

— pH-mätare.

— Utrustning för bestämning av vattnets hårdhet.

1.6.3. *Testorganism*

Daphnia magna eller *Daphnia pulex*, som är mer än sex timmar och mindre än 24 timmar gamla i början av testet, odlade i laboratoriet, fria från uppenbara sjukdomar och med en känd historia (t.ex. odling — alla förbehandlingar osv.).

1.6.4. *Testförfarande*

Innan det slutliga testet görs kan ett inledande test göras för att fastställa vilka koncentrationsintervaller som skall användas i huvudtestet. Förutom behandlingsgrupperna omfattar testet en kontrollgrupp som inte får testämnet utan ett tillsatsämne.

Daphnia exponeras för testämnet enligt beskrivningen nedan:

— Varaktighet:
Minst 24 timmar.

— Antal djur:
Minst 20 för varje koncentration, helst uppdelade i fyra partier om fem djur vardera eller två partier om 10.

— Belastning:
För varje djur skall minst 2 ml testlösning tillhandahållas.

— Testkoncentrationer:
Testlösningen skall framställas omedelbart innan *Daphnia* tillsätts, helst utan något annat lösningsmedel än vatten. Koncentrationerna framställs i en geometrisk serie med ett koncentrationsförhållande på 1,8. Tillräckligt många koncentrationer skall användas för att uppnå 0 och 100 % immobilisering efter 24 timmar och ett passande antal mellangrader av immobilisering skall testas tillsammans med kontrollgrupp för att möjliggöra en beräkning av 24-timmars EC_{50}.

— Vatten:
Se 1.6.1.2.

— Ljus:
En cykel med ljus och mörker kan användas men totalt mörker är acceptabelt.

— Temperatur:
Testtemperaturen skall ligga mellan 18 och 22°C och skall för var enskilt test hållas konstant inom ± 1,0°C.

— Syrsättning:
Testlösningarna skall inte syrsättas medelst luftgenombubbling.

— Utfodring:
Ingen.

pH-värdet och syrekoncentrationen i kontrollgruppen och i alla testkoncentrationer skall mätas i slutet av testet. pH-värdet i testlösningen skall inte ändras.

Flyktiga föreningar skall testas i helt fyllda och slutna behållare som är tillräckligt stora för att förhindra syrebrist.

Daphnia besiktas efter minst 24 timmars exponering och åter efter 48 timmar om testet har förlängts.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Rita in den kumulativa procentuella immobiliseringen för varje koncentration efter minst 24 timmars exponering som funktion av koncentrationerna på logaritmiskt sannolikhetspapper. Rita en linje till punkterna och avläs koncentrationen som motsvarar 50 % respons.

När tillräckligt med data har erhållits kan mediankoncentrationen och dess konfidensgränser (p = 0,05) uppskattas medelst standardförfaranden.

EC_{50}-värdet skall avrundas till en (eller högst två) signifikanta siffror.

I de fall där koncentrations-procentresponskurvans lutning är för brant för att medge en beräkning av EC_{50} räcker det med en grafisk uppskattning av detta värde.

Om två på varandra följande koncentrationer med ett förhållande på 1,8 endast ger 0 och 100 % immobilisering, räcker dessa två värden för att ange inom vilket område EC_{50} ligger.

Om det framgår att det inte går att hålla testämnet stabilt eller homogent skall detta rapporteras och försiktighet skall iakttas vid tolkningen av resultaten.

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall om möjligt innehålla:

— Uppgifter om testorganismen (vetenskapligt namn, stam, leverantör eller källa, eventuell förbehandling, odlingsmetod — inklusive källa, typ av och mängd foder, utfodringsfrekvens).

— Antal *Daphnia* som har använts i varje testkoncentration.

— En lista över de koncentrationer som använts och alla tillgängliga uppgifter om testämnets stabilitet vid koncentrationerna i testlösningen.

— Beskrivning av testkärl, volymer lösning i varje testkärl, antal djur per kärl.

— Om kemiska analyser görs skall metoder och resultat rapporteras.

— Källan till utspädningsvattnet och viktiga kemiska egenskaper.

— Koncentrationen av eventuella tillsatsämnen (organiska lösningsmedel, dispergermedel osv.).

— Ljusbetingelser.

— Högsta testade koncentration som inte medför immobilisering inom testperioden.

— Lägsta testade koncentration som medför 100 % immobilisering inom testperioden.

— Kumulativ immobilisering i blindproven, i kontrollproven med tillsatsämne och i varje testad koncentration vid de rekommenderade observationstiderna (24 timmar eller 24 och 48 timmar).

— EC_{50}-värden för varje rekommenderad observationstid (om möjligt med 95 % konfidensgränser).

— Kurva över koncentrations-procentresponsen i slutet av testet.

— Statistiska förfaranden som använts vid bestämning av EC_{50}-värdena.

— Om möjligt lutningen av responskurvan över koncentration-procent vid 24 timmar och dess 95 % konfidensgränser.

— Testlösningens koncentration av upplöst syre, pH-värden och temperatur.

— Om referensämne har använts skall erhållna resultat rapporteras.

— Bevis på att kvalitetskriterierna har uppfyllts.

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 202*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) ISO *Inhibition of mobility of* Daphnia magna *Straus (Cladocera — crustacea)* ISO/6341.

3) AFNOR *Inhibition of mobility of* Daphnia magna *Straus (Cladocera — crustacea)* NTF 90 301 (April 1974).

4) DIN *Testverfahren mit Wasserorganismen* 38412 (L1) und (L11).

Tillägg

Rekonstituerat vatten

Exempel på lämpligt utspädningsvatten

Alla kemikalier skall vara av analytisk renhetsgrad.

Vattnet skall vara destillerat vatten av god kvalitet eller avjoniserat vatten med en ledningsförmåga på mindre än $5 \mu Scm^{-1}$

Stamlösningar

$CaCl_2 \pm 2H_2O$ (kalciumklorid-dihydrat) 11,76 g
Upplös i vatten så att 1 liter erhålls.

$MgSO_4 \pm 7H_2O$ (magnesiumsulfat-heptahydrat): 4,93 g
Upplös i vatten så att 1 liter erhålls.

$NaHCO_3$ (natriumhydrogenkarbonat): 2,59 g
Upplös i vatten så att 1 liter erhålls.

KCl (kaliumklorid): 0,23 g
Upplös i vatten så att 1 liter erhålls.

Rekonstituerat utspädningsvatten

Blanda 25 ml av de fyra stamlösningarna med vatten så att 1 liter erhålls.

Syrsätt tills koncentrationen av upplöst syre är lika med luftmättnadsvärdet.

pH-värdet skall vara 7,9 ± 0,3. Justera vid behov pH-värdet med NaOH (natriumhydroxid) eller HCl (saltsyra).

Det således framställda utspädningsvattnet sätts åt sidan i ungefär 12 timmar och skall inte syrsättas ytterligare.

Summan av Ca- och Mg-jonerna i denna lösning är 2,5 mmol per liter. Förhållandet mellan Ca- och Mg-jonerna är 4:1 och mellan Na- och K-jonerna 10:1. Den totala alkaliniteten hos denna lösning är 0,8 mmol per liter.

Avvikelser vid framställningen av utspädningsvattnet får inte ändra vattnets sammansättning eller egenskaper.

C. 3. NEDBRYTNING

BIOTISK NEDBRYTNING: MODIFIERAT OECD-SCREENING-TEST

1. METOD

1.1. Inledning

Syftet med denna metod är att mäta bionedbrytbarheten hos vattenlösliga, icke flyktiga organiska föreningar i ett aerobt vattenmedium med en initial koncentration motsvarande 5—40 mg DOC ("dissolved organic carbon", dvs. upplöst organiskt kol) per liter. Om detektionsgränserna för mätapparatur för bestämning av organiskt kol förbättras kan det vara fördelaktigt att använda lägre testkoncentrationer, särskilt för toxiska föreningar. Innehållet organiskt kol i testämnet måste fastställas.

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid den använda testkoncentrationen

— minst är vattenlösliga vid den koncentration som skall testas (5—40 mg DOC per liter),

— har försumbart ångtryck,

— inte hämmar bakterier,

— inte signifikant adsorberas till glasytor.

Uppgifter om de relativa proportionerna av testämnets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de erhållna resultaten, särskilt om resultaten är låga eller marginella.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

1.2. Definitioner och enheter

Nedbrytningen definieras som den procentandel av testämnet som avgår, uttryckt i procent DOC:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

där:

D_t = nedbrytning i procent DOC som avgått vid tid t,

C_0 = initial DOC-koncentration i kulturmediet (mg DOC per liter),

C_t = DOC-koncentration i kulturmediet vid tid t (mg DOC per liter),

$C_{bl(0)}$ = initial DOC-koncentration i blindprovet (mg DOC per liter),

$C_{bl(t)}$ = DOC-koncentration i blindprovet vid tid t (mg DOC per liter).

1.3. Referensämnen

Det är önskvärt att använda lämpliga kontrollkemikalier för att kontrollera inokulatets aktivitet.

Till detta ändamål kan t.ex. användas anilin, natriumacetat eller natriumbensoat och de skall då utvisa en DOC-avgång på $\geq$ 70 % inom 10 dagar, räknat från den dag då den observerade bionedbrytningsnivån första gången överstiger 10 %. Dessa resultat skall erhållas inom en testperiod på 28 dagar, i annat fall anses testet ogiltigt och skall upprepas med ett inokulat från en annan källa.

1.4. **Testmetodsprincip**

En på förhand bestämd mängd av föreningen upplöses i ett oorganiskt medium (mineralnäringslösning med tillsats av ett spårämne och en essentiell vitaminlösning) till en koncentration motsvarande 5—40 mg DOC per liter. Lösningen inokuleras med ett litet antal mikroorganismer från en blandad population och syrsättas vid 20—25°C i mörker eller i endast indirekt ljus.

Nedbrytningen följs genom DOC-analyser under en 28-dagarsperiod.

Förfarandet kontrolleras med ett kontrollämne.

Ett DOC-blindprov skall bestämmas i ett parallelltest som varken innehåller test- eller ökontrollmaterial.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Metodens reproducerbarhet har fastställts genom OECD- och EEC-ringtest.

Den lägsta koncentrationen av ett testämne för vilken denna metod kan användas bestäms till stor del av den organiska kolanalysens detektionsgräns (0,5 mg kol per liter på nuvarande stadium) och av koncentrationen upplöst organiskt kol i näringslösningen.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Vatten

Avjoniserat eller destillerat vatten utan innehåll av toxiska substanser (särskilt koppar) för allmänt bruk som lösningsmedel. Vatten som har avjoniserats genom destillation eller jonbyte är lämpligt.

Destillerat vatten får inte innehålla mer än 10 % av det organiska kol som tillförs med testämnet.

Vatten med en hög renhet är nödvändigt med tanke på DOC-analyserna i koncentrationsintervallet 0–40 mg per liter. Föroreningarna stammar från inneboende orenheter men också från jonbyteshartser och mikrobial utveckling (bakterier, alger under inflytande av ljus osv.). Till en testserie får endast vatten från samma behållare användas och detta vatten skall kontrolleras i förväg medelst DOC-analys. Vid behov kan lämpligt vatten erhållas genom UV-strålning eller på annat sätt.

1.6.1.2. Näringslösning

Näringslösningen innehåller per liter 1 ml av vardera av följande lösningar a — f i vatten (1.6.1.1.) (AR = analytisk reagens):

a) KH_2PO_4 (kaliumdihydrogenfosfat): 8,50 g AR

K_2HPO_4 (dikaliumhydrogenfosfat): 21,75 g AR

Na_2HPO_4 $2H_2O$ (dinatriumhydrogenfosfat-dihydrat): 33,40 g AR

NH_4CL (ammoniumklorid): 20,00 g AR

Upplös i vatten så att 1 000 ml erhålls (1.6.1.1.). pH-värdet skall vara 7,2.

b) $MgSO_4$ $7H_2O$ (magnesiumsulfat-heptahydrat): 22,50 g AR

c) $CaCl_2$ (kalciumklorid) 27,50 g AR

Upplös i vatten så att 1 000 ml vatten erhålls (1.6.1.1.).

d) $FeCl_3$ $6H_2O$ (järn(III)klorid-hexahydrat) 0,25 g AR

Upplös i vatten så att 1 000 ml erhålls (1.6.1.1.).

Denna lösning skall framställas omedelbart innan den skall användas.

e) Spårämneslösning

$MnSO_4$ $4H_2O$ (mangan(II)sulfat-tetrahydrat) (= 30,23 mg $MnSO_4$ H_2O):	39,9 mg AR
H_3BO_3 (borsyra):	57,2 mg AR
$ZnSO_4$ $7H_2O$ (zinksulfat-heptahydrat):	42,8 mg AR
$(NH_4)_6MO_7O_{24}$ (ammonium-heptamolybdat (IV)) (= 36,85 mg $(NH_4)_6MO_7O_{24}$ $4H_2O$):	34,7 mg AR
Fe-kelat ($FeCl_3$ EDTA):	100,0 mg AR

Upplös i vatten så att 1 000 ml erhålls (1.6.1.1.).

Sterilisera stamlösningen av spårämne vid 120°C, 2 atm., i 20 minuter.

f) Vitaminlösning

Biotin	0,2 mg AR
Nikotinsyra	2,0 mg AR
Tiamin	1,0 mg AR
p-aminobensoesyra	1,0 mg AR
Pantotensyra	1,0 mg AR
Pyridoxamin	5,0 mg AR
Cyanokobalamin	2,0 mg AR
Folsyra	5,0 mg AR

Upplös i vatten så att 100 ml erhålls (1.6.1.1.)

Lösningen sterilfiltreras genom 0,2 µm membranfilter. I stället för lösning 1.6.1.2. f) kan 15 mg jästextrakt användas per 100 ml vatten (1.6.1.1.).

1.6.1.3. Kontrollämnen

Anilin (nydestillerat), natriumacetat, natriumbensoat.

1.6.1.4. Kvicksilverkloridlösning

1 % av $HgCl_2$ i vatten (1.6.1.1.).

1.6.2. *Apparatur*

1.6.2.1. Skakapparat som rymmer 2-liters Erlenmeyer-kolvar, antingen med automatiska temperaturkontroller eller använd i ett rum med en konstant temperatur på 20—25°C.

1.6.2.2. Smalhalsade 2-liters Erlenmeyer-kolvar (veckade eller rynkade kolvar rekommenderas). Kolvarna skall rengöras noggrant med t.ex. alkoholisk saltsyra före användning, sköljas och torkas för att undvika förorening av rester från tidigare prov. Även kolvarna skall rengöras innan de används första gången eftersom de kan vara förorenade.

1.6.2.3. Membranfiltreringsapparat

1.6.2.4. Membranfilter 0,2 µm.

1.6.2.5. Kolanalysator.

1.6.3. *Förberedelse av inokulat*

Någon av följande källor kan användas som inokulat förutsatt att dess livskraft kontrolleras medelst ett kontrollämne (1.6.1.3.).

1.6.3.1. Inokulat från ett sekundärt utflöde

Inokulatet erhålls helst från ett sekundärt utflöde av god kvalitet vid ett reningsverk som huvudsakligen behandlar spillvatten från hushåll. Provet skall hålls under aeroba betingelser i perioden mellan provtagning och användning. För att förbereda inokulatet filtreras provet genom ett grovt filter och de första 200 ml kasseras. Filtratet hålls under aeroba betingelser tills det skall användas. Inokulatet skall användas samma dag som provet tas.

1.6.3.2. Inokulat från jord

100 g jord (bördig, inte steril) uppslammas i 1 000 ml klorfritt dricksvatten (jordar med extremt hög halt av lera, sand eller organiskt kol är inte lämpliga). Efter omrörning får utfällning av suspensionen ske i 30 minuter.

Supernatanten filtreras genom ett grovt filtrerpapper och de första 200 ml kasseras. Filtratet syrsätts omedelbart och syrsättningen pågår tills att filtratet skall användas. Inokulatet skall användas samma dag som provet tas.

1.6.3.3. Inokulat från ytvatten

Ett inokulat som tas från ett lämpligt ytvatten. Provet filtreras genom ett grovt filtrerpapper och de första 200 ml kasseras. Filtratet hålls under aeroba betingelser till det skall användas. Inokulatet skall användas samma dag som provet tas.

1.6.3.4. Blandat inokulat

Lika volymer av de tre inokulatproven blandas väl och det slutliga inokulatet tas från denna blandning.

Inokulatets lämplighet kontrolleras medelst ett kontrollämne (1.6.1.3.)

1.6.4. *Testförfarande*

Dubbla och samtidiga utvärderingar skall göras av testämnena tillsammans med kontrollämnet (1.6.1.3.). Dessutom skall ett blindprov med inokulat men utan test- eller kontrollmaterial göras för att bestämma DOC-blindvärdena.

En stamlösning av testämnet i vatten (1.6.1.1.) framställs. En volym av denna stamlösning tillsätts till näringslösningen (1.6.1.2.) så att en kolkoncentration på 5—40 mg DOC per liter uppnås. Kontrollmaterialet (1.6.1.3.) testas med en initial koncentration motsvarande 20 mg DOC per liter.

900 ml av näringslösningen placeras i två reaktionskärl (1.6.2.2.) och inokuleras med 0,5 ml per literportion av inokulatet (1.6.3.). Kärlets öppning täcks med t.ex. aluminiumfolie på ett sådant sätt att luftväxlingen mellan kolven och den omgivande atmosfären inte hindras i onödan (bomull lämpar sig inte på grund av DOC-analysen). Kärlen placeras i skakapparaten. Temperaturen 20—25°C skall hållas oförändrad under testet och kärlen skall avskärmas från ljus. Luften får inte innehålla några föroreningar eller toxiska material (klorerade lösningsmedel osv.).

Under loppet av bionedbrytningstestet görs dubbla bestämningar av DOC-koncentrationerna dag 1, 27 och 28. Minst tre ytterligare analyser (ungefär den 7, 14 och 21 dagen) skall göras för att följa nedbrytningsförloppet.

Endast den nödvändiga volymen av kulturmediet skall tas till varje bestämning. För olika apparatur, t.ex. centrifugeringen eller membranfiltreringen som föregår själva kolbestämningen, krävs olika volymer. Förluster genom förångning av kulturmediet skall kompenseras genom tillförsel av vatten (1.6.1.1.) i erforderliga mängder. Kulturmediet skall blandas väl innan prov tas. Material som

vidhäftar kärlväggarna skall upplösas eller uppslammas före provtagning. Membranfiltreringen eller centrifugeringen skall göras omedelbart. De filtrerade eller centrifugerade proven skall analyseras samma dag. I annat fall skall de konserveras med 0,05 ml $HgCl_2$-lösning (1.6.1.4.) för varje 10 ml näringsmedium eller genom att förvaras vid 2—4°C i upp till 24 timmar, eller under -18°C vid längre perioder.

Om en platå observeras före den 28 dagen kan testet avslutas. Om nedbrytningen uppenbarligen har börjat dag 28 men inte nått en platå anses det vara god praxis att förlänga testet med en eller två veckor.

Alla steg kräver stor försiktighet och att renligheten är garanterad för kärl, pipetter osv. (men de behöver inte vara sterila).

1.6.5. *DOC-bestämningar*

Membranfilter är lämpliga om det är garanterat att de varken frigör kol eller adsorberar ämnet i filtreringssteget.

Om proven centrifugeras skall detta göras vid 40 000 ms^{-2} (~ 4 000 g) i 15 minuter, helst i en kylcentrifug men i alla händelser under 40°C.

Anmärkningar

Differentieringen mellan TOC och DOC vid centrifugering vid mycket låga koncentrationer tycks inte fungera bra eftersom antingen avlägsnas inte alla bakterier eller återupplöses kol som del av bakterieplasmat. Vid högre testkoncentrationer (≥ 10 mg C per liter) och samma lilla inokulering tycks centrifugeringsfelet bli jämförelsevis litet.

Det prov som har tagits från kulturmediet (ungefär 30 ml) centrifugeras eller membranfiltreras omedelbart i filtreringsapparaten (1.6.2.3.) med användning av membranfilter enligt 1.6.2.4. De första 20 ml av filtratet kasseras.

DOC-koncentrationen bestäms två gånger i det kvarvarande filtratet (ungefär 10 ml) medelst TOC-/DOC-instrumentet (1.6.2.5.). Om det inte går att analysera filtratet samma dag skall det konserveras enligt punkt 1.6.4.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Analysresultaten registreras på bifogade formulär (tillägg 1) och värdena för bionedbrytningen beräknas enligt 1.2.

DOC-koncentrationerna beräknas till närmaste 0,1 mg per liter. Medelvärdet av D_t-värdena avrundas till närmaste hela procenttal.

Förloppet av nedbrytningstestet följs grafiskt i ett diagram enligt bifogade exempel (tillägg 2).

Resultaten av nedbrytningstestet är giltiga om följande villkor är uppfyllt: Kontrollmaterialet i samma testserie skall ge ≥ 70 % DOC-avgång på inom 10 dagar, räknat från den dag då den observerade bionedbrytningsnivån först överstiger 10 %. Om inte detta resultat erhålls inom den 28 dagar långa testperioden skall hela serien kasseras.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla:

— Data skall rapporteras enligt formuläret (tillägg 1).

— Förloppet av nedbrytningstestet framställs grafiskt i ett diagram som visar eftersläpningsfasen, nedbrytningsfasen, lutning och "tidsfönster" (med tidsfönster menas här en 10-dagarsperiod med början den dag då den observerade bionedbrytningsnivån först översteg 10 %).

— Bevis på testets giltighet (kontrollämne ≥ 70 % DOC-avgång inom 10 dagar räknat från den dag då nedbrytningen översteg 10 %, vilken dag skall infalla inom testperiodens 28 dagar).

3.2. **Tolkning av resultat**

På grund av stringensen i detta test behöver ett lågt resultat inte nödvändigtvis betyda att testämnet inte är bionedbrytbart under miljöbetingelser utan det pekar mera på att det krävs mer arbete för att fastställa detta.

Testkemikalier som visar en hög DOC i detta test skall anses vara lätt bionedbrytbara förutsatt att denna nivå uppnås inom tidsfönstrets 10 dagar räknat från den dag då den observerade nivån av bionedbrytning först överstiger 10 %.

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301E,* Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* vol. 3, No. 2, 1979, s. 159—173.

3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* vol. 5, No. 1, 1981, s. 45—55.

Tillägg 1

Biotisk nedbrytning: modifierad OECD-screening

Provningsanstalt .....

Testämne .....

Test nr .....

Testdata

Teoretisk koncentration ..... mg DOC per liter

Kolbestämningar

	Kolv nr		DOC-koncentrationer efter x dagar (milligram per liter)							
			0 (C_0)							
Blind Mineralisk näringslösning utan testmaterial men med inokulat	1	a_1								
		a_2								
		$C_{a(t)} = \frac{a_1 + a_2}{2}$								
	2	b_1								
		b_2								
		$C_{b(t)} = \frac{b_1 + b_2}{2}$								
Test Mineralisk näringslösning med testämne och med inokulat	3	bl_1								
		bl_2								
		$C_{bl(t)} = \frac{bl_1 + bl_2}{2}$								

Utvärdering av rådata

Kolv nr	Beräkning av resultat	% DOC-avgång efter x dagar							
		0							
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0							
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0							
Medelvärde(*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0							

(*) Medelvärden skall inte beräknas om det är stor skillnad mellan D_1 och D_2.

Biotisk nedbrytning: modifierad OECD-screening (formulär)

Provningsanstalt .....

Ansvarig för testet .....

Testets startdatum ..... Test nr .....

Testämne .....

Kemisk struktur .....

Stamlösning:

	milligram per liter	milligram per liter TOC(*)	milligram per liter DOC(**)
Testämnets koncentrat			

(*) Bristande överensstämmelse mellan DOC- och TOC-värden pekar på otillräcklig löslighet hos testämnet.
(**) Alla DOC-Värden bestämda efter membranfiltrering eller centrifugering.

Kolanalysator .....

Inokulat .....

Testresultat

D_t = ... % DOC-avgång efter ..... dagar.

Resultatens giltighet

Kontrollämne .....

Resultat ..... % DOC-avgång efter ..... dagar.

Referenstest nr .....

Anmärkningar:

....

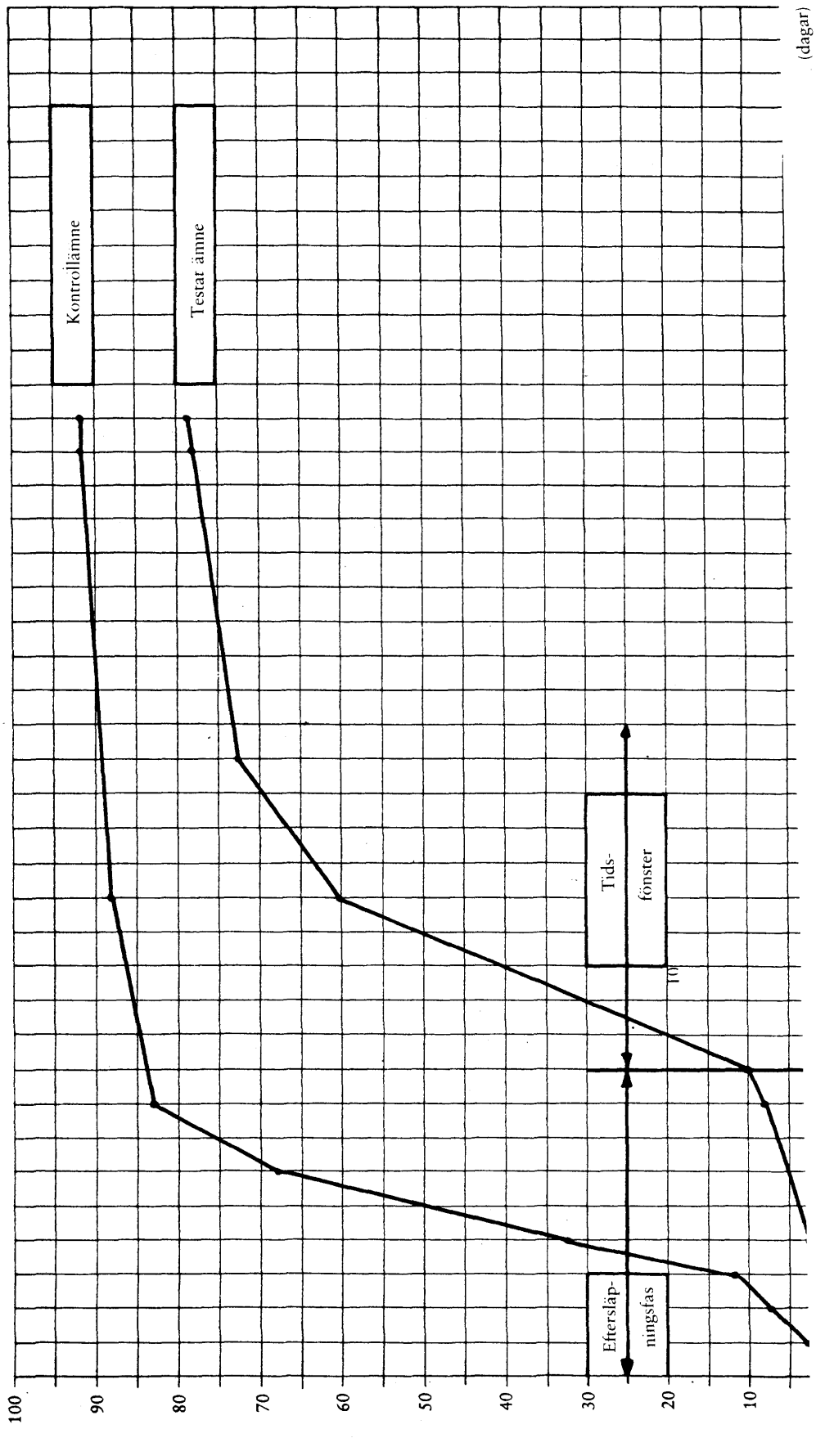
Datum Namnteckning

Tillägg 2

Modifierad OECD-screening

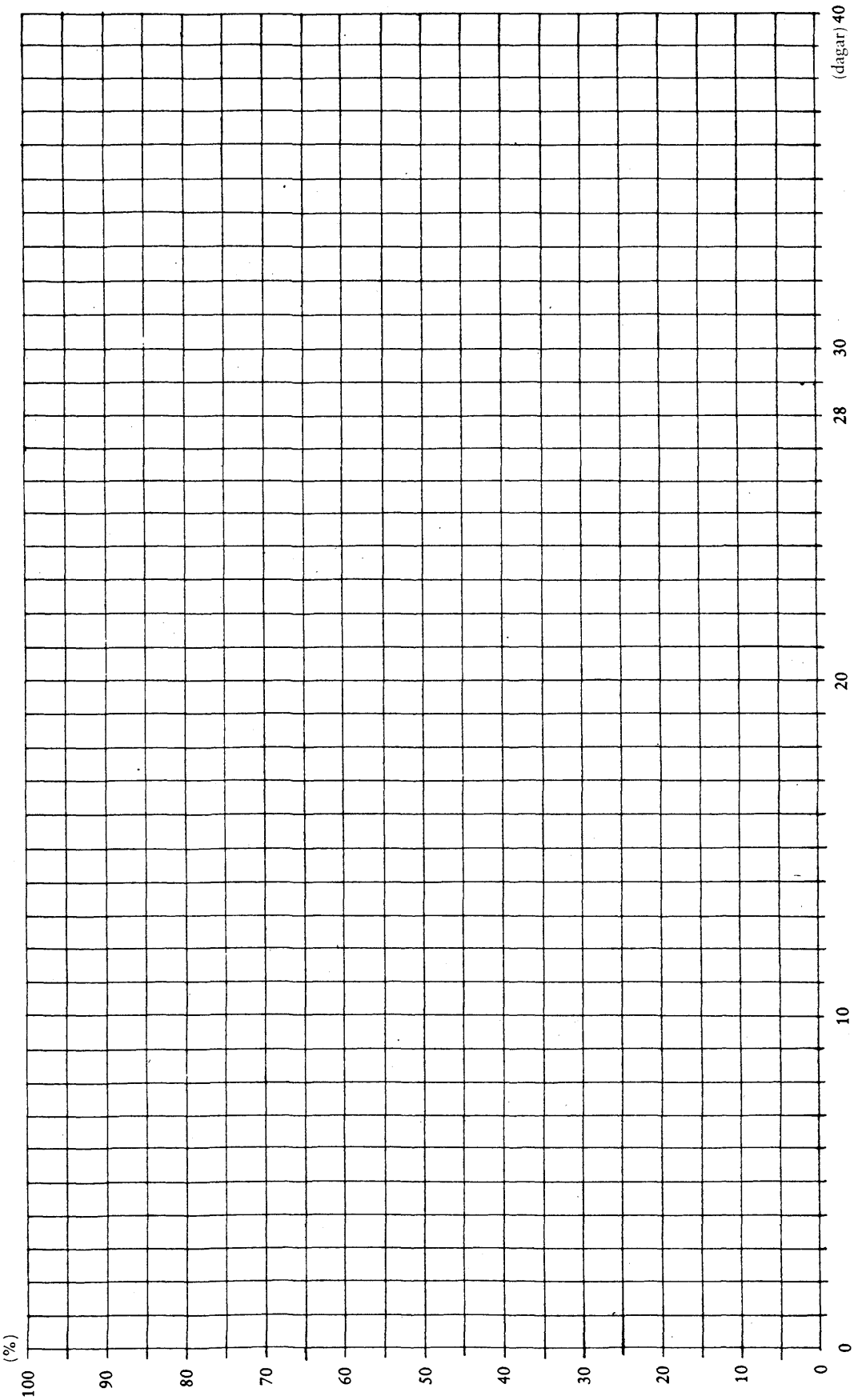
Provningsanstalt ..... Test nr .....

Testämne .....



Modifierad OECD-screening

Provningsanstalt ..... Testämne ..... Test nr .....



C. 4. NEDBRYTNING

BIOTISK NEDBRYTNING: MODIFIERAT AFNOR-TEST NF T 90/302

1. METOD

1.1. Inledning

Syftet med denna metod är att mäta bionedbrytbarheten hos vattenlösliga, icke flyktiga organiska föreningar i ett aerobt vattenmedium med en initial koncentration motsvarande 40 mg DOC ("dissolved organic carbon", dvs. upplöst organiskt kol) per liter. Om känslighetsgränserna för organiska kolanalysatorer förbättras kan det vara fördelaktigt att använda lägre testkoncentrationer, särskilt för toxiska föreningar.

Innehållet organiskt kol i testämnet måste fastställas.

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid den använda testkoncentrationen

— minst är vattenlösliga vid den koncentration som skall testas (40 mg DOC per liter),

— har försumbart ångtryck,

— inte hämmar bakterier,

— inte signifikant adsorberas till glasytor.

Uppgifter om de relativa proportionerna av testämnets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de erhållna resultaten, särskilt om resultaten är låga.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat.

1.2. Definitioner och enheter

Nedbrytningen definieras som den procentandel av testämnet som avgår, uttryckt i procent DOC:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

där:

D_t = nedbrytning i procent DOC som avgått vid tid t,
C_0 = initial DOC-koncentration i kulturmediet (mg DOC per liter),
C_t = DOC-koncentration i kulturmediet vid tid t (mg DOC per liter),
$C_{bl(0)}$ = initial DOC-koncentration i blindprovet (mg DOC per liter),
$C_{bl(t)}$ = DOC-koncentration i blindprovet vid tid (mg DOC per liter).

1.3. Referensämnen

Det är önskvärt att använda lämpliga kontrollkemikalier för att kontrollera inokulatets aktivitet.

Till detta ändamål kan t.ex. användas anilin, natriumacetat eller natriumbensoat och de skall då utvisa en DOC-avgång på ≥ 70 % inom 28 dagar. I annat fall anses testet vara ogiltigt och skall upprepas med ett inokulat från en annan källa. Med just den här testmetoden används särskilt glukos i hämningstestet och för att kontrollera aktiviteten hos inokulatet, som även kan kontrolleras medelst anilin, natriumacetat och natriumbensoat.

1.4. **Testmetodsprincip**

Kemo-organotrofiska mikroorganismer bionedbryter organiska ämnen som är upplösta i vatten genom att använda dem som den enda kol- och energikällan. Dessa produkter undersöks vid en sådan koncentration att det initiala innehållet av organiskt kol är 40 mg per liter. Organiskt kol som förblir i lösning mäts minst efter 3, 7, 14 och 28 dagar. Samtidigt kontrolleras testämnet för möjliga hämmande effekter på inokulatet.

Förfarandet kontrolleras med ett kontrollämne.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Metodens reproducerbarhet har fastställts genom OECD- och EEC-ringtest.

Den lägsta koncentrationen av ett testämne för vilken denna metod kan användas bestäms till stor del av den organiska kolanalysens känslighetsgräns (0,5 mg kol per liter på nuvarande stadium) och av koncentrationen upplöst organiskt kol i näringslösningen.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Reagenser*

De kemikalier som används måsta vara av analytisk renhetsgrad.

1.6.1.1. Destillerat vatten

Destillerat vatten får inte innehålla mer än 10 % av det organiska kol som tillförs med testämnet.

1.6.1.2. Näringslösning

Framställ testmediet enligt anvisningarna nedan med användning av sterila material. För en liter lösning skall följande lösas i destillerat vatten (AR = analytisk reagens):

$(NH_4)_2SO_4$ (ammoniumsulfat):	0,300 g AR
NH_4NO_3 (ammoniumnitrat):	0,150 g AR
KH_2PO_4 (kaliumdihydrogenfosfat):	0,300 g AR
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (dinatriumhydrogenfosfat-dodekahydrat):	2,000 g AR
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnesiumsulfat-heptahydrat):	0,050 g AR
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (kalciumklorid-dihydrat):	0,050 g AR
Jästextrakt:	0,005 g AR

pH-värdet är 7,5 ± 0,1.

Tillsätt 1 ml spårämneslösning av följande sammansättning:

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (järn(II)sulfathepta-hydrat):	0,100 g (AR)
$MnSO_4 \cdot H_2O$) (mangan(II)sulfat-monohydrat):	0,100 g (AR)
K_2MoBO_4 (kaliummolybdat):	0,025 g (AR)
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (dinatriumtetraborat-dekahydrat):	0,025 g (AR)

$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (kobolt(II)nitrat-hyxahydrat):	0,025 g (AR)
$CUCl_2) \cdot 2H_2O$ (koppar(II)klorid-dihydrat):	0,025 g (AR)
$ZnCl_2$ (zinkklorid):	0,025 g (AR)
NH_4VO_3 (ammoniumvanadat):	0,010 g (AR)
Destillerat vatten till 100 ml.	

(Spårämneslösningen kan förvaras i en månad vid en temperatur mellan +1 och + 4°C.)

Framställ volymen (1 liter) och blanda. Mediet skall användas inom 12 timmar.

1.6.1.3. Kontrollämnen

Anilin (nydestillerat), natriumacetat, natriumbensoat, glukos.

1.6.2. *Apparatur*

Vanlig laboratorieutrustning och:

— Apparatur för mätning av organiskt kol.

— Spektrofotometer.

— Centrifug 4 000 g.

— Skakapparat som medger lämplig syrsättning och omskakning.

— Apparatur för mätning av löst syre, pH-mätare, 500 ml steril, vidhalsade koniska kolvar.

— Apparatur för sterilfiltrering (membranfilter med 0,22 μm porer).

Glasutrustningen skall vara noggrant rengjord och helt fri från alla spår av organiskt eller toxiskt material.

1.6.3. *Förberedelse av inokulat*

Tag en lämplig volym av en blandning av tre prov från förorenat ytvatten och avloppsvatten från kommunala avloppsreningsverk. Proven skall inte ha några större särskilda föroreningar. Bakterietalet för varje prov skall vara minst 10^5 bakterier/ml.

Proven skall användas som inokulat inom en 12-timmarsperiod, inklusive transport, och får inte vara utan syrsättning mer än sex timmar.

Filtrera genom papper för att avlägsna större, olösliga partiklar, samla upp filtratet och låt det passera ett membranfilter med en porstorlek på 0,22 μm.

Tvätta med lämplig isoton lösning. Överför de bakterier som deponerats på membranfiltret till en liten volym isoton lösning. Blanda väl. Mät absorbansen vid 620 nm för att härleda koncentrationen av bakterier i förhållande till en tidigare framtagen standardkurva över räknade *Pseudomonas fluorescens* av stam ATCC 15453 på fast medium. Tillsätt erforderlig volym av lösningen för att justera bakteriekoncentrationen till $5 \pm 3 \times 10^7$/ml. Använd inokulatet inom en timme.

1.6.4. *Testförfarande*

Inkuberingen skall göras i frånvaro av intensivt ljus i en inkubator som hålls vid 20—25°C och är fri från toxiska ångor.

Framställ följande lösningar:

1. En lösning av testämnet i testmediet med en koncentration på 40 mg per liter organiskt kol.
2. En lösning av glukos i testmediet med en koncentration på 40 mg per liter organiskt kol.
3. En lösning som i testmediet innehåller ovan nämnda koncentrationer av testämnet och glukos.
4. Ha dessutom en lämplig volym av testmediet till hands.

Blanda de fyra lösningarna var för sig och sterilfiltrera dem genom ett membranfilter.

Membranfilter är lämpliga om det är säkerställt att de varken frigör kol eller adsorberar ämnet i filtreringssteget.

Alla nödvändiga manipulationer skall utföras med sterila metoder. Fördela lösningarna i testkolvarna (tidigare steriliserade) efter följande schema:

kolv 1 (test):	150 ml av lösning 1
kolv 2 (test):	150 ml av lösning 1
kolv 3 (test):	150 ml av lösning 1
kolv 4 (steril kontroll):	150 ml av lösning 1
kolv 5 (glukoskontroll):	150 ml av lösning 2
kolv 6 (kontroll av hämmande aktivitet):	150 ml av lösning 3
kolv 7 (blindprov):	150 ml av lösning 4

Inokulera kolv 1, 2, 3, 5, 6 och 7 med 1,5 ml av inokulatet och blanda väl genom att skaka för hand.

Tag ett lika stort prov, 3—5 ml, från varje kolv.

Centrifugera proven vid 4 000 g i 15 minuter och håll temperaturen under 26°C.

Samla upp supernatanterna för att mäta organiskt kol vid tid 0.

Placera kolvarna i skakapparaturen och låt dem stå där under resten av testperioden: koncentrationen av upplöst syre dag 3 i kolv 5 skall vara minst 5 mg per liter.

På samma sätt som vid mätningen av organiskt kol vid tid 0 görs denna mätning för kolvarna 1, 2, 3, 5, 6 och 7 efter minst 3, 7, 14 och 28 dagars inkubering. Om kolinnehållet i kolv 1, 2 och 3 har minskat med 95 % i förhållande till det initiala innehållet kan testet betraktas som avslutat.

Testet kan avslutas för den 28 dagen om en platå observeras dessförinnan.

Om en nedbrytning uppenbarligen har börjat dag 28 men inte nått en platå anses det vara god praxis att förlänga testet med en eller två veckor.

I slutet av testet mäts det organiska kolet i kolv 4 på samma sätt som vid tid 0 och steriliteten kontrolleras genom inokulering till ett provrör med flytande kulturmedium som inkuberas vid 25°C i fem dagar.

Kulturmedium:

torkat jästextrakt	3 g
bukspottskörtelkaseinpepton	6 g
vatten	1 000 ml

Lös upp de dehydrerade beståndsdelarna till det kompletta mediet i kokande vatten. Justera vid behov pH-värdet så att det efter sterilisering är 7,2 ± 0,2 vid 20°C.

Om mätningarna av innehållet organiskt kol måste skjutas upp skall supernatanten hållas vid 4°C i mörker i hermetiskt tillslutna glaskolvar; kolvarna får maximalt bevaras i 24 timmar. Om analysen inte kan göras inom 24 timmar skall proven frysas till en temperatur under — 18°C.

För att kompensera vattenförlust på grund av förångning skall volymen kontrolleras i kolvarna före provtagning. Vid behov återställs den volym som uppmättes efter föregående provtagning genom tillsättning av destillerat vatten som sterilfiltrerats genom membranfilter med 0,22 µm porstorlek.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Analysresultaten registreras på bifogade formulär (tillägg 1) och värdena för bionedbrytningen beräknas enligt 1.2.

Resultaten av nedbrytningstestet är giltiga om följande villkor är uppfyllda:

— Nivån av glukosnedbrytningen i kolv 5 skall vara minst 80 % dag 7.

— I slutet av testet skall kolv 4 fortfarande vara steril.

— Koncentrationen av upplöst syre dag 3 i kolv 5 skall vara minst 5 mg per liter.

Nivån av glukosbionedbrytningen i kolv 6 skall dag 7 vara minst 75 % av den nivå som observerats i kolv 5. Om denna gräns inte uppnås kan det antas att testämnet, som var föremålet för testet, har en hämmande effekt på de närvarande bakterierna och att metoden följaktligen inte är tillämpbar vid den angivna koncentrationerna.

Anmärkningar

Genom att jämföra den procentuella elimineringen av kol i kolv 1, 2 och 3 å ena sidan och i kolv 4 å andra sidan, kan en differentiering göras mellan orsakerna till den observerade nedbrytningen:

— Den fysisk-kemiska mekanismen i kolv 4.

— Den fysisk-kemisk plus biologiska mekanismen i kolv 1, 2 och 3.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Alla testresultat avseende det undersökta ämnet, referensämnet och blindproverna skall rapporteras.

Särskilt skall följande punkter nämnas:

— Avgångsgraden för produkten i kolv 4 i slutet av testet.

— Alla observerade hämningsfenomen.

— Bevis på giltighet.

— Förloppet av nedbrytningstestet framställs grafiskt i ett diagram som visar eftersläpningsfasen, nedbrytningsfasen, lutning och tidsfönster (med "tidsfönster" menas här en 10-dagarsperiod med början från den dag då den observerade nivån av bionedbrytning först överstiger 10 %).

3.2. Tolkning av resultat

På grund av stringensen i detta test behöver ett lågt resultat inte nödvändigtvis betyda att testämnet inte är bionedbrytbart under miljöbetingelser utan det pekar mera på att det krävs mer arbete för att fastställa detta.

Testkemikalier som visar en hög DOC-avgång i detta test skall anses vara lätt bionedbrytbara förutsatt att denna nivå uppnås inom tidsfönstrets 10 dagar räknat från den dag då den observerade nivån av bionedbrytning först överstiger 10 %.

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301A,* Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* vol. 3, No. 2, 1979, s. 159—173.

3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* vol. 5, No. 1, 1981, s. 45—55.

4) Afnor, *Method for the evaluation in aqueous medium of the biodegradability of so-called "total" of organic products*, T 90—302.

Tillägg 1

Formulär för modifierat Afnor-test

Test nr .....

Testets startdatum .....

Test-/kontrollmaterial .....

Teoretisk testkoncentration .....

Kolanalys .....

DOC-bestämningar

Kulturmedium	Kolv nr	DOC-koncentration (mg/l) efter				
		t = 0	3	7	14	28 (dagar)
Test	1	1_{C_0}	1_{C_3}	1_{C_7}	$1_{C_{14}}$	$1_{C_{28}}$
Test	2	2_{C_0}	2_{C_3}	2_{C_7}	$2_{C_{14}}$	$2_{C_{28}}$
Test	3	3_{C_0}	3_{C_3}	3_{C_7}	$3_{C_{14}}$	$3_{C_{28}}$
Test medelvärde	1–3	$\bar{C}_0$	$\bar{C}_3$	$\bar{C}_7$	$\bar{C}_{14}$	$\bar{C}_{28}$
Steril kontroll	4	4_{C_0}	×	×	×	$4_{C_{28}}$
Glukoskontroll	5	5_{C_0}	5_{C_3}	5_{C_7}	$5_{C_{14}}$	$5_{C_{28}}$
Hämningskontroll	6	6_{C_0}	6_{C_3}	6_{C_7}	$6_{C_{14}}$	$6_{C_{28}}$
Blindprov	7	$7_{C_{bl(0)}}$	$7_{C_{bl(3)}}$	$7_{C_{bl(7)}}$	$7_{C_{bl(14)}}$	$7_{C_{bl(28)}}$

Utvärdering av resultaten

	t = 0	3	7	24	28 (dagar)
Test $\left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Glukoskontroll $\left[1 - \frac{5_{C_t} - C_{bl(t)}}{5_{C_0} - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Hämningskontroll $\left[1 - \frac{6_{C_t} - C_{bl(t)}}{6_{C_0} - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				

Giltighet:

— Upplöst syre kolv 5, dag 3: .....mg per liter

— % bionedbrytning kolv 5, dag 7: ..... %

— % bionedbrytning kolv 6, dag 7: ..... %

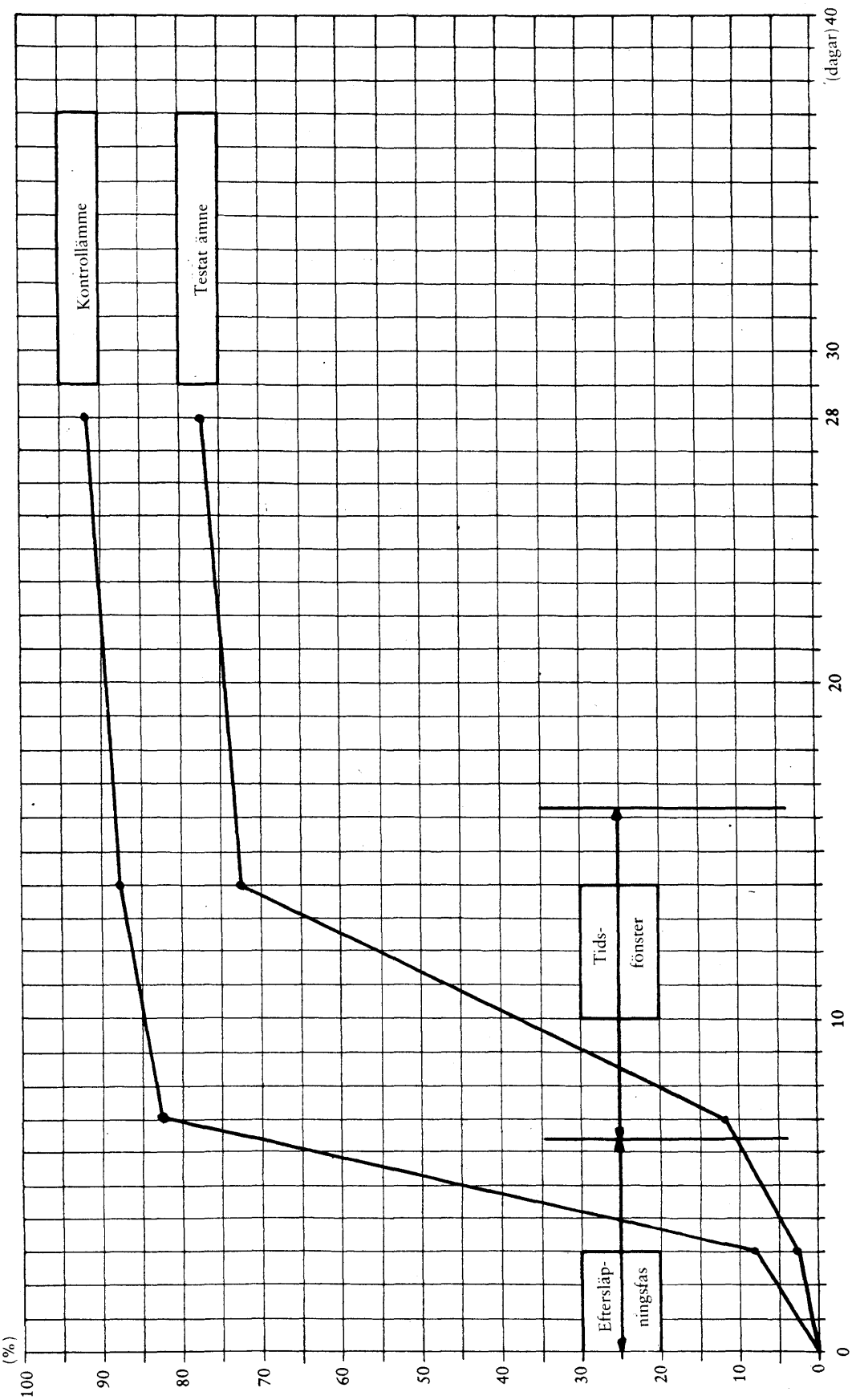
— Steril kolv 4: .....

Tillägg 2

Modifierat Afnor-test NF T 90/302

Provningsanstalt .....

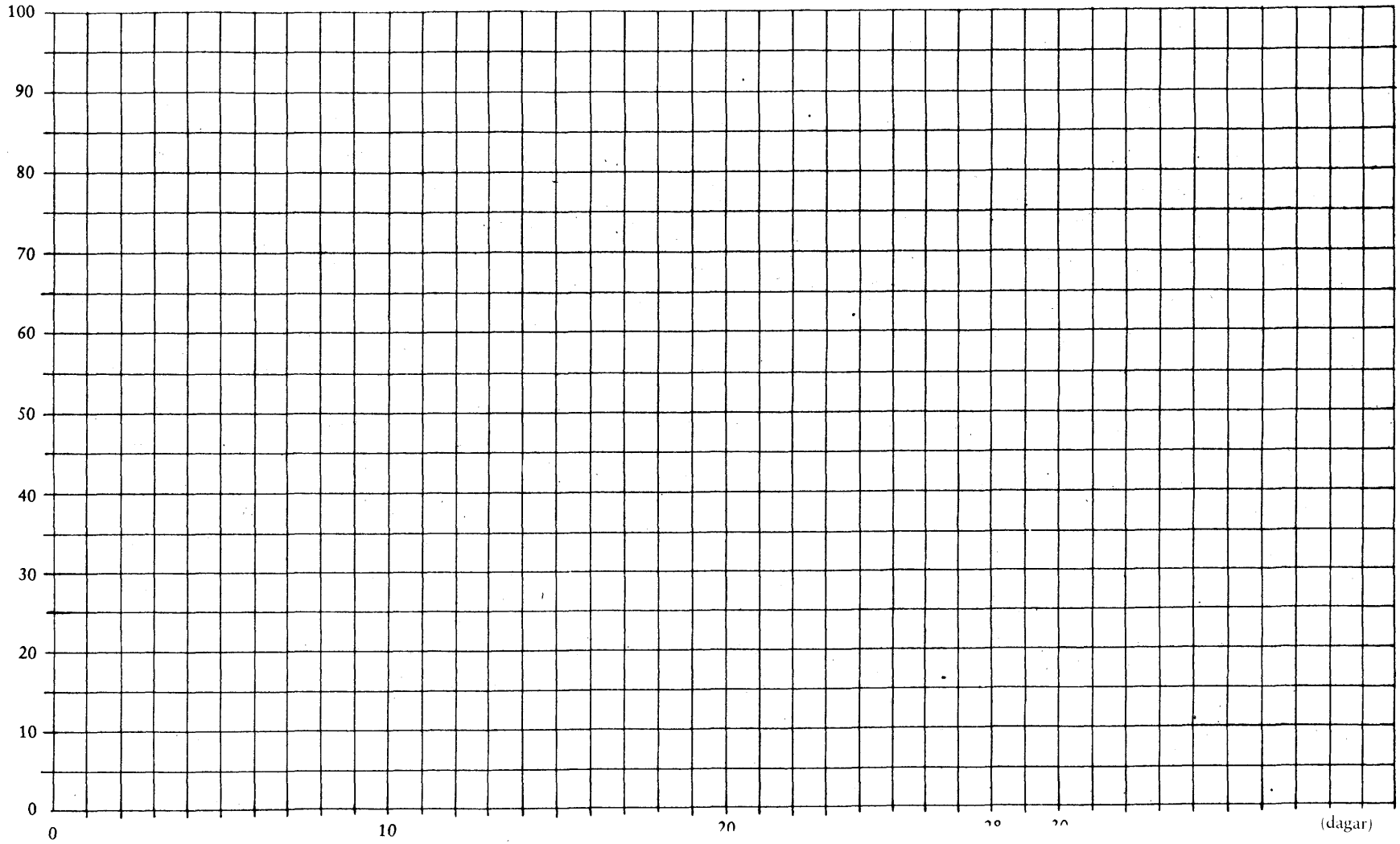
Testämne ..... Test nr .....



Modifierat Afnor-test NF T 90/302

Provningsanstalt ..... Testämne ..... Test nr .....

DOC-avgang %



C. 5. NEDBRYTNING

BIOTISK NEDBRYTNING — MODIFIERAT STURM-TEST

1. METOD

1.1. Inledning

Syftet med denna metod är att mäta bionedbrytbarheten hos icke flyktiga organiska föreningar i ett aerobt vattenmedium. Två initiala testkoncentrationer används, 10 och 20 mg per liter (standardkoncentrationer).

Innehållet av organiskt kol i testämnet skall vara känt (genom TOC-analys eller uppskattning utifrån den empiriska formeln så att det teoretiska CO_2-utbytet kan beräknas).

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid den koncentration som används i testet

— har försumbart ångtryck,

— inte inverkar hämmande på bakterier.

Denna metod kan, åtminstone principiellt, tillämpas på ämnen som inte är lösliga vid testkoncentrationerna.

Uppgifter om de relativa proportionerna av testämnets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de resultat som erhålls, särskilt om resultaten är låga.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

1.2. Definitioner och enheter

Nedbrytningen definieras som den mängd CO_2 som produceras av ämnet, uttryckt i procent av det teoretiska CO_2-utbytet av ämnet ($ThCO_2$), beräknat utifrån dess innehåll av organiskt kol.

1.3. Referensämnen

Det är önskvärt att använda en lämplig kontrollkemikalie för att kontrollera inokulatets aktivitet.

Till detta ändamål kan användas t.ex. anilin, natriumacetat eller natriumbensoat och de skall då utvisa en CO_2-produktion på $\geq$ 60 % inom 28 dagar. I annat fall anses testet vara ogiltigt och skall upprepas med ett inokulat från en annan källa.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet tillsätts till ett kemiskt definierat flytande medium, inokuleras med avloppsmikroorganismer och syrsätts vid 20—25°C. Temperaturen registreras under testperioden.

Frigjort CO_2 fångas som $BaCO_3$ och efter nedbrytningen görs en CO_2-analys under en 28-dagarsperiod. Efter jämförelse med en eller flera lämpliga blindprovskontroller bestäms den

totala mängd CO_2 som testämnet producerat under testperioden och denna mängd beräknas som ett procenttal av den totala mängden CO_2 som testämnet på basis av sitt kolinnehåll teoretiskt kunde ha producerat.

Förfarandet kontrolleras med ett inokulatkontrollämne (se 1.6.1.3.).

1.5. **Kvalitetskriterier**

Metodens reproducerbarhet har fastställts genom OECD- och EEC-ringtest.

Inokulatets endogena CO_2-produktion, mätt genom blindprovet, är huvudskälet till att det inte går att använda en lägre koncentration av testämnet än 5 mg per liter. (Om testet anpassas till ^{14}C-märkta testämnen kan koncentrationen vara mycket lägre.)

1.6 **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Vatten av hög kvalitet

Omdestillerat vatten, fritt från toxiska ämnen (särskilt koppar), med låg kolhalt (>2,0 mg per liter TOC) och med ett motstånd på ≥ 18 megohm/cm. Destillerat vatten får inte innehålla mer än 10 % av det organiska kol som tillförs med testämnet.

1.6.1.2 Näringslösning

a) Stamlösning

$FeCl_3 \pm 6H_2O$ (järn(III)klorid-hexahydrat): Upplös i vatten (1.6.1.1.)så att 1 000 ml erhålls.	0,25 g
$MgSO_3 \pm 7H_2O$ (magnesiumsulfat-heptahydrat): Upplös i vatten (1.6.1.1.) så att 1 000 ml erhålls.	22,50 g
$CaCl_2$ (kalciumklorid): Upplös i vatten (1.6.1.1.) så att 1 000 ml erhålls.	27,50 g
KH_2PO_4 (kaliumdihydrogenfosfat):	8,50 g
K_2HPO_4 (dikaliumhydrogenfosfat):	21,75 g
$Na_2HPO_4 \pm 2H_2O$ (dinatriumhydrogenfosfat-dihydrat):	33,40 g
NH_4Cl (ammoniumklorid): Upplös i vatten (1.6.1.1.) så att 1 000 ml erhålls.	1,70 g
$(NH_4)_2SO_4$ (ammoniumsulfat): Upplös i vatten (1.6.1.1.) så att 1 000 ml erhålls.	40,00 g

b) Testmedium

Testmediet innehåller följande reagenser per liten vatten (1.6.1.1.):

— 4 ml järnkloridlösning enligt ovan,

— 1 ml magnesiumsulfatlösning enligt ovan,

— 1 ml kalciumkloridlösning enligt ovan,

— 2 ml fosfatlösning enligt ovan,

— 1 ml ammoniumsulfatlösning enligt ovan.

pH-värdet skall vara 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Kontrollämnen

Anilin (nydestillerat), natriumacetat, natriumbensoat.

1.6.1.4. Bariumhydroxid 0,025 N (0,0125 M)

Upplös 4,0 g $Ba(OH)_2$ $8H_2O$ per liter vatten av hög kvalitet. Filtrera genom filtrerpapper och förvara den klara lösningen i tätt tillslutet kärl för att förhindra absorption av CO_2 från luften. Det är inte tillrådligt att bereda mer än 5 liter åt gången när testserien utförs.

1.6.2. *Apparatur*

1.6.2.1. CO_2 våtrenare

En serie av 12 damejeanner (tre testämnen) används. (Med "damejeanne" förstås här en 4—5-liters brun glasflaska. Om klara glasflaskor används skall testet utföras i mörker.)

Fyra 1-liters plastflaskor innehållande 700 ml 10 N (10 M) NaOH.

En 1-liters Erlenmeyer-kolv innehållande 700 ml 0,025 N (0,0125 M) $Ba(OH)_2$-lösning.

En tom 1-liters Erlenmeyer-kolv för att förhindra vätskeöverföring.

Dessa flaskor seriekopplas med en inert slang till en tryckluftskälla och luft får bubbla genom våtreningslösningarna med konstant hastighet.

För varje ytterligare uppsättning om fyra damejeanner utökas serien med ytterligare en 1-liters plastflaska innehållande 700 ml 10 N (10 M) NaOH.

1.6.2.2. CO_2-produktionsapparatur

Fyra 4—5-liters bruna damejeanner till varje testämne. Proppar, böjliga slangar, plastslangar.

1.6.2.3. CO_2-absorptionsflaskor

100 ml bariumhydroxidabsorptionsflaskor.

1.6.3. *Förberedelse av inokulatet*

Testorganismernas källa är aktiverat slam, som nyligen har insamlats från ett väl fungerande kommunalt avloppsverk. Detta avloppsverk får inte ta emot något eller endast minimalt med industriellt avloppsvatten.

Vid ankomsten till laboratoriet syrsätts det aktiverade slammet i fyra timmar. 500 ml av den blandade vätskan tas ut och homogeniseras i två minuter med en mekanisk omrörare. Låt därefter utfällning ske i 30 minuter.

Om supernatanten efter 30 minuter fortfarande innehåller höga nivåer av fasta slampartiklar kan utfällning få ske i ytterligare 30—60 minuter eller anpassas det till laboratoriebetingelser för att förbättra dess utfällningsförmåga.

Supernatanten dekanteras för att ge tillräcklig volym till ett 1 % inokulat för varje CO_2-testflaska. Undvik att överföra fasta slampartiklar som skulle inverka på mätningen av CO_2-produktionen.

Även om det inte är ett krav är det nyttigt att räkna antalet livsdugliga enheter på supernatantfraktionen för att kunna bestämma mikrobtal. Detta inokulat skall normalt innehålla 10^6 — 20 x 10^6 kolonibildande enheter per milliliter.

Det skall användas samma dag som det framställs.

1.6.4. *Testförfarande*

1.6.4.1. Stamlösning

En initial stamlösning av testämnet förbereds genom upplösning i vatten av hög kvalitet så att koncentrationen blir 1 000 mg per liter.

Stamlösningar bereds på basis av innehållet av organiskt kol i testämnet. Om detta inte är känt framställs stamlösningar till en koncentration av 1 000 mg per liter på viktbasis. För att få ett homogent prov är det nödvändigt att blanda väl och samtidigt undvika all skumbildning som kan medföra att testämnet koncentreras. För fasta ämnen kan det vara nödvändigt att smälta och blanda hela innehållet i provflaskan innan alikvoter tas av den. Denna del av förfarandet är ytterst viktig eftersom beräkningen av den procentuella bionedbrytningen är avhängig av att mängden kol i testsystemet är korrekt.

Stamlösningens Ph-värde behöver inte justeras om det inte ligger utanför intervallet 3—10. Detta regleras av fosfatbufferten i testmediet. Om Ph ligger utanför detta intervall justeras en alikvot av stamlösningen till pH-värdet 7,0 ± 1,0 med 1N (1M) HCl eller NaOH varvid det skall säkerställas att lösningen blandas kraftigt under tillsättande av syra eller bas.

För att kontrollera den nominella koncentrationen av organiskt kol i testämnet kan stamlösningen (eller den neutraliserade alikvoten) analyseras för totalt organiskt kol. En TOC-analys är också nödvändig för stamlösningen av kontrollämnet.

Om ett testämne inte är lösligt i vatten tillsätts korrekt mängd av testämnet direkt i damejeannen på basis av vikt eller volym.

Om testämnet inte är lösligt vid testkoncentrationen kan det vara nödvändigt att vidta särskilda åtgärder, t.ex. att använda ultraljudsdispersion, för att uppnå en god dispersion av testämnet.

1.6.4.2. Testbetingelser

Eftersom ett 1 % inokulat används i CO_2-testet är det nödvändigt att göra utspädningar i CO_2-testmediet.

Detta görs enklast på följande sätt:

a) Till var och en av de 4—5-liters damejeannerna tillsätts 2 470 ml vatten av hög kvalitet (se 1.6.1.1.).

b) Till var och en av de 4—5-liters damejeannerna tillsätts 3 ml vardera av stamlösningarna av ammoniumsulfat, magnesiumsulfat och kalciumklorid, 6 ml av stamlösningen av fosfatbuffert och 12 ml av järnkloridlösningen.

c) Till var och en av 4—5-liters damejeannerna tillsätts 30 ml av inokulatet av aktiverat slam.

Denna blandning syrsätts med CO_2-fri luft i 24 timmar så att systemet renas från koldioxid.

Efter syrsättningen tillförs de tre CO_2-absorptionsflaskorna 100 ml 0,025 N (0,0125 M) $Ba(OH)_2$ vardera och seriekopplas till utluftsledningen på varje damejeanne.

1.6.4.3. Testförfarande

Testet inleds med att testämnet tillsätts till två av de fyra damejeannerna. Varje material testas vid två koncentrationer: 10 och 20 mg per liter.

Den mängd stamlösning av testämnet som krävs i damejeannen beräknas enligt nedan:

$$\text{milliliter stamlösning per damejeanne} = \frac{B \times C}{A}$$

där:

B = testämnets koncentration i testdamejeannen (milligram per liter),

A = testämnets koncentration i stamlösningen (milligram per liter),

C = den slutliga volymen av testmediet i damejeannen (milliliter).

Till aktuella damejeanner tillsätts tillräckligt med stamlösning för att uppnå den önskade testkoncentrationen, enligt beräkningen ovan, plus tillräckligt med destillerat vatten för att ge 473 ml (stamlösning + vatten av hög kvalitet). Till den tredje damejeannen, som används som öblindprovskontroll och som inte innehåller något testämne, tillsätts 473 ml vatten av hög kvalitet. Den slutliga volymen i varje damejeanne är nu 3 000 ml.

Till den sista av de fyra damejeannerna tillsätts nu ett kontrollämne med en koncentration av 20 mg per liter.

Testet startas genom att CO_2-fri luft får bubbla genom lösningen med en hastighet av 50—100 ml per minut och damejeanne (= 1-2 bubblor per sekund).

Testämnen som inte är lösliga i vatten kan tillsättas torra till CO_2-damejeannen och omröras med magnetomrörare. För skummande kemikalier kan den CO_2-fria luftgenombubblingen ersättas med luftblåsning över ytan och magnetomrörning.

Det CO_2 som produceras i varje damejeanne reagerar med bariumhydroxiden och fälls ut som bariumkarbonat. Mängden producerat CO_2 bestäms genom titrering av resterande $Ba(OH)_2$ med 0,05 N (0,05 M) standardiserad HCl. Periodvis (varannan eller var tredje dag) avlägsnas CO_2-absorptionsflaskan närmast damejeannen för titrering. Resterande två absorptionsflaskor flyttas en plats närmare damejeannen och en ny absorptionsflaska innehållande 100 ml färsk 0,025 N (0,0125 M) $Ba(OH)_2$ placeras längst bak i serien.

Titreringar görs efter behov (innan någon utfällning av $BaCO_3$ kan ses i den andra fällan), ungefär varannan dag de första 10 dagarna och därefter var femte dag till den 28 dagen.

Den 27 dagen mäts pH-värdet i innehållet i damejeannerna igen och därefter tillsätts 1 ml koncentrerad HCl till var och en av damejeannerna för att driva ut oorganiskt kol. Damejeannerna syrsätts över natten varefter prov tas från varje damejeanne för DOC-analys. Den slutliga titreringen görs dag 28.

Titreringar av de 100 ml $Ba(OH)_2$-lösning görs efter borttagande av flaskorna närmast damejeannerna. $Ba(OH)_2$ titreras med 0,05 N (0,05 M) HCl med fenolftalein som indikator.

Testet utförs vid rumstemperatur, 20—25°C och temperaturen registreras under testperioden.

Om en platå observeras före den 28 dagen kan testet avslutas.

Om nedbrytningen uppenbarligen har börjat men inte har nått en platå dag 28 anses det vara god praxis att förlänga testet med en eller två veckor.

1.6.5. *CO_2-bestämning*

Andra sätt att mäta CO_2-utvecklingen än genom tillbakatitrering av $Ba(OH)_2$-fällor kan övervägas. Detta ändrar inte testprincipen men kan möjligen leda till en fortlöpande mätning av bionedbrytningen.

Det första steget vid beräkning av den producerade mängden CO_2 är att korrigera damejeannerna med testämnet för endogen CO_2-produktion. Kontrolldamejeannen fungerar som ett blindvärde för korrigering av CO_2 som kan produceras genom bakteriers endogena respiration. Mängden CO_2 som producerats av ett testämne bestäms av skillnaden (i millimeter titrant) mellan testets och blindprovets $Ba(OH)_2$-fällor.

Om 0,05 N (0,05 M) HCl används för att titrera absorptionsflaskan motsvarar varje titrerad milliliter HCl 1,1 mg producerad CO_2.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Analysresultaten registreras på bifogade formulär (se tillägg 1) och värdena för bionedbrytningen beräknas enligt punkt 1.2.

CO_2-koncentrationerna beräknas till närmaste 0,1 mg per liter. Värdena för bionedbrytningen avrundas till närmaste hela procenttal.

Förloppet av nedbrytningstestet följs grafiskt i ett diagram enligt bifogade exempel (se tillägg 2).

Resultaten av nedbrytningstestet är giltiga om följande villkor har uppfyllts:

— I samma testserie skall kontrollmaterialet ha givit ≥ 60 % bionedbrytning inom 28 dagar (om så inte är fallet skall hela serien kasseras och upprepas med inokulat från en annan källa).

— Ingen signifikant mängd CO_2 skall ha utvecklats från blindprovet under testet (förorening av mediet, glasapparaturen och lufttillförseln). Den totala CO_2-utvecklingen i slutet av testet får inte överstiga 50 mg CO_2 per 3 liter medium.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande:

— Data skall rapporteras enligt formuläret (se tillägg 2).

— Nedbrytningstestets förlopp framställs grafiskt i ett diagram som visar eftersläpningsfasen, nedbrytningsfasen, lutningen och tidsfönstret (med "tidsfönster" menas här en 10-dagarsperiod med början från den dag då den observerade bionedbrytningsnivån först överstiger 10 %).

— Dispersionsförfarande för ämnen som inte är lösliga under testbetingelserna.

— Ange data och plats för insamling av testorganismer och hur de hanterades före inokulering.

— Temperaturintervallet som registrerats under testperioden skall anges.

— Om inokulatet mätts enligt punkt 1.6.3. anges antalet mikroorganismer per millimeter (kolonibildande enheter (colony forming units, CFU) per milliliter).

— Bevis på testets giltighet (≥ 60 % nedbrytning av kontrollämnet på 28 dagar).

3.2. Tolkning av resultat

På grund av stringensen i detta test behöver ett lågt resultat inte nödvändigtvis betyda att testämnet inte är bionedbrytbart under miljöbetingelser utan det pekar mera på att det krävs mer arbete för att fastställa detta.

Testkemikalier som visar en hög grad av bionedbrytning i detta test skall anses vara lätt bionedbrytbara förutsatt att denna nivå uppnås inom tidsfönstrets 10 dagar räknat från den dag då den observerade nivån av bionedbrytning först överstiger 10 %.

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301B*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 3, No. 2, 1979, s. 159—173.

3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No. 1, 1981, s. 45—55.

4) Larson, R. J., Estimation of biodegration potential of xenobiotic organic chemicals, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 38, 1979, s. 1153–1161.

Tillägg 1

Formulär för modifierat Sturm-test

Test nr.....

Testets startdatum .....

Test-/kontrollmaterial .....

Teoretiskt testkoncentrat .....

Kolanalys .....

Teoretiskt $ThCO_2$ .....

Temperaturintervall under testet .....

CO_2-produktion .....

Dagar	CO_2 funnet (mg)	CO_2 kumulativt (mg)	% $ThCO_2$
28			

Giltighet:

— % bionedbrytning kontrollmaterial.

— CO_2 total utveckling i blindprov.

Tillägg 2

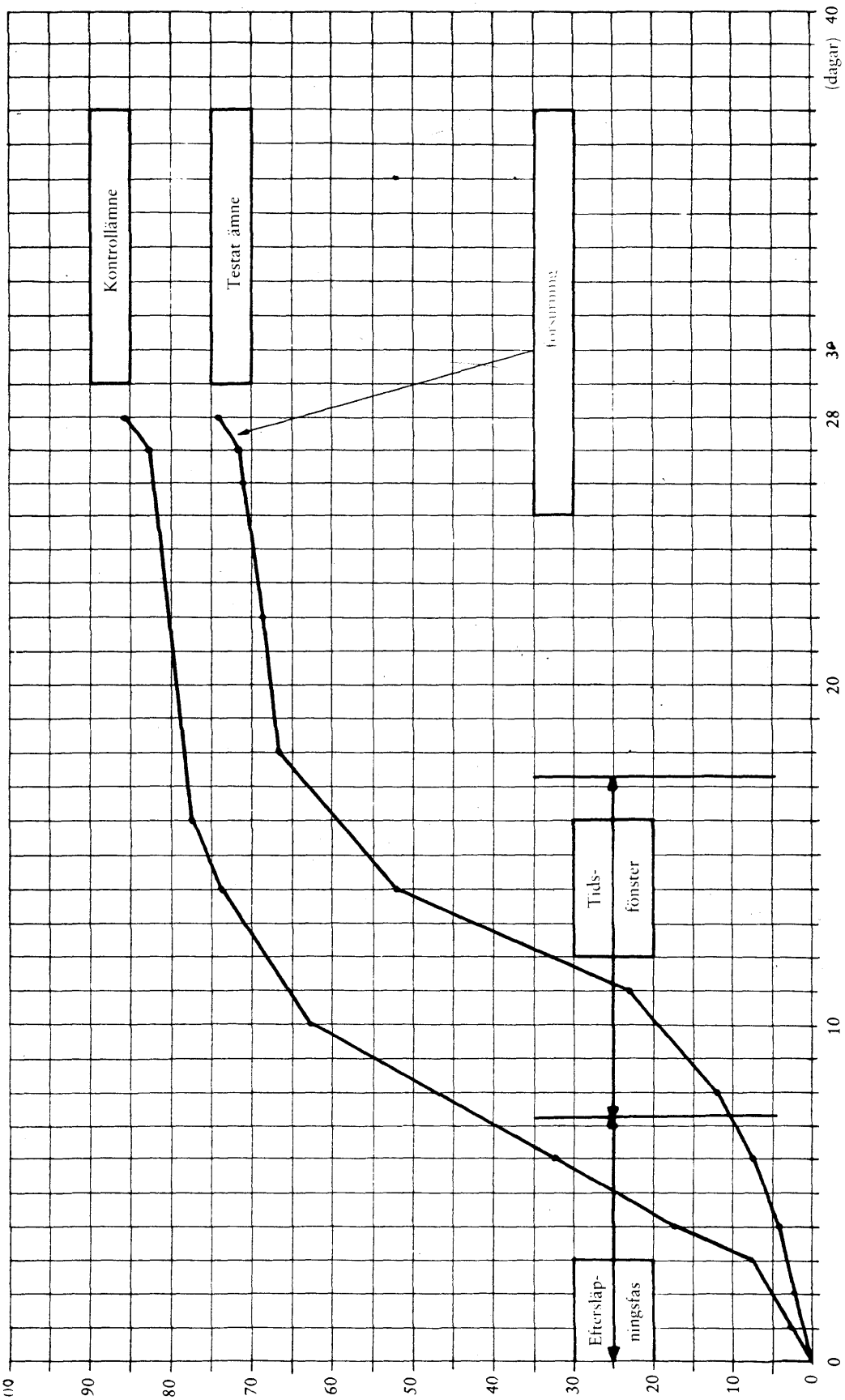
Modifierat Sturm-test

Provningsanstalt .....

Biomedbyrning

Testämne .....

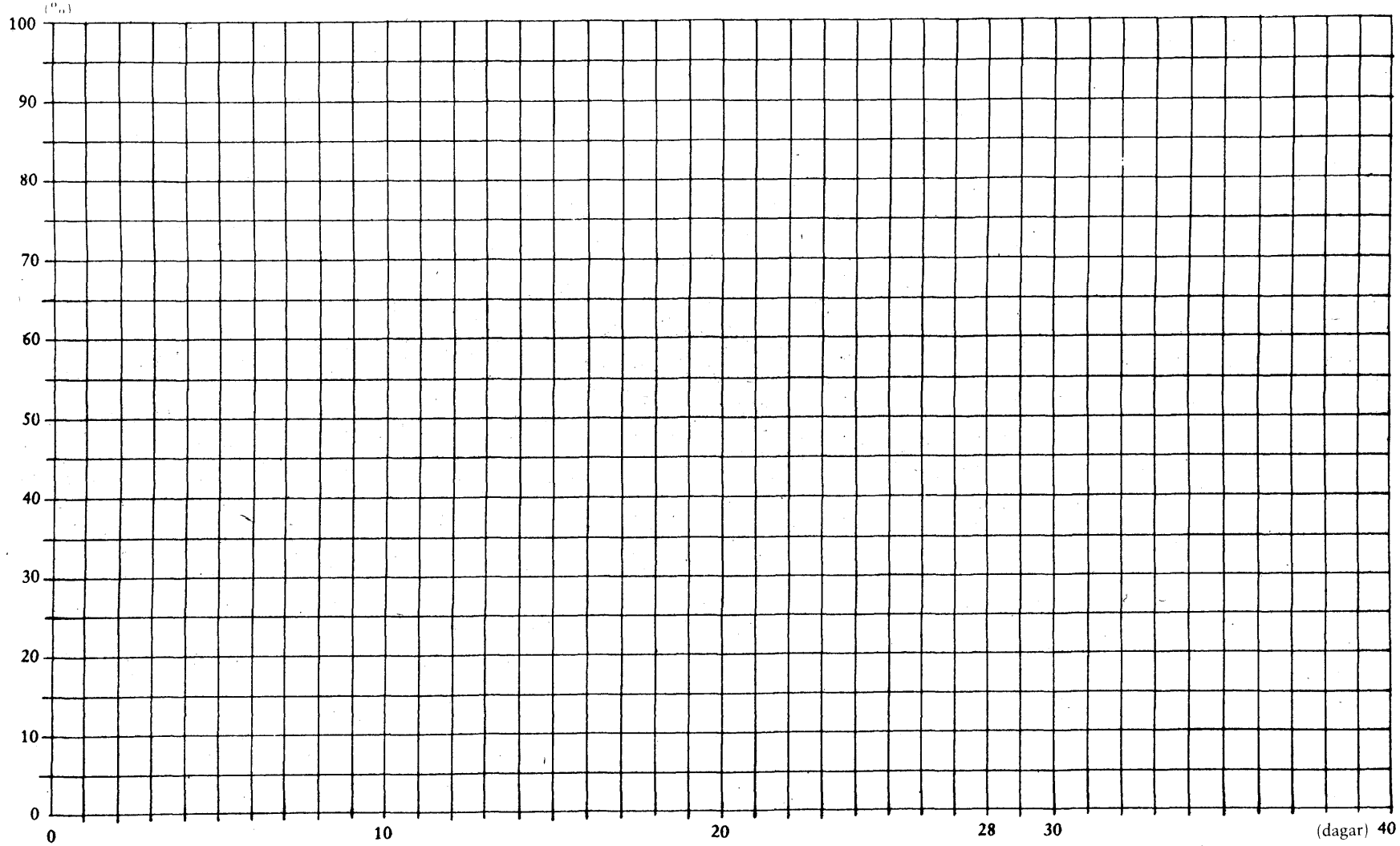
Test nr .....



Modifierat Sturm-test

Provningsanstalt ..... Testämne ..... Test nr .....

Bionedbrytning (%)



C. 6. NEDBRYTNING BIOTISK NEDBRYTNING: CLOSED BOTTLE TEST

1. METOD

1.1. Inledning

Syftet med denna metod är att mäta bionedbrytbarheten hos organiska föreningar i ett aerobt vattenmedium vid en testkoncentration från 2 (standardkoncentration) till 10 mg per liter testämne.

I nuvarande utvecklingsstadium är testet särskilt lämpligt för utvärderingen av vattenlösliga föreningars bionedbrytbarhet. Dock kan, åtminstone principiellt, såväl flyktiga föreningar som tungt lösliga föreningar testas.

Det är nödvändigt att känna till testämnets empiriska formel för att kunna beräkna det teoretiska syrebehovet (ThOD). Om formeln inte är känd kan testämnets kemiska syrebehov (COD) fungera som referensvärde (se tillägg 1).

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid den koncentration som används i testet inte inverkar hämmande på bakterier. Om testämnet inte är lösligt vid testkoncentrationen kan det vara nödvändigt att vidta särskilda åtgärder, t.ex. att använda ultraljudsdispersion, för att uppnå en god dispersion av testämnet.

Uppgifter om de relativa proportionerna av testämnets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de resultat som erhålls, särskilt om resultaten är låga.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

Denna metod kan användas för bestämning av BOD.

1.2. Definitioner och enheter

Det biokemiska syrebehovet (BOD) beräknas som skillnaden i syreförbrukning mellan ett blindprov och en lösning av testämnet under testbetingelserna. Efter division med koncentrationen (vikt/volym) av ämnet erhålls nettosyreförbrukningen i milligram BOD per milligram ämne.

Nedbrytningen definieras som relationen mellan det biokemiska syrebehovet och antingen det teoretiska syrebehovet (ThOD) eller det kemiska syrebehovet (COD) och uttrycks i procent.

Anmärkning

Det kan hända att de två beräkningssätten (procent ThOD eller procent COD) inte ger samma resultat.

$$\% \text{ bionedbrytning (av ThOD)} = \frac{\text{mg } O_2/\text{mg testat ämne}}{\text{ThOD}} \times 100$$

eller

$$\% \text{ bionedbrytning (av COD)} = \frac{\text{mg } O_2/\text{mg testat ämne}}{\text{mg COD/mg testat ämne}} \times 100$$

där:

ThOD = teoretiskt syrebehov (se beräkning i tillägg 1),

COD = kemiskt syrebehov, bestämt experimentellt.

1.3. **Referensämnen**

Det är önskvärt att använda lämpliga kontrollkemikalier för att kontrollera inokulatets aktivitet.

Till detta ändamål kan användas t.ex. anilin, natriumacetat eller natriumbensoat och de skall då utvisa en nedbrytning på ≧ 60 % inom 28 dagar. I annat fall anses testet vara ogiltigt och skall upprepas med ett inokulat från en annan källa.

1.4. **Testmetodsprincip**

En förbestämd mängd av föreningen upplöses i ett oorganiskt medium (mineralisk näringslösning) till en koncentration på normalt 2 mg testämne per liter. Lösningen inokuleras med ett litet antal mikroorganismer från en blandad population och hålls i tillslutna flaskor i mörker i ett bad eller ett avgränsat utrymme vid en konstant temperatur på 20–21°C.

Nedbrytningen följs genom syreanalyser under en 28-dagarsperiod. Förfarandet kontrolleras medelst inokulering av ett kontrollämne.

Ett oxygen-blindvärde skall bestämmas i ett parallelltest där varken testämne eller kontrollmaterial används.

Samtidigt kan testämnet kontrolleras för möjliga hämmande effekter på inokulatet.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Metodens reproducerbarhet har fastställts genom OECD- och EEC-ringtest.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Destillerat eller avjoniserat vatten

Destillerat eller avjoniserat vatten som inte innehåller mer än 0,01 mg Cu per liter, luftmättat. En volym motsvarande dagsbehovet (t.ex. 50 liter) hålls vid rumstemperatur, så nära 20°C som möjligt, och syrsätts kraftigt i 20 minuter med ren tryckluft. Efter att ha stått i 20 timmar vid 20°C är vattnet normalt klart för användning. Syre bestäms i kontrollsyfte. Koncentrationen vid 20°C skall vara 9,09 mg O_2 per liter. All överföring och påfyllning av luftmättat vatten skall ske utan bubbelbildning med hävert.

1.6.1.2. Näringslösning

a) Stamlösningar:

KH_2PO_4 (kaliumdihydrogenfosfat):	8,50 g
K_2HPO_4 (dikaliumhydrogenfosfat):	21,75 g
Na_2HPO_4 $2H_2O$ (dinatriumhydrogenfosfat-dihydrat):	33,30 g
NH_4CL (ammoniumklorid): Upplös i destillerat vatten så att 1 000 ml erhålls.	1,70 g
pH-värdet skall vara 7,2.	
$MgSO_4$ $7H_2O$ (magnesiumsulfat-heptahydrat): Upplös i destillerat vatten så att 1 000 ml erhålls.	22,50 g
$CaCl_2$ (kalciumklorid): Upplös i destillerat vatten så att 1 000 ml erhålls.	27,50 g
$FeCl_3$ $6H_2O$ (järn(III)klorid-hexahydrat): Upplös i destillerat vatten så att 1 000 ml erhålls.	0,25 g

b) Testmedium:

Testmediet innehåller 1 ml av vardera av ovannämnda stamlösningar per liter vatten (1.6.1.1.).

pH-värdet skall vara 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Kontrollämnen

Anilin (nydestillerat), natriumacetat, natriumbensoat.

1.6.2. *Apparatur*

1.6.2.1 Till testet kan användas kalibrerade 250—300-ml BOD-flaskor med glasproppar eller icke kalibrerade smalhalsade 250-ml flaskor med glasproppar. Flaskornas volymer skall bestämmas.

1.6.2.2. Ett antal 2-, 3- och 5-liters flaskor med litermarkering för förberedelse av testet och för påfyllning av BOD-flaskorna.

1.6.2.3. Pipetter med en volym på 1—10 ml, trattar och grova filtrerpapper, flaskor för förberedelse av inokulatet.

1.6.2.4. Vattenbad för att hålla flaskorna vid konstant temperatur och i frånvaro av ljus.

1.6.3. *Förberedelse av inokulatet*

Inokulat kan hämtas från någon av följande fyra källor, förutsatt att dess livsduglighet kontrolleras medelst ett kontrollämne (1.6.1.3.).

1.6.3.1. Inokulat från jord

En vattensuspension av ogödslad trädgårdsjord. 100 g trädgårdsjord som inte har gödslats nyligen, (jord från ett drivhus som håller en konstant temperatur hela året är särskilt ändamålsenlig) dispergeras i 1 liter klorfritt kranvatten. Efter 30 minuter filtreras suspensionen genom ett grovt filtrerpapper och de första 200 ml av filtratet kasseras. Följande huvuddel av filtratet används som inokulat (en droppe från en spetsig pipett per liter slutlig volym). Inokulatet bereds omedelbart före testet. Om det får stå i flera timmar före användning skall det syrsättas. Antalet bakterier kan bestämmas genom räkning på utsättningsplattor eller med näringsplattor. Det får inte finnas mer än 10^3—10^5 bakterier per milliliter slutlig volym.

1.6.3.2. Inokulat från sekundärt utflöde

Inokulatet skall helst beredas med prov från en sekundär anläggning (aktiverad slamanläggning eller en droppfilteranläggning som huvudsakligen hanterar hushållsavlopp). Avloppsvattnet skall hållas under aeroba betingelser under perioden mellan provtagning och användning. Vid beredning av inokulatet filtreras provet genom ett grovt filtrerpapper och de första 200 ml kasseras. Återstoden av filtratet hålls under aeroba betingelser tills det används. Inokulatet skall användas samma dag som provet tas.

1.6.3.3. Inokulat från laboratorieaktiverat slam

Utflödet från en väl syrsatt laboratorieaktiverad slamenhet används. Inokulatet förbereds enligt beskrivningen under 1.6.3.2.

1.6.3.4. Sammansatt inokulat

Lika volymer av de tre inokulatproven (1.6.3.1. — 1.6.3.3.) blandas väl och det slutliga inokulatet tas från denna blandning.

1.6.4. *Testförfarande*

All hantering som behöver göras före inkuberingen skall göras vid ungefär 20°C.

Grupper av flaskor (1.6.2.1.) förbereds för bestämningen av test- och kontrollämnens BOD-värden i parallella provningsserier (se tillägg 2). Om kemiska analyser görs samtidigt skall tillräckligt antal flaskor förberedas, inklusive kontrollflaskor för inokulatet och blindprovet. Exempelvis förbereds antingen 7 eller 15 parallellflaskor per testämne för testen dag 0, 5, 15 och 28, efter det att en tillräcklig mängd vatten har förberetts i stora flaskor (1.6.2.2.).

Först används hävert till att fylla dessa stora flaskor till ungefär en tredjedels volym med destillerat vatten (1.6.1.1.). Alltefter slutvolym pipetteras därefter de enskilda stamlösningarna av salt (1.6.1.2.) till dessa flaskor och respektive test- och kontrollmaterial tillsätts i sådana mängder att slutkoncentrationerna på 2, ibland 5 eller 10 mg per liter uppnås.

Koncentrationen på ungefär 9 mg upplöst syre per liter utspädningsvatten vid 20°C begränsar den möjliga startkoncentrationen av testämnet till ungefär 2 mg per liter för att en signifikant syrekoncentration skall kunna säkerställas efter oxidering av testsubstratet.

Dåligt nedbrytbara ämnen eller ämnen med lågt ThOD kan med fördel testas parallellt vid högre koncentrationer. Därefter inokuleras testlösningarna och blindprovet med en droppe från en pipett per liter slutlig volym.

Lösningens slutvolym uppnås genom påfyllning med hävert som når ner till kolvens botten. Detta säkerställer tillräcklig blandning. Omedelbart därefter fylls varje förberedd lösning i motsvarande grupp av flaskor med hävert från den nedersta fjärdedelen (inte från botten) av flaskan.

Vidare analyseras nollkontrollerna, eller konserveras de för senare analys (för O_2-bestämning genom fällning med $mnCl_2$ (mangan(II)klorid) och NaOH (natriumhydroxid)).

Resterande parallellflaskor placeras i ett vattenbad vid 20°C och hålls i mörker. Efter 5, 15 och 28 dagar tas aktuella flaskor från badet och analyseras.

Varje serie åtföljs av en komplett parallellserie för bestämning av blindvärden, syreförbrukning utan inokulering och kontrollämne.

Hämningstest:

Ämnen kan enkelt undersökas för hämmande effekter med closed bottle test (slutet flasktest):

Serie 1: 2 mg per liter lätt nedbrytbar förening, t.ex. fet alkohol kondenserad med etylenoxid, i molekylförhållandet 1:10, eller något av kontrollkemikalierna.

Serie 2: x mg per liter testämne (x är vanligtvis 2).

Serie 3: 2 mg per liter lätt nedbrytbar förening plus x mg per liter testämne.

Om BOD-värdena för serie 3 är mindre än summan av BOD-värdena för serie 1 och 2 kan testämnet anses inverka hämmande på bakterier vid denna koncentration. Detta kontrolltest är alltid nödvändigt om ett negativt eller dåligt nedbrytningsresultat verkar ologiskt med hänsyn till testämnets struktur, dvs. om det finns tecken på att det kan vara en följd av hämning.

1.6.5. *Bestämning av upplöst syre*

Den upplösta syremängden bestäms enligt en internationellt eller nationellt erkänd kemisk eller elektrokemisk metod.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Analysresultaten registreras på bifogade formulär (se tillägg 3).

Nedbrytningstestets förlopp framställs grafiskt i ett diagram enligt bifogade exempel (se tillägg 4).

Resultaten av nedbrytningstestet är giltiga om följande villkor har uppfyllts:

— I samma testserie skall kontrollmaterialet ha givit ≥ 60 % bionedbrytning inom 28 dagar. Om så inte är fallet skall hela serien kasseras.

— Syreförbrukningen i flaskan utan inokulat skall inte ha överstigit 0,3 mg O_2 per liter efter fem dagar och 0,4 mg O_2 per liter efter 28 dagar. Blindvärdet med inokulat skall inte ha överstigit 0,5 mg O_2 per liter efter fem dagar och 0,6 mg O_2 per liter efter 15 och 28 dagar.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapporten

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande:

— Data skall rapporteras enligt formuläret (se tillägg 3).

— Nedbrytningstestets förlopp framställs grafiskt i ett diagram som visar eftersläpningsfasen, nedbrytningsfasen, lutningen och tidsfönstret (med "tidsfönster" menas här en 10-dagarsperiod med början från den dag då den observerade bionedbrytningsnivån först överstiger 10 %).

— Metod som har använts för COD-bestämning.

— Metod som har använts för syremätningar.

— Dispersionsförfarande för ämnen som inte är lösliga under testbetingelserna.

— Bevis på testets giltighet.

3.2. Tolkning av resultat

Möjligheten att kvävehaltiga föreningar kan påverka resultaten skall övervägas.

På grund av stringensen i detta test behöver ett lågt resultat inte nödvändigtvis betyda att testämnet inte är bionedbrytbart under miljöbetingelser utan det pekar mera på att det krävs mer arbete för att fastställa detta.

Testkemikalier som visar en hög syreupptagning i detta test skall anses vara lätt bionedbrytbara förutsatt att denna nivå uppnås inom tidsfönstrets 10 dagar räknat från den dag då den observerade nivån av bionedbrytning först överstiger 10 %.

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301D*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 3, No. 2, 1979, s. 159—173.

3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No. 1, 1981, s. 45—55.

Tillägg 1

Beräkning av det teoretiska biokemiska syrebehovet

ThOD för ämnet $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ med molekylvikten MW beräknas enligt följande formel:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Denna beräkning förutsätter att C mineraliseras till CO_2, H till H_2O, P till P_2O_5 och Na till Na_2O. Halogen elimineras som vätehalogenid och kväve som ammoniak.

Exempel:

Glukos $C_6H_{12}O_6$, MW = 180.

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg glukos.}$$

Molekylvikter av andra salter än dem från alkaliska metaller beräknas utifrån antagandet att salterna har hydrolyserats.

Svavel antas oxidera till tillståndet +6.

Exempel:

Natrium-n-alkylbensensulfonat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348.

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg ämne.}$$

Vid kvävehaltiga ämnen kan kvävet elimineras som ammoniak, nitrit eller nitrat som motsvarar olika teoretiska biokemiska syrebehov.

$$ThOD_{NH_2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

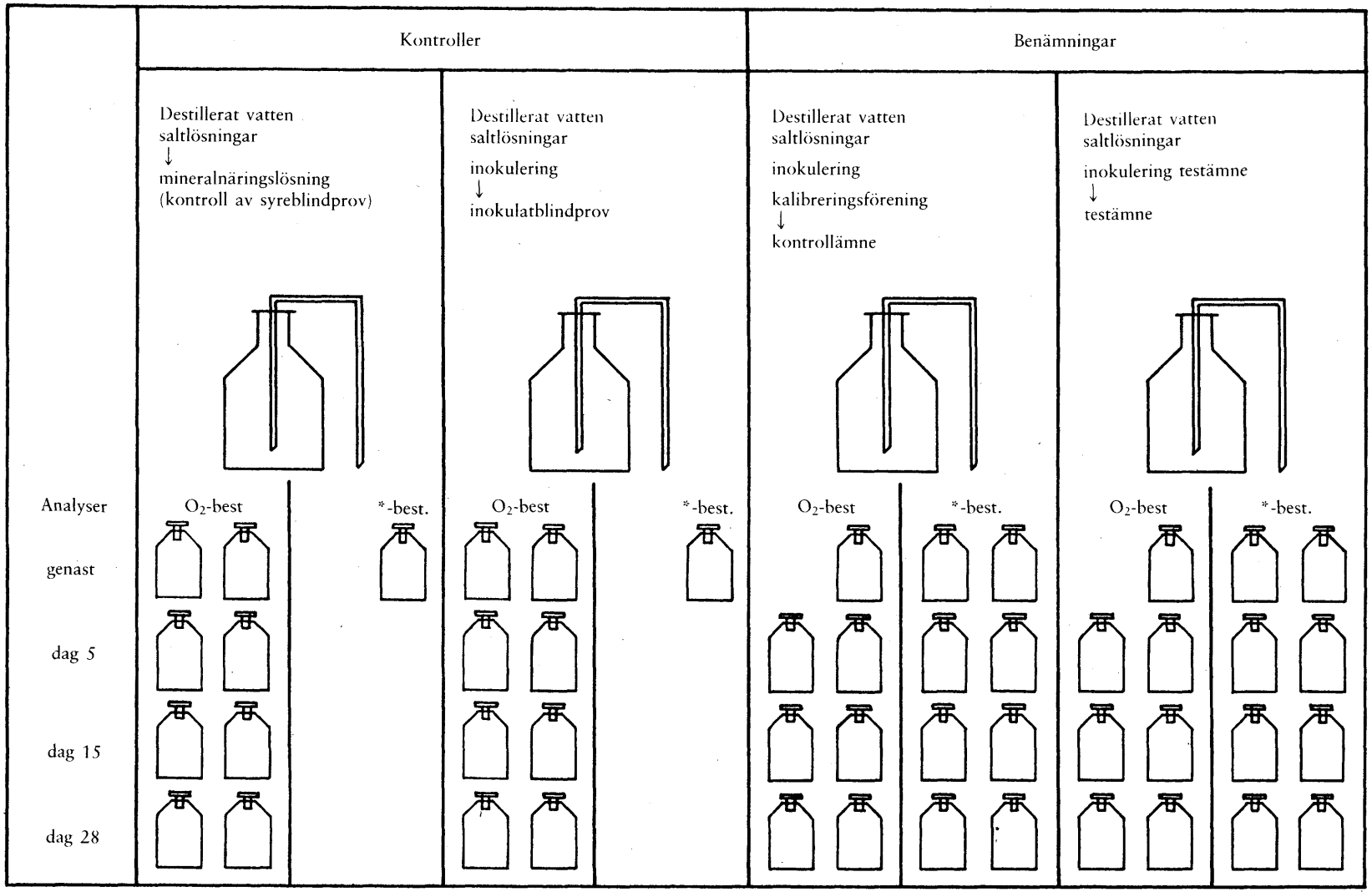
Antag att full nitratbildning hade observerats vid analys av en sekundär amin: $(C_{12}H_{25})_2NH$, MW = 353

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg ämne.}$$

Tillägg 2

Schema över flaskuppställningen för slutet flasktest

(* = särskild analys om sådan finns)



Tillägg 3

Biotisk nedbrytning: slutet flasktest (formulär)

Provningsanstalt .....

Ansvarig för testet .....

Testets startdatum ..... Test nr .....

Testämne .....

Kemisk struktur .....

Analys (Winklers metod eller syreelektrod) .....

Testämnets ThOD eller COD ..... mg O_2/mg

Utspädningsvattnets temperatur efter syrsättning .....

Vattnets O_2-koncentration efter syrsättning och vila innan testet startar ..... mg O_2 per liter

Inokulat .....

Testresultat

D_t = ... BOD uttryckt i % ThOD efter 28 dagar eller

D_t = ... BOD uttryckt i % COD efter 28 dagar

Resultatens giltighet

Kontrollkemikalie .....

Resultat ..... BOD uttryckt i % ThOD efter 28 dagar

Testets referensnummer .....

Anmärkningar:

Provningsanstalt .....

Testämne .....

Test nr .....

A: *O_2-bestämningar:*

	Kolv nr		mg O_2 per liter efter x dagar			
			0	5	15	28
Mineralnäringslösning utan testämne och utan inokulat	O_2-kontroll	c_1		—	—	—
		c_2		—	—	—
	Medelvärde	$m_a = \frac{c_1 + c_2}{2}$				
Mineralnäringslösning utan testämne men med inokulat	1	c_3				
	2	c_4				
	Medelvärde blindprov	$m_b = \frac{c_3 + c_4}{2}$				
Mineralnäringslösning med testämne och med inokulat	1	a_1				
	2	a_2				
	Medelvärde testämne	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

B: *O_2-förbrukning (mg BOD per liter) efter x dagar*

$BOD_x = (m_o - m_{tx}) - m_o - m_{tx}(*)$

mg BOD per liter efter x dagar		
5	15	28

(*) Denna skillnad är viktig som kontroll av testets giltighet.

C: *Utvärdering*

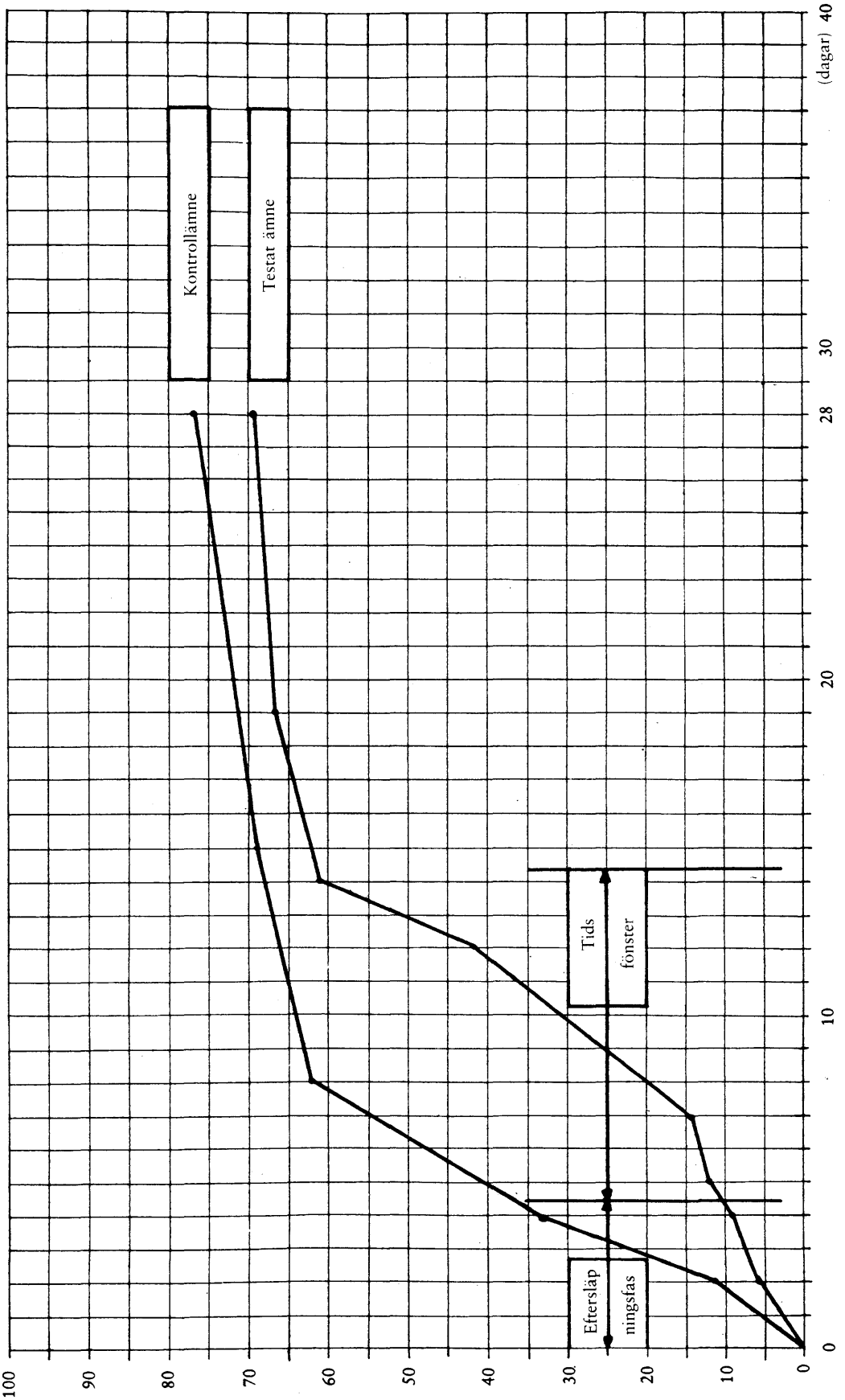
$D_t = \frac{\text{mg } BOD_x \text{ per liter}}{mg_{subs} \text{ per liter} \cdot ThOD} 100$ eller $\%\ BOD_xCOD \frac{\text{mg } BOD_x \text{ per liter}}{mg_{subs} \text{per liter} \cdot COD} \cdot 100$

	Efter x dagar		
	5	15	28
% BOD/ThOD			
% BOD_x/COD			

Tillägg 4

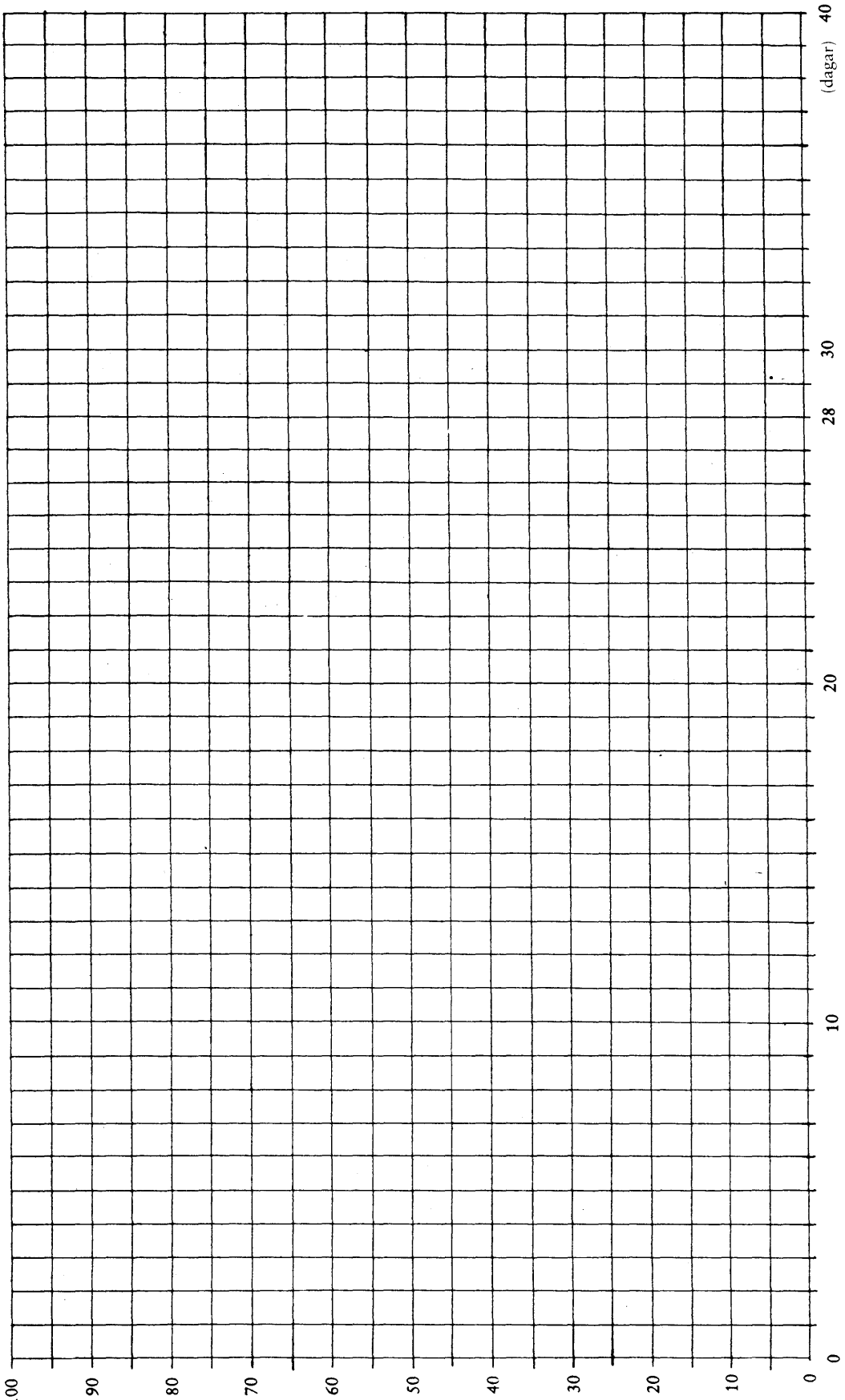
Slutet flasktest

Provningsanstalt ..... Testämne ..... Test nr .....



Slutet flasktest

Provningsanstalt ..... Testämne ..... Test nr .....



C. 7. NEDBRYTNING

BIOTISK NEDBRYTNING: MODIFIERAT MITI-TEST

1. METOD

1.1. Inledning

Syftet med denna metod är att mäta bionedbrytbarheten hos organiska ämnen i ett aerobt vattenmedium med en kapslad respirometer som ger avläsningarna av det biokemiska syrebehovet.

Det är nödvändigt att känna till testämnets empiriska formel för att kunna beräkna det teoretiska syrebehovet (ThOD). Om formeln inte är känd kan COD (kemiskt syrebehov) användas.

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid den koncentration som används i testet

— har försumbart ångtryck,

— inte inverkar hämmande på bakterier,

— inte kommer i kontakt och reagerar med CO_2-absorptionsmedlet.

Om testämnet inte är lösligt vid testkoncentrationen kan det vara nödvändigt att vidta särskilda åtgärder, t.ex. att använda ultraljudsdispersion, för att uppnå en god dispersion av testämnet.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

Uppgifter om de relativa proportionerna av testämnets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de resultat som erhålls, särskilt om resultaten är låga.

1.2. Definitioner och enheter

$$\text{Procent nedbrytning} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{(\text{ThOD (eller COD)}} \times 100\,\%$$

eller

$$\text{procent nedbrytning} = \frac{(\text{Sb} - \text{Sa})}{\text{Sb}} \times 100\,\%$$

där:

BOD = biokemiskt syrebehov hos testföreningen (experimentellt) (i milligram) mätt på BOD-kurvan,

B = syreförbrukning av basalt kulturmedium till vilket inokulatet tillförs (experimentellt) (i milligram) mätt på BOD-kurvan,

ThOD = teoretiskt syrebehov när testföreningen har oxiderats helt (teoretiskt) (i millimeter),

Sa = restmängd av testföreningen efter slutförande av bionedbrytningstestet (experimentellt) (milligram),

Sb = restmängd av testföreningen i blindprovet med vatten till vilket endast testföreningen har tillsatts (experimentellt) (i milligram).

1.3. Referensämnen

För att kontrollera inokulatets aktivitet är det önskvärt att kontrollämnen används. Anilin, natriumacetat och natriumbensoat kan användas till detta ändamål. Om den procentuella nedbrytningen av anilin, beräknad utifrån syreförbrukningen, inte överstiger 40 % efter 7 dagar eller 65 % efter 14 dagar anses testet vara ogiltigt. Testet anses även vara ogiltigt om återhämtningen för Sb konstateras vara ganska låg.

1.4. **Testmetodsprincip**

Testkemikalierna är de enda källorna till organiskt kol och det sker ingen föregående anpassning av mikroorganismer till testkemikalierna.

Till testet används ett automatiserat slutet system för mätning av syreförbrukning (BOD-mätare). Kemikalier som skall testas inokuleras med mikroorganismer i testkärlen. Under testperioden mäts det biokemiska syrebehovet fortlöpande med BOD-mätaren. Bionedbrytbarheten beräknas på basis av BOD och kompletterande kemiska analyser görs, t.ex. mätning av koncentrationen av upplöst organiskt kol, koncentrationen av restkemikalier osv.

1.5. **Kvalitetskriterier**

1.5.1. *Reproducerbarhet:*

Vanligen god, i synnerhet för kemikalier med högre vattenlöslighet än 0,1 g per liter.

1.5.2. *Sensitivitet:*

A) Syreförbrukning: detektionsgräns = 1 mg (syreförbrukning av mikroorganismer).

B) Kemisk analys: beror på analysmetodernas sensitivitet.

1.5.3. *Specificitet:*

Kan tillämpas på alla slags kemikalier för vilka gäller att förhållandet (C_v) i vatten till (C_l)i luft är större än eller lika med 1. För flyktiga kemikalier skall användas en "modifierad BOD-mätare" bestående av en vanlig BOD-mätare med kapillärrör (se tillägg 1).

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Det destillerade vattnet får inte innehålla mer än 10 % av det kol som tillförs med testämnet.

1.6.1.2. Basalt kulturmedium

Till var 3 ml av lösning A, lösning B, lösning C och lösning D tillsätts vatten till 1 000 ml (avjoniserat vatten används genomgående).

A) K_2HPO_4 (dikaliumhydrogenfosfat):	21,75 g
KH_2PO_4 (kaliumdihydrogenfosfat):	8,50 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (dinatriumhydrogenfosfat-dodekahydrat):	44,60 g

NH_4Cl (ammoniumklorid): 1,70 g
Upplös i vatten (1.6.1.1.) så att 1 000 ml erhålls.
pH-värdet skall vara 7,2.

B) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnesiumsulfat-heptahydrat): 22,50 g
Upplös i vatten (1.6.1.1.) så att 1 000 ml erhålls.

C) $CaCl_2$ (kalciumklorid) 27,50 g
Upplös i vatten (1.6.1.1.) så att 1 000 ml erhålls.

D) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (järn(III)klorid-hexahydrat) 0,25 g
Upplös i vatten (1.6.1.1.) så att 1 000 ml erhålls.

1.6.2. *Apparatur*

BOD-mätare utrustad med sex flaskor (300 ml vardera):

Flaska 1 och 2:

avjoniserat vatten, 300 ml + testkemikalie, 30 mg.

Flaska 3 och 4:

basalt kulturmedium, 300 ml + aktiverat slam, 9 mg (pulverformigt) + testämne, 30 mg.

Flaska 5:

basalt kulturmedium, 300 ml + aktiverat slam, 9 mg (pulverformigt) + anilin eller annat referensämne, 30 mg.

Flaska 6:

basalt kulturmedium, 300 ml + aktiverat slam, 9 mg (pulverformigt).

1.6.3. *Förberedelse av inokulatet*

1.6.3.1. Aktiverat slam

Insamlingsställen: Slaminsamling görs i princip på minst 10 platser över hela landet, huvudsakligen i de områden där det kan antas att många kemiska ämnen används och kasseras.

I Japan t.ex. hämtar och blandar Japanese Chemical Biotesting Centre sitt standardblandning av aktiverat slam på följande platser:

— Stadsreningsverk: tre anläggningar, varav en i norra Japan, en i centrala delen av Japan och en i södra Japan.

— Industrireningsverk: en anläggning som renar avloppsvatten från kemiska industrier.

— Flod: tre floder, varav en i norra Japan, en i centrala delen av Japan och en i södra Japan.

— Insjö: en sjö mitt i Japan.

— Större insjö: två större insjöar i Japan.

Slaminsamlingsfrekvens: Slaminsamling skall i princip göras fyra gånger om året (mars, juni, september och december).

Slaminsamlingsmetoder:

— Stadsreningsverk: en liter sekundärt slam i ett reningsverk.

— Floder, insjöar och sumpmarker eller hav: en liter ytvatten och från stranden en liter ytjord som har kontakt med atmosfären.

Förberedelse:

Slamproverna som hämtats från insamlingsplatserna blandas genom omrörning i en behållare varefter blandningen får stå. Flytande främmande material avlägsnas och supernatanten filtreras genom filtrerpapper nr 2. Filtratet justeras till pH-värdet 7,0 ± 1,0 med natriumhydroxid eller fosforsyra, överförs till en kulturtank och syrsätts.

Kultur:

När lösningen har syrsatts i ungefär 30 minuter avlägsnas cirka en tredjedel av supernatantens hela volym. En lika stor volym på 1,0 % syntetiskt avloppsvatten tillsätts till den resterande delen av supernatanten och blandningen syrsätts igen (0,1 % syntetiskt avloppsvatten: 1 g glukos, 1 g pepton och 1 g monokaliumfosfat upplöses i 1 liter vatten och lösningen justeras till pH-värdet 7,0 ± 1,0 med natriumhydroxid). Detta förfarande upprepas en gång varannan dag. Kulturen hålls vid 25 ± 2°C.

Kontroll:

Som kontroll till odlingsmomentet skall följande punkter kontrolleras och nödvändiga justeringar skall göras:

— Supernatantens utseende: Det aktiverade slammets supernatant skall vara klar.

— Bottenfällning hos aktiverat slam: Det aktiverade slammet i stora flockar skall lätt sjunka till botten.

— Utvecklingstillstånden hos aktiverat slam: Om ingen flockbildning observeras skall det syntetiska avloppsvattnet tillsättas i större mängd än volymen 0,1 % eller skall det tillsättas oftare.

— Supernatantens pH-värde skall vara 7,0 ± 1,0.

— Temperatur: odlingstemperaturen för aktiverat slam skall vara 25 ± 2°C.

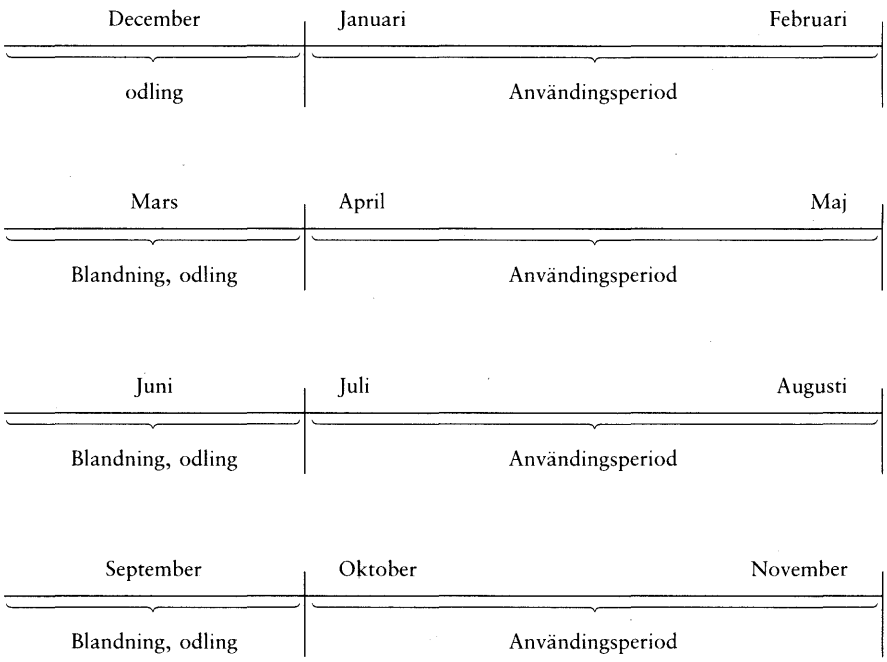
— Syrsättning: När supernatanten ersätts med syntetiskt avloppsvatten skall suspensionen i kulturtanken syrsättas tillräckligt så att det upplösta syrets koncentration i lösningen bibehålls över 5 mg per liter.

— Det aktiverade slammets mikroflora: När det aktiverade slammet iakttas under mikroskop (vid 100—400 gångers förstoring) skall ett antal protozoer av olika arter kunna ses tillsammans med grumliga flockar.

— Blandning av färskt och gammalt aktiverat slam: För att hålla samma aktivitet i färskt och gammalt aktiverat slam skall filtratet av supernatanten från ett aktiverat slam som används i testet blandas med lika stor volym av filtratet av supernatanten från ett aktiverat slam som nyligen har insamlats. Denna blandning odlas.

— Kontroll av aktiviteten i aktiverat slam: Aktiviteten i aktiverat slam skall kontrolleras med jämna mellanrum, minst en gång var tredje månad, med standardämnen enligt anvisningarna nedan. Särskilt om färskt och gammalt aktiverat slam blandas skall det gamla aktiverade slammet kontrolleras noggrant.

Exempel på beredning av aktiverat slam och användningsperiod:



1.6.4. *Förbehandling av testämnet*

Om testämnet inte är lösligt i vatten upp till testkoncentrationen skall det pulvriseras så fint som möjligt.

1.6.5. *Tillsättning av testämne och förberedelse av testet*

Följande testkärl (se 1.6.2.) skall användas och justeras till testtemperaturen:

1) Två testkärl innehållande vatten. Till dessa (kärl 1 och 2) tillsätts 100 mg testämne per liter.

2) Två testkärl innehållande basalt kulturmedium. Till dessa (kärl 3 och 4) tillsätts 100 mg testämne per liter: denna lösnings pH-värde justeras vid behov till 7 före inokulering av aktiverat slam.

3) Ett testkärl innehållande basalt kulturmedium. Till detta (kärl 5) tillsätts 100 mg anilin eller annat referensämne per liter.

4) Ett testkärl för blindprovskontrollen innehållande endast basalt kulturmedium (kärl 6).

1.6.5.1. Inokulering med aktiverat slam

Inokulat tillsätts till testkärl 3, 4, 5 och 6 så att det suspenderade materialet, definierat i t.ex. Japanese Industrial Standards (se hänvisning 3), hålls vid en koncentration på 30 mg per liter.

1.6.5.2. Testbetingelser

Testämnens koncentration: 100 mg per liter.

Det aktiverade slammets koncentration: 30 mg per liter.

Testtemperatur: 20—25°C.

Testperiod: 28 dagar.

Testet utförs i mörker. Varje dag kontrolleras temperaturen och ändringar av kulturens färg. Omröres kraftigt med mekanisk omrörare.

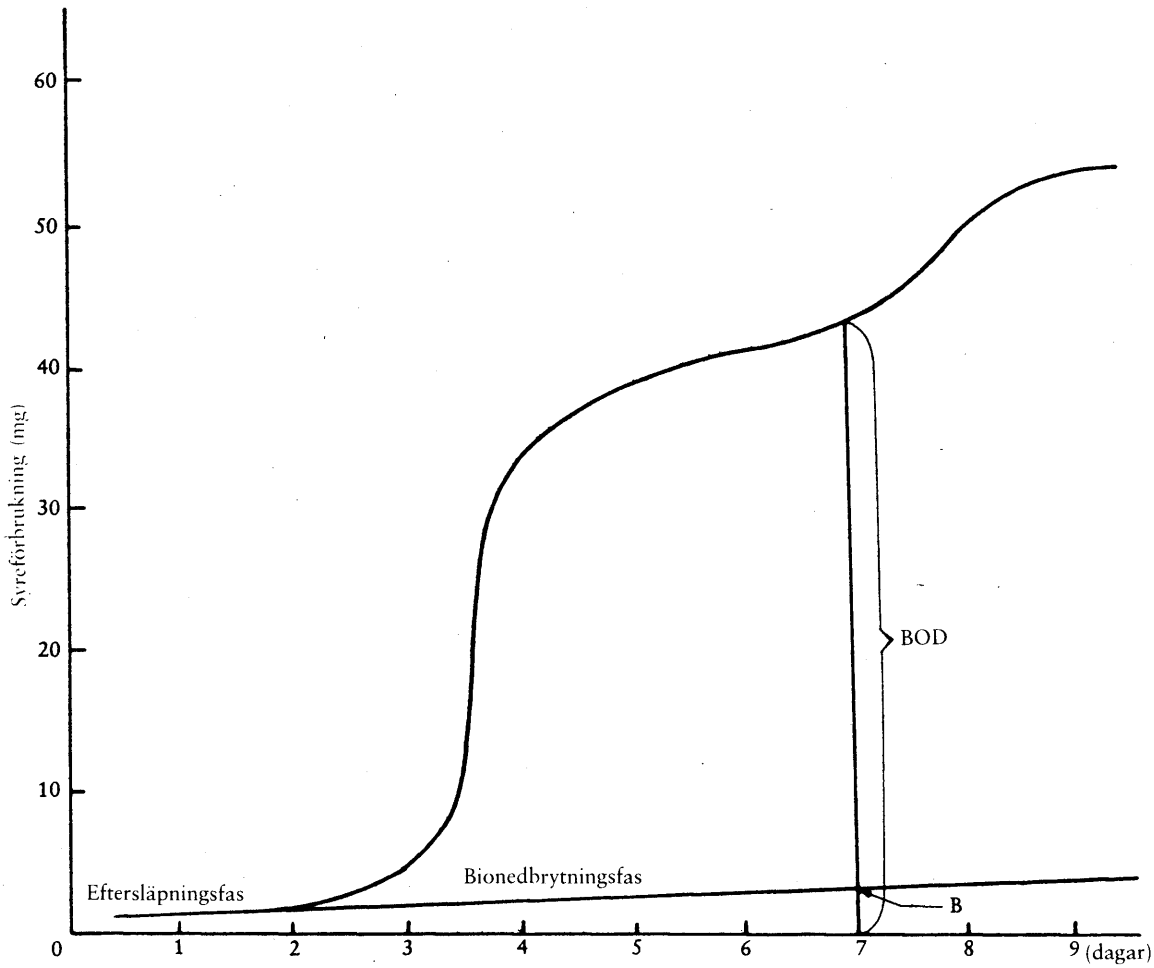
1.6.6. *Testförfarande*

BOD-kurvan ritas som en sammanhängande linje under 28 dagar (se figuren).

Efter den 28 dagar långa testperioden bestäms pH-värde och koncentration för restkemikalier och övergångsprodukter i testkärlen.

Figur

BOD-kurva för anilin



Testämnena i testkärlet utan aktiverat slam analyseras också för att bekräfta om testämnet har förändrats under testperioden eller om det ursprungliga testämnet har gjort några förluster genom förångning eller adsorption från testkärlets väggar osv.

1.6.7. *Analysutrustning*

Om testämnet är lösligt i vatten skall även restmängden totalt organiskt kol bestämmas i slutet av testet.

a) Om analysapparat för organiskt kol används:

10 ml prov tas av testlösningen i testkärlet. Provet centrifugeras vid 3 000 g i fem minuter. Restmängden totalt organiskt kol i supernatanten bestäms medelst en analysapparat för totalt organiskt kol.

b) Om andra analysmetoder används:

Hela innehållet i testkärlet extraheras med ett för testämnet lämpligt lösningsmedel och efter korrekt förbehandling, t.ex. koncentration, bestäms restmängden av testämnet medelst ett analysinstrument (gaskromatograf, masspektrometer, spektrofotometer osv.).

För flyktiga kemikalier skall BOD-mätarens termostatbad avkylas till 10°C och hållas vid denna temperatur i minst 30 minuter för att förhindra förångning. Därefter kan analysförfarandena enligt a) och b) inledas.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

2.1. Behandling av resultat

Metoden för beräkning av procentuell nedbrytning utifrån syreförbrukning och resultatet av direkt analys finns beskriven i 1.2.

2.2. Utvärdering av resultat

Det teoretiska syrebehovet kan beräknas antingen enligt tillägg 2 eller enligt den ursprungliga MITI-metoden:

Grundämne	Oxiderad form
C	CO_2
H	H_2O
N	NO_2
S	SO_2
X (halogen)	X

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapporten

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande:

— Uppgifter om testämnet (namn, strukturformel, molekylvikt, renhet, art av orenheter, fysiska och kemiska egenskaper, identifieringsuppgifter.

— Testbetingelser.

— Aktiverat slam: insamlingsplatser och koncentration.

— Testämne: koncentration.

— Testperiod.

— Testtemperatur.

— Analysförfarande:

förbehandling
instrumentella analysbetingelser
återhämtningsgrad vid analysförfarande
identifiering av övergångsprodukter

— Resultat:

bionedbrytningskurvor (kontroll av inokulatets aktivitet + kurva över testämnets aktivitet)
BOD (mg)
B (mg)
Sa_a (mg)
Sb_b (mg)
ThOD (mg)
procentuell nedbrytning genom BOD
procentuell nedbrytning genom kemisk analys
kromatogram eller spektra av testämnen, framtagna och använda i analyssyfte

— bevis på giltighet (se punkt 1.3.).

3.2. **Tolkning av resultat**

Möjligheten att kvävehaltiga föreningar kan påverka resultaten skall övervägas.

Om återhämtningsgraden för Sb_b konstateras vara i storleksordningen 10 % eller lägre tyder detta på analytiska problem eller t.ex. hydrolys. I så fall skall försiktighet iakttas vid tolkningen.

På grund av stringensen i detta test behöver ett lågt resultat inte nödvändigtvis betyda att testämnet inte är bionedbrytbart under miljöbetingelser utan det pekar mera på att det krävs mer arbete för att fastställa detta.

Testkemikalier som visar en hög syreupptagning i detta test skall anses vara lätt bionedbrytbara förutsatt att denna nivå uppnås inom tidsfönstrets 10 dagar räknat från den dag då den observerade nivån av bionedbrytning först överstiger 10 %.

4. **HÄNVISNINGAR**

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301C,* Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) *Biodegradability and bioaccumulation test of chemical substances* (C-5/98/JAP), 1978.

(3) *The chemical substances control law in Japan* (Chemical Products Safety Division, Basic Industries Bureau, MITI) (C-2/78/JAP), 1978.

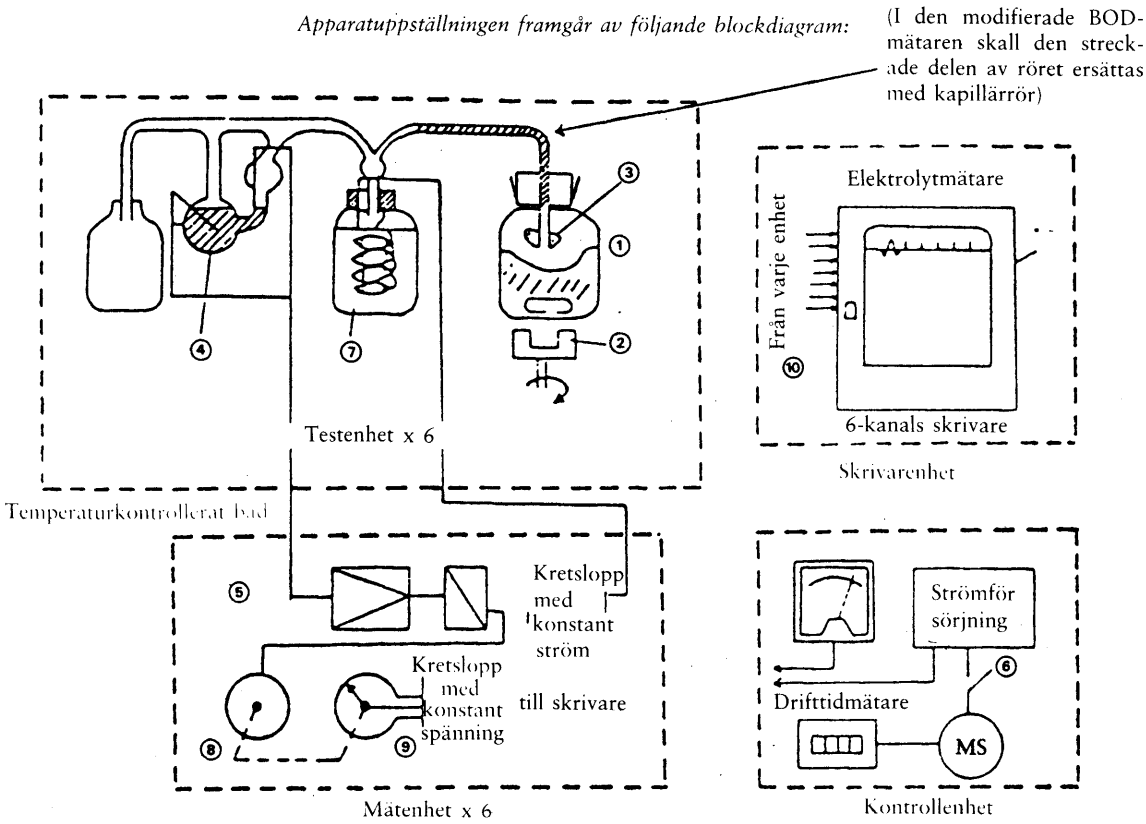
(4) *The biodegradability and bioaccumulaiton of new and existing chemical substances,* 5,8 (C-3/78/JAP), 1978.

Tillägg 1

Principskiss över apparatur för mätning av syreförbrukning i ett slutet system

Mikroorganismernas syreförbrukning kan bestämmas med användning av en elektrokemisk analysprocess (t.ex. coulometri).

Apparatuppställningen framgår av följande blockdiagram:



Proven i odlingsflaskan (1) omröres med magnetomrörare (2). I takt med reaktionen förbrukas det upplösta syret i vätskan. Syret (O_2) i rummet i odlingsflaskan upplöses varvid CO_2 bildas i stället.

När detta CO_2 absorberas av natronkalk (3) sjunker det partiella syretrycket i rummet och det totala trycket.

Tryckminskningen upptäcks och omvandlas till en elektrisk signal av en manometer av elektrodtyp (4) och förstärks av en förstärkare (5) som styr ett reläkretslopp (6), som aktiverar en synkronmotor (8). Genom konstant ström bildas samtidigt elektrolytiskt syre från en svavelsyre-kopparlösning i en elektrolysflaska (7).

Detta syre levereras till odlingsflaskan och trycknormaliseringen upptäcks av manometern, vilket leder till att reläkretsloppet bryts och stoppar elektrolyt- och synkronmotorn.

Det övre rummet i odlingsflaskan hålls hela tiden under konstant syretryck och mängden syre som förbrukas i odlingsflaskan står i proportion till mängden elektrolytiskt syre. Då denna mängd elektrolytiskt syre är proportionell till elektrolystiden är elektrolysströmmen konstant. Följaktligen omvandlas synkronmotorns (9) rotationsvinkel till en mV-signal medelst förreglingspotentiometern, varvid skrivaren (10) upptecknar syreförbrukningen.

Tillägg 2

Beräkning av det teoretiska biokemiska syrebehovet

ThOD för ämnet $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ med molekylvikten MW beräknas enligt följande formel:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Denna beräkning förutsätter att C mineraliseras till CO_2, H till H_2O, P till P_2O_5 och Na till Na_2O. Halogen elimineras som vätehalogenid och kväve som ammoniak.

Exempel:

Glukos $C_6H_{12}O_6$, MW = 180.

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg glukos.}$$

Molekylvikter av andra salter än dem från alkaliska metaller beräknas utifrån antagandet att salterna har hydrolyserats.

Svavel antas oxidera till tillståndet +6.

Exempel:

Natrium-n-alkylbensensulfonat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348.

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg ämne.}$$

Vid kvävehaltiga ämnen kan kvävet elimineras som ammoniak, nitrit eller nitrat som motsvarar olika teoretiska biokemiska syrebehov.

$$ThOD_{NO_2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Antag att full nitratbildning hade observerats vid analys av en sekundär amin:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, MW = 353

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg ämne.}$$

Tillägg 3

Biotisk nedbrytning: Modifierat MITI-test

Provningsanstalt .....

Ansvarig för testet .....

Testets startdatum ..... Test nr .....

Testämne .....

Kemisk struktur .....

Analysförfarande .....

Testämnets ThOD eller COD .....

Inokulat .....

Insamlingsplats .....

Koncentration .....

Testresultat

..... % nedbrytning = $\frac{\text{BOD} - \text{B}}{(\text{ThOD (eller COD)}} \times 100\,\%$ efter 28 dagar

eller

..... % nedbrytning = $\frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{DBQ}} \times 100\,\%$ efter 28 dagar

..... % nedbrytning = $\frac{\text{Sb} - \text{Sa}}{\text{Sb}} \times 100\,\%$ efter 28 dagar

Resultatens giltighet

Kontrollkemikalie .....

Resultat: ..... % nedbrytning efter 28 dagar .....

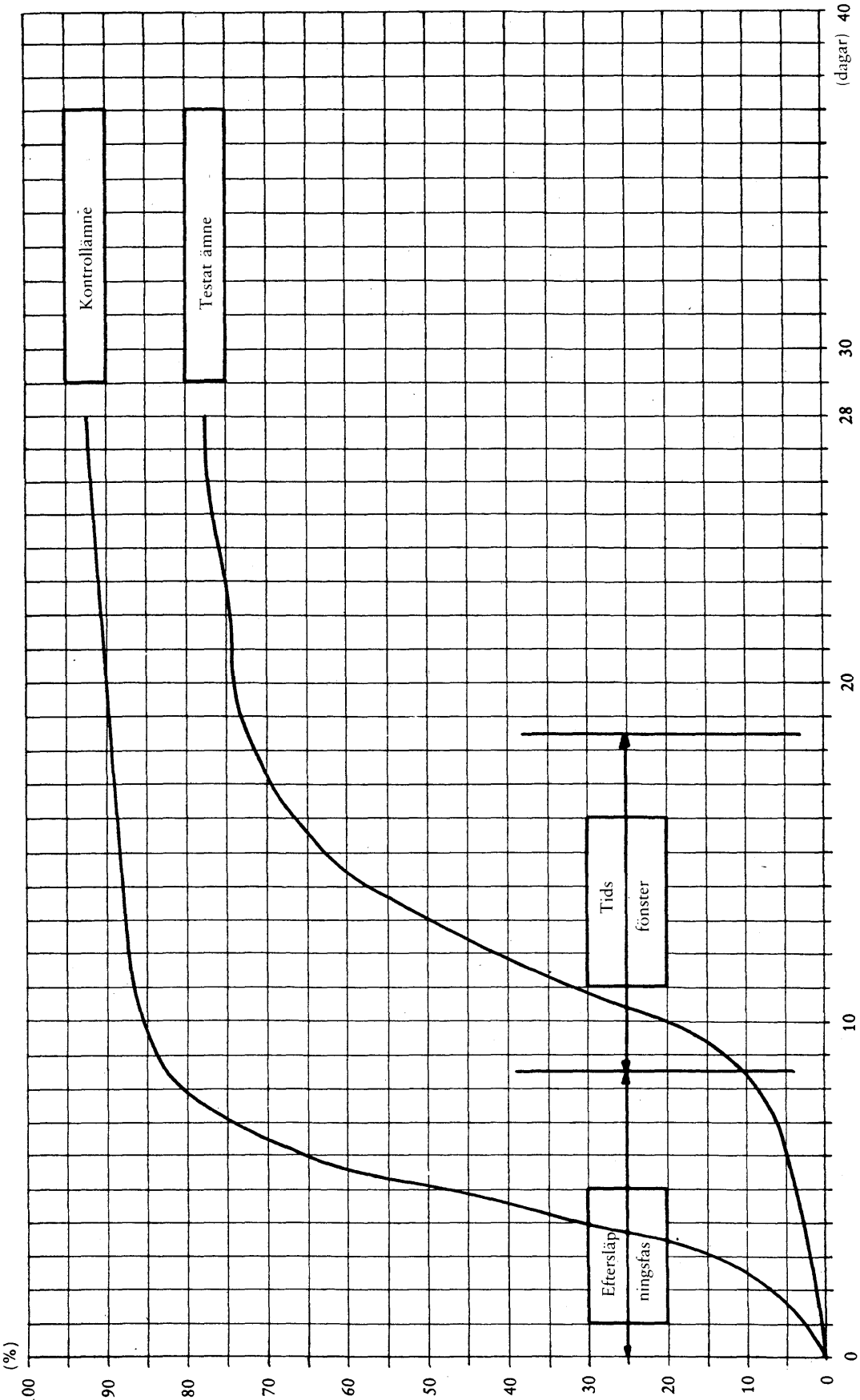
Testets referensnummer .....

Anmärkningar:

Tillägg 4

Modifierat MITI-test

Provningsanstalt ..... Testämne ..... Test nr .....

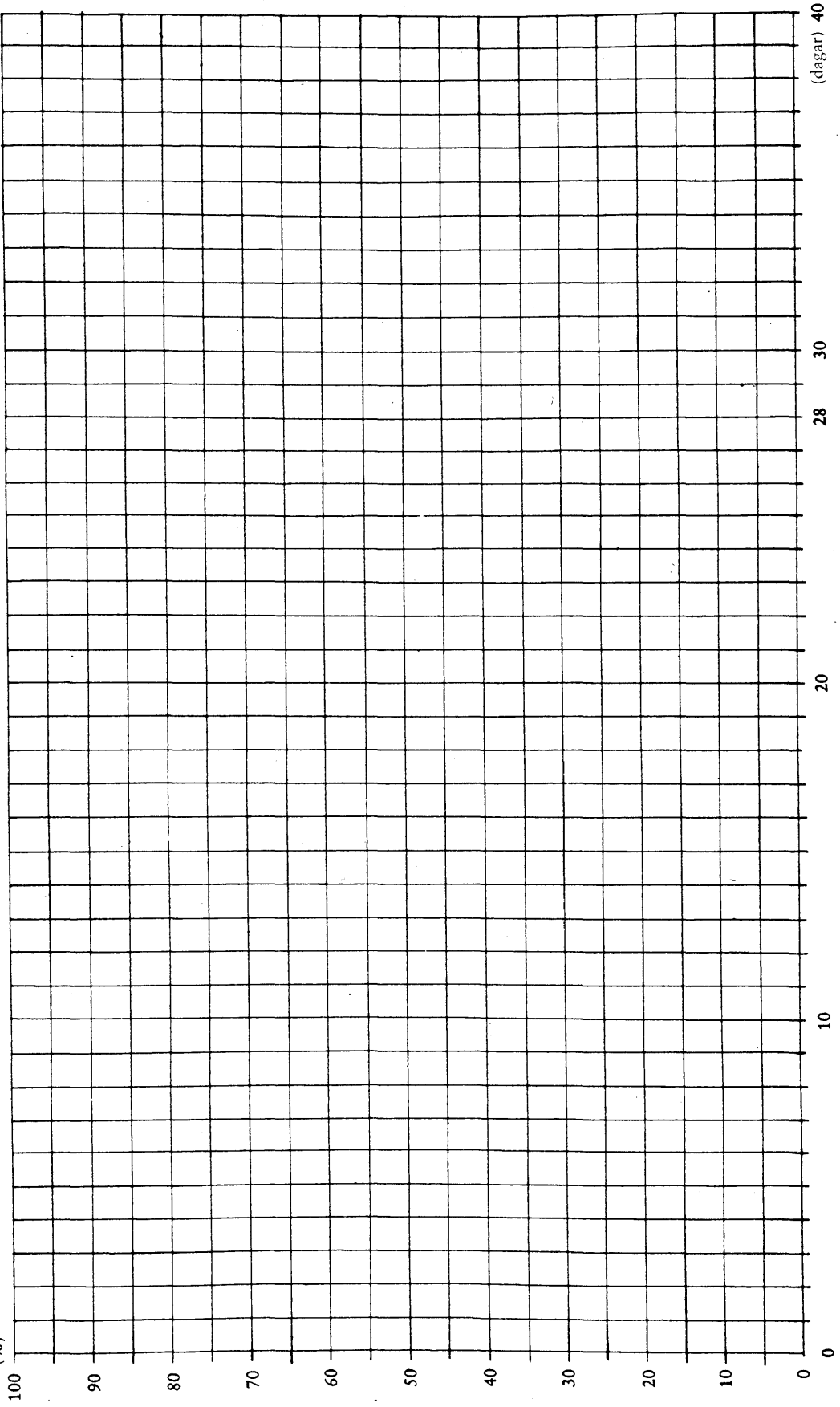


Modifierat MITI-test

Provningsanstalt .....

Testämne .....

Test nr .....



C. 8. BIONEDBRYTNING

BIOKEMISKT SYREBEHOV

1. METOD

1.1. **Inledning**

Syftet med denna metod är att mäta det biokemiska syrebehovet (BOD) för fasta eller flytande organiska ämnen.

Data som erhålls vid detta test avser vattenlösliga föreningar. Dock kan, åtminstone principiellt, även flyktiga föreningar undersökas.

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid de koncentrationer som används i testet inte inverkar hämmande på bakterier. Om testämnet inte är lösligt vid testkoncentrationen kan det vara nödvändigt att vidta särskilda åtgärder, t.ex. att använda ultraljudsdispersion, för att uppnå en god dispersion av testämnet.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

1.2. **Definitioner och enheter**

BOD definieras som den mängd upplöst syre som krävs för den biokemiska oxideringsprocessen för en angiven mängd lösning av testämnet under testbetingelser.

Resultaten uttrycks som gram BOD per gram testat ämne.

1.3. **Referensämnen**

Referensämnen för kalibrering kan ännu inte rekommenderas. Det är önskvärt att lämpligt kontrollämne används för att kontrollera inokulatets aktivitet.

1.4. **Testmetodsprincip**

En förbestämd mängd av ämnet, upplöst eller dispergerat i ett väl syrsatt medium, inokuleras med mikroorganismer och inkuberas i mörker vid en konstant, definierad rumstemperatur.

BOD bestäms genom skillnaden mellan mängden upplöst syre i början och i slutet av testet. Durationen av testet skall vara minst fem dagar och högst 28 dagar.

Parallellt med testet skall utföras ett blindprov utan innehåll av testämnet.

1.5. **Kvalitetskriterier**

BOD-bestämningen kan inte anses vara en giltig bestämning av ett ämnes bionedbrytbarhet. Detta test kan endast betraktas som ett screening-test.

1.6. **Metodbeskrivning**

En preliminär lösning eller dispersion av ämnet bereds för att uppnå en BOD-koncentration som är förenlig med den använda metoden. BOD bestäms därefter enligt lämplig nationell standardmetod. När en internationell metod har fastställts är den att föredra.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

BOD-innehållet i lösningen beräknas enligt den valda standardmetoden och omvandlas till gram BOD per gram testat ämne.

3. RAPPORTERING

Den använda metoden skall anges.

Det biokemiska syrebehovet skall vara ett medeltal av minst tre giltiga mätningar.

Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras, särskilt avseende ämnets sammansättning, orenheter, fysiskt tillstånd och toxiska effekter som kan påverka resultaten.

Eventuella tillsatser som använts för att hämma biologisk nitrifikation skall rapporteras.

4. HÄNVISNINGAR

Listaöver standardiserade metoder, t.ex.:

NF T 90—103:	Determination of the biochemical oxygen demand.
NBN 407:	Biochemical oxygen demand.
NEN 3235 5.4:	Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, *Methods for the examination of water and associated materials*, HMSO, London.

C. 9. NEDBRYTNING

KEMISKT SYREBEHOV

1. METOD

1.1. Inledning

Syftet med denna metod är att mäta det kemiska syrebehovet (COD) för fasta eller flytande organiska ämnen på ett godtyckligt standardsätt under givna laboratoriebetingelser.

Uppgifter om ämnets formel är till nytta vid utförandet av testet och tolkningen av resultaten (t.ex. halogensalter, ferrosalter av organiska föreningar, organiska klorföreningar).

1.2. Definitioner och enheter

Det kemiska syrebehovet är ett mått på ett ämnes förmåga att oxideras, uttryckt som den ekvivalenta mängden syre i en oxiderande reagens som förbrukas av ämnet under givna laboratoriebetingelser.

Resultatet uttrycks i gram COD per gram testat ämne.

1.3. Referensämnen

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas till att från tid till annan kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

1.4. Testmetodsprincip

En förbestämd mängd av ämnet, upplöst eller dispergerat i vatten, oxideras av kaliumbikromat i ett starkt svavelsyremedium med silversulfat som katalysator under återflöde i två timmar. Restmängden bikromat bestäms genom titrering med standard järnammoniumsulfat.

Vid klorhaltiga ämnen tillsätts kvicksilversulfat för att reducera inverkan av klor.

1.5. Kvalitetskriterier

Till följd av det godtyckliga sättet att bestämma COD skall resultatet mera betraktas som en "indikator på oxideringsförmågan" än som ett mått på mängden organiskt ämne.

Klorid kan inverka på detta test. Oorganiska reducerande eller oxiderande ämnen kan också inverka på BOD-bestämningen.

Vissa cykliska föreningar oxideras inte till fullo vid detta test.

1.6. Metodbeskrivning

En inledande lösning eller dispersion av ämnet bereds så att ett COD mellan 250 och 600 mg per liter erhålls.

Anmärkningar:

Vid svårlösliga ämnen och ämnen som inte dispergerar kan finpulvriserat eller flytande ämne motsvarande ungefär 5 mg COD överföras till försöksapparaten tillsammans med vatten.

COD bestäms därefter enligt lämplig nationell standardmetod i avvaktan på att en internationell standardiserad metod skall offentliggöras. Sistnämnda metod är då att föredra.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

COD-innehållet i testkolven beräknas enligt den valda standardmetoden och omvandlas till gram COD per gram testat ämne.

3. RAPPORTERING

Den använda referensmetoden skall anges.

Det kemiska syrebehovet skall vara ett medeltal av minst tre mätningar. Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras, särskilt avseende orenheter, ämnets fysiska tillstånd och egenskaper (om de är kända) som kan påverka resultaten.

Om kvicksilversulfat har använts för att minimera inverkan av klor skall detta rapporteras.

4. HÄNVISNINGAR

Listaöver standardiserade metoder, t.ex.:

NBN T 91—201:	Determination of the oxygen demand.
ISBN 0 11 7512494:	Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.
NF T 90—101:	Determination of the chemical oxygen demand.
DS 217 — water analysis:	Determination of the chemical oxygen demand.
DIN 38409 — H — 41	Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.
NEN 3235 5.3	Bepaling an het chemisch zuurstofverbruik.
ISO DP 6060	Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

C. 10. NEDBRYTNING

ABIOTISK NEDBRYTNING: HYDROLYS SOM EN FUNKTION AV pH-VÄRDE

1. METOD

Denna metod är baserad på OECDs riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1. Inledning

Hydrolys är en viktig reaktion som styr den abiotiska nedbrytningen. Denna reaktion är av särskild betydelse för ämnen med låg bionedbrytbarhet och den kan påverka ett ämnes beständighet i miljön.

De flesta hydrolysreaktioner är av *pseudo*-första ordningen och halveringstiden är därför oberoende av koncentration. Detta innebär att resultat som erhålls vid laboratoriekoncentrationer normalt kan extrapoleras till betingelserna i miljön.

För flera typer av kemikalier har dessutom rapporterats ett antal exempel (se hänvisning 2) på tillfredsställande överensstämmelse mellan resultat i rent och i naturligt förekommande vatten.

Förhandsuppgifter om ämnets ångtryck är till nytta vid utförandet av detta test.

Denna metod kan endast tillämpas på vattenlösliga ämnen. Orenheter påverkar resultaten.

Kemikaliers hydrolysegenskaper skall undersökas vid pH-värden som normalt finns i miljön (pH-värde 4—9).

1.2. Definitioner och enheter

Hydrolys anger en reaktion mellan ett ämne RX med vatten. Denna reaktion kan uttryckas genom nettoutbytet mellan gruppen X och OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Den hastighet varmed koncentrationen av RX minskar erhålls genom:

$$\text{hastighet} = k\,[H_2O]\,[RX] \qquad [2]$$

Eftersom vatten förekommer i stort överskott jämfört med ämnet beskrivs denna typ av reaktion vanligen som en *pseudo*-första ordningens reaktion i vilken den observerade hastighetskonstanten erhålls genom relationen:

$$k_{obs} = k \times [H_2O] \qquad [3]$$

Denna konstant kan bestämmas för ett pH-värde och en temperatur, T, medelst uttrycket:

$$k_{obs}\,\frac{2{,}303}{t} \times \log\frac{C_0}{C_t} \qquad [4]$$

där:

t = tiden,

C_0 = ämnets koncentration vid tiden 0,

C_t = ämnets koncentration vid tiden t, och

2,303 = omvandlingsfaktorn mellan naturliga logaritmer och tiologaritmer.

Koncentrationerna uttrycks i gram per liter eller mol per liter.

Konstanten k_{obs} har dimensionen $(tid)^{-1}$.

Halveringstiden, $t_{1/2}$, definieras som den tid det tar att minska testämnets koncentration med 50 %, dvs.:

$$C_t = 1/2\ C_0 \qquad [5]$$

Med uttrycken (4) och (5) kan visas att:

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{obs} \qquad [6]$$

1.3. **Referensämnen**

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas till att från tid till annan kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

Acetylsalicylsyra (aspirin)

Fosfortionatsyra 0,0-dietyl 0-(6-metyl-2-(1metyletyl)4-pyrimidinylester (dimpylat, diazinon), har använts som referensämnen (se hänvisning 1).

1.4. **Testmetodsprincip**

Ämnet upplöses i vatten vid en låg koncentration och pH-värdet och temperaturen kontrolleras.

Minskningen i ämnets koncentration med tiden följs enligt lämpligt analysförfarande.

Logaritmen av koncentrationen avbildas som en funktion av tiden och om det blir en rät linje kan första ordningens hastighetskonstant erhållas av linjens lutning (se punkt 2).

När det inte går att direkt bestämma en hastighetskonstant för en viss temperatur kan man oftast uppskatta konstanten genom att använda Arrhenius ekvation, som ger hastighetskonstantens beroende av temperaturen. Utifrån den linjära avbildningen av logaritmen av hastighetskonstanten, bestämd vid lämplig temperatur som en funktion av den reciproka absoluta temperaturen, K, kan man extrapolera värdet för hastighetskonstanten, vilken inte gick att bestämma direkt.

1.5. **Kvalitetskriterier**

I hänvisning 2 rapporteras att mätningar av hastighetskonstanter för hydrolys av 13 klasser av organiska strukturer kan vara mycket noggranna.

Repeterbarheten är särskilt beroende av kontrollen av pH-värdet och koncentrationen av det upplösta syret och den kan påverkas av förekomsten av mikroorganismer.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Buffertlösningar

Testet utförs med tre pH-värden: 4,0, 7,0 och 9,0.

I detta syfte kan buffertlösningar beredas med användning av kemikalier av reagenskvalitet och destillerat eller avjoniserat sterilt vatten. Några exempel på buffertsystem presenteras i tillägget.

Hydrolyshastigheten kan påverkas av det buffertsystemet som används. Om det finns tecken på detta skall ett alternativt buffertsystem användas. I hänvisning (2) rekommenderas användning av borat- eller acetatbuffertar i stället för fosfatbuffert.

Om buffertlösningarnas pH-värde vid testtemperaturen inte är känt kan det bestämmas med en kalibrerad pH-mätare vid den valda temperaturen med en noggrannhet på ± 0,1 pH-enheter.

1.6.1.2. Testlösningar

Testämnet skall upplösas i den valda bufferten och koncentrationen får inte överstiga 0,01 M eller halva mättnadskoncentrationen. Det lägsta av dessa värden skall användas.

Användning av organiska lösningsmedel som är blandbara med vatten rekommenderas endast för ämnen med låg vattenlöslighet.

Mängden lösningsmedel skall vara högst 1 % och lösningsmedlet får inte inverka på hydrolysprocessen.

1.6.2. *Apparatur*

Glasflaskor med propp skall användas, men fett får inte appliceras på den slipade ytan.

Om ämnet eller buffertsystemet är flyktigt, eller om testet görs vid förhöjda temperaturer, är förseglade eller membranförslutna rör att föredra och tomma utrymmen skall undvikas.

1.6.3. *Analysmetod*

Vilken analysmetod som skall användas beror på ämnets art. Metoden skall vara tillräckligt noggrann och sensitiv för att upptäcka en minskning på 10 % av den initiala koncentrationen.

Metoden skall vara specifik så att den medger bestämning av testämnet vid testlösningens koncentrationer och den kan gärna bestå av en kombination av lämpliga analystekniker.

1.6.4. *Testbetingelser*

Testet utförs i ett termostatreglerat avgränsat utrymme eller i ett bad med en konstant temperatur på ± 0,5°C av den valda temperaturen. Temperaturen skall hållas inom ± 0,1°C. Åtgärder skall vidtas för att undvika inverkan av fotolys.

Alla lämpliga försiktighetsåtgärder skall vidtas för att förhindra upplösning av syre (t.ex. genombubbling med kväve eller argon i fem minuter innan lösningen framställs).

1.6.5. *Testförfarande*

1.6.5.1. Förberedande test

För alla ämnen skall ett förberedande test utföras vid 50 ± 0,5°C med tre pH-värden: 4,0, 7,0 och 9,0. Tillräckligt antal mätningar skall göras för att uppskatta om halveringstiden ($t_{1/2}$) vid varje pH-värde och vid 50°C är mindre än 2,4 timmar eller om mindre än 10 % hydrolys observeras efter fem dagar. (Man kan uppskatta att dessa värden motsvarar halveringstider som är mindre än en dag respektive längre än ett år under betingelser som är mer representativa för miljön (25°C).

Om det förberedande testet visar att 50 % eller mer av testämnet vid vart och ett av de tre pH-värdena (4, 7 och 9) har hydrolyserats på 2,4 timmar vid 50°C, eller mindre än 10 % har hydrolyserats efter fem dagar behöver ytterligare test inte göras.

I andra fall och för enskilda pH-värden för vilka detta villkor inte har uppfyllts, utförs test 1.

1.6.5.2. Test 1

Test 1 utförs vid en temperatur, helst 50 ± 0,5°C, om det är möjligt, och under sterila betingelser vid de pH-värden för vilka det förberedande testet har visat att det är nödvändigt med ytterligare test.

Tillräckligt antal prov (minst fyra) skall väljas så att de täcker intervallet 20—70 % hydrolys för att undersöka om reaktionen vid de angivna pH-värdena är av *pseudo*-första ordningen.

Reaktionens ordning bestäms för varje pH-värde vid vilket test 1 utförs.

Hastighetskonstanten uppskattas vid 25°C.

Det fortsatta testförfarandet är beroende av om det vid test 1 kan fastställas att reaktionen är av *pseudo*-första ordningen.

Om det vid test 1 inte med säkerhet kan fastställas att reaktionen är av *pseudo*-första ordningen skall ytterligare test göras enligt anvisningarna för test 2.

Om det vid test 1 med säkerhet kan fastställas att reaktionen är av *pseudo*-första ordningen skall ytterligare test göras enligt anvisningarna för test 3. (Alternativt kan det under vissa omständigheter vara möjligt att beräkna hastighetskonstanter vid 25°C utifrån konstanter vid 50°C, vilka har beräknats på basis av resultaten från test 1 (se 3.2.).

1.6.5.3 Test 2

Detta test utförs för alla pH-värden för vilka resultaten från test 1 har visat att detta test är nödvändigt:

— antingen vid en temperatur under 40°C

— eller vid två temperaturer över 50°C med minst 10°C skillnad.

För varje pH-värde och temperatur vid vilka test 2 utförs skall minst sex lämpligt fördelade datapunkter bestämmas så att hydrolysgraden ligger i intervallet 20–70 %.

För ett pH-värde och en temperatur görs två bestämningar. Om test 2 görs vid två temperaturer över 50°C skall den andra bestämningen utföras vid den lägre av dessa två temperaturer.

För varje pH-värde och temperatur vid vilka test 2 utförs skall där så är möjligt halveringstiden (t_{12}) uppskattas genom en grafisk framställning.

1.6.5.4. Test 3

Detta test utförs för alla pH-värden för vilka resultaten från test 1 har visat att detta test är nödvändigt:

— antingen vid en temperatur under 40°C

— eller vid två temperaturer över 50°C med minst 10°C skillnad.

För varje pH-värde och temperatur vid vilka test 3 utförs skall tre datapunkter bestämmas, den första vid tid 0 och den andra och tredje när hydrolysgraden är högre än 30 %. Konstanten k_{obs} och $t_{1/2}$ skall beräknas.

2. DATA

För reaktioner av *pseudo*-första ordningen kan värdet för k_{obs} för varje pH-värde och varje testtemperatur erhållas från den grafiska framställningen av logaritmen av koncentrationen som en funktion av tiden med användning av uttrycket:

$$k_{obs} = \text{lutning} \times 2{,}303$$

Vidare kan $t_{1/2}$ beräknas enligt ekvation 6.

Uppskatta k_{25}°C genom att tillämpa Arrhenius ekvation, där så är möjligt.

För reaktioner som inte är av *pseudo*-första ordningen, se 3.1.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Specifikation av ämnet.

— Alla resultat som erhållits med referensämnen.

— Principer och detaljuppgifter för använd analysmetod.

— För varje test: temperatur, pH-värde, buffertsammansättning och en tabell över alla datapunkter avseende koncentration och tid.

— För reaktioner av *pseudo*-första ordningen: värdena för k_{obs} och $t_{1/2}$ och hur dessa har beräknats.

— För reaktioner som inte är av *pseudo*-första ordningen framställs resultaten grafiskt som logaritmer av koncentration som en funktion av tiden.

— Alla uppgifter och observationer som är nödvändiga för att tolka resultaten.

3.2. Tolkning av resultat

Det kan vara möjligt att beräkna acceptabla värden för testämnets hastighetskonstant (vid 25°C), förutsatt att det redan finns experimentella värden för aktiveringsenergin för ämnen som är homologa med testämnet och förutsatt att det är rimligt att anta att testämnets aktiveringsenergi är av samma storleksordning.

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 111*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 111*, Decision of the Council C(81) 30 final, reference 2.

Tillägg

BUFFERTBLANDNINGAR

A. CLARK OCH LUBS

De pH-värden som rapporteras i dessa tabeller har beräknas utifrån de potentiella mätningarna enligt Sörensens standardekvationer (1909). Det faktiska pH-värdet är 0,4 enheter högre än de angivna värdena.

Sammansättning	*pH-värde*
0,1 M kaliumhydrogenftalat + 0,1 N HCl vid 20°C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalat till 100 ml	3,8
0,1 M kaliumhydrogenftalat + 0,1 N NaOH vid 20°C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalat till 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalat till 100 ml	4,2
0,1 M monokaliumfosfat + 0,1 N NaOH vid 20°C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat till 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat till 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat till 100 ml	7,2
0,1 M H_3BO_3 i 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH vid 20°C	
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra till 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra till 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra till 100 ml	9,2

B. KOLTHOFF OCH VLEESHOUWER

Sammansättning	*pH-värde*
0,1 M monokaliumcitrat och 0,1 N NaOH vid 18°C (tillsätt små tymolkristaller eller ett par milligram kvicksilverjodider för att förebygga mögelbildning)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat till 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat till 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat till 100 ml	4,2

C. SÖRENSEN

0,05 M borax + 0,1 N HCL

Sammansättning		pH-värde			
Borax (ml)	HCl (ml)	Sörensen 18°C	Walbum		
			10°C	40°C	70°C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M borax + 0,1 N NaOH

Sammansättning		pH-värde			
Borax (ml)	NaOH (ml)	Sörensen 18°C	Walbum		
			10°C	40°C	70°C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12