II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS DIREKTIV

af 25. april 1984

om sjette tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlig stoffer

(84/449/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 67/548/EØF af 27. juni 1967 om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer (1), ændret for sjette gang ved Rådets direktiv 79/831/EØF) (2), navnlig artikel 19, 20 og 21, og

ud fra følgende betragtninger:

I artikel 3, stk. 1, i Rådets direktiv 79/831/EØF er det fastsat, at bestemmelsen af stoffernes og præparaternes fysisk-kemiske egenskaber, deres toksicitet og deres økotoksicitet foretages efter de metoder, der er fastlagt i bilag V;

i artikel 19 i direktiv 79/831/EØF af 18. september 1979 er det fastsat, at bilag V omfattes af fremgangsmåden for udvalget for tilpasning til den tekniske udvikling, og der bør navnlig tages hensyn til metoder, som internationale organisationer har anerkendt og eventuelt rettet henstillinger om;

bestemmelserne i dette direktiv er i overensstemmelse med udtalelse fra Udvalget for tilpasning til den tekniske udvikling af direktiverne om fjernelse af tekniske hindringer for samhandelen med farlige Stoffer og Præparater —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Teksten i bilag V til direktiv 67/548/EØF erstattes af teksten, der er anført i bilaget til dette direktiv.

Artikel 2

Medlemsstaterne vedtager og offentliggør inden den 1. juli 1985 de bestemmelser, der er nødvendige for at efterkomme dette direktiv, og underretter straks Kommissionen herom. De anvender disse bestemmelser senest fra den 1. juli 1986.

Artikel 3

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 25. april 1984.

På Kommissionens vegne

Karl-Heinz NARJES

Medlem af Kommissionen

(1) EFT nr. L 196 af 16. 8. 1967, s. 1.
(2) EFT nr. L 259 af 15. 10. 1979, s. 10.

BILAG

I bilaget anføres undersøgelsesmetoder til bestemmelse af fysisk-kemiske, toksikologiske og økotoksikologiske egenskaber, der er opregnet i bilag VII og i bilag VIII til direktiv 79/831/EØF.

Metoderne er baseret på sådanne, der er anerkendt og anbefalet af kompetente internationale organisationer (navnlig OECD).

Hvor der ikke har foreligget sådanne metoder, er der valgt nationale standardmetoder eller videnskabeligt anerkendte metoder. I almindelighed skal undersøgelserne foretages med stoffet, som det markedsføres. Man bør være opmærksom på, at urenheder kan påvirke undersøgelsesresultaterne.

Hvis metoderne i bilaget til direktiv 79/831/EØF ikke er anvendelige til undersøgelse af en given egenskab, skal anmelderen eftervise berettigelsen af, at en alternativ metode er anvendt.

Dyreforsøg og -undersøgelser skal udføres i overensstemmelse med de nationale bestemmelser og bør tage hensyn til humane principper og den internationale udvikling i spørgsmålet om dyrenes velbefindende.

Hvor undersøgelsesmetoder er ligeværdige, bør kun de metoder anvendes, som bruger det mindste antal forsøgsdyr.

INDHOLD

AFSNIT A:	Metoder til bestemmelse af fysisk-kemiske egenskaber	4
A. 1.	Smeltepunkt/smeltepunktsinterval	4
A. 2.	Kogepunkt/kogepunktsinterval	13
A. 3.	Relativ massefylde	20
A. 4.	Damptryk	25
A. 5.	Overfladespænding	37
A. 6.	Vandopløselighed	44
A. 7.	Fedtopløselighed	53
A. 8.	Fordelingskoefficient	57
A. 9.	Flammepunkt	61
A. 10.	Antændelighed (faste stoffer)	63
A. 11.	Antændelighed (gasser)	66
A. 12.	Antændelighed (stoffer og præparater, der i kontakt med vand eller fugtig luft udvikler let antændelige gasser i farlige mængder)	68
A. 13.	Antændelighed (faste stoffer og væsker)	72
A. 14.	Eksplosive egenskaber	74
A. 15.	Selvantændelighed (bestemmelse af selvantændelsestemperaturen for flygtige væsker og for gasser)	84
A. 16.	Selvantændelighed (faste stoffer — bestemmelse af relativ selvantændelsestemperatur)	86
A. 17.	Oxiderende egenskaber	89
AFSNIT B:	Metoder til bestemmelse af toksicitet	94
Generel indledning		
B. 1.	Akut toksicitet, oral indgift	96
B. 2.	Akut toksicitet, inhalation	99
B. 3.	Akut toksicitet, optagelse gennem huden	103
B. 4.	Akut toksicitet, hudirritation	106
B. 5.	Akut toksicitet, øjenirritation	109
B. 6.	Akut toksicitet, hudsensibilisering	113
B. 7.	Subakut toksicitet, oral indgift	118
B. 8.	Subakut toksicitet, inhalation	122
B. 9.	Subakut toksicitet, optagelse gennem huden	127
B. 10.	Andre virkninger, mutagenicitet — in vitro (cytogenisk test, pattedyrceller)	131
B. 11.	Andre virkninger, mutagenicitet — in vitro — cytogenisk test (knoglemarv fra pattedyr, kromosomanalyse)	134
B. 12.	Andre virkninger, mutagenicitet (mikronucleustest)	137
B. 13.	Andre virkninger, mutagenicitet — *Escherischia Coli,* tilbagemutationstest	140
B. 14.	Andre virkninger, mutagenicitet — *Salmonella Typhimurium,* tilbagemutationstest	143
AFSNIT C:	Metedor til bestemmelse af økotoksicitet	146
C. 1.	Akut toksicitet for fisk	146
C. 2.	Akut toksicitet for dafnier	155
C. 3.	Nedbrydning — biologisk nedbrydning: modificeret OECD screening test	160
C. 4.	Nedbrydning — biologisk nedbrydning modificeret ANFOR-test NF T 90/302	170
C. 5.	Nedbrydning — biologisk nedbrydning: modificeret Sturm-test	179
C. 6.	Nedbrydning — biologisk nedbrydning: Closed bottle test (langtids BOD-prøve)	188
C. 7.	Nedbrydning — biologisk nedbrydning: modificerede MITI-test	199
C. 8.	Nedbrydning — biokemisk oxygen-behov	212
C. 9.	Nedbrydning — kemisk oxygen-forbrug	214
C. 10.	Nedbrydning — abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH	216

AFSNIT A: METODER TIL BESTEMMELSE AF FYSISK-KEMISKE EGENSKABER

A.1. SMELTEPUNKT/ SMELTEPUNKTSINTERVAL

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD retningslinje for undersøgelse af kemikalier (1).

1.1. INDLEDNING

De beskrevne metoder og apparater kan anvendes til bestemmelse af smeltepunktet for kemiske stoffer uden renhedsbegrænsninger.

Valg af metode afhænger af arten af det stof, der skal undersøges.

Det er således afgørende, om stoffet let, vanskeligt eller slet ikke kan pulveriseres.

For nogle stoffer er bestemmelse af fryse- eller størkningspunkt mere hensigtsmæssigt, og standarder for disse bestemmelser er også optaget i retningslinjen.

1.2. Definitioner og enheder

Smeltepunktet defineres som den temperatur, ved hvilken faseovergangen fra fast til flydende tilstand finder sted ved normalt atmosfæretryk.

I det ideale tilfælde svarer denne temperatur til temperaturen ved størknings- eller frysepunktet.

Da faseovergangen for mange stoffer finder sted over et større temperaturinterval, beskrives den ofte som smeltepunktintervallet.

Enhedsomregning (K til °C):

$t = T - 273{,}15$ hvor t er °C. og T er K.

1.3. Referencestoffer

Det er ikke nødvendigt at anvende referencestoffer i alle tilfælde, når et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest anvendes til lejlighedsvist at korrigere metoden og til at muliggøre sammenligning af resultater, når en anden metode anvendes.

Nogle referencestoffer er angivet i referencerne (2).

1.4. Metodeprincip

Temperaturen (temperaturintervallet) for faseovergangen fra fast til flydende tilstand bestemmes. I praksis bestemmes temperaturen ved begyndende smeltning og ved endelig smeltning under opvarmning af en prøve af stoffet ved atmosfæretryk.

Tre typer metoder er beskrevet: kapillarmetoder, varmebordsmetoder og frysepunktsbestemmelser

1.4.1. *Kapillarmetoder*

1.4.1.1. Smeltepunktsapparater med væskebad.

En lille mængde af det findelte stof fyldes i et kapillarrør og pakkes tæt. Røret opvarmes sammen med et termometer, og temperaturforøgelsen indstilles til mindre end ca. 1 K/min under den egentlige smeltning. Temperaturen ved begyndende og endelig smeltning bestemmes.

1.4.1.2. Metalblok

Som beskrevet under 1.4.1.1 bortset fra, at kapillarrøret og termometret er anbragt i en opvarmet metalblok og kan iagttages gennem huller i blokken.

1.4.1.3. Bestemmelse med fotocelle.

Prøven i kapillarrøret opvarmes automatisk i en metalcylinder. En lysstråle sendes gennem stoffet via et hul i cylinderen og ind på en nøjagtigt indstillet fotocelle. De fleste stoffers optiske egenskaber ændres under smeltning fra at være ugennemsigtige til gennemsigtige. Lysintensiteten, som når fotocellen, øges herved, og der sendes et stopsignal til en digitalindikator, som viser temperaturen af et platinmodstands-termometer anbragt i varmekammeret. Denne metode kan ikke anvendes for visse stærkt farvede stoffer.

1.4.2. *Varmeborde*

1.4.2.1. Koflers varmebænk

Koflers varmebænk består af to elektrisk opvarmede metalstykker med forskellig varmeledningsevne og er udformet sådan, at dens temperaturgradient i længderetningen er næsten lineær. Varmebænken kan spænde over temperaturområdet fra 283 K til 543 K og er forsynet med en særlig anordning til temperaturaflæsning, som omfatter en skyder med en viser og en fane, der er særligt udformet til den enkelte bænk. Smeltepunktet bestemmes ved, at det pågældende stof lægges i et tyndt lag direkte på bænkens overflade, hvorefter der på få sekunder opstår en skarp skillelinje mellem flydende og fast fase. Temperaturen på skillelinjen aflæses ved at indstille viseren på denne.

1.4.2.2. Smeltemikroskop.

Adskillige varmeborde med mikroskop er i anvendelse til smeltepunktbestemmelser på meget små prøvemængder. I de fleste varmeborde måles temperaturen med **en termofø**ler, men undertiden anvendes også kviksølvtermometre. Et typisk smeltepunktsapparat bestående af varmebord med mikroskop er udstyret med et varmekammer indeholdende en metalplade, hvorpå prøven anbringes i en slæde. I midten af metalpladen er der et hul, hvorigennem der kan sendes lys fra mikroskopets belysningsspejl. Når apparatet er i brug, er kammeret lukket med en **glasplade for** at forhindre luftens adgang til arbejdsfeltet. Opvarmningen af prøven reguleres med en rheostat. Kræves meget nøjagtige målinger, kan der for optisk anisotrope stoffer anvendes polariseret lys.

1.4.2.3. Meniskmetoden

Denne metode anvendes kun for polyamider.

Der bestemmes den temperatur, ved hvilken forskydningen af en silikonoliemenisk, som er indesluttet mellem et varmebord og et dækglas hvilende på det undersøgte polyamid, iagttages visuelt.

1.4.3. *Metode til bestemmelse af frysepunkt*

Prøven fyldes i en særlig type reagensglas og anbringes i et apparat til bestemmelse af krystallisationspunktet. Prøven afkøles under konstant, svag omrøring, og temperaturen aflæses og noteres med 30 sekunders mellemrum. Når temperaturen er konstant ved flere aflæsninger, anføres denne temperatur (korrigeret for termometerfejl) som krystallisationspunktet.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Anvendelighed og nøjagtighed for de forskellige metoder til bestemmelse af smeltepunkt/smeltepunktsinterval er angivet i tabel 1.

TABEL: METODERNES ANVENDELIGHED

A. Kapillarmetoder

Målemetode	For stoffer, som kan pulveriseres	For stoffer, som ikke let pulveriseres	Temperatur område	Omtr. maksim. nøjagt. (1)	Bemærkninger
Smeltepunktsapparater med væskebad	ja	enkelte	273 K til 573 K	± 0,3 K	standard forefindes JIS K 0064
Smeltepunktsapparatur med metalblok	ja	enkelte	293 K til 573 K	± 0,5 K	standard forefindes ISO 1218 (E)
Bestemmelse med fotocelle	ja	adskillige, v.hj.a. særligt udstyr	253 K til 573 K	± 0,1 K	

(1) Afhængig af instrumenttype og prøvens renhed.

B. Varmeborde og frysemetoder

Målemetode	For stoffer, som kan pulveriseres	For stoffer, som ikke let pulveriseres	Temperatur område	Omtr. maksim. nøjagt. (1)	Bemærkninger
Koflers varmebænk	ja	nej	283 K til 533 K	± 1,0 K	standard forefindes ANSI/ASTM D 3451/76
Smeltemikroskop	ja	enkelte	273 K til 573 K (op til 1773 K)	± 0,2 K	standard forefindes DIN 53736
Mekanisk metode	nej	kun for polyamider	293 K til 573 K	± 0,5 K	standard forefindes ISO 1218 (E)
Frysepunktsmetoder	for væsker	for væsker	223 K til 573 K	± 0,5 K	standard forefindes f.eks. BS 4699

(1) Afhængig af instrumenttype og prøvens renhed.

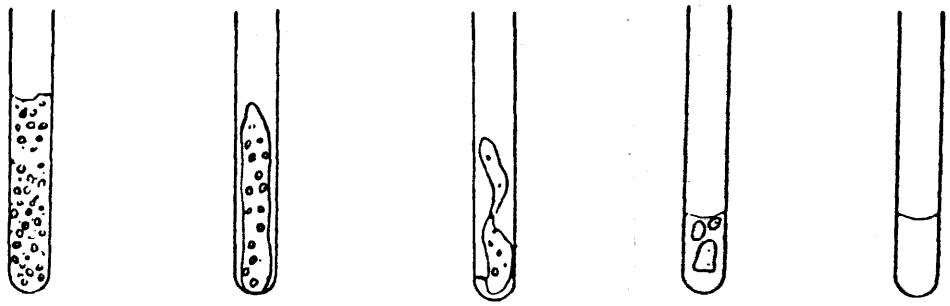
1.6. **Beskrivelse af metoderne**

Fremgangsmåden ved næsten alle undersøgelsesmetoderne er beskrevet i internationale og nationale standarder (se tillæg).

1.6.1. *Kapillarrørsmetoder*

Fint pulveriserede stoffer udviser ved langsom opvarmning sædvanligvis et smeltningsforløb som vist på fig. 1.

Figur 1



Trin A (betydenden smeltning, vådpunkt): Små dråber fordeler sig jævnt over kapillarrørets indervæg.

Trin B (indskrumpningspunkt): Der opstår et mellemrum mellem prøven og indervæggen som følge af prøvens indskrumpning under smeltning.

Trin C (sammensynkningspunkt): Den indskrumpne prøve begynder at synke ned mod bunden og blive flydende.

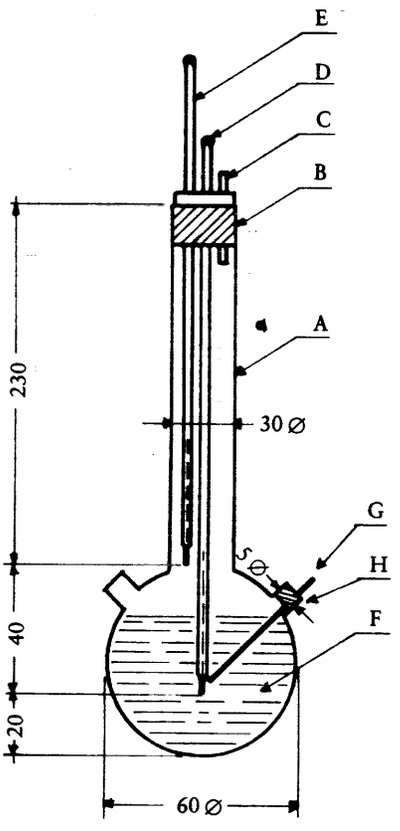
Trin D (flydepunkt): Der dannes en ubrudt væskeoverflade, men en væsentlig del af prøven udgøres stadig af fast stof.

Trin E (endelig smeltning): Der er ingen faste partikler. Under smeltepunktsbestemmelsen noteres temperaturerne ved begyndende og endelig smeltning.

1.6.1.1. Smeltepunktsapparater med væskebad.

Fig. 2 viser et eksempel på et standardiseret smeltepunktsapparat (JIS K 0064). Apparatet er fremstillet af glas, og alle mål er angivet i mm.

Figur 2



A: Undersøgelseskar
B: Korkprop
C: Udluftningshul
D: Termometer
E: Hjælpetermometer
F: Badvæske
G: Kapillarrør af glas;
længde: 80 til 100 mm
diameter: 1,0 ± 0,2 mm
vægtykkelse: 0,2 til 0,3 mm
H: Siderør

Badvæske: En passende væske vælges blandt de nedennævnte på baggrund af smeltepunktet. Flydende paraffin for smeltepunkter op til 473 K, konc. svovlsyre eller silikonolie for smeltepunkter op til 573 K. For smeltepunkter over 523 K kan anvendes en blanding af 3 dele svovlsyre og 2 dele kaliumsulfat (massedele).

Termometer

Man bør kun anvende termometre, som opfylder kravene i de følgende eller tilsvarende standarder: ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Fremgangsmåde

Det tørre stof pulveriseres fint i en morter og fyldes i kapillarrøret, som er lukket i den ene ende, således at fyldningshøjden er ca. 3 mm efter tæt pakning. For at opnå en ensartet pakket prøve lader man kapillarrøret falde fra en højde af ca. 700 mm gennem et lodret glasrør ned på et urglas. Det fyldte kapillarrør anbringes i badet, således et den midterste del af termometrets kviksølvkugle berører den del af kapilarrøret, hvor prøven befinder sig. Sædvanligvis anbringes kapillarrøret i apparatet, når badets temperatur er ca. 10 K under smeltepunktet.

Badvæsken opvarmes med en temperaturstigning på ca. 3 K/min under omrøring af væsken. Når temperaturen er ca. 10 K under det forventede smeltepunkt, indstilles temperaturstigningen til højst 1 K/min.

Beregning

Smeltepunktet beregnes således:

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

hvor:

T = korrigeret smeltepunktstemperatur (K),

T_D = temperaturaflæsning af termometer D (K),

T_E = temperaturaflæsning af termometer E (K),

n = antallet af gradinddelinger på den udestående del af termometer D's kviksølvsøjle.

1.6.1.2. Metalblok

Apparatet består af følgende:

— en cylindrisk metalblok, hvis øverste del er hul og danner et kammer (se figur 3),

— en metalprop med to eller flere huller som muliggør anbringelse af rør i metalklodsen,

— et opvarmningssystem for metalklodsen, f.eks. i form af en elektrisk modstand indbygget i blokken,

— en rheostat til regulering af energitilførslen (hvis der anvendes elektrisk opvarmning),

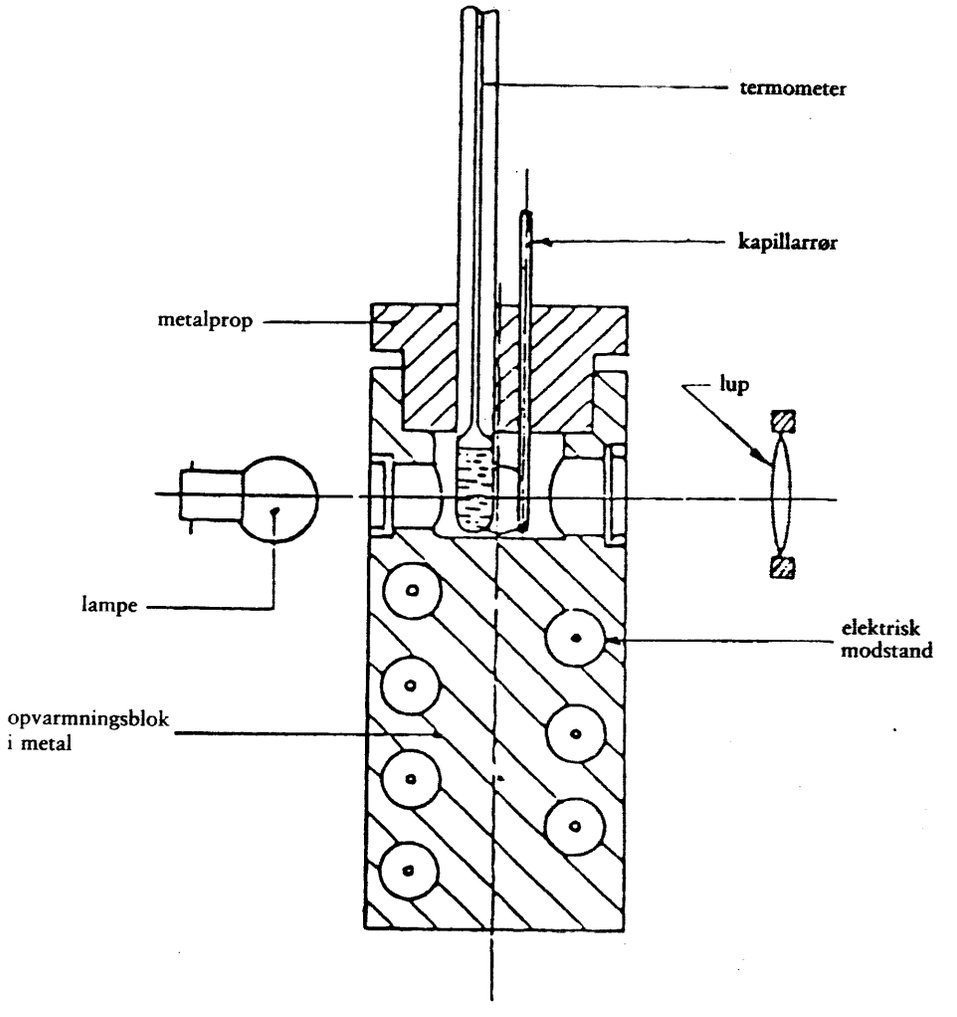
— fire vinduer af varmeresistent glas i kammerets sidevægge, anbragt diametralt og vinkelret på hinanden. Foran et af disse vinduer er anbragt en lup til iagttagelse af kapillarrøret. De tre andre vinduer tjener til belysning af indersiden af kammeret ved hjælp af lamper,

— et kapillarrør af varmeresistent glas lukket i den ene ende (se 1.6.1.1).

Termometer

Se standarderne i 1.6.1.1. Termoelektriske instrumenter med tilsvarende nøjagtighed kan også anvendes.

Figur 3



Fremgangsmåde

Se 1.6.1.1. Termometerkorrektion foretages ikke i dette tilfælde. Den aflæste temperatur angiver smeltepunktet.

1.6.1.3. Bestemmelse med fotocelle.

Apparat og fremgangsmåde.

Apparatet består af et metalkammer med et automatisk opvarmningssystem. Tre kapillarrør fyldes som i 1.6.1.1 og anbringes i ovnen.

Fem lineære temperaturforøgelser kan anvendes til korrektion af apparatet, og den egnede temperaturstigning indstilles elektrisk på en forudvalgt konstant og lineær hastighed. Skrivere viser den øjeblikkelige ovntemperatur og smeltepunktet af stoffet i kapillarrørene.

1.6.2. *Varmeborde*

1.6.2.1. Koflers varmebænk

Se tillæg

1.6.2.2. Smeltemikroskop

Se tillæg

1.6.2.3. Meniskmetode (for polyamider)

Se tillæg

Opvarmningshastigheden ved smeltepunktet skal være mindre end 1 K/min.

1.6.3. *Metoder til bestemmelse af frysepunkt*

Se tillæg

2. **DATA**

I visse tilfælde er termometerkorrektion nødvendig.

3. **RAPPORTERING**

Den anvendte metode skal anføres.

Det angivne smeltepunkt skal være gennemsnittet af mindst to bestemmelser, som ligger inden for den omtrentlige nøjagtighed (se tillæg). Der gives et skøn over nøjagtigheden. Hvis forskellen mellem temperaturen ved begyndende og endelig smeltning ligger inden for metodens nøjagtighed, angives temperaturen ved den endelige smeltning som smeltepunktet; i modsat fald angives begge temperaturer.

Nogle stoffer nedbrydes eller sublimerer, inden smeltepunktstemperaturen er nået, Hvis dette er tilfældet, skal det anføres.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand skal anføres.

4. **REFERENCER**

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

(2) IUPAC, Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, Pure and Applied Chemistry, Vol. 48, 1976, p. 505-515.

Tillæg

Til opnåelse af yderligere tekniske detaljer kan følgende standarder tjene som eksempler.

1. **Kapillarmetoder**

1.1. *Smeltepunktsapparater med væskebad*

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

1.2. *Smeltepunktsapparater med metalblok*

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.
ISO 1218 (E)	Plastics-Polyamides-Determination of »Melting Point«,

2. **Varmeborde**

2.1. *Koflers varmebænk*

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

2.2. *Smeltemikroskop*

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. *Meniskmetode (for 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	Resines de Polyamides Determination du »Point de Fusion«, Methode du menisque.

3. **Metoder til bestemmelse af frysepunkt**

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. KOGEPUNKT/KOGEPUNKTSINTERVAL

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD retningslinje for undersøgelse af kemikalier. (1)

1.1. Indledning

De her beskrevne metoder og instrumenter kan anvendes for alle væsker, forudsat at disse ikke reagerer kemisk under kogepunktet (f.eks. autooxidation), omlejring, nedbrydning o.l). Metoderne kan anvendes for alle væsker uden renhedsbegrænsninger.

Specielt bør den metode bemærkes, som benytter sig af bestemmelse med fotocelle, fordi såvel smelte- som kogepunkter kan bestemmes ved denne metode. Desuden kan disse målinger udføres automatisk.

Den dynamiske metode har den fordel, at den også kan benyttes til bestemmelse af damptryk, og det er ikke nødvendigt at korrigere kogepunktstemperaturen for afvigelser fra normaltrykket (101,325 kPa), fordi trykket kan reguleres under målingen. Denne metode er dog ikke på nuværende tidspunkt automatiseret.

Bemærkninger:

Urenheders indflydelse på bestemmelsen af kogepunktet afhænger i høj grad af urenhedens art. Effekten kan være betydelig, hvis et letflygtigt opløsningsmiddel er til stede i prøven.

Sammensætninger af den undersøgte prøve ændres fra måling til måling på grund af fordampning af lavtkogende komponenter. Under sådanne omstændigheder fås stadigt stigende værdier.

1.2. Definitioner og enheder

Standardkogepunktstemperaturen beskrives som den temperatur, hvorved en væskes mættede damptryk er det samme som standardtrykket.

Det målte kogepunkt afhænger af atmosfæretrykket. Denne afhængighed kan beskrives kvantitativt ved hjælp af Clausius-Clapeyrons ligning:

$$\log p = -\frac{\Delta H_v}{2{,}3 \cdot R \cdot T} + \text{konstant},$$

hvor:

p er væskens damptryk i Pa,

ΔH_v dets fordampningsvarme i $J \cdot mol^{-1}$,

R er den molære gaskonstant. $R = 8{,}31\ J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$,

Temperaturen T er i K.

Temperaturen ved kogepunktet (kogepunktstemperaturen) opgives i forhold til det aktuelle tryk under målingen.

Omregninger:

Tryk (enhed — kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(»bar«-enheden er stadig tilladt, men anbefales ikke)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr (enhederne mm Hg og Torr er ikke tilladt)

Temperatur (enhed – K)

t = T – 273,15

t er i °C og T er i K.

1.3. **Referencestoffer**

Det er ikke nødvendigt at anvende referencestoffer i alle tilfælde, når et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest anvendes til lejlighedsvist at korrigere metoden og til at muliggøre sammenligning af resultater.

Nogle referencestoffer kan findes under de metoder, som er angivet i tillæg.

1.4. **Metodeprincip**

Alle metoder til kogepunktsbestemmelse (kogepunktsinterval) er baseret på måling af den temperatur, hvorved prøven koger. Der er beskrevet fem metoder.

1.4.1. *Bestemmelse ved hjælp af ebulliometer*

Ebulliometre blev oprindeligt udviklet til molekylevægtsbestemmelser via kogepunktsforhøjelse, men de er også velegnede til nøjagtige kogepunktsbestemmelser. Et meget enkelt apparat er beskrevet i ASTM D 1120-72 (tillæg). I dette apparat opvarmes væsken under ligevægtsbetingelser ved atmosfæretryk indtil den koger.

1.4.2. *Dynamisk metode*

Ved denne metode måles dampenes fortætningstemperatur ved hjælp af en termoføler under kogning med tilbagesvaling. Trykket kan reguleres ved denne metode.

1.4.3. *Destillationsmetode til bestemmelse af kogepunkt og kogepunktsinterval.*

Ved denne metode destilleres væsken, og dampens fortætningstemperatur samt destillatmængden måles.

1.4.4. *Siwoloboff's metode*

En prøve opvarmes i et prøverør, som er nedsænket i et varmebad. Et tilsmeltet kapillarrør med en luftboble i den nederste ende er nedsænket i prøverøret.

Man bestemmer den temperatur, ved hvilken en jævn strøm af bobler undviger fra kapillarrøret eller den temperatur, ved hvilken boblerækken standser ved momentvis afkøling og væsken pludseligt stiger op i kapillarrøret.

1.4.5. *Bestemmelse med fotocelle*

Ved at følge Siwoloboff's princip kan der foretages automatisk fotoelektrisk måling ved hjælp af de opstigende bobler.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Anvendeligheden og nøjagtigheden af de forskellige metoder som anvendes til bestemmelse af kogepunkt/kogepunktsinterval, er opstillet i tabel 1.

1.6. **Beskrivelse af metoderne**

Fremgangsmåden ved nogle undersøgelsesmetoder er beskrevet i internationale og nationale standarder (se tillæg).

1.6.1. *Ebulliometer*

Se tillæg 1.

1.6.2. *Dynamisk metode*

Se undersøgelsesmetode A.4 til bestemmelse af damptryk.

Kogepunktstemperaturen, som iagttages ved et tryk på 101,325 kPa, noteres.

1.6.3. *Destillationsforløb (kogepunktsinterval)*

Se tillæg.

TABEL 1: SAMMENLIGNING AF METODERNE

Målemetode	Omtrentlig nøjagtighed	Bemærkninger
Ebulliometer	± 1,4 K (op til 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (over 373 K) (1) (2)	eksisterende standard ASTM D 1120-72 (1)
Dynamisk metode	± 0,5 K (2)	
Destillationsforløb (kogepunktsinterval)	± 0,5 K	eksisterende standard f.eks. ISO/R 918 DIN 53171 BS 4591/71
Siwoloboff's metode	± 1 til ± 2 K (2)	
Påvisning ved fotocelle	± 0,3 K (ved 373 K) (2)	

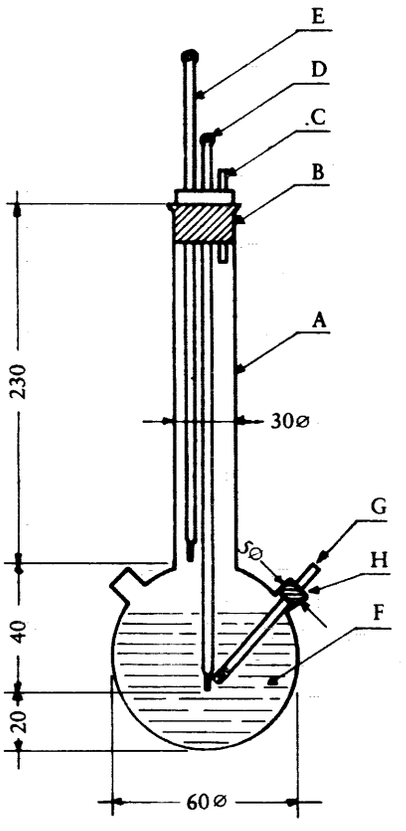
(1) Denne nøjagtighed gælder kun for det simple apparat, som er beskrevet f.eks. ASTM D 1120-72; den kan forbedres med mere raffinerede ebulliometre.
(2) Gælder kun for rene stoffer.

1.6.4. *Siwoloboff's metode*

Prøven opvarmes i et smeltepunktsapparat i et prøverør med en diameter på ca. 5 mm (figur 1).

Figur 1 viser en model af et standardiseret smelte- og kogepunktsapparat (JIS K 0064) (fremstillet af glas, alle mål i mm).

Figur 1

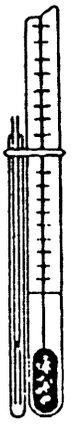


A: Målerør
B: Prop
C: Udluftning
D: Termometer
E: Hjælpetermometer
F: Væske i varmebadet
G: Prøverør; ydre diameter maks. 5 mm; kapillarrør længde ca. 100 mm; indre diameter ca. 1 mm og vægtykkelse ca. 0,2 til 0,3 mm
H: Siderør

Et kapillarrør, som er tilsmeltet ca. 1 cm over den nederste ende, anbringes i prøverøret. Prøven fyldes så højt op, at den tilsmeltede del af kapillarrøret befinder sig under væskeoverfladen. Prøverøret med kapillarrøret fastgøres til termometret med en elastik eller fastholdes støttet fra siden (se figur 2).

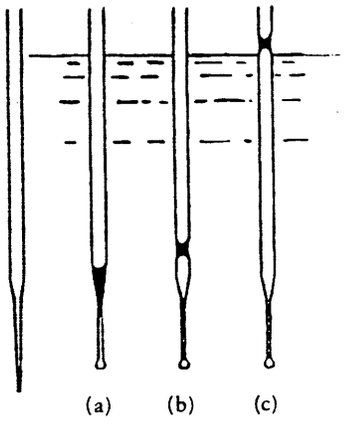
Figur 2

Siwoloboff's princip.



Figur 3

Modificeret princip.



Væsken til varmebadet vælges ud fra kogepunktet. Ved en temperatur op til 573 K kan svovlsyre eller silikoneolie bruges. Flydende paraffinolier kan kun anvendes op til 473 K. Opvarmningen af væsken i varmebadet må i begyndelsen indstilles, så temperaturforøgelsen er 3 K/min. Væsken i badet skal være under omrøring. Ca. 10 K under det forventede kogepunkt mindskes temperaturforøgelsen til under 1 K/min.

Når man nærmer sig kogepunktstemperaturen, begynder der at komme bobler fra kapillarrøret.

Kogepunktet er nået, når boblerækken standser ved momentvis afkøling, og væsken pludseligt begynder at stige op i kapillarrøret. Den hertil svarende termometeraflæsning er stoffets kogepunktstemperatur. I det modificerede princip (fig. 3) bestemmes kogepunktet i smeltepunktskapillaret. Det trækkes ud til en tynd tråd på ca. 2 cm's længde (a), og en lille prøvemængde suges op. Den åbne ende af det tynde kapillar tilsmeltes, således at der bliver en lille luftboble i enden. Ved opvarmning i smeltepunktsapparatet (b) udvider luftboblen sig, kogepunktet svarer til den temperatur, ved hvilken stofproppen når op til samme højde som væskeoverfladen i badet (c).

1.6.5. *Bestemmelse med fotocelle*

Prøven opvarmes i et kapillarrør i en opvarmet metalblok.

En lysstråle ledes via passende huller i blokken gennem stoffet mod en nøjagtig indstillet fotocelle.

Når prøvens temperatur forøges, kommer der enkelte bobler fra kogekapillaret. Når kogepunktstemperaturen nås, øges antallet af bobler voldsomt. Dette forårsager en intensitetsændring af det lys, som fotocellen modtager, og der gives et stopsignal til en indikator, som viser temperaturen af et platinmodstandstermometer i blokken.

Denne metode er særlig anvendelig, fordi den tillader bestemmelser under stuetemperatur ned til 253,15 K (– 20 °C) uden ændringer ved apparaturet; instrumentet skal blot anbringes i et kølerum eller et kuldebad. Den nøjagtige udførelse af kogepunktsbestemmelsen fremgår af instrumenthåndbogen.

2. DATA

Ved små afvigelser fra normaltryk (maks. ± 5 kPa) omregnes kogepunktstemperaturerne til T_n ved hjælp af følgende ligning af Sidney-Young:

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

Hvor

Δp = (101,325 – p) (bemærk fortegnet)

p = trykket målt i kPa

f_T = kogepunktets ændring med trykket i K/kPa

T = aflæst kogepunktstemperatur i K

T_n = kogepunktstemperatur i K, korrigeret til normaltryk.

Temperaturkorrektionsfaktorerne f_T og tilnærmede ligninger for disse er angivet i overnævnte internationale og nationale standarder for mange stoffer.

F.eks. nævner DIN 53171 følgende tilnærmede korrektioner for opløsningsmidler, som anvendes i maling.

Tabel 2 indeholder temperaturkorrektionsfaktorer for organiske opløsningsmidler (se ISO/DIS 4626).

TABEL 2: TEMPERATURKORREKTIONSFAKTORER (f_T)

temperatur T i K	korrektionsfaktor f_T i 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

Det skal anføres, hvilken metode der er anvendt. Det rapporterede kogepunkt er gennemsnittet af mindst 2 målinger, som ligger indenfor den usikkerhed der er angivet i tabel 1. Hvis bestemmelserne ikke er reproducerbare, bør andre metoder overvejes.

De målte kogepunkter og deres gennemsnit skal angives tillige med de tryk i kPa, hvorved disse målinger er foretaget. Trykket skal helst ligge tæt på normaltrykket. Hvor et stof koger over et temperaturinterval, skal dette interval opgives. For alle resultater skal der gives skøn over usikkerheden.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkningen af resultaterne skal anføres, især hvad angår urenheder og stoffets fysiske tilstand.

4. REFERENCER

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

Tillæg

For yderligere tekniske detaljer kan henvises til følgende standarder som eksempler:

1. **Ebulliometer**

ASTM D 1120-72	Standard Test Method for Boiling Point of Engine Antifreezes.

2. **Destillationsforløb (kogepunktsinterval)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range),
BS 4349/68	Method for the Determination of Distillation of Petroleum Products.
BS 4591/71	Method for the Determination of Distillation Characteristics.
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siederverlaufes.

A. 3. RELATIV MASSEFYLDE

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD retningslinje for undersøgelse af kemikalier (1).

1.1. Indledning

De beskrevne metoder til bestemmelse af relativ massefylde kan anvendes for faste stoffer og væsker uden renhedsbegrænsninger. De forskellige metoder, som kan anvendes, er anført i tabel 1.

1.2. Definitioner og enheder

Den relative massefylde (D_4^{20}) af faste stoffer og væsker er forholdet mellem massen af et rumfang af det undersøgte stof bestemt ved 20° C og massen af det samme rumfang vand bestemt ved 4° C. Den relative massefylde har ingen enhed.

Massefylden, (ρ), af et stof er dets masse, m, divideret med dets rumfang, v.
Massefylden opgives i kg/m^3 (SI-enheder).

1.3. Referencestoffer (1), (2)

Det er ikke nødvendigt at anvende referencestoffer i alle tilfælde, når et nyt stof undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest anvendes til lejlighedsvist at korrigere metoden og til at muliggøre sammenligning af resultater.

1.4. Metodeprincip

Der kan anvendes fire forskellige metoder.

1.4.1 *Opdriftsmetoder*

1.4.1.1. Arometer (for væsker)

Der kan opnås tilstrækkelig nøjagtige og hurtige massefyldebestemmelser med arometre. Ved hjælp af disse kan massefylden af en væske udledes af nedsænkningsdybden ved aflæsning på en skala.

1.4.1.2. Hydrostatisk vægt (for væsker og faste stoffer)

Forskellen mellem massen af en prøve i henholdsvis atmosfærisk luft og vand kan anvendes til at bestemme dens massefylde. For faste stoffer er den fundne massefylde kun repræsentativ for den bestemte prøve, som er anvendt til bestemmelsen. Til bestemmelse af væskers massefylde vejes et legeme med kendt rumfang, V, først i atmosfærisk luft og dernæst i væsken.

1.4.1.3. Metode med nedsænket kugle (for væsker) (3)

Ved denne metode bestemmes en væskes massefylde ud fra forskellen mellem resultaterne af vejning af væsken før og efter nedsænkning af en kugle med rumfang heri.

1.4.2. *Pyknometermetoder*

Pyknometre af forskellig udformning og med kendt rumfang kan anvendes for faste stoffer og væsker. Massefylden beregnes ud fra masseforskellen mellem det fulde og det tomme pyknometer og dets kendte rumfang.

1.4.3. *Luftsammenligningspyknometer* (for faste stoffer)

Massefylden af et fast stof i enhver form kan bestemmes ved stuetemperatur med et gassammenligningspyknometer. Rumfanget af en prøve af stoffet måles i atmosfærisk luft eller i en inaktiv luftart i en beholder med korrigeret rumfangsinddeling. Til beregning af massefylden foretages efter rumfangsbestemmelsen en bestemmelse af prøvens masse.

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

Massefylden af en væske kan bestemmes med et oscillerende densitometer. En mekanisk oscillator i form af et U-rør sættes i svingninger med en specifik frekvens, som afhænger af oscillatorens masse. Når der indføres en prøve, ændres oscillatorens resonansfrekvens. Apparatet skal indstilles ved hjælp af to væsker med kendte massefylder. Disse stoffer skal fortrinsvis vælges således, at deres massefylder spænder over det pågældende måleområde.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Anvendeligheden af de forskellige metoder, som anvendes til bestemmelse af den relative massefylde, er opstillet i tabel 1.

Den i ISO-standarden anførte nøjagtighed gælder kun for rene stoffer.

1.6. **Beskrivelse af metoderne**

Tillægget indeholder en liste over standarder, der kan tjene som eksempler, og hvorfra yderligere tekniske detaljer kan hentes.

Målingerne skal udføres ved 20° C, og der foretages mindst to bestemmelser.

2. **DATA**

Se standarderne.

3. **RAPPORTERING**

Den anvendte metode i standard skal angives. Den relative massefylde D_4^{20} angives som defineret i 1.2 tillige med den fysiske tilstand af det undersøgte stof, den anvendte metode og referencestoffet.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand skal anføres.

Der skal redegøres for den anvendte metode/standard og mulige afvigelser herfra.

TABEL 1: METODERNES ANVENDELIGHED

Målemetode	Massefylde		Maksimale dynamiske viskositet	Bemærkninger
	fast stof	væske		
1.4.1.1. Arometer		×	5 Pa s	ISO 387 ISO/R 649
1.4.1.2. Hydrostatisk				
a) Faste stoffer	×			ISO/R 1185 (A)
b) Væsker		×	5 Pa s	ISO/R 91 og R 758
1.4.1.3. Metode med nedsænket kugle		×	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pyknometer				ISO/R 3507
a) Faste stoffer	×			ISO/R 1183 (B)
b) Væsker		×	500 Pa s	ISO/R 758
1.4.3. Luftsammenligningspyknometer	×			DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
1.4.4. Oscillerende densitometer		×	5 Pa s	

4. REFERENCER

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

(2) IUPAC, Recommended reference materials for realisation of Physico-chemical Properties. — Pure and Applied Chemistry, Vol. 48, 1976, p. 508.

(3) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, vol. 11, 1979, 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.

Tillæg

Til opnåelse af yderligere tekniske detaljer kan følgende standarder tjene som eksempler.

1. **Opdriftsmetoder**

1.1. *Arometer*

DIN 12790 Hydrometer; general instructions.

ISO 387.

DIN 12791 Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use
Part II: Density hydrometers; standardised sizes, designation.

ISO/R 649.

DIN 12793 Laboratory glassware: range find hydrometers.

1.2. *Hydrostatisk vægt*

For faste stoffer:

ISO/R 1183 Method, A, Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics.

ASTM-D-792 Specific Gravity and Density of Plastics by Displacement.

DIN 53479 Testing of plastics and elastomers; determination of density.

For væsker:

ISO/R 91, ISO/R 758.

DIN 51757 Testing of mineral oils and related materials; determination of density.

ASTM D 941-55, ASTM D 129-67 og 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 Titel: samme som ASTM D 1298.

1.3. *Metode med nedsænket kugle*

DIN 5317 Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer (Tilføjelse vedrørende metode med **nedsænket kugle** vil blive udgivet i 1981).

2. **Pyknometermetoder**

2.1. *For væsker*

ISO 3507 Pycnometers.

ISO/R 758 Liquid chemical products; determination of density at 20° C.

DIN 12797 Gay-Lussac pyknometer (for ikke-flygtige væsker, som ikke er for tyktflydende).

DIN 12798 Lipkin pyknometer (for væsker med kinematisk viskositet under $100.10^{-6}m^2s^{-1}$ ved 15° C).

DIN 12800	Sprengel pyknometer (for væsker, som i DIN 12798).
DIN 12801	Reischauer pyknometer (for væsker med kinematisk viskositet under $100.10^{-6}m^2s^{-1}$ ved 20° C; desuden særligt egnet til kulbrinter og vandige opløsninger samt væsker med højere damptryk, ca. 1 bar ved 90° C).
DIN 12806	Hubbard pyknometer (for alle tyktflydende væsker, som ikke har for højt damptryk, specielt også for malinger, lakker og asfalt).
DIN 12807	Bingham pyknometer (for væsker, som i DIN 12801).
DIN 12808	Jaulmes, pyknometer (hovedsagelig for ethanol/vandblandinger).
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for væsker, som ikke er for tyktflydende).
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer.
DIN 51757	Point 7; Testing of mineral oils and related materials; determination of density.
ASTM D 297	Section 15; Rubber Products-Chemical Analysis.
ASTM D 2111	Method C; Halogenated organic compounds.
BS 4699	Method for Determination of Specific Gravity and Density of Petroleum Products (Graduated Bicapillary Pycnometer Method).
BS 5903	Method for Determination of Relative Density and Density of Petroleum Products by the Capillary-Stoppered Pycnometer Method.

2.2. *For faste stoffer*

ISO/R 1183	Method for Determining the Density and Relative Density of Plastics excluding Cellular Plastics.
DIN 19683	Determination of the Density of Soils.

3. **Luftsammenligningspyknometer**

DIN 55990	Teil 3 Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte.
DIN 53243	Anstrichstoffe; chlorhaltige Polymere; prüfung.

A. 4. DAMPTRYK

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD retningslinie for undersøgelse af kemikalier (1).

1.1. Inledning

Det er værdifuldt at have forhåndskundskab til stoffets struktur smeltepunkt og kogepunkt for at udføre denne prøvning.

Der findes ikke en enkelt metode, som er anvendelig i hele damptryksområdet. Derfor anbefales flere metoder til anvendelse ved måling af damptryk fra $< 10^{-3}$ Pa til 10^5 Pa.

Urenheder vil normalt påvirke damptrykket. Urenhedens indflydelse på målingen af damptrykket afhænger stærkt af urenhedens art. Påvirkningen kan være betydelig, hvis der er stærkt flygtigt opløsningsmiddel i prøven.

1.2. Definitioner og enheder

Et stofs damptryk defineres som mætningstrykket over et fast eller flydende stof. Ved den termodynamiske ligevægt er damptrykket af et rent stof alene en funktion af temperaturen.

Den SI-enhed for tryk, som bør anvendes er Pascal (Newton/m^2).

Enheder, som har været anvendt tidligere sammen med deres omregningsfaktorer, er:

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

1 atmosfære (fysisk atm) = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 atmosfære (teknisk at) = $9{,}81 \times 10^4$ Pa

1 bar = 10^5 Pa

SI-enheden for temperaturen er Kelvingrader (K).

1.3. Referencematerialer

Det er ikke nødvendigt at anvende referencematerialer i alle tilfælde ved undersøgelsen af et nyt stof. De skal fortrinsvis tjene til at kontrollere metodens ydeevne fra tid til anden og for at give mulighed for at sammenligne resultater, opnået ved andre metoder.

1.4. Prøvningsmetodens principper

Der foreslås fem metoder til bestemmelse af damptryk, som kan bruges i forskellige damptryksområder. Ved hver metode bestemmes damptrykket ved forskellige temperaturer. I et begrænset temperaturområde er logaritmen til et damptryk af et rent stof en lineær funktion af den reciprokke værdi af temperaturen.

1.4.1. *Dynamisk metode*

Ved den dynamiske metode måles kogetemperaturen, der svarer til et specificeret tryk.

Anbefalet område:

10^3 Pa op til 10^5 Pa, mellem 20° C og 100° C. Denne metode er også anbefalet til kogepunktsbestemmelse og kan anvendes til dette formål op til 350° C.

1.4.2. *Statisk metode*

Ved den statiske proces, ved termodynamisk ligevægt, bestemmes det damptryk, der dannes i et lukket system ved en specificeret temperatur.

Denne metode er egnet for en- og flerkomponent faste stoffer og væsker.

Anbefalet område:

10 Pa op til 10^5 Pa, mellem 0° C og 100° C.

1.4.3. *Isoteniskop*

Denne standardiserede metode er også en statisk metode, men den er normalt ikke anvendelig til flerkomponentsystemer. Yderligere information kan fås i ASTM metode D-2879-75.

Anbefalet område:

Fra 100 Pa til 10^5 Pa mellem 0° C og 100° C.

1.4.4. *Damptryksvægt*

Den stofmængde, der forlader en celle pr. tidsenhed gennem en åbning af kendt størrelse bestemmes under vakuum, således at den mængde stof, der vender tilbage til cellen, er ubetydelig (f. eks. ved måling af den impuls, som en dampstråle fremkalder på en følsom vægt eller ved at måle vægttabet).

Anbefalet område:

10^{-3} Pa til 1 Pa, mellem 0° C og 100° C.

1.4.5. *Gasmætningsmetode*

En strøm af inaktiv bæregas føres hen over stoffet på en sådan måde, at den mættes med dets dampe, og dampene opsamles derefter i en passende fælde. Måling af den mængde materiale, der transporteres med en kendt mængde bæregas, bruges til beregning af damptrykket ved en given temperatur.

Anbefalet område:

Op til 1 Pa.

1.5. **Kvalitetskriterier**

De forskellige metoder til bestemmelse af damptrykket er sammenlignet med hensyn til anvendelse, repeterbarhed, reproducerbarhed, måleområde, eksisterende standard. Dette er gjort i tabellen.

TABEL: KVALITETSKRITERIER

Målemetode	Stoffer		Skønnet repeterbarhed (1)	Skønnet reproducerbarhed (1)	Anbefalet område	Eksisterende Standard
	Faste	Væsker				
1.4.1. Dynamisk metode		×	Op til 25 %	Op til 25 %	10^3 Pa til $2 \cdot 10^3$ Pa	—
			1— 5 %	1— 5 %	$2 \cdot 10^3$ Pa til 10^5 Pa	—
1.4.2. Statisk metode	×	×	5—10 %	5—10 %	10 Pa til 10^5 Pa	—
1.4.3. Isoteniskop	×	×	5—10 %	5—10 %	10^2 Pa til 10^5 Pa	ASTM-D 2879-75
1.4.4. Damptryksvægt	×	×	5—20 %	Op til 50 %	10^{-3} Pa til 1 Pa	—
1.4.5. Gasmætningsmetode	×	×	10—30 %	Op til 50 %	< 10^{-3} Pa op til 1 Pa	—

(1) Afhængig af renhedsgraden.

1.6. **Metodebeskrivelse**

1.6.1. *Dynamisk måling*

1.6.1.1. Apparatur

Måleinstrumentet består typisk af en kogebeholder med tilsluttet køler fremstillet af glas eller metal (figur 1), udstyr til regulering og måling af temperaturen og udstyr til regulering og måling af trykket. Et typisk måleudstyr, vist på skitsen, fremstilles af varmefast glas og består af fem dele:

Et stort, delvis dobbeltvægget rør bestående af en slibsamling, en køler, en kølebeholder og et indløb.

Glascylinderen med en Cottrell-pumpe monteres på rørets kogesektion og har en ru overflade for at undgå stødkogning.

Temperaturen måles ved anvendelse af et termoelement eller et modstandstermometer, som indesluttes i en lille smule olie. Det indsættes i prøverøret, som har udvendige slib og er forseglet på bunden.

Krydsstykket udgør de nødvendige forbindelser til udstyret til regulering og måling af trykket.

Bulben, som fungerer som stødpudevolumen, forbindes med måleudstyret ved hjælp af et kapillarrør.

Et varmeelement, som indsættes udvendig i glasapparatet nedefra bruges til opvarmning af kogebeholderen. Den ønskede opvarmningsstrøm indstilles ved hjælp af en spændingsregulerende transformer, og registreres ved hjælp af et amperemeter.

En oliepumpe bruges til at indstille det ønskede vakuum mellem 10^2 Pa og rundt regnet 10^5 Pa.

En nitrogentrykflaske bruges til at indstille det ønskede tryk og forbindes via en ventil, som også bruges til udluftning af apparatet.

Et præcisionsmanometer, som er tilsluttet krydsstykket, bruges til trykmålingen.

1.6.1.2. Fremgangsmåde ved målingen

Damptrykket måles ved at bestemme prøvens kogepunkt ved forskellige specificerende tryk mellem rundt regnet 10^3 Pa og 10^5 Pa. En ikke-stigende temperatur ved konstant tryk viser, at kogepunktet (ligevægtskogepunktet, hvis det er en blanding) er nået. Skummende stoffer kan ikke måles ved denne metode.

Før målingen skal alle glasdele rengøres og tørres omhyggeligt og derefter evakueres under gasballast. Derefter indføres stoffet i apparatet. Hvis faste stoffer ikke er pulverformige, kan der opstå problemer under påfyldningen, men disse kan undgås ved at opvarme kølevandskappen. Efter påfyldning, samles apparatet og stoffet afgasses. Derpå indstilles på det laveste af de ønskede tryk, og opvarmningssystemet tændes. Samtidig forbindes termoelementet eller modstandstermometret til en skriver. Der er nået ligevægt, når der aflæses en konstant kogetemperatur ved et givet tryk. Når dette ligevægtspunkt er registreret, sættes et højere tryk. Der fortsættes på denne måde, indtil 10^5 Pa er nået (i alt omkring 5 til 10 målepunkter). Som kontrol skal ligevægtspunkterne gentages ved aftagende tryk.

1.6.2. *Statisk måling*

1.6.2.1. Apparatur

Et typisk måleudstyr (figur 2) omfatter såvel et opvarmnings- og et kølesystem, bestående af glas og metal, til at bibringe prøven en reguleret temperatur, som et udstyr til fastsættelse og måling af trykket og temperaturen.

Prøvekammeret har på den ene side en højvakuumventil af rustfast stål, og på den anden side et rør indeholdende en passende manometervæske, rørets anden ende forbindes med et krydsstykke, hvis ene gren føres til en vakuumpumpe, den anden til nitrogentrykflasken og den tredje til trykmåleren.

For at bibringe stoffet en reguleret temperatur, placeres hele prøvekammeret, inklusive ventilklodsen og en tilstrækkelig stor del af røret (af praktiske grunde op til ventilklodsens højde) i et egnet termostatbad. Temperaturen måles med et termoelement eller et modstandstermometer meget tæt på prøvekammerets yderside, den kan registreres løbende.

Flydende nitrogen eller tøris-alkohol blanding er velegnet til kraftig afkøling af prøven. Til måling ved lave temperaturer bruges en ultrakryostat.

Der benyttes en passende pumpe til at evakuere apparatet til det krævende tryk.

Et stofs damptryk måles normalt indirekte via en nul-indikator. Denne nul-indikator kan være et rør indeholdende en væske, som specificeret nedenfor, eller blandt andre et differens trykmanometer. Damptrykket flytter væsken i røret ud af ligevægt i en termostat. Nitrogen ledes nu ind i apparatet fra en tilsluttet nitrogen-trykflaske via en ventil for at kompensere for damptrykkets virkning og bringe trykmåleren tilbage til nul. Det hertil krævede nitrogentryk aflæses på en præcisionstrykmåler, som befinder sig ved stuetemperatur, og svarer til stoffets damptryk ved den tilsvarende konstante temperatur. Forskellige væsker som kviksølv, silikonolie, phthalater, kan afhængigt af trykområdet og stoffets kemiske adfærd, bruges som væske i røret til nul-ligevægtsstilling.

Kviksølv kan bruges fra atmosfæretryk ned til 10^2 Pa, silikonolier og phthanalater også under 10^2 Pa ned til 10 Pa; membranmanometeret kan endog anvendes under 10^{-1} Pa.

1.6.2.2. Fremgangsmåde ved målingen

Før målingen renses alle dele af det på figur 2 viste apparat omhyggeligt med opløsningsmidler og tørres derpå i vakuum. U-røret fyldes derpå med den ønskede væske, som bør afgasses ved forhøjet temperatur før påfyldningen.

Efter at stoffet er fyldt i apparatet, samles dette og prøvekammeret underafkøles passende. Derefter pumpes den indesluttede luft ud af apparatet i flere minutter med ventilen over prøvekammeret stående åben. Derefter lukkes ventilen over stoffet. Prøven bibringes den valgte temperatur og herunder iagttages den deraf følgende forskydning af søjlerne, og der kompenseres om nødvendigt til nul-stilling med kvælstof, indtil konstant temperatur er opnået. Derefter afkøles prøvekammeret igen. Hvis der observeres et resstryk i den underafkølede tilstand, skyldes dette enten at luft, indeholdt i prøven, kan frigøres ved opvarmningen, og kan trækkes ud, eller at køletemperaturen ikke er tilstrækkeligt lav. Der må da benyttes flydende nitrogen som kølemiddel.

Efter at prøven er blevet tilstrækkeligt afgasset, bestemmes damptrykkets afhængighed af temperaturen med tilstrækkelig små temperatur intervaller.

1.6.3. *Isoteniskop*

En fuldstændig beskrivelse af denne metode findes i (2). Måleudstyrets princip ses på figur 3. I lighed med den under 1.6.2 beskrevne statiske metode er isoteniskopet egnet til undersøgelse af faste stoffer og væsker.

I tilfælde af væsker tjener stoffet selv som væske i hjælpemanometret. I tilfælde af faste stoffer anvendes, afhængigt af tryk- og temperaturområdet, de i 1.6.2 oplistede manometervæsker. For væsker fyldes kuglen i isoteniskopet med det stof, som skal undersøges, det afgasses ved kogning ved forhøjet temperatur.

Samtidig destilleres en del af væsken ud af kuglen og kondenseres i den øverste afkølede kugle og vender tilbage til røret. Når dette er tilstrækkelig fyldt med afgasset væske, bringes den underste kugle med røret i en termostat op på den valgte temperatur og det resulterende damptryk måles indirekte på nøjagtig samme måde som ved den i 1.6.2 beskrevne metode.

I tilfælde af faste stoffer påfyldes den afgassede manometervæske gennem udbulingen på isoteniskopets lange arm. Derpå fyldes det faste stof, der skal undersøges, ind i den nederste kugle og afgasses ved forhøjet temperatur. Derefter hældes isoteniskopet således, at manometervæsken kan fyldes ind i røret. Måling af damptrykket som funktion af temperaturen foretages i henhold til 1.6.2.

1.6.4. *Damptryksvægt*

1.6.4.1. Apparatur

Der er beskrevet forskellige apparaturudformninger i litteraturen (1). Den her beskrevne illustrerer det anvendte princip. Et antal dele er vist på figur 4. Disse er grundplade og glasklokke, en pumpe med en vakuummåler og udstyr til måling af damptrykket ved viserudslag. Følgende indbygget udstyr er monteret på grundpladen.

— En fordampningsovn med flange og rotationsfødning. Fordampningsovnen er et fladt, cylinderisk kobberkar (ovnen kan også være af glas omgivet af en kobbervæg). Den sidder i en kobberholder, som er skruet på et stykke rustfrit stål ved dens nedre udragende kant. Det rustfri stålstykke er igen monteret på grundpladen ved hjælp af en flange, således at det kan roteres omkring ovnens akse. Opvarmningen tilvejebringes ved hjælp af en varmevikling, der sidder indvendigt i det rustfrie stålstykke, og således er adskilt fra vakuumkammeret.

— Ovnlåget er fremstillet af kobber, og har tre fordampningsåbninger med forskelligt tværsnit, som er forskudt 90° i forhold til hinanden. Ved drejning af ovnen kan en ønsket ovnåbning eller en mellemstilling placeres under spalten i køleren, som er placeret ekscentrisk i forhold til ovnen, således at molekylstrålen rettes mod vægtskålen eller afbøjes. Et termoelement eller modstandstermometer er monteret i ovnvæggen til temperaturmåling.

— Vægten er et drejespoleinstrument. Viseren er erstattet med et lille rør, som vægtbjælken og modvægt er monteret på. Vægtbjælken har en udskiftelig vægtskål fremstillet af et tyndt stykke guldplateret aluminium. En 0,1 mm tyk konstartantråd, hvorpå der kan anbringes justeringsvægte, er fastgjort til vægtbjælkens omtrentlige center. Damptrykket kan registreres ved anvendelse af et fotoelektrisk nulpunktsinstrument.

— En cylinderisk messingbeholder omgiver vægtskålen til alle sider med undtagelse af de to spalter for vægtbjælkens bevægelse og en snæver åbning til indføring af molekylstrålen. Varmeafgivelse til omgivelserne tilvejebringes med en kobberstang, på messingbeholderens top, og føres via et rustfrit stålrør, som går gennem grundpladen og er varmeisoleret fra denne. Kobberstangen neddyppes i en Dewarflaske, som indeholder flydende nitrogen, under grundpladen.

1.6.4.2. Målemetode

Kobberovnen fyldes med stoffet, låget lukkes og pladeåbningen, afskærmningen og køleren føres ned over ovnen. Klokken monteres, og vakuumpumperne startes. Sluttrykket før målingen begyndes, er ca. 10^{-4} Pa. Fra 10^{-2} Pa og nedefter startes kølingen af køleboksen.

Efter et tidsrum vil vægten have nået en tilstrækkelig lav temperatur, således at den udslippende dampstråle kan kondensere på vægtsålen. Denne kondensation frembringer et signal på den tilsluttede skriver. Signalet kan bruges på to måder: med det specielle apparat, der beskrives her, bestemmes damptrykket direkte fra trykket på vægtskålen (molekylvægten kræves ikke). Samtidig bestemmes den kondenserede masse, og fordampningshastigheden kan derfor beregnes ud fra deponeringstiden. Dette gælder for mere generelle apparater. Damptrykket kan også beregnes ud fra fordampningshastigheden og molekylvægten under anvendelse af Herz' ligning.

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

hvor

G = fordampningshastighed (kg/sm²),
M = molekylvægt (g/mol),
T = temperatur (K),
R = gaskonstant (J/molK),
P = damptryk (Pa).

Efter at det nødvendige vakuum er nået, begyndes målerækken startende ved den laveste af de ønskede måletemperaturer. Den nødvendige åbning åbnes og dampstrålen passerer afskærmningen, som er direkte monteret over dækslet, og rammer derpå den afkølede vægtskål. Vægtskålen er dimensioneret således, at hele strålen opsamles i dens cosinusformede fordeling. Dampstrålens moment fremkalder en kraft på vægtskålen, hvor kondensationen sker på dens afkølede overflade. Som følge af dampstrålens kraft vil vægtbjælken afvige fra ligevægtstilstanden. Vægtbjælkens ende har en lille tap, som registreres optisk via et prismesystem og to fotodioder. Et tilsluttet reguleringskredsløb regulerer og tilbagestiller momentant vægtbjælken til den balancerede stilling. Det nødvendige vridningsmoment registreres og svarer efter en kontrolvejning til stoffets damptryk.

Til yderligere målinger hæves temperaturen med små intervaller indtil den højest ønskede temperaturværdi er nået. Derefter køles prøven igen og der kan registreres en anden kurve for damptrykket. De to målerækker vil kun være reproducerbare, hvis den målte prøve er tilstrækkelig ren. Hvis den tredje forsøgsrække ikke bekræfter resultaterne fra den anden række, er det sandsynligt, at stoffet sønderdeles i det målte temperaturområde.

1.6.5. *Gasmætningsmetode*

1.6.5.1. Apparatur

Et typisk apparatur omfatter en række komponenter, som er vist på figur 5 og beskrevet i det følgende (1).

Inaktiv gas

Bære-gassen må ikke reagere kemisk med prøvestoffet. Det er normalt tilstrækkeligt at anvende nitrogen til dette formål, men lejlighedsvis kan der kræves andre gasser. Den anvendte gas skal være tør (se figur 5 (4): Føler. Relativ fugtighed).

Strømningsregulering

Der kræves et velegnet gasreguleringssystem for at sikre en konstant og valgbar strømhastighed gennem mætningskolonnen.

Fælder til opsamling af damp

Disse afhænger af den aktuelle prøves egenskaber og af den valgte analysemetode. Dampen bør indfanges kvantitativt og i en form, som tillader efterfølgende analyse. Til visse stoffer vil fælder, som indeholder væsker som hexan eller ethylenglycol, være velegnede. Til andre vil der kunne anvendes faste absorptionsmidler.

Varmeveksler

Til målinger ved forskellige temperaturer kan det være nødvendigt at tilføje en varmeveksler i opstillingen.

Mætningskolonne

Stoffet coates i opløsning på et egnet inaktivt bæremateriale. Det coatede bæremateriale pakkes i mætningskolonnen, hvis dimensioner samt strømningshastigheden skal være således, at en fuldstændig mætning af bære-gassen sikres. Mætningskolonnen skal være termostateret. For målinger ved temperaturer over 20° C skal stykket mellem mætningskolonnen og fælderne være opvarmet for at undgå kondensation af stoffet.

1.6.5.2. Målemetode

Klargøring af mætningskolonnen

En opløsning af prøven i et meget letflygtigt opløsningsmiddel sættes til en passende mængde af bærematerialet. Der skal tilsættes tilstrækkeligt med prøve til opretholdelse af mætning under hele prøvningens varighed. Opløsningsmidlet afdampes fuldstændigt i luft eller i en rotationsfordamper, og det omhyggeligt blandede materiale tilføres mætningskolonnen. Efter at prøven er blevet termostateret, ledes tør nitrogen gennem apparatet.

Måling

Fælderne forbindes med kolonnesystemet, og tiden registreres. Strømningshastigheden kontrolleres i begyndelsen og med regelmæssige mellemrum under forsøget ved anvendelse af en boblemåler (eller kontinuerligt med en massestrømningsmåler).

Trykket ved tilledningen til mætningskolonnen skal måles. Dette kan gøres enten:

a) ved at indsætte en trykmåler mellem mætningskolonnen og fælderne (dette på grund af forøget dødvolumen og adsorberende overflade);

eller

b) ved at bestemme tryktabene over det aktuelt anvendte system af fælder som funktion af strømningshastigheden ved et separat forsøg (kan være lidet tilfredtillende for væskefælder).

Den tid, der kræves, til opsamling af den mængde prøvestof, som er nødvendig for de forskellige analysemetoder, bestemmes ved et forhåndsforsøg eller ved skøn. Før beregning af damptrykket ved en given temperatur skal der udføres forhåndsforsøg til bestemmelse af den maksimale strømningshastighed, som mætter bære-gassen fuldstændigt med stofdampe. Dett sikres, hvis bære-gassen føres langsomt nok gennem mætningskolonnen til, at en endnu lavere hastighed ikke giver et større beregnet damptryk.

Den specifikke analysemetode vil være bestemt af arten af det stof, der prøves (f.eks. gaschromatografi eller gravimetri).

Stofmængden, som transporteres med et kendt volumen bæregas, bestemmes.

1.6.5.3. Beregning af damptryk

Damptrykket beregnes ud fra dampens massefylde W/V, efter ligningen:

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

hvor:

P = damptryk (PA),
W = masse af adsorberet prøvestof (g),
V = rumfang mættet gas (m^3),
R = gaskonstant (J/mol·K),
T = temperatur (K),
M = molekylvægt (g/mol).

De målte rumfang skal korrigeres for tryk- og temperaturforskelle mellem strømningsmåleren og den termostaterede mætningskolonne. Hvis strømningsmåleren, i strømforløbet er placeret efter dampfælden, kan det være nødvendigt at foretage korrektioner, der tager hensyn til eventuelle fordampede bestanddele fra fældesystemet (1).

2. DATA

Damptrykket bestemt ved en hvilken som helst af de ovenfor beskrevne metoder bør bestemmes ved mindst to temperaturer. Tre eller flere er ønskelige i området 0° C til 50° C, for at kontrollere damptrykkurvens liniaritet.

3. RAPPORTERING

Følgende oplysninger skal, om muligt, indeholdes i rapporten:

— præcis specifikation af stoffet (identitet og urenheder);

— mindst to værdier for damptrykket og temperatur helst i området 0° C — 50° C. Den skal også indeholde alle de oprindelige resultater og en kurve over log p, som funktion af 1/T. Desuden skal en beregning af damptrykket ved 20° C eller 25° C anføres.

Hvis der forekommer overgange (tilstandsændring, sønderdeling) bør følgende oplysninger noteres:

— ændringens natur;

— den temperatur, hvor ændringen sker ved atmosfæretryk;

— damptrykket ved 10° C og 20° C under overgangstemperaturen og 10° C og 20° C over denne temperatur (med mindre overgangen er fra fast stof til gas).

Alle oplysninger og bemærkninger, der er af betydning for fortolkningen af resultaterne, skal anføres.

Den anvendte metode skal anføres.

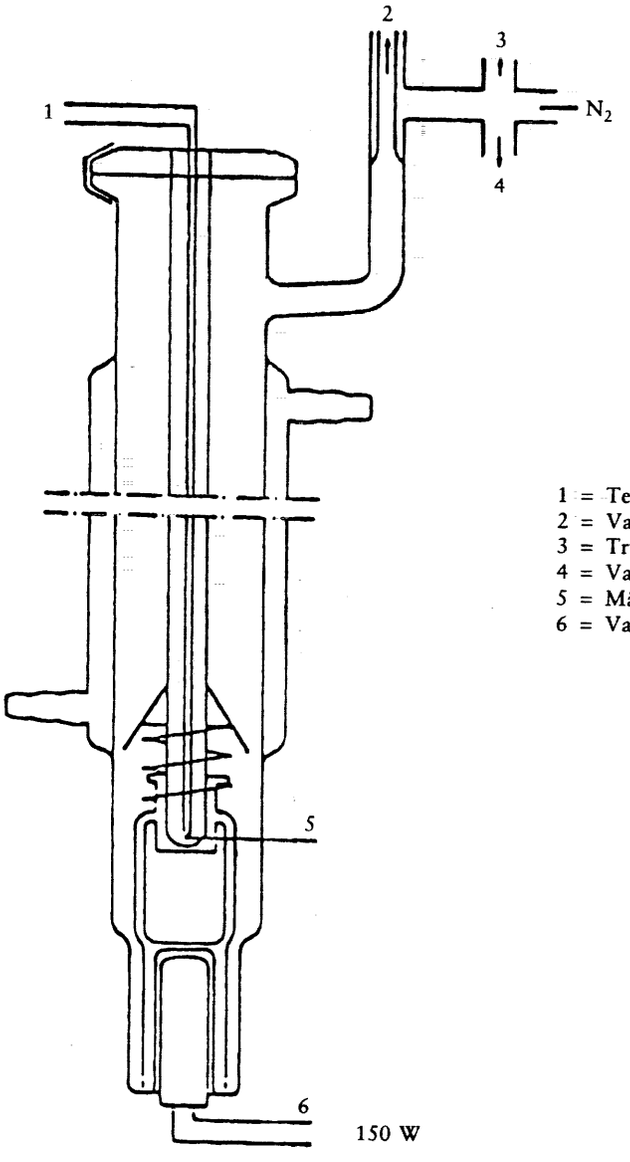
4. REFERENCER

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

Tillæg

Figur 1

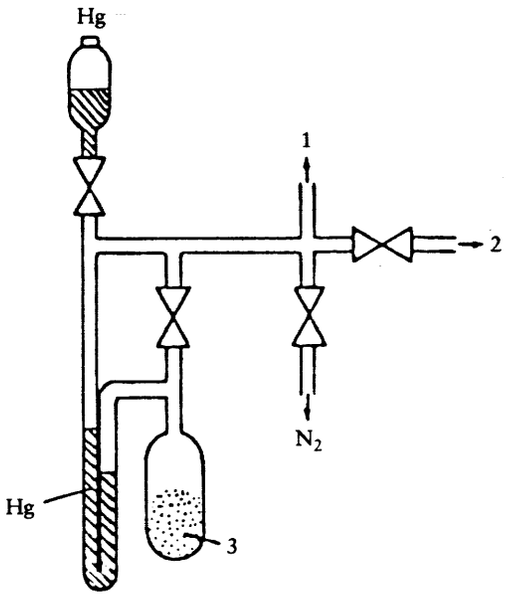
Apparat til bestemmelse af damptrykskurven ved den dynamiske metode



1 = Termoelement
2 = Vakuumstødpuderumfang
3 = Trykmåler
4 = Vacuum
5 = Målepunkt
6 = Varmeelement ca. 150 W

Figur 2

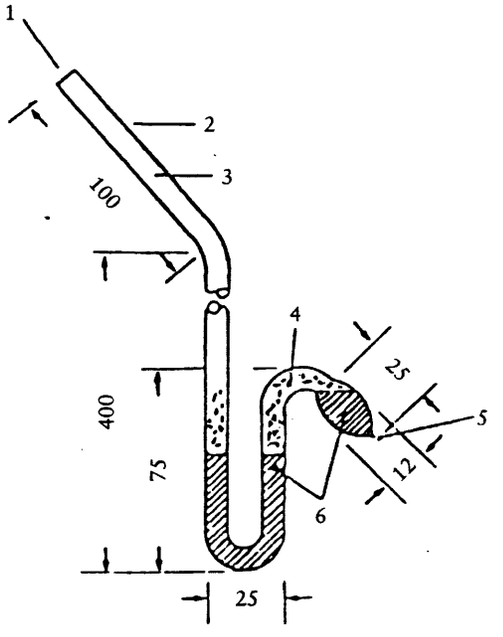
Apparat til bestemmelse af damptrykskurven efter den statiske metode



1 = Trykmåler
2 = Vakuum
3 = Prøve

Figur 3

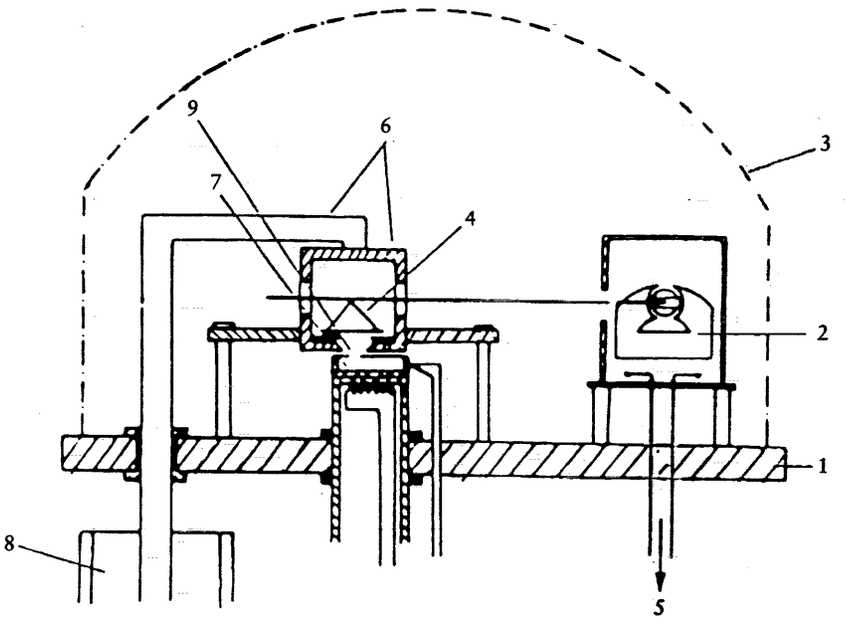
Isoteniskop (ref. 2).



1 = Trykregulerings- og målesystem
2 = 8 mm O D. rør.
3 = Tørt nitrogen i tryksystemet.
4 = Dampe af prøven
5 = Lille spids
6 = Flydende prøve

Figur 4

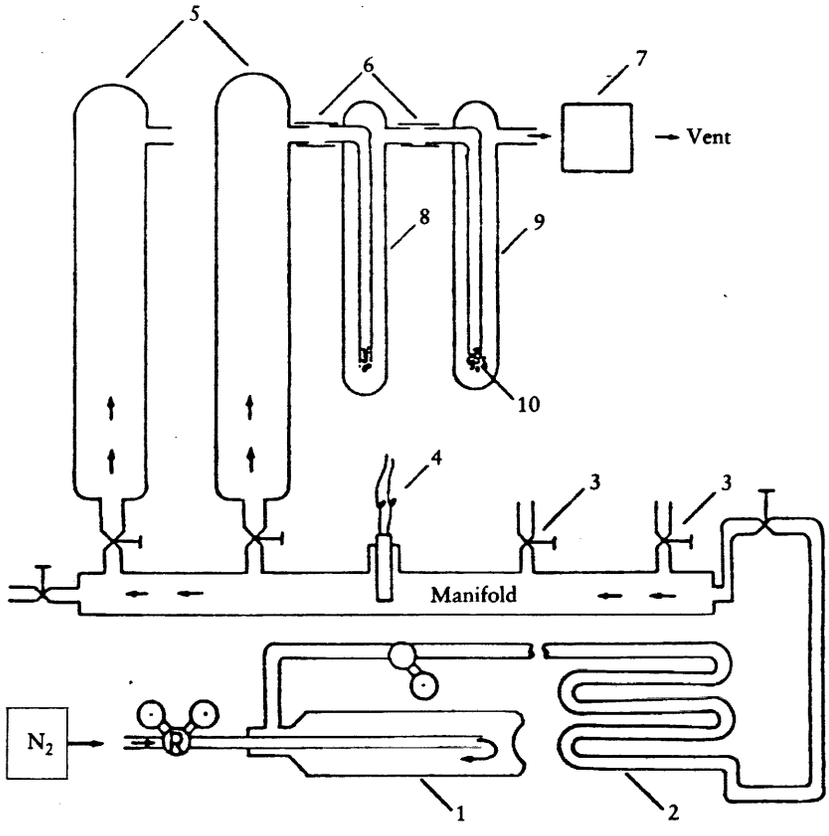
Apparat til bestemmelse af damptrykskurven efter dampstrålemetoden



1 = Grundplade
2 = Drejespoleinstrument
3 = Klokke
4 = Vægt med skål
5 = Vakuum måler
6 = Køleboks og -stang
7 = Fordampningsovn
8 = Dewar-flaske med flydende nitrogen
9 = Skærm

Figur 5

Eksempel på et strømningssystem til bestemmelse af damptryk ved gasmætningsmetoden



1 = Strømningsregulator
2 = Varmeveksler
3 = Nåleventiler
4 = Føler, % rel. fugtighed
5 = Mætningskolonner
6 = PTFE-samlinger
7 = Strømningsmåler
8 = Fælde (absorber)
9 = Oliefælde
10 = Frittet boblerør

A. 5. OVERFLADESPÆNDING

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD retningslinje for undersøgelse af kemikalier (1).

1.1. Indledning

De beskrevne metoder anvendes til måling af vandige opløsningers overfladespænding.

Det er nyttigt at skaffe sig forhåndskendskab om stoffets vandopløselighed, molekylestruktur, hydrolyseegenskaber samt den kritiske koncentration for micelledannelse, inden disse undersøgelser foretages.

De følgende metoder kan anvendes for de fleste kemiske stoffer uden renhedsbegrænsninger.

Måling af overfladespænding ved ringtensiometermetoden er begrænset til vandige opløsninger med en dynamisk viskositet på mindre end ca. 200 m Pa s.

1.2. Definitioner og enheder

Den frie overfladeenthalpi pr. overfladearealenhed betegnes som overfladespændingen. Overfladespændingen angives som

N/m (SI-enhed)
eller mN/m (SI-underenhed).

1 N/m = 10^3 dyn/cm
1 mN/m = 1 dyn/cm i det gamle cgs-system.

1.3. Referencestoffer

Det er ikke nødvendigt at anvende referencestoffer i alle tilfælde, når et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest anvendes til lejlighedsvist at korrigere metoden, og til at muliggøre sammenligning af resultater fra andre målemetoder.

Referencestoffer, som dækker et bredt udvalg af overfladespændinger, er angivet i ref. (1) og (2).

1.4. Metodeprincipper

Metoden er baseret på måling af den største kraft, der skal udøves lodret på en stigbøjle eller ring i kontakt med væskeoverfladen af en prøve i et målekar for at bryde denne kontakt, eller den lodrette kraft, som skal udøves på en plade, hvis ene kant er i kontakt med prøveoverfladen for at bryde den dannede hinde.

1.5. Kvalitetskriterier

Disse metoder kan give større nøjagtighed, end der formentlig kræves ved undersøgelser af miljømæssig karakter.

1.6. Beskrivelse af metoderne

1.6.1. *Plademetoden*

Se ISO 304 (»Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films«).

1.6.2. *Stigbøjlemetoden*

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-harmoniseret ringmetode*

1.6.4.1. Apparatur

Kommercielt tilgængelige tensometre er tilstrækkelige til denne måling. De består af følgende dele:

— bevægeligt prøvebord,

— kraftmålingssystem,

— målelegeme (ring),

— målekar.

1.6.4.1.1. Bevægeligt prøvebord

Det bevægelige prøvebord anvendes til understøttelse af det termostaterede målekar, som rummer den væske, der skal undersøges. Sammen med kraftmålingssystemet er det monteret på et stativ.

1.6.4.1.2. Kraftmålingssystem

Kraftmålingssystemet (se figur 1) er placeret over prøvebordet. Usikkerheden ved kraftmålingen må ikke overstige $\pm 10^{-6}$ N, svarende til en usikkerhed på ± 0,1 mg ved en afvejning. Oftest er måleskalaen på de kommercielt tilgængelige tensometre inddelt mN/m, således at overfladespændingen direkte kan aflæses i mN/m med en nøjagtighed på 0,1 mN/m.

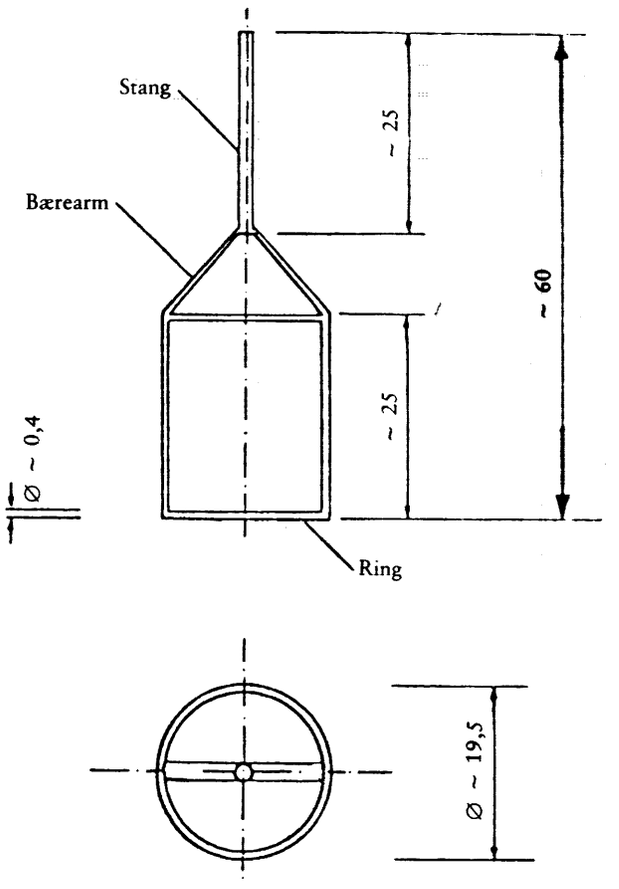
1.6.4.1.3. Målelegeme (ring)

Ringen er sædvanligvis fremstillet af en platin-iridium tråd med en tykkelse på ca. 0,4 mm og en middelomkreds på 60 mm. Trådringen er ophængt vandret fra en metalstang og en trådbærearm, som danner forbindelsen til kraftmålingssystemet (se figur).

Figur

Målelegeme

(alle dimensioner er i mm)



1.6.4.1.4. Målekar

Målekarret, som rummer prøveopløsningen, skal være et termostateret glaskar. Det skal være udformet således, at temperaturen af prøveopløsningen og den overstående gasfase er konstant under målingen, således at prøven ikke kan fordampe. Cylindriske glaskar med en indre diameter på mindst 45 mm er acceptable.

1.6.4.2. Klargøring af apparatet

1.6.4.2.1. Rengøring

Glaskar skal rengøres omhyggeligt. Om nødvendigt skal de først vaskes med varm kromsvovlsyre og dernæst med en viskøs phosphorsyre opløsning (83 til 98 w/w % H_3PO_4).

Herefter skylles omhyggeligt i ledningsvand og endeligt vaskes i redestilleret vand til neutral reaktion. Til sidst tørres karrene, eller de skylles i noget af den prøvevæske, som skal måles.

Ringen skal først renses grundigt i vand for at fjerne alle vandopløselige stoffer. Derefter nedsænkes den et øjeblik i kromsvovlsyre, vaskes i redestilleret vand til neutral reaktion og til sidst et øjeblik over en methanolflamme.

Bemærk:

Forurening med stoffer, som ikke opløses eller destrueres af kromsvovlsyre eller phosphorsyre, som f. eks. silikoner, skal fjernes ved hjælp af et passende organisk opløsningsmiddel.

1.6.4.2.2. Kalibrering af apparatet

Apparatet klargøres ved at nulpunktet justeres, og apparatet indstilles til pålidelig aflæsning i mN/m.

— opstilling: Apparatet skal stilles i vater, f. eks. ved hjælp af en spritlibelle på tensiometrets fod, idet man justerer stilleskruerne.

— nulpunktsindstilling: Efter montering af ringen i apparatet, men inden den nedsænkes i væsken, skal tensometervisningen indstilles på nul, og man kontrollerer, at ringen er parallel med væskeoverfladen. Til dette kan væskeoverfladen anvendes som et spejl.

— kalibreringer: prøvekalibreringen kan udføres ved en af de følgende to metoder:

a) ved hjælp af lodder: dette er en fremgangsmåde, hvor ryttere af kendt masse mellem 0,1 og 1,0 g anbringes på ringen. Kalibreringsfaktoren a, som alle instrumentaflæsninger skal multipliceres med, bestemmes ifølge ligning (1):

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

hvor

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

m = rytterens masse (g),

g = tyngdeaccelerationen (981 cm · s^{-2} ved havoverfladen),

b = ringens middelomkreds (cm),

σ_a = tensometeraflæsningen efter anbringelse af rytterer på ringen (mN/m).

b) ved hjælp af vand: dette er en fremgangsmåde, hvor der **anvendes rent** vand, hvis overfladespænding ved f.eks. 23° C er 72,3 mN/m. Denne fremgangsmåde er hurtigere at udføre end vægtkalibreringen, men der er altid en risiko for, at vandets overfladespænding er ændret ved forurening med spor af overfladeaktive stoffer.

Kalibreringsfaktoren Φ_b, som alle instrumentaflæsninger skal multipliceres med, bestemmes ifølge ligning (2):

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

hvor

σ_o = litteraturværdi for vands overfladespænding (mN/m)

σ_g = målt værdi for vands overfladespænding (mN/m) ved samme temperatur.

1.6.4.3. Prøveforberedelse

Der fremstilles vandige opløsninger med passende koncentrationer af de stoffer, som skal undersøges. Opløsningerne må ikke indeholde uopløst stof.

Opløsningerne holdes ved konstant temperatur (± 0,5° C). Idet en opløsnings overfladespænding ændres i målekarret med tiden, må der foretages adskillige **målinger på forskellige** tidspunkter, og der

laves en kurve, der viser overfladespændingen som funktion af tiden. Når overfladespændingen ikke ændres yderligere, er ligevægtstilstanden nået.

Støv og gasformig forurening med andre stoffer forstyrrer målingen, hvorfor arbejdet bør udføres under et beskyttende dække.

1.6.5. *Prøvebetingelser*

Målingerne foretages ved ca. 20° C og skal holdes inden for ± 0,5° C.

1.6.6. *Undersøgelsens udførelse*

De opløsninger, som skal måles, fyldes i det omhyggeligt rengjorte målekar, idet man undgår skumning. Målekarret anbringes på apparatets prøvebord. Bordet med målekarret hæves, indtil ringen er nedsænket fuldstændigt i den opløsning, som skal måles. Derefter sænkes bordet jævnt og gradvist med en hastighed på ca. 0,5 cm/min, for at løsrive ringen fra overfladen indtil den største kraft er nået. Det væskelag som hænger ved ringen, må ikke fjernes fra denne. Når målingen er udført, nedsænkes ringen atter i væsken, og målingen gentages, indtil der opnås konstante værdier for overfladespændingen. Den tid, der er gået fra overføring af opløsningen til målekarret og til selve målingen udføres, noteres ved hver bestemmelse. Aflæsningerne skal foretages ved den største kraft, som kræves til løsrivning af ringen fra væskeoverfladen.

2. **DATA**

For at beregne overfladespændingen skal den værdi, som er aflæst i mN/m på apparatet, først multipliceres med kalibreringsfaktoren Φ_a eller Φ_b (afhængigt af den anvendte kalibreringsmetode). Dette giver en værdi, som kun gælder tilnærmelsesvist, og som derfor kræver korrektion.

Harkins og Jordan (3) har empirisk bestemt korrektionsfaktorer for værdier af overfladespændingen, som er bestemt med ringmetoden; disse faktorer afhænger af ringens dimensioner, væskens massefylde og dens overfladespænding.

Da det er besværligt for hvert enkelt måling at bestemme korrektionsfaktoren ud fra Harkins og Jordans tabeller for at beregne overfladespænding, kan man for vandige opløsninger benytte en forenklet metode, hvor de korrigerede værdier for overfladespændingen direkte aflæses i den nedenstående tabel (der anvendes interpolation til aflæsninger, som ligger mellem tabelværdierne).

TABEL: KORREKTION AF DEN MÅLTE OVERFLADESPÆNDING

Kun for vandige opløsninger, $\rho \simeq 1\ g/cm^3$

R = 9,55 mm (gennemsnitlig ringradius)

r = 0,185 mm (ringtrådens radius)

Eksperimentel værdi (mN/m)	Korrigeret værdi (mN/m)	
	kalibrering (se 1.6.4.2.2.a)	kalibrering (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	71,2	—
78	73,2	—

Denne tabel er udarbejdet på basis af Harkins-Jordan korrektioner, og lignes den i DIN standarden (DIN 53914) for vand og vandige opløsninger (massefylde $\rho = 1\ g/cm^3$) og for en kommerciel tilgængelig ring med dimensionerne R = 9,55 mm (middelringradius) og r = 0,185 mm (ringtrådens radius). Tabellen angiver korrigerede værdier for overfladespændingen, målt efter kalibrering med lodder eller vand.

Alternativt kan overfladespænding uden forudgående kalibrering beregnes efter følgende formel:

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

hvor

F = kraften målt på dynamometeret, idet hinden brydes

R = ringens radius

f = korrektionsfaktoren (1)

3. **RAPPORTERING**

Undersøgelsesrapporten skal, om muligt, mindst indeholde følgende oplysninger:

— Anvendt metode: ISO eller OEDC-harmoniseret ringtensometermetode.

— Anvendte type vand eller opløsning.

— Nøjagtig specifikation af stoffet (identitet og urenheder)

— Måleresultater: Overfladespænding (aflæsning) med angivelse af både de enkelte målinger, deres middelværdi og den korrigerede middelværdi (med hensyn til apparatfaktoren og korrektionstabellen).

— Prøveopløsningens koncentration.

— Undersøgelsestemperaturen.

— Den anvendte opløsnings alder, og specielt den forløbne tid mellem fremstillingen og målingen af opløsningen.

— Beskrivelse af overfladespændingens tidsafhængighed efter overføring til målekarret.

— Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne skal anføres, herunder specielt hvad angår urenheder og stoffets fysiske tilstand.

4. **REFERENCER**

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

(2) Pure and Applied Chem, Vol. 48, 1976, p. 511.

(3) Harkins, W. D., Jordan, H. F., J Amer. Chem. Soc., Vol. 52, 1930 , p. 1751.

A. 6. VANDOPLØSELIGHED

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD retningslinje for undersøgelse af kemikalier (1).

1.1. Indledning

Det er værdifuldt at have forhåndsinformation om stoffets struktur formel, damptryk, dissociationskonstant og hydrolyseegenskaber (som funktion af pH) for at udføre denne prøvning.

Der findes ikke tilgængeligt én enkelt metode, der dækker hele området af opløseligheder i vand.

Metoden egner sig ikke til flygtige stoffer.

De to prøvningsmetoder, der er beskrevet nedenfor, dækker hele området af opløseligheder:

— en der kan anvendes til stoffer, som i det væsentlige, er rene, med lave opløseligheder ($< 10^{-2}$ g/l) og som er stabile i vand, betegnet »kolonne-eluerings-metoden«,

— den anden, der kan anvendes til hovedsagligt rene stoffer med større opløseligheder ($< 10^{-2}$ g/l), og som er stabile i vand, betegnet »kolbe-metoden«.

De undersøgte stoffers vandopløselighed kan i betragtelig grad afhænge af tilstedeværelsen af urenheder.

1.2. Definitioner og enheder

Et stofs opløselighed i vand angives ved mætningskoncentrationen af stoffet i vand ved en given temperatur. Opløseligheden i vand angives i enheden masse pr. rumfang opløsning. SI-enheden er kg/m^3 (g/l kan også anvendes).

1.3. Referencematerialer

Referencematerialer behøver ikke anvendes i alle tilfælde når et nyt stof undersøges. De bør fortrinsvis tjene som kontrol af metodens ydeevne fra tid til anden og for at give mulighed for sammenligning af resultater opnået med andre metoder.

1.4. Prøvningsmetodens princip

Den omtrentlige mængde af prøven og tiden, der er nødvendig til at opnå mætningskoncentrationen, bør bestemmes ved en simpel foreløbig undersøgelse.

1.4.1. *Kolonne-eluerings-metoden*

Denne metode er baseret på eluering af det undersøgte stof med vand fra en mikrokolonne, der er fyldt med et inert bærematerialе såsom glaskugler, silicagel eller sand og et overskud af det undersøgte stof. Vandopløseligheden bestemmes, når koncentrationen i eluatet bliver konstant. Dette fremkommer som et koncentrationsplateau som en funktion af tiden.

1.4.2. *Kolbe-metoden*

Ved denne metode opløses stoffet (faste stoffer skal pulveriseres) i vand ved en temperatur noget over prøvningstemperaturen. Når mætning er opnået, afkøles blandingen til prøvningstemperatur og holdes der under omrøring så længe, som det er nødvendigt for at opnå ligevægt (2). Derefter bestemmes vægt-koncentrationen af stoffet i den vandige opløsning, der ikke må indeholde uopløste partikler, ved en passende analysemetode.

1.5. **Kvalitetskriterier**

1.5.1. *Repeterbarhed*

For kolonne-elueringsmetoden er < 30 % opnåelig; for kolbe-metoden bør den være < 15 %.

1.5.2. *Følsomhed*

Denne afhænger af analysemetoden, men massekoncentrationsbestemmelser ned til mindst 10^{-6} g/l kan foretages.

1.6. **Metodebeskrivelse**

1.6.1. *Prøvningsbetingelser*

Prøvningen udføres helst ved 20° C ± 0,5° C. Hvis der er mistanke om, at opløseligheden er temperaturafhængig (>3 %/ °C), der også udføres undersøgelser ved to andre temperaturer, der er mindst 10° C over og under den først valgte temperatur. I så tilfælde må temperaturkontrollen være ± 0,1° C. Den valgte temperatur bør holdes konstant i alle relevante dele af udstyrret (inklusive niveaubeholderen).

1.6.2. *Foreløbig undersøgelse*

Til ca. 0,1 g af prøven (faste stoffer må være pulveriserede) i et 10 ml gradueret måleglas med glasprop sættes stigende mængder destilleret vand ved stuetemperatur, efter de i tabellen nedenfor angivne trin.

0,1 g stof opløselig i »x« ml vand	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
anslået opløselighed (g/l)	> 1 000	1 000—200	200—100	100—50	50—10	10—1	< 1

Efter hver tilsætning af den angivne mængde vand til blandingen, omrystes kraftigt i 10 minutter, og det undersøges visuelt, om der er noget uopløst af prøven tilbage. Hvis prøven eller dele af prøven forbliver uopløst, efter at 10 ml er tilsat, overføres indholdet i måleglasset til et 100 ml måleglas, som derefter fyldes op til 100 ml med vand og omrystes. Ved lavere opløseligheder kan den tid, der kræves til opløsning af et givet stof, være betragteligt længere (der bør tillades 24 timer). Den anslåede opløselighed er angivet i tabellen under det rumfang af tilsat vand, der netop forårsagede en fuldstændig opløsning af prøven. Hvis stoffet stadig er tilsyneladende uopløst, bør der foretages yderligere fortynding for at sikre at hverken kolonne-elueringsmetoden eller kolbe-metoden kan anvendes.

1.6.3. *Kolonne-elueringsmetoden*

1.6.3.1. Bæremateriale, opløsningsmiddel og elueringsmiddel

Bæremateriale til kolonne-elueringsmetoden skal være inert. Mulig materialer, der kan anvendes, er glaskugler og siliciumdioxyd. Et passende flygtigt opløsningsmiddel af analyse kvalitet bør anvendes til at overføre det undersøgte stof til bæremateriale. Dobbelt destilleret vand fra glas- eller kvartsapparatur bør anvendes som opløsnings- og elueringsmiddel.

Bemærk:

Vand direkte fra en organisk ionbytter må ikke anvendes.

1.6.3.2. Afsætning på bæremateriale

Ca. 600 mg bæremateriale afvejes og overføres til en 50 ml rundbundet kolbe.

En passende, afvejet mængde af prøven opløses i det valgte opløsningsmiddel. En passende mængde af prøveopløsningen sættes til bæremateriale. Opløsningsmidlet skal afdampes fuldstændigt, f.eks. i en rotationsinddamper: i modsat fald vil der ikke kunne opnås en mætning af bæremateriale med vand som følge af fordelingseffekter på overfladen af bæremateriale.

Afsætningen på bæremateriale kan give problemer (fejlagtige resultater), hvis det undersøgte stof afsættes som en olie eller i en anden krystalstruktur. Dette problem må undersøges eksperimentelt.

Det behandlede bæremateriale henstilles til kvældning i ca. to timer i ca. 5 ml vand, hvorefter suspensionen overføres til mikrokolonnen. Alternativt kan det tørre behandlede bæremateriale hældes i mikrokolonnen, der er fyldt med vand, og derefter henstå i ca. to timer til opnåelse af ligevægt.

Prøvningsprocedure:

Elueringen af stoffet fra bæremateriale kan udføres på en af de to forskellige måder:

— med cirkulationspumpe (se figur 1)

— med niveaubeholder (se figur 4).

1.6.3.3. Kolonne-elu erings-metoden med recirkulationspumpe

Apparatur

En skematisk gengivelse af et typisk system er vist i figur 1. En egnet mikrokolonne er vist i figur 2, omend en hvilken som helst størrelse kan anvendes, forudsat, at den opfylder kriterierne for reproducerbarhed og følsomhed. Kolonnen bør have et head-space på mindst fem bed-volumen vand plus mindst fem prøver. Alternativt kan størrelsen reduceres, hvis der anvendes tilsætning af opløsningsmiddel som erstatning for de første fem bed-rumfang, der fjernes med urenheder.

Kolonnen skal forbindes til en recirkulationspumpe, der er i stand til at kontrollere strømninger på ca. 25 ml/h. Pumpen forbindes med tilslutning af polytetrafluoroethylen og/eller glas. Kolonnen og pumpen skal, når de er forbundet, give mulighed for at udtage prøver af den eluerede væske og for ækvilibrering af head-space ved atmosfæretryk. Kolonnematerialet holdes oppe med en lille (5 mm) prop af glasuld, der også fungerer som filter for partikler. Recirkulationspumpen kan f.eks. være en slangepumpe (man må være omhyggelig med ikke at få kontaminering af og/eller sorption på slangematerialet) eller en membranpumpe.

Måleprocedure

Strømningen gennem kolonnen startes. Det anbefales at bruge en strømningshastighed på ca. 25 ml/h (ca. ti bed-rumfang pr. time for den beskrevne kolonne). De første fem bed-rumfang (minimum) bortkastes for at fjerne vandopløselige urenheder. Derefter kører recirkulationspumpen til der er opnået ligevægt, defineret ved, at fem på hinanden følgende prøver giver koncentrationer, der ikke afviger mere end ± 30 % på tilfældig måde. Disse prøver bør være adskilt fra hinanden ved tidsintervaller, der svarer til et gennemløb af mindst ti bed-rumfang af opløsningsmiddel.

1.6.3.4. Kolonne-elu erings-metoden med niveaubeholder

Apparatur — (se figur 4 og 3)

Niveaubeholder: Forbindelsen til niveaubeholderen etableres ved at anvende et glasslibovergangsstykke, der tilsluttes med en PTFE-slange. Det anbefales, at der anvendes en gennemstrømningshastighed på ca. 25 ml/h. Successive fraktioner af eluatet opsamles og analyseres efter den valgte metode.

Måleprocedure.

Fraktioner fra det midterste elueringsområde, hvor koncentrationerne er konstante (± 30 %) i mindst fem på hinanden følgende prøver, anvendes til at bestemme opløseligheden i vand.

Et andet forsøg udføres med halvt så høj gennem-strømningshastighed som det første. Hvis resultaterne fra de to forsøg stemmer overens, er analysen tilfredsstillende; hvis der er en større opløselighed ved den lavere hastighed, må halveringen af gennem-strømningshastigheden fortsættes, indtil to på hinanden følgende prøvninger giver den samme opløselighed.

I begge tilfælde (anvendelse af recirkulationspumpe eller niveaubeholder) bør fraktionerne kontrolleres for tilstedeværelsen af kolloidt materiale ved undersøgelse for Tyndall-effekt (lysspredning). Tilstedeværelsen af sådanne partikler ødelægger resultaterne, og prøvningen bør gentages med forbedring af kolonnens filtreringsformåen. pH i hver prøve skal registreres. Endnu et forsøg skal udføres ved samme temperatur.

1.6.4. *Kolbe-metoden*

1.6.4.1. Apparatur

Til kolbe-metoden kræves følgende udstyr:

— normalt laboratorieglasudstyr og -instrumentering,

— udstyr til bevægelse af opløsninger ved kontrolleret konstant temperatur,

— en centrifuge (helst termostateret), om nødvendigt ved emulsioner, og

— udstyr til analytisk bestemmelse.

1.6.4.2. Måleprocedure

Mængden af materiale, der er nødvendig for at mætte det ønskede rumfang vand, er anslået ved den foreløbige undersøgelse. Det fornødne rumfang vand vil afhænge af den analytiske metode og opløselighedsområdet. Ca. fem gange mængden af stof, der er bestemt ovenfor, afvejes i hver af tre beholdere med glaspropper (f.eks. centrifugeglas, kolber). Det valgte rumfang vand sættes til hver beholder, og beholderne lukkes helt tæt. De lukkede beholdere bevæges derefter ved 30 °C.

(Ryste- eller omrørerudstyr, der kan operere ved konstant temperatur, bør anvendes, f.eks. magnetomrøring i et termostatbad). Efter en dag fjernes én af beholderne, og den henstilles til opnåelse af ligevægt i 24 timer ved den ønskede temperatur og lejlighedsvis omrystning. Indholdet i beholderen centrifugeres derefter ved prøvningstemperaturen, og koncentrationen af forbindelsen i den klare vandige fase bestemmes med en passende analysemetode. De andre to kolber behandles på samme måde efter forudgående opnåelse af ligevægt ved 30° C i henholdsvis to og tre dage. Hvis koncentrationsresultaterne fra mindst to af beholderne er i overensstemmelse med den forlangte reproducerbarhed, er prøvningen tilfredsstillende. Hele forsøget bør gentages under anvendelse af længere tider til opnåelse af ligevægt, hvis resultaterne fra beholder 1, 2 og 3 viser en stigende tendens.

pH i hver prøve bør noteres.

1.6.5. *Analyser*

En stofspecifik analysemetode foretrækkes til disse bestemmelser, eftersom små mængder af opløselige urenheder kan forårsage store fejl i den målte opløselighed. Eksempler på sådanne metoder er: gas- eller væskechromatografi, titreringsmetoder, photometriske metoder, voltametriske metoder.

2. DATA

2.1. Kolonne-eluerings-metoden

Middelværdien samt standardafvigelsen for mindst fem på hinanden følgende prøver taget ved mætningsplateauet bør udregnes for hvert forsøg.

2.2. Kolbe-metoden

De enkelte resultater skal angives for hver af de tre kolber, og for de resultater, der skønnes at være konstante (repeterbarhed mindre end 15 %), beregnes gennemsnittet og det angives i masseenheder pr. opløsningsvolumen. Dette kan kræve en omsætning af masseenheder til volumen, under anvendelse af densitete, hvis opløseligheden er meget høj (>100 g/1).

3. RAPPORTERING

3.1. Kolonne-eluerings-metoden

Rapporten skal, om muligt, omfatte en angivelse af resultater fra den foreløbige undersøgelse samt følgende oplysninger:

— præcis specifikation af stoffet (identitet og urenheder),

— de enkelte koncentrationer, gennem strømningshastigheder og pH for hver prøve,

— middelværdier og standardafvigelser for mindst fem prøver fra mætningsplateauet fra hvert forsøg,

— gennemsnittet for to successive, acceptable forsøg,

— vandtemperaturen under mætningsprocessen,

— den anvendte analysemetode,

— arten af det anvendte bæremateriale,

— afsætning på bæremateriale,

— anvendt opløsningsmiddel,

— tegn på eventuel kemisk instabilitet af stoffet under prøvningen og den anvendte metode,

— alle oplysninger, der er af betydning for fortolkningen af resultaterne.

3.2. Kolbe-metoden

Rapporten skal omfatte følgende oplysninger:

— præcis specifikation af stoffet (identitet og urenheder),

— de enkelte analytiske bestemmelser og gennemsnittet, når der er bestemt mere end en værdi for hver kolbe,

— pH i hver prøve,

— gennemsnitsværdien for de forskellige kolber, der stemte overens,

— analysetemperaturen,

— den anvendte analysemetode,

— beviser for kemiske ustabiliteter af stoffet under forsøget og den anvendte metode.

— alle oplysninger, der er af betydning for fortolkningen af resultaterne.

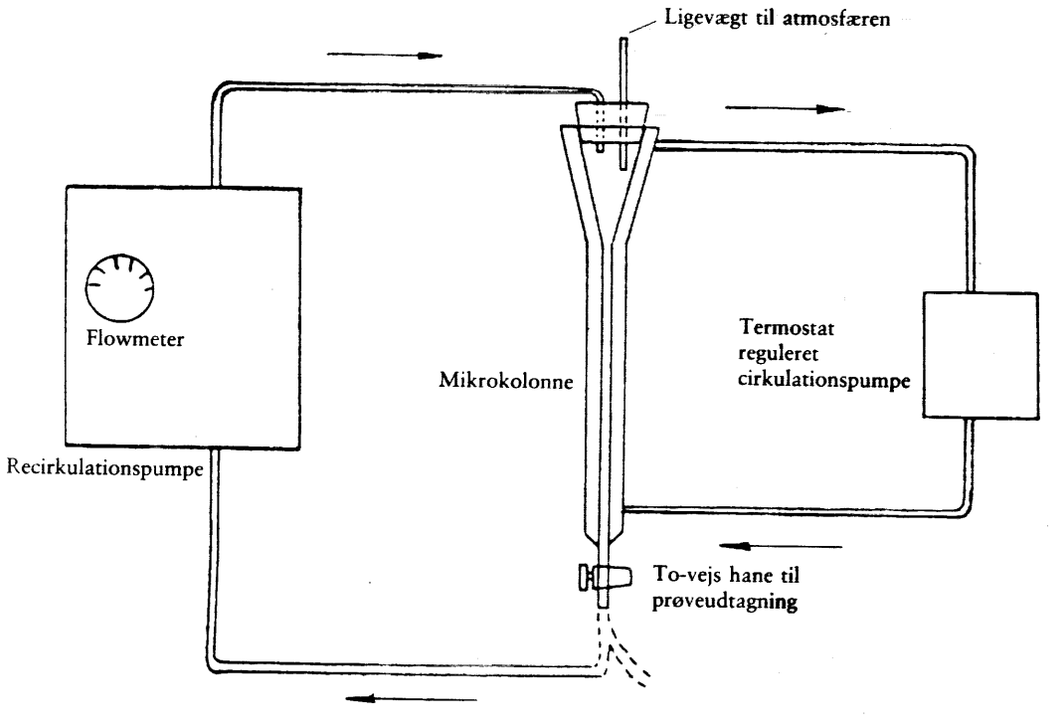
4. REFERENCER

(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.

Tillæg

Figur 1

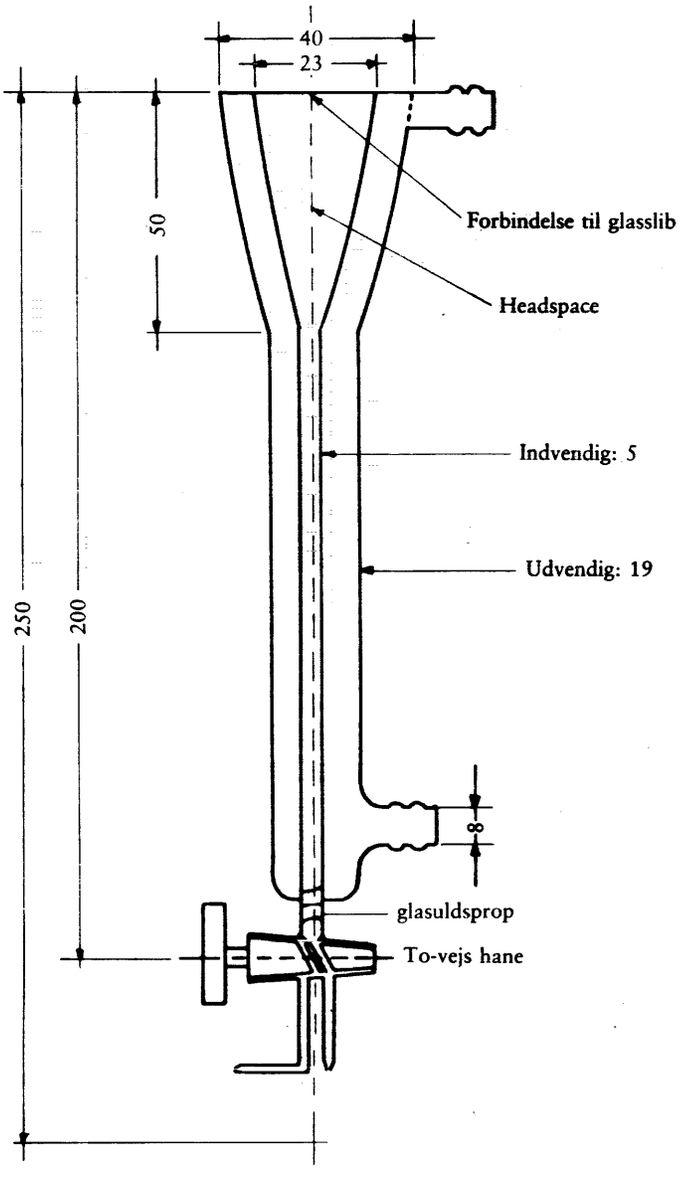
Skematisk forsøgsopstilling



Figur 2

En typisk mikrokolonne

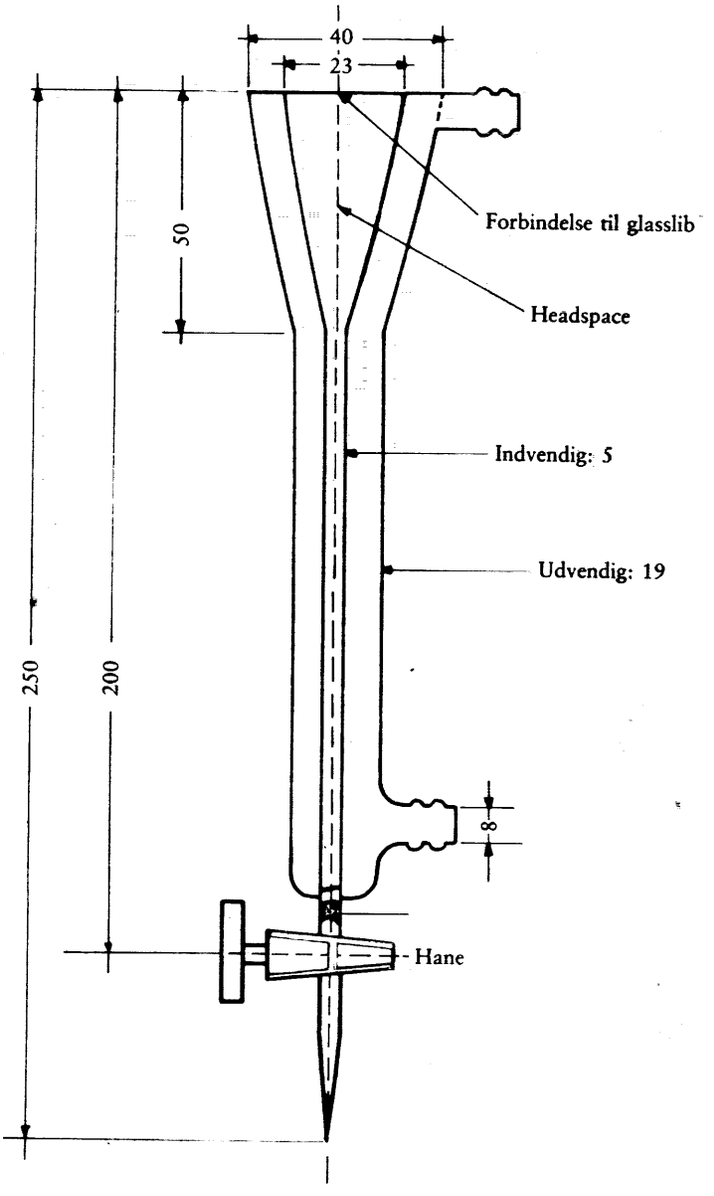
(alle dimensioner er i mm).



Figur 3

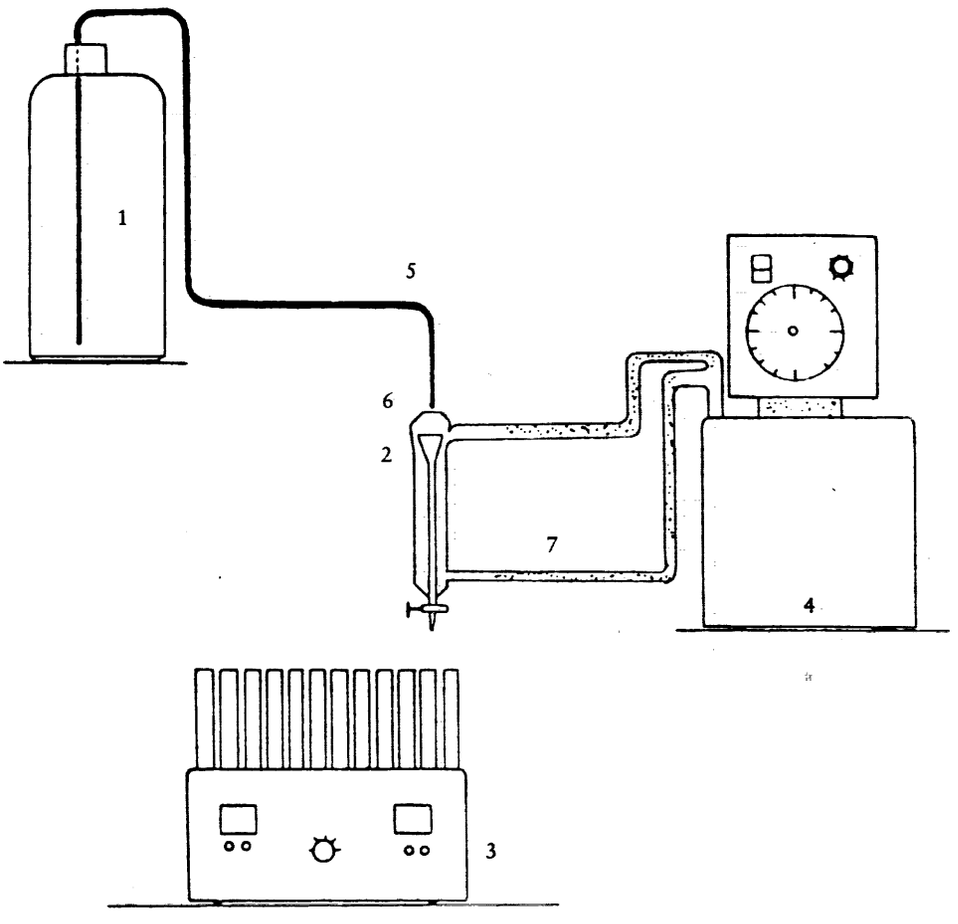
En typisk mikrokolonne

(alle dimensioner er i mm).



Figur 4

Prøvningsopstilling til bestemmelse af opløseligheden i vand af tungt opløselige, svagt flygtige stoffer



1 = Niveaubeholder (f.eks. 2.5.1 kemisk kolbe)
2 = Kolonne (se figur 3)
3 = Fraktionssamler
4 = Termostat
5 = Teflonslange
6 = Glaslib forbindelse
7 = Vandslange (mellem termostat og kolonne, indre diameter: ca. 8 mm).

A. 7. FEDTOPLØSELIGHED

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD retningslinje for undersøgelse af kemikalier (1).

1.1. Indledning

Det er værdifuldt at have forhåndsinformation om stoffets fordelingskoefficient, vandopløselighed, strukturformel og stabilitet ved 50° C for at udføre denne prøvning. Denne metode er kun anvendelig til sådanne stoffer, som i det væsentlige er rene, som er stabile ved 50° C og som ikke er nævneværdigt flygtige under de samme betingelser.

Metoden er uegnet til stoffer, som reagerer med triglycerider.

1.2. Definitioner og enheder

Den vægtfraktion af et stof, som danner en homogen fase med et flydende fedtstof (olie) uden at give anledning til kemiske reaktioner, defineres som fedtopløseligheden. Den største af sådanne vægtfraktioner kaldes mætnings-vægtfraktionen, og denne er en funktion af temperaturen.

Et stofs mætnings-vægtfraktion bør angives i mg/100 g af standardfedt ved 37° C ± 0,5° C.

Der eksisterer følgende sammenhæng mellem opløseligheden i g pr. 100 g opløsning (S′) og opløseligheden i g pr. 100 g opløsningsmiddel (S):

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

Multiplikation af S-værdien med 1 000 giver mg/100 g standardfedtstof.

1.3. Referencematerialer

Referencematerialer behøver ikke at anvendes i alle tilfælde ved undersøgelsen af et nyt stof. De skal primært tjene til at kontrollere metodens ydeevne fra tid til anden og for at give mulighed for sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. Metodens princip

Stoffet sættes til et flydende »standardfedtstof« og omrøres. Der tilsættes så meget af stoffet, at der med sikkerhed er overskud. Den opløste stofmængde bestemmes ved en egnet analysemetode.

1.5. Kvalitetskriterier

1.5.1. *Specificitet*

Repeterbarheden af målingen er endnu ukendt.

Resultaterne bør gælde for standardfedtstoffer, og er relevante for relativt rene stoffer. Selv ved 37° C kan fedtstoffer danne fine emulsioner eller fine suspensioner med faste stoffer. Eftersom disse vil forstyrre den efterfølgende bestemmelse af vægtfraktionen, må dannelsen af sådanne undgås.

1.6. **Metodebeskrivelse**

1.6.1. *Forberedelse*

1.6.1.1. Apparatur

Følgende udstyrsdele er nødvendige:

— normalt laboratorieglasudstyr,

— vægt,

— termostateret centrifuge,

— omrører der kan anvendes i kombination med temperaturkontrolsystem,

— termostat.

1.6.1.2. Standardfedtstoffer

Det er nødvendigt at anvende standardfedtstoffer. Disse standardfedtstoffer bør være lette at definere, og et eksempel på et sådant standardfedtstof er angivet i bilaget.

1.6.1.3. Foreløbig undersøgelse

En simplificeret foreløbig undersøgelse bør udføres, for at kunne bestemme den omtrentlige mængde af stof, der er nødvendig for at opnå mætnings-vægtfraktionen ved prøvningstemperaturen (37° C).

Bemærk:

Hastigheden, hvormed mætningsligevægten opnås, kan være stærkt afhængig af partikelstørrelsen, for så vidt angår faste stoffer. Derfor bør sådanne materialer pulveriseres.

1.6.1.4. Forberedelse af stoffet

Afvej 8 prøver i 50 ml kolber. Normalt bør hver portion være den dobbelte mængde af, hvad der er fundet nødvendigt til mætning ved den foreløbige undersøgelse.

Efter tilsætning af afvejet mængde på omtrent 25 g flydende og blandet standardfedtstof udstyres kolberne med omrørere, og lukkes tæt til med glaspropper. Halvdelen (gruppe I) omrøres ved 30° C og den anden halvdel (gruppe II) ved ca. 50° C, begge i mindst en time.

1.6.2. *Prøvningsbetingelser*

Bestemmelsen af fedtopløseligheden udføres ved 37° C ± 0,5° C.

1.6.3. *Måleprocedure*

Omrør indholdet af kolberne i begge grupper ved 37° C ± 0,5° C indtil de er omhyggeligt opblandet.

Den omrøringstid, der kræves for at opnå ligevægt, kan ikke forudsiges generelt. Ved flydende stoffer kan mætning opnås på få minutter; ved faste stoffer kan det tage timer. Almideligvis vil det ikke være nødvendigt med mere end tre timers omrøring; derefter kan omrøringen standses for to kolber i begge grupper, og disse kolber skal henstå i mindst en time ved 37° C for at skille det uopløselige stof fra og for at tillade dannelse af en homogen fase. Emulsions- eller suspensionsdannelse (f.eks. Tyndall-effekt) må forhindres ved en passende metode, såsom termostateret centrifugering.

Den tredje og den fjerde kolbe i begge grupper bør omrøres i mindst 24 timer, før de henstår en time ved 37° ± 0,5° C.

Bemærk:

Hvis der ikke dannes bundfald (for faste stoffer), eller der ikke sker faseadskillelse (for flydende stoffer) efter denne periode, må prøvningen gentages med en større mængde stof.

1.6.4. *Analyse*

Der udtages én prøve fra hver mættet fedtfase til analyse. Denne prøve vejes, og vægtfraktionen bestemmes. Enhver egnet analysemetode kan anvendes, enten direkte eller efter ekstraktion med vand eller et organisk opløsningsmiddel, eller enhver anden seperationsmetode.

Eksempler på sådanne metoder er:

— spektrofotometri,

— gas- eller væskechromatografi,

— voltametri.

2. DATA

Hvis der er signifikante forskelle i resultaterne fra enten over-/undermætningsforsøgene eller kort-/langtidsperioderne, må prøven gentages med længere omrøringstider.

3. RAPPORTERING

Følgende oplysninger skal, om muligt, omfattes af rapporten:

— præcis specifikation af stoffet (identitet og urenheder),

— præcis specifikation af fedtstoftet (f.eks. beskrivelse, karakteristika, oprindelse, sammensætning),

— analysemetode, afvigelser og specielle træk.

Resultaterne må vurderes som beskrevet ovenfor, og de udgør en del af forsøgsrapporten. Hvis der ikke er nogen signifikante forskelle mellem de forskellige observerede værdier i mg pr. 100 g, bør de individuelle resultater, middelværdien og standardafvigelsen rapporteres. Hvis der er signifikante forskelle, selv efter fornyet prøvning, anføres kun de individuelle resultater.

Alle oplysninger og bemærkninger, der er af betydning for fortolkningen af resultaterne, skal anføres.

4. REFERENCER

(1) OECD Paris 1981. Test-Guideline 116. Decision of the Council C(81) 30. Final.

Bilag

EKSEMPEL PÅ ET STANDARDFEDTSTOF

Nedenstående tabel viser sammensætningen af et typisk standardfedtstof.

Fedtsyrefordeling

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

Glyceridfordeling

Antal C-atomer i fedtsyredelen	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
GLC-arealer (%)	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

Renhed

Monoglyceridindhold (enzymatisk)	≤ 0,1 %
Diglyceridindhold (enzymatisk)	≤ 0,4 %
Uforsæbeligt indhold	≤ 0,1 %
Wijstal	≤ 0,5 %
Syretal	0,02
Vandindhold (K. Fischer)	≤ 0,1 %
Klart smeltepunkt	28,5° C

Typisk absorptionsspektrum (lagtykkelse d = 1 cm, reference: vand, 35° C)

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

Mindst 10 % lystransmission ved 303 nm

Dette fedtstof er en syntetisk blanding af mættede triglycerider med en fedtsyre og triglyceridfordeling, der svarer til kokosfedt.

A. 8. FORDELINGSKOEFFICIENT

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD retningslinje for undersøgelse af kemikalier (1).

1.1. Indledning

Det er værdifuldt at have forhåndsinformation om stoffets dissociationskonstant, vandopløselighed og overfladespænding for at udføre denne prøvning.

Denne metode er kun anvendelig til stoffer, der i det væsentlige er rene, og som kan opløses i vand og n-octanol. Den kan ikke anvendes til overfladeaktivt materiale.

1.2. Definitioner og enheder

Fordelingskoefficienten (P) defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne (c_i) for et stof opløst i et to-fasesystem bestående af to stort set ublandbare opløsningsmidler.

I tilfældet n-octanol og vand

$$P_{ov} = \frac{c_{octanol}}{c_{vand}}$$

Fordelingskoefficienten (P) defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne (c_i) for et stof opløst i et to-fasesystem bestående af to stort set ublandbare opløsningsmidler.

1.3. Referencematerialer

Referencematerialer behøver ikke anvendes i alle tilfælde ved undersøgelsen af et nyt stof. De skal primært tjene til at kontrollere metodens ydeevne fra tid til anden og for at give mulighed for at sammenligne resultater opnået ved andre metoder.

1.4. Metodens princip

For at fordelingskoefficienten kan bestemmes, må der opnås ligevægt mellem alle de medvirkende komponenter i systemet, og de opløste stoffers koncentrationer i de to faser, skal bestemmes. En gennemgang af litteraturen om dette emne antyder, at der er mange forskellige teknikker, som kan bruges til at løse dette problem, det vil sige den omhyggelige blanding af de to faser efterfulgt af deres adskillelse for bestemmelse af ligevægtskoncentrationerne for det undersøgte stof.

1.5. Kvalitetskriterier

1.5.1. *Repeterbarhed*

For at sikre fordelingskoefficientens nøjagtighed skal der udføres dobbeltbestemmelser under tre forskellige prøvningsbetingelser, hvorunder såvel mængden af det angivne stof som forholdet mellem volumen af opløsningsmidlerne kan varieres. De fundne værdier for fordelingskoefficienten udtrykt ved almindelige logaritmer bør falde indenfor ± 0,3-logaritmeenheder.

1.5.2. *Følsomhed*

Metodens måleområde bestemmes af analysemetodens detektionsgrænse. Denne skal være tilstrækkelig til at tillade bestemmelsen af værdier af P_{ov} op til 10^5, når koncentrationen af det opløste stof i én af faserne ikke er større end 0,01 mol/l.

1.5.3. *Specificitet*

Nernst's fordelingslov gælder kun ved konstant temperatur, tryk og pH og for tynde opløsninger. Den kan alene anvendes på et rent stof, der fordeles mellem to rene opløsningsmidler. Hvis der forekommer flere opløste stoffer i den ene eller i begge faser samtidig, kan dette påvirke resultaterne.

Dissociation eller association af de opløste molekyler resulterer i afvigelser fra Nernst's fordelingslov. Sådanne afvigelser indiceres af det faktum, at fordelingskoefficienten bliver afhængig af koncentrationen i opløsningen.

På grund af de mange ligevægte der er involveret i nærværende prøvningsmetode, bør den ikke anvendes på ioniserbare stoffer, uden at der foretages korrektioner. (Anvendelsen af pufferopløsninger i stedet for vand bør tages i overvejelse for sådanne stoffer.)

1.6. **Metodebeskrivelse**

1.6.1. *Foreløbigt skøn for fordelingskoefficienten*

Fordelingskoefficientens værdi kan estimeres enten ved simple beregninger (2) eller ved anvendelse af prøvens opløselighed i de rene opløsningsmidler (1).

Herved fås:

$$P_{estimeret} = \frac{\text{mætnings } c_{n\text{-octanol}}}{\text{mætnings } c_{vand}}$$

Alternativt kan den bestemmes groft ved en simplificeret foreløbig undersøgelse.

1.6.2. *Forberedelser*

n-octanol: Bestemmelsen af fordelingskoefficienten bør bestemmes under anvendelse af meget rene reagenser af analysekvalitet. Vand: Destilleret eller dobbeltdestilleret vand fra glas- eller kvartsapparatur bør anvendes.

(Bemærk:

Vand taget direkte fra en ionbytter bør ikke anvendes.)

1.6.2.1. Formætning af opløsningsmidlerne

Før en fordelingskoefficient bestemmes, mættes de to faser gensidigt ved omrystning ved forsøgstemperaturen. Herved er det praktisk at omryste to store standflasker med meget ren n-octanol af analysekvalitet eller vand hver for sig med en tilstrækkelig mængde af det andet opløsningsmiddel i 24 timer på et mekanisk rysteapparat, og derefter at lade flaskerne stå længe nok til at sikre en fuldstændig adskillelse af de to faser og en fuldstændig mætning.

1.6.2.2. Prøvningsforberedelse

Det samlede rumfang af to fasesystemet skal fylde næsten hele analysebeholderen. Dette vil hjælpe til at forhindre tab af materiale som følge af fordampning. Forholdet mellem de to rumfang og mængden af stof, der skal anvendes, fastsættes ud fra følgende:

— den foreløbige bestemmelse af fordelingskoefficienten (se ovenfor);

— den mindste prøvemængde der kræves til den analytiske metode;

og

— begrænsningen ved en maksimal koncentration i én af faserne på 0,01 mol/l.

Der udføres tre prøvninger. I den første tilsættes det beregnede volumenforhold; i den anden tilsættes det dobbelte volumen n-octanol; og i den tredie tilsættes det halve volumen n-octanol.

1.6.2.3. Prøven

For at kunne lave en massebalance under forsøget, fremstilles der en stamopløsning i n-octanol med en massekoncentration på mellem 1 og 100 mg/ml. Den aktuelle massekoncentration i denne stamopløsning skal bestemmes præcist, inden den anvendes til bestemmelse af fordelingskoefficienten. Denne opløsning skal opbevares under stabile betingelser.

1.6.3. *Prøvningsbetingelser*

Prøvningstemperaturen bør holdes konstant (± 1° C) og ligge i området 20° C – 25° C.

1.6.4. *Måleprocedure*

1.6.4.1. Opnåelse af fordelingsligevægt

To prøvningsbeholdere, der indeholder de krævede nøjagtigt afmålte mængder af de ro opløsningsmidler sammen med den nødvendige mængde af stamopløsningen, skal forberedes for hvert sæt prøvningsbetingelser.

Octanofaserne afmåles volumetrisk. Prøvningsbeholderne bør enten placeres i et passende rysteapparat eller omrystes med håndkraft. En anbefalet metode er, at dreje et centrifugeglas hurtigt ca. 180° om en akse vinkelret på dets længdeakse, således at alt indespærret luft stiger op gennem de to faser.

1.6.4.2. Faseadskillelse

For at adskille faserne bør blandingen centrifugeres. Dette bør gøres i en laboratoriecentrifuge, holdt på stuetemperatur, eller hvis der ikke benyttes en temperaturreguleret centrifuge, bør centrifugeglassene bringes i temperaturligevægt ved prøvningstemperatur i mindst 1 time før analysen.

1.6.5. *Analyse*

Til bestemmelse af fordelingskoefficienten er det nødvendigt at bestemme koncentrationerne af det undersøgte stof i begge faser. Dette kan gøres ved at udtage en aliquot fra hver af de to faser fra hver beholder fra hver prøvningsbetingelse og analysere dem ved den valgte fremgangsmåde. Den totale mængde af stof, der findes i hver af faserne skal beregnes og sammenlignes med den mængde stof, der oprindelig blev tilsat.

Fra den vandige fase bør prøvetagningen ske på en sådan måde, at risikoen for at medtage spor af octanol minimeres: en glassprøjte med en aftagelig kanyle kan anvendes til at udtage prøver fra vandfasen. Sprøjten fyldes først delvis med luft. Luften bør forsigtigt presses ud, mens kanylen føres gennem octanolfasen. Et passende rumfang af vandfasen trækkes op i sprøjten. Sprøjten fjernes hurtigt fra opløsningen og kanylen tages af. Indholdet i sprøjten kan da anvendes som den vandige prøve. Koncentrationen i de to adskilte faser skal helst bestemmes ved en stof-specifik metode. Eksempler på fysisk-kemiske bestemmelser, der kan anvendes er:

— fotometriske metoder,

— gaschromatografi,

— højtryksvæskechromatografi.

2. **DATA**

Hvis den målte P_{OV} er større end 10^4, anbefales det, at resultaterne sammenlignes med beregnede P_{OV} værdier, som for eksempel er fremkommet ved metoden angivet i (3).

Pålideligheden af de bestemte værdier af P kan afprøves ved sammenligning af gennemsnitsværdierne for dobbeltbestemmelserne med det samlede gennemsnit.

3. **RAPPORTERING**

Følgende oplysninger skal, om muligt, omfattes af rapporten:

— Præcis specifikation af stoffet (identitet og urenheder).

— Temperatur, hvorved bestemmelserne er udført.

— Data for de analytiske metoder, der er anvendt ved bestemmelsen af koncentrationerne.

— De målte koncentrationer i begge faser for hver bestemmelse. (Dette betyder, at i alt tolv koncentrationer skal angives.)

— Vægten af det undersøgte stof, rumfanget af hver fase, der er anvendt i hver prøvningsbeholder og den totale beregnede mængde prøve, der findes i hver fase efter ligevægten er opnået.

— De beregnede værdier for fordelingskoefficienten (P) og gennemsnittet skal anføres for hvert sæt prøvningsbetingelser, ligesom gennemsnittet for alle bestemmelserne. Hvis der er tegn på koncentrationsafhængighed for fordelingskoefficienten, bør dette anføres i rapporten.

— Standardafvigelsen for de individuelle P-værdier omkring deres middelværdi bør anføres.

— Middelværdien for P for alle bestemmelser skal også udtrykkes ved dens logaritme (basis 10).

— Den beregnede teoretiske P_{OV}, når denne værdi er bestemt, eller når den målte værdi er større end 10^4.

— pH i vandet, der er anvendt, og i vandfasen under forsøget.

— Alle oplysninger og bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. **REFERENCER**

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

A. 9. FLAMMEPUNKT

1. METODE

1.1. Indledning

Det er værdifuldt at have forhåndskendskab til stoffets antændelighed for at udføre denne prøvning. Prøvningsmetoden kan anvendes til flydende stoffer, som markedsført, hvis dampe kan antændes af en antændelseskilde. De i denne tekst beskrevne prøvningsmetoder er kun pålidelige i de flammepunktsområder, der er anført i de enkelte metoder.

1.2. Definitioner og enheder

Flammepunktet er den laveste temperatur, korrigeret til et tryk på 101,325 kPa, ved hvilken den undersøgte mængde væske i en lukket prøvningsbeholder, under de i prøvningsmetoden definerede betingelser, udvikler dampe i et sådant omfang, at der dannes en brændbar damp/luft blanding i prøvningsbeholderen.

Enheder: ° C

$t = T - 273{,}15$
(t i ° C og T i K).

1.3. Referencematerialer

Det er ikke nødvendigt at anvende referencematerialer i alle tilfælde ved en undersøgelse af nye stoffer. De skal primært tjene til at kalibrere metoden fra tid til anden og for at frembyde en mulighed for at sammenligne resultater, når andre metoder anvendes.

1.4. Metodens princip

Stoffet anbringes i en prøvningsbeholder, som gradvis opvarmes, indtil dampene når en tilstrækkelig høj koncentration i luft til at danne en brændbar blanding, som kan antændes.

1.5. Kvalitetskriterier

1.5.1. *Repeterbarhed*

Repeterbarheden varierer med flammepunktsområdet og den anvendte prøvningsmetode; max. ± 2 ° C.

1.5.2. *Følsomhed*

Følsomheden afhænger af den anvendte prøvningsmetode.

1.5.3. *Specificitet*

Visse prøvningsmetoders specificitet er begrænset til visse flammepunktsområder og er afhængig af stoffernes egenskaber (f.eks. høj viskositet).

1.6. Metodebeskrivelse

1.6.1. *Forberedelse*

En prøve af stoffet udtages og anbringes i et prøvningsudstyr i henhold til 1.6.3.1 og/eller 1.6.3.2.

1.6.2. *Prøvingsbetingelser*

Apparatet anbringes så vidt muligt trækfrit.

1.6.3. *Udførelse af prøvningen*

1.6.3.1. Ligevægtsmetoden

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

1.6.3.2. Ikke-ligevægtsmetoden

Abel apparat:

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

Abel-Pensky apparat:

se: (EN 57), DIN 51755 part 1 (for temperaturer fra 5 til 65 °C) og DIN 51755 part 2 (for temperatur 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 part 34, NF M07-019.

Bemærkninger:

Når flammepunktet, bestemt ved ikke-ligevægtsmetode i 1.6.3.2, findes at være:

0 ± 2° C, 21 ± 2° C, 55 ± 2° C,

bør det bekræftes ved en ligevægtsmetode under anvendelse af det samme apparat.

Kun de metoder, der kan give temperaturen for flammepunktet, kan bruges ved en anmeldelse.

Til bestemmelse af flammepunktet for tyktflydende væsker (malinger, lim og lignende) indeholdende opløsningsmidler, må der kun anvendes apparater og prøvningsmetoder, som er velegnede til bestemmelse af tyktflydende væskers flammepunkt. Se: ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213, del 1.

2. **DATA**

3. **RAPPORTERING**

Rapporten skal, om muligt, omfatte følgende oplysninger:

— nøjagtig specifikation af stoffet (identifikation og urenheder),

— metoden skal anføres såvel som eventuelle afvigelser,

— resultaterne og alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkningen af resultaterne må rapporteres.

4. **REFERENCER**

Ingen.

A. 10. ANTÆNDELIGHED — FASTE STOFFER

1. METODE

1.1. Indledning

Det er nyttigt at have forhåndskendskab til stoffets mulige eksplosive egenskaber før prøvningens udførelse.

Denne prøvning bør kun anvendes på pulverformige, granulære og pastaagtige stoffer.

For ikke at medtage alle stoffer, der kan antændes, men kun de stoffer, som brænder hurtigt, eller som på den ene eller den anden måde har særligt farlige egenskaber ved forbrænding, betragtes kun stoffer, hvis forbrændingshastighed overstiger en vis grænseværdi, for at være letantændelige. Desuden bør metalpulvere, som kan forgløde, også anses for at være let antændelige, hvis forglødningen forsætter gennem prøven.

Sådan forglødning og de dermed forbundne vanskeligheder ved at bekæmpe en brand er hovedårsagen til, at metalpulver er særligt farlige. Normale slukningsmidler såsom kuldioxid og/eller vand kan forøge faren betydeligt.

1.2. Definitioner og enheder

Forbrændingstiden udtrykkes i sekunder.

1.3. Referencematerialer

Ikke specificeret.

1.4. Metodens princip

Stoffet i dets kommercielle tilstand formes til en vold på 250 mm. Derefter forsøges prøven antændt under de i 1.6.3 definerede betingelser og forbrændingstiden måles.

1.5. Kvalitetskriterier

1.6. Metodebeskrivelse

1.6.1. *Forberedelser*

Hvis stoffet foreligger som pulver eller granulat, fyldes produktet i den tilstand, hvori det forhandles, løst i en form. Formen er fremstillet af metal, har en længde på 250 mm og triangulært tværsnit med indvendig højde på 10 mm og indvendig bredde 20 mm. På hver side af formen i længderetningen er monteret en metalplade, der rager 2 mm op over den øverste kant af det triangulære tværsnit (figur 1). Formen bringes derefter til fald tre gange fra 2 cm's højde ned på en fast overflade. Om nødvendigt efterfyldes formen. Derefter fjernes sidestykkerne og overskydende stof skrabes af. En ubrændbar og ikke-porøs plade anbringes oven på formen, apparatet vendes og formen fjernes.

Pastaagtige stoffer bredes ud på en ubrændbar overflade i form af en 250 mm lang pølse med et tværsnitsareal på ca. 1 cm^2.

En passende antændingskilde såsom en lille flamme eller en glødetråd med en temperatur på mindst 1 000° C anvendes til at tænde volden i den ene ende.

1.6.2. *Prøvningsbetingelser*

Hvis stoffet er følsomt overfor fugt, skal prøvningen udføres så hurtigt som muligt efter at stoffet er fjernet fra beholderen.

1.6.3. *Udførelse af prøvningen*

Antænd den ene ende af volden. Når 80 mm af volden er brændt, måles forbrændingshastigheden over de næste 100 mm. Prøvningen udføres seks gange under anvendelse af et rent koldt underlag hver gang.

2. DATA

Værdierne af forbrændingstiden, bestemt ved seks prøvninger, er nødvendige for vurderingen.

3. RAPPORTERING

3.1. Prøvningsrapport

Rapporten skal, om muligt, indeholde følgende oplysninger:

— præcis specifikation af stoffet (identifikation og urenheder)

— en beskrivelse af det undersøgte materiale, dets fysiske tilstandsform inklusive indhold af fugtighed,

— måleresultaterne,

— alle yderligere oplysninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

3.2. Fortolkningen af resultaterne

Pulvere, granulater eller pastaagtige stoffer anses for at være letantændelige, når forbrændingstiden i en af de seks prøvninger, udført i overensstemmelse med fremgangsmåden, beskrevet i 1.6., er mindre end 45 sekunder. Pulvere af metaller eller metallegeringer anses for at være letantændelige, hvis de kan antændes, og flammen eller reaktionszonen udbredes over hele prøven.

4. REFERENCER

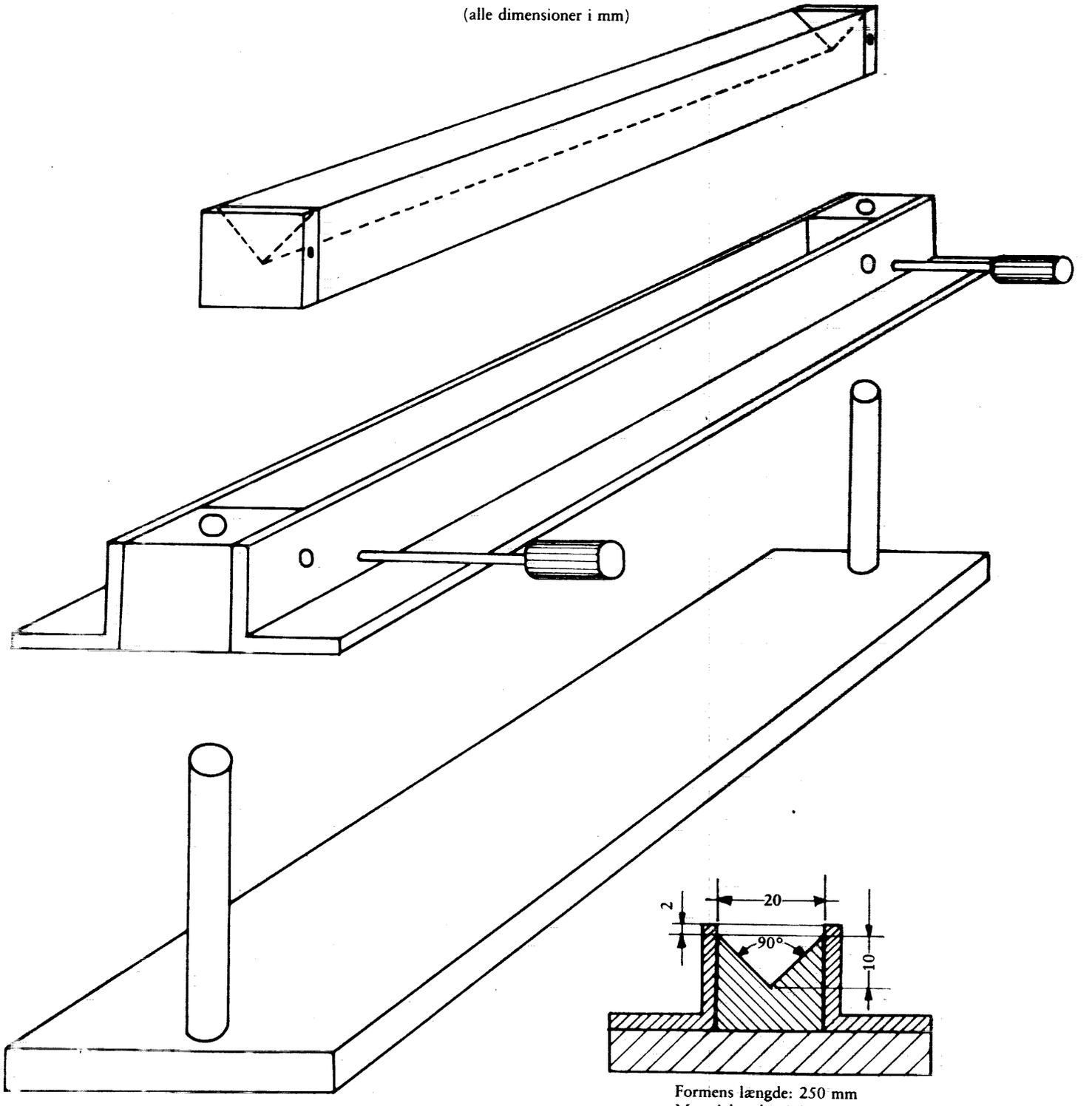
Ingen

Tillæg

Figur 1

Form og tilbehør til tilberedning af prøvevold

(alle dimensioner i mm)



Formens længde: 250 mm
Materiale: aluminium

A. 11. ANTÆNDELIGHED — GASSER

1. METODE

1.1. Indledning

Denne metode gør det muligt at bestemme, om gasser i blanding med luft ved stuetemperatur og atmosfæretryk har et antændelsesområde. Blandinger med stigende koncentrationer af prøvegassen i luft udsættes for en elektrisk gnist, og det iagttages, om der sker en antændelse.

1.2. Definitioner og enheder

Antændelsesområdet er koncentrationsområdet mellem den nedre og den øvre eksplosionsgrænse. Den nedre og den øvre eksplosionsgrænse er de koncentrationsgrænser for den antændelige gas i blanding med luft ved hvilke der ikke sker en flammeudbredelse.

1.3. Referencemateriale

Ikke specificeret.

1.4. Metodens princip

Koncentrationen af gas i luft øges trinvis, og blandingen udsættes ved hvert trin for en elektrisk gnist.

1.5. Kvalitetskriterier

Ikke anført.

1.6. Metodebeskrivelse

1.6.1. *Apparatur*

Prøvningsbeholderen er en opretstående glascylinder med en indre diameter på mindst 50 mm og en højde på mindst 300 mm. Antændelseselektroderne er placeret 60 mm over cylindernes bund med en indbyrdes afstand på 3 til 5 mm. Cylinderen er forsynet med en trykudløsningsåbning. Apparatet skal afskærmes for at begrænse eventuel eksplosionsskade.

Som antændingskilde anvendes en stående induktionsgnist med en varighed på 0,5 sek. Den dannes af en højspændingstransformator med udgangsspænding 10 til 15 kV (højeste indgangseffekt 300 W).

1.6.2. *Prøvningsbetingelser*

Prøvningen skal udføres ved stuetemperatur.

1.6.3. *Udførelse af prøvningen*

Under anvendelse af proportionalpumper indføres en bestemt koncentration af gas i luft i glascylinderen. En gnist føres gennem blandingen, og det iagttages, om en flamme udskiller sig uafhængigt. Gaskoncentrationen varieres i trin på 1 vol %, indtil der sker antændelse som beskrevet ovenfor.

2. DATA

Forekomsten af en flammeudbredelse er det eneste relevante data for bestemmelsen af denne egenskab.

3. RAPPORTERING

Rapporten skal, om muligt, omfatte følgende oplysninger:

— nøjagtig specifikation af stoffet (identifikation og urenheder);

— en beskrivelse, med dimensioner, af det anvendte apparat;

— stuetemperaturen, hvorved prøven er udført;

— de prøvede koncentrationer og de opnåede resultater;

— prøvningsresultatet: ubrændbar gas eller letantændelig gas;

— i tilfælde af konklusionen: »ubrændbar«, skal det anføres, at alle koncentrationer er undersøgt ved at øge koncentrationen i trin på 1 % fra 0 til 100 %;

— alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkningen af resultaterne må rapporteres.

4. REFERENCER

Ingen.

A. 12. ANTÆNDELIGHED — STOFFER OG PRÆPARATER, DER I KONTAKT MED VAND ELLER FUGTIG LUFT UDVIKLER LET ANTÆNDELIGE GASSER I FARLIGE MÆNGDER

1. METODE

1.1. Indledning

Denne prøvningsmetode kan bruges til at bestemme, om et stofs reaktion med vand kan medføre udvikling af farlige mængder gas eller gasser, som kan være letantændelige eller giftige. Prøvningsmetoden kan anvendes både til faste og flydende stoffer. Metoden kan ikke anvendes til stoffer, som antænder spontant ved kontakt med luft.

1.2. Definitioner og enheder

Let antændelig:

Stoffer og præparater, som, ved kontakt med vand eller fugtig luft, udvikler let antændelige gasser i farlige mængder med en mindste hastighed på 1 liter/kg.h. Denne grænse tager ikke hensyn til giftighed af gassen.

1.3. Metodens Princip

Stoffet prøves i den nedenfor anførte trinvise rækkefølge; hvis der sker antændelse på noget trin, er yderligere prøvning unødvendig.

1.3.1. *Trin 1*

Prøven anbringes i en beholder indeholdende destilleret vand ved 20° C og det noteres, om den udviklede gas antændes eller ikke.

1.3.2. *Trin 2*

Prøven anbringes på et filtrerpapir, som flyder på overfladen af en skål indeholdende destilleret vand ved 20° C og det noteres, om den udviklede gas antændes eller ikke. Filtrerpapiret tjener kun til at holde stoffet på ét sted for at øge muligheden for antændelse.

1.3.3. *Trin 3*

Prøven formes til en vold ca. 2 cm høj og 3 cm i diameter. Nogle få dråber vand tilsættes til volden og det noteres, om den udviklede gas antændes eller ikke.

1.3.4. *Trin 4*

Prøven blandes med destilleret vand ved 20° C og gasudviklingens hastighed måles over en periode af syv timer med en times intervaller. Hvis udviklingshastigheden er ujævn eller stigende efter syv timer, bør måletiden udvides til i det højeste fem dage. Prøvningen kan standses, hvis hastigheden på noget tidspunkt overstiger 1 l/kg · h.

1.4. **Referencemateriale**

Ikke specificeret.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Ikke angivet.

1.6. **Metodebeskrivelser**

1.6.1. *Trin 1*

1.6.1.1. Prøvningsbetingelser

Stoffet prøves som det er markedsført og prøvningen udføres ved stuetemperatur (ca. 20° C).

1.6.1.2. Udførelse af prøvningen

En lille mængde (ca. 2 mm i diameter) prøve anbringes i en beholder **indeholdende destilleret vand.** Det noteres, om (i) der udvikles gas, og (ii) om der sker antændelse af gassen. Hvis der sker antændelse af gassen, er yderligere prøvning af stoffet unødvendig, idet stoffet betragtes som farligt.

1.6.2. *Trin 2*

1.6.2.1. Apparatur

Et filtrerpapir anbringes fladt flydende på overfladen af destilleret vand i en egnet beholder, f.eks. en 100 mm afdampningsskål.

1.6.2.2. Prøvningsbetingelser

Stoffet prøves som det er markedsført og prøvningen udføres ved stuetemperatur (ca. 20° C).

1.6.2.3. Udførelse af prøvningen

En lille mængde (ca. 2 mm i diameter) prøve anbringes midt på filtrerpapiret. Det noteres, om (i) der udvikles gas, og (ii) om der sker antændelse af gassen. Hvis der sker antændelse af gassen, er yderligere prøvning af stoffet unødvendig, idet stoffet betragtes som farligt.

1.6.3. *Trin 3*

1.6.3.1. Prøvningsbetingelser

Stoffet prøves som det er markedsført og prøvningen udføres ved stuetemperatur.

1.6.3.2. Udførelse af prøvningen

Prøven formes som en vold, ca. 2 cm høj og 3 cm i diameter med en fordybning i toppen. Nogle få dråber vand tilsættes i fordybningen, og det noteres, om (i) der udvikles gas, og (ii) om der sker antændelse af gassen. Hvis der sker antændelse af gassen, er yderligere prøvning af stoffet unødvendig, idet stoffet betragtes som farligt.

1.6.4. *Trin 4*

1.6.4.1. Apparatur

Apparatet opstilles som vist i figur (se tillæg)

1.6.4.2. Prøvningsbetingelser

Undersøg den beholder, hvori stoffet befinder sig, for pulver < 500 µm (partikkelstørrelse). Hvis pulveret udgør mere end 1 vægtprocent af den samlede mængde, eller hvis prøven er sprød, bør alt stoffet males til pulver før prøvning for at tillade en formindskelse af partikkelstørrelse under lagring og håndtering; ellers anvendes stoffet i den form, hvori det forhandles. Prøvningen bør udføres ved stuetemperatur (20° C) og atmosfæretryk.

1.6.4.3. Udførelse af prøvningen

Der hældes vand i skilletragten på apparatet, og der afvejes tilstrækkeligt af stoffet, maksimalt 25 g, til at udvikle mellem 100 og 250 ml gas. Stoffet anbringes i den koniske kolbe. Rumfanget af den udviklede gas kan måles ved en hvilken som helst egnet metode. Skilletragtens hane åbnes for at lede vand ned i den koniske kolbe, og et stopur startes. Den tid, det tager al gassen at udvikles, noteres, og om muligt foretages målinger ind imellem. Denne prøvning bør udføres tredobbelt.

Hvis gassens kemiske identitet er ukendt, skal gassen analyseres. Hvis gassen ideholder let antændelige bestanddele og det ikke vides, om hele blandingen er letantændelig, skal der fremstilles en blanding med samme sammensætning, som prøves efter prøvningsmetoden (A. 11.).

2. **DATA**

En antændelse eller udvikling af letantændelig gas med en hastighed over 1 l/kg · h i tre forsøg er nok til at anse et stof for farligt (1.6.1), (1.6.2) og (1.6.3).

3. **RAPPORT**

Rapporten skal, om muligt, omfatte følgende oplysninger:

— præcis specifikation og beskrivelse af stoffet som modtages (f.eks. farve, kornstørrelse og fysisk tilstandsform);

— enhver indledende behandling af prøven;

— resultater af prøvningerne;

— kemisk identitet af den udviklede gas;

— gassens udviklingshastighed (1.6.4);

— eventuelle yderligere bemærkninger af betydning for fortolkning af resultaterne.

4. **REFERENCER**

(1) ISO 1773.

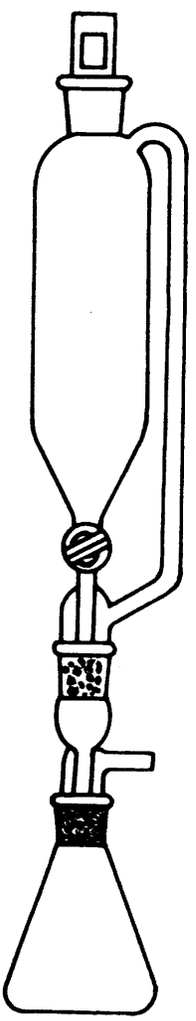
(2) OECD, Paris, Preliminary Test Guideline for the Determination of Substances which give off Highly Inflammable Gases in Dangerous Amounts on Contact with Water A 80/28 — Final report of the OECD chemical testing programme.

(3) U.N. doc. No ST/SG/AC 10/1 rev 1

Tillæg

Figur

Apparatur



A. 13. ANTÆNDELIGHED — FASTE STOFFER OG VÆSKER

1. METODE

1.1. Indledning

Det er værdifuldt at have forhåndskendskab til et stofs selvantændelighed. Prøvningsmetoden kan anvendes til faste og flydende stoffer, som markedsført, som i små mængder vil antænde spontant kort tid efter, at de er kommet i kontakt med luft ved stuetemperatur.

Stoffer, der ikke omfattes af denne metode, er sådanne, som behøver timer eller dage ved stuetemperatur før selvantændelse forekommer, eller sådanne, som skal udsættes for betydeligt højere temperatur, før der sker selvantændelse.

1.2. Definitioner og enheder

Væsker og faste stoffer betragtes som let antændelige, hvis de tænder ved mindst én ud af seks prøvninger under de i 1.6 beskrevne betingelser.

Det kan tillige være nødvendigt at prøve væskers selvantændelighed ved metoden A. 15: Selvantændelighed: bestemmelse af selvantændelsestemperaturen for flygtige væsker og gasser.

1.3. Referencematerialer

Ikke specificeret.

1.4. Metodens princip

Stoffet bringes i kontakt med luft ved en temperatur på 25 ± 10° C i en periode på fem minutter. Hvis der sker antændelse, betragtes stoffet som letantændeligt.

1.5. Kvalitetskriterier

Repeterbarhed: Af sikkerhedsmæssige årsager er bare ét positivt resultat ud af seks prøvninger tilstrækkeligt til at stoffet bedømmes som letantændeligt.

1.6. Beskrivelse af prøvningsmetoden

1.6.1. *Apparatur*

En porcelænsskål med ca. 10 cm diameter fyldes med diatoméjord til ca. 5 mm's højde ved stuetemperatur.

Bemærk:

Diatoméjord eller ethvert andet inaktivt stof, der er alment tilgængeligt, skal anses for repræsentativt for jord, som stoffet er spildt på i uheldstilfælde.

1.6.2. *Udførelse af prøvningen*

a) Pulverformige faste stoffer

1 til 2 cm^3 af den pulverformige prøve hældes fra ca. 1 m's højde ned på en ubrændbar overflade, og det iagttages, om stoffet antænder under faldet eller inden der er gået fem minutter efter at det har lagt sig.

b) Væsker

Ca. 5 cm^3 af den flydende prøve hældes i den klargjorte porcelænsskål, og det iagttages, om stoffet antændes indenfor fem minutter.

2. DATA

Resultaterne af seks prøvninger er relevante ved vurderingen.

3. RAPPORTERING

Rapporten skal, om muligt, omfatte følgende oplysninger:

— en beskrivelse af stoffet, der skal prøves,

— prøvningsresultaterne.

4. REFERENCER

(1) OECD, Paris, Preliminary Test Guideline for the Determination of Pyrophoric Behaviour of Solids and Liquids. A80/23 — Final report of the OECD chemical testing programme.

A. 14. EKSPLOSIVE EGENSKABER

1. METODE

1.1. Indledning

Metoden opstiller et prøvningsskema til bestemmelse af, om et fast, flydende eller pastaagtigt stof eller præparat frembyder fare for eksplosion, når det udsættes for flammepåvirkning (varmefølsomhed) eller stød- eller friktionspåvirkning (følsomhed overfor mekanisk påvirkning).

Metoden består af tre dele:

a) en prøvning for termisk følsomhed;

b) en prøvning for mekanisk følsomhed med hensyn til stød;

c) en prøvning for mekanisk følsomhed med hensyn til friktion.

Metoden giver data til vurdering af sandsynligheden for at initiere en eksplosion ved hjælp af visse almindelige påvirkninger. Metoden tilsigter ikke at fastslå, om et stof er i stand til at eksplodere eller ikke under hvilke som helst betingelser; den tilsigter heller ikke at bestemme i hvilket omfang den begyndende dekomponering kan udvikle sig til at forårsage eksplosion af hele prøven.

Metoden er egnet til at bestemme, om et stof eller præparat vil frembyde fare for eksplosion (termisk eller mekanisk følsomhed) under de særlige betingelser, der er specificeret i direktivet. Prøvningerne er irrelevante, når foreliggende termodynamiske oplysninger (dannelsesvarme, dekomponeringsvarme, fravær af visse reaktive grupper (1) i strukturformlen), hævet over rimelig tvivl fastslår, at stoffet eller præparatet er ude af stand til at nedbrydes, at danne gasser eller være tilbøjelig til hastig varmeafgivelse. Det erkendes, at metoden ikke er definitiv. Den omfatter et antal udvalgte, specificerede apparater, som i vidt omfang anvendes internationalt, og som sædvanligvis giver meningsfyldte resultater.

Den person, som udfører prøvningerne, kan vælge at bruge alternativt apparatur i de tre nævnte metoder, forudsat, at det kan begrundes videnskabeligt, og at apparaturet er internationalt anerkendt. I så faldt skal han bestemme korrelationen mellem sine resultater og dem, der opnås med det beskrevne apparatur.

1.2. Definitioner og enheder

Eksplosiv:

Stoffer og præparater, som kan eksplodere under flammepåvirkning, eller som er mere følsomme over for chok end dinitrobenzen.

1.3. Referencemateriale

Meta-dinitrobenzen, teknisk krystallinsk produkt, til friktions- og chokmetoden.

1.4. Metodens princip

En indledende screeningsprøvning er nødvendig for at fastslå sikre betingelser for udførelse af de tre følsomhedsprøvninger:

1.4.1. *Indledende screeningsprøvning*

Meget små prøver (ca. 10 mg) af stoffet eller præparatet underkastes opvarmning, uden at være indesluttet, med en bunsenbrænder, for stød i et eller andet egnet apparat og for friktion ved anvendelse af en hammer mod en ambolt eller en hvilken som helst form for friktionsmaskine. Formålet er at fastslå, om stoffet er så følsomt og eksplosivt, at de foreskrevne følsomhedsprøvninger skal udføres med specielle forholdsregler for at undgå, at eksperimentatoren kommer til skade.

1.4.2. *Termisk følsomhed*

Metoden indebærer opvarmning af stoffet eller præparatet i en stålbeholder med varierende grader af indeslutning, som tilvejebringes af hulplader med åbninger af forskellig diameter, for at bestemme, om stoffet eller præparatet er tilbøjeligt til at eksplodere under termisk belastning.

1.4.3. *Mekanisk følsomhed* (stød)

Metoden indebærer, at stoffet eller præparaetet udsættes for stød fra en faldhammer på en stålambolt.

1.4.4. *Mekanisk følsomhed* (friktion)

Metoden indebærer, at stoffet eller præparatet udsættes for friktion mellem standardoverflader under specificerede betingelser for belastning og relativ bevægelse.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Ikke angivet.

1.6. **Metodebeskrivelse**

1.6.1. *Apparatur*

1.6.1.1. Termisk følsomhed (virkningen af en flamme)

Stålbeholderen er fremstillet af dybtrukket stålplade (se tillæg). Den har en indvendig diameter på 24 mm, en længde på 75 mm og en vægtykkelse på 0,5 mm. I den åbne ende er beholderen forsynet med en flange til lukning af beholderen (figur 1). Beholderen er forsynet med en trykmodstandsdygtig rund hulplade med et centralt hul, og denne plade fastholdes på beholderen ved hjælp af en todelt forskruning (møtrik og hættemøtrik). Hulpladen (se figur 1) er 6 mm tyk og fremstillet af varmebestandigt chromstål (se tillæg).

Til rådighed for prøvningen findes en række hulplader med forskellige åbningsdiameter (1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ... mm) til at bestemme den grad af eksplosionsfare, der frembydes af stoffet eller præparatet. Møtrikken og hættemøtrikken (i figur 1) består af chrom-mangan stål (se tillæg), som er gnistfrit op til 800° C. Stålbeholderne bruges kun til ét forsøg.

1.6.1.2. Mekanisk følsomhed (stød)

Et typisk faldhammerapparat består i det væsentlige af en støbejernsblok (gråt støbejern) med fod og ambolt, søjle, styr, faldvægt og udløsningsmekanisme. Stålblokken 230 mm (dybde) × 250 mm (bredde) × 200 mm (højde) med støbt fod 450 mm (dybde) × 450 mm (bredde) × 60 mm (højde) bærer stålambolten 100 mm diameter × 70 mm højde, som er skruet på. På stålblokkens bagside fastskrues holderen, i denne fastgøres søjlen, der består af et heltrukket stålrør med 90 mm udvendig og 70 mm indvendig diameter. Fire skruer forankret i en massiv betonblok 60 cm × 60 cm × 60 cm holder faldhammeren på en sådan måde, at skinnerne er absolut lodrette og faldvægten let kan styres.

Faldhammerens vægt skal være 10 kg. Massen består af **massivt stål. Den skal** have en slagflade af anløbet stål, HRC 60 til 63, og en mindste diameter **på** 25 mm. Prøvningerne skal udføres med faldhøjde på 0,4 m.

Prøven, der skal undersøges, anbringes i en matrice bestående af to massive koaksiale stålcylindre, den. ene ovenpå den anden, og en hul stålcylinder som styrering. De massive stålcylindre skal være 10 (−0,003, −0,005) mm i diameter og 10 mm høje samt **have polerede overflader**, afrundede kanter (rundingsradius 0,5 mm) og en hårdhed på HRC 58 til 65. Den hule cylinder skal have en udvendig diameter på 16 mm, en poleret udboring på 10 (+0,005, **+0,010) mm og en højde på** 13 mm.

Hvis der forekommer en eksplosion, må stålcylinderen ikke bruges til yderligere prøvninger.

For at fjerne eksplosionsdampene stilles matriceanordningen oven på en mellemambolt med diameter 26 mm og 26 mm højde, fremstillet af stål, og centreret ved hjælp af en centreringsring med en opspændingsring.

1.6.1.3. Mekanisk følsomhed (friktion)

Friktionsapparatet består af en støbt stålbundsplade (gråt **støbejern), på hvilken selve** friktionsanordningen er monteret, bestående af en fastsiddende porcelænsstang og bevægelige porcelænsplader. Porcelænspladen er fastgjort i en slæde, der bevæger sig mellem to skinner. Slæden drives gennem en drivstang, en eksentrik og et transmissionsgear af en elektromotor på en sådan måde, at porcelænspladen bevæges under porcelænsstangen med frem- og tilbagegående bevægelse på 10 mm. Porcelænsstangen skal belastes med ca. 360 N.

Porcelænspladerne er fremstillet af hvidt teknisk porcelæn, og har dimensionerne 25 mm (længde) × 25 mm (bredde) × 5 mm (højde). Begge friktionsoverfladerne på pladerne er før brænding gjort (ruhedsdybde 9 til 32 µm) ved gnidning med en svamp.

Den cylindriske porcelænsstang er ligeledes fremstillet af hvidt teknisk porcelæn. Den er 15 mm lang, har diameteren 10 mm og halvkugleformede endeflader med krumningsradius 10 mm.

1.6.2. *Prøvningsbetingelser*

1.6.2.1. Termisk følsomhed (virkningen af en flamme)

Stoffet, i den fysiske tilstandsform, det skal leveres i, fyldes **i stålbeholderen** til en højde af 60 mm i tre lige store portioner. Hver portion sammenpresses forsigtigt **ved at påføre overfladen en** kraft på 80 N ved hjælp af et egnet træstempel, der er lidt mindre end beholderen. Ved geleagtige stoffer drages der omsorg for at undgå luftbobler under fyldningen.

1.6.2.2. Mekanisk følsomhed (stød)

Stoffet prøves i tør tilstand. Prøven skal have et volumen på **40 mm³, eller et** volumen, der passer til det beskrevne apparat. For faste stoffer, med undtagelse af pastaer, gælder følgende:

a) pulverformige stoffer sigtes (sigtestørrelse 0,5 mm); alt, **hvad der** passerer gennem sigten, bruges til prøvningen;

b) pressede, støbte eller på anden måde sammenpressede stoffer sønderdeles og sigtes; sigtefraktionen fra 0,5 til 1 mm diameter bruges til prøvningen.

Ved flydende stoffer presses den øverste stålcylinder ned, til den befinder sig i en afstand af 1 mm fra den nederste cylinder, og fastholdes i denne stilling.

1.6.2.3. Mekanisk følsomhed (friktion)

Stoffet prøves i tør tilstand. Prøven skal have et volumen på 10 mm^3. For faste stoffer, med undtagelse af pastaer, gælder følgende:

a) pulverformige stoffer sigtes (sigtestørrelse 0,5 mm); alt, hvad der passerer gennem sigten, bruges til prøvningen;

b) pressede, støbte eller på anden måde sammentrykte stoffer sønderdeles og sigtes; sigtefraktionen < 0,5 mm diameter bruges til prøvningen.

1.6.3. *Udførelse af prøvningerne*

1.6.3.1. Termisk følsomhed (virkningen af en flamme)

Opvarmningen sker med propan fra en industriel trykflaske, forsynet med en trykregulator (500 mbar), gennem en måler og fordelt ved en manifold til de fire brændere. De fire brændere bruger 3,2 l propan i minuttet.

Hvis der bruges andre gasser til opvarmningen, skal der vælges passende brændere, gasforbrug og luftindtag, således at sammenlignende målinger på beholdere fyldt med inerte materialer (sand, dibutylphalat) viser lignende temperatur/tid kurver som opvarmning med propan.

Brænderne placeres rundt om prøvningskammeret som vist i figur 2.

Brænderne justeres på en sådan måde, at spidsen af den indre blå kegle i flammen næsten berører beholderen. Prøvningen udføres i et stålkammer med de i figur 2 angivne dimensioner. Brændernes dimensioner ses i figur 3a og 3b.

To serier på tre prøvninger er obligatorisk, i den første serie bruges en hulplade med et hul på 2 mm i diameter, i den anden bruges et hul større end 2 mm (f.eks. 6 mm) i diameter.

Hvis der sker en eksplosion i første serie (2 mm hul), er det unødvendigt at gå videre til den næste serie. Hvis der ikke er sket en eksplosion efter fem minutter, er prøvningen slut.

1.6.3.2 Mekanisk følsomhed (stød)

I det beskrevne slagapparat udføres seks prøvninger ved at lade 10 kg-loddet falde fra 0,4 m. I andre apparater sammenlignes prøven med m-dinitrobenzen under anvendelse af anerkendt metode (op- og nedteknikken osv.).

1.6.3.3. Mekanisk følsomhed (friktion)

Porcelænsstangen anbringes på den prøve, der skal undersøges, og belastningen hænges på. Under prøvningens udførelse skal slibemærkerne på porcelænspladen ligge på tværs af bevægelsesretningen. Der skal passes på, at stangen hviler på prøven, at der er tilstrækkeligt prøvemateriale under stangen, og at pladen bevæges korrekt under stangen. Porcelænspladen skal bevæges frem og tilbage under porcelænsstangen, en afstand på 10 mm hver vej i løbet af 0,44 sekunder. Hver del af overfladen må kun bruges til en prøvning.

2. DATA

2.1. Behandling af resultaterne

Prøvningen kan afbrydes, så snart der opnås et positivt resultat i én af prøvningerne.

2.2. Vurdering

Principielt anses et stof eller præparat for at frembyde eksplosionsfare i direktivets forstand, hvis:

a) der sker en eksplosion (dvs. beholderen sprænger i tre eller flere fragmenter) indenfor det fastsatte antal prøvninger for termisk følsomhed;
eller

b) en eksplosion (at bryde i brand svarer til eksplosion) sker mindst én gang under seks prøvninger med det beskrevne slagapparat, eller prøven er mere følsom end m-dinitrobenzen i en alternativ slagprøvning;
eller

c) en eksplosion (knitren eller brand svarer til eksplosion) sker mindst én gang under seks prøvninger med det beskrevne friktionsapparet, eller prøven er mere følsom end m-dinitrobenzen i en alternativ friktionsprøvning.

3. RAPPORTERING

3.1. Prøvningsrapport

Prøvningsrapporten skal, om muligt, omfatte følgende oplysninger:

— identitet, sammensætning, renhed, fugtighedsindhold osv. for stoffet eller præparatet, der skal undersøges;

— prøvens fysiske tilstandsform, og om der er foretaget sigtning eller ikke;

— iagttagelser under prøvningerne (reaktionstype, gnister, flamme, eksplosion, antal fragmenter osv.);

— resultater af hver prøvning:

— hvis der har været anvendt alternativt apparat, skal der gives videnskabelig begrundelse, såvel som dokumentation for sammenlignelighed mellem de resultater, der opnås med det beskrevne apparatur, og de som opnås med det tilsvarende apparatur;

— alle brugbarer oplysninger som referencer til prøvninger med lignende produkter, som kan være relevante for den rette fortolkning af resultaterne.

3.2. Fortolkning og vurdering af resultater

Prøvningsrapporten bør nævne ethvert resultat, som betragtes som forkert, afvigende eller ikke-repræsentativt. Hvis nogle af resultaterne lades ude af betragtning, bør der gives en forklaring tillige med resultater af eventuel alternativ eller supplerende prøvning.

Undertiden kan resultatet være en teknisk fejl, som står i forbindelse med stoffets eller præparatets flygtige karakter eller fysiske tilstandsform under prøvningen; i så fald er det værd at vide, hvilket resultat man ville opnå, når stoffet eller præparatet har den tilstandsform, som det har, når det bringes på markedet. Alternativ prøvning kan muligvis oplyse herom. Med mindre et afvigende resultat kan forklares på denne måde, må det tages for gode varer, og i overensstemmelse hermed bruges ved klassifikationen af stoffet eller præparatet.

4. REFERENCER

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

(2) Koenen, H., Ide, K. H., Über die Prüfung explosiver Stoffe, I. Ermittlung der Reibempfindlichkeit, Explosive Stoffe, Vol. 3, 1955, S. 57-65 und S. 89-93.

(3) Koenen, H., Ide, K. H., Über die Prüfung explosiver Stoffe, III. Ermittlung der Empfindlichkeit explosiver Stoffe gegen thermische Beanspruchung in einer Erhitzungskammer mit verschiedenen definierten Öffnungen (Stahlhusenverfahren), Explosive Stoffe, Vol. 4, 1956, S. 119-125, 143-148.

(4) Koenen, H., Ide, K. H., Haupt, W., Über die Prüfung explosiver Stoffe, IV. Ermittlung der Schlagempfindlichkeit explosiver Stoffe von fester, flüssiger und gelatinoser Beschaffenheit, explosive Stoffe, Vol. 6, 1958, S. 178-189, 202-214 und 223-235.

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

Tillæg

Eksempel på materialespecifikation

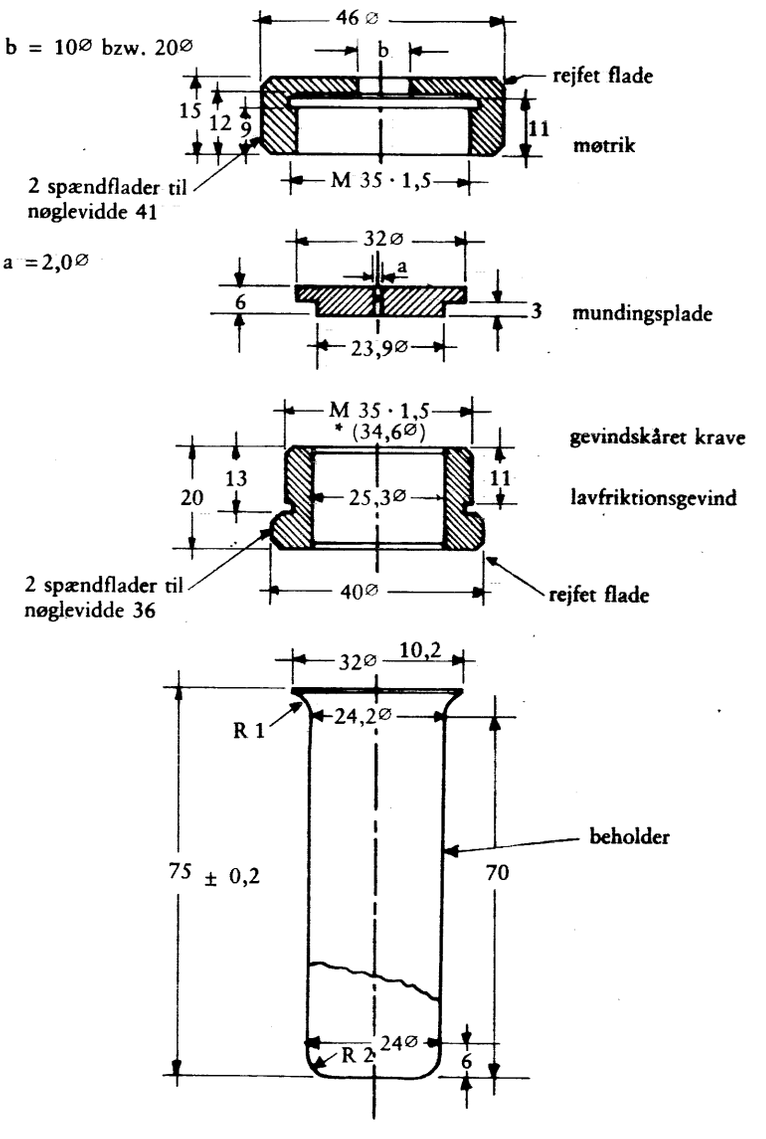
(1) Materialespecification No 1.0336.505 g, i overensstemmelse med DIN 1623 sheet 1.

(2) Materialespecification No 1.4873, i overensstemmelse med sheet »Stahl-Eisen-Werkstoff« 490-52. 490-52.

(3) Materialespecification No 1.3817, i overensstemmelse med sheet »Stahl-Eisen-Werkstoff« 490-52.

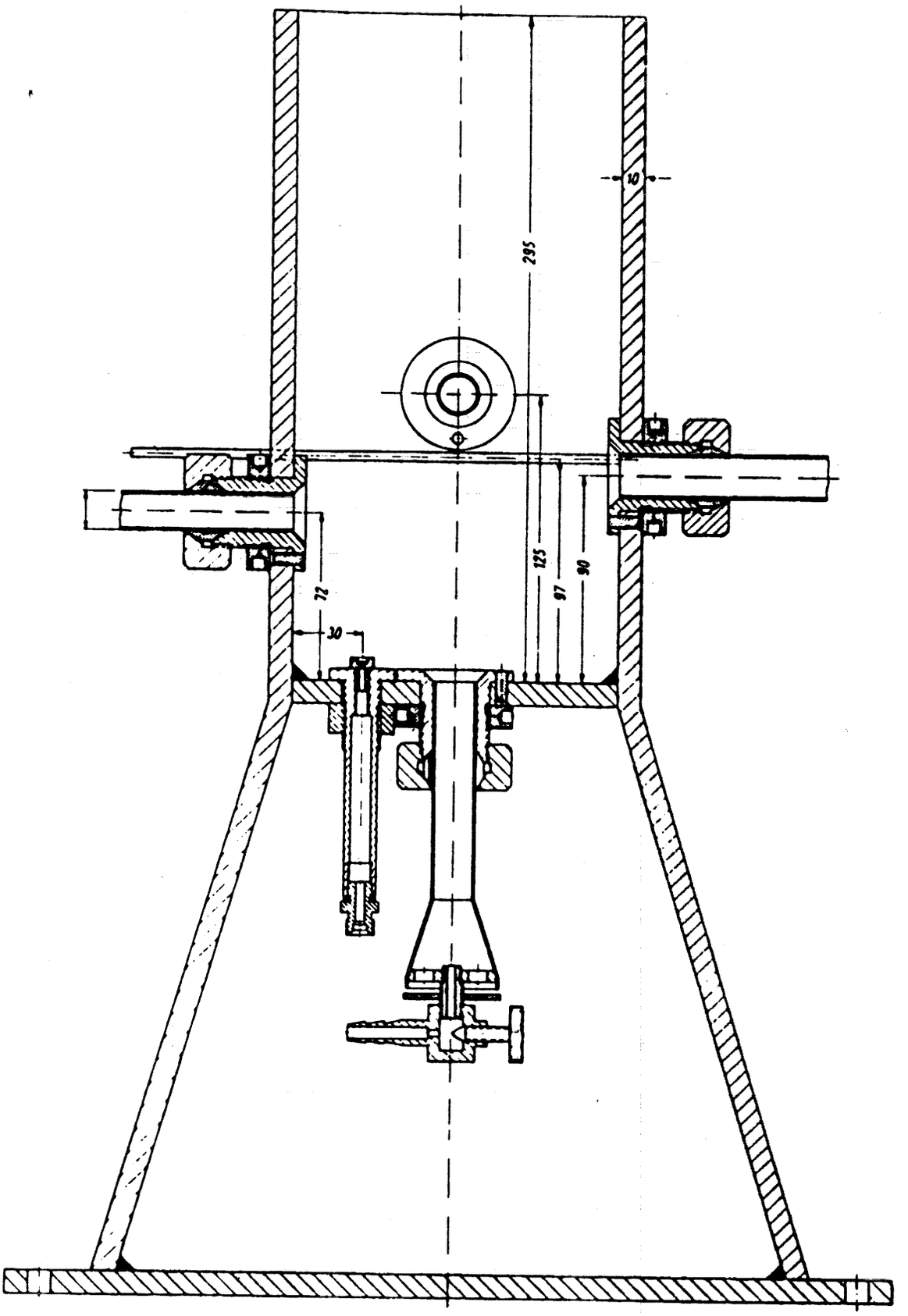
Figur 1

dimensioner i mm



Figur 2

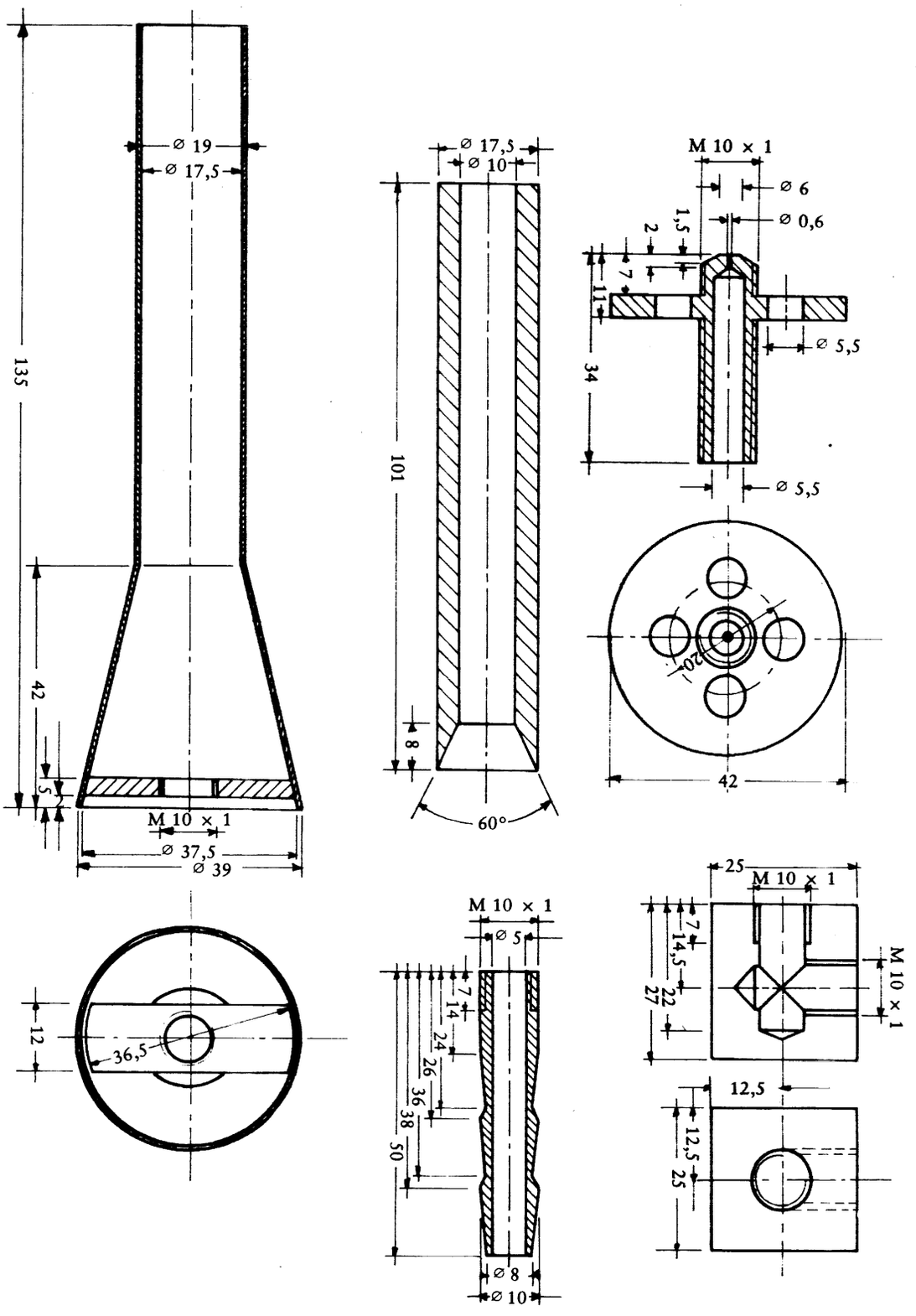
(Dimension i mm)



Figur 3a

Materiale: messing

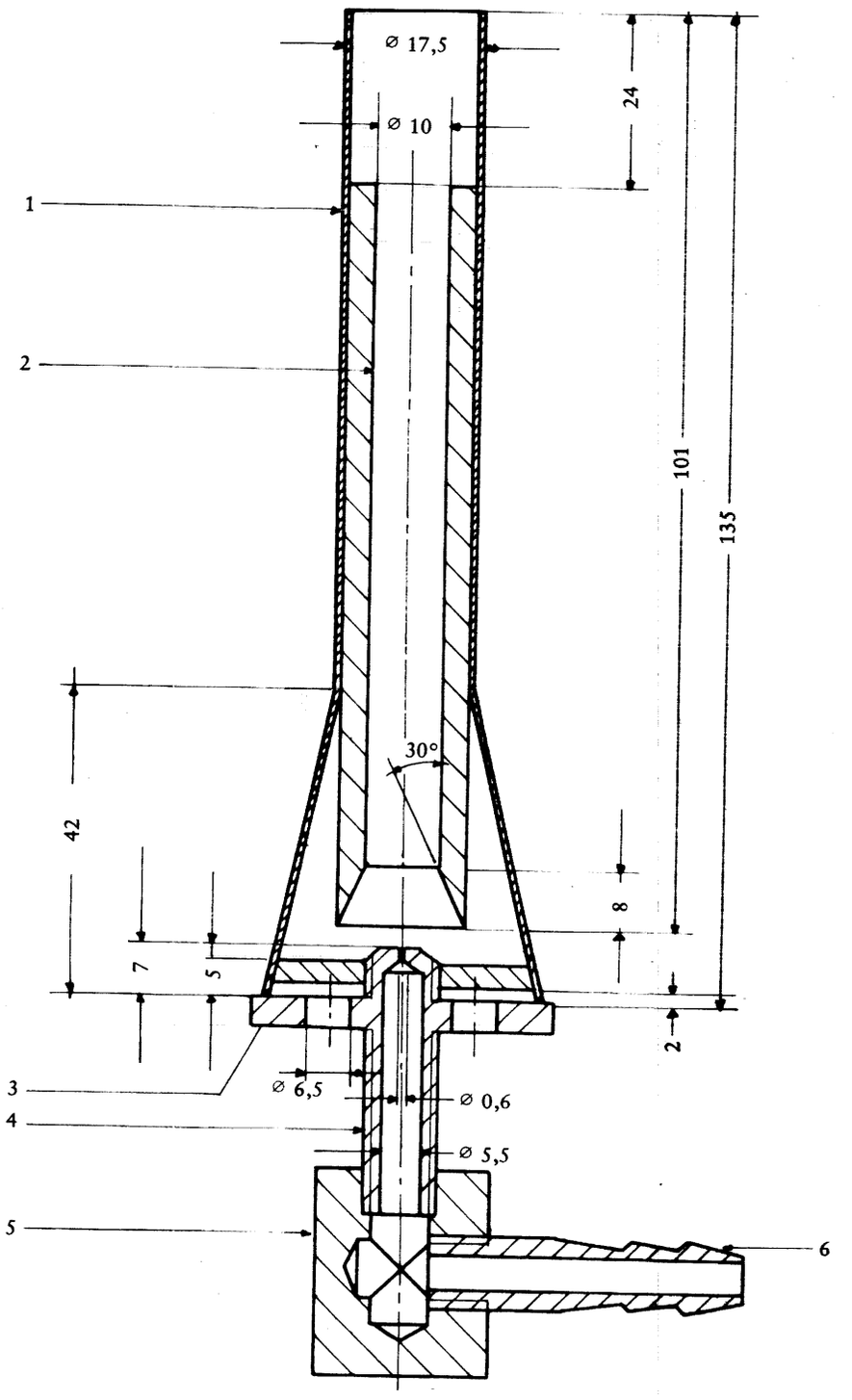
(Dimension i mm)



Figur 3b

Materiale: messing

(Dimension i mm)



A. 15. SELVANTÆNDELIGHED — BESTEMMELSE AF SELVANTÆNDELSESTEMPERATUREN FOR FLYGTIGE VÆSKER OG GASSER

1. METODE

1.1. Indledning

Det er værdifuldt at have forhåndskendskab til et stofs **selvantændelighed**. Prøvningsmetoden kan anvendes på markedsførte stoffer i form af gasser eller flygtige væsker, som enten i sig selv eller ved afgivne dampe kan antændes af en hed overflade under tilstedeværelsen af luft. Selvantændelsestemperaturen kan reduceres betragteligt ved tilstedeværelsen af katalytiske urenheder.

1.2. Definitioner og urenheder

Graden af selvantændelighed udtrykkes ved selvantændelsestemperaturen. Selvantændelsestemperaturen er den laveste temperatur, ved hvilken prøven vil antænde i blanding med luft under de i prøvningsmetoden definerede betingelser.

1.3. Referencematerialer

Ikke specificeret.

1.4. Metodens princip

Gassers og dampes tilbøjelighed til selvantændelse bestemmes under anvendelse af det i IEC 79-4 beskrevne apparatur.

1.5. Kvalitetskriterier

Repeterbarheden varierer afhængigt af området for selvantændelsestemperaturen, og af den anvendte prøvningsmetode; højst ± 5° C.

Følsomheden afhænger af den anvendte prøvningsmetode.

Specificiteten afhænger af den anvendte prøvningsmetode.

1.6. Metodebeskrivelse

1.6.1. *Apparatur*

Apparaturet er beskrevet i den i 1.6.3 refererede metode.

1.6.2. *Prøvningsbetingelser*

En prøve af stoffet prøves i overensstemmelse med den i 1.6.3 refererede metode.

1.6.3. *Udførelse af prøvningen*

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

2. **DATA**

Noter prøvningstemperaturen, atmosfæretryk, anvendt prøvemængde tidsinterval indtil antændelse sker.

3. **RAPPORTERING**

Rapporten skal, om muligt, omfatte følgende oplysninger:

— præcis specifikation af stoffet (identifikation og urenheder).

— anvendt mængde, atmosfæretryk;

— prøvningsresultaterne (prøvningstemperaturer, resultater vedrørende antændelse, tilhørende tidsintervaller);

— alle yderligere bemærkninger af betydning for fortolkningen af resultaterne.

4. **REFERENCER**

Ingen.

A. 16. SELVANTÆNDELIGHED — FASTE STOFFER — BESTEMMELSE AF RELATIV SELVANTÆNDELSESTEMPERATUR

1. METODE

1.1. Indledning

Eksplosive stoffer og stoffer, som antænder spontant ved kontakt med luft ved stuetemperatur, bør ikke underkastes denne prøvning.

Formålet med denne prøvning er at tilvejebringe forhåndsoplysninger om et stofs selvstændelighed ved forhøjede temperaturer. Hvis den varme som udvikles, enten ved stoffets reaktion med oxygen eller ved exotermisk nedbrydning, ikke hurtigt nok afgives til omgivelserne, sker der selvopvarmning, der fører til selvantændelse. Selvantændelse optræder derfor, når hastigheden af varmeproduktionen overstiger hastigheden af varmetabet.

Prøvningsmetoden er værdifuld som foreløbig screeningsprøvning for faste stoffer. I betragtning af de komplicerede forhold ved antændelse og forbrænding af faste stoffer bør selvantændelsestemperaturen, bestemt efter denne metode, kun anvendes til sammenligningsformål.

1.2. Definitioner og enheder

Den selvantændelsestemperatur, der opnås ved denne metode, er den mindste rumtemperatur udtrykt i °C, ved hvilken et bestemt volumen af et stof vil antænde under definerede betingelser.

1.3. Referencematerialer

Ingen.

1.4. Metodens princip

Et bestemt volumen af prøven anbringes i en ovn ved stuetemperatur; temperatur-tidskurven i prøvens midte relativt til omgivelserne optegnes, medens ovnens temperatur øges till 400° C med en hastighed på 0,5° C/min. Den ovntemperatur, ved hvilken prøvens temperatur når 400° C ved selvopvarmning, benævnes selvantændelsestemperaturen i henseende til denne prøvning.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Metodebeskrivelse

1.6.1. *Apparatur*

1.6.1.1. Ovn

En temperaturprogrammeret laboratorieovn (volumen ca. 2 l) udstyret med naturlig luftcirkulation og eksplosionssikring. Det må påses, at ingen nedbrydningsgasser kan komme i kontakt med det elektriske varmelegeme, for at indgå eventuel eksplosionsfare.

1.6.1.2. Terning af ståltrådsnet

Et stykke rustfast ståltrådsnet med 0,045 mm huller klippes til efter mønsteret i fig. 1 (se tillæg). Nettet foldes og lukkes med tråd til terninger, der er åbne foroven.

1.6.1.3. Termoelementer

Egnede termoelementer.

1.6.1.4. Skriver

Enhver to-kanalsskriver der er kalibreret til 600° C eller tilsvarende spænding.

1.6.2. *Prøvningsbetingelser*

Stoffer prøves i deres handelsmæssige form.

1.6.3. *Prøvningens udførelse*

Terningen fyldes med det stof, der skal prøves, og bankes let, idet der tilføjes yderligere materiale, indtil terningen er helt fyldt. Prøven ophænges derefter i ovnens midte ved stuetemperatur. Et termoelement placeres i terningens midte og et andet mellem terningen og ovnvæggen for at registrere ovntemperaturen. Temperaturerne i ovnen og prøven registreres kontinuert, mens ovntemperaturen hæves til 400° C eller til det faste stofs smeltepunkt, hvis det er lavere, med en hastighed på 0,5° C/min. Når stoffet antænder, vil termoelementet i prøven vise en meget skarp temperaturstigning over ovntemperaturen.

2. DATA

Den ovntemperatur, ved hvilken prøvetemperaturen når 400° C ved selvopvarmning er relevant for vurderingen (se figur 2 i tillægget).

3. RAPPORT

Rapporten skal, om muligt, omfatte følgende oplysninger:

— en beskrivelse af det stof der skal prøves,

— måleresultaterne, herunder temperatur/tidskurve,

— alle yderligere bemærkninger af betydning for vurderingen af resultaterne.

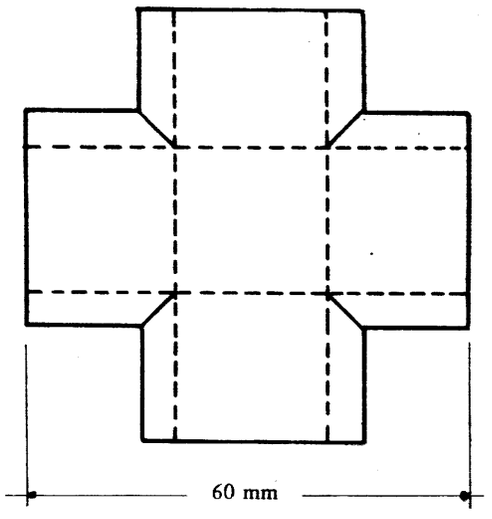
4. REFERENCER

Ingen.

Tillæg

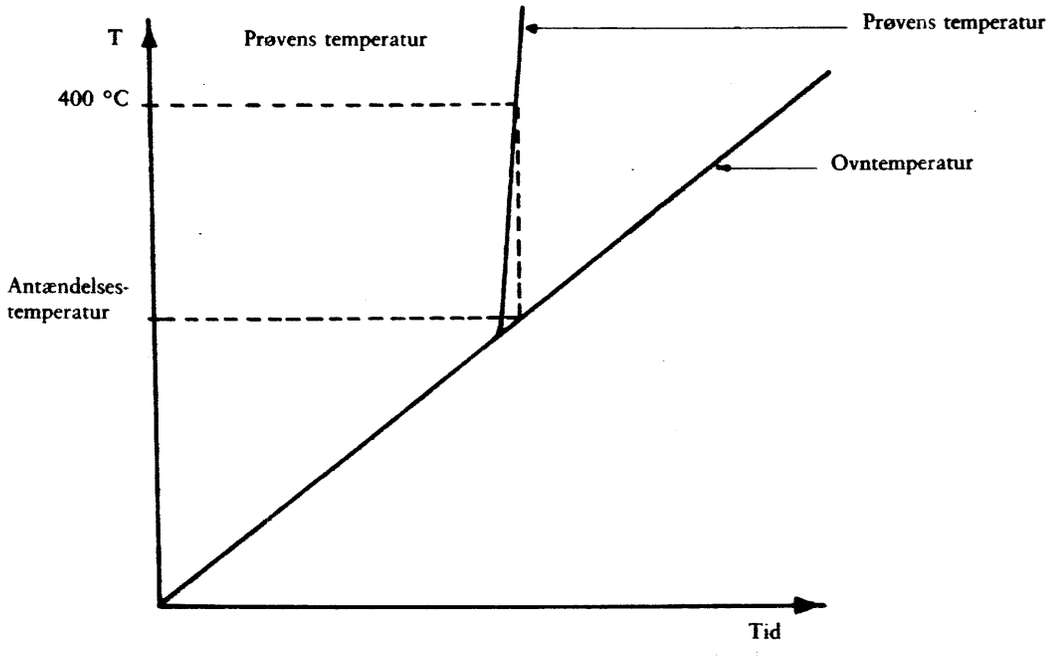
Figur 1

Mønster for 20 mm prøveterning



Figur 2

Typisk temperatur/tidskurve



A. 17. OXIDERENDE EGENSKABER

1. METODE

1.1. Indledning

Det er nyttigt på forhånd at have kendskab til stoffets mulige eksplosive og giftige egenskaber for at udføre denne prøvning.

Prøvningen er uegnet for eksplosive eller letantændelige stoffer, organiske peroxider og for brændbare faste stoffer, som er tilbøjelige til at smelte under prøvningsbetingelserne.

Denne prøvning er irrelevant, når en undersøgelse af strukturformlen uden for enhver tvivl fastslår, at stoffet eller præparatet er ude af stand til at reagere eksotermt med **et brændbart** materiale.

For at fastslå, om prøvningen bør udføres under iagttagelse af særlige forholdsregler, bør der udføres en forhåndsprøvning.

1.2. Definitioner og enheder

Reaktionstid: Den reaktionstid, i sekunder, der kræves for at **reaktionszonen** vandrer langs en prøvevold, efter den procedure, der er beskrevet i 1.6.

Reaktionshastigheden udtrykkes i mm/s.

Største reaktionshastighed: Den største reaktionshastighed, bestemt ved blandinger indeholdende fra 10 til 90 vægtprocent af det oxiderende stof.

1.3. Referencemateriale

Bariumnitrat (analysevare) bruges almindeligvis til prøven og forhåndsprøvningen som referencemateriale.

Kaliumdichromat bør kun bruges til forhåndsprøvningen. Der bør tages særlige forholdsregler ved håndteringen af kaliumdichromat. Referenceblandingen er den blanding af bariumnitrat med cellulosepulver, fremstillet efter 1.6, som har den største reaktionshastighed. (**Normalt en blanding** indeholdende 60 vægtprocent bariumnitrat).

1.4. Metodens princip

Der udføres af sikkerhedshensyn en forhåndsprøvning. Denne forhåndsprøvning vil være tilstrækkelig, når den klart viser, at stoffet eller præparatet har oxiderende egenskaber. Når dette ikke er tilfældet, skal stoffet eller præparatet underkastes yderligere prøvning.

Ved den yderligere prøvning blandes det stof, der skal prøves, og et defineret brændbart materiale i forskellige forhold. Hver blanding formes derefter til en vold, som antændes i den ene ende. Den største reaktionshastighed bestemmes derefter, og sammenlignes med den største reaktionshastighed for referencematerialet.

1.5. Kvalitetskriterier

Hvis det ønskes, kan en hvilken som helst metode til knusning og blanding anvendes, forudsat, at forskellen mellem den største reaktionshastighed for de 6 individuelle prøvninger afviger mindre end 10 % fra den aritmetriske middelværdi.

1.6. **Metodebeskrivelse**

1.6.1. *Forhåndsprøvning*

Det tørrede stof i den form, hvori det forhandles, blandes groft med det tørrede cellulosepulver eller savsmuld i vægtforholdet 2 dele af det stof, der skal prøves, til 1 del tørret cellulose eller savsmuld, og blandingen formes til en lille kegleformet bunke med en grunddiameter på 3,5 cm og en højde på 2,5 cm, ved at fylde, uden at banke, en form (f.eks. en kegleformet laboratorietragt, hvis stilk er tilstoppet).

Bunken placeres på en kold, modstandsdygtig, ikke ledende overflade ovenpå antændelseskilden, som består af inaktiv metaltråd, som f.eks. en platin- eller nikkeltråd (som kan opvarmes elektrisk til ca. 1 000° C). Denne metaltråd anbringes ca. 1 mm over prøvefladen, og den spænder over keglens grundflade. Denne prøvning skal udføres i et stinkskab, som omtalt i 1.6.3. Antændelseskilden tilsluttes og forbliver tilsluttet. Reaktionens styrke og varighed iagttages og registreres.

Stoffet eller præparatet skal betragtes som oxiderende, hvis reaktionen er voldsom.

I alle tilfælde, hvor resultatet er tvivlsomt, er det nødvendigt at fuldføre hele prøvningsrækkefølgen som beskrevet nedenfor.

1.6.2. *Tilberedning*

1.6.2.1. Stoffet der skal prøves

Knus prøven til en partikelstørrelse < 0,125 mm ved følgende fremgangsmåde:

Sigt stoffet i den form, hvori det forhandles.

Knus den tilbageværende del. Gentag fremgangsmåden, indtil alt det oxiderende stof er kommet igennem sigten.

Enhver knusnings- og sigtemetode kan anvendes, hvis den opfylder kvalitetskriteriet.

Før stofferne blandes, tørres de ved 105° C til konstant vægt. Hvis det stof, der skal prøves, dekomponerer ved temperaturer under 105° C, skal det tørres ved en passende lav temperatur.

1.6.2.2. Brændbart stof

Cellulosepulver anvendes som brændbart materiale. Cellulosen skal være af en type, som kan anvendes til tyndtlags- eller søjlechromatografi. En type, hvor mere end 85 % af fiberlængderne ligger mellem 0,075 og 0,020 mm, har vist sig at være egnet. Cellulosepulveret skal kunne passere en sigte med en maskestørrelse på 0,125 mm.

Før blandingen skal cellulosepulveret tørres ved 105° C til konstant vægt.

Hvis der bruges savsmuld i den indledende prøvning, tilberedes nåletræssavsmuld ved at samle den del, der passerer gennem en sigte med maskevidde 1 600 µm, bland omhyggeligt, og tør derefter ved 105° C i fire timer i et højst 25 mm tykt lag.

Lad det afkøle og opbevar det i en lufttæt beholder, så fyldt som muligt, til det skal bruges, helst indenfor 24 timer efter tørring.

1.6.2.3. Blanding

Fremstil blandinger af oxiderende stof og cellulose indeholdende fra 10 til 90 vægtprocent af det oxiderende stof i trin på 10 %.

I grænsetilfælde bør mellemliggende blandinger af oxiderende stof og cellulose anvendes for at finde den største reaktionshastighed mere præcist.

Note:

Blandinger af oxiderende stoffer med cellulose skal betragtes som potentielle eksplosiver og behandles med tilsvarende forsigtighed.

Volden dannes ved hjælp af en form. Formen fremstilles af metal en længde på 250 mm og et trekantet tværsnit med en indre højde på 10 mm og en indvendig bredde på 20 mm. På begge sider af formen er i længderetningen monteret to metalplader som langsgående skinner, som rager 2 mm over det trekantede tværsnits øverste kant (figur).

Ned i denne opstilling drysses så meget af blandingen, at der dannes en lille top. Efter at man har ladet formen falde fra en højde på 2 cm mod en fast overflade, skrabes det tilbageværende overskud væk med en skråtstillet plade. Derefter fjernes de langsgående skinner, og det resterende pulver jævnes med en rulle. Nu placeres en ubrændbar plade ovenpå formen, apparatet vendes, og formen fjernes.

1.6.2.4. Antændelseskilde

En platintråd, der er elektrisk opvarmet til ca. 1 000° C, eller en gasflamme bruges som antændelseskilde.

1.6.3. *Prøvningens udførelse*

Volden anbringes på tværs af trækket i et stinkskab. Lufthastigheden bør være tilstrækkelig til at forhindre gasser i at undslippe ud i laboratoriet. Lufthastigheden bør ikke ændres under prøvningen. En læskærm bør placeres rundt om opstillingen.

Da cellulosen og stofferne, der skal prøves, er hygroskopiske, bør prøvningen udføres så hurtigt som muligt.

Antænd den ene ende af volden ved at berøre den med en flamme eller den glødende platintråd.

Mål reaktionstiden over 200 mm efter at reaktionszonen har vandret de første 30 mm.

Prøvningen udføres derefter med referencematerialet. Prøvningen udføres derefter mindst en gang med hver af rækken af blandinger af prøvematerialet og cellulosen.

Hvis den største reaktionshastighed er betydelig større end referencematerialets, kan prøvningen afbrydes, ellers skal de tre blandinger, som har givet de tre største reaktionshastigheder, hver prøves yderligere fem gange.

2. **DATA**

Af sikkerhedsmæssige grunde skal den største enkeltværdi af reaktionshastighederne — ikke middelværdien — betragtes som værende stoffets karakteristiske oxiderende egenskab.

Den største værdi af reaktionshastigheden ud af seks prøvninger for en given blanding er relevant for vurderingen.

Tegn en kurve for den største reaktionshastighed for hver blanding som funktion af indholdet af oxiderende stof.

Bestem den største reaktionshastighed ud fra kurven.

De seks målte enkeltværdier af reaktionshastigheden i den blanding, som indeholder den største reaktionshastighed, må ikke afvige mere end 10 % fra den aritmetriske middelværdi, ellers skal knuse- og blandemetoderne forbedres.

Sammenlign den fundne største reaktionshastighed med den største reaktionshastighed for referenceblandingen (se 1.3).

3. **RAPPORT**

3.1. **Prøvningsrapport**

Rapporten skal, om muligt, omfatte følgende oplysninger:

— en beskrivelse af det stof, der skal prøves,

— enhver behandling af prøven (f.eks. knusning, tørring ....),

— måleresultaterne,

— reaktionsforløbet (f.eks. forbrænding med flammer fra overfladen, gennembrænding, enhver oplysning om forbrændingsprodukter, ...),

— alle yderligere oplysninger, som er relevante for fortolkningen af resultaterne, herunder en beskrivelse af reaktionens styrke (flammer, gnister, røg, langsom ulmen, osv.) og tilnærmelsesvis varighed fundet ved forhåndsprøvningen for såvel prøven som for referencematerialet.

3.2. **Fortolkning af resultaterne**

Et stof skal betragtes som et oxiderende stof når:

a) der ved den indledende prøvning finder en voldsom reaktion sted,
eller

b) det ved den yderligere prøvning findes, at den største reaktionshastighed for de blandinger, der skal prøves, er større end eller lig med den største reaktionshastighed for blandingerne af cellulose og bariumnitrat.

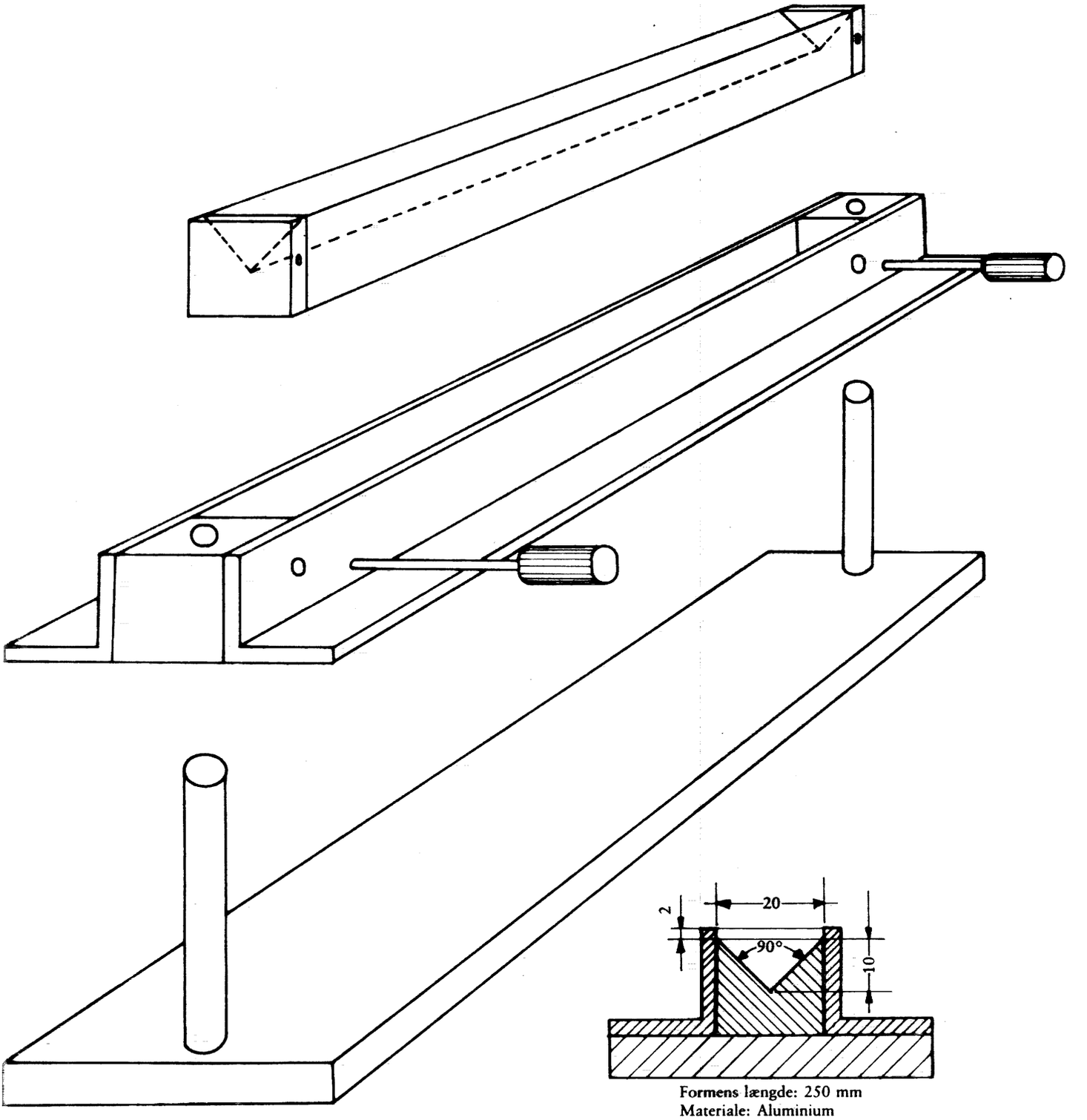
4. **REFERENCER**

Ingen.

Tillæg
Figur

Form og tilbehør til tilberedning af prøvevold

(alle dimensioner i mm)



Formens længde: 250 mm
Materiale: Aluminium

AFSNIT B: METODER TIL BESTEMMELSE AF TOKSICITET

GENEREL INDLEDNING: DEL B

A. INDLEDNING

Se den generelle indledning

B. DEFINITIONER

(I) *Akut toksicitet* omfatter de sundhedsmæssigt uønskede virkninger, der optræder indenfor et givet tidsrum (sædvanligvis 14 dage) efter udsættelse for en enkelt dosis af et teststof.

(II) LD_{50} *(middel letal dosis)* er en statistisk fastlagt enkelt dosis af et teststof, som kan forventes at forårsage 50 % af forsøgsdyrenes død.

En LD_{50}-værdi udtrykkes som vægt af teststof pr. vægtenhed af forsøgsdyr (mg/kg).

(III) LC_{50} *(middel letal koncentration* er en statistisk fastlagt koncentration af et stof, som kan forventes at forårsage 50 % af forsøgsdyrenes død under eksponering eller inden for et fastsat tidsrum efter eksponering i en fastlagt periode. LC_{50} udtrykkes som vægt af teststof pr. enhed luftvolumen (mg/l).

(IV) *Ikke-toksisk dosis* er den største dosis eller det højeste ekspositionsniveau i en test, som ikke forårsager erkendbare sundhedsmæssig uønskede virkninger.

(V) *Subakut/subkronisk toksicitet* omfatter de sundhedsmæssige uønskede virkninger, som ses på forsøgsdyr som resultat af dagligt gentagen indgift af eller eksponering for et kemikalie for en kort tid af dyrenes forventede levetid.

(VI) *Maksimal tolerabel dosis* (MTD) er den højeste dosis som frembringer en toksisk virkning uden samtidig i væsentlig grad at påvirke overlevelsesgraden i det forsøg hvor den anvendes, i kræftforsøg for eks. en toksisk virkning, som ikke skyldes svulstdannelser.

(VII) *Hudirritation* er dannelsen af reversible inflammatoriske forandringer i huden som følge af applikation af et teststof.

(VIII) *Øjenirritation* er dannelsen af reversible forandringer i øjet som følge af applikation af et teststof til den indre overflade af øjet.

(IX) *Hudsensibilisering* (allergisk kontakt dermatitis) er en immunologisk udløst kutan reaktion på et teststof.

C. VURDERING OG FORTOLKNING

Det er kun i begrænset omfang muligt at ekstrapolere resultater af dyreforsøg og *in vitro*-tests direkte til mennesker, hvilket skal tages i betragtning ved vurdering og fortolkning af forsøg.

For så vidt de foreligger, betragtes human data som mere relevante ved vurdering af kemiske stoffers potentielle virkninger på mennesker.

MUTAGENICITET (inklusiv præ-screening test for carcinogenicitet)

Den indledende vurdering af mulig mutagenicitet kræver informationer om to typer af mutationer, nemlig genmutationer og kromosomforandringer.

Disse to typer vurderes ved hjælp af følgende tests:

(I) prøve for dannelse af gen(punkt)mutationer i prokaryotiske celler som *Salmonella typhimurium*. Test der anvender *Escherichia coli* kan også anvendes. Valget mellem disse to testorganismer kan afhænge af, hvilken slags kemikalie der testes.

(II) Prøve for dannelse af kromosomforandringer i pattedyrceller, som er dyrket *in vitro*. Der kan også anvendes en *in vivo* metode (mikro-nucleustest eller metafase analyse af knoglemarvsceller).

D. LITTERATURHENVISNINGER

Toksikologi er en eksperimentel videnskab under udvikling, og der foreligger en omfattende litteratur om de forskellige emner, den behandler. Relevante henvisninger findes i OECD's retningslinier for forsøgsvirksomhed.

Supplerende bemærninger

Pasning af dyr

Ved toksicitetstest er det afgørende, at der føres nøje kontrol med testmiljøet, og at dyrene passes korrekt.

(I) Miljø

Miljøet i forsøgsstalde såvel som i forsøgsdyrsbure skal afpasses efter dyrearten. Passende betingelser for gnavere er en rumtemperatur på 22° C (± 3° C) med en relativ luftfugtighed på 30 til 70 %. For kaniner og marsvin bør temperaturen holdes på 20° C (± 3° C) med en relativ luftfugtighed på 30 til 70 %.

Visse forsøgsteknikker er særlig følsomme for temperatursvingninger. I disse tilfælde omfatter beskrivelse af forsøgsmetoden detaljerede retningslinjer for testmetode.

Temperatur og luftfugtighed bør kontrolleres, registreres og anføres i den afsluttende forsøgsrapport i forbindelse med alle undersøgelser for toksisk effekt.

Når der anvendes kunstigt lys, bør almindeligvis en rytme med 12 timers lys og 12 timers mørke følges. Oplysninger om belysningsrytmen registreres og anføres i den afsluttende forsøgsrapport.

I rapporter over dyreforsøg er det vigtigt at anføre, hvilken type bure der er anvendt og antallet af dyr i hvert bur både under eksponering med et kemikalie og i en efterfølgende observationsperiode.

(II) Fodring

Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, forsøgsdyrsarten stiller. Hvis teststofferne indgives i foderet kan næringsværdien formindskes som følge af reaktion mellem teststoffet og foderets bestanddele.

Muligheden for en sådan reaktion bør tages i betragtning, når forsøgsresultaterne fortolkes.

Forureninger i foderet, som vides at influere på toksiciteten, må ikke forefindes i forstyrrende koncentrationer.

B. 1. AKUT TOKSICITET, ORAL INDGIFT

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Teststoffet indgives med mavesonde i graduerede doser til grupper af forsøgsdyr, idet der gives en bestemt dosis til hver gruppe. Der foretages derefter observationer af virkninger, herunder død. Dyr, der dør under forsøget obduceres. Ved slutningen af forsøget aflives og obduceres overlevende dyr. Denne testmetode er hovedsagelig beregnet til undersøgelser på gnavere.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelser*

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser mht. miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget begyndes. Unge, sunde, kønsmodne dyr skal fordeles randomiseret i grupper inden forsøget begyndes. Teststoffet opløses eller opslæmmes i et passende vehikel. Det anbefales, at der så vidt muligt anvendes en vandig opløsning, og hvis dette ikke er muligt, en opløsning i vegetabilsk olie, en opløsning i andre vehikler eller eventuelt en suspension. Ved ikke-vandige vehikler bør vehiklets relevante karakteristika være kendt eller, hvis de ikke kendes, blive bestemt forud for eller i forbindelse med forsøget. Hos gnavere bør volumen normalt ikke overstige 10 ml/kg legemsvægt, undtagen ved anvendelse af vandige opløsninger, hvor op til 20 ml/kg kan anvendes. Forskelle i volumen skal gøres mindst mulig ved at justere koncentrationen, og således sikre, at volumen er konstant ved alle doser.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Rotter er de fortrukne forsøgsdyr, medmindre der foreligger kontraindikationer. Der benyttes rotter af almindeligt anvendte stammer. For såvel han- som hunrotter gælder det, at vægten af de dyr, som anvendes ved et forsøg, ikke må variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt.

1.6.2.2. Antal og køn

Der anvendes mindst ti gnavere (fem hun- og fem handyr) til hvert dosisniveau. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige.

1.6.2.3. Dosisniveauer

til forsøget anvendes et tilstrækkeligt antal dosisniveauer, mindst tre, og disse skal være valgt således, at der opnås en graduering i de toksiske virkninger i testgrupperne og i dødeligheden. Der skal være tilstrækkelige data til, at der kan fremstilles en dosisvirkningskurve, og til, om muligt, at foretage en rimelig bestemmelse af LD_{50}.

1.6.2.4. Grænsetest

En tilstrækkelig vurdering af et teststofs orale akutte toksicitet vil i de fleste tilfælde være opnået, såfremt der ikke optræder dødsfald som følge af indgift af teststoffet i op til 14 dage efter indgivelse af en dosis på 5 000 mg/kg legemsvægt. (fem dyr af hvert køn pr. gruppe).

1.6.2.5. Observationsperiode

Observationsperioden skal være mindst 14 dage. Observationsperiodens varighed bør dog ikke fastsættes rigoristisk. Den bør bestemmes udfra toksiske reaktioner, hvornår disse indtræder, og af restitutionsperiodens længde; den bør udvides, såfremt det anses for nødvendigt. Tidspunktet for, hvornår symptomer på toksicitet erkendes og forsvinder, samt dødstidspunktet er vigtigt, navnlig hvis der er tendens til, at der indtræffer sene dødsfald.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Dyrene fastes inden teststoffet indgives. Rotter må ikke få foder natten før teststoffet indgives; for dyr med hurtigere stofskifte vil en kortere fasteperiode være hensigtsmæssig, der skal være fri adgang til drikkevand. Den følgende dag vejes dyrene, og teststoffet indgives gruppevis i en enkelt dosis med mavesonde. Hvis det ikke er muligt at give hele dosis på een gang, kan den gives fraktioneret over en periode, der ikke må overstige 24 timer. Når teststoffet er indgivet, kan man undlade at give dyrene foder i yderligere tre til fire timer. Hvis en dosis indgives fraktioneret over en periode, kan det være nødvendigt at give dyrene foder og vand afhængig af, hvor lang en periode der er tale om. Efter indgivelse af teststoffet foretages der systematisk observation, som registreres for hvert enkelt dyr. Observationerne skal foretages hyppigt i løbet af den første dag.

Der skal foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst een gang hver arbejdsdag. Herudover bør dyrene dagligt observeres med henblik på, at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen, dvs. dyr, der findes døde obduceres eller nedfryses, og svage eller døende dyr isoleres eller aflives. Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønsteret. Der bør navnlig foretages en omhyggelig observation for forekomst af rystelser, kramper, spytflåd, diarré, apati, søvn og bevidstløshed. Dødstidspunktet noteres med størst mulig nøjagtighed.

De dyr, der dør under forsøget, og de dyr, der overlever til slutningen af forsøget, obduceres. Alle makroskopisk patologiske forandringer registreres. På indikation udtages der vævsprøver til histopatologisk undersøgelse.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser: antal dyr ved begyndelsen af forsøget, dødstidspunkt for de enkelte dyr, antal dyr, der udviser andre tegn på toksicitet, beskrivelse af toksiske virkninger og obduktionsresultater. Forsøgsdyrenes individuelle vægt bestemmes og registreres kort før teststoffet gives, derefter ugentligt og endeligt på dødstidspunktet. Ændringer i vægt skal beregnes og registreres, når et dyr lever mere end een dag efter indgivelsen af teststoffet. LD_{50} bestemmes efter en anerkendt metode. Evaluering af data bør omfatte sammenhæng mellem dyrenes eksposition for

teststoffet og hyppighed og grad af alle forandringer, herunder adfærdsmæssige og kliniske symptomer, makroskopisk patologiske forandringer, ændringer i legemsvægt, dødelighed og eventuelle andre toksiske virkninger.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst mulig omfang indeholde følgende informationer:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.;

— forsøgsbetingelser;

— dosisniveauer (med angivelse af typen af vehikel, hvor et sådant er anvendt samt koncentration);

— tabelopstilling over reaktioner efter køn og dosis (dvs. antal doserede dyr, antal døde dyr under forsøget, antal dyr der har vist tegn på toksicitet);

— dødstidspunktet efter doseringen;

— kliniske observationer;

— LD_{50} for hvert køn bestemt efter 14. dag (med angivelse af beregningsmetode);

— 95 % konfidensinterval for LD_{50};

— dosis/dødsfaldskurve og hældning (hvor beregningsmetoden muliggør det);

— obduktionsfund;

— eventuelle histopatologiske fund;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

B. 2. AKUT TOKSICITET, INHALATION

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper forsøgsdyr udsættes i en defineret periode for teststoffet i **graduerede koncentrationer**, idet der anvendes en bestemt koncentration til hver enkelt gruppe. **Der** foretages observationer af virkningerne, herunder død. Dyr, der dør under forsøget obduceres. Ved slutningen af forsøget aflives og obduceres overlevende dyr.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelser*

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser mht. miljø og fodring i mindst fem dage, før forsøget indledes. Unge, sunde, kønsmodne rotter skal fordeles randomiseret i det nødvendige antal grupper. De behøver ikke udsættes for simuleret eksposition, medmindre dette indiceres af **den type ekspositionsudstyr**, der anvendes. Om nødvendigt kan der tilsættes et egnet vehikel til teststoffet, således at der opnås en passende koncentration af teststoffet i luften. I så tilfælde skal der i forsøget indgå en kontrolgruppe, der udsættes for vehiklet. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer for at lette doseringen, skal det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Her kan tidligere opsamlede data benyttes.

1.6.2. *Testbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Rotter er den foretrukne dyreart, medmindre der foreligger kontraindikationer. Der benyttes rotter af almindeligt anvendte rottestammer. For såvel han- som hunrotter **gælder det, at** variationen i forsøgsdyrenes vægt ikke må overskride mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt.

1.6.2.2. Antal og køn

Der anvendes mindst ti gnavere (fem hunner og fem hanner) til hvert koncentrationsniveau af stoffet. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige.

1.6.2.3. Ekspositionskoncentrationer

Der skal være tilstrækkelig mange koncentrationsniveauer og mindst tre. De skal ligge så langt fra hinanden, at der opnås testgrupper med en så stor variation i den toksiske virkning og i dødelighed, at der kan tegnes en koncentrations-dødsfaldskurve og foretages en acceptabel bestemmelse af LC_{50}.

1.6.2.4. Grænsetest

Hvis en eksposition af fem han- og fem hundyr på 20 mg/l af en luftart eller 5 mg/l af en aerosol eller et fint fordelt stof i fire timer, eller — hvis dette ikke kan lade sig gøre som følge af fysiske eller kemiske egenskaber (herunder eksplosive) ved teststoffet — den højeste opnåelige koncentration ikke har teststofrelateret dødelig virkning inden for 14 dage, kan yderligere forsøg betragtes som overflødige.

1.6.2.5. Ekspositionstid

Den korteste ekspotionsperiode er fire timer.

1.6.2.6. Udstyr

Dyrene testes med inhalationsudstyr, der er udformet således, at der kan opretholdes en dynamisk luftcirkulation på mindst 12 luftskift pr. time, samtidig med at der sikres et adækvat iltindhold og en jævnt fordelt ekspositionsluft. Benyttes et ekspositionskammer, bør det være således indrettet, at der undgås sammenklumpning af forsøgsdyrene og sikres en så stor eksponering for teststoffet ved inhalation som muligt. Den generelle regel er, at for at sikre en stabil atmosfære, må dyrenes totale »volumen« ikke overstige 5 % af ekspositionskammerets volumen. Ekspositionen kan foregå gennem mund-næse, hovedet alene eller ved kamre til hele kroppen; ved anvendelse af de to første muligheder opnår man, at indtagelsen af testtoffet ad andre veje reduceres.

1.6.2.7. Observationsperiode

Observationsperioden skal være mindst 14 dage. Observationsperiodens varighed bør dog ikke fastsættes rigoristisk. Den bør bestemmes udfra toksiske reaktioner, hvornår disse indtræder og af restitutionsperiodens længde; den bør udvides, såfremt det anses for nødvendigt. Tidspunktet for, hvornår symptomer på toksicitet erkendes og forsvinder, samt dødstidspunktet er vigtige, navnlig hvis der er tendens til, at der indtræffer sene dødsfald.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Kort før ekspositionen vejes dyrene, hvorefter de udsættes for testkoncentrationen i det pågældende ekspositionsudstyr i mindst fire timer, efter at koncentrationen i kammeret er ækvilibreret. Ækvilibreringsperioden bør være af kort varighed. Temperaturen under forsøget bør holdes på 22° C ± 3° C. Under ideelle forhold skal den relative lufttugtighed holdes på mellem 30 % og 70 %, men i visse tilfælde (f.eks. ved testning af aerosoler) kan det være praktisk uigennemførligt. Der gives hverken foder eller vand under ekspositionen. Der anvendes et dynamisk inhalationssystem med et passende analytisk kontrolsystem til sikring af ekspositionskoncentrationen. Det anbefales at foretage en prøvetest for at finde frem til passende ekspositionskoncentrationer.

Systeme bør være af en sådan kvalitet, at der så hurtigt som muligt opnås stabile ekspositionsbetingelser. Lufthastigheden skal tilpasses, således at der er ensartede forhold i hele ekspositionskammeret.

Målinger eller kontrol skal foretages af:

a) Lufthastighed (kontinuerligt)

b) Den faktiske koncentration af teststoffet målt i opholdsarealet. Koncentrationen må under eksposition sperioden ikke variere mere end ± 15 % fra den gennemsnitlige koncentration. Det kan dog være umuligt at opnå en sådan grad af kontrol med fint fordelt stof og aerosoler, i så tilfælde kan større udsving accepteres. For partikler og aerosoler skal der foretages analyser så ofte, som det er nødvendigt, og mindst én gang, for at fastslå om partikelstørrelsen er jævnt fordelt.

c) Temperatur og luftfugtighed.

d) Under og efter eksposition foretages der systematisk observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Observationerne skal foretages hyppigt i løbet af den første dag. Der skal foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst een gang hver arbejdsdag. Herudover **bør dyrene dagligt observeres** med henblik på, at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen, dvs. dyr der findes døde obduceres eller nedfryses, og svage eller døende dyr isoleres eller **aflives. Inspektion** af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinde, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der bør navnlig foretages en omhyggelig observation af respiration, rystelser, kramper, spytflåd, diarre, apati, søvn og bevidstløshed. Dødstidspunktet noteres med størst mulig nøjagtighed. Forsøgsdyrenes vægt bestemmes ugentlig og på dødstidspunktet.

De dyr, der dør under forsøget, og de, der overlever til forsøgets slutning, obduceres med særlig opmærksomhed rettet mod eventuelle ændringer i øvre og nedre del af luftvejene. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres. På indikation udtages der vævsprøver til histopatologisk undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser: antal dyr ved begyndelsen af forsøget, dødstidspunkt for de enkelte dyr, antal dyr, der udviser andre tegn på **toksicitet, beskrivelse af** toksiske virkninger og obduktionsresultater. Ændringer i vægt skal beregnes og registreres, når et dyr lever ud over første dag. LC_{50} bestemmes efter en anerkendt metode. Evaluering af data bør omfatte sammenhæng, hvis et sådant findes, mellem dyrenes eksposition for teststof og hyppighed og grad af alle forandringer, herunder adfærdsmæssige og kliniske symptomer, makroskopisk patologiske forandringer, ændringer i legemsvægt, dødelighed og eventuelle andre toksiske **virkninger.**

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationen

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.;

— Forsøgsbetingelser:

Beskrivelse af ekspositionsudstyret; herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af partikler og aerosoler, metode til konditionering af luften og den måde hvorpå dyrene holdes i et ekspositionskammer, når et sådant benyttes.

Apparatur til måling af temperatur, fugtighed og partikulære aerosolers koncentration skal beskrives.

Eksspositionsdata:

Disse skal opstilles i tabelform og angive middelværdi og variation (standardafvigelse) og bør i videst mulig omfang omfatte:

a) lufthastigheden gennem inhalationsudstyret;

b) luftens temperatur og fugtighed;

c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsudstyret, divideret med luftvolumen);

d) type vehikel hvor et sådant er anvendt;

e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget;

f) middelværdi af patikelstørrelse;

g) ekvilibreringspeirode;

h) ekspositionsperiode;

— tabelopstilling af data over virkninger efter køn og ekspostitionsniveau (dvs. antal dyr eksponeret, antal dyr døde under forsøget, antal dyr, der har vist tegn på toksicitet);

— dødstidspunktet under eller efter eksposition;

— kliniske observationer af dyrene;

— LC_{50} for hvert køn bestemt ved afslutningen af observationsperioden (med angivelse af beregningsmetode);

— dosis-dødsfaldskurve og hældning (hvor beregningsmetoden muliggør det);

— obduktionsfund;

— eventuelle histopatologiske fund;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne;

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

B. 3. AKUT TOKSICITET, OPTAGELSE GENNEM HUDEN

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Teststoffet påføres huden på flere grupper af forsøgsdyr i graduerede doser, idet der gives en bestemt dosis til hver enkelt gruppe. Der foretages observationer af virkningerne, herunder død. Dyr, som dør under forsøget obduceres. Ved slutningen af forsøget aflives og obduceres overlevende dyr.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelser*

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser mht. miljø og fodring i mindst fem dage, før forsøget indledes. Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i forsøgsgrupper. Ca. 24 timer før forsøget begyndes, fjernes pelsen på ryggen af forsøgsdyrene ved klipning eller barbering. Under denne procedure må man passe på ikke at beskadige huden, da det kan ændre dens permeabilitet. Mindst 10 % af kroppens overflade skal gøres klar til påføring af teststoffet. Ved testning af faste stoffer, som — hvis det er hensigtsmæssigt — kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel for at sikre god kontakt med huden. Hvis der anvendes et vehikel, bør man tage hensyn til, om vehiklet har indflydelse på hudens permeabilitet for teststoffet. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Der kan anvendes voksne rotter eller kaniner. Der kan anvendes andre dyrearter, men i så fald skal dette være begrundet. Der benyttes dyr af almindeligt anvendte stammer. For begge køn af forsøgsdyr gælder det, at variationen i deres vægt ikke må overskride ± 20 % af en rimelig gennemsnitsvægt.

1.6.2.2. Antal og køn

Der anvendes mindst ti dyr (fem hunner og fem hanner) med sund, intakt hud til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Det kan i nogle tilfælde begrundes at vælge et mindre antal forsøgsdyr, navnlig når der er tale om kaniner.

1.6.2.3. Dosisniveauer

Til forsøget anvendes et tilstrækkeligt antal dosisniveauer, mindst tre. De skal ligge så langt fra hinanden, at der opnås testgrupper med variation i den toksiske virkning og i dødelighed. Der bør ved doseringen tages hensyn til en eventuel hudirriterende eller ætsende virkning. Der skal være tilstrækkeligt med data til, at der kan tegnes en dosis-virkningskurve, og til, hvor det er muligt, at foretage en acceptabel bestemmelse af LD_{50}.

1.6.2.4. Grænsetest

Hvis en dosis på 2 000 mg/kg legemsvægt eller mere, som påføres intakt hud på mindst fem dyr pr. køn som led i en foreløbig test, ikke medfører teststofrelaterede dødsfald inden for 14 dage, kan yderligere forsøg med andre doser betragtes som unødvendige.

1.6.2.5. Observationsperiode

Observationsperioden skal være mindst 14 dage. Observationsperiodens varighed bør dog ikke fastsættes rigoristisk. Den bør bestemmes udfra toksiske reaktioner, hvornår disse indtræder og af restitutionsperiodens længde; den bør udvides, såfremt det anses for nødvendigt. Tidspunktet for hvornår symptomer på toksicitet erkendes og forsvinder samt dødstidspunktet er vigtige, navnlig hvis der er tendens til, at der indtræffer sene dødsfald.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Dyrene skal holdes i hver sit bur. Teststoffet skal påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10 % af den samlede kropsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet bør påføres så tyndt og ensartet og over så stor en del af området som muligt.

Teststoffet skal holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel i en ekspositionsperiode på 24 timer. Teststedet skal desuden dækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert på plads, så det sikres, at dyrene ikke indtager teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer indtagelse af teststoffet. Fuldstændig immoboliserіng kan ikke anbefales.

Ved ekspositionsperiodens slutning fjernes eventuelt tilbagesiddende teststof, idet der f.eks. anvendes vand eller en anden egnet metode til at rense huden.

Der foretages systematisk observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Dyrene observeres hyppigt i løbet af den første dag. Der skal foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst een gang hver arbejdsdag. Herudover bør dyrene daglig observeres med henblik på, at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen, dvs. dyr der findes døde obduceres eller nedfryses, og svage eller døende dyr isoleres eller aflives. Inspektionen af dyrene skal omfatte forandringer i pels, behandelt hud, øjne og slimhinder, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet samt adfærdsmønsteret. Der bør foretages omhyggelig observation af rystelser, kramper, spytflåd, diarré, apati, søvn og bevidstløshed. Dødstidspunktet skal noteres så præcist som muligt. De dyr, der dør under forsøget, og de, der overlever til forsøgets slutning, aflives og obduceres. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres. På indikation udtages der vævsprøver til histopatologisk undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, dødstidspunkt for de enkelte dyr, antal dyr, der udviser andre tegn på toksicitet, beskrivelse af toksiske virkninger og obduktionsresultater. Dyrenes individuelle vægt registreres kort før teststoffet påføres derefter hver uge og endelig på dødstidspunktet; ændringer i vægt skal beregnes og registreres, hvis dyrene lever mere end en dag efter påføringen af teststoffet LD_{50} bestemmes efter en anerkendt metode.

Evaluering af data bør omfatte sammenhæng, hvis et sådant findes, mellem dyrenes eksposition for teststof og hyppighed og grad af alle forandringer herunder adfærdsmæssige og kliniske symptomer, makroskopisk patologiske forandringer, ændringer i legemsvægt, dødelighed og eventuelle andre toksiske virkninger.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationer:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.;

— forsøgsbetingelser (herunder arten af hudrensningsmetoden);

— dosisniveauer (med angivelse af typen af vehikel, hvor et sådant er anvendt samt koncentration);

— tabelopstilling over virkninger efter køn og dosisniveau (dvs. antal doserede dyr, antal dyr døde under forsøget, antal dyr, der har vist tegn på toksicitet);

— dødstidspunktet efter doseringen;

— kliniske observationer af dyrene;

— LD_{50} bestemt den 14. dag for hvert køn med angivelse af beregningsmetoden;

— 95 % konfidensinterval for LD_{50} (hvor dette kan angives);

— dosis-dødsfaldskurve og hældning, hvor beregningsmetoden muliggør det;

— obduktionsfund;

— eventuelle histopatologiske fund;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

B. 4. AKUT TOKSICITET, HUDIRRITATION

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Teststoffet påføres huden i en enkelt dosis på en række forsøgsdyr, der hver især fungerer som sin egen kontrol. Efter et fastlagt tidsrum vurderes og noteres graden af irritation. Effekten beskrives detaljeret med henblik på en fuldstændig vurdering af virkningerne. Observationerne bør strække sig over et så langt tidsrum, at de fuldt ud giver mulighed for at vurdere en eventuel tilbagevenden til normal tilstand.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelser*

Ca. 24 timer før forsøget begyndes, fjernes pelsen på ryggen af forsøgsdyrene ved klipning eller barbering. Under denne procedure må man passe på ikke at beskadige huden. Der bør kun benyttes dyr med sund og intakt hud.

Ved testning af faste stoffer som — hvis det er hensigtsmæssigt — kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel, for at sikre god kontakt med huden. Hvis der anvendes et vehikel, bør man tage hensyn til, om vehiklet har indflydelse på teststoffets hudirriterende virkning. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet.

Det er ikke nødvendigt at undersøge teststoffer, som er stærkt sure eller alkaliske for akut hudirriterende virkning, da deres ætsende virkning er forudseelig. Det er også unødvendigt at teste stoffer, der har vist en høj grad af toksicitet ved optagelse gennem huden.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Det fortrukne forsøgsdyr er albino kaninen, selv om mange andre pattedyrarter også kan anvendes.

1.6.2.2. Antal dyr

Der anvendes mindst tre sunde kønsmodne dyr. Det kan være nødvendigt at anvende flere dyr, for at afklare usikre responser.

1.6.2.3. Dosisniveauer

Medmindre der foreligger kontraindikationer påføres testarealet 0,5 ml flydende eller 0,5 g fast eller halvflydende teststof. Det er ikke nødvendigt at anvende ubehandlede dyr som kontrolgruppe. Tilstødende, ubehandelede hudområder på hvert enkelt dyr fungerer som kontrol.

1.6.2.4. Observationsperiode

Observationsperiodens varighed bør ikke fastsættes rigoristisk. Den skal være tilstrækkelig lang til fuldt ud at give mulighed for at vurdere den observerede virkning og en eventuel tilbagevenden til en normal tilstand, men behøver i almindelighed ikke at overskride 14 dage efter påføringen.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Dyrene skal holdes i hvert sit bur. Teststoffet påføres et lille hudområde (ca. 6 cm^2) og dækkes med et stykke gaze, som holdes på plads med en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Hvis der anvendes flydende eller pastaagtige teststoffer, kan det være nødvendigt at påføre gazestoffet teststoffet, og derefter placere gazestykket på huden. I ekspositionsperioden bør gazestykket holdes i løs kontakt med huden ved hjælp af en passende semi-okklusiv forbinding. Der kan imidlertid være tilfælde, hvor en okklusiv forbinding er påkrævet. Man skal sikre sig. at dyrene ikke kan komme til at løsne gazestykket og derved indtage/inhalere teststoffet.

Ekspositionperioden er fire timer. Hvis det forventes, at teststoffet vil give en alvorlig hudreaktion (lætsning) må ekspositionsperioden forkortes (eks. til en time eller tre minutter).

Hvis der anvendes en ekspositionsperiode, som er mindre end fire timer, og en alvorlig hudreaktion i agttages, behøver man ikke gentage forsøget med en fire timers ekspositionsperiode. Der kan under visse omstændigheder være indikation for længere ekspositionsperioder, f.eks. når den humane anvendelse berettiger det. Ved ekspositionsperiodens slutning fjernes tilbagesiddende teststof, så vidt muligt ved hjælp af vand eller et egnet opløsningsmiddel, idet man skal undgå at påvirke det fremkomne respons eller beskadige epidermis.

1.6.3.1. Observation og klassificering

Dyrene observeres for erytem og ødem, og respons noteres efter 30—60 minutter og derpå 24, 48 og 72 timer efter, at forbindingen er fjernet. Hudirritation klassificeres i overensstemmelse med tabellen. Det kan være nødvendigt at foretage yderligere observationer for at undersøge eventuel opheling til normal tilstand. I forbindelse med observering for hudirritation bør der gives en fuld beskrivelse af eventuelle alvorlige læsioner f.eks. ætsninger (irreversibel destruktion af hudvæv) eller andre toksiske virkninger.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform, som for hvert enkelt dyr angiver klassificering af erytem og ødem i hele observationsperioden. Man skal beskrive alle alvorlige læsioner, graden og arten af irritation, opheling eller ætsning og eventuelle andre observerede toksiske effekter.

3. RAPPORTERING

3.1. **Forsøgsrapport**

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationer:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.;

— forsøgsbetingelser (herunder kemikaliets relevante fysisk-kemiske egenskaber og den anvendte teknik ved forberedelse og rensning af hud);

— tabelopstilling over hvert enkelt dyrs irritationsrespons i hver enkel observationsperiode (f.eks. 1, 24, 48, 72 osv. timer efter fjernelse af forbindingen);

— beskrivelse af alle alvorlige læsioner, inklusiv ætsning;

— beskrivelse af arten og graden af den observerede irritation og eventuelle histopatologiske fund;

— beskrivelse af eventuelle toksiske virkninger udover hudirritation;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

TABEL

KLASSIFICERING AF HUDENS REAKTION

Erytem og skorpedannelse

	Værdi
Intet erytem	0
Let erytem (knapt diagnosticerbart)	1
Veldefineret erytem	2
Moderat til svært erytem	3
Svært erytem (rødbedefarvet) til let skorpedannelse (dyberegående beskadigelse)	4

Ødemer

Intet ødem	0
Let ødem (knapt diagnosticerbart)	1
Ødem (veldefineret område afgrænset at konstaterbar hævelse)	2
Moderat ødem (afgrænset af ca. 1 mm hævelse)	3
Svært ødem (mere end 1 mm hævelse og udstrækning ud over ekspositionsområdet)	4

B. 5. AKUT TOKSICITET, ØJENIRRITATION

1. METODER

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Et antal forsøgsdyr påføres det ene øje hele teststofdosis. Det ubehandlede øje benyttes som kontrol. Graden af irritation vurderes og klassificeres med bestemte intervaller. Der udarbejdes en udførlig beskrivelse med henblik på en fuldstændig vurdering af virkningerne. Observationerne bør strække sig over så langt et tidsrum, at de fuldt ud giver mulighed for at vurdere regeneration eller persistens af virkningerne.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelser*

Inden for de sidste 24 timer, før forsøget begyndes, undersøges øjnene på de dyr, der foreløbigt er udtaget til forsøget. Dyr, som lider af øjenirritation, øjendefekter eller som tidligere har haft hornhindebeskadigelser anvendes ikke.

Stærkt alkaliske eller stærkt sure teststoffer og stoffer, som i en hudirritationstest eller i andre tests har vist sig at være udpræget ætsende, er det ikke nødvendigt at teste for øjenirritation.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Det anbefales at anvende sunde, kønsmodne albinokaniner, selv om mange andre forsøgsdyr har været anvendt.

1.6.2.2. Antal dyr

Der anvendes mindst tre dyr. Det kan være nødvendigt at anvende flere dyr, for at afklare usikre responser.

1.6.2.3. Dosisniveauer

Ved undersøgelse af flydende stoffer anvendes 0,1 ml. Ved undersøgelse af faste stoffer, pastaer og fintfordelte faste stoffer, anvendes et volumen på 0,1 ml eller **en mængde på ca. 0,1 g** (vægten registreres under alle omstændigheder). Faste og granulerede teststoffer knuses til fine støvpartikler. Partiklernes volumen måles efter let sammenpresning f. eks. frembragt ved små slag på målebeholderen.

1.6.2.4. Observationsperiode

Observationsperiodens varighed bør ikke fastsættes rigoristisk. Den bør være tilstrækkelig lang til at give mulighed for at vurdere, om observerede virkninger **forsvinder eller persisterer**, men behøver normalt ikke overskride 21 dage efter instillation.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Dyrene skal holdes i hvert sit bur. Teststoffet instilleres hos hvert enkelt dyr i det ene øjes nederste øjenlåg, ved forsigtigt at trække det lidt ud fra øjeæblet. Derefter holdes øjenlågene sammen i ca. et sek. for at forhindre, at noget af stoffet løber ud. Det ubehandlede øje fungerer som kontrol.

I 24 timer efter instillation af teststoffet må der ikke foretages skylning af forsøgsdyrenes øjne. Efter 24 timers forløb kan der, hvis det skønnes rimeligt, foretages skylning.

Når et stof i denne test har vist sig at forårsage øjenirritation, kan det undersøges, om øjenudskylning kan reducere irritationen eller andre skadevirkninger. I så tilfælde anbefales det at anvende seks kaniner. Tre kaniner får foretaget en øjenskylning fire sek. efter instillation af teststoffet, og de øvrige tre kaniner får foretaget skylning efter 30 sek. Skylningen varer for begge gruppers vedkommende fem minutter og foregår med et væskevolumen og væsketryk, som ikke beskadiger øjet.

1.6.3.1. Observation og klassificering

Øjnene undersøges efter 1, 24, 48 og 72 timers forløb. Hvis der ikke er tegn på irritation efter 73 timer, kan undersøgelsen afsluttes.

Såfremt der forekommer vedvarende beskadigelse af hornhinden eller anden øjenirritation, kan det være nødvendigt at udvide observationerne for at kunne bestemme udviklingen af læsionerne, om de forsvinder eller persisterer. Samtidig med observation af hornhinde, iris og bindehinder registreres og rapporteres eventuelle andre læsioner. Øjets reaktionsgrad (tabellen) skal registreres ved hver enkelt undersøgelse. (Inddeling af øjets responser i grader kan gøres til genstand for forskellige fortolkninger. Til hjælp for forsøgslaboratorier og personale, der foretager og fortolker observationer, kan en illustreret vejledning om øjenirritationer anvendes.)

Undersøgelse af øjenreaktionerne kan lettes ved anvendelse af binokulær lup, håndspaltelampe, binokulært mikroskop eller andre egnede instrumenter. Efter de første 24 timers observationer kan en eller flere kaniners øjne undersøges yderligere ved hjælp af **fluorescein.**

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hvert enkelt dyr angiver klassificering af øjenirritation på et givet observationstidspunkt. En beskrivelse af arten og graden af irritation og tilstedeværelse af alvorlige læsioner og enhver observeret virkning ud over virkningen på selve øjet skal indgå i rapporten.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationer:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.;

— forsøgsbetingelser (herunder teststoffets relevante fysisk-kemiske egenskaber);

— tabelopstilling over irritations/ætsningsrespons hos hvert enkelt dyr på hvert enkelt observationstidspunkt f. eks. 1, 24, 48 og 72 timer);

— beskrivelse af alle alvorlige læsioner;

— beskrivelse af arten og graden af observeret irritation og ætsning, herunder regeneration til normal tilstand;

— beskrivelse af den anvendte metode til klassificering af irritation efter 1, 24, 48 og 72 timers forløb (f. eks. håndspaltelampe, binokulært mikroskop, fluorescein);

— beskrivelse af eventuelle registrerede lokale virkninger uden for selve øjet;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

TABEL

KLASSIFICERING AF ØJENLÆSIONER

Hornhinden (Corena)

Opacitet: graden af uklarhed (vurdering baseres på det område, der udviser en største uklarhed).

Ingen sårdannelse eller opacitet	0
Spredte eller diffuse områder med opacitet (ud over let tåge i stedet for normal glans), iris klart og detaljeret synlig	1
Umiddelbart skelneligt gennemskinneligt område, let sløring af detaljerne i iris	2
Område med ardannelse, detaljerne i iris ikke synlige, pupilstørrelsen knapt synlig	3
Fuldstændig opacitet, iris ikke synlig gennem opacitet	4

Iris

Normal	0
Markant dybere rugae, kongestion, opsvulmning, moderat hypermæmi omkring hornhinden eller injicerede conjunctiva eller flere af disse symptomer, iris stadig lysfølsom (træg reaktion er positiv)	1
Ingen lysfølsomhed, hæmorragi, makroskopisk synlig beskadigelse (et eller flere af disse symptomer)	2

Bindehinder (conjunctiva)

Rødme (af øjenlågets og øjenæblets bindehinder, hornhinden og iris).

Normale blodkar	0
Nogle blodkar tydeligt hyperæmiske (injicerede)	1
Spredt højrød farvning, de enkelte kar ikke klart skelnelige	2
Spredt mørkerød farvning	3

Chemosis: øjenlåg og/eller blinkhinde

Ingen opsvulmning	0
Unormal opsvulmning (omfattende blinkhinden)	1
Tydelig opsvulmning med partiel udkrængning af øjenlågene	3
Opsvulmning med halvt lukkede øjenlåg	3
Opsvulmning med øjenlågene mere end halvt lukkede	4

B. 6. AKUT TOKSICITET, HUDSENSIBILISERING

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden/Guinea Pig Maximisation Test

Efter den første eksposition for teststoffet (»induktionsperioden«) udsættes dyrene to uger efter den sidste eksposition for en provokationsmængde af teststoffet med henblik på at konstatere, om der er opstået hypersensibilitet. Sensibilisering konstateres ved at undersøge hudens reaktion ved provokation med teststoffet.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelser*

Unge, sunde dyr (under et år gamle) fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper. Før forsøget begyndes fjernes pelsen på skuldrene af forsøgsdyrene ved klipning eller barbering. Man må passe på ikke at beskadige huden.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Som forsøgsdyr anvendes albinomarsvin.

1.6.2.2. Antal og køn

Der anvendes han- og/eller hundyr. Såfremt der benyttes hundyr, må de ikke have født, og de må ikke være drægtige. Der benyttes tyve dyr i forsøgsgruppen og mindst ti i kontrolgruppen. Anvendes der færre dyr, skal det begrundes.

1.6.2.3. Dosisniveauer

Koncentrationen af teststoffet bestemmes i forhold til den **højeste dosis**, der i induktionsfasen ikke har vist sig at have toksisk effekt.

Provokationsmængden må ikke forårsage hudirritation hos ikke-sensibiliserede dyr. Koncentrationen kan bestemmes i en forundersøgelse f.eks to til tre dyr.

1.6.2.4. Observationsperiode

Under induktionsperioden observeres for eventuel hudirritation. Efter provokationen registreres hudens reaktion efter 48 og 72 timer.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Dyrene vejes før induktionsperioden og efter forsøgets afslutning. Pelsen klippes på ryggens skulderregion. Der er to stadier i fremgangsmåden:

1.6.3.1. Induktion

Dag 0-Forsøgsgruppe.

Følgende intradermale injektioner gives parvis i skulderregionen. Hvert injektionspar placeres på hver side af midterlinjen.

1) 0,1 ml af Freunds komplette adjuvant (FCA),

2) 0,1 ml af teststoffet, eventuelt i vehikel,

3) 0,1 ml teststof i FCA.

De under 1) og 2) nævnte injektioner placeres tæt på hinanden og nærmest ved hovedet. Den under 3) nævnte placeres i den bageste del af testområdet.

Dag 0-Kontrolgruppe.

Følgende intradermale injektioner foretages parvis på samme steder som ovenfor nævnt.

1) 0,1 ml FCA,

2) 0,1 ml vehikel,

3) 0,1 ml vehikel i FCA.

Dag 7-Forsøgsgruppe.

Hårene fjernes igen fra testområdet. Teststoffet, i passende vehikel, fordeles over et stykke filtrerpapir, placeres på testområdet og holdes på plads med en passende forbinding i 48 timer. (Væsker kan, hvis det skønnes rimeligt påføres direkte).

Dag 7-Kontrolgruppe.

Hårene fjernes igen fra testområdet. Vehikel påføres huden på den tidligere nævnte måde og holdes på plads med en passende forbinding i 48 timer.

1.6.3.2. Provokation

Dag 21.

Pelsen fjernes fra flanken af dyr i forsøgs- og i kontrolgruppen. På forsøgsdyrenes venstre side fastgøres en lap eller et kammer indeholdende teststoffet, og på deres højre side fastgøres en lap eller et kammer med vehikel. Lapperne holdes i kontakt med huden ved **hjælp af passende** forbindinger i 24 timer. Kontrolgruppen behandles på samme måde.

Dag 23 og 24.

21 timer efter at lappen er fjernet, renses provokationsområdet, og **barberes om nødvendigt.**

3 timer senere (48 timer efter provokationseksponeringen begyndte) **registreres** og klassificeres hudens reaktio.

24 timer efter denne observation (72 timer) observeres og klassificeres på ny.

Resultaterne fra den første provokationseksposition kan om **nødvendigt** uddybbes ved en fornyet provokationseksposition, med en ny vehikelkontrolgruppe, ca. en uge efter den første eksposition.

1.6.3.3. Observation og klassificering

Enhver hudreaktion og enhver usædvanlig virkning af induktionen **og** provokationseksposition skal registreres og klassificeres.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hvert enkelt dyr angiver hudens reaktion i forbindelse med hver enkelt observation.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationer:

— anvendt marsvinstamme;

— forsøgsbetingelser;

— dyrenes antal, alder og køn;

— hvert dyrs individuelle vægt ved forsøgets begyndelse og slutning;

— hver enkelt observation af hvert enkelt dyr inklusive klassificeringssystemet, hvis et sådant er anvendt;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

Bemærkninger

Maksimeringstest på marsvin (GPMT) er en meget anvendt test af **adjuvanttypen,** skønt der kan benyttes en række andre metoder (anført i vedlagte oversigt) til at **undersøge** et stofs potentielle sensibiliserende effekt. Maksimeringstesten er den normalt foretrukne (reference) metode.

Testens sensitivitet og dens evne til at afsløre potentielle sensibiliserende stoffer for menneskets hud anses for at være af stor betydning i et klassifikationssystem for toksicitet med relevans for en befolknings sundhed. Et eventuelt valg af en anden test må begrundes, og der må anføres kriterier for dens validitet. Et af kriterierne må være en forventet reaktion på standardallergener såsom 2,4-dinitrochlorbenzen eller p-fenylendiamin eller et andet stærktvirkende sensibiliserende stof, der passer til den gruppe af stoffer, der testes.

Der findes ikke nogen enkelt testmetode, hvorved man med sikkerhed kan identificere alle stoffer, som besidder mulighed for at sensibilisere menneskets hud, og som kan anvendes til alle stoffer.

Faktorer som et stofs fysiske egenskaber, herunder dets evne til at trænge igennem huden, og den måde, hvorpå mennesker, som formodes at kunne blive udsat for det, kommer i kontakt med stoffet, må tages i betragtning ved valget af test. Forsøg med marsvin kan underopdeles i adjuvant-typen, hvor en allergisk tilstand forstærkes, når forsøgsstoffet opløses eller opslæmmes i Freunds komplette adjuvant (FCA), og non-adjuvant-typerne. I visse tilfælde kan der være god grund til at vælge en test, hvor der benyttes lokal applikation fremfor intradermal injektion, som ved maksimeringstesten på marsvin.

Også her bør der tages hensyn til forsøgsstoffets fysiske egenskaber og de betingelser, hvorunder mennesker formodes at kunne blive udsat for det.

Sensibiliteten hos den marsvinestamme, der anvendes til hudsensibiliseringstests, må kontrolleres med regelmæssige mellemrum (hvert halve år) ved anvendelse af kendte, stærke og moderat sensibiliserende stoffer, og der skal opnås et tilfredsstillende antal positive reaktioner.

Tabel

Test	Draize	Freunds komplette adjuvant (FCA)	Maurer optimering	Buehler	Åben epikutan test	Split adjuvant
Dyreart	marsvin	marsvin	marsvin	marsvin	marsvin	marsvin
Administrationsmåde	intradermal (id)	intradermal (id)	intradermal (id)	epikutan (ec)	epikutan (ec)	id og ec
Antal i testgruppe	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
Antal testgrupper	1	1	1	1	1—6	1
Antal i kontrolgruppe	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
Induktionseksposition						
Administrationsmåde	id	id	id	dermal	dermal	id og dermal
Antal ekspositioner	10	5	9	3	20 eller 21	4
Ekspositionsperiode	—	—	24 timer	6 timer hver	fortløbende	48 timer hver
Laptype	—	—	—	lukket	åben	lukket
Testgruppe(r)	TS [1]	TS i FCA	TS i FCA	TS	TS	TS
Kontrolgruppe	—	kun FCA	—	—	kun vehikel	—
Placering	v. side	h. side	ryg	v. side	h. side	skulder
Frekvens	hver anden dag	hver anden dag	hver anden dag	hver 7. dag	daglig	0, 2, 4, 7. dag
Varighed	0—18 dage	0—8 dage	0—21 dage	0—14 dage	0—20 dage	0—7 dage
Koncentration	2—10 dobbelt så meget som første	samme hele tiden	0,1 ml á 0,1 %	samme hele tiden	samme pr. gruppe forskellig for grupperne	samme hele tiden
Provokations eksposition						
Administrationsmåde	id	dermal	id	dermal	dermal	dermal
Antal ekspositioner	1	2	1	1	2	1
Dag(e)	35	22 og 35	14 og 28	28	21 og 35	20
Ekspositionsperiode	—	—	24 timer	6 timer	—	24 timer
Laptype	—	åben	—	lukket	åben	lukket
Testgruppe(r)	TS	TS	TS	TS	TS	TS
Kontrolgruppe	TS	TS	TS	TS	TS	TS
Placering	h. side	v. side	ryg, nyt sted	h. side	v. side	skulder
Koncentration	samme som første	4 forskellige	0,1 ml á 0,1 %	samme som induktion	4 forskellige	halv induktion
Evaluering (timer efter provokation)	24, 48	24, 48, 72	24	24, 48	24, 48 og/eller 72	24, 48

[1] TS = Teststoffer.

B. 7. SUBAKUT TOKSICITET, ORAL INDGIFT

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Teststoffet indgives oralt dagligt i graduerede doser til grupper af forsøgsdyr. Der gives en dosis pr. gruppe gennem en periode på 28 dage. Dyrene observeres dagligt i doseringsperioden. Eventuelle tegn på en toksisk virkning registreres. Dyr, der dør under forsøget obduceres, og dyr, der overlever til forsøgte afslutning, aflives og obduceres.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelser*

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser mht. miljø og fodring i mindst fem dage inden forsøget begyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i grupper. Teststoffet kan indgives med foderet, med mavesonde, i kapsler eller i drikkevandet. Alle dyr bør underkastes samme administrationsform i hele forsøgsperioden. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer med henblik på at lette doseringen, skal det være vist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Her kan tidligere opsamlede data benyttes.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Rotten er det foretrukne forsøgsdyr, medmindre der foreligger kontraindikationer. Der benyttes unge sunde rotter af almindeligt anvendte stammer. Doseringen bør ideelt påbegyndes inden rotterne er seks uger, og under alle omstændigheder inden de er otte uger gamle. Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke afvige mere end ± 20 % fra gennemsnitsvægten.

1.6.2.2. Antal og køn

Der anvendes mindst ti dyr (fem hun- og fem handyr) til hver dosisniveau. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør det oprindelige antal forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Man kan samtidig indgive en satellitgruppe på ti dyr (fem af hvert køn) den højeste dosis i 28 dage og observere, i en periode på 14 dage efter forsøget. hvorvidt toksiske virkninger er reversible, persisterende eller indtræder forsinket.

1.6.2.3. Dosisniveauer

Der skal anvendes mindst tre dosisniveauer samt en kontrolgruppe. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne, bortset fra indgiften af teststoffet. Hvis der anvendes et vehikel for at lette doseringen, bør kontrolgruppen indgives vehiklet på samme måde som forsøgsgrupperne, og der bør indgives samme mængde vehikel som til forsøgsgruppen, der modtager den største dosis. Den højeste dosis bør have toksisk effekt, men kun få eller ingen dødsfald. Det laveste dosisniveau bør ikke have nogen toksisk virkning overhovedet. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, bør det laveste dosisniveau overskride denne eksponering. Ideelt set bør middeldosis frembringe de mindste observerbare toksiske effekter. Hvis der anvendes mere end tre dosisniveauer, bør de vælges således, at der opnås graduering af de toksiske virkninger. I den lavt doserede og middel doserede gruppe og i kontrolgruppen bør dødeligheden holdes på et lavt niveau for at give mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Hvis teststoffet indgives med foderet, kan man enten anvende en konstant koncentration (ppm eller mg/kg i foderet) eller en konstant dosering i forhold til dyrenes vægt. Det benyttede alternativ specificeres. Hvis teststoffet indgives med mavesonde, bør doseringen finde sted på samme tidspunkt hver dag. Doserne bør justeres med jævne mellemrum (hver eller hveranden uge) for at dosis kan være konstant i forhold til dyrets legemsvægt.

1.6.2.4. Grænsetest

Hvis der ikke i et 28 dages forsøg udført efter nedenstående retningslinier kan konstateres toksisk virkning af en dosis på 1000 mg/kg legemsvægt, eller en større dosis fastsat udfra kendskabet til den eventuelle eksponering mennesker udsættes for, kan yderligere testning betragtes som unødvendig. Det er vigtigt at sikre sig, at stoffer med lav toksicitet, som indgives med foderet, ikke på grund af deres mængde eller andre egenskaber griber ind i ernæringsmæssige krav.

1.6.2.5. Observationsperiode

Alle dyr observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksisk virkning, hvornår disse tegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Dødstidspunkt og toksicitetstegns optræden og forsvinden bør noteres.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Den ideelle dosering er, at teststoffet indgives dagligt, syv dage om ugen i en periode på 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til længerevarende undersøgelser holdes under observation i yderligere 14 dage, uden indgift af teststof, således at man har mulighed for at registrere, om toksiske virkninger forsvinder, eller om de persisterer.

Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Det ugentlige foderforbrug beregnes (vandforbrug, hvis teststoffet indgives via drikkevandet). Dyrene vejes een gang om ugen.

Dyrene observeres med jævne mellemrum for at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets slutning aflives og obduceres dyrene med undtagelse af satellitgruppen. Døende dyr bør fjernes og obduceres, så snart de registreres. Ved forsøgets slutning skal alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes følgende undersøgelse.

1) Hæmatologisk undersøgelse omfattende mindst hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, total og differential leucocyttælling og et mål for koaguleringsevne.

2) Klinisk biokemisk analyse af blodet omfattende mindst een lever- og nyrefunktionsparameter: serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT) og total serumprotein, albumin, creatinin, total bilirubin og urinstof.

Andre bestemmelser, der kan være påkrævet for en adækvat toksikologisk vurdering er calcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, glucose efter faste, lipidanalyser, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin og cholinesteraseaktivitet.

Der kan udføres yderligere klinisk biokemiske analyser, hvor det skønnes nødvendigt for en videre undersøgelse af de observerede virkninger.

1.6.3.1. Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene skal underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering. Lever, nyrer, binyrer testes og vejes så hurtigt som muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Væv og organer (lever, nyrer, milt, binyrer og hjerte samt andre organer, der udviser alvorlige læsioner eller forandringer i størrelse) opbevares i et passende medium med henblik på en eventuel senere histopatologisk undersøgelse.

1.6.3.2. Histopatologisk undersøgelse

Der skal foretages en histologisk undersøgelse af præpareret væv og organer fra dyrene i kontrolgruppen samt i den gruppe, der er indgivet den højeste dosis. Væv og organer, der udviser defekter, som kan tilskrives teststoffet i den gruppe, der er indgivet en højeste dosis, bør også undersøges i de øvrige grupper. Dyrene i den eventuel satellitgruppe bør underkastes en histopatologisk undersøgelse især for de væv og organer, der har vist en toksisk virkning i de øvrige grupper.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, og for hver type af læsion det antal dyr, der udviser den pågældende læsion.

Evaluering af samtlige observationer skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationer:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.;

— forsøgsbetingelser;

— dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentrationer;

— oplysninger om toksisk reaktion opdelt efter køn og dosis;

— ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret;

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse af forsøgsdyr til forsøgets slutning;

— toksiske eller andre virkninger;

— observationsperiode for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten;

— foder- og legemsvægt;

— hæmatologiske undersøgelser og samtlige resutlater;

— klinisk biokemiske undersøgelser og samtlige resultater;

— obduktionsfund;

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund;

— eventuel statistisk behandling af resultaterne;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

B. 8. SUBAKUT TOKSICITET, INHALATION

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper af forsøgsdyr udsættes i 28 dage dagligt i en defineret periode for teststoffet i graduerede koncentrationer, idet hver gruppe eksponeres for en bestemt koncentration. Anvendes der et vehikel til at frembringe en passende koncentration af teststoffet i luften, bør der i forsøget indgå en kontrolgruppe, der udsættes for vehiklet alene. Dyrene observeres dagligt for toksicitetstegn. Dyr, der dør under forsøget obduceres, og ved slutningen af forsøget aflives og obduceres de overlevende dyr.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelse*

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage før forsøget begyndes. Unge, sunde, rotter fordeles randomiseret i det nødvendige antal grupper. Om nødvendigt kan der tilsættes et egnet vehikel til teststoffet, således at der opnås en passende koncentration af teststoffet i luften. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer med henblik på at lette doseringen, skal det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Her kan tidligere opsamlede data benyttes.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Rotter er den foretrukne dyreart, medmindre der foreligger kontraindikationer. Der benyttes rotter af almindeligt anvendte stammer. Ved forsøgets begyndelse gælder det, at variationen i forsøgsdyrenes vægt ikke må være mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt.

1.6.2.2. Antal og køn

Der anvendes mindst ti dyr (fem hun- og fem handyr) i hver forsøgsgruppe. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Man kan samtidig dosere

en satellitgruppe på ti dyr (fem af hvert køn) med den højeste koncentration i 28 dage og observere i en periode på 14 dage efter forsøget hvorvidt toksiske virkninger er reversible, persisterende eller optræder forsinket.

1.6.2.3. Ekspositionskoncentrationer

Der skal anvendes mindst tre forskellige koncentrationsniveauer og en kontrolgruppe eller en vehikelkontrolgruppe, (svarende til koncentrationen af vehiklet i højeste dosisniveau), såfremt der benyttes vehikel. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtig som dyrene i forsøgsgrupperne bortset fra inhalation af teststoffet. Den højeste koncentration bør have toksisk effekt, men kun få eller ingen dødsfald. Det laveste dosisniveau bør ikke have nogen toksisk effekt overhovedet. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, bør den laveste dosis overskride denne eksponering. Ideelt bør middelkoncentrationen frembringe de mindste observerbare toksiske effekter. Hvis der anvendes mere end een middelkoncentration, bør de gradueres med henblik på at opnå en spredning af den toksiske virkning. I de grupper, der udsættes for den lave koncentration og middelkoncentrationen og i kontrolgrupperne, bør dødeligheden holdes på et lavt niveau for at give mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

1.6.2.4. Ekspositionstid

Den daglige ekspositionsperiode er seks timer, men det kan være nødvendigt at benytte kortere eller længere perioder for at imødekomme specielle krav.

1.6.2.5. Udstyr

Dyrene testes med inhalationsapparatur, der er således udformet, at der kan opretholdes en dynamisk luftgennemstrømning på mindst 12 luftskift pr. time, samtidig med, at der sikres et adækvat iltindhold og en jævn fordelt ekspositionsluft. Benyttes et ekspositionskammer, bør det være således indrettet, at der undgås sammenklumpning af forsøgsdyrene og sikre en så stor eksposition for teststoffet ved inhalation som muligt. Den generelle regel er, at for at sikre en stabil atmosfære, må dyrenes totale »volumen« ikke overstige 5 % af ekspositionskammerets volumen. Ekspositionen kan foregå gennem mund-næse, hovedet alene eller ved kamre til hele kroppen; ved anvendelse af de to første muligheder opnår man, at indtagelsen af teststoffet ad andre veje reduceres.

1.6.2.6. Observationsperiode

Dyrene observeres dagligt for tegn på toksiske virkninger i hele forsøgsperioden og restitutionsperioden. Dødstidspunkt og toksicitetstegns optræden og forsvinden bør registreres.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Dyrene eksponeres for teststoffet dagligt seks til syv dage om ugen i en periode på 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til længerevarende observationer skal holdes under observation i yderligere 14 dage, efter at eksponering for teststoffet er sluttet, for at registrere om en toksisk virkning er reversibel eller persisterer. Temperaturen under forsøget bør holdes på 22° C ± 3°. Under ideelle forhold skal den relative luftfugtighed holdes på mellem 30 % og 70 %, men i visse tilfælde (f. eks. ved testning af aerosoler) kan dette være praktisk uigennemførligt. Der gives hverken foder eller vand under ekspositionen.

Der anvendes et dynamisk inhalationssystem med et passende analytisk kontrolsystem til sikring af ekspositionskoncentrationen. Det anbefales at foretage en prøvetest for at finde frem til passende

ekspositionskoncentrationer. Lufthastigheden skal tilpasses, således at der er ensartede forhold i hele ekspositionskammeret. Systemet bør være af en sådan beskaffenhed, at der så hurtigt som muligt opnås stabile ekspositionsbetingelser.

Der skal foretages måling og kontrol af:

a) Lufthastighed (kontinuerlig).

b) Den faktiske koncentration af teststoffet målt i vejrtrækningszonen. Koncentrationen må under den daglige ekspositionsperiode ikke variere mere end ± 15 % fra gennemsnitskoncentrationen. Det kan være umuligt at opnå en sådan grad af kontrol med støvpartikler og aerosoler, og i så tilfælde kan større udsving accepteres. Koncentrationerne bør fra dag til dag holdes så konstante som muligt under hele forsøgets forløb. For partikler og aerosoler skal der foretages analyser så ofte som det er nødvendigt for at fastslå, om partikelstørrelsen er jævnt fordelt.

c) Temperatur og luftfugtighed.

d) Under og efter eksposition foretages der systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Alle dyr observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektionen af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og det centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønsteret. Der holdes ugentligt regnskab med fødeindtagelse, og dyrene vejes een gang om ugen. Dyrene observeres med jævne mellemrum med henblik på at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af (f. eks.) kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets slutning aflives og obduceres alle tilbageværende dyr med undtagelse af satellitgruppen. Døende dyr bør fjernes og obduceres, så snart de registreres.

Ved forsøgets slutning skal alle dyr inklusiv kontrolgruppen underkastes følgende undersøgelser:

(i) Hæmatologisk analyse omfattende mindst hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, tælling af erytrocytter, total og differential leucocyttælling og et mål for koagulationsevnen.

(ii) Klinisk biokemisk analyse af blodet omfattende mindst een lever- og nyrefunktionsparameter: serum alanin aminotransferase * (ALAT), serum aspartat aminotransferase **(ASAT), urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein. Andre bestemmelser, der kan være påkrævet i en adækvat toksikologisk vurdering, omfatter kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, glucose efter faste, lipidanalyser, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin og cholinesteraseaktivitet osv. Der kan udføres yderligere klinisk biokemisk analyse, hvor det skønnes nødvendigt for en videre undersøgelse af de observerede virkninger.

1.6.3.1. Makroskopisk vurdering

Alle forsøgsdyrene bør underkastes en fuldstændig makroskopisk undersøgelse, Lever, nyrer, binyrer og testes vejes våde så hurtigt som muligt efter dissektion for at undgå udtørring. En række væv og organer, luftveje, leveren, nyrerne, milten, binyrerne, hjertet samt andre organer, der udviser alvorlige læsioner eller forandringer i størrelse, bør præpareres i et passende medium med henblik på en eventuel senere histopatologisk undersøgelse. Naso-Farynx (øvreluftveje) og lunger skal udtages hele og intakte ved dissektionen, vejes og behandles med et passende fixativ for at sikre, at lungestrukturen bibeholdes. Perfusion med et fixativ regnes for en effektiv fremgangsmåde.

1.6.3.2. Histopatologisk undersøgelse

Der bør foretages en histopatologisk undersøgelse af præparerede væv og organer fra dyrene i kontrolgruppen samt i den gruppe, der har været udsat for den højeste koncentration. Væv og organer, der udviser defekter som kan henføres til teststoffet i gruppen, der har været eksponeret for den højeste koncentration, skal også undersøges i de øvrige grupper på lavere dosisniveau. Dyrene i en eventuel satellitgruppe bør underkastes en histologisk undersøgelse med særligt henblik på de væv og organer, der udviser toksisk påvirkning i de øvrige grupper.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelse af forsøget, og for hver type af læsion det antal dyr, der udviser den pågældende læsion.

Evaluering af samtlige observationer, kvantitative såvel som tilfældige, skal baseres på en rimelig statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationer:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.;

— forsøgsbetingelser;

— Beskrivelse af eksspositionsapparatur, herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af partikler og aerosoler, metode til konditionering af luften, behandling af udpumpet luft og den måde, hvorpå dyrene holdes i et ekspositionskammer, når et sådant benyttes. Apparaturet til måling af temperatur, fugtighed og, når det skønnes hensigtsmæssigt, aerosolkoncentrationens eller partikelstørrelsens stabilitet skal beskrives.

Eksspositionsdata

Disse skal opstilles i tabelform og angive middelværdi og variation (f.eks. standardafvigelser) og i videst mulig omfang omfatte:

a) lufthastighed gennem inhalationsudstyret;

b) luftens temperatur;

c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsapparaturet divideret med luftmængden);

d) type vehikel, hvor et sådant er anvendt;

e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget;

f) middelværdi af partikelstørrelse (for så vidt den er relevant);

— oplysninger om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis;

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning;

— minimal virkningsfuld koncentration; toksiske og andre virkninger;

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormitet;

— data vedrørende foder og legemsvægt;

— de anvendte hæmatologiske analyser og samtlige resultater;

— de anvendte klinisk biokemiske analyser og samtlige resultater;

— obduktionsfund;

— en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund;

— eventuel statistisk behandling af resultaterne;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. **LITTERATURHENVISNINGER**

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

B. 9. SUBAKUT TOKSICITET, OPTAGELSE GENNEM HUDEN

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Teststoffet påføres dagligt huden i graduerede doser på grupper af forsøgsdyr, idet der gives en bestemt dosis til hver gruppe gennem en periode på 28 dage. Dyrene observeres dagligt i forsøgsperioden, og eventuelle tegn på toksicitet registreres. Dyr, der dør under forsøget obduceres, og dyr, der overlever til slutningen af forsøget, aflives og obduceres.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelser*

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, før forsøget begyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i forsøgsgrupper. Kort før forsøget indledes, klippes pelsen på ryggen af forsøgsdyrene. Såfremt pelsen barberes bort, bør det ske ca. 24 timer inden forsøget indledes, Klipningen eller barberingen må som regel gentages med en uges mellemrum. Man må ved klipning og barbering passe på ikke at beskadige huden. Mindst 10 % af kroppens overflade klargøres til påføring af teststoffet. Ved afgørelse af, hvilket og hvor stort et område, der skal klippes, bør der tages hensyn til dyrets vægt. Ved testning af faste stoffer, som — hvis det er hensigtsmæssigt — kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel for at sikre god kontakt med huden. Flydende teststoffer påføres normalt udfortyndet. Teststoffet påføres dagligt fem til syv dage om ugen.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Der kan anvendes voksne rotter, kaniner eller marsvin. Der kan også anvendes andre dyrearter, men i så fald skal det være begrundet. Ved forsøgets begyndelse bør dyrenes vægt ikke variere mere end ± 20 % fra gennemsnitsvægten.

1.6.2.2. Antal og køn

Der anvendes mindst ti dyr (fem hun- og fem handyr) med sund hud til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør det oprindelige antal dyr forøges med det antal, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Man kan herudover give en satellitgruppe på ti dyr (fem af hvert køn) den højeste dosis gennem 28 dage og observere, hvorvidt de toksiske virkninger er reversible eller persisterende, eller indtræder forsinket i en periode på 14 dage efter forsøget.

1.6.2.3. Dosisniveauer

Der skal anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer i mindst seks timer daglig samt en kontrolgruppe eller en vehikelkontrolgruppe, såfremt der benyttes et vehikel. Teststoffet skal påføres på ca. samme tidspunkt hver dag, og doserne justeres med jævne mellemrum (hver eller hveranden uge) for at dosis kan være konstant i forhold til dyrenes legemsvægt. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne bortset fra teststoffet. Hvis der anvendes et vehikel til at lette doseringen, bør vehikelkontrolgruppen doseres på samme måde som forsøgsgrupperne og påføres samme mængde vehikel, som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Det højeste dosisniveau bør give toksisk effekt, men kun få eller ingen dødsfald. Det laveste dosisniveau bør ikke have nogen toksisk effekt overhovedet. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, bør det laveste dosisniveau overskride denne eksponering. Ideelt bør middeldosis frembringe de mindste observerbare toksiske effekter. Hvis der anvendes mere end een middeldosis, bør de gradueres med henblik på at opnå en spredning af toksiske virkninger. I den lavt doserede og middel doserede gruppe og i kontrolgrupperne bør dødeligheden holdes på et lavt niveau for at give mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Hvis applikation af teststoffet forårsager alvorlig hudirritation, bør koncentrationen sænkes. Dette kan medføre en reduktion eller et fuldstændigt bortfald af øvrige toksiske effekter på det højeste dosisniveau. Hvis huden er blevet alvorligt beskadiget, kan det være nødvendigt at slutte forsøget og foretage et nyt forsøg med lavere koncentrationer.

1.6.2.4. Grænsetest

Hvis en dosis på 1 000 mg/kg legemsvægt i et forforsøg eller en større dosis bestemt af en eventuel vurdering af menneskers eksponering ikke giver nogen toksisk virkning, kan yderligere forsøg betragtes som unødvendige.

1.6.2.5. Observationsperiode

Dyrene observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet. Dødstidspunkt og tidspunkt for toksicitetstegns optræden og forsvinden skal registreres.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Dyrene skal holdes i hvert sit bur. Den ideelle dosering er påføring af teststoffet syv dage om ugen i en periode på 28 dage. Eventuelle satellitgrupper beregnet til efterfølgende observationer bør holdes under observation i yderligere 14 dage, uden påføring af teststof, således at man har mulighed for at registrere om toksiske virkninger er reversible eller om de persisterer. Ekspositionsperioden er seks timer dagligt.

Teststoffet skal påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10 % af den samlede kropsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet skal påføres så tyndt og ensartet over en så stor del området som muligt.

Teststoffet skal holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Teststedet skal desuden dækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og

teststoffet holdes sikkert fast, og at dyrene ikken kan komme til at indtage teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet, men man bør ikke immobilisere dyrene fuldstændigt.

Ved ekspositionsperiodens slutning fjernes eventuelt tilbagesiddende teststof, idet der anvendes vand eller en anden egnet metode til at rense huden.

Alle dyr observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der holdes ugentligt regnskab med fødeindtagelsen, og dyrene vejes en gang om ugen. Dyrene observeres med jævne mellemrum med henblik på, at dyr ikke går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets slutning aflives og obduceres alle tilbageværende dyr med undtagelse af satellitgrupperne. Døende dyr skal fjernes og obduceres, så snart de registreres.

Ved forsøgets slutning skal alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes følgende undersøgelse:

1) Hæmatologisk analyse omfattende mindst hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, tælling af erythrocytter, total og differentialtælling af leucocytter og et mål for koaguleringsevne.

2) Klinisk biokemisk analyse af blodet omfattende mindst een lever- og nyrefunktionsparameter: Serum alanin aminotransferase * (ALAT), serum aspartat aminotransferase ** (ASAT) og total serumprotein.

Andre bestemmelser, der kan være påkrævet i en adækvat toksikologisk vurdering omfatter calcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, glucose efter faste, lipidanalyser, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin og cholinesteraseaktivitet.

Der kan udføres yderligere klinisk biokemiske analyser, hvor det skønnes nødvendigt for videre undersøgelse af observerede virkninger.

1.6.4. *Makroskopisk vurdering*

Alle forsøgsdyrene bør underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering. Lever, nyrer, binyrer testes og vejes så hurtigt som muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Væv og organer, dvs. normal og behandlet hud, lever, nyrer og målorganer (dvs. organer der viser alvorlige læsioner eller forandringer i størrelse), opbevares i et passende medium med henblik på en eventuel senere histopatologisk undersøgelse.

1.6.5. *Histopatologiske undersøgelser*

Der skal foretages en histologisk undersøgelse af præparerede væv og organer fra dyrene i kontrolgruppen samt i den gruppe, der har fået den største dosis. Væv og organer, der har vist defekter som kan tilskrives teststoffet i den højest doserede gruppe, skal også undersøges i de øvrige doserede grupper. Dyrene i en satellitgruppe bør underkastes en histologisk undersøgelse, særligt de væv og organer, hvor der er iagttaget påvirkninger i de øvrige grupper.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser: antal dyr ved begyndelse af forsøget, og for hver type af læsion det antal dyr, der udviser den pågældende læsion.

Evaluering af samtlige observationer, kvantitative og tilfældige, skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationer:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.;

— forsøgsbetingelser;

— dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentration;

— ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret;

— oplysninger om toksiske reaktioner inddelt efter køn og dosis;

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning;

— toksiske eller andre virkninger;

— observationsperiode for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten;

— data vedrørende foder- og legemsvægte;

— anvendte hæmatologiske analyser og samtlige resultater;

— anvendte klinisk biokemiske analyser og samtlige resultater;

— obduktionsfund;

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund;

— statistisk behandling af resultaterne, hvis det er muligt;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

B. 10. ANDRE VIRKNINGER, MUTAGENICITET, *IN VITRO* — CYTOGENETISK TEST (PATTEDYRCELLER)

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Denne in vitro cytogenetiske test er en korttids mutagenicitetstest til konstatering af strukturelle kromosomforandringer i dyrkede pattedyrceller. Der kan anvendes både primærkulturer og kulturer af etablerede cellelinjer. Efter at cellekulturerne har været eksponeret for teststoffet både med og uden et leverenzymaktiveringssystem (co-faktor tilsat den mikrosomholdige supernatant fra leverhomogenat) behandles kulturerne med en tentrådsinhibitor, som for eks. tolchicin med henblik på et akkumulere celler i et metafasestadie i mitosen (c-metafase). Cellerne høstes på egnede tidspunkter og præpareres med henblik på kromosomanalyse. Præparaterne farves og celler i metafase underkastes analyse med henblik på konstatering af eventuelle kromosomforandringer.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelser*

Teststoffet tilsættes kulturmediet direkte eller opløses i et passende vehikel, inden cellerne eksponeres. Der anvendes primærkulturer eller kulturer af etablerede cellelinjer, f.eks. celler fra kinesiske hamstere eller humane lymfocytter.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

Antal af kulturer

Der anvendes mindst to kulturer for hvert dosisniveau og kontrol.

Negative og positive kontrolkulturer

Som negativ kontrol anvendes opløsningsmiddel (såfremt dette ikke er kulturmediet eller vand), leverenzymaktiveringsblanding, leverenzymaktiveringsblanding plus opløsningsmiddel samt helt ubehandlede kulturer.

Der anvendes en positiv kontrol i hvert enkelt forsøg. Anvendes der en leverenzymaktiveringsblanding til at aktivere teststoffet, skal der som positiv kontrol benyttes et stof, der vides at kræve metabolisk aktivering.

Dosisniveau

Der anvendes mindst tre dosisniveauer af teststoffet over mindst eet logaritmisk dosisinterval, og således at den højeste dosis nedsætter den mitotiske aktivitet med ca. 50 %.

Dyrkningsbetingelser

Der anvendes et passende kulturmedium og passende inkubationsbetingelser (temperatur, dyrkningsflasker, CO_2-koncentration, fugtighed, osv.).

1.6.3. *Fremgangsmåde*

1.6.3.1. Fremstilling af kulturer

Etablerede cellelinjer: cellerne tages fra stamkulturer (f.eks. ved hjælp af trypsinbehandling eller afrystning), hvorefter de udsås med passende tæthed på dyrkningsplader og inkuberes ved 37° C.

Humane lymfocytter: hepariniseret fuldblod tilsættes kulturmedium, indeholdende phyto-haemagglutinin, foetalt kalveserum og antibiotika. Blandingen inkuberes ved 37° C.

1.6.3.2. Behandling af kulturerne med teststof

(i) Behandling uden leverenzymaktiveringsblanding.

Behandling skal mindst have samme varighed som en hel cellecyklus, og der skal fastlægges fikseringstidspunkter for at sikre, at celler, der er blevet underkastet behandling på forskellige trin i deres cyklus, analyseres under den første mitose efter behandlingen.

Hvis behandlingen har kortere varighed end en hel cellecyklus, skal der fastlægges serier af fikseringstidspunkter for at sikre, at der udtages celler, som er på forskellige cykliske trin (G_1, S og G_2) under behandlingen.

Teststoffet tilsættes kulturer af etablerede cellelinjer, mens de er i den eksponentielle vækstfase. Humane lymfocytkulturer behandles, mens de stadig befinder sig i en semisynkron tilstand. Hvis teststoffet ændrer varigheden af cellernes cyklus, skal fikseringsintervallet ændres tilsvarende.

(ii) Behandling med leverenzymaktiveringsblanding.

Kulturerne bør behandles med teststoffet plus aktiveringssystemet så længe som muligt uden at der optræder toksiske virkninger i cellerne. Hvis behandlingen som følge af toksisk virkning må begrænses til mindre varighed end en hel cellecyklus, skal der fastlægges serier af fikseringstidspunkter for at sikre, at der udtages celler, som er på forskellige cykliske trin (G_1, S og G_2) under behandling.

Høst af celler.

Cellekulturerne behandles med tentrådsinhibitoren 1 til 2 timer før de høstes. Høst og kromosompræparering skal foregå særskilt for hver enkelt kultur.

1.6.3.3. Kromosompræparering.

Kromosompræparering omfatter hypotonisk behandling af cellerne, fiksering, spredning på objektglas og farvning.

Analyse:

Der undersøges mindst 100 velpræparerede metafaser pr. kultur for eventuelle kromosomforandringer. Objektglas kodes før analyse. Ved humane lymfocytter undersøges kun metafaser, der indeholder 46 centromerer. Ved etablerede cellelinjer undersøges kun metafaser, som indeholder ± 2 centromerer i forhold til normaltallet for stammen (modaltallet).

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Forandringer af kromatider (gaps, brud, **translokationer**) og af kromosomer (gaps, brud, bruddele, ringe, dicentromerer, polycentromerer) samt antallet af afvigende metafaser (inklusive og eksklusive gaps) registreres separat for alle behandlede kulturer og kontrolkulturer. Evaluering af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationer:

— anvendt celletype;

— forsøgsbetingelser: sammensætning af mediet, CO_2-koncentration, inkubationstemperatur, inkubationstid, dosisniveauer, behandlingstid, varigheden af behandling med og koncentrationen af den anvendte tentrådsinhibitor, den anvendte leverenzymaktiveringsblanding, positive og negative kontroller;

— antal cellekulturer;

— antal undersøgte metafaser (der angives data for hver enkelt kultur);

— mitotisk indeks;

— type og antal af kromosomforandringer oplyst særskilt for **hver enkelt behandlet kultur** og kontrolkultur, og de etablerede cellelinjers modaltal;

— statistisk evaluering;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

B. 11. ANDRE VIRKNINGER MUTAGENICITET

IN VIVO — CYTOGENETISK TEST (KNOGLEMARV FRA PATTEDYRKROMOSOMANALYSE)

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Denne *in vivo* cytogenetiske test er en korttids mutagenicitetstest til påvisning af strukturelle kromosomforandringer. Vurdering af kromosomforandringer foregår oftest i forbindelse med den første mitose efter eksponering. Størstedelen af de forandringer, der induceres af kemiske mutagener, er kromatidforandringer.

Der anvendes knoglemarvsceller fra pattedyr, som eksponeres for teststofferne på hensigtsmæssig måde, hvorefter de aflives med regelmæssige intervaller. Før aflivningen behandles dyrene med en tentrådsinhibitor som for eks. colchicin med henblik på at akkumulere celler i metafasen i mitosen (c-metafase). Der fremstilles lufttørrede kromosompræparationer fra cellerne, og præparaterne farves og undersøges mikroskopisk for kromosomforandringer.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelser*

Teststoffet opløses i isotonisk saltvand. Hvis dette ikke lader sig gøre, opløses eller opslemmes det i et passende vehikel. Opløsning af teststoffet foretages umiddelbart inden anvendelse.

Hvis der anvendes et vehikel, for at lette doseringen, må det ikke indvirke på teststoffet eller forårsage toksiske effekter.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Der anvendes gnavere som f.eks. rotter, mus eller kinesiske hamstere. Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper.

1.6.2.2. Antal og køn

Der anvendes mindst fem hun- og fem handyr i hver forsøgsgrupe og hver kontrolgruppe. Dvs., at der aflives ti dyr pr. interval pr. gruppe, også hvis forsøget omfatter flere testintervaller efter doseringen.

1.6.2.3. Administrationsmåde

Teststoffet skal i almindelighed gives i een dosis. Såfremt der foreligger en toksikologisk begrundelse, kan doseringen opdeles i mindre doser. Denne fremgangsmåde kan imidlertid kun anvendes, såfremt teststoffet ikke har cytotoksisk effekt på knoglemarv. Sædvanligvis **administreres teststoffet** oralt eller ved intraperitoneal injektion. Andre administrationsformer kan dog **også anvendes**.

1.6.2.4. Negative og positive kontroller

Som positiv kontrol anvendes en kemisk forbindelse, der vides at forårsage kromosomforandringer *in vivo*, og der inkluderes også en negativ kontrolgruppe (opløsningsmiddel) i hvert forsøg.

1.6.2.5. Dosisniveau

I den basale forsøgsbeskrivelse anvendes een (1) dosis, som skal være den maksimale ikke-toksiske dosis eller den dosis, der viser en vis cytotoksisk effekt, (dvs. delvist mitosehæmning).

Der kan anvendes flere dosisniveauer, såfremt der er videnskabeligt grundlag herfor.

I tilfælde, hvor testen anvendes som verifikation, bør der yderligere anvendes mindst to andre dosisniveauer.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Testen kan gennemføres på to måder:

i) Forsøgsdyrene eksponeres for teststoffet i een dosis på det maksimale ikke-toksiske niveau. Der udtages herefter prøver tre gange. Den vigtigste prøveudtagning **foregår efter** 24 timer. Eftersom teststoffet kan have indflydelse på cellecykluskinetikken anvendes herudover eet kortere og eet længere prøveudtagningsinterval af passende længde mellem 6 og **48 timer**.

Hvis der benyttes mere end een dosis, bør der udtages prøver i den periode, hvor effekten er størst, eller, såfremt denne ikke kendes, efter 24 timer.

(ii) Dersom der foreligger farmakokinetiske og metaboliske begrundelser herfor, kan eksponeringen opdeles i flere doser, og prøveudtagningen bør i så fald foregå 6 og 24 timer efter sidste eksponering.

Knoglemarvspræparation

Inden aflivning får forsøgsdyrene en intraperitoneal injektion af en tentrådsinhibitor for at akkumulere et tilstrækkeligt antal celler i c-metafase. Knoglemarven vaskes ud af begge femora på nyligt aflivede dyr ved hjælp af en isotonisk opløsning. Efter hypotonisk behandling **fikseres** cellerne og spredes på objektglas, lufttørres og farves.

Analyse

Inden mikroskopisk undersøgelse kodes objektglassene. For hvert dyr **undersøges mindst** 50 velpræparerede metafaser med det komplette antal centromerer for strukturelle kromosomforandringer. Samtidig kan det mitotiske indeks for hvert dyr registreres.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Kromatidforandringer og isokromatidforandringer (gaps, brud, translokationer), antallet af afvigende metafaser (inklusiv og eksklusiv gaps) samt det eventuelt registrerede mitotiske indeks angives for alle forsøgs- og kontroldyr. Der anføres også middeltal og standardafvigelser for de enkelte forsøgs- og kontrolgrupper. Evaluering af de fremkomne data bør baseres på passende statistiske metoder.

3. Rapportering

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationen:

— dyreart/stamme samt dyrenes alder;

— antal dyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupperne;

— forsøgsbetingelser: detaljeret beskrivelse af administrationsmåde, prøveudtagning, dosisniveauer, varighed af behandling med tentrådsinhibitor samt koncentration heraf;

— antal undersøgte metafaser pr. dyr;

— mitotisk indeks hvis der er registreret;

— antal og type af forandringer opgivet separat for hvert enkelt forsøgs- og kontroldyr;

— statistisk evaluering;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

B. 12. ANDRE VIRKNINGER

MUTAGENICITET (MICRONUCLEUSTEST)

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Mikronucleustesten er en *in vivo* korttidstest i pattedyrsceller. Den anvendes til bestemmelse af kromosomskader eller beskadigelser af det mitotiske apparat forårsaget af kemikalier. Grundlaget for denne test er en forøgelse af antallet af mikronuclei i forsøgsdyrenes polykromatiske erytrocytter i forhold til kontroldyrenes.

Mikronuclei dannes af kromosomdele eller hele kromosomer, som forsinkes i mitosen. Når erytroblaster udvikles til erytrocytter, udstødes cellekernen, mens mikronuclei kan forblive i cytoplasmaet. I denne test anvendes unge polyromatiske erythrocytter fra knoglemarven hos forsøgsdyr, der har været eksponeret for teststoffer på en passende måde. Knoglemarven ekstraheres og anvendes til udstrygningspræparater, som farves. Polykromatiske erythrocytter undersøges i mikroskop, mikronuclei tælles, og forholdet mellem polykromatiske og normokromatiske erytrocytter bestemmes.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Forberedelser*

Teststoffet opløses i isotonisk saltvand. Hvis dette ikke lader sig gøre, opløses eller opslemmes det i et passende vehikel. Hvis der anvendes et vehikel, må det ikke indvirke på teststoffet eller forårsage toksiske effekter. Opløsningen af teststoffet foretages normalt umiddelbart inden anvendelsen.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Det anbefales at anvende mus, men andre pattedyr kan også anvendes. Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper.

1.6.2.2. Antal og køn

Der anvendes mindst fem hun- og fem handyr i hver forsøgsgruppe og hver kontrolgruppe. Dvs. at der aflives ti dyr pr. interval pr. gruppe, også hvis forsøget omfatter flere tidsintervaller efter dosering.

1.6.2.3. Administrationsmåde

Teststoffet skal i almindelighed gives i een dosis. Såfremt der foreligger en toksikologisk begrundelse, kan doseringen opdeles i flere doser. Denne fremgangsmåde kan imidlertid kun anvendes, såfremt teststoffet ikke har cytotoksisk effekt på knoglemarv. Sædvanligvis administreres teststoffet oralt eller ved intraperitoneal injektion. Andre administrationsformer kan dog også anvendes.

1.6.2.4. Negative og positive kontroller

Der anvendes både positiv og negativ (opløsningsmiddel) kontrol i forbindelse med hvert enkelt forsøg.

1.6.2.5. Dosisniveau

I den basale forsøgsbeskrivelse anvendes een (1) dosis, som skal være den maksimale ikke-toksiske dosis eller den dosis der har en vis toksisk effekt, f.eks. ændring af forholdet mellem polykromatiske og normokromatiske erytrocytter.

Der kan anvendes flere dosisniveauer, såfremt der er videnskabeligt grundlag herfor.

I de tilfælde, hvor testen anvendes som verifikation, bør der yderligere anvendes mindst to andre dosisniveauer.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Testen kan gennemføres på to måder:

(i) Forsøgsdyrene eksponeres for teststoffet i een dosis på det maksimale ikke-toksiske niveau. Prøveudtagning bør foretages på de tidspunkter, hvor der kan forventes maksimal respons, hvilket varierer med teststoffet. Når der anvendes maksimal dosis, udtages der derfor prøver af knoglemarven mindst tre gange, første gang ikke tidligere end 12 timer efter dosering og herefter med passende intervaller, som dog ikke må overstige 72 time i alt.

Hvis der benyttes mere end et dosisniveau skal der udtages prøver i den periode, hvor effekten er størst, eller, såfremt denne ikke kendes, efter 24 timer.

(ii) Dersom der foreligger farmakokinetiske og metaboliske begrundelser herfor, kan eksponeringen opdeles i flere doser. Der udtages i så fald prøver mindst tre gange, første gang ikke tidligere end 12 timer efter sidste dosering og herefter med passende intervaller, som dog ikke må overstige 72 timer i alt.

Knoglemarvspræparation

Knoglemarven vaskes ud af begge femora på nyligt aflivede dyr med foetalt kalveserum. Cellerne sedimenteres ved centrifugering og supernatanten fjernes. Den homogene cellesuspension dryppes på objektglas og der fremstilles udstrygningspræparater. Efter lufttørring farves præparaterne.

Analyse

Inden mikroskopisk undersøgelse kodes objektglassene. For hvert dyr undersøges mindst 1 000 polykromatiske erytrocytter for forekomst af mikronuclei.

Forholdet mellem normokromatiske og polykromatiske erytrocytter bestemmes for hvert dyr ved tælling af sammenlagt 1 000 erytrocytter.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antallet af polykromatiske erytrocytter samt antallet af polykromatiske erytrocytter med mikronuclei og procentdelen af celler med mikronuclei anføres for hvert enkelt forsøgs- og kontroldyr sammen med forholdet mellem normokromatiske og polykromatiske erytrocytter. Der anføres også middeltal og standardafvigelser for de enkelte forsøgs- og kontrolgrupper. Evaluering af de fremkomne data bør baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst mulig omfang indeholde følgende informationer:

— dyreart/stamme samt dyrenes alder;

— antal dyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupperne;

— forsøgsbetingelser: detaljeret beskrivelse af administrationsmåde, prøveudtagning, dosisniveauer, toksiske reaktioner, negative og positive kontroller;

— kriterier for registrering af mikronuclei;

— dosis-virkningskurve, hvor det er muligt;

— statistisk evaluering;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

B. 13. ANDRE VIRKNINGER, MUTAGENICITET.

ESCHERISCHIA COLI TILBAGEMUTATIONSTEST

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

En tilbagemutation hos *Escherichia coli* i tryptophan (trp) operonet $trp^- \rightarrow trp^+$, er grundlaget for, at kemiske stoffer kan forårsage baseparsubstitutioner i genomet hos denne mikroorganisme.

Bakterier eksponeres for teststoffet både med og uden **metabolisk aktivering**. Efter en passende inkubationstid i minimalmedium tælles tilbagemuterede kolonier (revertanter), og der sammenlignes med antallet af spontane revertanter på en ubehandlet udsået plade og/eller på en plade tilsat opløsningsmiddel som kontrol.

1.5. Kvalitets kriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Der kan benyttes følgende metoder ved denne bestemmelse:

1. forinkubationsmetoden, og
2. direkte inkorporering, hvorved bakterier og teststof blandes i topager og hældes ud over en selektiv agarplade.

1.6.1. *Forberedelser*

1.6.1.1. Bakterier

Bakterierne dyrkes ved 37° C, til de når slutningen af den **eksponentielle fase** eller begyndelsen af den stationære fase. Celletætheden bør ligge omkring 10^8 til 10^9 celler pr. ml.

1.6.1.2. Metabolisk aktivering

Bakterierne eksponeres for teststoffet både med og uden en passende leverenzymaktiveringsblanding (en co-faktor tilsat den mikrosomholdige supernatant fra leverhomogenatet) fremstillet fra mus eller rotter, som er forbehandlet med enzyminducerende stoffer.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Teststammer

Der skal anvendes tre stammer, WP2, WP2 uvrA og WP2 uvrA pkM 101. Der benyttes anerkendte metoder ved dyrkning og opbevaring af stamkulturer. Stammernes vækstkrav og genetiske identitet samt deres følsomhed over for ultraviolet lys eller mitomycin C skal undersøges. WP2 uvr A pKM 101's modstandsdygtighed over for ampicillin skal undersøges. Stammerne bør også producere spontane revertanter indenfor det interval, der kan forventes.

1.6.2.2. Medier

Der anvendes et passende selektivt medium, som fremmer mutanternes udvikling, og en egnet topagar.

1.6.2.3. Negative og positive kontrolkulturer

Der skal anvendes både ubehandlet kontrol og kontrol med opløsningsmiddel. Postiv kontrol skal anvendes til to formål:

(i) Til at bekræfte følsomheden af bakteriestammerne. Ved tests uden metabolisk aktivering kan anvendes metyl-metan-sulfonat, 4-nitroquinolinoxid eller etylnitrosourinstof som positiv kontrol.

(ii) Til at sikre, at det anvendte metaboliske system har aktivitet. En positiv kontrol for et metabolisk system til alle stammer er 2-aminoantracen. Hvis det er muligt, bør der som positiv kontrol anvendes en kemisk forbindelse af samme type som teststoffet.

1.6.2.4. Mængde af teststof pr. plade

Mindst fem forskellige mængder af teststoffet prøves med semilogaritmiske dosisintervaller. Stoffet prøves i mængder op til grænsen for opløselighed eller toksicitet. Toksicitet erkendes ved en reduktion i antal af spontane revertanter, pladens dybdegennemskinnelighed, eller i overlevelsesgraden af behandlede kulturer. Ikke-toksiske stoffer skal testes op til fem mg pr. plade før de betragtes som negative.

1.6.2.5. Inkubationsbetingelser

Pladerne inkuberes ved 37° C i 48 til 72 timer.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Ved direkte pladetest (uden enzymaktivering) tilsættes teststoffet og 0,1 ml frisk bakteriekultur 2,0 ml af topagar. Hvis testen udføres med metabolisk aktivering, tilsættes der 0,5 ml leverenzymaktiveringsblanding indeholdende en passende mængde mikrosomer til topagaren, efter at teststoffet og bakterierne er tilsat. Prøveglassets indhold blandes og hældes ud over en plade med en selektiv agar. Topagaren får lov til at størkne, og pladerne inkuberes ved 37° C i 48 til 72 timer. Ved inkubationsperiodens slutning tælles antallet af tilbagemuterede kolonier pr. plade.

Ved forinkubationsmetoden forinkuberes en blanding af teststoffet, 0,1 ml frisk bakteriekultur og en passende mængde leverenzymaktiveringsblanding eller en tilsvarende mængde buffer, før de 2,0 ml topagar tilsættes. De øvrige dele af denne metode er identisk med den direkte pladetest.

Ved begge metoder foretages al udsåning parallelt på mindst tre plader.

2. DATA

Antallet af tilbagemuterede kolonier pr. plade registreres både for de behandlede kulturers og for kontrolkulturernes vedkommende.

Alle optællinger på enkeltplader, det gennemsnitlige antal tilbagemuterede kolonier pr. plade samt standardafvigelser skal angives både for de plader, der har været eksponeret for teststoffet og for kontrolpladerne. Alle resultater skal efterprøves i et uafhængigt forsøg. Evaluering af de fremkomne data bør foretages under anvendelse af passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationer:

— anvendte bakteriestammer;

— forsøgsbetingelser: doser, toksicitet, sammensætning af medier, fremgangsmåder, leverenzymaktiveringsblanding, negative kontroller;

— optællingen på de enkelte plader, det gennemsnitlige antal tilbagemuterede kolonier pr. plade, standardafvigelse, om muligt en dosis-virkningskurve;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

B. 14. ANDRE VIRKNINGER, MUTAGENICITET

SALMONELLA TYPHIMURIUM — TILBAGEMUTATIONSTEST

1. METODE

1.1. **Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. **Definitioner**

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. **Referencestoffer**

Ingen.

1.4. **Princip for testmetoden**

En tilbagemutation hos *Salmonella typhimurium* i histidin (his) operonet *his*$^-$ → *his*$^+$ er grundlaget for, at kemiske stoffer kan forårsage baseparsubstitutioner eller frameshiftmutationer i genomet hos denne mikroorganisme.

Bakterier eksponeres for teststoffet både med og uden metabolisk aktivering og udsås på plader med minimalmedium. Efter en passende inkubationstid tælles tilbagemuterede kolonier (revertanter), og der sammenlignes med antallet af spontane revertanter på en ubehandlet udsået plade og/eller på en plade tilsat opløsningsmiddel som kontrol.

1.5. **Kvalitets kriterier**

Ingen.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

1.6.1. *Forberedelser*

1.6.1.1. Bakterier

Nyfremstillede bakteriekulturer dyrkes ved 37° C til de når slutningen af den eksponentielle fase eller begyndelsen af den stationære fase. Celletætheden bør ligge omkring 10^8 til 10^9 celler pr. ml.

1.6.1.2. Metabolisk aktivering

Bakterierne eksponeres for teststoffet med og uden en passende leverenzymaktiveringsblanding (en co-faktor tilsat den mikrosomholdige supernatant fra leverhomogenatet) fremstillet fra mus eller rotter, som er forbehandlet med enzyminducerende stoffer.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Teststammer

Der anvendes mindst fire stammer TA 1535, TA 1537, TA 98 og TA 100. Andre stammer som TA 1538 kan anvendes supplerende. Der benyttes anerkendte metoder ved dyrkning og opbevaring af

stamkulturer. Stammernes vækstkrav og genetiske identitet samt deres følsomhed over for ultraviolet lys og krystalviolet og deres modstandsdygtighed over for ampicillin skal undersøges. Stammerne bør også producere spontane revertanter indenfor det interval, der kan forventes.

1.6.2.2. Medier

Der anvendes et passende selektiv medium og en egnet topagar.

1.6.2.3. Negative og positive kontroller

Der anvendes både ubehandlet kontrol og kontrol med opløsningsmiddel. Positiv kontrol skal anvendes til to formål:

(i) Til at bekræfte følsomheden af bakteriestammerne. Følgende stoffer kan anvendes i tests uden metabolisk aktivering.

Stamme	*Reverteres med*
TA 1535 TA 100	Natriumazid
TA 1538 TA 98	2-nitrofluoren
TA 1537	9-aminoacridin.

(ii) For at sikre, at det anvendte metaboliske system har aktivitet. En positiv kontrol for et metabolisk system til alle stammer er to-aminoanthracen. Hvis det er muligt, bør der som positiv kontrol anvendes en kemisk forbindelse af samme type som teststoffet.

1.6.2.4. Mængde af teststof pr. plade

Mindst fem forskellige mængder af teststoffet prøves med semilogaritmiske dosisintervaller. Stoffet prøves i mængder op til grænsen for opløselighed eller toksicitet.

Toksicitet erkendes ved en reduktion i antal af spontane revertanter, pladens dybdegennemskinnelighed, eller i overlevelsesgraden af behandlede kulturer.

Ikke- toksiske stoffer skal testes op til fem mg pr. plade før de betragtes som negative.

1.6.2.5. Inkubationsbetingelser

Pladerne inkuberes ved 37° C i 48 til 72 timer.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Ved den direkte pladetest (uden enzymaktivering) tilsættes teststoffet og 0,1 ml frisk bakteriekultur 2,0 ml af topagar. Hvis testen udføres med metabolisk aktivering, tilsættes der 0,5 ml leverenzymaktiveringsblanding indeholdende en passende mængde mikrosomer til topagaren efter at teststoffet og bakterierne er tilsat. Prøveglassets indhold blandes og hældes ud over en plade med en selektiv agar. Topagaren får lov at størkne og pladerne inkuberes ved 37° C i 48 til 72 timer. Ved inkubationsperiodens slutning tælles antallet af tilbagemuterede kolonier pr. plade.

Ved forinkubationsmetoden forinkuberes en blanding af teststoffet, 0,1 ml frisk bakteriekultur og en passende mængde buffer, før de 2,0 ml topagar tilsættes. De øvrige dele af denne metode er identiske med den direkte pladetest.

Ved begge metoder foretages udsåning parallelt på mindst tre plader.

2. DATA

Antallet af tilbagemuterede kolonier pr. plade registreres både for de behandlede kulturers og for kontrolkulturernes vedkommende.

Alle optællinger på enkelte plader, det gennemsnitlige antal tilbagemuterede kolonier pr. plade samt standardafvigelser skal angives både for de plader, der har været eksponeret for teststoffet og for kontrolpladerne.

Alle resultater skal efterprøves i et uafhængigt forsøg. Evaluering af de fremkomne data bør foretages under anvendelse af passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende informationer:

— anvendte bakteriestammer;

— forsøgsbetingelser: doser, toksicitet, sammensætning af medier, fremgangsmåder, leverenzymaktiveringsblanding, positive kontroller, negative kontroller;

— optælling på de enkelte plader, det gennemsnitlige antal tilbagemuterede kolonier pr. plade, standardafvigelse, om muligt en dosis-virkningskurve;

— diskussion af resultaterne;

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt C).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

AFSNIT C: METODER TIL BESTEMMELSE AF ØKOTOKSICITET

C. 1. AKUT TOKSICITET FOR FISK

1. METODE

1.1. Indledning

Så vidt muligt er det ønskeligt at have oplysninger om teststoffets vandopløselighed, damptryk, kemiske stabilitet, dissociationskonstanter og bionedbrydelighed til hjælp ved valg af den mest hensigtsmæssige testmetode (statisk, semistatisk eller gennemløb) for at sikre tilfredsstillende konstante koncentrationer af teststoffet under prøvens forløb.

Andre påbudte oplysninger, som f. eks. strukturformel, **renhedsgrad**, art og procentdel af betydende urenheder, tilstedeværelse og mængde af tilsætningsstoffer, samt n-octanol/vand-fordelingskoefficienten, bør tages i betragtning både ved planlægningen og fortolkningen af resultaterne fra testen.

1.2. Definitioner og enheder

Akut toksicitet er erkendbar uønsket virkning, der fremkaldes hos en organisme inden for kort tid (dage) ved eksponering med et stof. I denne test udtrykkes akut toksicitet som den mediane dødelige koncentration (LC_{50}), det vil sige den koncentration i **vand**, som dræber 50 % af fiskene i en forsøgsgruppe under eksponering i en sammenhængende **periode**. Eksponeringstiden skal angives.

Alle koncentrationer af teststoffet er angivet i vægt/volumenforhold (mg:l) og også udtrykkes som vægt/vægtforhold (parts pr. million).

1.3. Referencestoffer

Et referencestof kan testes for at vise, at testdyrenes følsomhed ikke har ændret sig væsentligt under laboratoriets forsøgsbetingelser.

Der er ikke specificeret referencestoffer til denne test.

1.4. Metodens princip

Fiskene udsættes for teststoffet (-stofferne) i vand i en række koncentrationer og i en periode på mindst 48 timer, men helst 96 timer. Dødeligheden registreres med højst 24 timers mellemrum, og man beregner, hvor det er muligt, de koncentrationer, der på **hvert observationstidspunkt** dræber 50 % af fiskene (LC_{50}).

1.5. Kvalitetskriterier

— Dødeligheden i kontrolgruppen må ikke overstige 10 % **ved prøvens afslutning.**

— Oxygenkoncentrationen skal være > 60 % mætning gennem hele forsøget.

— Det må godtgøres, at teststoffets koncentration har været holdt tilfredsstillende i forsøgsperioden (f. eks. mindst 80 % af den initiale koncentration) enten ved analyse eller ud fra stoffets kemiske egenskaber eller ved hjælp af det anvendte testsystem.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

Tre typer procedurer kan anvendes:

Statisk test:

Toksicitetstest med akvatiske organismer, hvor der ikke foregår gennemløb af testopløsning. (Opløsningerne udskiftes ikke under testens forløb.)

Semi-statisk test:

Test uden gennemløb af testopløsning, men med regelmæssig total **udskiftning af testopløsning** med længere tidsintervaller (f. eks. 24 timer).

Gennemløbstest:

Toksicitetstest, hvor vandet konstant fornys i testkamrene, og hvor **teststoffet transporteres med** det vand, der fornyr testmediet.

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Teststofopløsninger

Stamopløsninger af den påkrævede styrke fremstilles ved opløsning **af stoffet i afioniseret** vand eller vand beskrevet i 1.6.1.2.

Stamopløsninger af stoffer med lav vandopløselighed kan fremstilles gennem ultrasonisk dispersion eller, om nødvendigt, ved brug af organiske opløsningsmidler, emulgatorer eller dispergeringsmidler. Når sådanne hjælpestoffer anvendes, skal kontrolfiskene udsættes for samme koncentration af disse stoffer, som anvendes ved den højeste koncentration af teststoffet. Koncentrationen af hjælpestoffer bør ikke overstige 0,1 g/l.

De valgte testkoncentrationer fremstilles ved fortynding af stamopløsningen. Hvis høje koncentrationer testes, kan stoffet opløses direkte i det vand som ellers anvendes til fortynding.

Prøven skal udføres uden justering af pH. Hvis der konstateres en væsentligt pH-ændring, anbefales det, at gentage testen med justeret pH, og disse resultater rapporteres. I så tilfælde skal stamopløsningen justeres til pH af det vand som anvendes til fortynding, hvis der ikke er særlige grunde til at undlade dette. Til justering af pH bør HCl og NaOH foretrækkes. Justering af pH skal foregå på en sådan måde, at koncentrationen af teststof i stamopløsningen ikke ændres **signifikant. Såfremt** der sker en kemisk reaktion eller en udfældning af teststoffet ved justeringen, bør **dette** rapporteres.

1.6.1.2. Vand til opbevaring og fortynding

Drikkevand (ikke forurenet med skadelige koncentrationer af klor, **tungmetaller** eller andre stoffer), naturligt forekommende vand af god kvalitet, eller kunstigt fremstillet ferskvand (se tillæg 1) kan bruges. Vand med en total hårdhed mellem 50 og 250 mg/l (som $CaCO_3$) og med pH 6,0—8,5 bør foretrækkes.

1.6.2. *Apparatur*

Alt apparatur skal være af kemisk inert materiale.

— Automatisk fortyndingssystem (til gennemløbstesten).

— Oxygenmålingsudstyr.

— Udstyr til hårdhedsbestemmelse af vand.

— Passende apparatur til temperaturkontrol.

— pH-meter.

1.6.3. *Testfisk*

En eller flere arter kan bruges- og vælges af det afprøvende laboratorium.

Det foreslås, at arterne vælges på basis af vigtige, praktiske kriterier som, hvorvidt de er til rådighed hele året, hvor let de er at holde, deres egnethed til testning, deres relative følsomhed og andre økonomiske, biologiske eller økologiske faktorer af betydning. Fiskene skal være i god helbredstilstand og uden nogen synlige misdannelser.

Fiskearter, som anbefales til denne test, er angivet i bilag 2.

1.6.3.1. Opbevaring

Testfisk skal fortrinsvis komme fra en enkelt bestand og være af samme længde og alder. Fiskene skal holdes i mindst 12 til 15 dage under følgende betingelser:

Kar:

Der anbefales mindst 300 l til koldtvandsfisk, mindst 100 l til varmtvandsfisk.

Belastning:

Passende for systemet (recirkulation eller gennemløb) og fiskearten.

Vand:

Se 1.6.1.2.

Lys:

12 til 16 timers lys dagligt.

Koncentration af opløst oxygen:

Mindst 80 % mætning.

Fodring:

Dagligt eller tre gange ugentligt, sidste gang 24 time før testen begyndes.

1.6.3.2. Dødelighed

Efter en 48 timers tilvænningsperiode registreres dødeligheden og følgende kriterier anvendes:

— Større end 10 % af populationen på syv dage: hele partiet kasseres.

— Mellem 5 og 10 % af populationen: observationsperioden forlænges med yderligere syv dage. Hvis der ikke sker flere dødsfald, kan partiet accepteres, i modsat fald må det kasseres.

— Mindre end 5 % af populationen: partiet accepteres.

1.6.4. *Tilvænning*

Alle fisk skal udsættes for vand af den kvalitet og med den temperatur, som skal anvendes i testen, i mindst syv dage, før de skal tages i anvendelse.

1.6.5. *Prøvens udførelse*

Forud for en endelig test kan foretages en indledende prøve med det formål at få oplysninger om det koncentrationsinterval, som skal anvendes i hovedtesten.

Udover testserien skal medtages en kontrolgruppe uden teststoffet, men med de behørige hjælpestoffer.

Koncentrationerne må ikke falde mere end 20 % i forsøgsperioden. Afhængig af teststoffets fysiske og kemiske egenskaber, vælges en statisk eller semi-statisk test eller en gennemløbstest som den mest hensigstmæssige, for at opfylde dette krav.

Fiskene udsættes for stoffet som beskrevet nedenfor.

Varighed:

Mindst 48 timer, men helst 96 timer.

Antal dyr:

Mindst ti pr. koncentration.

Kar:

Af passende kapacitet i relation til den anbefalede belastning.

Belastning:

For statiske og semi-statiske tests, anbefales 1,0 g/l som den maksimale belastning. For gennemløbssystemer kan en større belastning accepteres.

Testkoncentration:

En kontrol og mindst fem koncentrationer, som afviger med en konstant faktor på højst 1,8, og som dækker intervallet 0—100 % dødelighed.

Vand:

1.6.1.2.

Lys:

12 til 16 timers lys dagligt.

Temperatur:

Passende for arten (Bilag II) men indenfor ± 1 °C i testperioden.

Koncentration af opløst oxygen:

Ikke mindre en 60 % mætning ved den valgte temperatur.

Fodring:

Ingen.

Fiskene inspiceres efter de første to til fire timer og med højst 24 timers mellemrum. Fisk betragtes som døde, hvis berøring af haleroden ikke giver nogen reaktion og ingen respirationsbevægelser er synlige. Døde fisk fjernes, når de observeres, og dødeligheden noteres.

Synlige abnormaliteter (f. eks. tab af ligevægt, ændringer i svømmeadfærd, respirationsbevægelse, pigmentering osv.) noteres.

Måling af pH, opløst oxygen og temperatur skal foretages dagligt.

2. DATA OG BEDØMMELSE

Den procentvise dødelighed aftegnes for hver anbefalet eksponeringsperiode mod koncentrationen på logaritmisk sandsynlighedspapir. På øjemål tilpasses en kurve til punkterne og koncentrationen svarende til 50 % respons aflæses (se figur i tillæg 3).

Dette er LC_{50} for den pågældende eksponeringsperiode.

Når de opnåede data er dækkende, kan den mediane koncentration, LC_{50} og dens konfidensgrænser ($p = 0,05$) beregnes ved hjælp af standarprocedurer.

LC_{50}-værdien afrundes til eet (eller højst to) betydende cifre.

I de tilfælde, hvor hældningen af koncentration/% responskurven er for stejl til at LC_{50} kan beregnes, er en grafisk bestemmelse tilstrækkelig.

Når to på hinanden følgende koncentrationer med et forhold på 1,8 kun giver 0 og 100 % mortalitet, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for LC_{50} intervallet.

Hvis man bemærker, at teststoffet ikke kan holdes stabilt eller homogent, skal dette anføres, og man må være forsigtig ved fortolkningen af resultaterne.

3. RAPPORTERING

Testrapporten bør om muligt indeholde:

— Oplysninger om testorganismen (videnskabeligt navn, stamme, leverandør, enhver forbehandling samt antal og størrelse, der er brugt ved hver testkoncentration).

— En liste over de anvendte koncentrationer og alle tilgængelige oplysninger vedrørende stabiliteten af testkemikaliet ved de anvendte koncentrationer.

— Beskrivelse af testudstyret.

— Hvis kemiske analyser er udført, skal metoder og resultater angives.

— Oprindelsen af vand brugt til fortynding og dets vigtigste kemiske egenskaber (pH, hårdhed og temperatur).

— Koncentrationen af hjælpestoffer.

— I tilfælde af tungtopløselige stoffer angives metoden til fremstilling af stam- og testopløsninger.

— Grunde for valg af og detaljer vedrørende den anvendte testprocedure, (f. eks. varighed, statisk, semi-statisk, tilsætningshastighed, gennemløbshastighed: beluftning, antal af fisk osv.).

— Lysforhold.

— Højeste testkoncentration, der ikke forårsager dødsfald inden for testperioden.

— Laveste testkoncentration, der forårsager 100 % dødelighed inden for testperioden.

— Kumulative dødelighed for hver koncentration og i kontrolprøven (eller kontrol med hjælpestoffet, hvis påkrævet) på de anbefalede observationstidspunkter.

— Værdier for LC_{50} på hvert af de anbefalede observationstidspunkter (om muligt med 95 % konfidensgrænser).

— Statistiske metoder, som er anvendt til bestemmelse af LC_{50}.

— Afbildning af koncentrations-% responskurve ved slutningen af testen.

— Om muligt hældning af koncentrations-% responskurven ved afslutningen af testen og dens 95 % konfidensgrænser.

— Koncentration af opløst oxygen, pH og temperatur for hver 24 timer.

— Hvis der er anvendt referencestof, skal de opnåede resultater anføres.

— Det må godtgøres at kvalitetskriterierne er opfyldt.

4. REFERENCER

(1) OECD, Paris 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30, Final.

Tillæg 1

Kunstigt fremstillet ferskvand

Eksempel på brugbart vand til fortynding

Alle kemikalier skal være af analytisk renhedsgrad. Vandet skal være destilleret vand af god kvalitet eller afioniseret vand med en ledningsevne på mindre end 5 μScm^{-1}.

Stamopløsning

$CaCl_2 : 2H_2O$ Calciumchlorid dihydrat	11,76 g,
opløst i vand ad 1 liter.	
$MgSO_4 : 7H_2O$ Magnesiumsulfat heptahydrat	4,93 g,
samme procedure	
$NaHCO_3$ Natriumhydrogencarbonat	2,59 g,
samme procedure.	
KCl Kaliumchlorid	0,23 g.
samme procedure	

Kunstigt fremstillet ferskvand til fortynding

Bland 25 ml af hver af de fire stamopløsninger og fortynd til en liter med vand.

Beluft indtil koncentrationen af opløst oxygen svarer til mætningsværdien.

pH skal være 7,9 ± 0,3. Om nødvendigt justeres med NaOH (Natriumhydroxid) eller HCl (Hydrogenchlorid).

Det således fremstillede vand til fortynding henstår i ca. 12 timer og behøver ikke at blive beluftet yderligere.

Summen af Ca- og Mg-ioner i denne opløsning er 2,5 mmol/l. Forholdet mellem Ca- Mg-ioner er 4:1 og mellem Na-K-ioner 10:1. Den totale basestyrke af denne opløsning er 0,8 mmol/l.

Afvigelser ved fremstillingen af fortyndingsvandet må ikke medføre ændringer i vandets sammensætning eller egenskaber.

Tillæg 2

Fiskearter, der anbefales til testning

Anbefalede arter	Anbefalet temperatur interval (°C)	Anbefalet længde af testdyr (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrafisk	20 til 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae)	20 til 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus latipes (Teleostei, Cyprinidae) (Linne 1758) Karpe	20 til 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850)	20 til 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 til 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Linnaeus 1758)	20 til 24	5,0 ± 2,0
Salmo gairdneri (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Regnbueørred	13 til 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linne 1758)	20 til 24	6,0 ± 2,0

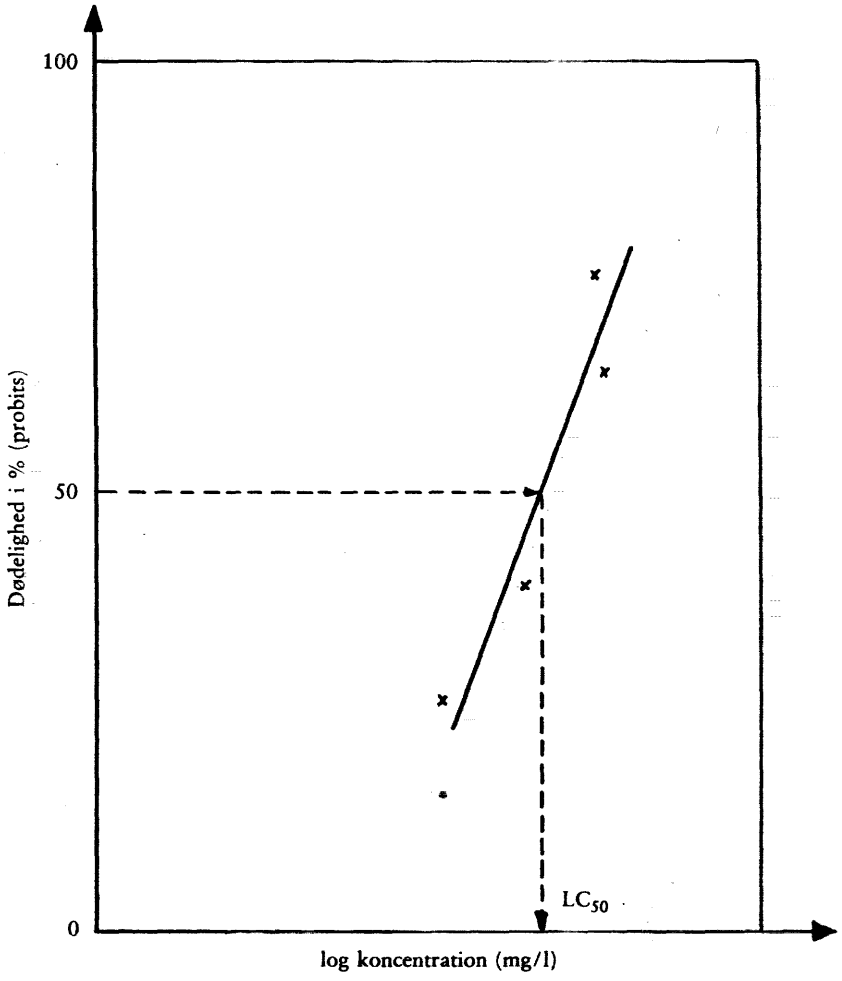
Opdrætsbetingelser

De ovenfor nævnte fisk er lette at opdrætte og eller let tilgængelige hele året rundt. De kan opdrættes enten i dambrug eller i laboratoriet under sygdoms- og parasitkontrollerede betingelser, sådan at testdyrene er sunde og af kendt afstamning. Disse fisk er tilgængelige i store dele af verden.

Tillæg 3

Eksempel på koncentration / % dødelighedskurve

Exempel på bestemmelse af LC_{50} på log-probit papir



Tillæg 4

Liste over eksempler på standardprocedurer

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30, Final.

(2) ISO/TC/147/SC 5/WG/3. — Draft proposal for screening chemicals and products for acute toxicity to fish using a static, semi-static or flow-through method. — Document 7346/I, II, III, 1980/06/15 ISO/DP.

(3) Eidgenössiches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen. 38 412 (L1) und L (15).

(5) AFNOR. Determination de la toxicite 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 on the aquatic environment, Volume I and II, Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands 1980.

(8) Environmental Protection Agency 1975. Methods for the Acute Toxicity Tests with fish, Macroinvertebrates and Amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms. Ecological Research Series EPA-660-75-009.

(9) Environmental Protection Agency. January 1978. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development. EPA-600/4-78-012.

(10) Environmental Protection Agency: Toxic Substance Control, March 16 1979, Part IV.

(11) Standard methods for the Examination of Water and Wastewater. 14th edition 1975 APHA-AWWA-WPCF.

(12) Commission of the European Communities. Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. CEE Study D.8368, 22 March 1979.

(13) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. A simplified method for Evaluating dose Effects Experiments, J. Pharm. Exp. Therap., Vol. 96, 1949, p. 99.

C. 2. AKUT TOKSICITET FOR *DAFNIER*

1. METODE

1.1. Indledning

Inden undersøgelsen begyndes er det ønskeligt så vidt muligt at have oplysninger om stoffets vandopløselighed, damptryk, kemisk stabilitet, dissociationskonstanter og bionedbrydelighed.

Yderligere oplysninger (f. eks. strukturformel, renhedsgrad, art og mængde af signifikante urenheder, tilstedeværelse og mængde af tilsætningsstoffer, og fordelingskoefficienten for n-octanol/-vand) bør indgå såvel i forsøgsplanlægningen som i fortolkningen af resultaterne fra undersøgelsen.

1.2. Definitationer og enheder

Direktivets ønske om LC_{50} for dafnier opfyldes ved bestemmelsen af EC_{50}, som beskrevet i denne metode.

Den akutte toksicitet udtrykkes ved nærværende undersøgelse som den mediane effektive koncentration (EC_{50}), som immobiliserer. Dette er den koncentration (udtrykt ved initiale værdier), der immoboliserer 50 % af dafnierne i en testgruppe i løbet af en 24 timers forsøgsperiode. 48 timers EC_{50} for immobilisering kan også bestemmes, hvis det er praktisk muligt.

Immobilisering

De dyr, der ikke er i stand til at svømme i løbet af en periode på 15 sekunder efter en forsigtig omrøring i prøveglasset, anses for at være immobile.

Alle koncentrationer af det undersøgte stof udtrykkes som vægt/-vægtforhold (parts pr. million).

1.3. Referencestoffer

Et referencestof kan afprøves til en demonstration af, at følsomheden hos de anvendte forsøgsdyr under laboratoriebetingelserne ikke er ændret signifikant.

Der angives ingen referencestoffer til nærværende metode.

1.4. Testmetodens principper

Dafnierne udsættes for stoffet, der skal undersøges, tilsat vand i forskellige koncentrationer i 24 timer. Om nødvendigt kan dette udstrækkes til 48 timer.

Under i øvrigt ens forsøgsbetingelser og i et passende koncentrationsområde, vil de forskellige koncentrationer af et teststof, give forskellige gennemsnitlige grader af påvirkning af dafniernes svømmedygtighed. Forskellige koncentrationer resulterer i, at forskellige procentdele af dafnierne ikke er i stand til at svømme ved afslutningen af forsøget. Koncentrationerne, der forårsager 0 og 100 % immobilisering udledes direkte af de ved forsøget gjorte observationer, hvorimod 24 timers EC_{50} (respektive 48 timers EC_{50}) om muligt bestemmes ved beregning.

I nærværende metode anvendes et statisk system. De anvendte opløsninger udskiftes således ikke i testperioden.

1.5. Kvalitetskriterier

— Immobiliseringen i kontrolprøverne må ikke overskride 10 % ved afslutning af undersøgelsen.

— oxygenkoncentrationen må ikke være under 2 mg/l ved afslutningen af undersøgelsen.

— Dafnier, der anvendes til undersøgelsen, bør i det mindste i kontrolgruppen ikke være fanget af vandets overflade.

1.6. **Metodebeskrivelse**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Opløsninger af teststofferne

Stamopløsninger af den ønskede styrke fremstilles ved at opløse stoffet i afioniseret vand eller vand beskrevet i 1.6.1.2.

Stamopløsninger af stoffer med lav vandopløselighed kan fremstilles ved ultrasonisk dispergering eller om nødvendigt ved anvendelse af organiske opløsningsmidler, emulgatorer eller dispergeringsmidler. Når sådanne hjælpestoffer anvendes, bør kontroldafnierne udsættes for disse hjælpestoffer i de koncentrationer, der anvendes ved den højeste koncentration af teststoffet der undersøges. Koncentrationen af sådanne hjælpestoffer bør ikke overstige 0,1 g/l.

De udvalgte testkoncentrationer fremstilles ved fortynding af stamopløsningerne. Hvis høje koncentrationer skal testes kan stoffet opløses direkte i vandet der anvendes til fortynding.

Undersøgelsen bør udføres uden justering af pH. Hvis der observeres store ændringer i pH, tilrådes det at gentage forsøget med pH-justering og rapportere resultaterne. I så tilfælde skal pH-værdien i stamopløsningen justeres til pH-værdien i opløsningsvandet, medmindre der er specifikke grunde til ikke at gøre dette. HCl og NaOH bør foretrækkes til dette formål. Denne pH-justering bør foretages således, at koncentrationen af teststoffet i stamopløsningen ikke ændres signifikant. Sker der kemiske reaktioner eller udfældninger af teststoffet som følge af denne justering, skal dette rapporteres.

1.6.1.2. Opbevarings- og fortyndingsvand

Alt vand, der kan anvendes til dyrkning af dafnier, hvad enten det er naturligt vand eller kunstigt fremstillet ferskvand (se tillæg), kan anvendes ved undersøgelsen. For at undgå at skulle tilvænne forud for undersøgelsen, anbefales det, at bruge samme vand til testen, som er anvendt ved dyrkning af kulturen.

1.6.2. *Apparatur*

Normalt laboratorieapparatur og -udstyr bør anvendes. Udstyr, der kommer i kontakt med testopløsningerne, bør fortrinsvis være fremstillet helt af glas:

— oxygenmåler (med mikroelektroder eller andet passende udstyr til måling af opløst oxygen i prøver med lille rumfang);

— passende apparatur til temperaturkontrol;

— pH-meter;

— udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed.

1.6.3. *Testorganisme*

Daphnia magna eller *Daphnia pulex*, der er mere end seks timer og mindre end 24 timer gammel ved forsøgets start, dyrket i laboratoriet, fri for åbenbare sygdomme og med en kendt historie (f.eks. dyrkning — alle forbehandlinger osv.).

1.6.4. *Fremgangsmåde*

En forprøve kan gå forud for den endelige undersøgelse for af opnå viden om det koncentrationsområde, der skal anvendes ved hovedundersøgelsen. En kontrolprøve med alle hjælpestoffer, men uden det undersøgte stof, bør udføres ud over forsøgsserierne.

Dafnierne udsættes for stoffet som beskrevet nedenfor:

Varighed:

Mindst 24 timer.

Antal dyr:

Mindst 20 dyr ved hver testkoncentration, helst delt op i fire hold med fem dyr i hver eller to med ti i hver.

Belastning:

Mindst 2 ml af prøveopløsningen bør være til rådighed for hvert dyr.

Testkoncentration:

Testopløsningen skal fremstilles umiddelbart før tilsætningen af dafnier, og helst uden brug af andre opløsningsmidler end vand. Koncentrationerne laves i geometriske serier, med en koncentrationsratio på 1,8. Der medtages tilstrækkelige mange koncentrationer til at opnå 0 og 100 % immobilisering efter 24 timer og til at få passende antal grader af immobiliseringer til bestemmelse af 24 timers EC_{50}. EC_{50}-bestemmelsen bør udføres samtidig med kontroltesten.

Vand:

Se 1.6.1.2.

Lys:

En lys-mørke cyklus kan anvendes, men fuldstændigt mørke er acceptabelt.

Temperatur:

Prøvetemperaturen bør ligge mellem 18 og 22 °C, men i den enkelte test bør temperaturen holdes inden for ± 1,0 °C.

Beluftning:

Testopløsningerne må ikke beluftes ved luftgennembobling.

Fodring:

Ingen.

pH og oxygenkoncentrationen i kontrolprøverne og i alle testkoncentrationerne måles ved slutningen af forsøget. pH i testopløsningerne bør ikke ændres.

Flygtige forbindelser bør undersøges i helt fyldte og helt tillukkede beholdere, der er store nok til, at oxygenmangel undgås.

Dafnierne undersøges i det mindste efter 24 timers inkubering og igen efter 48 timer, såfremt forsøgstiden forlænges.

2. DATA OG VURDERING

Afbild den cumulative procentvise immobilisering ved hver koncentration efter 24 timers eksponering, som funktion af koncentrationerne og på et logaritmisk sandsynlighedspapier. Tilpas en linje til punkterne og aflæs den koncentration, der svarer til 50 % reaktion.

Når de opnåede data er dækkende, kan den mediane koncentration og dens konfidensgrænser ($p = 0,05$) beregnes ved hjælp af standardprocedurer.

EC_{50}-værdien bør rundes af til en (eller højst to) betydende ciffer.

I de tilfælde, hvor hældningen af kurven over koncentrations / % responskurven er for stejl, til at en beregning af EC_{50} er mulig, er et grafisk estimat tilstrækkeligt.

Når to på hinanden følgende koncentrationer med en ratio på 1,8 kun giver 0 og 100 % immobilisering, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for EC_{50} intervallet.

Hvis det observeres, at stabiliteten eller homogeniteten af det undersøgte stof ikke kan opretholdes, bør man være forsigtig med tolkningen af resultaterne, og det bør rapporteres.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal, om muligt, indeholde:

— Oplysninger om den anvendte organisme (videnskabeligt navn, stamme, herkomst, forbehandlinger, dyrkningsmetoder — inklusive kilde, art og mængde af foder og fodringsfrekvens).

— Antal dafnier anvendt ved hver testkoncentration.

— Liste over de anvendte koncentrationer og tilgængelige oplysninger om stabiliteten af teststoffet ved de koncentrationer, der er anvendt i testopløsningerne.

— Beskrivelse af forsøgsbeholdere, testopløsningernes rumfang i hver beholder, antal af dyr i hver beholder.

— Hvis der er udført kemiske analyser: de anvendte metoder og opnåede resultater.

— Oprindelse af vand anvendt til fortynding og dets væsentligste kemiske karakteristika.

— Metode til fremstilling af stam- og testopløsninger.

— Koncentrationer af alle anvendte hjælpestoffer (organiske opløsningsmidler, dispergeringsmidler osv.).

— Lysforhold.

— Højeste testkoncentration, som ikke giver immobilisering i undersøgelsesperioden.

— Laveste testkoncentration, som giver 100 % immobilisering i undersøgelsesperioden.

— Kumulativ immobilisering i blindprøven, i kontrolprøven med hjælpestofferne og i hver afprøvet koncentration i de(n) anbefalede observationstid(er) (24 eller 24 og 48 timer).

— EC_{50}-værdier for hver af de anbefalede observationstider (med 95 % konfidensinterval om muligt).

— Afbildning af den tilhørende koncentration/% responskurve opnået ved slutningen af forsøget.

— Statistiske metoder, der er anvendt ved bestemmelsen af EC_{50}-værdien.

— Om muligt hældningen af koncentration-/% responskurven ved 24 timer med tilhørende 95 % konfidensinterval.

— Koncentration af opløst oxygen, pH-værdier, temperatur af prøveopløsningerne.

— Hvis der anvendes et referencestof, må dets navn og opnåede resultater anføres.

— Opfyldelse af kvalitetskriterierne.

4. REFERENCER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 202. Decision of the Council C(81) 30. Final.
(2) ISO Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus *(Cladocera — crustacea)* ISO/6341.
(3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus *(Cladocera —crustacea)* NFT 90 301.
(4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).

Tillæg

Kunstigt fremstillet ferskvand

Eksempel på egnet vand til fortynding

Alle kemikalier skal være af analytisk renhedsgrad.

Vandet skal være destilleret vand af god kvalitet eller afioniseret vand med en ledningsevne på under 5 μScm^{-1}.

Stamopløsning

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ Calciumchlorid dihydrat	11,76 g,
opløst i 1 l vand	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Magnesiumsulfat heptahydrat	4,93 g,
samme procedure	
$NaHCO_3$ Natriumhydrogencarbonat	2,59 g,
samme procedure	
KCl Kaliumchlorid	0,23 g.
samme procedure	

Kunstigt fremstillet ferskvand til fortynding

Bland 25 ml af hver af de fire stamopløsninger og fyld op til 1 liter med vand.

Beluft indtil koncentrationen af opløst ilt svarer til mætningsværdien.

pH skal være 7,9 ± 0,3. Om nødvendigt justeres pH med NaOH (natriumhydroxid) eller HCl (hydrogenchlorid).

Det på denne måde fremstillede vand til fortynding, stilles til side i ca. 12 timer og behøver ikke beluftes yderligere.

Summen af Ca- og Mg-ioner i denne opløsning er 2,5 mmol/l. Forholdet mellem Ca- og Mg-ioner er 4:1 og mellem Na- og K-ioner er det 10:1. Den totale alkalinitet af denne opløsning er 0,8 mmol/l.

Ændringer i fremstillingen af fortyndingsvandet må ikke ændre sammensætningen eller egenskaberne af vandet.

C. 3. NEDBRYDNING

BIOLOGISK NEDBRYDNING: MODIFICERET OECD SCREENING TEST

1. METODE

1.1. Indledning

Formålet med metoden er at måle bionedbrydeligheden af vandopløselige, ikke flygtige organiske stoffer i et aerobt, vandigt miljø ved en begyndelseskoncentration svarende til 5 til 40 mg DOC/l (DOC = dissolved organic carbon, dvs. opløst organisk kulstof pr. liter). Hvis detektionsgrænsen for måleapparater til bestemmelse af organisk kulstof forbedres, kan brugen af lavere testkoncentrationer være fordelagtig, især for toksiske stoffer. Indholdet af organisk kulstof i teststoffet må være kendt.

Metoden er kun anvendelig for de organiske teststoffer, der ved den anvendte testkoncentration,

— i det mindste er opløselige i vand ved testkoncentrationerne (5 til 40 mg DOC/l),

— har et ubetydeligt damptryk,

— ikke er hæmmende over for bakterier, og som

— ikke adsorberes væsentligt til glasoverflader.

Oplysninger om stoffets toksicitet over for mikroorganismer kan være nyttig for fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer.

Oplysninger om stoffets toksicitet over for mikroorganismer kan være nyttig for fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer.

1.2. Definitioner og enheder

Nedbrydningen er defineret som den del af teststoffet, som forsvinder, udtrykt i procent DOC-fjernelse.

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100,$$

hvor

D_t = nedbrydning i procent DOC fjernet til tiden t,

C_0 = startkoncentration af DOC i kulturmediet (mg DOC/l),

C_t = koncentration af DOC i kulturmediet til tiden t (mg, DOC/l),

$C_{bl(0)}$ = startkoncentration af DOC i blindprøven (mg DOC/l),

$C_{bl(t)}$ = koncentration af DOC i blindprøven til tiden t (mg DOC/l).

1.3. Referencestoffer

Det er ønskeligt at bruge passende kontrolkemikalier til at kontrollere aktiviteten af inoculum. F. eks. kan anilin, natriumacetet eller natriumbenzoat bruges hertil og de skal udvise en DOC-fjernelse på mere end 70 % inden for ti dage, regnet fra den dag, hvor det observerede niveau af bionedbrydning først overskrider 10 %. Hvis ikke disse resultater opnås inden for en testperiode af 28 dage, anses testen for ugyldig og skal gentages med et inoculum fra en anden kilde.

1.4. **Metodens princip**

En forudbestemt mængde af stoffet opløses i et uorganisk medium (mineralsk næringsopløsning, tilsat sporelementer og essentielle vitaminer) til en koncentration svarende til 5 til 40 mg DOC/l. Opløsningen inokuleres med et lille antal mikroorganismer fra en blandet population og gennemluftes ved 20 til 25 °C i mørke eller i kun diffust lys.

Nedbrydningen følges ved hjælp af DOC analyse gennem en 28 dages periode.

Proceduren efterprøves ved hjælp af et kontrolstof. En DOC-blindprøve gennemføres i en parallel test, der hverken indeholder teststof eller kontrolstof.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Metodens reproducerbarhed er efterprøvet i OECD- og EØF-ringtests og fundet passende for en screening-test.

Den laveste koncentration af teststoffer, ved hvilken denne metode kan bruges er stort set bestemt af følsomhedsgrænsen for organisk kulstof (0,5 mg C/l på nuværende stade) og af koncentrationen af opløst organisk kulstof i næringsopløsningen.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Vand

Deioniseret eller destilleret vand uden indhold af toksiske stoffer (specielt kobber) til alment brug som opløsningsmiddel. Vand, som er blevet deioniseret ved destillation eller ved ionbytning, er passende.

Det destillerede (eller deioniserede) vand må ikke indeholde mere end 10 % af det organiske kulstof, som tilføres med teststoffet.

En høj renhed af vandet er nødvendig i betragtning af, at DOC analyserne foretages i koncentrationsintervallet 0 til 40 mg/l. Forureningerne stammer fra uundgåelige urenheder, men også fra ionbytterresiner og mikrobiel vækst (bakterier, alger under indflydelse af lys, osv.). Kun vand fra samme beholdning må anvendes til hver testserie, og vandet skal kontrolleres forud ved DOC analyser. Om nødvendigt kan passende vand fremstilles ved UV-bestråling eller på anden måde.

1.6.1.2. Næringsopløsning

Næringsopløsningen indeholder 1 ml af hver af de følgende opløsninger (a) til (f) pr. liter vand (1.6.1.1) (PA betyder at reagenserne er af analytisk renhedsgrad = AR).

a) KH_2PO_4 kaliumdihydrogenphosphat PA 8,5 g,
K_2HPO_4 Kaliumhydrogenphosphat PA 21,75 g,
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ natriumhydrogenphosphat dihydrat PA 33,4 g,
NH_4Cl ammoniumchlorid PA 20,0 g
opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml.
pH skal være 7.2;

b) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ magnesiumsulfat hæptahydrat PA 22,50 g,
opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml;

c) $CaCl_2$ calciumchlorid PA 27,50 g
opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml;

d) $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ jern(III)chlorid hexahydrat PA 0,25 g
opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml;
denne opløsning laves først umiddelbart før brug;

e) sporstofopløsning
$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$ Mangan(II)sulfat tetrahydrat (= 30,23 mg, $MnSO_4$, $2H_2O$) PA 39,9 mg
H_3BO_3borsyre PA 57,2 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ zinksulfat heptahydrat PA 42,8 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ hexaammoniumheptamolybdat(IV) (= 36,85 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) PA 34,7 mg
Fe-chelat ($FeCl_3 \cdot$EDTA) PA 100 mg
opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml;
sterilisation af stamopløsningen af sporstoffer kan ske ved 120° C, 2 atm., 20 min.

f) Vitaminopløsning
Biotin PA 0,2 mg
Nikotinsyre PA 2,0 mg
Thiamin PA 1,0 mg
p-Aminobenzoesyre PA 1,0 mg
Pantothensyre PA 1,0 mg
Pyridoxamin PA 5,0 mg
Cyanocobalamin PA 2,0 mg
Folinsyre PA 5,0 mg
opløses i vand (1.6.1.1) til 100 ml.

Opløsningen sterilfiltreres gennem 0,2 µm membranfiltre. I stedet for opløsning 1.6.1.2 (f) kan 15 mg gærekstrakt bruges pr. 100 ml vand (1.6.1.1).

1.6.1.3. Kontrolstoffer

Anilin (frisk destilleret), natriumacetat, natriumbenzoat.

1.6.1.4. Mercurichloridopløsning

1 % (w/v) $HgCl_2$ i vand (1.6.1.1).

1.6.2. *Apparatur*

1.6.2.1. Rystemaskine til to liter Erlenmeyerkolber med automatisk temperaturkontrol eller anvendt i et rum med konstant temperatur ved 20 til 25 °C.

1.6.2.2. Tyndhalsede to liter Erlenmeyerkolber, (foldede, rillede kolber anbefales). Kolberne skal renses omhyggeligt med f. eks. alkoholisk saltsyre før brugen, skylles og tørres for at undgå forurening med rester fra tidligere prøver. Kolberne skal også renses, før de bruges første gang, da de kan være forurenede.

1.6.2.3. Membranfiltreringsapparatur

1.6.2.4. Membranfiltre 0,2 µm

1.6.2.5. Kulstofanalysator

1.6.3. *Forberedelse af inoculum*

Inoculum kan fås fra en af følgende fire kilder, forudsat at dets aktivitet kontrolleres ved hjælp af et kontrolstof (1.6.1.3).

1.6.3.1. Inoculum fra et sekundært afløb

Inoculum tages fortrinsvis fra et sekundært afløb af god kvalitet ved et rensningsanlæg, der hovedsagelig behandler husholdningsspildevand. Prøven skal holdes under aerobe betingelser indtil brugen. Som forberedelse af inoculum filtreres prøven gennem et groft filter, idet de første 200 ml bortkastes. Filtratet holdes aerobt indtil brugen. Inoculum skal anvendes samme dag, som prøven er taget.

1.6.3.2. Inoculum fra jord

100 g jord (frugtbar, ikke steril) opslemmes i 1 000 ml chlorfrit drikkevand (jord med et ekstremt højt indhold af ler, sand eller organisk kulstof er ikke egnet). Efter omrøring henstår suspensionen i 30 minutter til bundfældning.

Supernatanten filtreres gennem et groft filtrerpapir, idet de første 200 ml bortkastes. Udluftning af filtratet begyndes straks og fortsættes indtil brugen. Inokulering skal foretages samme dag, som prøven er taget.

1.6.3.3. Inoculum fra overfladevand

Et inoculum kan tages fra et passende overfladevand. Prøven filtreres gennem groft filtrerpapir, idet de første 200 ml bortkastes. Filtratet holdes aerobt indtil brugen. Inokulering skal foretages samme dag, som prøven er taget.

1.6.3.4. Blandet inoculum

Lige dele af de tre inoculumprøver blandes godt, og det endelige inoculum tages fra denne blanding.

Anvendeligheden af dette inoculum kontrolleres ved hjælp af et kontrolstof (1.6.1.3).

1.6.4. *Testprocedure*

Teststofferne bedømmes samtidigt, som dobbeltbestemmelser sammen med kontrolstoffet (1.6.1.3). Der udføres tillige en blindprøve med inokulering uden test- eller kontrolstof til bestemmelse af DOC-blindværdierne.

Der tilberedes en stamopløsning af teststof i vand (1.6.1.1). Der tilsættes så meget af denne stamopløsning til næringsopløsningen (1.6.1.2), at der opnås en kulstofkoncentration på 5 til 40 mg DOC/l. Kontrolstoffet (1.6.1.3) testes ved en startkoncentration svarende til 20 mg DOC/l.

To kolber (1.6.2.2) påfyldes 900 ml næringsopløsning og inokuleres med 0,5 ml/l af inoculum (1.6.3). Kolbens munding dækkes f. eks. med aluminiumfolie, således at udveksling af luft mellem kolben og den omgivende atmosfære ikke er unødvendigt hindret. (Bomuldsvat er uanvendeligt, på grund af DOC-analysen). Kolberne anbringes i rystemaskinen. Temperaturen holdes ændret på 20 til 25° C under testen, og kolberne afskærmes fra lys. Luften må være fri for forurening og toksiske stoffer (chlorerede opløsningsmidler osv.).

I løbet af bionedbrydningstesten dobbelbestemmes DOC-koncentrationerne på den første dag, på dag 27 og dag 28. Mindst tre analyser skal yderligere udføres for at følge nedbrydningen (omkring dag 7, dag 14 og dag 21).

Kun det nødvendige volumen af kulturmedium må udtages til hver bestemmelse. For forskelligt apparatur, f. eks. contrifugering eller membranfiltrering forud for kulstofanalyen kræves forskellige volumina for analysens gennemførelse. Tab ved fordampning kompenseres ved tilsætning af vand (1.6.1.1) i rette mængde. Kulturmediet skal blandes godt før der udtages en prøve. Hvis der hænger stof fast på kolbens inderside, må det opløses eller bringes i opslemning før prøven udtages. Membranfiltrering eller centrifugering må foretages omgående. Den filtrerede eller centrifugerede prøve skal analyseres

samme dag, ellers skal den konserveres med 0,05 ml merkurichlorid (1.6.1.4) for hver ti ml næringsmedium, eller opbevares ved to til fire ° C i højst 24 timer, eller under – 18° C ved længere perioder.

Hvis et plateau observeres før den 28. dag, kan testen sluttes. Hvis nedbrydningen tydeligt er startet, men ikke har nået et plateau ved den 28. dag, anses det for fornuftigt at forlænge forsøget en til to uger.

Alle trin forudsætter stor omhu og høj renhedsgrad af kolber, pipetter osv. (men ikke sterilitet).

1.6.5. *DOC-bestemmelserne*

Membranfiltre er egnede, hvis det godtgøres, at de hverken frigør kulstof eller adsorberer stoffet ved filtreringen.

Hvis prøverne centrifugeres, må dette gøres ved 40 000 m s^{-2} (~ 4 000 g) i 15 min., helst i en kølecentrifuge og under alle omstændigheder under 40° C.

(Bemærk: Differentieringen mellem TOC og DOC ved centrifugering ved meget lave koncentrationer synes ikke at virke godt, da enten ikke alle bakterier fjernes, eller da kulstof genopløses fra bakterieplasmaet. Ved højere testkoncentrationer (større end eller lig 10 mg C/l) og ved den samme lille inokulation synes, centrifugeringsfejlen at være relativt lille.

Prøven, der er udtaget fra kulturmediet (omkring 30 ml), centrifugeres eller membranfiltreres straks i filtreringsapparatet (1.6.2.3), idet der bruges filtre ifølge 1.6.2.4. De første 20 ml af filtratet bortkastes.

DOC-koncentrationen i det resterende filtrat (ca. ti ml) dobbeltbestemmes ved hjælp af TOC/DOC instrumentet (1.6.2.5). Hvis filtratet ikke kan analyseres samme dag, skal det konserveres ifølge 1.6.4.

2. DATA OG BEDØMMELSE

De analytiske resultater registreres på det vedlagte skema (tillæg 1) og værdien for den biologiske nedbrydning beregnes som angivet i 1.2.

DOC-koncentrationerne beregnes til nærmeste 0,1 mg/l. Gennemsnittet af D_t-værdierne rundes op til nærmeste hele procent.

Forløbet af nedbrydningstesten følges grafisk i et diagram som vist vedlagt (tillæg 2).

Resultaterne af nedbrydningstesten er gyldige, hvis følgende betingelse er opfyldt:

— Såfremt kontrolstoffet i den samme testserie udviser en DOC-fjernelse på $\geqslant$ 70 % inden for ti dage, regnet fra den dag, hvor niveauet af bionedbrydning først overskrider 10 %. Hele serien må forkastes, såfremt dette resultat ikke opnås inden for testperiodens 28 dage.

3. RAPPORT

3.1. Testrapporter

Testrapporten skal i videst mulige omfang indeholde følgende:

— data skal rapporteres på skema (tillæg 1);

— forløbet af nedbrydningen afbildes grafisk i et diagram, der viser lag-fase, nedbrydningsfase, hældning og »tidsvindue«, — dvs. en ti dages periode begyndende fra den dag bionedbrydningen først overskrider 10 %;

— bevis for testens gyldighed (nemlig at kontrolstoffet udviser ≥ 70 % DOC-fjernelse på ti dage, regnet fra den dag, hvor nedbrydningen overskrider 10 %, og opnået inden for testperiodens 28 dage.)

3.2. **Fortolkning af resultater**

På grund af denne tests stramme forsøgsbetingelser betyder et lavt resultat ikke nødvendigvis, at teststoffet ikke er bionedbrydeligt under miljøbetingelser, men indicerer, at mere arbejde vil være påkrævet for at afgøre dette.

Testkemikalier, der udviser et stort DOC-tab i denne test, anses for let bionedbrydelige, forudsat at dette niveau er nået inden for ti dage, regnet fra den dag, hvor det observerede niveau af bionedbrydning først overskrider 10 %.

4. **REFERENCER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301E. Decision of the Council C(81) 30. Final.

(2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159 til 173.

(3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, Exotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45—55.

Tillæg 1

Biologisk nedbrydning

Prøvningslaboratorium: .....

Teststof: .....

Exsp.-nr.: .....

Testresultater

Teoretisk koncentration: ..... mg/l DOC

Kulstofbestemmelser

	Kolbe nr.		DOC-koncentration efter x dage (mg/l)							
			0 (C_0)							
Test Mineralsk næringsopløsning med teststof og med inokulum	1	a_1								
		a_2								
		$C_{a(t)} = \frac{a_1 + a_2}{2}$								
	2	b_1								
		b_2								
		$C_{b(t)} = \frac{b_1 + b_2}{2}$								
Blind Mineralsk næringsopløsning uden teststof men med inokulum	3	bl_1								
		bl_2								
		$C_{bl(t)} = \frac{bl_1 + bl_2}{2}$								

Evaluering af forsøgsresultater

Kolbe nr.	Beregning	% DOC fjernet efter x dage							
		0							
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0							
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0							
Gennemsnit (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0							

(*) Gennemsnittet skal ikke beregnes, hvis der er stor forskel på D_1 og D_2.

Biologisk nedbrydning (Skema)

Prøvningslaboratorium: .....

Ansvarlig for undersøgelsen: .....

Dato for prøvningens start ..... Exsp. nr. .....

Teststof: .....

Kemisk Struktur: .....

Stamopløsning:

	mg/l	mg/l TOC (1)	mg/l DOC (2)
Teststofkonc.			

(1) Uoverensstemmelse mellem DOC og TOC værdier peger på utilstrækkelig opløselighed af teststoffet.
(2) Alle DOC værdier bestemt efter membranfiltrering eller centrifugering.

Kulstofanalysator: .....

Inoculum: .....

Testresultat

D_t = ... % DOC fjernet efter ..... dage

Prøvning af metodens gyldighed

Kontrolstof: .....

Resultat: ..... % DOC fjernet efter ..... dage

Referenceeksp. nr.: .....

Bemærkninger:

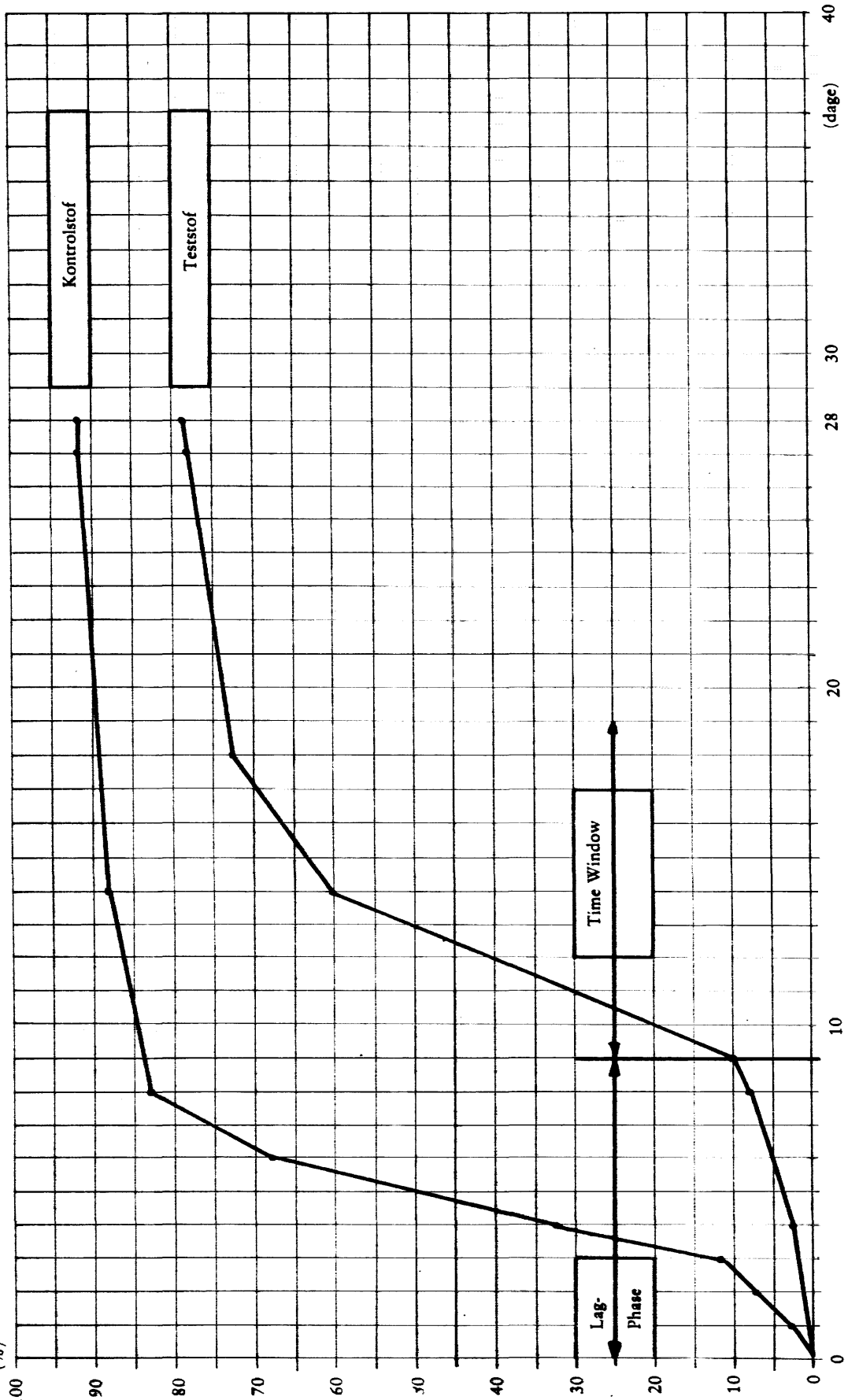
....

Dato Underskrift

Tillæg 2

Modificeret OECD Screening Test

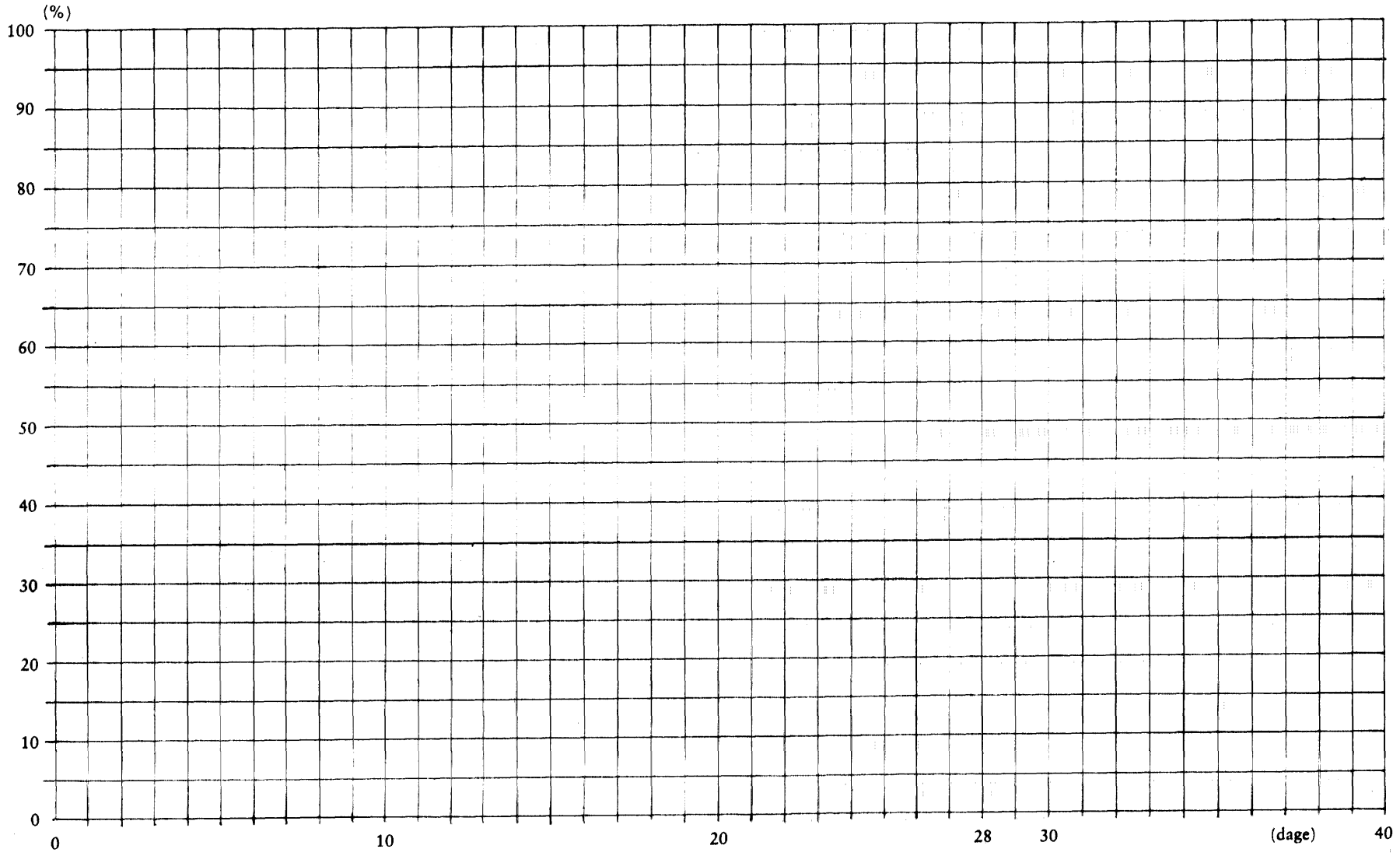
Prøvningslaboratorium: ..... **Teststof:** ..... **Exp. nr.:** .....



Modificeret OECD Screening Test

Prøvningslaboratorium: ..... Teststof: ..... Exsp. nr.: .....

DOC fjernet



C. 4. NEDBRYDNING

BIOLOGISK NEDBRYDNING: MODIFICERET AFNOR-TEST NFT 90/302

1. METODE

1.1. Indledning

Formålet med metoden er at måle bionedbrydeligheden af vandopløselige, ikke-flygtige organiske stoffer i et aerobt vandigt miljø ved en begyndelseskoncentration svarende til 40 mg DOC/l (DOC = dissolved organic carbon, opløst organisk kulstof). Hvis målegrænsen for apparater til bestemmelse af organisk kulstof forbedres, kan brugen af lavere test-koncentrationer være fordelagtig, især for toksiske stoffer.

Indholdet af organisk kulstof i teststoffet må være kendt.

Metoden er kun anvendelig for de organiske teststoffer, der ved den anvendte testkoncentration:

— i det mindste er opløselige i vand ved testkoncentrationen (40 mg DOC/l),

— har et ubetydeligt damptryk,

— ikke er hæmmende over for bakterier, og som

— ikke adsorberes væsentligt til glasoverflader.

Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedkomponenter vil være nyttig for fortolkningen af de opnåede resultater, specielt i de tilfælde, hvor resultaterne er lave.

Oplysninger om stoffets toksicitet over for mikroorganismer kan være nyttig for fortolkningen af lave resultater.

1.2. Definitioner og enheder

Nedbrydningen er defineret som den del af teststoffet som forsvinder udtrykt i procent DOC fjernelse:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100,$$

hvor

D_t = nedbrydning i procent DOC fjernet til tiden t.

C_0 = startkoncentration af DOC i kulturmediet (mg DOC/l).

C_t = koncentration af DOC i kulturmediet til tiden t (mg DOC/l).

$C_{bl(0)}$ = startkoncentration af DOC i blindprøven (mg DOC/l).

$C_{bl(t)}$ = koncentrationen af DOC i blindprøven til tiden t (mg DOC/l).

DOC = opløst organisk kulstof (»dissolved ogane carbon«).

1.3. Referencestoffer

Det er ønskeligt at bruge passende kontrolkemikalier til at kontrollere aktiviteten af inoculum. F. eks. kan anilin, natriumacetat eller natriumbenzoat bruges hertil, og de skal udvise en DOC fjernelse på $\geqslant$ 70 % inden for 28 dage. Hvis dette ikke er tilfældet, anses testen for ugyldig og skal gentages med et inoculum fra en anden kilde.

I denne specifikke test finder glucose specielt anvendelse i hæmningstesten og for at kontrollere aktiviteten af inoculum, hvilket også kan gøres med anilin, natriumacetat og natriumbenzoat.

1.4. **Metodens princip**

Kemo-organotrofe mikroorganismer bionedbryder organiske stoffer, der er opløst i vand, idet disse udgør den eneste kulstof- og energikilde. Stofferne undersøges ved en sådan koncentration, at det initiale indhold af organisk kulstof er 40 mg/l. Tilbageblivende organisk kulstof i opløsningen måles mindst efter 3, 7, 14 og 28 dage. Samtidig kontrolleres teststoffet for mulige hæmmende virkninger over for inoculum, Proceduren kontrolleres ved hjælp af et kontrolstof.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Metodens reproducerbarhed er efterprøvet i OECD og EØF-ringtests og fundet passende for en screening-test.

Den laveste koncentration af teststoffer, ved hvilken denne metode kan bruges, er stort set bestemt af følsomhedsgrænsen for organisk kulstofanalyse, som på nuværende stade er 0,5 mg C/l, og af koncentrationen af opløst organisk kulstof i næringsopløsningen.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

1.6.1. *Reagenser*

De reagenskemikalier der bruges, må være af anerkendt analytisk renhed.

1.6.1.1. Destilleret vand

Destilleret vand må ikke indeholde mere end 10 % af det organiske kulstof, som tilføres med teststoffet.

1.6.1.2. Næringsopløsning

Fremstil testmediet som anført nedenfor ved brug af sterilt materiale. Til brug for en liter opløsning opløses følgende i destilleret vand: (PA betyder, at reagenserne er af analytisk renhedsgrad = AR).

— $(NH_4)_2SO_4$ ammoniumsulfat	PA 0,300 g
— NH_4NO_3 ammoniumnitrat	PA 0,150 g
— KH_2PO_4 kaliumdihydrogenphosphat	PA 0,300 g
— $Na_2HPO_4 \cdot 12H_{20}$ natriumhydrogenphosphat dodecahydrat	PA 2,000 g
— $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ magnesiumsulfat heptahydrat	PA 0,050 g
— $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ calciumchlorid dihydrat	PA 0,050 g
— Gærekstrakt	0,005 g

pH er 7,5 ± 0,1.

Tilsæt en ml af følgende sporstofopløsning:

— $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ jern(II)sulfat heptahydrat	PA 0,100 g
— $MnSO_4 \cdot H_2O$ mangan(II)sulfat monohydrat	PA 0,100 g
— K_2MoO_4 Kaliummolybdat	PA 0,025 g
— $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ dinatriumtetraborat decahydrat	PA 0,025 g

— $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ cobalt(II)nitrat hexahydrat PA 0,025 g
— $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ kobber(II)chlorid dihydrat PA 0,025 g
— $ZnCl_2$ zinkchlorid PA 0,025 g
— NH_4VO_3 Ammoniumvanadat PA 0,010 g.

Destilleret vand til 100 ml

(sporstofopløsningen kan holde sig i en måned ved en temperatur på mellem 1 og 4° C).

Fortynd op til en liter og bland. Mediet skal bruges inden for 12 timer.

1.6.1.3. Kontrolstoffer

Anilin (frisk destilleret), natriumacetat, natriumbenzoat, glucose.

1.6.2. *Apparatur*

Sædvanlig laboratorieudstyr samt:

— apparatur til måling af organisk kulstof;

— spektrofotometer;

— centrifuge, 4 000 g;

— rysteapparat, der muliggør passende udluftning og rystning,

— apparatur til måling af opløst oxygen, pH-meter, 500 ml bredhalsede koniske kolber, sterile;

— apparatur til sterilfiltrering (membranfiltre med 0,22 µm porer).

Glasudstyret skal være omhyggeligt renset og helt fri for alle spor af organisk eller toksisk materiale.

1.6.3. *Fremstilling af inoculum*

Tag et passende volumen af en blanding af tre prøver fra forurenet overfladevand og afløb fra kommunale rensningsanlæg, der er fri for større specifikke forureninger. Bakterietælling for hver prøve skal vise mindst 10^5 bakterier/ml. Prøverne skal bruges som inoculum inden for 12 timer, inklusive transport, og de må ikke henstå mere end seks timer uden udluftning.

Der filtreres gennem papir for at fjerne større uopløselige partikler. Filtratet opsamles og passeres gennem et membranfilter med 0,22 µm porer.

Vask med en egnet isoton opløsing. Overfør de på membranen aflejrede bakterier til et lille volumen isoton opløsning. Der blandes godt. Mål adsorbansen ved 620 nm, og udled heraf koncentrationen af bakterier i relation til en standardkurve, som tidligere er fremkommet ved hjælp af tælling på fast medium af Pseudemonas fluorescens, stamme ATCC 15453. Tilsæt et sådant rumfang af opløsning, at koncentrationen af bakterier bliver $5 \pm 3 \times 10^7$ pr. ml. Brug inoculum inden for den næste time.

1.6.4. *Testprocedure*

Inkuberingen udføres uden tilstedeværelse af intenst lys i en inkubator holdt ved 20 til 25° C, og fri for toksiske dampe.

Forbered følgende opløsninger:

1. Opløsning af teststoffet i testmediet med en koncentration på 40 mg organisk kulstof/l.
2. Opløsning af glucose i testmediet med en koncentration på 40 mg organisk kulstof/l.
3. Opløsning af teststof og glucose i testmediet med de samme koncentrationer som ovenfor.
4. Hav ligeledes en passende mængde testmedium klar.

Bland de fire opløsninger hver for sig og sterilfiltrer dem gennem membranfilter.

Membranfiltre er egnede, hvis det godtgøres, et de hverken frigør kulstof eller absorberer stoffet ved filtreringen.

Alle nødvendige manipulationer skal udføres med sterile metoder. Fordel opløsningerne i test-kolber, der i forvejen er steriliserede, efter følgende skema:

kolbe nr. 1 (forsøg)	150 ml opløsning 1,
kolbe nr. 2 (forsøg)	150 ml opløsning 1,
kolbe nr. 3 (forsøg)	150 ml opløsning 1,
kolbe nr. 4 (steril kontrol)	150 ml opløsning 1,
kolbe nr. 5 (glucosekontrol)	150 ml opløsning 2,
kolbe nr. 6 (kontrol af hæmning)	150 ml opløsning 3,
kolbe nr. 7 (blindprøve)	150 ml opløsning 4.

Tilså kolberne 1, 2, 3, 5, 6, og 7 med 1,5 ml inokulum og bland godt ved manuel rystning.

Tag en prøve på tre til fem ml fra hver kolbe. Centrifuger prøverne ved 4 000 g i 15 minutter, idet temperaturen holdes under 26° C. Udtag supernatanterne til måling af organisk kulstof til tiden 0.

Anbring kolberne på rysteapparatet og lad dem stå der i hele testperioden: koncentrationen af opløst oxygen på dag 3 i flaske fem skal være mindst 5 mg/l. På samme måde som til tiden 0 udføres måling af organisk kulstof for kolberne (en, to, tre, fem, seks og syv mindst efter 3, 7, 14 og 28 dages inkubation. Dog kan testen betragtes som afsluttet, hvis reduktionen i kulstofindhold i kolberne en, to og tre når 95 % i forhold til initialindholdet.

Testen kan sluttes før den 28. dag, hvis et plateau observeres forinden.

Hvis en nedbrydning tydeligt er startet, men ikke har nået et plateau ved den 28. dag, anses det for fornuftigt at forlænge forsøget en eller to uger.

Ved slutningen af testen udføres en måling af organisk kulstof i kolbe fire på samme måde som til tiden 0, samt en kontrol for sterilitet ved udsåning i et glas med flydende medium og inkubering ved 25° C i fem dage.

Kulturmedium:	
tørret gærekstrakt	3 g,
pancreas casein pepton	6 g,
vand	1 000 ml.

Opløs de tørre komponenter til det komplette medium i kogende vand. Om nødvendigt justeres pH, således at det efter steriliseringen er 7,2 ± 0,2 ved 20° C.

Hvis målingerne af organisk kulstof må udskydes, opbevares supernatanten ved 4° C i mørke i hermetisk forseglede glas i højst 24 timer. Hvis analysen ikke kan udføres inden for 24 timer, nedfryses

prøven til under – 18 °C. I hver kolbe kontrolleres væskestanden af mediet for hver prøveudtagning, og som kompensation for vandtabet ved fordampning tilsættes destilleret vand, som er sterilfiltreret gennem membranfilter med 0,22 mm porer, til samme volumen som efter foregående prøveudtagning.

2. DATA OG BEDØMMELSE

De analytiske resultater angives på det vedlagte skema (tillæg 1) og værdien for den biologiske nedbrydning beregnes som angivet i 1.2.

Resultaterne af nedbrydningstesten er gyldige, hvis følgende betingelser er opfyldt:

— niveauet af glucosenedbrydning i kolbe fem skal være mindst 80 % på dag syv;

— ved afslutningen af testen skal kolbe fire stadig være steril.

— Koncentrationen af opløst oxygen i kolbe fem skal være mindst 5 mg/l på dag tre.

Niveauet af glucosebionedbrvdning i kolbe seks skal på dag syv være mindst 75 % af, hvad der er observeret i kolbe fem. Hvis denne grænse ikke er nået, antages teststoffet at have hæmmende virkning på de tilstedeværende bakterier, og metoden kan derfor ikke anvendes ved den specificerede koncentration.

Bemærkninger

Ved sammenligning af den procentvise eliminering af kulstof i kolberne en, to og tre på den ene side med kolbe fire på den anden side, kan der skelnes mellem årsagerne til den iagttagne nedbrydning:

— de fysisk-kemiske mekanismer i kolbe fire,

— de fysisk-kemiske samt de biologiske mekanismer i kolberne en, to og tre.

3. RAPPORT

3.1. Testrapport

Testrapporten skal i videst mulige omfang indeholde følgende:

Alle de eksperimentelle resultater vedrørende teststoffet, referencestoffet og blindprøverne skal anføres.

Specielt nævnes følgende punkter:

— forsvindingsgraden for produktet i kolbe fire ved slutningen af testen;

— alle iagttagne hæmningsfænomener;

— bevis for gyldighed;

— forløbet af nedbrydningen afbildes grafisk i et diagram, der viser lag-fase, nedbrydningsfase, hældning og »tidsvindue«, — dvs. en ti-dages periode begyndende fra den dag bionedbrydningen først overskrider 10 %.

3.2. Fortolkning af resultaterne

På grund af denne tests stramme forsøgsbetingelser betyder et lavt resultat ikke nødvendigvis, at teststoffet ikke er bionedbrydeligt under miljøbetingelser, men indicerer, at mere arbejde vil være påkrævet for at afgøre dette.

Testkemikalier, der giver et stort DOC tab i denne test, anses for let bionedbrydelige, forudsat at dette niveau er nået inden for ti dage, regnet fra den dag, hvor det observerede niveau af bionedbrydning først overskrider 10 %.

4. REFERENCER

(1) OECD, Paris, 1981, Test guideline 301A. Decision of the Council C(81) 30. Final.

(2) Gerike, P., Fischer. W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159 to 173.

(3) Gerike, P., Fischer W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45 to 55.

(4) AFNOR: Method for the evaluation in aqueous medium of the biodegradability of so called »total« of organic products. T 90 to 302.

Tillæg 1

Skema

Eksp. nr.: .....

Dato for start: .....

Test/kontrolstof: .....

Teoretisk test konc: .....

Kulstofanalyse: .....

Kulstofbestemmelser

Kulturmedium	Kolbe nr.	DOC Koncentrationer efter × dage (mg/l)				
		0	3	7	14	28 (dage)
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 mean	1-3	$\bar{C}_0$	$\bar{C}_3$	$\bar{C}_7$	$\bar{C}_{14}$	$\bar{C}_{28}$
Steril kontrol	4	4_{C_0}				$4_{C_{28}}$
Glucose kontrol	5	5_{C_0}	5_{C_3}	5_{C_7}	$5_{C_{14}}$	$5_{C_{28}}$
Hæmningskontrol	6	6_{C_0}	6_{C_3}	6_{C_7}	$6_{C_{14}}$	$6_{C_{28}}$
Inokulumkontrol	7	$C_{bl(0)}$	$C_{bl(3)}$	$C_{bl(7)}$	$C_{bl(14)}$	$C_{bl(28)}$

Bedømmelse af resultater:

	t = 0	3	7	14	28 (dage)
Test $\left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Glucose $\left[1 - \frac{{}^5C_t - C_{bl(t)}}{{}^5C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Hæmningskontrol $\left[1 - \frac{{}^6C_t - C_{bl(t)}}{{}^6C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				

Gyldighed:

Opløst oxygen, kolbe nr. 5, dag 3: ..... mg/l

% bionedbrydning, kolbe nr. 5, dag 7: ..... %

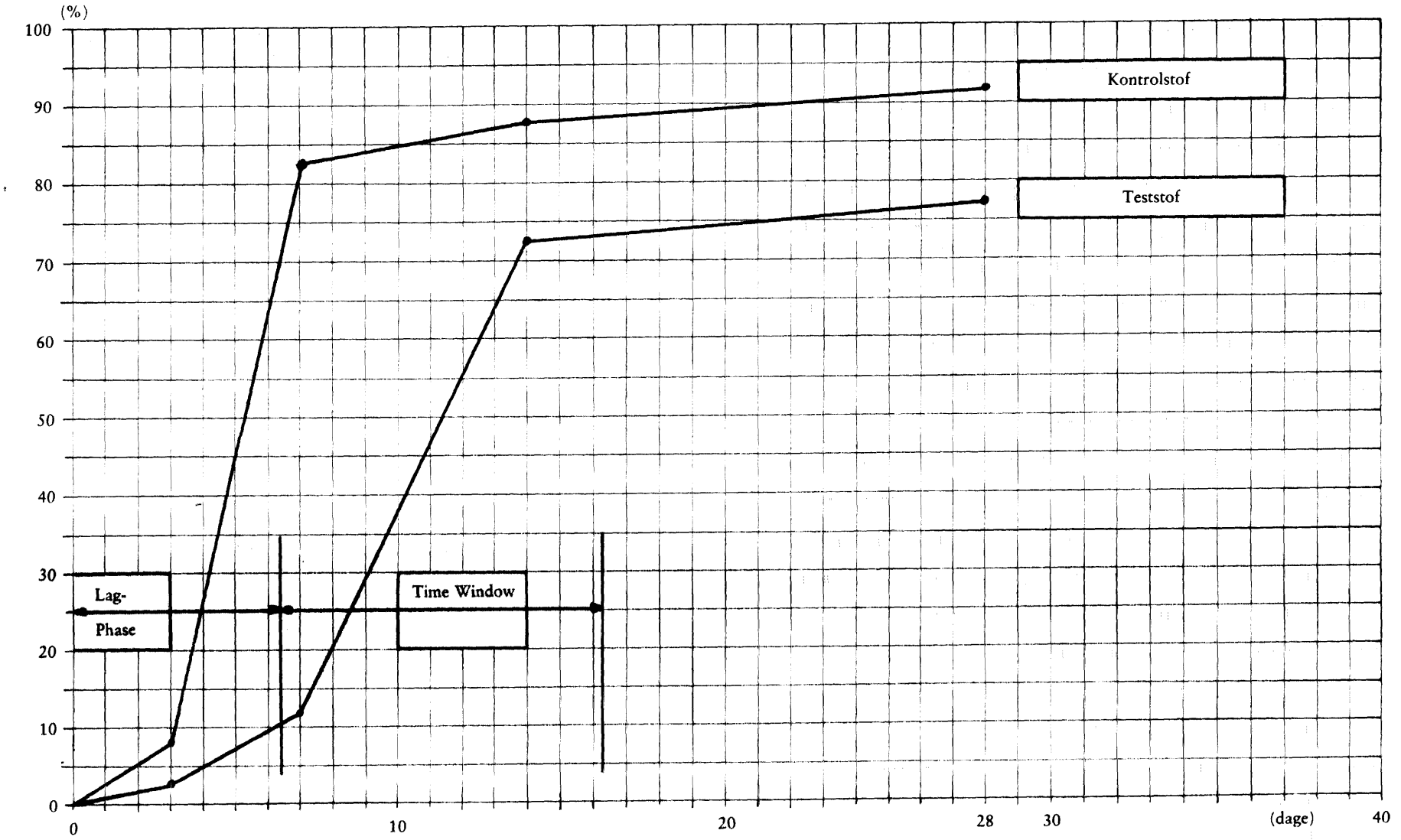
% bionedbrydning, kolbe nr. 6, dag 7: ..... %

Sterilitet, kolbe nr. 4: .....

Tillæg 2

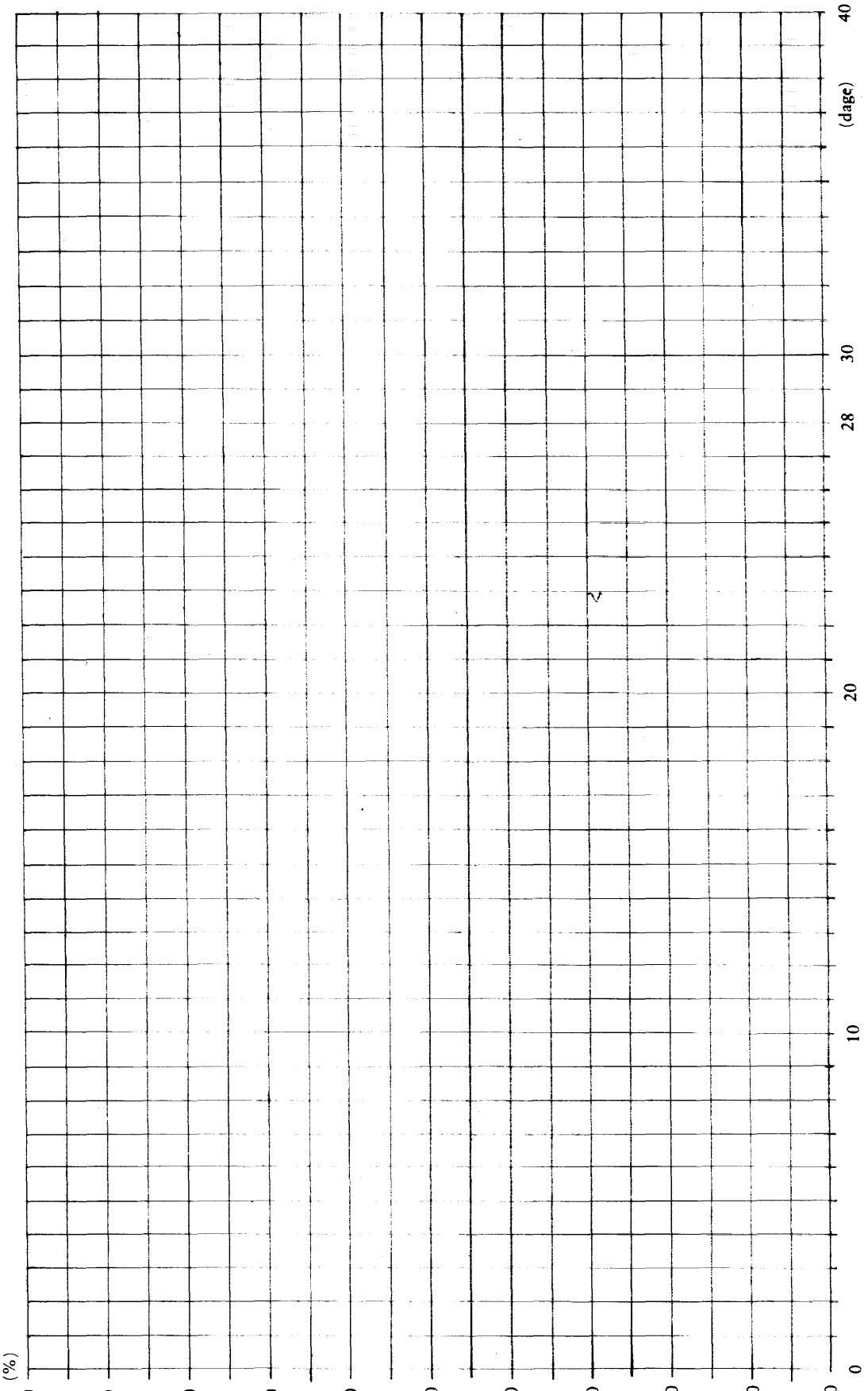
Modificeret Afnor Test NF T 90/302

Prøvningslaboratorium: ..... Teststof: ..... Exsp. nr.: .....



Modificeret Afnor Test NF T 90/302

Prøvningslaboratorium: ..... Teststof: ..... Exsp. nr.: .....



C. 5. NEDBRYDNING

BIOLOGISK NEDBRYDNING: MODIFICERET STURM-TEST

1. METODE

1.1. Indledning

Formålet med denne metode er at måle bionedbrydeligheden af ikke-flygtige organiske stoffer i et aerobt, vandigt miljø ved to startkoncentrationer, 10 og 20 mg/l (standardkoncentrationer).

Indholdet af organisk kulstof i teststoffet skal være kendt (fra TOC analyse eller skønnet ud fra den empiriske formel, således at det teoretiske kuldioxyd-udbytte kan beregnes).

Metoden er kun anvendelig for de teststoffer, der ved den anvendte testkoncentration

— har et forsvindende damptryk, og

— ikke er hæmmende over for bakterier.

Denne metode kan, i det mindste principielt, anvendes for stoffer, der er tungtopløselige ved testkoncentrationerne.

Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedkomponenter vil være nyttige for fortolkningen af de opnåede resultater, specielt i de tilfælde, hvor resultaterne er lave.

Oplysninger om stoffets toksicitet over for mikroorganismer kan være nyttig for fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer.

1.2. Definitioner og enheder

Nedbrydningen defineres som den mængde CO_2, der produceres af stoffet, udtrykt i procent af den teoretiske CO_2-mængde, det efter beregning ud fra stoffets indhold af organisk stof skulle have produceret (»$ThCO_2$«).

1.3. Referencestoffer

Det er ønskeligt at bruge et passende kontrolkemikalium til at kontrollere aktiviteten af inoculum. F. eks., kan anilin, natriumacetat eller natriumbenzoat, bruges hertil og de skal udvise en CO_2-produktion, der er større end eller lig 60 % inden for 28 dage. Hvis dette ikke er tilfældet, anses testen for ugyldig og skal gentages med et inoculum fra en anden kilde.

1.4. Metodens princip

Teststoffet sættes til et kemisk defineret flydende medium inokuleret med kloak-mikroorganismer og udluftet ved 20 til 25° C. Temperaturen registreres under testforløbet.

Det frigjorte CO_2 fanges som $BaCO_3$, og nedbrydningen følges med CO_2-analyser gennem en 28 dages periode. Efter sammenligning med passende blindprøve(r) bestemmes den totale CO_2-mængde, som

teststoffet har produceret gennem testen, og beregnes som en procentdel af den totale CO_2-mængde, som teststoffet på basis af sit kulstofindhold teoretisk kunne have produceret.

Proceduren kontrolleres ved hjælp af et kontrolstof (se 1.6.1.3).

1.5. **Kvalitetskriterier**

Metodens reproducerbarhed er efterprøvet i OECD- og EØF-ring tests og fundet passende for en screening-test.

Den endogene CO_2-produktion i inoculum, som måles i blindprøven, er hovedårsagen til, at der i testen ikke kan anvendes koncentrationer lavere end 5 mg/l teststof. Såfremt testen tilpasses til anvendelse af ^{14}C-mærkede teststoffer, kan teststofkoncentrationen være meget lavere.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Vand af høj kvalitet.

Dobbeltdestilleret vand, frit for toksiske stoffer (specielt kobber), med et lavt kulstofindhold (< 2,0 mg/l TOC) og med en modstand på ⩾ 18 megohm · cm. Destilleret vand må ikke indeholde mere end 10 % af det organiske kulstof, som tilføres med teststoffet.

1.6.1.2. Næringsopløsning

a) Stamopløsning

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ jern(III)chlorid hexahydrat opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml;	0,25 g,
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ magnesiumsulfat heptahydrat opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml;	22,50 g,
$CaCl_2$ calciumchlorid opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml;	27,50 g,
KH_2PO_4 kaliumdihydrogenphosphat	8,50 g,
K_2HPO_4 kaliumhydrogenphosphat	21,75 g,
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ natriumhydrogenphosphat dihydrat	33,40 g,
NH_4Cl ammoniumchlorid opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml;	1,70 g,
$(NH_4)_2SO_4$ ammoniumsulfat opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml.	40,00 g.

(b) Testmedium

Testmediet indeholder følgende reagenser pr. liter vand (1.6.1.1):

— 4 ml af ovennævnte jern(III)chloridopløsning,

— 1 ml af ovennævnte magnesiumsulfatopløsning,

— 1 ml af ovennævnte calciumchloridopløsning,

— 2 ml af ovennævnte phosphatopløsning,

— 1 ml af ovennævnte ammoniumsulfatopløsning;

pH skal være 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Kontrolstoffer

Anilin (frisk destilleret), natriumacetat, natriumbenzoat.

1.6.1.4. Bariumhydroxid, 0,025 N (0,0125 M)

Opløs 4,0 g $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ pr. liter vand af høj kvalitet. Filtrer gennem filtrerpapir og opbevar den klare opløsning tæt tillukket for at undgå adsorption af CO_2 fra luften. Det anbefales at fremstille mere end fem liter samtidig, når der laves en forsøgsserie.

1.6.2. *Apparatur*

1.6.2.1. Gasvaskeapparat for CO_2.

Til en serie på 12 testflasker (svarende til tre teststoffer) anvendes (flaske betyder her en fire- til fem-liter brun glasflaske. Hvis klare glasflasker bruges, skal testen udføres i mørke):

— fire en-liter plastflasker indeholdende 700 ml 10N (10M) NaOH,

— en en-liter Erlenmeyerkolbe indeholdende 700 ml 0,025 N (0,0125 M) $Ba(OH)_2$-opløsning,

— en tom en-liter Erlenmeyerkolbe til hindring af væskemedrivning.

Disse flasker forbindes i serie med inert slange til en trykluftkilde og luft bobles gennem vaskeopløsningerne med konstant hastighed.

For hvert yderligere sæt på fire testflasker vedføjes yderligere en en-liter plastflaske påfyldt 700 ml 10 N (10 M) NaOH.

1.6.2.2. CO_2-produktionsapparat

Fire fire- til fem-liters brune engangsflasker til hvert testmateriale.

Propper, bøjelig slange, plastslange.

1.6.2.3. CO_2-absorptionsflasker

100 ml bariumhydroxydabsorptionsflasker.

1.6.3. *Forberedelse af inoculum*

Kilden for testorganismer er aktiveret slam, der nylig er indsamlet fra et godt fungerende kommunalt rensningsanlæg. Dette anlæg må kun modtage lidt eller intet industrispildevand.

Ved ankomsten til laboratoriet udluftes det aktiverede slam i fire timer. 500 ml af den blandede væske udtages og homogeniseres i to minutter med en blender. Der bundfældes i en halv time. Hvis supernatanten stadig indeholder en stor mængde slamartikler efter 30 minutter, skal der bundfældes i yderligere 30 til 60 minutter, eller adapteres til laboratoriebetingelser for at opnå bedre bundfældning.

Supernatanten dekanteres for at give tilstrækkeligt volumen til et 1 % inoculum for hver CO_2 testflaske. Undgå at overføre slamartikler, der vil forstyrre målingen af det dannede CO_2.

Skønt det ikke kræves, er det nyttigt at tælle kolonidannende enheder pr. ml. supernatant. Dette inoculum bør normalt indeholde 10^6 til 20×10^6 kolonidannende enheder pr. ml.

Det skal bruges samme dag, det er forberedt.

1.6.4. *Testprocedure*

1.6.4.1. Stamopløsning

En startstamopløsning forberedes af teststoffet ved opløsning i vand af høj kvalitet i en koncentration på 1 000 mg/l.

Stamopløsninger laves på grundlag af indholdet af organisk **bundet kulstof** i teststoffet. Hvis dette ikke er kendt, laves stamopløsningerne på vægtbasis til en koncentration af 1 000 mg/l. For at få en homogen prøve er det nødvendigt at blande godt, idet man samtidig bør undgå skumdannelse, som kan medføre koncentrering af teststoffet. For faste stoffer kan det være nødvendigt at smelte og blande hele indholdet af prøven, før der udtages delprøve af den. Dette er yderst vigtigt, da beregningerne af % bionedbrydning afhænger af, om den korrekte mængde kulstof er tilsat testsystemet.

pH af stamopløsningen behøver ikke at justeres, medmindre det falder uden for intervallet 3 til 10, da phosphatpufferen i testmediet vil regulere det. Hvis pH ligger uden for dette interval, justeres en prøve af stamopløsningen til pH 7,0 ± 1,0 med 1 N (1 M) HCl eller NaOH, idet man påser, at opløsningen blandes kraftigt under tilsætningen af syre eller base.

Som kontrol af den indstillede koncentration af organisk kulstof i teststoffet kan stamopløsningen (eller den neutraliserede prøve) analyseres for totalt organisk kulstof. En TOC analyse er også påkrævet for stamopløsningen af kontrolstoffet.

Hvis et teststof er uopløseligt i vand tilsættes den passende mængde teststof direkte til testflasken på basis af vægt eller volumen.

Hvis teststoffet ikke er opløseligt ved testkoncentrationen, kan der anvendes specielle teknikker, såsom dispersion ved hjælp af ultralyd, for at opnå en god dispersion af teststoffet.

1.6.4.2. Betingelser

Da et 1 % inoculum bruges i CO_2-testen, er det nødvendigt at foretage fortyndinger i CO_2-testmediet.

Dette foregår lettest på følgende måde:

a) Til hver af de fire til fem liters testflasker sættes 2 470 ml vand af høj kvalitet. (1.6.1.1).

b) Til hver af de fire til fem liters testflasker sættes tre ml **af hver af ammoniumsulfat-**, magnesiumsulfat- og calcium-chlorid-stamopløsningerne, seks ml af **phosphatbufferstamopløsningen** og 12 ml af ferrichloridopløsningen.

c) Til hver af de fire til fem liters testflasker sættes 30 ml inoculum af aktiveret slam.

Denne blanding udluftes med CO_2-fri luft i 24 timer for at **rense** systemet for kuldioxyd.

Efter udluftningen påfyldes tre CO_2-absorptionsflasker hver **100 ml** 0,025 N (0,0125 M) Ba $(OH)_2$ og forbindes i serie til luftafledningen fra hver sin testflaske.

1.6.4.3. Udførelse af testen

Teststof tilsættes to af de fire testflasker ved start af testningen. Hvert stof testes ved to koncentrationer: 10 og 20 mg/l.

Mængden af teststofstamopløsning, der kræves i flasken, udregnes på følgende måde:

$$\text{ml stamopløsning pr. flaske} = \frac{B \times C}{A}$$

hvor:

B er teststof-koncentrationen i testflasken (mg/l),

A er teststof-koncentrationen i stamopløsningen (mg/l), og

C er det endelige volumen af testmediet i testflasken (ml).

Tilstrækkelig stamopløsning til at opnå den ønskede testkoncentration, som beregnet ovenfor, plus tilstrækkeligt destilleret vand til at give 473 ml (stamopløsning plus vand af høj kvalitet) tilsættes de givne flasker. Til den tredje flaske, der bruges som blindforsøg, og som ikke indeholder noget teststof, sættes 473 ml vand af høj kvalitet. Det endelige volumen af hver flaske er nu 3 000 ml.

Et kontrolstof sættes til den sidste af de fire flasker, til en koncentration på 20 mg/l.

Testen startes ved at boble CO_2-fri luft gennem opløsningen med en hastighed på 50 til 100 ml/min. pr. flaske (ca. 1 til 2 bobler/sek.).

For vandopløselige teststoffer, der tilsættes som tørt stof til CO_2-testflasken, kan omrøring ske med en magnetomrører. For skummende kemikalier kan CO_2-fri luftgennembobling erstattes med indblæsning over overfladen og magnetisk omrøring.

Det kuldioxid, der produceres i hver flaske, reagerer med bariumhydroxidet og udfældes som bariumcarbonat, mængden af produceret CO_2 bestemmes ved titrering af det resterende $Ba(OH)_2$ med 0,05 N (0,05 M) standard HCl. Regelmæssigt (hver anden eller hver tredie dag) fjernes CO_2-absorptionsflasken nærmest testflasken og titreres. De resterende to absorptionsflasker rykkes en plads nærmere testflasken, og en ny absorptionsflaske fyldt med 100 ml frisk 0,025 N (0,0125 M) Ba $(OH)_2$ placeres bagest i serien.

Titreringer udføres efter behov (før bundfald af bariumcarbonat er synligt i den anden flaske) omtrent hver anden dag de første ti dage, derefter hver femte dag indtil den 28. dag.

På den 27. dag skal pH af testflaskens indhold måles igen, hvorefter en ml koncentreret HCl sættes til hver flaske for at udrive uorganisk carbonat. Flaskerne udluftes natten over, og der udtages prøver fra hver flaske til DOC analyse. Den sidste titrering foretages på dag 28.

Titreringer af de 100 ml $Ba(OH)_2$-opløsning foretages efter, at flasken nærmest testflasken er fjernet. Bariumhydroxidet titreres med 0,05 N (0,05 M) HCl med phenolphthalein som indikator.

Testen udføres ved stuetemperatur (20 til 25° C) og temperaturen registreres under testperioden.

Hvis et plateau observeres før den 28. dag, kan testen sluttes.

Hvis nedbrydningen tydeligt er startet, men ikke har nået et plateau ved den 28. dag, anses det for fornuftigt at forlænge testperioden en til to uger.

1.6.5. *CO_2-bestemmelse*

Andre måder til måling af CO_2-udviklingen end tilbagetitrering af bariumhydroxidfælder kan komme i betragtning. Dette ændrer ikke testens princip, og kan muligvis føre til kontinuerlig måling af bionedbrydningen.

Det første trin i beregningen af den producerede CO_2-mængde er at korrigere flaskerne med teststof for endogen CO_2-produktion. Kontrolflasken tjener som blindværdi for korrektion for den mængde CO_2, som kan produceres ved bakteriers endogene respiration. Mængden af CO_2, som et teststof har produceret, bestemmes ved forskellen (i ml af titrant) mellem den eksperimentelle og den blinde bariumhydroxidfælde.

Når man anvender 0,05 N (0,05 M) HCl ved titreringen, svarer hver ml HCl til 1,1 mg CO_2.

2. DATA OG BEDØMMELSE

De analytiske resultater angives i det vedlagte skema (tillæg I), og værdien for den biologiske nedbrydning beregnes, som angivet i 1.2.

Kuldioxidkoncentrationerne beregnes til nærmest 0,1 mg/l. Værdien for den biologiske nedbrydning rundes op til nærmeste hele procent. Forløbet af nedbrydningstesten følges grafisk i et diagram som vist på vedføjede eksempel (tillæg 2).

Resultaterne af nedbrydningstesten er gyldige, hvis følgende betingelser er opfyldt:

— I den samme testserie skal kontrolstoffet inden for 28 dage give en bionedbrydning, der er større end eller lig 60 %. (Hvis dette ikke er tilfældet, skal hele serien forkastes og gentages med et inoculum fra en anden kilde).

— Der må ikke ske en signifikant CO_2-udvikling fra blindflasken gennem testen (forurening af mediet, glasapparaturet og luftforsyningen). Total kuldioxidudvikling ved afslutningen af testen må ikke overstige 50 mg CO_2/3 l medium.

3. RAPPORT

3.1. Testrapport

Testrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende:

— Data skal rapporteres på skema (tillæg 1).

— Forløbet af nedbrydningen afbildes grafisk i et diagram, der viser lag-fase, nedbrydningsfase, hældning og »tidsvindue«, — dvs. en ti-dages periode begyndende fra den dag bionedbrydningen først overskrider 10 %.

— Dispersionsmetode, der er anvendt for stoffer, som ikke er opløselige ved testbetingelserne.

— Angiv dato og lokalitet for indsamling af testorganismerne, samt hvordan de blev håndteret før inokulation.

— Temperaturintervallet gennem forsøgsperioden skal angives.

— Hvis målt, som foreslået under punkt 1.6.3 (inoculum), angives antallet af mikroorganismer pr. ml (kolonidannende enheder (colony forming units) — CFU/ml).

— Bevis for testens gyldighed ($\geqslant$ 60 % nedbrydning af kontrolstoffet på 28 dage).

3.2. Fortolkning af resultater

På grund af denne tests stramme forsøgsbetingelser betyder et lavt resultat ikke nødvendigvis, at teststoffet ikke er bionedbrydeligt under miljøbetingelser, men indicerer, at mere arbejde vil være påkrævet for at afgøre dette.

Testkemikalier, der giver et højt resultat af bionedbrydning i denne test, anses for let bionedbrydelige, forudsat at dette niveau er nået inden for ti dage, regnet fra den dag, hvor det observerede niveau af bionedbrydning først overskrider 10 %.

4. REFERENCER

(1) OECD, Paris, 1981, Test guideline 301B. Decision of the Council C(81)30 Final.

(2) Gerike, P., Fisher, W. K., A correlation study of Biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159 to 173.

(3) Gerike, P., Fisher, W. K., A correlation study of Biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45 to 55.

(4) Larson, R. J., Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 38, 1979, p. 1153 to 1161.

Tillæg 1

Modificeret STURM Test

Skema

Eksp. nr.: .....

Dato for testbegyndelse: .....

Test-/kontrolstof: .....

Teoretisk testkoncentration: .....

Kulstofanalyse: .....

Teoretisk $ThCO_2$: .....

Temperaturinterval under testen: .....

CO_2-produktion:

Dage	CO_2 fundet mg	CO_2 kumuleret mg	% af $ThCO_2$
28			

Gyldighed: .....

— % bionedbrydning kontrolstof: .....

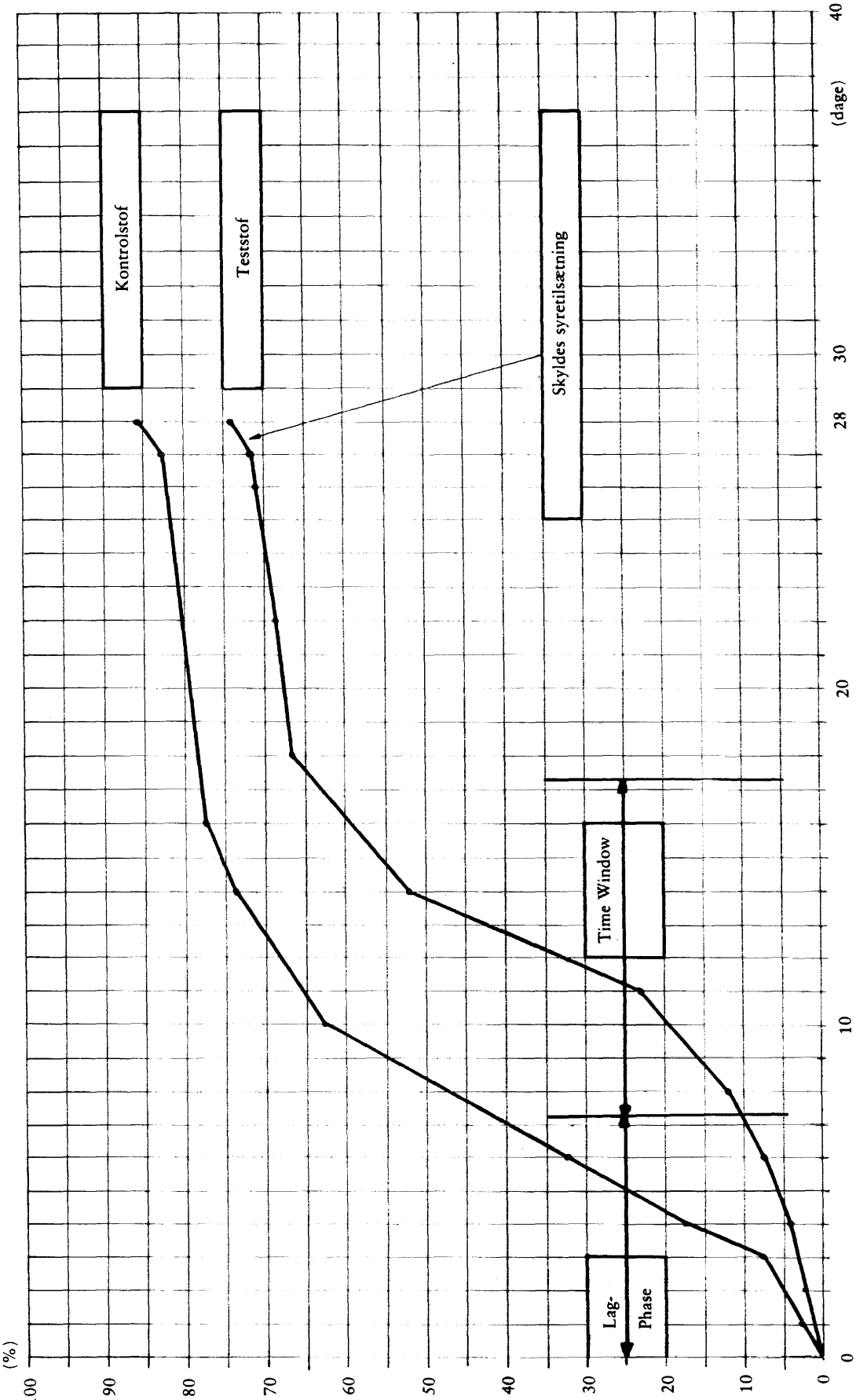
— CO_2, total udvikling i blindprøven: .....

Tillæg 2

Modificeret Sturm Test

Prøvningslaboratorium: ..... Teststof: ..... Exsp. nr.: .....

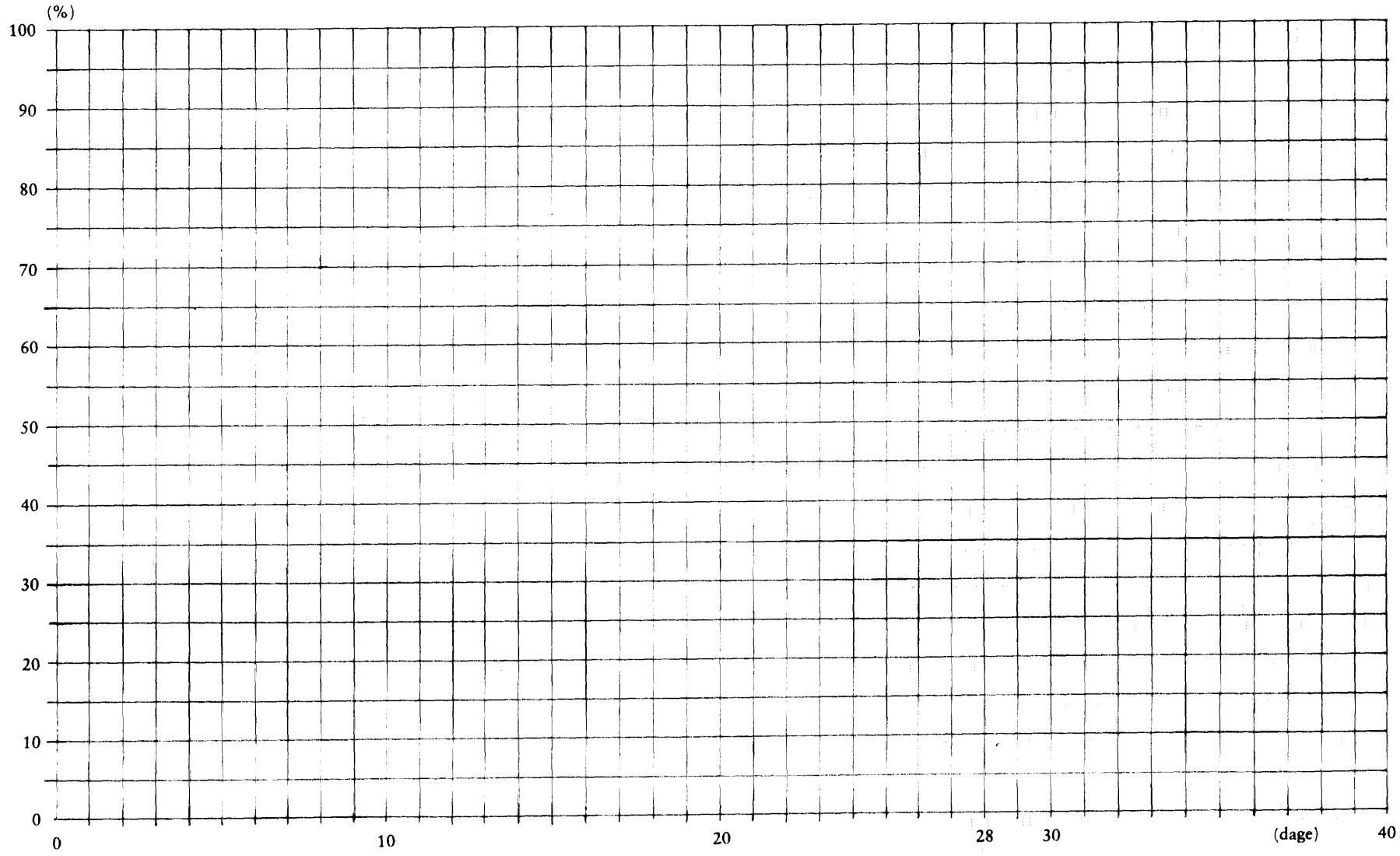
Bionedbrydning



Modificeret Sturm Test

Prøvningslaboratorium: ..... Teststof: ..... Exsp. nr.: .....

Bionedbrydning



C. 6. NEDBRYDNING

BIOLOGISK NEDBRYDNING: CLOSED BOTTLE TEST

1. METODE

1.1. Indledning

Formålet med metoden er at måle bionedbrydeligheden af organiske stoffer i et aerobt vandigt miljø ved en testkoncentration fra to (standardkoncentrationen) til 10 mg af stof pr. liter.

På sit nuværende udviklingstrin er testen specielt egnet til bedømmelse af bionedbrydeligheden af vandopløselige stoffer. Dog kan, i det mindste i princippet, også flygtige såvel som tungtopløselige stoffer testes.

Den empiriske formel for teststoffet er nødvendig for at kunne beregne det teoretiske oxygenforbrug (ThOD, theoretical oxygen demand); hvis den ikke kendes, kan det kemiske oxygenforbrug (COD, chemical oxygen demand) tjene som referenceværdi (tillæg 1).

Metoden er kun anvendelig for organiske teststoffer, som ikke er hæmmende for bakterier ved den anvendte testkoncentration. Hvis teststoffet ikke er opløseligt ved de angivne koncentrationer, kan der anvendes specielle teknikker, såsom dispersion ved hjælp af ultralyd, for at opnå en god dispersion af teststoffet.

Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedkomponenter vil være nyttig for fortolkningen af de opnåede resultater, specielt i de tilfælde, hvor resultaterne er lave.

Oplysninger om stoffets toksicitet over for mikroorganismer kan være nyttig for fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer.

Denne metode kan benyttes til bestemmelse af BOD-værdien.

1.2. Definitioner og enheder

Det biokemiske oxygenforbrug (BOD, biochemical oxygen demand) beregnes som forskellen mellem oxygenforbruget for en blindprøve og for en opløsning af teststoffet ved prøvningsbetingelserne. Efter division med koncentrationen (vægt/volumen) af stoffet fås oxygenforbruget i mg BOD pr. mg stof.

Nedbrydningen er defineret som forholdet mellem det biokemiske oxygenforbrug og enten det teoretiske oxygenforbrug (ThOD) eller det kemiske oxygenforbrug (COD), og den udtrykkes i procent.

Bemærk:

Undertiden vil de to beregningsmåder (% af ThOD og % af COD) ikke give det samme resultat.

$$\% \text{ bionedbrydning (af ThOD)} = \frac{\text{mg } O_2/\text{mg teststof}}{\text{ThOD}} \times 100$$

eller

$$\% \text{ bionedbrydning (af COD)} = \frac{\text{mg } O_2/\text{mg teststof}}{\text{mg COD/mg teststof}} \times 100,$$

hvor

ThOD = teoretisk oxygenforbrug (beregning se tillæg 1),

COD = kemisk oxygenforbrug bestemt eksperimentelt.

1.3. **Referencestoffer**

Det er ønskeligt at bruge passende kontrolkemikalier til at kontrollere aktiviteten af inoculum. Anilin, natriumacetat eller natriumbenzoat (f.eks.) kan bruges hertil og de **skal udvise en nedbrydning på** ≥ 60 % inden for 28 dage. Hvis dette ikke er tilfældet, anses testen for ugyldig og gentages med et inoculum fra en anden kilde.

1.4. **Metodens princip**

En forud bestemt mængde af stoffet opløses i et uorganisk medium (**mineralsk næringsopløsning**) til en koncentration, der normalt er 2 mg teststof/l. Opløsningen inokuleres med et lille antal mikroorganismer fra en blandingspopulation og holdes i lukkede flasker i mørke i et bad eller et rum ved konstant temperatur (20 til 21° C).

Nedbrydningen følges med oxygenanalyser over en 28 dages periode. **Proceduren kontrolleres ved** hjælp af parallel inokulation af kontrolstof.

En oxygen-blindværdi bestemmes i en parallel test, der hverken indeholder teststof eller kontrolstof.

Samtidig kontrolleres teststoffet for mulig hæmmende effekt på inoculum.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Metodens reproducerbarhed er efterprøvet i OECD- og EØF-ring-tests.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Destilleret eller ionbyttet vand

Destilleret eller ionbyttet vand der ikke indeholder mere ende 0,01 mg Cu/l, luftmættet. En mængde svarende til det daglige behov (f.eks. 50 liter) holdes ved stuetemperatur, så nær ved 20° C som mulig, og udluftes kraftigt i 20 minutter med ren trykluft. Normalt er vandet klar til brug efter at have stået i 20 timer ved 20° C. Oxygen bestemmes som kontrol. Koncentrationen ved 20° C skal være 9,09 mg O_2/l. Al væskeoverførsel og påfyldning med det luftmættede vand må foregå uden bobler med en hævert.

1.6.1.2. Næringsopløsning

a) Stamopløsninger:

KH_2PO_4 Kaliumdihydrogenphosphat	8,50 g,
K_2HPO_4 Kaliumhydrogenphosphat	21,75 g,
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ Natriumhydrogenphosphat dihydrat	33,30 g,
NH_4Cl Ammoniumchlorid	1,70 g,
opløses i destilleret vand til 1 000 ml.	
pH skal værre 7,2.	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Magnesiumsulfat heptahydrat	22,50 g,
opløses i destilleret vand til 1 000 ml.	
$CaCl_2$ Calciumchlorid	27,50 g,
opløses i destilleret vand til 1 000 ml.	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ jern(III)chlorid hexahydrat	0,25 g,
opløses i destilleret vand til 1 000 ml.	

b) Testmedium

Testmediet indeholder en ml af hver af de ovennævnte stamopløsninger pr. liter vand (1.6.1.1).

pH skal være 7.2 ± 0,2.

1.6.1.3. Kontrolstoffer

Anilin (frisk destilleret), natriumacetat, natriumbenzoat.

1.6.2. *Apparatur*

1.6.2.1. Der kan bruges kalibrerede 250 til 300 ml BOD kolber med glasslib eller ikke-kalibrerede tyndhalsede 250 ml kolber med glasslib, hvis volumen skal bestemmes.

1.6.2.2. Adskillige to, tre og fem liters kolber med afmærkede literstreger til forberedelse af prøvningen og for påfyldning af BOD kolberne.

1.6.2.3. Pipetter fra en til ti ml. Tragte og groft filtrerpapir. Flasker til forberedelse af inoculum.

1.6.2.4. Vandbad til at holde kolberne ved konstant temperatur under udelukkelse af lys.

1.6.3. *Forberedelse af inoculum*

Inoculum kan fås fra en af følgende fire kilder, idet dets aktivitet kontrolleres ved hjælp af et kontrolstof (1.6.1.3).

1.6.3.1. Inoculum fra jord

En vandig opslemning af ugødet havejord. 100 g havejord, **der ikke nyligt er gødet**, (jord fra et drivhus, som er under konstant temperatur året rundt er navnlig at foretrække) opslemmes i en liter chlor-frit ledningsvand. Efter 30 minutter filtreres opslemningen gennem groft filtrerpapir, og de første 200 ml af filtratet bortkastes. Den følgende del af filtratet tjener til inokulation med en dråbe fra spids pipette for hver liter slutrumfang. Inoculum forberedes umiddelbart før forsøget. Såfremt det står i flere timer før brug, skal det udluftes. Antallet af kim kan bestemmes ved **udsåningsplader eller på** næringsplader. Der bør ikke være mere end 10^3 til 10^5 kim pr. milliliter slutrumfang.

1.6.3.2. Inoculum fra sekundært afløb

Inoculum bør fortrinsvis forberedes ved prøvetagning fra et sekundært afløb fra et aktiveret rensningsanlæg eller et sivefilter, der hovedsagelig behandler husholdningsspildevand. Prøven skal holdes under aerobe betingelser i tiden mellem indsamling og anvendelse. Som forberedelse af inoculum filtreres prøven gennem et groft filter, idet de første 200 ml bortkastes. Resten af filtratet holdes aerobt indtil brugen. Inokulering skal foretages samme dag, som prøven er taget.

1.6.3.3. Inoculum fra aktiveret rensningsanlæg i laboratorieskala

Der bruges et afløb fra et stærkt udluftet aktiveret rensningsanlæg i laboratorieskala. Inoculum forberedes som beskrevet under 1.6.3.2.

1.6.3.4. Blandingsinoculum

Lige dele af de tre inoculumprøver (1.6.3.1 til 1.6.3.3) blandes godt, og det endelige inoculum tages fra denne blanding.

1.6.4. *Testprocedure*

Alle nødvendige manipulationer før inkubationen skal udføres ved ca. 20° C.

Grupper af kolber skal forberedes til bestemmelse af BOD-værdien af test- og kontrolstoffer i parallelle prøvningsserier (tillæg 2). Hvis kemiske analyser udføres samtidigt, skal et tilstrækkeligt stort antal kolber forberedes, inklusive kontrollerne af inoculum og af blindprøve. For eksempel forberedes 7 eller 15 kolber pr. teststof til 0-, 5-, 15- og 28 dages prøver, efter at en tilstrækkelig mængde vand er forberedt i store kolber (1.6.2.2).

Disse store kolber fyldes først til omtrent en trediedel af deres volumen med destilleret vand (1.6.1.1) ved hjælp af en hævert. Derefter afpipetteres de individuelle stamopløsninger af salte (1.6.1.2) i disse kolber alt efter slutrumfang, og henholdsvis teststof og kontrolstof tilsættes i sådanne mængder, at der opnås en endelig koncentration på to eller undertiden fem eller ti mg/l.

Koncentrationen på ca. ni mg opløst oxygen pr. liter vand ved 20° C begrænser den mulige startkoncentration af teststoffet til ca. to mg/l, for at en signifikant residual oxygenkoncentration skal kunne garanteres efter oxidationen af teststoffet. Dårligt nedbrydelige stoffer eller stoffer med lavt ThOD kan med fordel testes parallelt ved højere koncentrationer.

Dernæst inokuleres forsøgskolber såvel som blindprøve med en dråbe fra pipette for hver liter slutrumfang

Slutrumfang opnås ved påfyldning med en hævert, der når bunden af kolben. Dette sikrer tilstrækkelig blanding. Umiddelbart derefter fyldes hver forberedt opløsning over på den tilsvarende gruppe af kolber ved hjælp af en hævert fra den nederste fjerdedel af kolben (ikke fra bunden).

Yderligere analyseres nul-kontrollerne, eller de konserveres til senere analyse (til oxygenbestemmelsen ved fældning med $MnCl_2$ og NaOH).

De øvrige kolber placeres i vandbadet ved 20° C og holdes i mørke. Der udtages kolber til analyse efter henholdsvis 5, 15 og 28 dage.

Hver serie ledsages af en komplet parallel serie til bestemmelse af blindværdien, af oxygenforbruget uden inokulation og af kontrolstof.

Inhiberingstest

Stoffer kan let og simpelt testes for hæmmende virkninger i den lukkede flaske-test.

serie 1: 2 mg/l af et let nedbrydeligt stof, f.eks. fedt alkohol kondenseret med ethylenoxid (i mol-forholdet 1:10) eller et af kontrolstofferne;

serie 2: x mg/l af teststof (x er særdvanligvis 2);

serie 3: 2 mg/l af de let nedbrydelige stoffer samt x mg/l af teststoffet.

Hvis BOD-værdierne i serie tre findes at være mindre end summen af værdierne af serie en og to, anses teststoffet for at have hæmmende virkning over for bakterier ved denne koncentration. Dette kontrolforsøg er altid nødvendigt, hvis et negativt eller et dårligt nedbrydningsresultat synes ulogisk ved vurdering af teststoffets struktur dvs., hvis der er antydninger af, at det kan skyldes inhibering.

1.6.5. *Bestemmelse af opløst oxygen*

Den opløste oxygenmængde bestemmes ved hjælp af en international eller nationalt anerkendt kemisk eller elektrokemisk metode.

2. DATA OG BEDØMMELSE

De analytiske resultater anføres på det vedføjede skema (tillæg 3).

Forløbet af nedbrydningsprøvningen følges grafisk i et diagram som vist i (tillæg 4).

Resultaterne af nedbrydningstesten er gyldige, hvis følgende betingelser er opfyldt:

— I den samme testserie skal kontrolstoffet inden for 28 dage give en bionedbrydning, der er større end eller lig med 60 %. Hvis dette ikke er tilfældet, skal hele serien forkastes.

— Oxygenforbruget i kolben uden inokulation må ikke overstige 0,3 mg O_2/l efter fem dage og 0,4 mg O_2/l efter 28 dage. Blindværdien med inokulation må ikke overstige 0,5 mg O_2/l efter fem dage og 0,6 mg O_2/l efter 15 og 28 dage.

3. RAPPORT

3.1. Testrapporter

Testrapporten skal i videst mulige omfang indeholde følgende:

— data skal rapporteres på skema (tillæg 2),

— forløbet af nedbrydningen afbildes grafisk i et diagram, der viser lag-fase, nedbrydningsfase, hældning og »tidsvindue«, — dvs. en ti-dages periode begyndende fra den dag bionedbrydningen først overskrider 10 %,

— metoden, der er anvendt til COD bestemmelse,

— metoden, der er anvendt til oxygenmålinger,

— dispersionsmetode for stoffer, der er tungtopløselige ved testbetingelserne,

— bevis for testens gyldighed.

3.2. Fortolkning af resultater

Man må tage den mulighed i betragtning, at nitrogenholdige stoffer kan påvirke resultatet.

På grund af denne tests stramme forsøgsbetingelser betyder et lavt resultat ikke nødvendigvis, at teststoffet ikke er bionedbrydeligt under miljøbetingelser, men det indicerer, at mere arbejde vil være påkrævet for at afgøre dette.

Testkemikalier, der udviser et højt oxygenforbrug i denne test, anses for let bionedbrydelige, forudsat at dette niveau er opnået inden for ti dage, regnet fra den dag, hvor det observerede niveau af bionedbrydning først overskrider 10 %.

4. Referencer

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301 D. Decision of the Council C(81) 30. Final.

(2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of Biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 3, No 2, 1979, p. 159 to 1973.

(3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45 to 55.

Tillæg 1

Beregning af det teoretiske biokemiske oxygenforbrug

Det teoretiske biokemiske oxygenforbrug (ThOD) af stoffet $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ med molekylvægten MW beregnes efter følgende formel:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Denne beregning forudsætter, at C oxideres til CO_2, H til H_2O, P til P_2O_5 og Na til Na_2O. Halogen elimineres som hydrogenhalogenid og nitrogen som ammoniak.

Eksempel: Glukose $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucose.}$$

Molekylvægten af salte (bortset fra salte af alkalimetaller) beregnes under den forudsætning, at saltene er hydrolyseret.

Svovl antages at blive oxideret til oxidationstrin + 6.

Eksempel: Natrium-n-alkylbenzolsulfonat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348:

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg stof.}$$

I tilfælde af nitrogenholdige stoffer, kan nitrogen elimineres som ammoniak, nitrit eller nitrat, hvortil svarer forskellige teoretiske biokemiske oxygenforbrug:

$$ThOD_{NO_2^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO_3^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Eksempel:

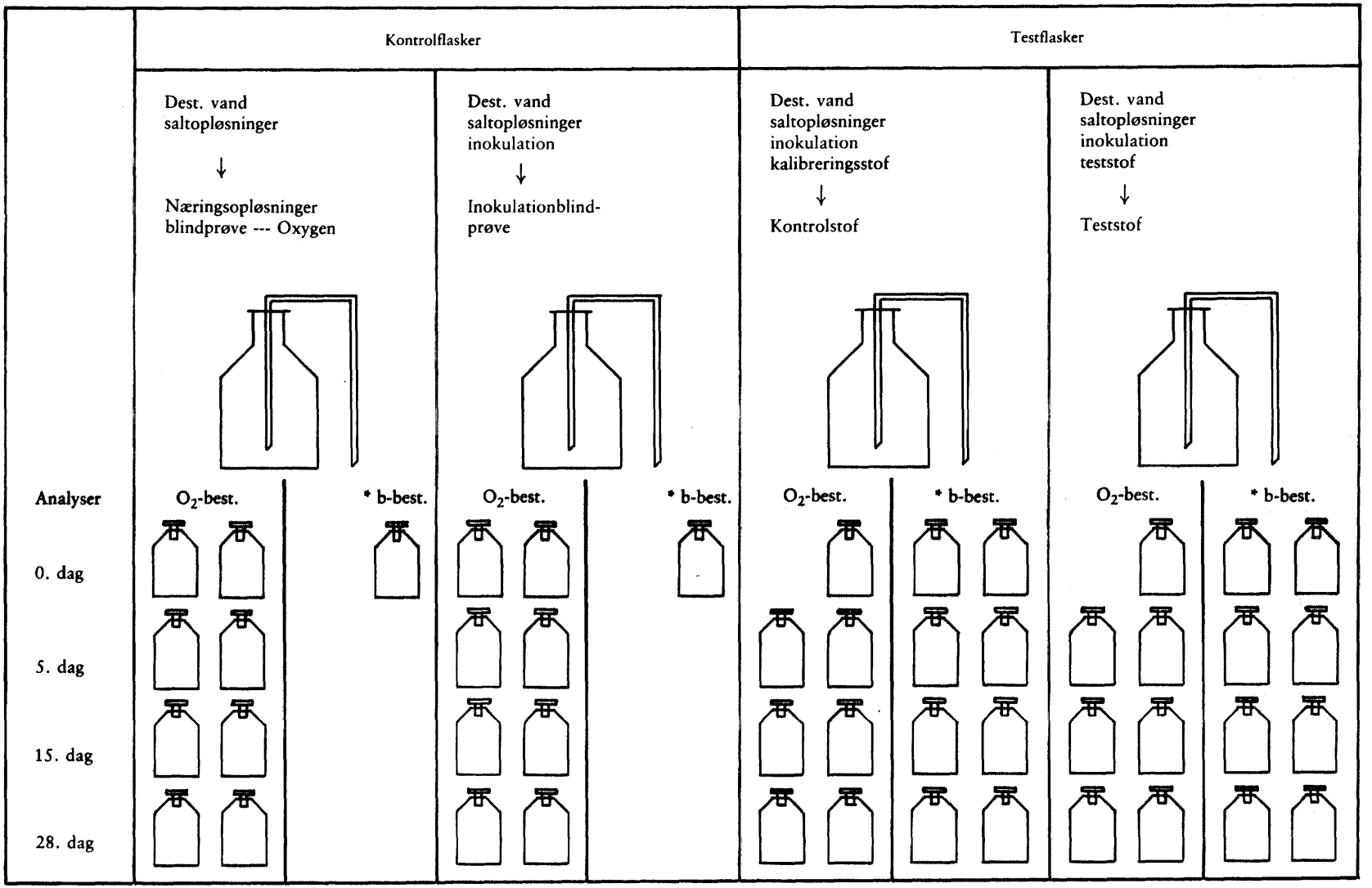
Antag fuld omdannelse til nitrat ved analyse af en sekundær amin: $(C_{12}H_{25})_2NH$, MW: 353

$$ThOD_{NO_3^-} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg stof.}$$

Tillæg 2

Skema over flaskearrangementet i langtids BOD-prøve (Closed bottle-test)

(* = specifik analyse, hvor det er muligt).



Tillæg 3

Bionedbrydning: closed bottle-test (Langtids BOD-bestemmelse)

Prøvningslaboratorium: .....

Undersøgelsesleder: .....

Dato for prøvningens start: ..... Eksp. nr.: .....

Teststof: .....

Kemisk struktur: .....

Analyse (Winklermetoden eller oxygenelektrode): .....

ThOD eller COD af teststoffet: ..... mg O_2/mg

Temperatur af fortyndingsvandet efter udluftning: .....

Oxygenkoncentrationen af vandet efter udluftning og henstand før testens start: ..... mg O_2/l

Inoculum: .....

Testresultat

D_t = ... BOD udtrykt i % ThOD efter 28 dage eller

D_t = ... BOD udtrykt i % COD efter 28 dage

Resultatets gyldighed

Kontrolstof: .....

Resultat: ..... BOD udtrykt i % ThOD efter 28 dage

Reference: ..... Eksp. nr.: .....

Bemærkninger:

Prøvningslaboratorium: .....

Teststof: .....

Exsp. nr.: .....

A: Oxygenbestemmelser:

	Kolbe nr.		mg O_2/l efter × dage			
			0	5	15	28
Mineralsk næringsopløsning uden teststof og uden inoculum	O_2-kontrol	c_1		—	—	—
		c_2		—	—	—
	Gennemsnit	$m_0 = \frac{c_1 + c_2}{2}$				
Mineralsk næringsopløsning uden teststof, men med inoculum	1	c_3				
	2	c_4				
	Gennemsnit blind	$m_b = \frac{c_3 + c_4}{2}$				
Mineralsk næringsopløsning med teststof og med inoculum	1	a_1				
	2	a_2				
	Gennemsnit teststof	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

B: Oxygenforbruget (mg BOD/l) efter × dage

$BOD_x - (m_0 - m_{t_x}) - (m_0 - m_{b_x})$ (1)

mg BSB/l efter × dage		
5	15	28

(1) Denne forskel er vigtig som kontrol af testens gyldighed

C: Bedømmelse:

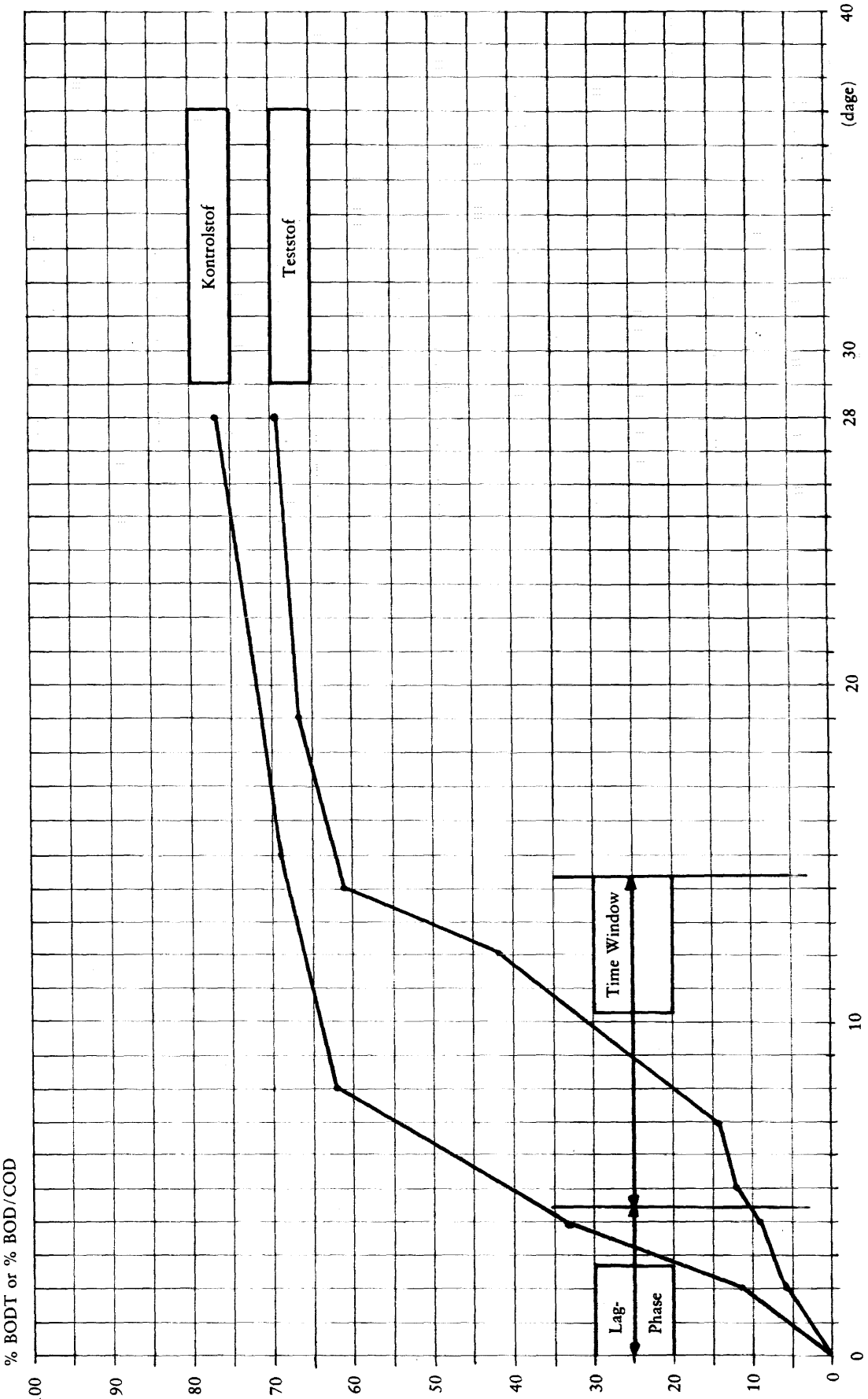
$$D_t = \frac{\text{mg } BOD_x/l}{mg_{teststof}/l \cdot ThOD} \times 100 \quad \text{eller} \quad \%\ BOD_x/COD = \frac{\text{mg } BOD_x/l}{mg_{teststof}/l \cdot COD} \times 100$$

	Efter × dage		
	5	15	28
% BOD/ThOD			
% BOD_x/COD			

Tillæg 4

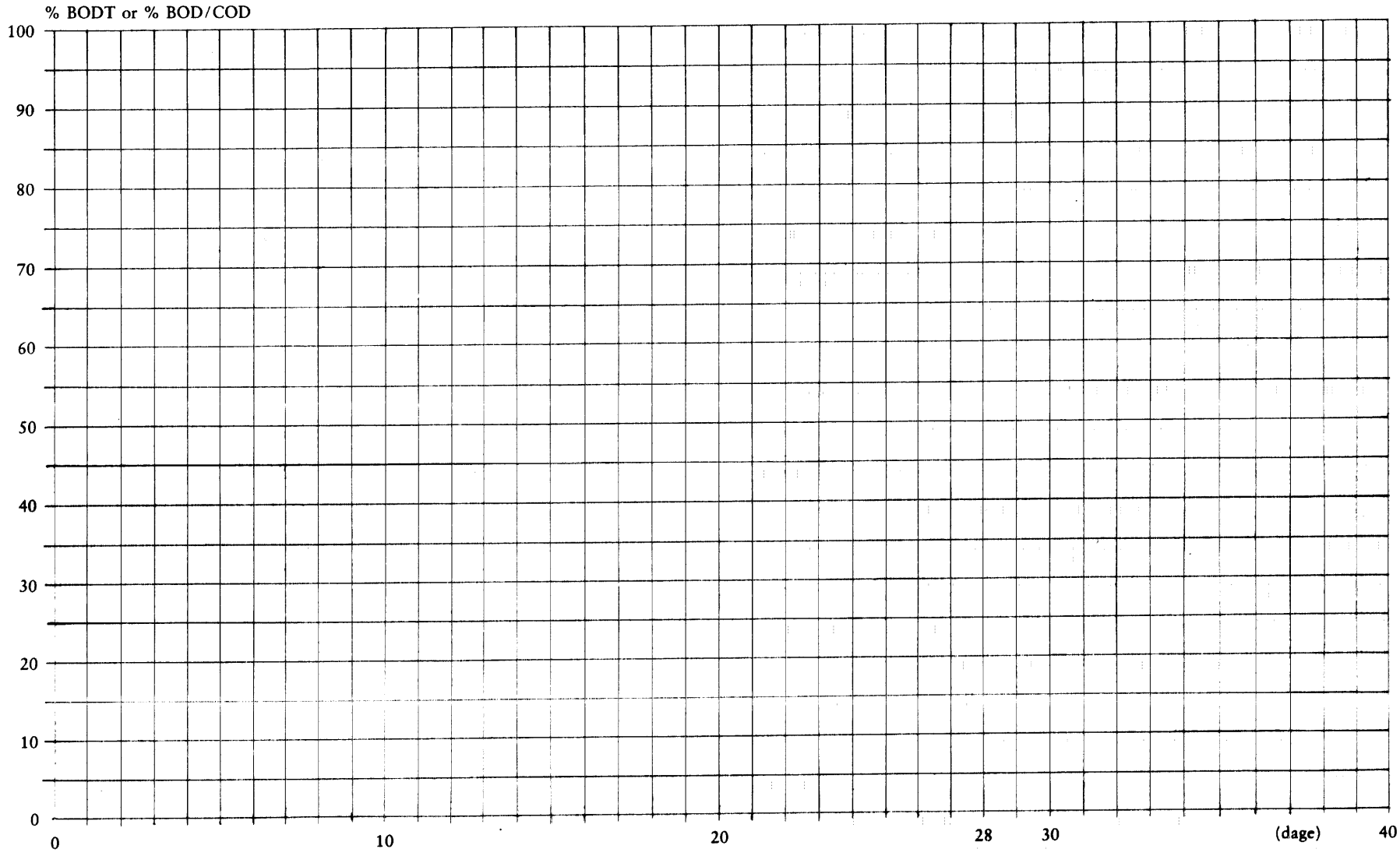
Closed Bottle Test

Prøvningslaboratorium: ..... Teststof: ..... Exsp. nr.: .....



Closed Bottle Test

Prøvningslaboratorium: ..... Teststof: ..... Exsp. nr.: .....



C. 7. NEDBRYDNING

BIOLOGISK NEDBRYDNING: MODIFICEREDE MITI-TEST

1. METODE

1.1. Indledning

Formålet med denne test er at måle bionedbrydeligheden af organiske stoffer i et vandigt miljø med respirometer, der udtrykker det biokemiske oxygenforbrug.

Den empiriske formel for teststoffet er nødvendig for at kunne beregne det teoretiske oxygenforbrug (ThOD, theoretical oxygen demand), idet det kemiske oxygenforbrug (COD, chemical oxygen demand) ellers må benyttes.

Metoden er kun anvendelig for de organiske teststoffer, der ved den anvendte testkoncentration

— har et forsvindende damptryk,

— ikke er hæmmende over for bakterier, og

— ikke kommer i kontakt med eller reagerer med CO_2-absorptionsmidlet.

Hvis teststoffet ikke er opløseligt ved testkoncentrationen, kan der anvendes specielle teknikker, såsom dispersion ved hjælp af ultralyd, for at opnå en god dispersion af teststoffet. Oplysninger om teststoffets toksicitet over for mikroorganismer kan være nyttige for fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer. Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedkomponenter vil være nyttige for fortolkningen af de opnåede resultater.

1.2. Definitioner og enheder

$$\text{Procentvis nedbrydning} = \frac{(\text{BOD} - \text{B})}{\text{ThOD (eller COD)}} \times 100\ \%$$

eller

$$\text{Procentvis nedbrydning} = \frac{(\text{Sb} - \text{Sa})}{\text{Sb}} \times 100\ \%,$$

hvor

BOD = Biokemisk oxygenforbrug (biological oxygen demand) af teststoffet (eksperimentelt) (mg) målt på BOD-kurven.

B = Oxygenforbruget af mineral-næringsopløsning, hvortil der er sat inoculum (eksperimentelt) (mg) målt på BOD-kurven.

ThOD = Teoretisk oxygenforbrug (theoretical oxygen demand) ved fuldstændig oxidation af teststoffet (teoretisk) (mg).

Sa = Resterende mængde af teststoffet efter slutning af bionedbrydningstesten (eksperimentelt) (mg).

Sb = Resterende mængde af teststoffet i blindprøven med vand, hvortil kun teststoffet er tilsat (eksperimentelt) (mg).

1.3. Referencestoffer

Det er ønskeligt at anvende kontrolstoffer for at bedømme aktiviteten af inoculum. Anilin, natriumacetat eller natriumbenzoat kan bruges hertil. Hvis den procentvise nedbrydning af anilin, beregnet ud fra

oxygenforbruget, ikke overstiger 40 % efter syv dage eller 65 % efter 14 dage skal testen betragtes som ugyldig. Hvis der fås en lav genfindelse i blindprøven, Sb, betragtes testen også som ugyldig.

1.4. **Metodens princip**

Testkemikalierne er de eneste kilder til organisk kulstof, og der er ingen forudgående adaptation af microorganismerne til testkemikalierne.

Der anvendes et automatiseret, lukket system til måling af **oxygenforbruget** (BOD-meter). Stofferne, der skal afprøves, inokuleres med mikroorganismer i testkolber. I testperiodens forløb måles det biokemiske oxygenforbrug kontinuerligt med BOD-meteret. Bionedbrydeligheden beregnes på grundlag af BOD, og der foretages supplerende kemiske analyser såsom koncentrationen af opløst organisk kulstof, koncentrationen af restkemikalie, osv.

1.5. **Kvalitetskrav**

1.5.1. *Reproducerbarhed:*

I almindelighed god, især for kemikalier, der er mere opløselige i vand end svarende til 0,1 g/l.

1.5.2. *Sensitivitet:*

(A) Oxygenforbruget: Detektionsgrænse = 1 mg (oxygenforbruget af mikroorganismer) (B) Kemiske analyser: Afhænger af sensitiviteten af de analytiske metoder.

1.5.3. *Specificitet:*

Kan anvendes til alle typer kemikalier, for hvilke det gælder, at forholdet (C_v) i vand til (C_l) i luft er større end eller lig med 1; Ved prøvning af flygtige kemikalier, skal der bruges et »modificeret BOD-meter«, som består af et normalt BOD-meter med kapillarrør. (Se tillæg 1).

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Det destillerede vand må ikke indeholde mere kulstof end svarende til 10 % af det kulstof, som tilføres med teststoffet.

1.6.1.2. Næringsopløsning

Til hver 3 ml af opløsning A, opløsning B, opløsning C og opløsning D tilsættes vand til 1 000 ml. (Deioniseret vand bruges overalt.)

A: K_2HPO_4 kaliumhydrogenphosphat	21,75 g
KH_2PO_4 kaliumdihydrogenphosphat	8,50 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ natriumhydrogenphosphat dodecahydrat	44,60 g

NH_4Cl ammoniumchlorid 1,70 g
opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml.
pH skal være 7,2.

B: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ magnesiumsulfat heptahydrat 22,50 g
opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml.

C: $CaCl_2$ calciumchlorid 27,50 g
opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml.

D: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ jern(III)chlorid hexahydrat 0,25 g
opløses i vand (1.6.1.1) til 1 000 ml.

1.6.2. *Apparatur*

BOD-meter udstyret med 6 flasker (hver på 300 ml)

Flaske 1 og 2:

deioniseret vand, 300 ml + teststof, 30 mg.

Flaske 3 og 4:

næringsopløsning (1.6.1.2), 300 ml + aktiveret slam, 9 mg (tørstof) + teststof, 30 mg.

Flaske 5:

næringsopløsning (1.6.1.2), 300 ml + aktiveret slam, 9 mg (tørstof) + anilin eller et andet referencestof, 30 mg

Flaske 6:

næringsopløsning (1.6.1.2), 300 ml + aktiveret slam, 9 mg (tørstof).

1.6.3. *Forberedelse af inoculum*

1.6.3.1. Aktiveret slam

Indsamlingssteder: Slamindsamling foretages i princippet på mindst ti lokaliteter over hele landet, hovedsagelig i områder, hvor mange kemiske stoffer kan antages at blive brugt og bortkastet.

I Japan er f. eks. Det japanske Biotest-Center's aktiverede standardslam fremstillet ved blanding af slam udtaget på følgende lokaliteter.

— By-rensningsanlæg: tre anlæg beliggende i hhv. den nordlige, den centrale og den sydlige del af Japan.

— Industri-rensningsanlæg: et anlæg, som renser spildevand fra kemisk industri.

— Flod: tre floder i hhv. den nordlige, den centrale og den sydlige del af Japan.

— Sø: en sø i midt-Japan.

— Hav: to japanske indhave.

Hyppighed af prøveindsamling: Slamindsamling skal i princippet foretages fire gange om året, i marts, juni, september og december.

Slamindsamlingsmetoder

— Byspildevand: 1 liter af sekundært slam i et rensningsanlæg.

— Floder, søer, marskområder eller have: 1 liter overfladevand og 1 liter overfladejord på kysten med kontakt til atmosfæren.

Forberedelse: Slamprøverne, der er indsamlet fra prøvestederne, blandes ved omrøring i en beholder og man lader blandingen stå. Flotterende fremmedlegemer fjernes, og supernatanten filtreres gennem filtrerpapier nr. 2. Filtratet justeres til pH 7,0 ± 1,0 med natriumhydroxid eller phosphorsyre, overføres til en kulturtank og udluftes.

Kultur: Når opløsningen er udluftet i 30 min. fjernes ca. $^1/_3$ af hele supernatantens rumfang. Et tilsvarende volumen af 0,1 % syntetisk spildevand 0,1 % syntetisk spildevand: 1 g glucose, 1 g pepton og 1 g monokaliumphosphat opløses i 1 liter vand og justeres til pH 7,0 ± 1,0 med NaOH. Sættes til den tilbageblevne portion supernatant, og blandingen udluftes igen. Denne procedure gentages een gang hver dag. Kulturen holdes ved 25 ± 2° C.

Kontrol:

Som kontrol af opdyrkningstrinet udføres følgende kontroller, og de nødvendige justeringer foretages:

— Supernatantens udseende: Supernatanten af det aktiverede slam skal være klar.

— Bundfældning af aktiveret slam: Det aktiverede slam i store flager må let kunne bundfældes.

— udviklingstilstanden af aktivt slam: Såfremt vækst af flager ikke observeres, kan det syntetiske spildevand tilsættes, enten i større mængde eller med støre hyppighed.

— supernatantens pH er 7,0 ± 1,0

— temperatur: Temperaturen skal være 25 ± 2° C ved kultiveringen af det aktiverede slam.

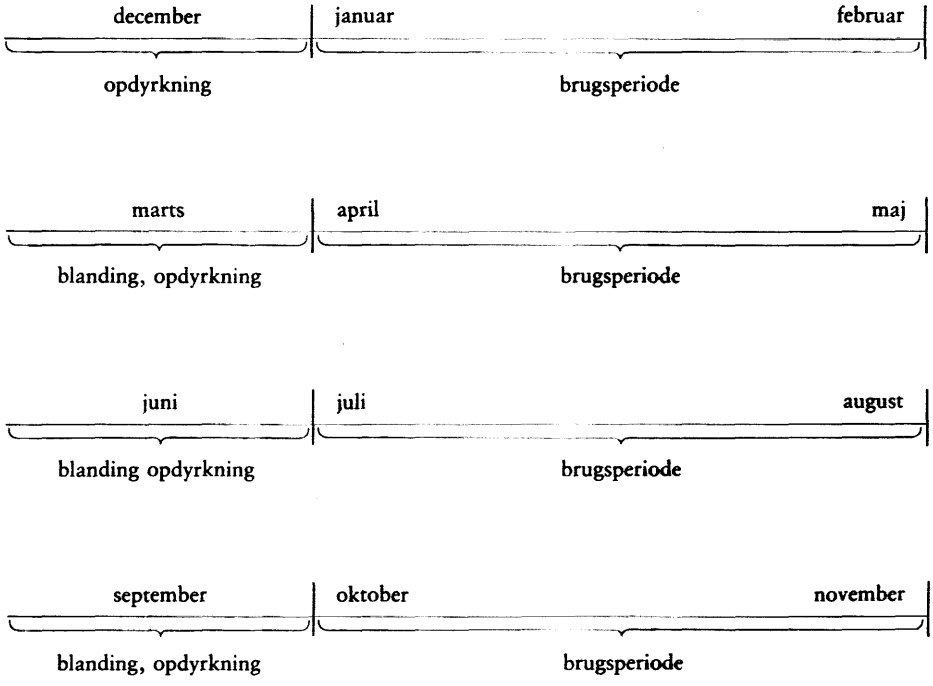
— Udluftning: Ved erstatning af supernatanten med det syntetiske spildevand må opslemningen i kulturtanken udluftes tilstrækkeligt til at holde koncentrationen af opløst oxygen i væsken over 5 mg/l.

— Det aktiverede slams mikroflora: Når det aktiverede slam iagttages under mikroskop (ved 100 til 400 ganges forstørrelse), skal et antal protozoer af forskellige arter kunne ses sammen med fnuggede flager.

— Blanding af frisk og gammelt aktiveret slam: For at holde samme aktivitet i frisk og gammelt aktiveret slam blandes den filtrerede supernatant af et aktiveret slam, som er i brug i testen, med et tilsvarende volumen filtreret supernatant af et nylig indsamlet aktiveret slam, og blandingen dyrkes.

— Kontrol af aktiviteten af det aktiverede slam: Det aktiverede slams aktivitet kontrolleres jævnligt, mindst een gang hver tredje måned, med standardstoffer efter forskriften givet nedenfor. Specielt i tilfælde, hvor frisk og gammelt slam blandes, skal omhyggelig kontrol udføres i sammenligning med det gamle aktiverede slam.

Eksempel på tilberedelse af aktiveret slam med efterfølgende brugsperiode:



(Dette forløb for tilberedelse og brug fortsættes).

1.6.4. *Forbehandling af teststoffet*

Hvis teststoffet ikke er opløseligt i vand op til testkoncentrationen, skal det pulveriseres så fint som muligt.

1.6.5. *Tilsætning af teststoffet og forberedelse til testen*

Følgende testkolber (jfr. 1.6.2) skal bruges og justeres til testtemperaturen.

1. To testkolber indeholdende vand, hvortil der er sat 100 mg teststof pr. liter (flaske en og to).
2. To testkolber indeholdende næringsopløsning, hvortil der er tilsat 100 mg teststof pr. liter. Om nødvendigt justeres pH af denne opløsning til syv før inokulation med aktiveret slam (flaske tre og fire).
3. En testkolbe indeholdende næringsopløsning, hvortil der er sat 100 mg anilin eller andet referencestof pr. liter (flaske fem).
4. En testkolbe til blindprøven kun indeholdende næringsopløsning (flaske seks).

1.6.5.1. Inokulation med aktiveret slam

Inoculum sættes til test-kolberne tre, fire, fem og seks, således at det suspenderede tørstof, (som defineret f. eks. i Japanese Industrial Standards, jfr. (3)), findes i en koncentration på 30 mg/l.

1.6.5.2. Testbetingelser

— Koncentration af teststoffer: 100 mg/l.

— Koncentration af aktiveret slam: 30 mg/l.

— Testtemperatur: 20 til 25° C.

— Forsøgets løbetid: 28 dage.

— Udføres i mørke. Hver dag kontrolleres temperaturen og ændringer i kulturens farve.

— Kraftig omrøring med mekanisk omrører.

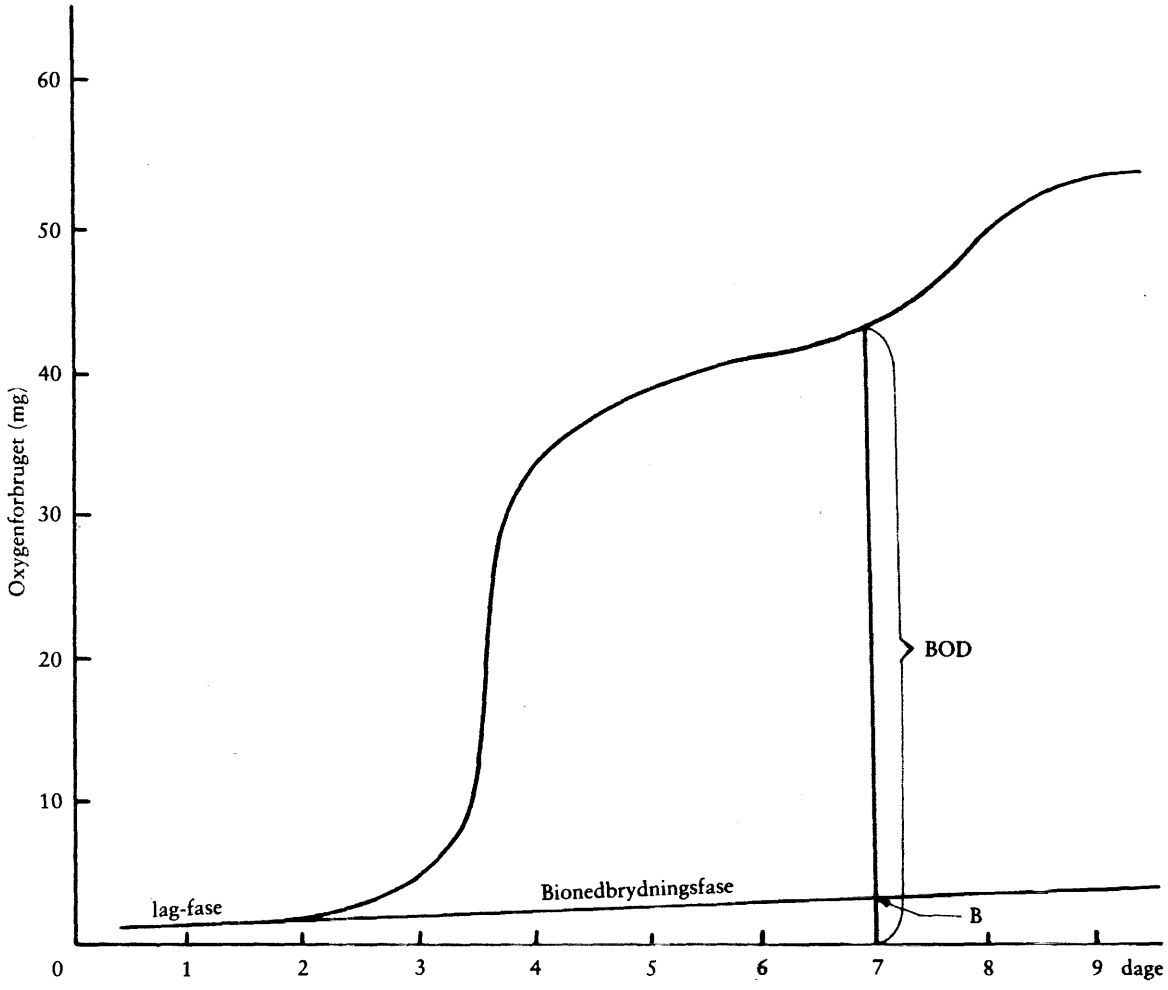
1.6.6. *Udførelse af testen*

BOD-kurven optegnes løbende og automatisk gennem 28 dage (jf. figur).

Efter de 28 dages testperiode bestemmes pH samt rest- og omdannelsesprodukterne i testkolberne.

Figur

BOD-kurve for anilin



Teststofferne i testkolberne uden aktiveret slam analyseres også for at bekræfte, om der er sket en ændring i testkemikalierne i testperioden, eller om der er sket et tab af det oprindelige teststof ved fordampning eller adsorption til kolbens væg osv.

1.6.7. *Analyseapparatur*

Hvis teststoffet er vandopløseligt, bestemmes også den totale resterende mængde organisk kulstof ved prøvens slutning.

a) Såfremt der bruges et analyseapparat for totalt organisk kulstof:

10 ml af testopløsningen udtages fra testkolben og centrifugeres ved 3 000 g og i fem minutter. Den resterende mængde af totalt organisk kulstof i supernatanten bestemmes på et analyseapparat for totalt organisk kulstof.

b) Såfremt andre analyser

Hele testkolbens indhold ekstraheres med et opløsningsmiddel passende for teststoffet, og efter passende forbehandling, som f. eks. koncentrering, bestemmes den resterende mængde teststof på analyseapparat (gaskromatografi, massespektrometer, spektrofometer osv.).

For flygtige kemikalier skal BOD-meterets termostatbad afkøles til 10° C og holdes ved denne temperatur i mindst 30 minutter for at forhindre fordampning. Derefter kan de analytiske procedurer, som nævnt under a) og b) indledes.

2. DATA OG BEDØMMELSE

2.1. Behandling af resultater

Metoden for beregning af den procentvise nedbrydning ud fra oxygenforbruget og ud fra resultatet af den direkte analyse er defineret i 1.2.

2.2. Bedømmelse af resultater

Beregning af teoretisk oxygenforbrug udføres enten som vist i tillæg 2 eller ved anvendelse af den originale MITI-forskrift:

Grundstof	*Oxideret form*
C	CO_2
H	H_2O
N	NO_2
S	SO_2
X (halogen)	X,

3. RAPPORT

3.1. Testrapport

Testrapporten skal i videst muligt omfang indeholde følgende punkter:

— Oplysninger om teststofferne: navn, strukturformel, molekylvægt, renhed, art af forureninger, fysisk-kemiske egenskaber, identifikationsdata.

— Testbetingelser.

— Aktiveret slam: indsamlingslokalitet og koncentration.

— Teststof: koncentration.

— Testperiode.

— Testtemperatur

— Analytisk procedure:
  — Forbehandling,
  — instrumentelle analysebetingelser.
  — Genfindelse ved analyseprocedure,
  — Identifikation af omdannelsesprodukter.

— Resultater:
  — Bionedbrydningskurver (kontrol af inoculum aktivitet såvel som kurve for teststof).
  — BOD (mg)
  — B (mg)
  — Sa (mg)
  — Sb (mg)
  — ThOd (mg)
  — Procentvis nedbrydning fundet ved BOD.
  — Procentvis nedbrydning fundet ved kemisk analyse.
— Kromatogrammer eller spektre af teststoffer, som er anskaffet og brugt med henblik på analyse.
— Bevis for gyldighed (se 1.3)

3.2. **Fortolkning af resultater**

Man må tage den mulighed i betragtning, at nitrogenholdige stoffer kan påvirke resultatet.

Hvis genfindingsforholdet, Sb, findes at være af størrelsesordenen 10 % eller mindre, kan dette betyde analytiske problemer eller f. eks. hydrolyse. I dette tilfælde skal man være meget varsom med fortolkningen.

På grund af denne tests stramme forsøgsbetingelser, betyder et lavt resultat ikke nødvendigvis, at teststoffet ikke er bionedbrydeligt under miljøbetingelser, men indicerer, at mere arbejde vil være påkrævet for at afgøre dette.

Testkemikalier, der udviser et højt oxygenforbrug i denne test, anses for let bionedbrydelige, forudsat at dette niveau et nået inden for ti dage, regnet fra den dag, hvor det observerede niveau af bionedbrydningen først overskrider 10 %.

4. **REFERENCER**

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301C*. Decision of the Council C(81) 30. Final.
(2) *Biodegradability and bioaccumulation test of chemical substances* (C-5/98/JAP), 1978.
(3) *The chemical substances control law in Japan* (Chemical Products Safety Division, Basic Industries Bureau, MITI) (C-2/78/JAP, 1978.
(4) *The biodegradability and bioaccumulation of new and existing chemical substances*, 5,8 (C-3/78/JAP), 1978.

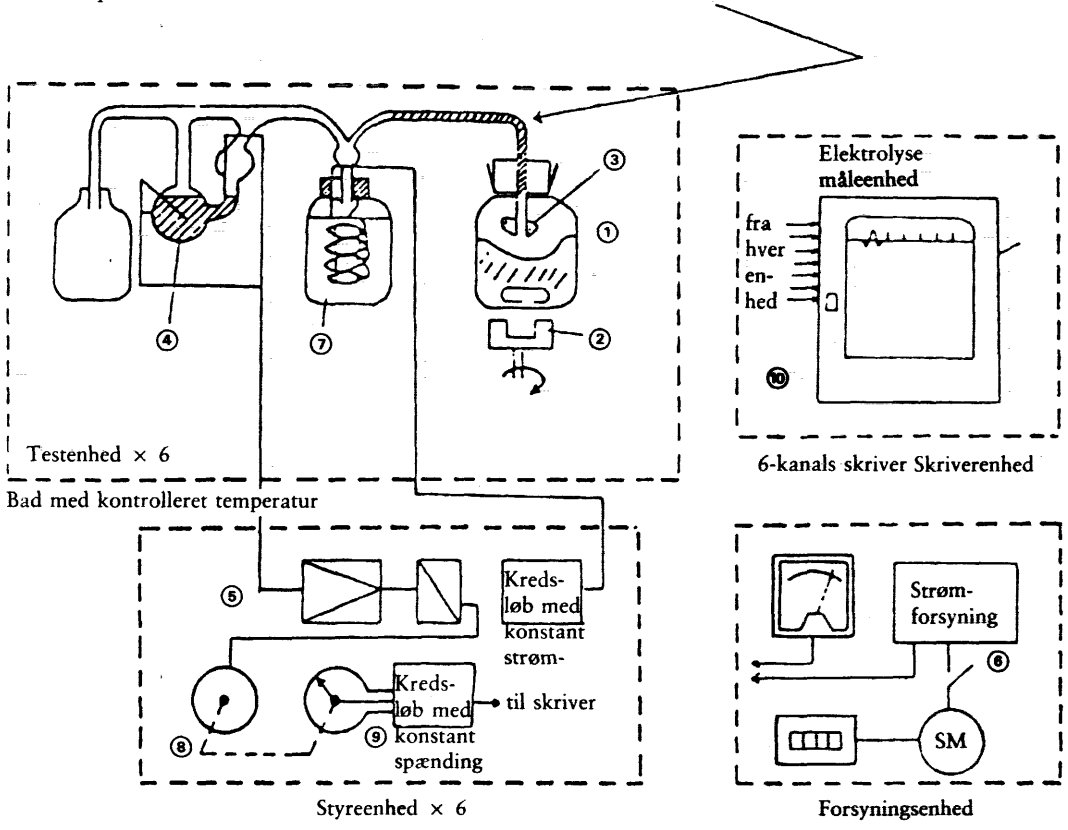
Tillæg 1

Principskitse af apparaturet til måling af oxygenforbrug i lukket målesystem

Mikroorganismers oxygenforbrug kan bestemmes ved anvendelse af en elektrokemisk analyseproces, f. eks. coulometri.

Apparatopstillingen er vist i følgende blok-diagram.

I det modificerede BOD-meter skal den skraverede del af røret der leder fra **vækstkolbe** (1) erstattes med et kapillarrør.



Prøven, der er indeholdt i vækstkolben (1), omrøres ved hjælp af en magnetomrører (2). Når reaktionen foregår, vil det i væsken opløste oxygen forbruges. Oxygen (O_2) i rummet i vækstkolben opløses i væsken, hvorved der i stedet dannes CO_2.

Da dette CO_2 absorberes af natronkalk (3), falder partialtrykket af oxygen i **rummet og totaltrykket går** ned.

Faldet i trykket detekteres og omsættes til et elektrisk signal ved hjælp af et **elektrode-type** manometer (4) og forstærkes af en forstærker (5) til styring af et relæ-kredsløb (6), der styrer en synkronmotor (8). Samtidig dannes elektrolytisk oxygen ved konstant strøm fra en svovlsur kobberopløsning indeholdt i en elektrolysekolbe (7).

Dette oxygen fødes til vækstkolben og normalisering af trykket måles ved hjælp af manometeret, hvilket medfører afbrydelse af relæ-kredsløbet og standsning af elektrolysen og synkronmotoren.

Det frie rum i vækst-kolben holdes under konstant oxygentryk, og oxygenmængden, der forbruges i vækstkolben, er proportional med den elektrolytisk dannede oxygenmængde. Da den elektrolytiske oxygenmængde er proportional med elektrolysetiden, er elektrolysestrømmen konstant. Derved omdannes synkronmotorens (9) omdrejninger til et mV-signal ved hjælp af det **indskudte potentiometer**, hvorved oxygenforbruget automatisk optegnes på en skriver (10).

Tillæg 2

Beregning af det teoretiske biokemiske oxygenforbrug

Det teoretiske biokemiske oxygenforbrug (ThOD) af stoffet $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ med molekylvægten MW beregnes efter følgende formel:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Denne beregning forudsætter, at C oxideres til CO_2, H til H_2O, P til P_2O_5 og Na til Na_2O. Halogen elimineres som hydrogenhalogenid og nitrogen som ammoniak.

Eksempel: Glucose $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg glukose.}$$

Molekylvægten af salte (bortset fra salte af alkalimetaller) beregnes under den forudsætning, at saltene er hydrolyseret.

Svovl antages at blive oxideret til oxidationstrin + 6.

Eksempel: Natrium-n-alkylbenzolsulfonat, $C_{18}H_{29}SO_3$ Na, MW = 348:

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg stof.}$$

I tilfælde af nitrogenholdige stoffer, kan nitrogen elimineres som ammoniak, nitrit eller nitrat, hvortil svarer forskellige teoretiske biokemiske oxygenforburg:

$$ThOD_{NO_2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Eksempel: Antag fuld omdannelse til nitrat ved analyse af en sekundær amin: $(C_{12}H_{25})_2NH$, MW = 353

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg stof.}$$

Tillæg 3

Biotic degradation: Modifed MITI test

Testing institute: .....

Study director: .....

Date of start of the test: .....

Test material: ..... Exp. no.: .....

Chemical structure: .....

Analytical procedure: .....

ThOD or COD of test material: .....

Inoculum: .....

Sampling site: .....

Concentration: .....

Test results:

..... % degradation = $\frac{BOD - B}{ThOD} \times 100$ % after 28 days

..... % degradation = $\frac{BOD - B}{COD} \times 100$ % after 28 days

..... % degradation = $\frac{Sb - Sa}{Sb} \times 100$ % after 28 days

Validation of the results:

Control chemical: .....

Result: ..... % degradation after 28 days .....

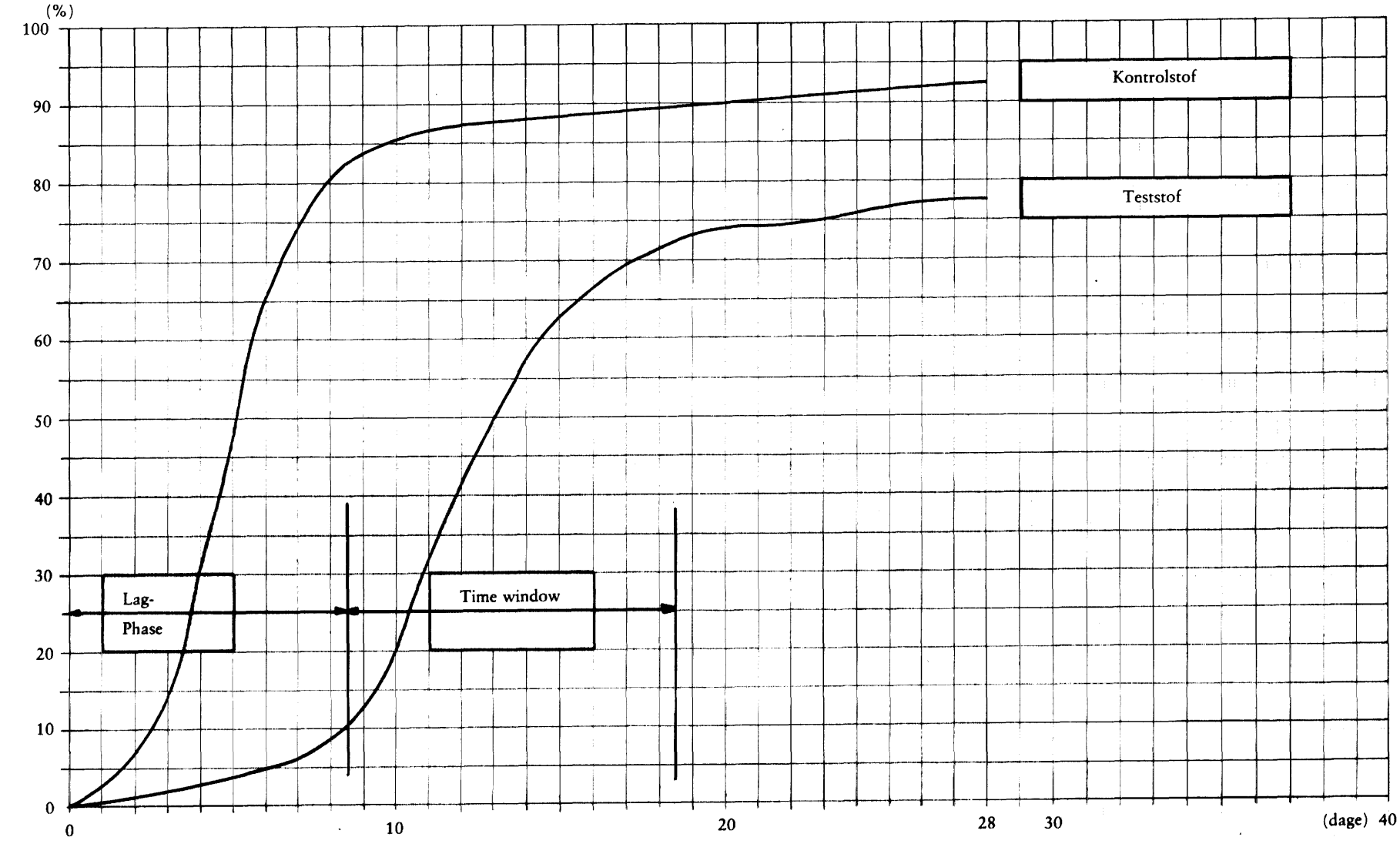
Reference: exp. no.: .....

Remarks:

Tillæg 4

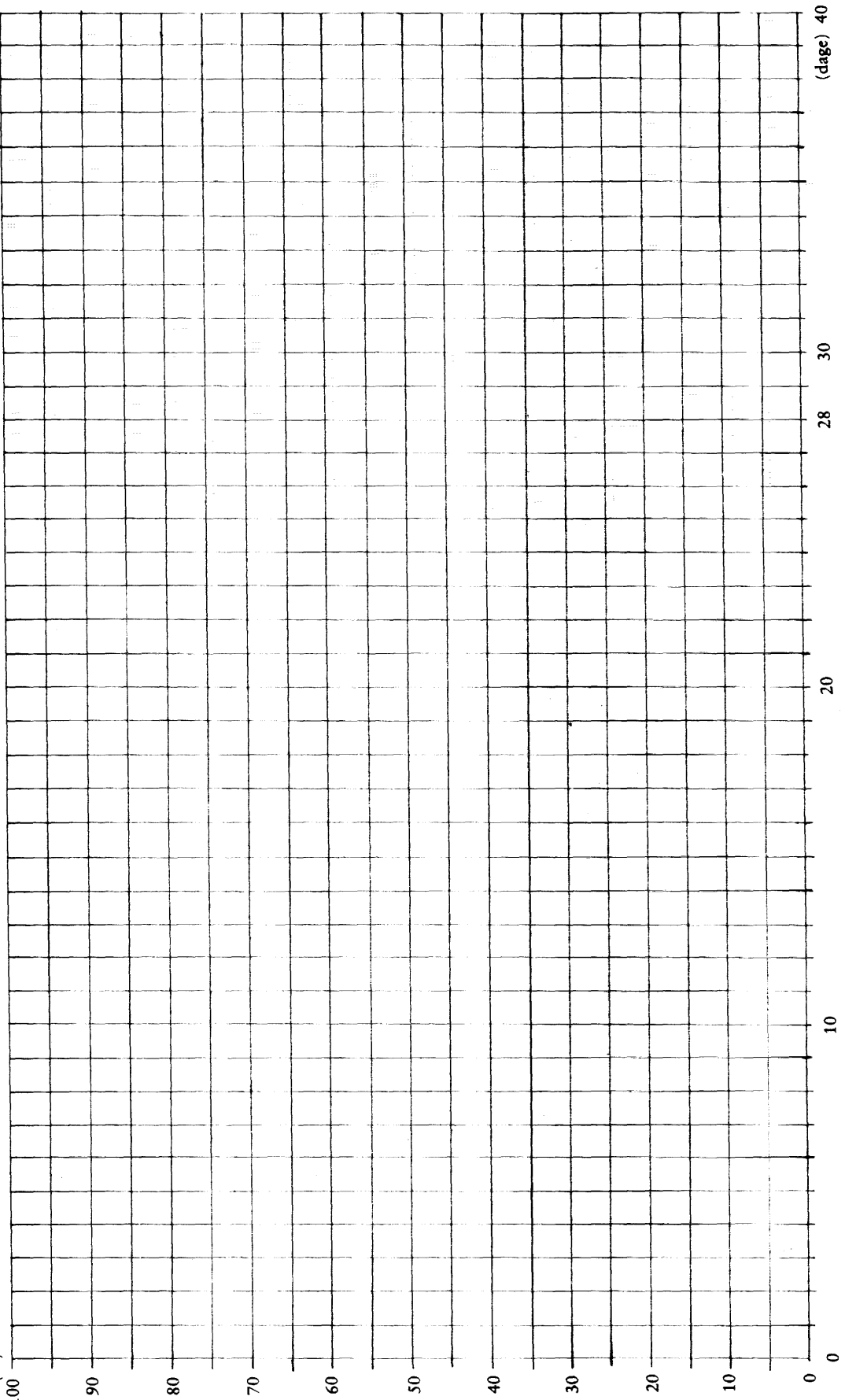
Modificeret MITI Test

Prøvningslaboratorium: ..... Teststof: ..... Exsp. no.: .....



Modificeret MITI Test

Prøvningslaboratorium: ..... Teststof: ..... Exsp. no.: .....



C. 8. NEDBRYDNING

BIOKEMISK OXYGEN-BEHOV

1. METODE

1.1. Indledning

Formålet med metoden er måling af det biologiske oxygenbehov (BOD) for faste eller flydende organiske stoffer. Data, som opnås med denne prøve vedrører vandopløselige forbindelser; dog kan flygtige forbindelser, samt forbindelser med lav vandopløselighed også afprøves, i det mindste i princippet.

Denne metode kan kun anvendes på organiske prøvematerialer, der ikke virker hæmmende for bakterier ved den koncentration, som anvendes ved prøvningen. Hvis prøvematerialet ikke lader sig opløse ved prøvekoncentrationen, kan det være nødvendigt at anvende særlige foranstaltninger, såsom ultralyd-dispersion for at opnå god fordeling af prøvematerialet.

Oplysninger om kemikaliets toksicitet kan være nyttige for fortolkningen af lave resultater og i valget af passende prøvekoncentrationer.

1.2. Definitioner og enheder

BOD defineres som den mængde opløst oxygen, der kræves til den biokemiske oxydationsproces for en nærmere angivet mængde opløsning af stoffet og under foreskrevne betingelser.

Resultatet udtrykkes som: g BOD pr. g undersøgt stof.

1.3. Referencestoffer

Referencestoffer til kalibrering kan endnu ikke anbefales. Brugen af et egnet kontrolkemikalium til kontrol af inoculums aktivitet er ønskelig.

1.4. Prøvemetodens princip

En forud bestemt mængde stof, opløst eller dispergeret i et egnet og godt gennemluftet medium podes med mikroorganismer og inkuberes ved en konstant, defineret omgivelsestemperatur i mørke.

BOD bestemmes ved forskellen mellem indholdet af opløst oxygen ved forsøgets begyndelse og ved forsøgets afslutning. Forsøgets varighed skal være mindst fem dage og ikke over 28 dage.

Et blindforsøg må udføres ved parallel prøvning, men uden indehold af prøvestof.

1.5. Kvalitetskriterier

Denne BOD-bestemmelse kan ikke betragtes som en gyldig bestemmelse af et stofs bionedbrydelighed, men kun som en screeningtest.

1.6. Beskrivelse af prøvemetoden

Der tilberedes en opløsning eller dispersions af stoffet for at opnå en BOD-koncentration, som er forenelig med den anvendte metode. BOD bestemmes derpå efter en hvilken som helst egnet national standardmetode. En international metode, vil dog blive foretrukket, når en sådan har opnået enighed.

2. **Dataevaluering**

BOD-indholdet i opløsningen beregnes efter den valgte normalmetode og udtrykkes som g BOD pr. g prøvestof.

3. **RAPPORTERING**

Den anvendte metode skal anføres. Det biokemiske oxygen-behov, BOD bør være middeltallet af mindst tre gyldige målinger.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkningen skal rapporteres, navnlig med hensyn til stoffets egen sammensætning, urenheder, fysisk tilstand og toksiske virkninger som vil kunne påvirke resultaterne.

Eventuel brug af tilsætningsstof til at hindre biologisk nitrifikation **skal rapporteres.**

4. **REFERENCER**

List of standardized methods, for example:

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. NEDBRYDNING

KEMISK OXYGEN-FORBRUG

1. METODE

1.1. Indledning

Formålet med denne metode er at måle det kemiske oxygenforbrug (COD) for et organisk stof i fast eller flydende form på en nærmere fastsat, standardiseret måde under givne laboratoriebetingelser.

Oplysninger om stoffets formel vil være nyttig for udførelsen af undersøgelsen og for fortolkningen af de opnåede resultater (f. eks. halogensalte, jern (ferro-) salte af organiske forbindelser, organiske chlorforbindelser).

1.2. Definitioner og enheder

Det kemiske oxygenforbrug er et mål for et stofs evne til at kunne oxideres og det udtrykkes som den ækvivalente mængde oxygen i det oxiderende reagens, der forbruges af stoffet under givne laboratoriebetingelser.

Resultatet udtrykkes som: g COD/g undersøgt stof.

1.3. Referencestoffer

Referencestoffer behøver ikke anvendes i alle tilfælde, når et nyt stof undersøges. De skal fortrinsvis tjene til kalibrering af metoden fra tid til anden og derved give mulighed for at sammenligne med resultater opnået ved andre metoder.

1.4. Metodeprincip

En afmålt mængde af stoffet, opløst eller dispergeret i vand, oxideres af kaliumdichromat i stærkt svovlsur opløsning med sølvnitrat som katalysator under tilbagesvaling i to timer. Den uforbrugte mængde dichromat bestemmes ved titrering med en standardopløsning af ferroammoniumsulfat. I tilfælde af chlorholdige stoffer tilsættes mercurisulfat for at nedsætte chloridinterferens.

1.5. Kvalitetskriterier

Metoden har karakter af vilkårligt fastlagt standardmetode, og COD må mere betragtes som en »oxyderbarhed indikator« end som mål for mængden af organisk stof.

Chlorid kan forstyrre målingen; uorganiske reducerende eller oxiderende stoffer kan også forstyrre COD-bestemmelse.

Visse cykliske forbindelser oxideres ikke fuldstændigt ved denne metode.

1.6. Metodebeskrivelse

En foreløbig opløsning eller opslemning af stoffet fremstilles, således at der opnås en COD-værdi mellem 250 og 600 mg pr. liter.

Bemærkning:

I tilfælde af vanskeligt opløselige og ikke opslemmelige stoffer kan der afvejes fint pulveriseret eller væskeformigt stof svarende til ca. fem mg COD og dette overføres da til forsøgsopstillingen med vand.

COD bestemmes derefter ved hjælp af en egnet national standardmetode indtil offenliggørelsen af en international standardmetode, der da vil blive foretrukket.

2. DATA

COD-indholdet i forsøgskolben beregnes i henhold til den valgte standardmetode og omregnes til g COD pr. g undersøgt stof.

3. RAPPORTERING

Den anvendte referencemtode skal anføres.

Det kemiske oxygenforbrug bør være et gennemsnit af mindst tre målinger. Alle oplysninger og bemærkninger, der er af betydning for fortolkningen af resultaterne, skal rapporteres, især hvad angår urenheder, fysisk tilstand og naturlige egenskaber ved stoffet (hvis sådanne kendes), der måtte kunne påvirke resultaterne.

Anvendelsen af mercurisulfat for at mindske chloridforstyrrelsen må rapporteres.

4. REFERENCER

Liste over standaridserede metoder, for eksempel:

NBN T 91 — 201:	Determination of the Chemical 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/l.
NEN 3235 5.3:	Bepalinge van het chemisch zuurstofverbruik.
ISO DP 6060:	Water Quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate Methods.

C. 10. NEDBRYDNING

ABIOTISK NEDBRYDNING: HYDROLYSE SOM FUNKTION AF pH

1. METODE

Denne metode er baseret på »OECD Test Guideline« (1).

1.1. Indledning

Hydrolyse er en vigtig reaktion, der styrer den abiotiske nedbrydning. Denne reaktion er særlig relevant for stoffer med lav bionedbrydelighed, og den kan have indflydelse på et stofs persistens i miljøet.

De fleste hydrolysereaktioner er af *pseudo*-første orden, og derfor er halveringstiden uafhængig af koncentrationen. Dette betyder, at resultater, der er bestemt ved laboratoriekoncentrationer, normalt kan ekstrapoleres til forholdene i miljøet.

Endvidere foreligger der adskillige eksempler (2) på tilfredsstillende overensstemmelse mellem resultater bestemt i rent og i naturligt forekommende vand, og dette er tilfældet for flere typer kemiske stoffer. Det er nyttigt på forhånd at have oplysninger om stoffets damptryk ved udførelse af metoden.

Denne metode kan kun anvendes på vandopløselige stoffer. Urenheder vil almindeligvis påvirke resultaterne.

Kemiske stoffers hydrolyseegenskaber skal undersøges ved pH-værdier, som normalt findes i miljøet (pH 4—9).

1.2. Definitioner og enheder

Hydrolyse er reaktionen af et stof RX med vand og kan udtrykkes ved nettoudskiftningen af gruppen X med OH

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad (1)$$

Den hastighed, hvormed koncentrationen af RX aftager, er givet ved

$$\text{hastighed} = k \cdot [H_2O] \cdot [RX] \qquad (2)$$

Da vand er til stede i stort overskud i forhold til stoffet, beskrives denne type reaktion almindeligvis som en pseudo-første ordens reaktion, hvor den iagttagne hastighedskonstant er givet ved ligningen

$$k_{obs} = k \cdot [H_2O] \qquad (3)$$

Denne konstant kan ved et givet pH og en given temperatur T bestemmes ud fra udtrykket

$$k_{obs} = \frac{2{,}303}{t} \cdot \log \frac{c_0}{c_t} \qquad (4)$$

hvor

t = er tiden,
C_0 = er koncentrationen af stoffet ved tiden 0,
C_t = er koncentrationen af stoffet ved tiden t, og
2,303 = er faktoren for omregning mellen naturlige logaritmer og titalslogaritmer.

Koncentrationerne er udtrykt i g/l eller mol/l.

Konstanten k_{obs} har dimensionen (tid)$^{-1}$.

Halveringstiden t ½ er defineret som den tid, det tager koncentrationen af stoffet at falde 50 %, dvs.

$$c_t = {}^1/_2 \cdot C_0 \qquad (5)$$

Ved hjælp af ligning (4) og (5) kan det vises, at

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{obs} \qquad (6)$$

1.3. **Referencestoffer**

Referencestoffer behøver ikke at anvendes i alle tilfælde ved undersøgelse af et nyt stof. De bør primært tjene til at kontrollere metoden med jævne mellemrum samt give **mulighed** for sammenligning med resultater, der opnås ved anvendelse af en anden metode. Acetylsalicylsyre (aspirin) og

0,0-diethyl-0-(6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pyrimidinylphosphorthioat (dimpylate, diazinon)

har været anvendt som referencestoffer (1).

1.4. **Prøvemetodens princip**

Stoffet opløses i vand i lav koncentration ved kendt pH og temperatur.

Faldet i stoffets koncentration som funktion af tiden følges ved hjælp af en egnet analysemetode.

Koncentrationernes logaritmer afbildes mod tiden, og hvis der fremkommer en ret linje, fås den første ordens hastighedskonstant af dens hældning (jf. punkt (2)).

Når det ikke er praktisk muligt direkte at bestemme en hastighedskonstant for en bestemt temperatur, kan man sædvanligvis skønne en værdi for konstanten ved brug af Arrhenius-ligningen, som udtrykker hastighedskonstantens afhængighed af temperaturen. Ud fra en lineær afbildning af logaritmen til hastighedskonstanten, bestemt ved passende temperaturer, mod den reciprokke absolutte temperatur (K) kan der ekstrapoleres til den hastighedskonstant, der ikke kunne bestemmes direkte.

1.5. **Kvalitetskriterier**

I reference (2) er det anført, at hastighedskonstanter for hydrolyse af **13 grupper organiske** stoffer kan bestemmes med stor nøjagtighed.

Gentageligheden afhænger især af pH og af koncentrationen af opløst **oxygen og kan påvirkes af**, at der er mikroorganismer til stede.

1.6. **Beskrivelse af prøvemetoden**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Bufferopløsninger

Prøven udføres ved tre pH-værdier, nemlig 4,0, 7,0 og 9,0. Til dette formål bør bufferopløsninger fremstilles under brug af analyserene kemikalier og sterilt destilleret eller deioniseret vand. I bilag I er vist nogle eksempler på buffersystemer.

Hydrolysehastigheden kan afhænge af det anvendte buffersystem. Hvis der er tegn herpå, bør der anvendes et andet buffersystem. I reference (2) anbefales borat- eller acetatbuffere frem for phosphatbuffere.

Hvis bufferopløsningens pH ikke er kendt ved den temperatur, der benyttes ved prøvningen, skal pH bestemmes med et kalibreret pH-meter ved den valgte temperatur med en nøjagtighed på 0,1 pH-enheder.

1.6.1.2. Prøveopløsninger

Stoffet bør opløses i den valgte buffer i en koncentration, der ikke overstiger 0,01 M eller den halve mætningskoncentration, idet den laveste værdi lægges til grund.

Brug af organiske opløsningsmidler, der er blandbare med vand, anbefales kun til stoffer med lav vandopløselighed. Opløsningsmidlets mængde bør højst være 1 %, og det må ikke indvirke på hydrolyseprocessen.

1.6.2. *Apparatur*

Der bruges glaskolber med prop, men der må ikke anvendes fedt på slibene.

Hvis stoffet eller buffersystemet er flygtigt, eller hvis prøven udføres ved forhøjet temperatur, foretrækkes forseglede eller membranlukkede glas, og luftmellemrum mellem væskeoverflade og lukke bør undgås.

1.6.3. *Analysemetode*

Analysemetoden afhænger af stoffets art og skal være tilstrækkelig nøjagtig og følsom til, at et fald på 10 % i forhold til startkoncentrationen kan påvises.

Metoden skal være specifik, således at stoffet kan bestemmes ved prøvekoncentrationerne, og der kan udmærket benyttes en kombination af egnede analyseteknikker.

1.6.4. *Prøvningsbetingelser*

Prøvningen udføres i et termostatstyret aflukke eller i et bad, hvis temperatur ligger inden for ± 0,5° C af den valgte temperatur. Temperaturen kontrolleres inden for ± 0,1° C. Der træffes foranstaltninger til at undgå påvirkning ved fotolyse.

Der træffes egnede foranstaltninger til at undgå opløst oxygen (f. eks. ved gennembobling med nitrogen eller argon i fem minutter før fremstilling af opløsningen).

1.6.5. *Fremgangsmåde*

1.6.5.1. Forhåndsprøvning

Der udføres for alle stoffer en forhåndsprøvning ved 50° C ± 0,5° C ved tre pH-værdier, 4,0, 7,0 og 9,0. Der foretages tilstrækkelig mange målinger til ved hver pH-værdi og ved 50° C at bestemme, om halveringstiden ($t_{1/2}$)er mindre end 2,4 timer, eller om mindre end 10 % er hydrolyseret efter fem dage. (Det skønnes, at disse værdier svarer omtrent til halveringstider på henholdsvis mindre end én dag og mere end ét år under forhold, der er mere repræsentative for miljøet (25° C).)

Hvis forhåndsprøvningen viser, at 50 % eller mere af stoffet er hydrolyseret på 2,4 timer ved 50° C, eller at mindre end 10 % er hydrolyseret efter fem dage, ved hver af de tre pH-værdier (4, 7 og 9), er yderligere afprøvning ikke nødvendig.

I andre tilfælde, og ved enkelte pH-værdier, hvor betingelserne ikke har været opfyldt, udføres prøve nr. 1.

1.6.5.2. Prøve nr. 1

Prøve nr. 1 udføres ved én temperatur, fortrinsvis 50 ± 0,5° C og om muligt under sterile forhold, ved de pH-værdier, hvor forhåndsprøvningen har vist, at yderligere prøvning er påkrævet Der vælges et tilstrækkeligt antal prøver (ikke mindre end fire) til at dække intervallet 20 til 70 % hydrolyse, således at det ved de specificerede pH-værdier kan kontrolleres, at reaktionen er af *pseudo*-første orden.

Reaktionens orden bestemmes ved hver af de pH-værdier, ved hvilke prøve nr. 1 udføres.

Skøn over hastighedskonstanten ved 25° C

Hvorledes der skal gås frem eksperimentelt, afhænger af, om man ud fra prøve nr. 1 kan slutte, at reaktionen er af *pseudo*-første orden eller ikke.

Hvis det ud fra prøve nr. 1 ikke med sikkerhed kan konkluderes, at reaktionen er af første orden, må der udføres yderligere forsøg som beskrevet i prøve nr. 2.

Hvis det ud fra prøve nr. 1 kan konkluderes med bestemthed, at reaktionen er af *pseudo*-første orden, udføres de følgende forsøg som beskrevet i prøve nr. 3. (Alternativt kan man under særlige omstændigheder muligvis beregne hastighedskonstanterne ved 25° C ud fra konstanter ved 50° C, som er fremkommet på grundlag af resultater fra prøve nr. 1, jf. punkt 3.2).

1.6.5.3. Prøve nr. 2

Denne prøve udføres ved alle de pH-værdier, hvor det ifølge resultaterne af prøve nr. 1 er påkrævet,

— enten ved én temperatur under 40° C

— eller ved to forskellige temperaturer over 50° C med mindst 10° C imellem.

For hver pH-værdi og temperatur, hvor prøve nr. 2 udføres, bestemmes mindst seks passende fordelte datapunkter, således at hydrolysegraden ligger i intervallet 20 til 70 %.

For én pH-værdi og én temperatur udføres en dobbeltbestemmelse. Hvis prøve nr. 2 udføres ved to temperaturer over 50° C, er det at foretrække at udføre dobbeltbestemmelsen ved den laveste af de to temperaturer.

For hver pH-værdi og temperatur, hvor prøve nr. 2 udføres, angives om muligt et grafisk skøn over halveringstiden ($t_{1/2}$).

1.6.5.4. Prøve nr. 3

Denne prøve udføres ved alle de pH-værdier, hvor det ifølge resultaterne af prøve nr. 1 er påkrævet,

— enten ved én temperatur under 40° C

— eller ved to forskellige temperaturer over 50° C med mindst 10° C imellem.

For hver pH-værdi og temperatur, hvor prøve nr. 3 udføres, bestemmes tre datapunkter, det første ved tiden 0 og det andet og det tredje, når hydrolysegraden er større end 30 %; konstanten k_{obs} og $t_{1/2}$ beregnes.

2. DATA

For reaktionen af *pseudo*-første orden fremkommer værdierne af k_{obs} for hver pH-værdi og temperatur, prøven er udført ved, ud fra afbildninger af logaritmen til koncentrationen mod tiden ved hjælp af udtrykket

$$k_{obs} = - \text{hældning} \times 2{,}303.$$

Derefter kan $t_{1/2}$ beregnes ifølge ligning (6).

Hvor det er muligt, skønnes en værdi for $k_{25°}$ ved hjælp af Arrhenius-ligningen.

Jf. punkt 3.1 for reaktioner, der ikke er af pseudo-første orden.

3. RAPPORT

3.1. Rapportering

Prøvnings-rapporten skal om muligt omfatte følgende oplysninger:

— specifikation af stoffet,

— alle resultater, der fremkommet med referencestoffer,

— princippet og enkelthederne i den anvendte analysemetode,

— for hvor prøvning: temperatur, pH-værdi, buffersammensætning og en tabel over alle koncentration/tid-datapunkter,

— for pseudo-første ordens reaktioner værdierne af k_{obs} og $t_{1/2}$ samt hvorledes de er beregnet,

— for reaktioner, der ikke x er af *pseudo*-første orden, afbildninger af logaritmen til koncentrationen mod tiden,

— alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkning af resultaterne.

3.2. Fortolkning af resultater

Det kan være muligt at beregne acceptable værdier for prøvestoffers hastighedskonstant (ved 25° C), forudsat at der for stoffets homologe findes eksperimentelt bestemte aktiveringsenergier, og at det med rimelighed kan antages, at prøvestoffets aktiveringsenergi er af samme størrelsesorden.

4. **REFERENCER**

(1) OECD, Paris, 1981, *Test guideline III* — Decision of the Council C(81) 30 F.
(2) OECD, Paris, 1981, *Test guideline III* — Decision of the Council C(81) 30 F. — reference 2.

Tillæg 1

BUFFERBLANDINGER

A. CLARK OG LUBS

De pH-værdier, som er angivet i disse tabeller, er beregnet ud fra de potentielle målinger under brug af Sørensens standardligninger (1909). De egentlige pH-værdier ligger **0,04 enheder højere** end de anførte værdier.

Sammensætning

	pH
0,1 M kaliumhydrogenphthalat + 0,1 N HCl ved 20° C	
2,63 ml. 0,1 N HCl + ml. phtalate to 100 ml	3,8
0,1 M kaliumhydrogenphthalat + 0,1 N NaOH ved 20° C	
0,40 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. phtalate to 100 ml	4,0
3,70 ml. 0.1 N NaOH + 50 ml. phtalate to 100 ml	4,2
0,1 M kaliumhydrogenphosphat + 0,1 N NaOH ved 20° C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	6,8
29,63 ml 0.1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	7,0
35,00 ml 0.1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	7,2
0,1 M H_3BO_3 i 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH ved 20° C	
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	9,2

B. KOLTHOFF OG VLEESCHHOUWER

Sammensætning

	pH
0,1 M monokaliumcitrat og 0,1 N NaOH ved 18° C (Tilsæt små thymolkrystaller eller nogle få milligram kviksølv for at forebygge svampevækst.)	
2,0 ml 0.1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	3,8
9,0 ml 0.1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	4,0
16,3 ml 0.1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	4,2

C. SØRENSEN

0,05 M borax + 0,1 N HCl

Sammensætning		pH			
ml Borax	ml HCl	Sørensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	**8,77**	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	**8,86**	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	**8,94**	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	**9,01**	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	**9,08**	8,86

0,05 M borax + 0,1 N NaOH

Sammensætning		pH			
ml Borax	ml HCl	Sørensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	**9,08**	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	**9,18**	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	**9,30**	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	**9,44**	9,12