II

(Πράξεις για την ισχύ των οποίων δεν απαιτείται δημοσίευση)

ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΔΗΓΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 25ης Απριλίου 1984

που προσαρμόζει για έκτη φορά στην τεχνική πρόοδο την οδηγία 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων περί ταξινομήσεως, συσκευασίας και επισημάνσεως των επικινδύνων ουσιών

(84/449/ΕΟΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

την συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας,

την οδηγία 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 27ης Ιουνίου 1967 περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων περί ταξινομήσεως, συσκευασίας και επισημάνσεως των επικινδύνων ουσιών (1), όπως τροποποιήθηκε για έκτη φορά από την οδηγία 79/831/ΕΟΚ του Συμβουλίου (2), και ιδίως τα άρθρα 19, 20 και 21,

Εκτιμώντας:

ότι το άρθρο 3 παράγραφος 1 της οδηγίας 79/831/ΕΟΚ προβλέπει ότι ο προσδιορισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας των ουσιών και παρασκευασμάτων διενεργείται σύμφωνα με τις μεθόδους που προβλέπονται στο παράρτημα V·

ότι το άρθρο 19 της οδηγίας 79/831/ΕΟΚ της 18ης Σεπτεμβρίου 1979 προβλέπει ότι το παράρτημα V υπάγεται στη διαδικασία της Επιτροπής για την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο και ότι είναι διαίτερα σκόπιμο να ληφθούν υπόψη μέθοδοι που αναγνωρίζονται και συνιστώνται από τους αρμόδιους διεθνείς οργανισμούς, εφόσον υπάρχουν οι συστάσεις αυτές·

ότι οι διατάξεις της παρούσας οδηγίας είναι σύμφωνες με τη γνώμη της επιτροπής για την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο των οδηγιών που αποβλέπουν στην εξάλειψη των τεχνικών εμποδίων στις συναλλαγές στον τομέα των επικίνδυνων ουσιών και παρασκευασμάτων,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Το κείμενο του παραρτήματος V της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ αντικαθίσταται από το κείμενο που ευρίσκεται στο παράρτημα της παρούσας οδηγίας.

Άρθρο 2

Τα κράτη μέλη υιοθετούν και δημοσιεύουν πρίν από την 1η Ιουλίου 1985 τις αναγκαίες διατάξεις για να συμμορφωθούν με την οδηγία αυτή και πληροφορούν αμέσως περί τούτου την Επιτροπή. Τα κράτη μέλη εφαρμόζουν τις διατάξεις αυτές το αργότερο από την 1η Ιουλίου 1986.

Άρθρο 3

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 25 Απριλίου 1984.

Για την Επιτροπή

Karl-Heinz NARJES

Μέλος της Επιτροπής

(1) ΕΕ.αριθ. L 196 της 16. 8. 1967, σ. 1.
(2) ΕΕ αριθ. L 259 της 15. 10. 1979, σ. 10.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Το παράρτημα καθιερώνει μεθόδους ελέγχου για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών, τοξικολογικών και οικοτοξικολογικών ιδιοτήτων που περιλαμβάνονται στο παράρτημα VII και στο παράρτημα VIII της οδηγίας 79/831/ΕΟΚ, καθώς και τις αρχές για την ορθή εργαστηριακή πρακτική που πρέπει να τηρείται κατά την εφαρμογή των μεθόδων.

Οι μέθοδοι και οι αρχές για την ορθή εργαστηριακή πρακτική βασίζονται σε αντίστοιχες μεθόδους και αρχές αναγνωρισμένες και συνιστώμενες από αρμόδιους διεθνείς οργανισμούς (κυρίως του ΟΟΣΑ).

Στις περιπτώσεις που δεν υπήρχαν τέτοιες μέθοδοι, υιοθετήθηκαν εθνικά πρότυπα ή κατάλληλες επιστημονικές μέθοδοι. Γενικά, οι έλεγχοι πρέπει να γίνονται με την ουσία, όπως αυτή κυκλοφορεί στην αγορά. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην πιθανή επίδραση ξένων προσμείξεων στα αναλυτικά αποτελέσματα.

Στις περιπτώσεις που οι μέθοδοι του παραρτήματος της οδηγίας 79/831/ΕΟΚ δεν είναι κατάλληλες για τη διερεύνηση μιας ιδιότητας, ο γνωστοποιών πρέπει να αιτιολογήσει την εναλλακτική μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί.

Τα ζωικά πειράματα και οι μελέτες θα διεξάγονται σύμφωνα με τους εθνικούς κανονισμούς, και θά πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ανθρώπινες αρχές και οι διεθνείς εξελίξεις στον τομέα της ζωικής πρόνοιας.

Ανάμεσα σε δύο η περισσότερες ισοδύναμες μεθόδους πρέπει να χρησιμοποιηθεί εκείνη που απαιτεί τη θυσία του μικρότερου δυνατού αριθμού πειραματοζώων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

		Σελίδα
ΜΕΡΟΣ Α:	Μέθοδοι προσδιορισμού φυσικοχημικών ιδιοτήτων	4
Α. 1	Σημείο τήξεως/Περιοχή τήξεως	4
Α. 2	Σημείο ζέσεως/Περιοχή ζέσεως	13
Α. 3	Σχετική πυκνότητα	20
Α. 4	Τάση ατμών	25
Α. 5	Επιφανειακή τάση	37
Α. 6	Διαλυτότητα στο νερό	44
Α. 7	Διαλυτότητα στο λίπος	54
Α. 8	Συντελεστής κατανομής	58
Α. 9	Σημείο αναφλέξεως	62
Α. 10	Αναφλεξιμότητα (Στερεά)	64
Α. 11	Αναφλεξιμότητα (Αέρια)	67
Α. 12	Αναφλεξιμότητα (Ουσίες που εκλύουν λίαν αναφλέξιμα αέρια)	69
Α. 13	Αναφλεξιμότητα (Στερεά και υγρά)	73
Α. 14	Εκρηκτικές ιδιότητες	75
Α. 15	Αυτοαναφλεξιμότητα (Πτητικά υγρά, αέρια)	85
Α. 16	Αυτοαναφλεξιμότητα (Στερεά)	87
Α. 17	Οξειδωτικές ιδιότητες	90
ΜΕΡΟΣ Β:	Μέθοδοι προσδιορισμού τοξικότητας	94
Γενική εισαγωγή		94
Β. 1	Οξεία τοξικότητα από στόματος	96
Β. 2	Οξεία τοξικότητα αναπνευστική	99
Β. 3	Οξεία τοξικότητα δερματική	103
Β. 4	Οξεία τοξικότητα δερματική ερεθιστικότητα	106
Β. 5	Οξεία τοξικότητα ερεθιστικότητα οφθαλμού	109
Β. 6	Οξεία τοξικότητα δερματική ευαισθητοποίηση	113
Β. 7	Υπο-οξεία τοξικότητα από στόματος	118
Β. 8	Υπο-οξεία τοξικότητα αναπνευστική	122
Β. 9	Υπο-οξεία τοξικότητα δερματική	127
Β. 10	Άλλες επιδράσεις — Μεταλλαξογένεση — Θηλαστικά — in vitro	131
Β. 11	Άλλες επιδράσεις — Μεταλλαξογένεση — Θηλαστικά — μυελός οστών	134
Β. 12	Άλλες επιδράσεις — Μεταλλαξογένεση — Θηλαστικά — μικροπυρήνας	137
Β. 13	Άλλες επιδράσεις — Μεταλλαξογένεση — Escherichia Coli	140
Β. 14	Άλλες επιδράσεις — Μεταλλαξογένεση — Salmonella Typhimurium	143
ΜΕΡΟΣ Γ:	Μέθοδοι προσδιορισμού οικοτοξικότητας	146
Γ. 1	Οξεία τοξικότητα σε ψάρια	146
Γ. 2	Οξεία τοξικότητα για daphnia	155
Γ. 3	Διασπασιμότητα — Βιοδιασπασιμότητα: τροποποιημένη βασική μέθοδος OECD	160
Γ. 4	Διασπασιμότητα — Βιοδιασπασιμότητα: τροποποιημένη μέθοδος ελέγχου AFNOR NF T 90/302	170
Γ. 5	Διασπασιμότητα — Βιοδιασπασιμότητα: τροποποιημένη μέθοδος Sturm	179
Γ. 6	Διασπασιμότητα — Βιοδιασπασιμότητα: μέθοδος κλειστής φιάλης	188
Γ. 7	Διασπασιμότητα — Βιοδιασπασιμότητα: τροποποιημένη μέθοδος MITI	199
Γ. 8	Διασπασιμότητα — Βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο	212
Γ. 9	Διασπασιμότητα — Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο	214
Γ. 10	Αποικοδόμηση — Αβιοτική αποικοδόμηση: Υδρόλυση σαν συνάρτηση του pH	216

ΜΕΡΟΣ Α: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ

Α. 1. ΣΗΜΕΙΟ ΤΗΞΕΩΣ/ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΞΕΩΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Οι μέθοδοι που περιγράφονται εδώ βασίζονται στην κατευθυντήρια γραμμή ελέγχου του ΟΟΣΑ (1).

1.1. **Εισαγωγή**

Οι μέθοδοι και τα όργανα που περιγράφονται εδώ εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό του σημείου τήξεως χημικών ουσιών, χωρίς περιορισμούς σχετικά με το βαθμό καθαρότητάς τους.

Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από τη φύση της ουσίας που θα ελεγχθεί.

Επομένως, ο περιοριστικός αυτός παράγοντας εξαρτάται από το εάν η ουσία μπορεί να κονιοποιηθεί εύκολα, δύσκολα ή καθόλου.

Για μερικές ουσίες είναι πιο χαρακτηριστικός ο προσδιορισμός του σημείου πήξεως ή στερεοποιήσεως, γι' αυτό περιελήφθησαν εδώ πρότυπες μέθοδοι για τους προσδιορισμούς αυτούς.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Σαν σημείο τήξεως ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα η μετατροπή της στερεάς φάσεως σε υγρά, σε κανονική ατμοσφαιρική πίεση.

Η θερμοκρασία αυτή, υπό ιδανικές συνθήκες, αντιστοιχεί στη θερμοκρασία του σημείου στερεοποιήσεως ή του σημείου πήξεως.

Επειδή η φάση μετατροπής πολλών ουσιών λαμβάνει χώρα σε μια μεγάλη περιοχή θερμοκρασίας, συχνά χαρακτηρίζεται σαν περιοχή τήξεως.

Μετατροπή μονάδων (K σε °C)

$t = T - 273{,}15$

όπου t εκφράζεται σε °C και T σε K.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες ερευνάται μια νέα χημική ουσία. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως για τον έλεγχο της εφαρμοζόμενης μεθόδου, κατά διαστήματα και για σύγκριση αποτελεσμάτων όταν εφαρμόζεται άλλη μέθοδος.

Μερικές ουσίες αναφοράς περιλαμβάνονται στη βιβλιογραφία (2).

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Προσδιορίζεται η θερμοκρασία (περιοχή θερμοκρασίας) της φάσεως μετατροπής από τη στερεά στην υγρή κατάσταση. Στην πράξη, κατά τη θέρμανση ενός δείγματος της ελεγχόμενης ουσίας υπό ατμοσφαιρική πίεση, προσδιορίζονται οι θερμοκρασίες της αρχής της τήξεως και της τελικής φάσεως της τήξεως. Περιγράφονται τρεις τύποι μεθόδων, η μέθοδος τριχοειδούς, η μέθοδος θερμών φάσεων και οι προσδιορισμοί του σημείου πήξεως.

1.4.1. *Μέθοδος τριχοειδούς*

1.4.1.1. Συσκευή σημείου τήξεως με υγρό λουτρό

Μικρή ποσότητα της λεπτά κονιοποιημένης ουσίας φέρεται σε τριχοειδή σωλήνα και συμπιέζεται καλά. Ο σωλήνας θερμαίνεται μαζί με ένα θερμόμετρο και ρυθμίζεται η άνοδος της θερμοκρασίας σε λιγότερο από περίπου 1 K/min κατά τη διάρκεια της κυρίως τήξεως. Ποσδιορίζονται η αρχική και τελική θερμοκρασία τήξεως.

1.4.1.2. Μεταλλικός κορμός

Όπως περιγράφεται στο 1.4.1.1, με τη διαφορά ότι ο τριχοειδής σωλήνας και το θερμόμετρο είναι τοποθετημένα σε ένα θερμαινόμενο μεταλλικό θάλαμο και η παρατήρηση γίνεται από τρύπες στο θάλαμο.

1.4.1.3. Ανίχνευση με φωτοκύτταρο

Το δείγμα στον τροχοειδή σωλήνα θερμαίνεται αυτόματα σε ένα μεταλλικό κύλινδρο. Μία δέσμη φωτός κατευθύνεται, μέσω της ουσίας, από μια τρύπα στον κύλινδρο, προς ένα φωτοκύτταρο βαθμονομημένο με ακρίβεια. Οι οπτικές ιδιότητες των περισσότερων ουσιών αλλάζουν από σκιερές προς διαφανείς όταν τήκονται. Η ένταση του φωτός που φθάνει στο φωτοκύτταρο αυξάνει και δίνει ένα σήμα ακινησίας στην αριθμητική ένδειξη της θερμοκρασίας ενός θερμομέτρου με αντίσταση από λευκόχρυσο, τοποθετημένου στο θάλαμο θερμάνσεως. Η μέθοδος αυτή δεν είναι κατάλληλη για μερικές ισχυρά χρωματιστές ουσίες.

1.4.2. *Θερμές επιφάνειες*

1.4.2.1. Θερμή ράβδος Kofler

Η θερμή ράβδος Kofler χρησιμοποιεί δύο τεμάχια μετάλλου με διαφορετική θερμική αγωγιμότητα, που θερμαίνονται ηλεκτρικά, με τη ράβδο κατασκευασμένη κατά τρόπο ώστε η πτώση θερμοκρασίας να είναι σχεδόν γραμμική κατά την κατεύθυνση του μήκους της. Η θερμοκρασία της θερμής ράβδου μπορεί να κυμαίνεται από 283 K έως 543 K με ένα είδικό εξάρτημα αναγνώσεως της θερμοκρασίας, που περιλαμβάνει ένα δρομέα με ένα δείκτη και μία κλίμακα σχεδιασμένη για την ειδική ράβδο. Για τον προσδιορισμό ενός σημείου τήξεως, η ουσία τοποθετείται απευθείας στην επιφάνεια της θερμής ράβδου, σε λεπτή στιβάδα. Σε λίγα δευτερόλεπτα σχηματίζεται μία λεπτή διαχωριστική γραμμή μεταξύ του υγρού και της στερεάς φάσεως. Διαβάζεται η θερμοκρασία στη διαχωριστική γραμμή διά μετακινήσεως του δείκτη πάνω στη γραμμή αυτή.

1.4.2.2. Μικροσκόπιο τήξεως

Διάφορα μικροσκόπια θερμών επιφανειών χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό σημείων τήξεως με πολύ μικρές ποσότητες υλικού. Στις περισσότερες από τις θερμές επιφάνειες η θερμοκρασία μετριέται με ένα ευαίσθητο θερμοστοιχείο, καμιά φορά όμως χρησιμοποιούνται και υδραργυρικά θερμόμετρα. Μία τυπική συσκευή μικροσκοπίου θερμών επιφανειών για τον προσδιρισμό σημείου τήξεως αποτελείται από ένα θερμαινόμενο θάλαμο ο οποίος περιέχει μία μεταλλική πλάκα, πάνω στην οποία τοποθετείται το δείγμα πάνω σε ένα φορείο. Στο κέντρο της μεταλλικής πλάκας υπάρχει μία τρύπα, που επιτρέπει την είσοδο φωτός από τον καθρέφτη φωτισμού του μικροσκοπίου. Κατά τη χρήση, ο θάλαμος κλείνεται με μία γυάλινη πλάκα που κόβει τον αέρα από την περιοχή εργασίας.

Η θέρμανση του δείγματος ρυθμίζεται με ένα ρεοστάτη. Για πολύ ακριβείς μετρήσεις, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολωμένο φως για οπτικά ανισότροπες ουσίες.

1.4.2.3. Μέθοδος μηνίσκου

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ειδικά για πολυαμίδια. Ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας, κατά την οποία η μετατόπιση ενός μηνίσκου από έλαιο σιλικόνης, που βρίσκεται μεταξύ μιας θερμής επιφάνειας και μιας υάλου-καλυπτρίδας, τοποθετημένης πάνω στο εξεταζόμενο δείγμα πολυαμιδίου, γίνεται οπτικά.

1.4.3. *Μέθοδος προσδιορισμού του σημείου πήξεως*

Το δείγμα φέρεται σε έναν ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα και τροποθετείται σε μία συσκευή προσδιορισμού του σημείου κρυσταλλώσεως. Το δείγμα ανακινείται ελαφρά και συνεχώς κατά τη διάρκεια της ψύξεως και η θερμοκρασία διαβάζεται και καταγράφεται κάθε 30 δευτερόλεπτα. Όταν η θερμοκρασία παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια μερικών αναγνώσεων, αυτή η θερμοκρασία (διορθωμένη κατά το θερμομετρικό σφάλμα) καταγράφεται σαν σημείο κρυσταλλώσεως.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Το πεδίο εφαρμογής και η ακρίβεια των διαφόρων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του σημείου τήξεως/περιοχής τήξεως αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα.

ΠΙΝΑΚΑΣ: ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Α. Μέθοδοι τριχοειδούς

Μέθοδος μετρήσεως	Ουσίες που μπορούν να κονιοποιηθούν	Ουσίες που δεν κονιοποιούνται εύκολα	Περιοχή θερμοκρασίας	Μεγίστη ακρίβεια, κατά προσέγγιση (1)	Παρατηρήσεις
Συσκευές σημείου τήξεως με υγρό λουτρό	Ναι	Μόνο σε μερικές	273 K έως 573 K	± 0,3 K	Υπάρχον πρότυπο: JIS K 0064
Συσκευές σημείου τήξεως με μεταλλικό κορμό	Ναι	Μόνο σε μερικές	293 K έως 573 K	± 0,5 K	Υπάρχον πρότυπο: ISO 1218(E)
Ανίχνευση με φωτοκύτταρο	Ναι	Σε αρκετές με συσκευές εφαρμογής	253 K έως 573 K	± 0,1 K	

(1) Εξαρτώμενη από τον τύπο του οργάνου και από το βαθμό καθαρότητας της ουσίας.

Β. Μέθοδοι θερμών επιφανειών και πήξεως

Μέθοδος μετρήσεως	Ουσίες που μπορούν να κονιοποιηθούν	Ουσίες που δεν κονιοποιούνται εύκολα	Περιοχή θερμοκρασίας	Μεγίστη ακρίβεια, κατά προσέγγιση (1)	Παρατηρήσεις
Θερμή επιφάνεια Kofler	Ναι	Όχι	283 K έως 543 K	± 1,0 K	Υπάρχον πρότυπο: ANSI/ASTM D 3451-76
Μικροσκόπιο τήξεως	Ναι	Μόνο σε μερικές	273 K έως 573 K (μέχρι 1773 K)	± 0,2 K	Υπάρχον πρότυπο: DIN 53736
Μέθοδος μηνίσκου	Όχι	Ειδικά για πολυαμίδια	293 K έως 573 K	± 0,5 K	Υπάρχον πρότυπο: ISO 1218(E)
Μέθοδοι σημείου πήξεως	Για υγρές ουσίες	Για υγρές ουσίες	223 K έως 573 K	± 0,5 K	Υπάρχον πρότυπο: BS 4699

(1) Εξαρτώμενη από τον τύπο του οργάνου και από το βαθμό καθαρότητας της ουσίας.

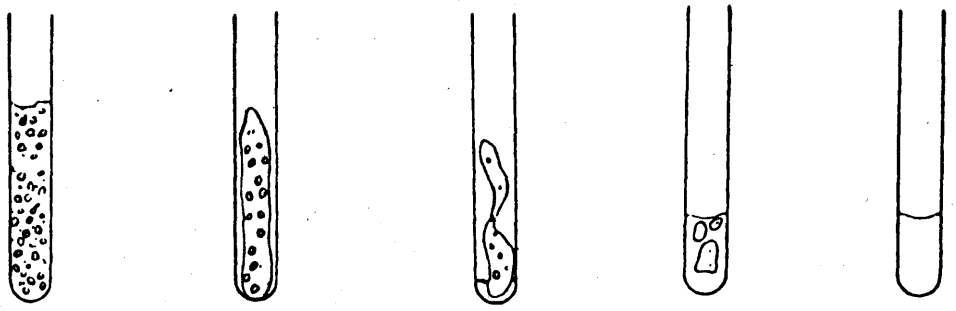
1.6. **Περιγραφή των μεθόδων**

Η τεχνική σχεδόν όλων των μεθόδων ελέγχου περιγράφεται σε εθνικά και διεθνή πρότυπα (βλέπε προσάρτημα).

1.6.1. *Μέθοδοι με δοκιμαστικό σωλήνα*

Λεπτά κονιοποιημένες ουσίες συνήθως παρουσιάζουν τις φάσεις τήξεως που εικονίζονται στο σχήμα 1 κατά τη διάρκεια ελαφράς ανόδου της θερμοκρασίας.

Σχήμα 1



Φάση Α (αρχή τήξεως, υγρό σημείο): Λεπτά σταγονίδια προσκολλώνται ομοιόμορφα στα εσωτερικά τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα.

Φάση Β (σημείο συστολής): Παρατηρείται διαύγαση μεταξύ του δείγματος και των εσωτερικών τοιχωμάτων λόγω συστολής του δείγματος.

Φάση Γ (σημείο καταρρεύσεως): Το συσταλέν δείγμα αρχίζει να καταρρέει και να υγροποιείται.

Φάση Δ (σημείο υγροποιήσεως): Σχηματίζεται πλήρης μηνίσκος στην επιφάνεια, αλλά σημαντική ποσότητα του δείγματος παραμένει στερεά.

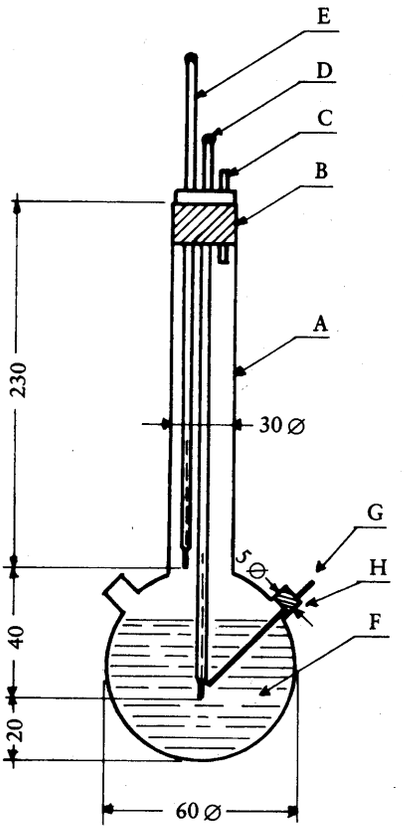
Φάση Ε (τελική φάση τήξεως): Δεν υπάρχουν στερεά σωματίδια.

Κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού του σημείου τήξεως, η θερμοκρασία καταγράφεται στην αρχή της τήξεως και στην τελική φάση.

1.6.1.1. Όργανα σημείου τήξεως με συσκευή υγρού λουτρού

Το σχήμα 2 δείχνει έναν τύπο πρότυπης συσκευής σημείου τήξεως (JIS K 0064), κατασκευασμένης από γυαλί, όλες οι προδιαγραφές σε mm.

Σχήμα 2



A: Δοχείο μετρήσεως.
B: Πώμα.
C: Αερισμός.
D: Θερμόμετρο.
E: Βοηθητικό θερμόμετρο.
F: Υγρό λουτρό.
G: Τριχοειδής σωλήνας κατασκευασμένος από γυαλί· 80 mm έως 100 mm μήκος· 1,0 mm ± 0,2 mm εσωτερική διάμετρος· 0,2 mm έως 0,3 mm πάχος πυθμένα.
H: Πλευρικός σωλήνας.

Υγρό λουτρό:

Πρέπει να επιλεγεί το κατάλληλο υγρό, εκ των κάτω, εξαρτώμενο από το σημείο τήξεως. Υγρή παραφίνη για σημεία τήξεως όχι ψηλότερα από 473 K, πυκνό θειικό οξύ ή έλαιο σιλικόνης για σημεία τήξεως όχι ψηλότερα από 573 K.

Για σημεία τήξεως πάνω από 523 K μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα μείγμα αποτελούμενο από 3 μέρη θειικού οξέος και 2 μέρη θειικού καλίου (σε κλάσμα βάρους).

Θερμόμετρο:

Πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο τα θερμόμετρα που είναι σύμφωνα με τις απαιτήσεις του ακόλουθου ή ισοδύναμων προτύπων: ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Πορεία:

Η ξηρά ουσία κονιοποιείται σε λεπτή μορφή σε γουδί και φέρεται στον τριχοειδή σωλήνα, συντετηγμένο στη μία άκρη, έτσι ώστε το ύψος της στάθμης της να είναι περίπου 3 mm μετά από καλή συμπίεση. Για να ληφθεί ένα δείγμα με ομοιόμορφη συμπίεση, ο τριχοειδής σωλήνας πρέπει να πέφτει από ένα ύψος περίπου 700 mm, μέσα σε έναν κατακόρυφο γυάλινο σωλήνα, πάνω σε μία ύαλο ωρολογίου.

Οι γεμάτοι τροχοειδείς σωλήνες φέρονται στο λουτρό έτσι ώστε το μεσαίο τμήμα της λεκάνης υδραργύρου του θερμόμετρου να ακουμπά τον τριχοειδή σωλήνα στο τμήμα του που βρίσκεται το δείγμα. Συνήθως ο τριχοειδής σωλήνας εισάγεται στη συσκευή σε 10 K περίπου κάτω του σημείου τήξεως.

Το υγρό λουτρό θερμαίνεται έτσι ώστε η ανύψωση της θερμοκρασίας να είναι περίπου 3 K/min. Το υγρό πρέπει να αναδεύεται. Σε 10 K περίπου κάτω της αναμενόμενης θερμοκρασίας τήξεως, η ταχύτητα ανυψώσεως της θερμοκρασίας ρυθμίζεται κατά μέγιστο σε 1 K/min.

Υπολογισμός:

Ο υπολογισμός του σημείου τήξεως γίνεται ως ακολούθως:

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

όπου:

T = διορθωμένη θερμοκρασία τήξεως σε K,

T_D = ένδειξη θερμοκρασίας θερμομέτρου D σε K,

T_E = ένδειξη θερμοκρασίας θερμομέτρου E σε K,

n = αριθμός διαιρέσεων της υδραργυρικής στήλης του θερμομέτρου D με την εμβαπτισμένη λεκάνη.

1.6.1.2. Μεταλλικός κορμός

Συσκευή

Η συσκευή αποτελείται από:

— έναν κυλινδρικό μεταλλικό κορμό, το πάνω μέρος του οποίου είναι κοίλο και σχηματίζει ένα θάλαμο (βλέπε σχήμα 3),

— ένα μεταλλικό βύσμα, με δύο ή περισσότερες τρύπες, που επιτρέπουν να εισαχθούν σωλήνες μέσα στο μεταλλικό κορμό,

— ένα σύστημα θερμάνσεως του μεταλλικού κορμού, που επιτυγχάνεται π.χ. με μία ηλεκτρική αντίσταση ενσωματωμένη στον κορμό,

— ένα ρεοστάτη για ρύθμιση της ισχύος, αν χρησιμοποιείται ηλεκτρική θέρμανση,

— τέσσερα παράθυρα από γυαλί ανθεκτικό στη θερμότητα πάνω στα όρθια τοιχώματα του θαλάμου, διαμετρικά τοποθετημένα σε ορθή γωνία μεταξύ τους. Εμπρός από το ένα από τα παράθυρα αυτά είναι στερεωμένος ένας προσοφθάλμιος φακός για παρατήρηση του τριχοειδή σωλήνα. Τα άλλα τρία παράθυρα χρησιμεύουν για φωτισμό του εσωτερικού της διατάξεως με λάμπες,

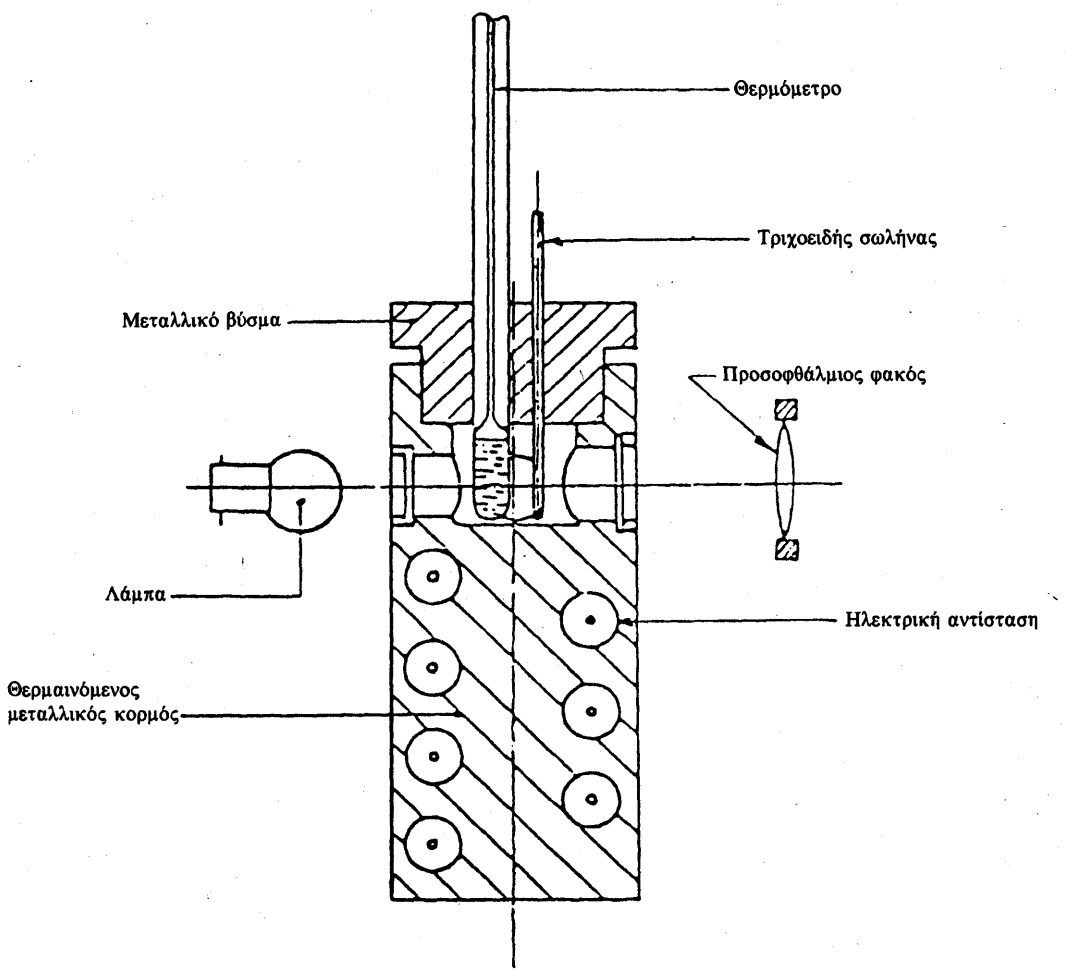
— έναν τριχοειδή σωλήνα από γυαλί ανθεκτικό στη θερμότητα, κλειστό στη μία άκρη (βλέπε σημείο 1.6.1.1).

Θερμόμετρο:

Βλέπε πρότυπα στο σημείο 1.6.1.1.

Μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν θερμοηλεκτρικά όργανα με παρεμφερή ακρίβεια.

Σχήμα 3



Πορεία:

Βλέπε σημείο 1.6.1.1. Στην περίπτωση αυτή δεν γίνεται διόρθωση θερμοκρασίας. Η μετρηθείσα θερμοκρασία δείχνει το σημείο τήξεως.

1.6.1.3. Ανίχνευση με φωτοκύτταρο

Συσκευή και πορεία:

Η συσκευή αποτελείται από ένα μεταλλικό θάλαμο με αυτόματο σύστημα θερμάνσεως. Τρεις τριχοειδείς σωλήνες γεμίζονται σύμφωνα με το σημείο 1.6.1.1 και φέρονται στον κλίβανο.

Πέντε γραμμικές αυξήσεις της θερμοκρασίας απαιτούνται για τη βαθμονόμηση της συσκευής και η κατάλληλη ανύψωση της θερμοκρασίας ρυθμίζεται ηλεκτρικά με υπολογισμένη εκ των προτέρων σταθερή και γραμμική ταχύτητα. Καταγραφείς δείχνουν την πραγματική θερμοκρασία του κλιβάνου και το σημείο τήξεως της ουσίας στους τριχοειδείς σωλήνες.

1.6.2. *Θερμές επιφάνειες*

1.6.2.1. Θερμή επιφάνεια Kofler

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.2.2. Μικροσκόπιο τήξεως

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.2.3. Μέθοδος μηνίσκου (πολυαμίδια)

Βλέπε προσάρτημα.

Η ταχύτητα θερμάνσεως κατά τη διάρκεια προσδιορισμού του σημείου τήξεως πρέπει να είναι μικρότερη από 1 K/min.

1.6.3. *Μέθοδοι προσδιορισμών του σημείου πήξεως*

Βλέπε προσάρτημα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Σε μερικές περιπτώσεις είναι αναγκαία μια θερμομετρική διόρθωση.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Πρέπει να δηλώνεται η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος.

Το δηλούμενο σημείο τήξεως είναι ο μέσος όρος τουλάχιστον δύο μετρήσεων, που βρίσκονται μέσα στην περιοχή της κατά προσέγγιση ακρίβειας (βλέπε πίνακα). Πρέπει να δηλώνεται μία εκτίμηση της ακρίβειας. Εάν η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ της αρχικής και τελικής φάσεως της τήξεως βρίσκεται μέσα στα όρια ακριβείας της μεθόδου, σαν σημείο τήξεως λαμβάνεται η θερμοκρασία της τελικής φάσεως της τήξεως, διαφορετικά δηλώνονται και οι δύο θερμοκρασίες.

Μερικές ουσίες διασπώνται ή εξαχνώνονται πριν από το σημείο τήξεως. Στις περιπτώσεις αυτές, αυτό πρέπει να δηλώνεται.

Πρέπει να δηλώνονται όλες οι πληροφορίες και οι παρατηρήσεις που είναι σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ειδικότερα όσες είναι σχετικές με τις ξένες προσμείξεις και με τη φυσική κατάσταση της ουσίας.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(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, pp. 505—515.

Προσάρτημα

Τα ακόλουθα πρότυπα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πρόσθετες τεχνικές λεπτομέρειες.

1.	**Μέθοδοι τριχοειδούς**	
1.1.	*Συσκευές σημείου τήξεως με υγρό λουτρό*	
	ASTM E 324-69	Standard Test Method for Relative Initial and Final Melting Points and the Melting Range of Organic Chemicals
	BS 4634	Method for the Determination of Melting Point and/or Melting Range
	DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
	JIS K 0064	Testing Methods for Melting Point of Chemical Products
1.2.	*Συσκευές σημείου τήξεως με μεταλλικό κορμό*	
	DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
	ISO 1218 (E)	Plastics — Polyamides — Determination of «Melting Point»
2.	**Θερμές επιφάνειες**	
2.1.	*Θερμή επιφάνεια Kofler*	
	ANSI/ASTM D 3451-76	Standard Recommended Practices for Testing Polymeric Powder Coatings
2.2.	*Μικροσκόπιο τήξεως*	
	DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
2.3.	*Μέθοδος μηνίσκου (πολυαμίδια)*	
	ISO 1218 (E)	Plastics — Polyamides — Determination of «Melting Point»
	ANSI/ASTM D 2133-66	Standard Specification for Acetal Resin Injection Moulding and Extrusion Materials
	NF T 51-050	Résines du Polyamides-Determination du «point de fusion» Méthode du ménisque
3.	**Μέθοδοι προσδιορισμού σημείου πήξεως**	
	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

Α. 2. ΣΗΜΕΙΟ ΖΕΣΕΩΣ/ΠΕΡΙΟΧΗ ΖΕΣΕΩΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Οι μέθοδοι που περιγράφονται βασίζονται στην κατευθυντήρια δοκιμασία του ΟΟΣΑ (1).

1.1. **Εισαγωγή**

Οι μέθοδοι και τα όργανα που περιγράφονται εδώ εφαρμόζονται σε υγρές ουσίες, εφόσον αυτές δεν υφίστανται χημικές αντιδράσεις κάτω του σημείου ζέσεως (π.χ. αυτο-οξείδωση, ανακατανομή των ατόμων στο μόριο, διάσπαση κλπ.). Οι μέθοδοι εφαρμόζονται σε καθαρές και σε μη καθαρές υγρές ουσίες.

Έμφαση δίνεται στη μέθοδο που χρησιμοποιεί ανίχνευση με φωτοκύτταρο, διότι επιτρέπει τον προσδιορισμό του σημείου τήξεως, καθώς επίσης και του σημείου ζέσεως. Επιπλέον, οι μετρήσεις γίνονται αυτόματα.

Η «δυναμική μέθοδος» παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μπορεί επίσης να εφαρμοστεί και για τον προσδιορισμό της τάσεως ατμών και ότι δεν είναι ανάγκη να γίνεται διόρθωση της θερμοκρασίας ζέσεως σε κανονική πίεση (101,325 kPa), διότι η κανονική πίεση μπορεί να ρυθμισθεί κατά τη διάρκεια της μετρήσεως. Η μέθοδος όμως αυτή δεν έχει ακόμη αυτοματοποιηθεί.

Παρατηρήσεις

Η επίδραση ξένων προσμείξεων στον προσδιορισμό του σημείου ζέσεως εξαρτάται πολύ από τη φύση της προσμείξεως. Η επίδραση μπορεί να είναι σημαντική, αν στο δείγμα υπάρχει ένας λίαν πτητικός διαλύτης.

Η σύνθεση του ερευνώμενου δείγματος αλλάζει από μέτρηση σε μέτρηση λόγω εξατμίσεως συστατικών με χαμηλό σημείο ζέσεως. Στις περιπτώσεις αυτές λαμβάνονται συνεχώς αυξανόμενες τιμές.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Σαν κανονική θερμοκρασία ζέσεως ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία η πίεση του κεκορεσμένου ατμού ενός υγρού είναι ίση με την κανονική πίεση.

Το μετρούμενο σημείο ζέσεως εξαρτάται από την ατμοσφαιρική πίεση. Η εξάρτηση αυτή περιγράφεται ποσοτικά από την εξίσωση των Clausius —Clapeyron ως ακολούθως:

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

όπου:

p = η τάση ατμών της ουσίας σε Pascals,

ΔH_v = η θερμότητα εξατμίσεως σε J mol^{-1},

R = η παγκόσμια μοριακή σταθερότητα την αερίων = 8,31 J mol^{-1} K^{-1},

T = η θερμοκρασία η οποία εκφράζεται σε K.

Η θερμοκρασία στο σημείο ζέσεως (θερμοκρασία ζέσεως) δηλώνεται σε σχέση με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια της μετρήσεως.

Μετατροπή μονάδων:

Πίεση (μονάδες: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa (η χρήση της μονάδας «bar» εξακολουθεί να επιτρέπεται αλλά δε συνιστάται)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr (η χρήση των μονάδων «mm Hg» και «Torr» δεν επιτρέπεται).

Θερμοκρασία (μονάδες: K).

$t = T - 273{,}15$

όπου t εκφράζεται σε °C και T σε K.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις που ερευνάται μια νέα ουσία. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως για τον έλεγχο της μεθόδου κατά διαστήματα, και για να επιτρέπουν σύγκριση αποτελεσμάτων.

Μερικές ουσίες ελέγχου της μεθόδου αναφέρονται στις μεθόδους του προσαρτήματος.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Όλες οι μέθοδοι προσδιορισμού του σημείου ζέσεως (περιοχής ζέσεως) βασίζονται στη μέτρηση της θερμοκρασίας ζέσεως. Περιγράφονται πέντε μέθοδοι.

1.4.1. *Προσδιορισμός με χρήση ζεσεόμετρου (ebulliometer)*

Τα ζεσεόμετρα αναπτύχθηκαν αρχικά για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους με τη μέθοδο της ανυψώσεως του σημείου ζέσεως, είναι όμως κατάλληλα για ακριβείς μετρήσεις του σημείου ζέσεως. Μια πολύ απλή συσκευή περιγράφεται στο ASTM D 1120-72 (βλέπε προσάρτημα). Το υγρό θερμαίνεται στη συσκευή αυτή, υπό συνθήκες ισορροπίας, στην ατμοσφαιρική πίεση, μέχρι βρασμού.

1.4.2. *Δυναμική μέθοδος*

Η μέθοδος στηρίζεται στη μέτρηση της θερμοκρασίας επανασυμπυκνώσεως των ατμών με ένα θερμοστοιχείο στην επαναρροή κατά το βρασμό. Σ' αυτή τη μέθοδο η πίεση μπορεί να μεταβάλλεται.

1.4.3. *Μέθοδος αποστάξεως για σημείο ζέσεως και περιοχή ζέσεως*

Η μέθοδος στηρίζεται στην απόσταξη του υγρού, στη μέτρηση της θερμοκρασίας επανασυμπυκνώσεως των ατμών και στον προσδιορισμό του ποσού του αποστάγματος.

1.4.4. *Μέθοδος κατά Siwoloboff*

Ένα δείγμα θερμαίνεται μέσα σε ένα σωλήνα δείγματος, που είναι εμβαπτισμένος σε ένα υγρό, σε ένα θερμόλουτρο. Ένα συντετηγμένο τριχοειδές, που περιέχει στο κατώτατο άκρο μια φυσαλλίδα αέρα, τοποθετείται μέσα στο σωλήνα δείγματος.

Προσδιορίζεται η θερμοκρασία στην οποία μια κανονική αλυσίδα από φυσαλλίδες βγαίνει από το τριχοειδές ή η θερμοκρασία στην οποία, σε στιγμιαία ψύξη, η αλυσίδα των φυσαλλίδων σταματάει και το υγρό αρχίζει να ανεβαίνει στο τριχοειδές (Siwoloboff).

1.4.5. *Ανίχνευση με φωτοκύτταρο*

Ακολουθώντας την αρχή κατά Siwoloboff, εφαρμόζεται αυτόματη φωτοηλεκτρική μέτρηση που χρησιμοποιεί τις ανερχόμενες φυσαλλίδες.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Το πεδίο εφαρμογής και η ακρίβεια των διαφόρων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του σημείου ζέσεως/περιοχής ζέσεως αναφέρονται στον πίνακα 1.

1.6. **Περιγραφή των μεθόδων**

Η πειραματική διαδικασία μερικών από τις μεθόδους ελέγχου περιγράφεται σε διεθνή και εθνικά πρότυπα (βλέπε προσάρτημα).

1.6.1. *Ζεσεόμετρο*

Βλέπε προσάρτημα.

1.6.2. *Δυναμική μέθοδος*

Βλέπε μέθοδο ελέγχου στο σημείο Α.4 για τον προσδιορισμό της τάσεως ατμών. Καταγράφεται η θερμοκρασία ζέσεως που παρατηρείται με εφαρμογή πιέσεως 101,325 kPa.

1.6.3. *Μέθοδος αποστάξεως (περιοχή ζέσεως)*

Βλέπε προσάρτημα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Μέθοδος μετρήσεως	Ακρίβεια, κατά προσέγγιση	Παρατηρήσεις
Ζεσεόμετρο	± 1,4 K (μέχρι 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (άνω των 373 K) (1) (2)	Υπάρχον πρότυπο: ASTM D 1120-72 (1)
Δυναμική μέθοδος	± 0,5 K (2)	
Μέθοδος αποστάξεως (περιοχή ζέσεως)	± 0,5 K	Υπάρχον πρότυπο: ISO/R 918 DIN 53171 BS 4591/71
Κατά Siwoloboff	± 1 K μέχρι ± 2 K (2)	
Ανίχνευση με φωτοκύτταρο	± 0,3 K (στους 373 K) (2)	

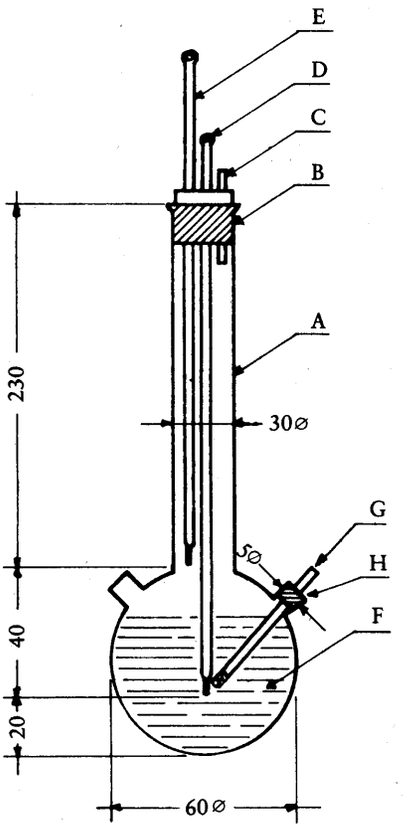
(1) Η ακρίβεια αυτή ισχύει μόνο για απλές συσκευές, π.χ. όπως περιγράφονται στο πρότυπο ASTM D 1120-72· μπορεί να βελτιωθεί με πιο μελετημένες συσκευές ζεσεομέτρων.
(2) Ισχύει μόνο για καθαρές ουσίες.

1.6.4. *Μέθοδος κατά Siwoloboff*

Το δείγμα θερμαίνεται σε μια συσκευή σημείου τήξεως, σε ένα σωλήνα δείγματος, διαμέτρου περίπου 5 mm (βλέπε σχήμα 1).

Το σχήμα 1 δείχνει έναν τύπο πρότυπης συσκευής σημείου τήξεως και σημείου ζέσεως (JIS K 0064) (κατασκευασμένης από γυαλί, όλες οι προδιαγραφές σε mm).

Σχήμα 1

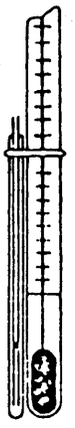


A: Σωλήνας μετρήσεως.
B: Πώμα.
C: Αερισμός.
D: Θερμόμετρο.
E: Βοηθητικό θερμόμετρο.
F: Υγρό λουτρό.
G: Σωλήνας δείγματος· εξωτερική διάμετρος περίπου 5 mm· τριχοειδής σωλήνας, περίπου 100 mm μήκος και περίπου 1 mm εσωτερική διάμετρος και περίπου 0,2 μέχρι 0,3 mm πάχος τοιχώματος.
H: Πλευρικός σωλήνας.

Ένας τριχοειδής σωλήνας (τριχοειδές ζέσεως), συντετηγμένος περίπου 1 cm πάνω από το κατώτατο σημείο του, φέρεται μέσα στο σωλήνα δείγματος. Το επίπεδο μέχρι του οποίου προστίθεται η ελεγχόμενη ουσία είναι τέτοιο ώστε η συντετηγμένη τομή του τριχοειδούς να είναι κάτω από την επιφάνεια του υγρού. Ο σωλήνας δείγματος που περιέχει το τριχοειδές ζέσεως στερεώνεται είτε πάνω στο θερμόμετρο με έναν ελαστικό σύνδεσμο είτε σε ένα πλευρικό υποστήριγμα (βλέπε σχήμα 2).

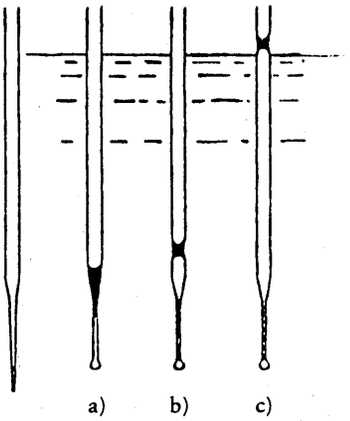
Σχήμα 2

Αρχή κατά Siwoloboff



Σχήμα 3

Τροποποιημένη αρχή



Το υγρό λουτρό επιλέγεται σύμφωνα με τη θερμοκρασία ζέσεως. Για θερμοκρασίες μέχρι 573 K μπορεί να χρησιμοποιηθεί θειικό οξύ ή έλαιο σιλικόνης. Υγρή παραφίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μέχρι 473 K. Η θέρμανση του υγρού λουτρού πρέπει να ρυθμισθεί με μια άνοδο θερμοκρασίας 3 K/min στην αρχή. Το υγρό λουτρό πρέπει να αναδεύεται. Περίπου 10 K κάτω από το αναμενόμενο σημείο ζέσεως, η θέρμανση ελαττώνεται τόσο ώστε η άνοδος θερμοκρασίας να είναι μικρότερη από 1 K/min. Όταν πλησιάζει η θερμοκρασία ζέσεως αρχίζουν να βγαίνουν φυσαλλίδες από το τριχοειδές ζέσεως.

Το σημείο ζέσεως είναι το σημείο εκείνο όταν, σε στιγμιαία ψύξη, σταματάει η αλυσίδα των φυσαλλίδων και ξαφνικά αρχίζει να ανεβαίνει υγρό στο τριχοειδές. Η αντίστοιχη ένδειξη του θερμόμετρου είναι η θερμοκρασία ζέσεως της ουσίας.

Στην τροποποιημένη αρχή (σχήμα 3) το σημείο ζέσεως προσδιορίζεται σε ένα τριχοειδές σημείου τήξεως. Το τριχοειδές αυτό εκτείνεται σε λεπτό τμήμα μήκους περίπου 2 cm (a) και ροφάται σ' αυτό μικρή ποσότητα του δείγματος. Η ανοικτή άκρη του λεπτού τμήματος κλείνεται διά συντήξεως, έτσι ώστε μια μικρή φυσαλλίδα αέρα εγκλωβίζεται στο άκρο. Κατά τη θέρμανση της συσκευής του σημείου τήξεως (b), η φυσαλλίδα του αέρα διαστέλλεται. Το σημείο ζέσεως αντιστοιχεί στη θερμοκρασία στην οποία το βύσμα της ουσίας ανέρχεται στο επίπεδο της επιφάνειας του υγρού λουτρού (c).

1.6.5. *Ανίχνευση με φωτοκύτταρο*

Το δείγμα θερμαίνεται σε έναν τριχοειδή σωλήνα στο εσωτερικό ενός μεταλλικού κορμού.

Μια δέσμη φωτός κατευθύνεται διά μέσου καταλλήλων οπών στον κορμό, μέσω της ουσίας, σ' ένα φωτοκύτταρο βαθμονομημένο με ακρίβεια. Κατά τη διάρκεια της αυξήσεως της θερμοκρασίας του δείγματος, μεμονωμένες φυσαλλίδες αέρα βγαίνουν από το τριχοειδές ζέσεως. Όταν η θερμοκρασία φθάσει τη θερμοκρασία ζέσεως, αυξάνει ο αριθμός των φυσαλλίδων και η έκλυσή τους είναι συνεχής. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μία αλλαγή στην ένταση του φωτός, που παρακολουθείται από ένα φωτοκύτταρο και δίνει ένα σήμα στοπ στο δείκτη αναγνώσεως της θερμοκρασίας ενός θερμομέτρου, με αντίσταση από λευκόχρυσο, τοποθετημένου στον κορμό.

Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, διότι επιτρέπει προσδιορισμούς σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από τη θερμοκρασία δωματίου, μέχρι 253,15 K (– 20 °C) χωρίς μετατροπές στη συσκευή. Απλώς, η συσκευή τοποθετείται σε ένα ψυχρό δωμάτιο ή ψυκτικό λουτρό. Η ακριβής εκτέλεση του προσδιορισμού του σημείου ζέσεως γίνεται ακολουθώντας τις οδηγίες της συσκευής.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Για μικρές αποκλίσεις από την κανονική πίεση (μέγιστο ± 5 kPa), οι θερμοκρασίες του σημείου ζέσεως ανάγονται στις κανονικές μέσες τιμές T_n διά χρησιμοποιήσεως της ακόλουθης εξισώσεως αριθμού-τιμών του Sidney Young:

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

όπου:

Δp = (101,325 — p) σημείωση συμβόλου,

p = μέτρηση πιέσεως, σε kPa,

f_T = ταχύτητα μεταβολής του σημείου ζέσεως με την πίεση, σε K/kPa,

T = μετρηθείσα θερμοκρασία ζέσεως, σε K,

T_n = θερμοκρασία ζέσεως διορθωμένη σε κανονική πίεση, σε K.

Οι συντελεστές διορθώσεως της θερμοκρασίας f_T και οι εξισώσεις για τις προσεγγίσεις τους συμπεριλαμβάνονται στα διεθνή και εθνικά πρότυπα που προαναφέρθηκαν για πολλές ουσίες.

Η μέθοδος DIN 53171, π.χ., μνημονεύει τις ακόλουθες κατά προσέγγιση διορθώσεις για διαλύτες που περιλαμβάνονται στα χρώματα:

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΕΣ ΔΙΟΡΘΩΣΕΩΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ (f_T)

Θερμοκρασία T σε K	Συντελεστής διορθώσεως f_T σε k/Pa
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. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Πρέπει να δηλώνεται η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος. Το αναφερόμενο σημείο ζέσεως είναι η μέση τιμή τουλάχιστον δύο μετρήσεων, οι οποίες βρίσκονται στην περιοχή της κατά προσέγγιση ακρίβειας, που αναφέρεται στον πίνακα 1. Εάν οι προσδιορισμοί δεν είναι αναπαραγώγιμοι, πρέπει να εφαρμοστούν άλλες μέθοδοι.

Τα μετρηθέντα σημεία ζέσεως και η μέση τιμή τους πρέπει να δηλώνονται και η πίεση (πιέσεις) στις οποίες έγιναν οι μετρήσεις πρέπει να αναφέρονται σε kPa.

Η πίεση πρέπει να είναι κατά προτίμηση κοντά στην κανονική πίεση. Αν μια ελεγχόμενη ουσία βράζει σε περιοχή ζέσεως, αυτή η περιοχή πρέπει να υποδεικνύεται. Πρέπει να αναφέρονται εκτιμήσεις της ακρίβειας όλων των αποτελεσμάτων.

Πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ειδικά σε ό,τι αναφέρεται στις ξένες προσμείξεις και στη φυσική κατάσταση της ουσίας.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

Προσάρτημα

Τα ακόλουθα πρότυπα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πρόσθετες τεχνικές λεπτομέρειες:

1. **Ζεσεοσκόπιο**

ASTM D 1120-72	Standard Test Method for Boiling Point of Engine Anti-freezes

2. **Μέθοδος αποστάξεως (περιοχή ζέσεως)**

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

Α. 3. ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Οι μέθοδοι που περιγράφονται βασίζονται στην κατευθυντήρια δοκιμασία του ΟΟΣΑ (1).

1.1. **Εισαγωγή**

Οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό της σχετικής πυκνότητας που περιγράφονται εδώ εφαρμόζονται σε στερεές και υγρές ουσίες, χωρίς οποιονδήποτε περιορισμό σχετικά με το βαθμό καθαρότητάς τους. Οι διάφορες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται αναφέρονται στον πίνακα 1.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Η σχετική πυκνότητα (D_4^{20}) στερεών ή υγρών είναι ο λόγος της μάζας ενός όγκου της ουσίας που εξετάζεται, προσδιορισμένου στους 20 °C, προς τη μάζα ίσου όγκου ύδατος, προσδιορισμένου στους 4 °C. Η σχετική πυκνότητα δεν έχει διαστάσεις.

Η πυκνότητα (ρ) μιας ουσίας είναι το πηλίκον της μάζας της m προς τον όγκο της v.

Η πυκνότητα εκφράζεται σε μονάδες S.I., σε kg/m^3.

1.3. **Ουσίες αναφοράς** (1) (2)

Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις που ερευνάται μια νέα ουσία. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως για τον έλεγχο της μεθόδου κατά διαστήματα, και για να επιτρέπουν σύγκριση αποτελεσμάτων.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Χρησιμοποιούνται τέσσερις μέθοδοι.

1.4.1. *Μέθοδοι ανώσεως*

1.4.1.1. Υδρόμετρο (για υγρές ουσίες)

Ικανοποιητική ακρίβεια και γρήγοροι προσδιορισμοί της πυκνότητας επιτυγχάνονται με τα επιπλέοντα υδρόμετρα, τα οποία επιτρέπουν την εκτίμηση της πυκνότητας ενός υγρού από το βάθος που βυθίζονται και με ανάγνωση σε βαθμολογημένη κλίμακα.

1.4.1.2. Υδροστατικός ζυγός (για υγρές και στερεές ουσίες)

Η διαφορά μεταξύ του βάρους ενός ελεγχόμενου δείγματος, μετρούμενου στον αέρα και στο νερό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της πυκνότητάς του. Για στερεά, η μετρούμενη πυκνότητα είναι μόνο αντιπροσωπευτική του συγκεκριμένου δείγματος που χρησιμοποιείται. για τον προσδιορισμό της πυκνότητας υγρών, ένα σώμα γνωστού όγκου v ζυγίζεται πρώτα στον αέρα και μετά στο υγρό.

1.4.1.3. Μέθοδος βυθιζόμενης σφαίρας (για υγρές ουσίες) (3)

Με τη μέθοδο αυτή, η πυκνότητα ενός υγρού προσδιορίζεται από τη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων του ζυγίσματος του υγρού πριν και μετά το βάπτισμα μιας σφαίρας γνωστού όγκου στο ελεγχόμενο υγρό.

1.4.2. *Μέθοδοι πυκνομέτρου*

Για στερεά ή υγρά μπορούν να χρησιμοποιηθούν πυκνόμετρα διαφόρων σχημάτων με γνωστούς όγκους. Η πυκνότητα υπολογίζεται από τη διαφορά βάρους του γεμάτου και του άδειου πυκνόμετρου και από το γνωστό όγκο του.

1.4.3. *Συγκριτικά πυκνόμετρα αέρα* (για στερεά)

Η πυκνότητα ενός στερεού, οποιασδήποτε μορφής, μπορεί να μετρηθεί στη θερμοκρασία του δωματίου με το συγκριτικό πυκνόμετρο αέρα. Ο όγκος μιας ουσίας μετριέται στον αέρα, ή σε ένα αδρανές αέριο, σε έναν κύλινδρο μεταβλητού βαθμονομημένου όγκου. Για τον υπολογισμό της πυκνότητας γίνεται μια μέτρηση μάζας, αφού πρώτα γίνει η μέτρηση του όγκου.

1.4.4. *Πυκνόμετρο ταλαντώσεως* (4) (5) (6)

Η πυκνότητα ενός υγρού μπορεί να μετρηθεί με ένα πυκνόμετρο ταλαντώσεως. Ένας μηχανικός ταλαντωτής, σε σχήμα U-σωλήνα, δονείται με μια ειδική συχνότητα, που εξαρτάται από τη μάζα του ταλαντωτή. Η εισαγωγή ενός δείγματος αλλάζει τη συχνότητα συντονισμού του ταλαντωτή. Η συσκευή πρέπει να βαθμονομηθεί με δύο υγρές ουσίες που έχουν γνωστές πυκνότητες. Αυτές οι ουσίες επιλέγονται κατά προτίμηση έτσι ώστε οι πυκνότητές τους να καλύπτουν την περιοχή που πρόκειται να μετρηθεί.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Το πεδίο εφαρμογής των διαφόρων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της σχετικής πυκνότητας αναφέρεται στον πίνακα.

Η ακρίβεια που περιλαμβάνεται στο πρότυπο του ISO αναφέρεται μόνο σε καθαρές ουσίες.

1.6. **Περιγραφή των μεθόδων**

Τα πρότυπα που δίνονται σαν παραδείγματα, και που πρέπει να χρησιμοποιούνται για πρόσθετες τεχνικές λεπτομέρειες, αναφέρονται στο προσάρτημα.

Οι έλεγχοι πρέπει να εκτελούνται στους 20 °C με διεξαγωγή τουλάχιστον δύο μετρήσεων.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Βλέπε πρότυπα.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Η χρησιμοποιούμενη μέθοδος/πρότυπο πρέπει να αναφέρεται.

Η σχετική πυκνότητα D_4^{20} πρέπει να αναφέρεται, όπως ορίζεται στο σημείο 1.2, μαζί με τη φυσική κατάσταση της μετρούμενης ουσίας.

Πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ειδικά σε ό,τι αναφέρεται στις ξένες προσμείξεις και στη φυσική κατάσταση της ουσίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ: ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Μέθοδος μετρήσεως		Πυκνότητα		Μέγιστο δυνατό δυναμικό ιξώδες	Παρατηρήσεις
		στερεά	υγρά		
1.4.1.1.	Υδρόμετρο		×	5 Pa s	ISO 387 ISO/R 649
1.4.1.2.	Υδροστατικός ζυγός: α) στερεά	×			ISO/R 1185 (A) ISO/R 91 και R 758
	β) υγρά		×	5 Pa s	
1.4.1.3.	Μέθοδος βυθιζόμενης σφαίρας		×	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2.	Πυκνόμετρο: α) στερεά β) υγρά	× 	 ×	 500 Pa s	ISO/R 3507 ISO/R 1183 (B) ISO/R 758
1.4.3.	Συγκριτικό πυκνόμετρο αέρα	×			DIN 55990 — Teil 3 DIN 53243
1.4.4.	Πυκνόμετρο ταλαντώσεως		×	5 Pa s	

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(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. — In: 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, pp. 427—430.

(4) Leopold H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, Vol. 19, 1970, pp. 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, pp. 717—726.

(6) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium. Brauwissenschaft, Vol. 9, 1976, pp. 253—255.

Προσάρτημα

Τα ακόλουθα πρότυπα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πρόσθετες τεχνικές πληροφορίες:

1. Μέθοδοι ανώσεως

1.1. *Υδρόμετρο*

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. *Υδροστατικός ζυγός*

Για στερεές ουσίες:

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

Για υγρές ουσίες:

ISO R 91	ISO R 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density

ASTM D 941 — 55, ASTM D 1296 — 67 και ASTM D 1481 — 62

ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. *Μέθοδος βυθιζόμενης σφαίρας*

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer (Enlargement for immersed ball method to be published in 1981)

2. Μέθοδοι πυκνομέτρου

2.1. *Για υγρές ουσίες*

ISO 3507	Pycnometers
ISO/R 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} m^2 s^{-1}$ at 15 °C)

DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} m^2 s^{-1}$ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)
DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have a too high vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol-water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber Products-Chemical Analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method

2.2. *Για στερεές ουσίες*

ISO/R 1183	Method B. Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **Συγκριτικό πυκνόμετρο αέρα**

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

Α. 4. ΤΑΣΗ ΑΤΜΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Οι μέθοδοι που περιγράφονται βασίζονται στην κατευθυντήρια δοκιμασία του ΟΟΣΑ (1).

1.1. Εισαγωγή

Είναι χρήσιμο, για την εκτέλεση του ελέγχου αυτού, να έχουμε προκαταρκτικές πληροφορίες για τη δομή, το σημείο τήξεως και το σημείο ζέσεως της ουσίας.

Δεν υπάρχει απλή πειραματική διαδικασία μετρήσεως εφαρμόσιμη σε όλη την περιοχή των τάσεων ατμών. Συνεπώς, αρκετές μέθοδοι συνιστώνται σαν κατάλληλες για τη μέτρηση τάσεως ατμών από $< 10^{-3}$ Pa μέχρι 10^5 Pa.

Οι ξένες προσμείξεις επηρεάζουν συνήθως την τάση ατμών. Η επίδραση των ξένων προσμείξεων στον προσδιορισμό της τάσεως ατμών εξαρτάται πολύ από τη φύση της ξένης προσμείξεως. Η επίδραση μπορεί να είναι σημαντική αν στο δείγμα υπάρχει ένας λίαν πτητικός διαλύτης.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Σαν τάση ατμών μιας ουσίας ορίζεται η κεκορεσμένη πίεση πάνω από μία στερεή ή υγρή ουσία. Στη θερμοδυναμική ισορροπία, η τάση ατμών μιας καθαρής ουσίας είναι συνάρτηση μόνο της θερμοκρασίας.

Η μονάδα πιέσεως SI που πρέπει να χρησιμοποιείται είναι το Pascal (Newton/m^2).

Μονάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί ιστορικά, μαζί με τους συντελεστές μετατροπής τους, είναι:

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

1 Ατμόσφαιρα (φυσική ατμόσφαιρα) = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 Ατμόσφαιρα (τεχνητή ατμόσφαιρα) = $9{,}81 \times 10^4$ Pa

1 Bar = 10^5 Pa

Η μονάδα θερμοκρασίας SI είναι ο βαθμός Kelvin (K).

1.3. Ουσίες αναφοράς

Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις που ερευνάται μία νέα ουσία. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως για τον έλεγχο της μεθόδου κατά διαστήματα, και για να δίνουν τη δυνατότητα για τη σύγκριση αποτελεσμάτων όταν εφαρμόζεται μία άλλη μέθοδος.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της τάσεως ατμών προτείνονται πέντε μέθοδοι, που μπορούν να εφαρμοστούν σε διαφορετικές περιοχές τάσεως ατμών. Για κάθε μέθοδο, η τάση ατμών προσδιορίζεται σε διάφορες θερμοκρασίες. Σε μια περιορισμένη περιοχή θερμοκρασίας, ο λογάριθμος της τάσεως ατμών μιας καθαρής ουσίας είναι γραμμική συνάρτηση του αντίστροφου της θερμοκρασίας.

1.4.1. *Δυναμική μέθοδος*

Στη δυναμική μέθοδο, μετριέται η θερμοκρασία ζέσεως που αντιστοιχεί σε μία καθορισμένη πίεση.

Συνιστώμενη περιοχή:

10^3 Pa μέχρι 10^5 Pa, μεταξύ 20 °C και 100 °C.

Η μέθοδος αυτή έχει επίσης υποδειχθεί σαν κατάλληλη για τον προσδιορισμό του σημείου ζέσεως και είναι χρήσιμη για το σκοπό αυτό μέχρι 350 °C.

1.4.2. *Στατική μέθοδος*

Κατά τη στατική διαδικασία, σε θερμοδυναμική ισορροπία, η τάση ατμών, που αποκαθίσταται σε ένα κλειστό σύστημα, προσδιορίζεται σε μια καθορισμένη θερμοκρασία.

Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για στερεά και υγρά αποτελούμενα από ένα συστατικό και από πολλά συστατικά.

Συνιστώμενη περιοχή:

10 Pa μέχρι 10^5 Pa, μεταξύ 0 °C και 100 °C.

1.4.3. *Ισοτενισκόπιο*

Η πρότυπη αυτή μέθοδος είναι, επίσης, στατική μέθοδος, αλλά συνήθως δεν είναι κατάλληλη για συστήματα με πολλά συστατικά. Πρόσθετες πληροφορίες αναφέρονται στη μέθοδο ASTM D-2879-75.

Συνιστώμενη περιοχή:

από 100 Pa μέχρι 10^5 Pa, μεταξύ 0 °C και 100 °C.

1.4.4. *Ζυγός τάσεως ατμών*

Προσδιορίζεται η ποσότητα μιας ουσίας που βγαίνει από μία κυψελίδα, στη μονάδα του χρόνου, από ένα άνοιγμα γνωστού μεγέθους, υπό συνθήκες κενού, έτσι ώστε η επιστροφή της ουσίας στην κυψελίδα να είναι αμελητέα (π.χ. με μέτρηση του παλμού που παράγεται σε έναν ευαίσθητο ζυγό από μία ακτίνα ατμού ή με μέτρηση της απώλειας βάρους).

Συνιστώμενη περιοχή:

10^{-3} Pa μέχρι 1 Pa, μεταξύ 0 °C και 100 °C.

1.4.5. *Μέθοδος κεκορεσμένου αερίου*

Ένα ρεύμα αδρανούς αερίου φορέα διαβιβάζεται πάνω από την ουσία, κατά τρόπο ώστε να γίνεται κεκορεσμένο από τους ατμούς της και στη συνέχεια οι ατμοί συλλέγονται σε μία κατάλληλη παγίδα. Η μέτρηση της ποσότητας της ουσίας που μεταφέρθηκε από γνωστή ποσότητα αερίου φορέα χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της τάσεως ατμών σε δεδομένη θερμοκρασία.

Συνιστώμενη περιοχή:

μέχρι 1 Pa.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Οι διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού της τάσεως ατμών συγκρίνονται σχετικά με το πεδίο εφαρμογής τους, την επαναληψιμότητα, την αναπαραγωγιμότητα, την περιοχή μετρήσεως, το υπάρχον πρότυπο, στον ακόλουθο πίνακα.

ΠΙΝΑΚΑΣ: ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Μέθοδος μετρήσεως	Ουσίες		Εκτιμώμενη επαναληψιμότητα (1)	Εκτιμώμενη αναπαραγωγιμότητα (1)	Συνιστώμενη περιοχή	Υπάρχον πρότυπο
	στερεές	υγρές				
1.4.1. Δυναμική μέθοδος		×	μέχρι 25 %	μέχρι 25 %	10^3 Pa μέχρι $2 \cdot 10^3$ Pa	—
			1— 5 %	1— 5 %	$2 \cdot 10^3$ Pa μέχρι 10^5 Pa	—
1.4.2. Στατική μέθοδος	×	×	5—10 %	5—10 %	10 Pa μέχρι 10^5 Pa	—
1.4.3. Ισοτενισκόπιο	×	×	5—10 %	5—10 %	10^2 Pa μέχρι 10^5 Pa	ASTM-D 2879-75
1.4.4. Ζυγός τάσεως ατμών	×	×	5—20 %	μέχρι 50 %	10^{-3} Pa μέχρι 1 Pa	—
1.4.5. Μέθοδος κεκορεσμένου αερίου	×	×	10—30 %	μέχρι 50 %	$< 10^{-3}$ Pa μέχρι 1 Pa	—

(1) Εξαρτάται από τον βαθμό καθαρότητας.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Δυναμική μέτρηση*

1.6.1.1. Συσκευή

Η πειραματική συσκευή συνίσταται τυπικά από ένα δοχείο ζέσεως με ψυκτήρα από γυαλί ή μέταλλο (σχήμα 1), εξάρτημα για ρύθμιση και μέτρηση της θερμοκρασίας και εξάρτημα για ρύθμιση και μέτρηση της πιέσεως. Μία τυπική συσκευή μετρήσεως εικονιζόμενη στο σχέδιο είναι κατασκευασμένη από πυρίμαχο γυαλί και αποτελείται από 5 τμήματα.

Ο μεγάλος, μερικά διπλότοιχος, σωλήνας αποτελείται από μία εσμυρισμένη βαλβίδα, έναν ψυκτήρα, ένα δοχείο ψύξεως και μία εισαγωγή.

Ο γυάλινος κύλινδρος, με μία αντλία Cottrell, βρίσκεται στο τμήμα ζέσεως του σωλήνα και έχει τραχεία επιφάνεια από τρίμματα γυαλιού, προς αποφυγή εκτινάξεων κατά τη διάρκεια του βρασμού.

Η θερμοκρασία μετριέται με ένα θερμοστοιχείο ή ένα θερμόμετρο αντιστάσεως, που είναι βυθισμένο σε μικρή ποσότητα λαδιού. Εισάγεται στο σωλήνα φορτίσεως, που φέρει αρσενική εσμυρισμένη σύνδεση και είναι κλειστός στον πυθμένα.

Ο σταυρός χρησιμεύει για τις αναγκαίες συνδέσεις με το εξάρτημα ρυθμίσεως και μετρήσεως της πιέσεως.

Η βαλβίδα, που παίζει το ρόλο ρυθμιστή του όγκου, συνδέεται με τη συσκευή μετρήσεως με τη βοήθεια ενός τριχοειδούς σωλήνα.

Ένας θερμομανδύας, που εισάγεται στη γυάλινη συσκευή εξωτερικά, από κάτω, χρησιμεύει για τη θέρμανση του δοχείου ζέσεως. Το επιθυμητό ρεύμα θερμάνσεως ρυθμίζεται με τη βοήθεια ενός μετασχηματιστή που ρυθμίζει την τάση και ελέγχεται από ένα αμπερόμετρο.

Μία αντλία λαδιού χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του επιθυμητού κενού μεταξύ 10^2 Pa και 10^5 Pa περίπου.

Ένας κύλινδρος αζώτου χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση της επιθυμητής πιέσεως και συνδέεται μέσω μιας βαλβίδας, που χρησιμεύει επίσης για αερισμό της συσκευής.

Μία βαλβίδα πιέσεως ακριβείας, που συνδέεται με το σταυρό, χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της πιέσεως.

1.6.1.2. Πορεία μετρήσεως

Η τάση ατμών μετριέται διά προσδιορισμού του σημείου ζέσεως του δείγματος σε διάφορες καθορισμένες πιέσεις μεταξύ 10^3 Pa περίπου και 10^5 Pa. Μία σταθερή θερμοκρασία, υπό σταθερή πίεση, δείχνει ότι έχει αποκατασταθεί το σημείο ζέσεως (ισορροπία ζέσεως στην περίπτωση μείγματος). Αφρίζουσες ουσίες δεν μπορούν να μετρηθούν με τη μέθοδο αυτή.

Για να εφαρμοστεί η μέθοδος, όλα τα γυάλινα τμήματα καθορίζονται πρώτα σχολαστικά, ξηραίνονται και δημιουργείται κενό με αντλία αερίου. Εισάγεται ακολούθως η ουσία στη συσκευή. Εάν χρησιμοποιούνται στερεές ουσίες, που δεν έχουν τη μορφή σκόνης, μπορεί να δημιουργηθούν προβλήματα κατά την πλήρωση, αλλά μπορεί να κυκλοφορήσουν μέσα στη συσκευή διά θερμάνσεως του ψυκτήρα. Μετά την πλήρωση, σταθεροποιείται η συσκευή και απαερώνεται η ουσία. Ρυθμίζεται η χαμηλότερη επιθυμητή πίεση και τίθεται σε λειτουργία το σύστημα θερμάνσεως. Ταυτόχρονα, το θερμοστοιχείο ή το θερμόμετρο αντιστάσεως συνδέεται με έναν καταγραφέα. Η ισορροπία έχει επιτευχθεί όταν αποκατασταθεί σταθερή θερμοκρασία ζέσεως υπό σταθερή δοθείσα πίεση. Μετά την καταγραφή του σημείου αυτού ισορροπίας, ρυθμίζεται ψηλότερη πίεση. Συνεχίζεται η διαδικασία κατά τον ίδιο τρόπο μέχρις ότου η πίεση φθάσει τα 10^5 Pa (συνολικά λαμβάνονται 5 έως 10 σημεία μετρήσεως). Για έλεγχο, επαναλαμβάνονται τα σημεία ισορροπίας σε ελαττούμενες πιέσεις.

1.6.2. *Στατική μέτρηση*

1.6.2.1. Συσκευή

Μία τυπική συσκευή μετρήσεως (βλέπε σχήμα 2) περιλαμβάνει ένα θερμαντικό και ένα ψυκτικό σύστημα, κατασκευασμένα από γυαλί και μέταλλο, που χρησιμεύουν για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας του δείγματος, καθώς και εξάρτημα για τη ρύθμιση και μέτρηση της πιέσεως και της θερμοκρασίας.

Ο θάλαμος του δείγματος έχει από το ένα μέρος μία βαλβίδα υψηλού κενού από ανοξείδωτο χάλυβα και από το άλλο μέρος ένα σωλήνα-U, που περιέχει κατάλληλο μανομετρικό υγρό. Το άλλο άκρο του σωλήνα-U καταλήγει σε σύνδεση με σχήμα σταυρού, ο ένας κλάδος του οποίου οδηγεί στην αντλία κενού, ο άλλος σε κύλινδρο αζώτου και ο τρίτος στη βαλβίδα πιέσεως.

Για τη θέρμανση της ουσίας σε ορισμένη ρυθμιζόμενη θερμοκρασία, ολόκληρος ο θάλαμος του δείγματος, μαζί με τη στρόφιγγα της βαλβίδας και ένα αρκετά μεγάλο τμήμα του σωλήνα-U (για πρακτικούς λόγους, μέχρι το ύψος της στρόφιγγας της βαλβίδας), τοποθετείται σε κατάλληλο λουτρό σταθερής θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία μετριέται με τη βοήθεια θερμοστοιχείου ή θερμόμετρου αντιστάσεως που βρίσκεται πολύ κοντά στην εξωτερική επιφάνεια του θαλάμου του δείγματος και μπορεί να καταγράφεται.

Για την υπέρψυξη του δείγματος χρησιμοποιείται υγρό άζωτο ή μείγμα ξηρού πάγου και αλκοόλης. Για τη μέτρηση χαμηλών θερμοκρασιών χρησιμοποιείται ειδικό υπερκρυοστατικό όργανο.

Για την εκκένωση της συσκευής μέχρι την επιθυμητή πίεση χρησιμοποιείται κατάλληλη αντλία.

Η τάση ατμών μιας ουσίας μετριέται συνήθως έμμεσα με χρησιμοποίηση ενός δείκτη μηδενός. Αυτός ο δείκτης μηδενός μπορεί να είναι ένας σωλήνας-U, που περιέχει κάποιο υγρό όπως καθορίζεται παρακάτω, ή, μεταξύ άλλων, ένα μανόμετρο μεμβράνης. Η τάση των ατμών μετακινεί το υγρό στο σωλήνα-U πέρα από τη θέση ισορροπίας, σε λουτρό ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας. Τότε διαβιβάζεται άζωτο στη συσκευή από ένα συνδεδεμένο κύλινδρο αζώτου, διά μέσου βαλβίδας, για την αντιστάθμιση του αποτελέσματος της τάσεως ατμών και επαναφορά της βαλβίδας πιέσεως στο μηδέν. Η απαιτούμενη για το σκοπό αυτό πίεση αζώτου διαβάζεται σε έναν ακριβή μετρητή πιέσεως, που βρίσκεται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος και αντιστοιχεί στην τάση ατμών της ουσίας, στην αντίστοιχη σταθερή θερμοκρασία. Για τη ρύθμιση στο μηδέν μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα υγρά, όπως ο υδράργυρος, έλαια σιλικόνης, φθαλικοί εστέρες, σύμφωνα με την περιοχή τάσεως και τη χημική συμπεριφορά της ουσίας.

Ο υδράργυρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την ατμοσφαιρική πίεση μέχρι 10^2 Pa, τα έλαια σιλικόνης και οι φθαλικοί εστέρες επίσης κάτω από 10^2 Pa μέχρι 10 Pa. Το μανόμετρο μεμβράνης μπορεί ακόμη να εφαρμοστεί κάτω από 10^{-1} Pa.

1.6.2.2. Πορεία μετρήσεως

Πριν από τη μέτρηση, όλα τα μέρη της συσκευής του σχήματος 2 καθαρίζονται προσεκτικά με διαλύτες και μετά ξηραίνονται υπό κενό. Στη συνέχεια ο σωλήνας-U γεμίζεται με το επιθυμητό υγρό, που πρέπει να έχει απαερωθεί σε ανυψωμένη θερμοκρασία πριν από το γέμισμα.

Μετά το γέμισμα με την ουσία, συναρμολογείται η πλήρης συσκευή και ο θάλαμος του δείγματος υπερψύχεται αρκετά. Κατόπιν, με τη βαλβίδα ανοιχτή πάνω από το θάλαμο του δείγματος, αφαιρείται ο αέρας με την αντλία επί αρκετά λεπτά. Ύστερα κλείνεται η βαλβίδα πάνω από την ουσία, φέρεται το

δείγμα στη θερμοκρασία που έχει επιλεγεί και, όσο διατηρείται αυτή η θερμοκρασία, η προκύπτουσα μετακίνηση της στήλης παρατηρείται και αντισταθμίζεται στη θέση μηδέν με άζωτο, αν είναι αναγκαίο, μέχρι να επικρατήσει σταθερότητα θερμοκρασίας. Υπερψύχεται πάλι ο θάλαμος του δείγματος. Εάν παρατηρηθεί υπόλοιπο πιέσεως στην κατάσταση υπερψύξεως τούτο οφείλεται είτε σε αέρα που παρέμεινε στο δείγμα και ελευθερώθηκε κατά τη διάρκεια της θερμάνσεως, ο οποίος μπορεί να απομακρυνθεί, είτε στο ότι η θερμοκρασία ψύξεως δεν ήταν αρκετά χαμηλή. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να χρησιμοποιηθεί υγρό άζωτο σαν ψυκτικό μέσο.

Αφού το δείγμα απαερωθεί ικανοποιητικά, προσδιορίζεται η εξάρτηση της τάσεως ατμών από τη θερμοκρασία σε διαστήματα θερμοκρασίας αρκετά μικρά.

1.6.3. *Ισοτενισκόπιο*

Πλήρης περιγραφή της μεθόδου αυτής δίνεται στη βιβλιογραφία (2). Η αρχή λειτουργίας του οργάνου μετρήσεως φαίνεται στο σχήμα 3. Όπως και στη στατική μέθοδο που περιγράφεται στο σημείο 1.6.2, το ισοτενισκόπιο είναι κατάλληλο για τον έλεγχο στερεών και υγρών.

Στην περίπτωση υγρών, η ίδια η ουσία χρησιμεύει σαν υγρό του βοηθητικού μανόμετρου. Στην περίπτωση στερεών, χρησιμοποιούνται τα μανομετρικά υγρά που αναφέρονται στο σημείο 1.6.2, ανάλογα με την περιοχή της πιέσεως και της θερμοκρασίας. Στην περίπτωση υγρών, η σφαίρα του ισοτενισκόπιου γεμίζεται με την υπό έλεγχο ουσία, η οποία απαερώνεται σε ανυψωμένη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια βρασμού.

Συγχρόνως, μέρος του υγρού αποστάζεται έξω από τη σφαίρα, συμπυκνώνεται στην ανώτερη ψυχόμενη σφαίρα και επιστρέφει στο σωλήνα-U. Όταν ο σωλήνας αυτός γεμίσει αρκετά με απαερωμένο υγρό, η κατώτερη σφαίρα με το σωλήνα-U σε θερμοστατικό λουτρό, φέρεται στην επιθυμητή θερμοκρασία και η δημιουργούμενη τάση ατμών μετριέται έμμεσα, ακριβώς όπως στη μέθοδο που περιγράφεται στο σημείο 1.6.2.

Στην περίπτωση στερεών, το απαερωμένο μανομετρικό υγρό φέρεται στην καμπύλη του μακρού βραχίονα του ισοτενισκόπιου. Κατόπιν, το υπό έλεγχο στερεό φέρεται στην κατώτερη σφαίρα και απαερώνεται σε ανυψωμένη θερμοκρασία. Ύστερα, το ισοτενισκόπιο τοποθετείται με κλίση, έτσι ώστε το μανομετρικό υγρό να ρεύσει στο σωλήνα-U. Η μέτρηση της τάσεως ατμών σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας γίνεται σύμφωνα με το σημείο 1.6.2.

1.6.4. *Ζυγός τάσεως ατμών*

1.6.4.1. Συσκευή

Αναφέρονται στη βιβλιογραφία (1) αρκετές διαφορετικές πειραματικές διατάξεις. Εκείνη που περιγράφεται εδώ δείχνει τις αρχές λειτουργίας. Μερικά από τα εξαρτήματα εικονίζονται στο σχήμα 4. Είναι ο βασικός δίσκος και ο θολωτός κώδωνας, μία αντλία με ένα όργανο μετρήσεως κενού και εξαρτήματα για τη μέτρηση της τάσεως ατμών με απόκλιση ενός δείκτη.

Τα ακόλουθα εξαρτήματα στερεώνονται στη βασική πλάκα:

— ένας φούρνος εξατμίσεως με δακτύλιο στεγανότητας και περιστροφική πλήρωση. Ο φούρνος εξατμίσεως είναι ένα πεπλατυσμένο, κυλινδρικό χάλκινο δοχείο (μπορεί επίσης να κατασκευαστεί από γυαλί με χάλκινο τοίχωμα). Είναι τοποθετημένος πάνω σε μία χάλκινη βάση, η οποία είναι βιδωμένη πάνω σε ένα κομμάτι από ανοξείδωτο χάλυβα στην κατώτερη προεξέχουσα ακμή του. Το κομμάτι αυτό του ανοξείδωτου χάλυβα είναι στερεωμένο στη βασική πλάκα με ένα δακτύλιο στεγανότητας, κατά τρόπο ώστε να μπορεί να περιστρέφεται γύρω από τον άξονα του φούρνου. Η θέρμανση γίνεται με ένα θερμαντικό πηνίο, τοποθετημένο στο εσωτερικό του κομματιού από ανοξείδωτο χάλυβα και είναι κατ' αυτό τον τρόπο στεγανοποιημένο από το θάλαμο κενού·

— το κάλυμμα του φούρνου είναι κατασκευασμένο από χαλκό και φέρει τρία ανοίγματα εξατμίσεως, διαφόρων τομών, τοποθετημένα σε 90 μοίρες προς άλληλα. Καθώς ο φούρνος περιστρέφεται, το επιθυμητό άνοιγμα του φούρνου ή μία ενδιάμεση θέση μπορούν να τοποθετηθούν κάτω από τη σχισμή στον ψυκτήρα, που είναι τοποθετημένος έκκεντρα ως προς το φούρνο, οδηγώντας έτσι τη μοριακή δέσμη στη φάλαγγα του ζυγού ή εκτρέποντάς την. Πάνω στο τοίχωμα του φούρνου είναι στερεωμένο ένα θερμοστοιχείο ή ένα θερμόμετρο αντιστάσεως για τη μέτρηση της θερμοκρασίας·

— ο ζυγός είναι ένα όργανο με κινούμενο πηνίο. Ο δείκτης έχει αντικατασταθεί από ένα μικρό σωλήνα, πάνω στον οποίο είναι στερεωμένα η δέσμη του ζυγού και η αντιστάθμιση. Η δέσμη του ζυγού έχει μία αντικαταστατή φάλαγγα, κατασκευασμένη από λεπτό κομμάτι αργιλίου επιστρωμένο με φύλλο χρυσού. Στο κέντρο περίπου της δέσμης του ζυγού είναι στερεωμένο ένα σύρμα constantan, πάχους 0,1 mm, πάνω στο οποίο μπορούν να σταθούν βάρη βαθμονομήσεως. Η τάση ατμών μπορεί να καταγραφεί με χρησιμοποίηση ενός φωτοηλεκτρικού οργάνου μηδενικής ενδείξεως·

— ένα κυλινδρικό ορειχάλκινο δοχείο περιβάλλει από παντού τη φάλαγγα του ζυγού, εκτός των δύο σχισμών για την κίνηση της δέσμης του ζυγού και ενός στενού ανοίγματος για την είσοδο της μοριακής δέσμης. Διαφυγή θερμότητας προς τα έξω επιτυγχάνεται με μία ράβδο χαλκού στην κορυφή του ορειχάλκινου δοχείου, με τη βοήθεια ενός σωλήνα από ανοξείδωτο χάλυβα, μέσω της βασικής πλάκας και είναι θερμικά μονωμένη από αυτή. Η ράβδος είναι βυθισμένη σε ένα δοχείο Dewar, που περιέχει υγρό άζωτο και βρίσκεται κάτω από τη βασική πλάκα.

1.6.4.2. Πορεία μετρήσεως

Γεμίζεται ο χάλκινος φούρνος με την ουσία, κλείνεται το κάλυμμα και το άνοιγμα της πλάκας, η θωράκιση και ο ψυκτήρας τοποθετούνται πάνω στο φούρνο. Συναρμολογείται ο κώδωνας και αρχίζουν να λειτουργούν οι αντλίες κενού. Η τελική πίεση πριν αρχίσει η μέτρηση είναι 10^{-4} Pa περίπου. Από 10^{-2} Pa και κάτω μπαίνει σε λειτουργία η ψύξη του ψυκτικού θαλάμου.

Μετά πάροδο ορισμένου χρόνου, ο ζυγός έχει φθάσει σε αρκετά χαμηλή θερμοκρασία, έτσι ώστε η εκφεύγουσα ακτίνα ατμών μπορεί να συμπυκνωθεί πάνω στη φάλαγγα. Η συμπύκνωση αυτή προκαλεί ένα σήμα στον συνδεδεμένο καταγραφέα. Το σήμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά δύο τρόπους: στην περίπτωση της συγκεκριμένης συσκευής που περιγράφεται εδώ, η τάση ατμών προσδιορίζεται απευθείας από την πίεση στη φάλαγγα της κλίμακας (η μοριακή μάζα δε χρειάζεται). Ταυτόχρονα, προσδιορίζεται η μάζα που συμπυκνώνεται και επομένως η ταχύτητα εξατμίσεως μπορεί να υπολογιστεί από το χρόνο επικαθίσεως. Το τελευταίο αυτό ισχύει για πιο γενικές συσκευές. Η τάση ατμών μπορεί, επίσης, να υπολογιστεί από την ταχύτητα εξατμίσεως και τη μοριακή μάζα, χρησιμοποιώντας την εξίσωση Herz.

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

όπου:

G = ταχύτητα εξατμίσεως ($kg/s \cdot m^2$),

M = μοριακή μάζα (g/mol),

T = θερμοκρασία (K),

R = παγκόσμια μοριακή σταθερά αερίων ($J/mol \cdot K$),

p = τάση ατμών (Pa).

Αφού επιτευχθεί το αναγκαίο κενό, αρχίζει η σειρά μετρήσεων στη χαμηλότερη επιθυμητή θερμοκρασία μετρήσεως. Ανοίγεται το κατάλληλο στόμιο και η ακτίνα ατμών περνάει από τη θωράκιση που βρίσκεται αμέσως πάνω από το κάλυμμα και χτυπάει την ψυχρή φάλαγγα της κλίμακας. Η άλαγγα αυτή είναι έτσι τοποθετημένη ώστε όλη η ακτίνα ατμών συλλέγεται κατά τη συνημιτονοειδή κατανομή της. Η ροπή της ακτίνας ατμών προκαλεί μία δύναμη στη φάλαγγα της κλίμακας, στην ψυχρή επιφάνεια της οποίας γίνεται η συμπύκνωση. Από τη δύναμη αυτή της ακτίνας ατμών, η δέσμη της κλίμακας αποκλίνει από τη θέση ισορροπίας. Στο άκρο της δέσμης της κλίμακας βρίσκεται μία μικρή λωρίδα που καταγράφεται οπτικά μέσω ενός συστήματος πρισμάτων και δύο φωτοδιόδων λυχνιών. Αμέσως, ένα συνδεδεμένο κύκλωμα ελέγχου ρυθμίζει και επαναφέρει τη δέσμη της κλίμακας στην κατάσταση ισορροπίας. Καταγράφεται η απαιτούμενη ροπή και μετά από πλήρη αντιστάθμιση αντιστοιχεί στην τάση ατμών της ουσίας.

Για περισσότερες μετρήσεις, αυξάνεται η θερμοκρασία κατά μικρά διαστήματα, μέχρι να φθάσει την ψηλότερη επιθυμητή τιμή. Ψύχεται κατόπιν το δείγμα και μπορεί να καταγραφεί μία δεύτερη καμπύλη τάσεως ατμών. Οι δύο σειρές μετρήσεων είναι αναπαραγώγιμες μόνο αν το μετρούμενο δείγμα είναι ικανοποιητικά καθαρό. Αν μία τρίτη σειρά μετρήσεων δεν επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα της δεύτερης σειράς, αυτό είναι δυνατό να οφείλεται στο ότι η ουσία μπορεί να αποσυντίθεται στην περιοχή της θερμοκρασίας μετρήσεως.

1.6.5. *Μέθοδος κεκορεσμένου αερίου*

1.6.5.1. Συσκευή

Μία τυπική συσκευή που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο αυτό περιλαμβάνει ορισμένα τμήματα, που φαίνονται στο σχήμα 5 και περιγράφονται παρακάτω [βιβλιογραφία (1)].

Αδρανές αέριο:

Ο αέριος φορέας δεν πρέπει να αντιδρά χημικά με την ελεγχόμενη ουσία. Συνήθως χρησιμοποιείται άζωτο για το σκοπό αυτό, σε ορισμένες όμως περιπτώσεις μπορεί να απαιτούνται άλλα αέρια. Το χρησιμοποιούμενο αέριο πρέπει να είναι ξηρό (βλέπε σχήμα 5 σημείο 4: Σχετική υγρασία του Sensor).

Έλεγχος ροής:

Απαιτείται κατάλληλο σύστημα ελέγχου του αερίου για την εξασφάλιση σταθερής και καθορισμένης ροής μέσω της στήλης κορεσμού.

Παγίδες συλλογής ατμών:

Οι παγίδες αυτές εξαρτώνται από τα ειδικά χαρακτηριστικά του δείγματος και από τη μέθοδο αναλύσεως που θα χρησιμοποιηθεί. Οι ατμοί πρέπει να παγιδευτούν ποσοτικά και υπό μορφή που να επιτρέπει την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Για μερικές ελεγχόμενες ουσίες, θεωρούνται κατάλληλες οι παγίδες που περιέχουν υγρά όπως το εξάνιο ή η αιθυλενογλυκόλη. Για άλλες, μπορεί να χρησιμοποιηθούν στερεοί απορροφητές.

Ανταλλάκτης θερμότητας:

Για μετρήσεις σε διαφορετικές θερμοκρασίες μπορεί να παραστεί ανάγκη να συνδεθεί στη συσκευή ανταλλάκτης θερμότητας.

Στήλη κορεσμού:

Η ελεγχόμενη ουσία είναι διάλυμα προσροφημένο σε κατάλληλο αδρανές υπόστρωμα. Το υπόστρωμα αυτό συμπιέζεται στη στήλη κορεσμού, οι διαστάσεις και η ταχύτητα ροής της οποίας πρέπει να είναι τέτοιες ώστε να εξασφαλίζεται πλήρης κορεσμός του αέριου φορέα. Η στήλη κορεσμού πρέπει να είναι θερμοστατημένη. Για μετρήσεις σε θερμοκρασίες πάνω από 20 °C, η περιοχή μεταξύ της στήλης κορεσμού και των παγίδων πρέπει να θερμαίνεται, για να εμποδίζεται η συμπύκνωση της ελεγχόμενης ουσίας.

1.6.5.2. Πορεία μετρήσεως

Προπαρασκευή της στήλης κορεσμού:

Διάλυμα της ελεγχόμενης ουσίας σε πολύ πτητικό διαλύτη προστίθεται σε κατάλληλη ποσότητα υποστρώματος. Η ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να είναι αρκετή, ώστε να εξασφαλίζεται ο κορεσμός σε όλη τη διάρκεια του ελέγχου. Απομακρύνεται τελείως ο διαλύτης δι' εξατμίσεως στον αέρα ή σε περιστρεφόμενη συσκευή εξατμίσεως και το υλικό που έχει προσεκτικά αναμειχθεί προστίθεται στη στήλη κορεσμού. Αφού θερμοστατηθεί το δείγμα, διαβιβάζεται ξηρό άζωτο από τη συσκευή.

Μέτρηση:

Συνδέονται οι παγίδες με τη γραμμή εξόδου από τη στήλη και καταγράφεται ο χρόνος. Ελέγχεται η ταχύτητα ροής στην αρχή, καθώς και σε κανονικά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πειράματος, με χρησιμοποίηση φυσαλλιδομέτρου (ή συνεχώς, με ροόμετρο μάζας).

Πρέπει να μετριέται η πίεση στην έξοδο της στήλης κορεσμού. Αυτό μπορεί να γίνει είτε

α) με παρεμβολή βαλβίδας πιέσεως μεταξύ της στήλης και των παγίδων (λόγω του αυξημένου νεκρού χώρου και προσροφητικής επιφάνειας),

είτε

β) με μέτρηση της πτώσεως πιέσεως κατά μήκος του ειδικού συστήματος που χρησιμοποιείται, σε συνάρτηση με την ταχύτητα ροής, σε χωριστό πείραμα (που μπορεί να μην είναι ικανοποιητικό για υγρές παγίδες).

Ο χρόνος που απαιτείται για τη συλλογή της ποσότητας της ελεγχόμενης ουσίας, που είναι αναγκαία για τις διάφορες μεθόδους αναλύσεως, προσδιορίζεται με προκαταρκτικά πειράματα ή κατ' εκτίμηση. Πριν από τον υπολογισμό της τάσεως ατμών σε δεδομένη θερμοκρασία, πρέπει να γίνουν προκαταρκτικά πειράματα για τον προσδιορισμό της μέγιστης ταχύτητας ροής που θα κορέσει τον αέριο φορέα με ατμούς της ουσίας. Αυτό εξασφαλίζεται, αν ο αέριος φορέας διαβιβαστεί μέσα από τη στήλη κορεσμού, τόσο αργά, ώστε μικρότερη ταχύτητα να μη δίνει με υπολογισμό μεγαλύτερη τάση ατμών.

Η ειδική αναλυτική μέθοδος μπορεί να προσδιοριστεί από τη φύση της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. αέρια χρωματογραφία ή σταθμική μέθοδος).

Προσδιορίζεται η ποσότητα της ουσίας που μεταφέρεται από γνωστό όγκο αέριου φορέα.

1.6.5.3. Υπολογισμός της τάσεως ατμών

Η τάση ατμών υπολογίζεται από την πυκνότητα ατμών, W/V, από την εξίσωση:

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

όπου:

p = τάση ατμών (Pa),

W = προσροφηθείσα μάζα ελεγχόμενης ουσίας (g),

V = όγκος κορεσμένου αερίου (m^3),

R = διεθνής μοριακή σταθερά αερίων (J/mol·K),

T = θερμοκρασία (K),

M = μοριακή μάζα (g/mol).

Οι μετρηθέντες όγκοι πρέπει να διορθωθούν για διαφορές πιέσεως και θερμοκρασίας μεταξύ του ροομέτρου και της θερμοστατημένης στήλης κορεσμού. Αν το ροόμετρο έχει τοποθετηθεί μετά την παγίδα των ατμών κατά τη διεύθυνση της ροής, είναι ανάγκη να γίνουν διορθώσεις για σφάλματα που οφείλονται σε τυχόν εξατμιζόμενα συστατικά της παγίδας [βιβλιογραφία (1)].

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Η τάση ατμών, από οποιαδήποτε από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν, πρέπει να προσδιορίζεται σε τουλάχιστον δύο θερμοκρασίες. Για να είναι δυνατό να ελεγχθεί η γραμμικότητα της καμπύλης τάσεως ατμών, είναι προτιμότερες τρεις ή περισσότερες θερμοκρασίες, στην περιοχή 0 °C — 50 °C.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

Στην έκθεση πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιληφθούν οι ακόλουθες πληροφορίες:

— ακριβής προδιαγραφή της ουσίας (ταυτότητα και ξένες προσμείξεις),

— τουλάχιστον δύο τιμές τάσεως ατμών και θερμοκρασίας, κατά προτίμηση στην περιοχή 0 °C — 50 °C. Πρέπει, επίσης, να περιληφθούν όλα τα προκαταρκτικά δεδομένα και μία καμπύλη log p σαν συνάρτηση του 1/T. Επιπλέον, πρέπει να αναφέρεται μία εκτίμηση της τάσεως ατμών στους 20 °C ή 25 °C.

Αν παρατηρηθεί κάποια μεταβολή (μεταβολή καταστάσεως, αποσύνθεση), πρέπει να δηλωθούν οι ακόλουθες πληροφορίες:

— φύση της αλλαγής,

— θερμοκρασία στην οποία παρατηρήθηκε η μεταβολή, υπό ατμοσφαιρική πίεση,

— τάση ατμών σε 10 °C και 20 °C κάτω από τη θερμοκρασία μεταβολής και σε 10 °C και 20 °C πάνω από τη θερμοκρασία αυτή (εκτός αν η μεταβολή είναι από στερεό σε αέριο).

Πρέπει να δηλωθούν όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις που είναι σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Πρέπει να δηλωθεί η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

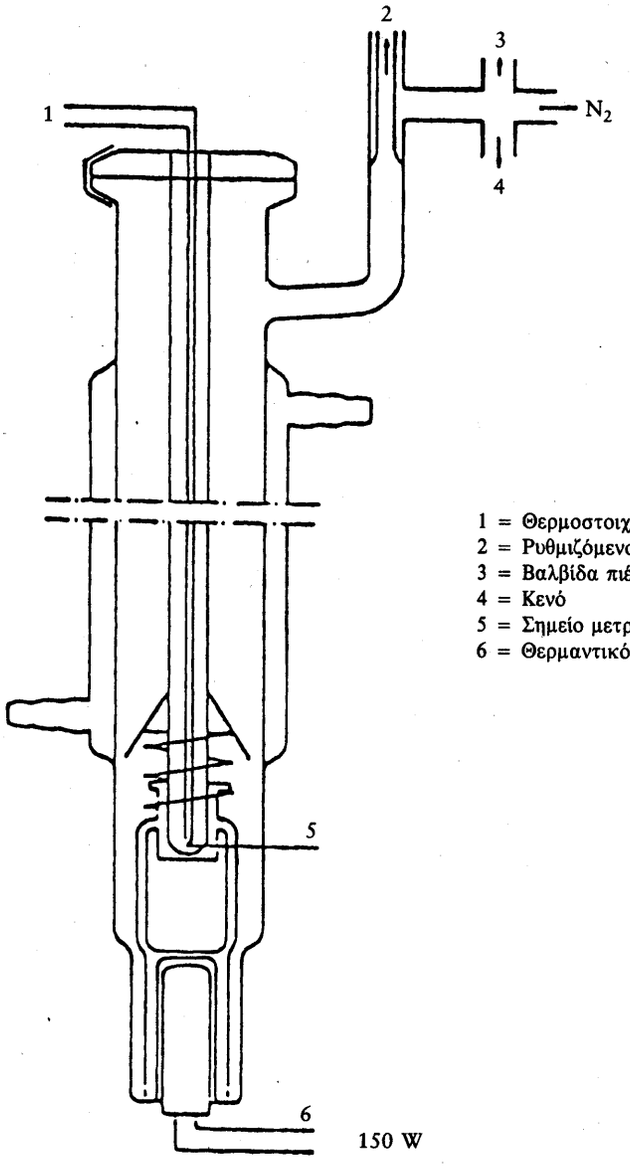
(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 104 — Decision of the Council C(81) 30 final.

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

Προσάρτημα

Σχήμα 1

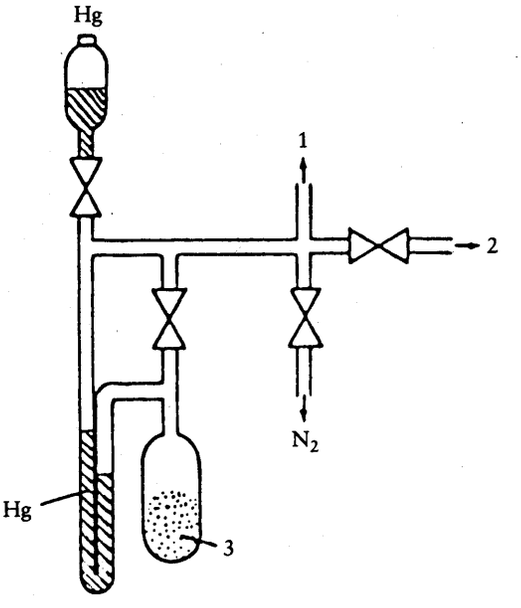
Συσκευή προσδιορισμού της καμπύλης τάσεως ατμών κατά τη δυναμική μέθοδο



1 = Θερμοστοιχείο
2 = Ρυθμιζόμενος όγκος κενού
3 = Βαλβίδα πιέσεως
4 = Κενό
5 = Σημείο μετρήσεως
6 = Θερμαντικό στοιχείο, περίπου 150 W

Σχήμα 2

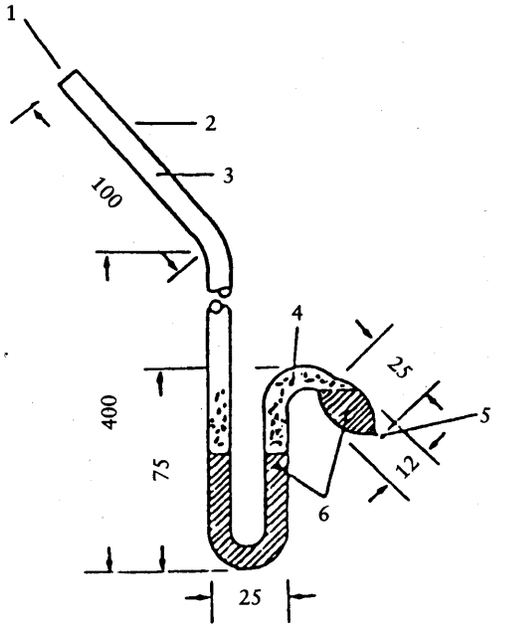
Συσκευή προσδιορισμού της καμπύλης τάσεως ατμών κατά τη στατική μέθοδο



1 = Βαλβίδα πιέσεως
2 = Κενό
3 = Δείγμα

Σχήμα 3

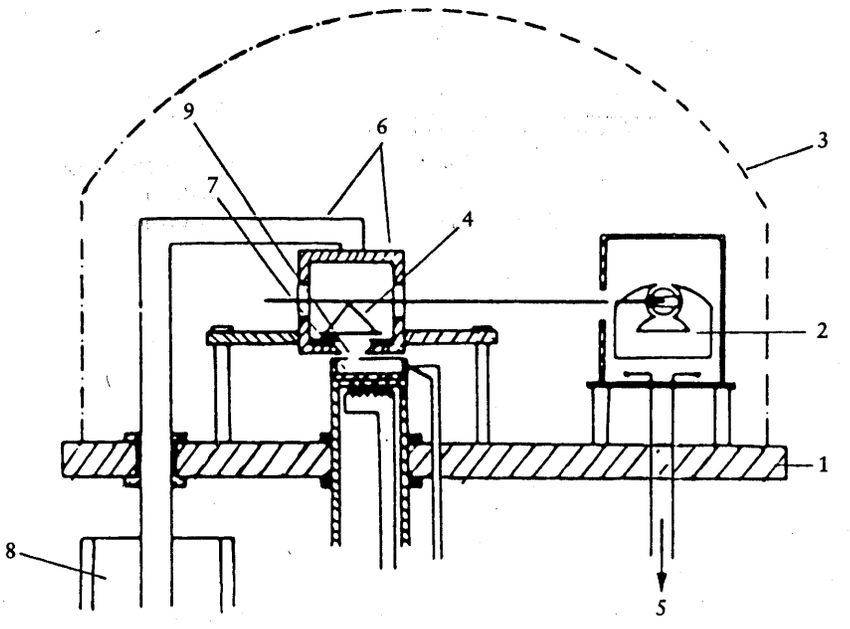
Ισοτενισκόπιο [βιβλιογραφία (2)]



1 = Σύστημα μετρήσεως ελέγχου πιέσεως
2 = Σωλήνας εξωτερικής διαμέτρου 8 mm
3 = Ξηρό άζωτο στο σύστημα πιέσεως
4 = Ατμός δείγματος
5 = Μικρό άκρο
6 = Υγρό δείγμα

Σχήμα 4

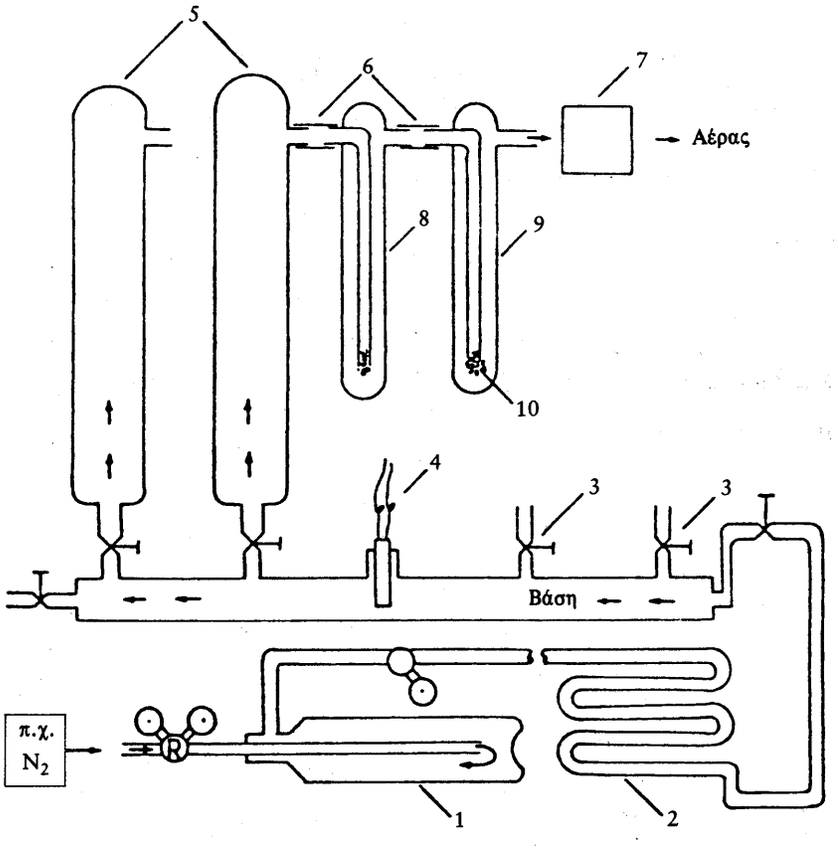
Συσκευή προσδιορισμού της καμπύλης τάσεως ατμών κατά τη μέθοδο ζυγού τάσεως ατμών



1 = Βασικός δίσκος
2 = Όργανο κινήσεως του πηνίου
3 = Θολωτός κώδωνας
4 = Ζυγός με φάλαγγα-κλίμακα
5 = Όργανο μετρήσεως κενού
6 = Σύστημα ψύξεως και ψυκτική ράβδος
7 = Φούρνος εξατμίσεως
8 = Δοχείο Dewar με υγρό άζωτο
9 = Θωράκιση

Σχήμα 5

Παράδειγμα συστήματος ροής για τον προσδιορισμό της τάσεως ατμών κατά τη μέθοδο κεκορεσμένου αερίου



1 = Ρυθμιστής ροής
2 = Ανταλλάκτης θερμότητας
3 = Βελονοειδείς βαλβίδες
4 = Σχετική υγρασία του Sensor
5 = Στήλες προσροφήσεως
6 = Συνδέσεις PTFE
7 = Ροόμετρο
8 = Παγίδα (προσροφητής)
9 = Παγίδα λαδιού
10 = Παραγωγή φυσαλλίδων

Α. 5. ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΤΑΣΗ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Οι περιγραφόμενες μέθοδοι βασίζονται στην κατευθυντήρια μέθοδο ελέγχου του ΟΟΣΑ (1).

1.1. **Εισαγωγή**

Οι περιγραφόμενες μέθοδοι εφαρμόζονται στη μέτρηση της επιφανειακής τάσεως των υδατικών διαλυμάτων.

Είναι χρήσιμο να υπάρχει προκαταρκτική πληροφορία για τη διαλυτότητα στο νερό, συντακτικό τύπο, τις ιδιότητες υδρολύσεως και την κρίσιμη συγκέντρωση για τη δημιουργία μικκυλίων της ουσίας πριν από την εκτέλεση των δοκιμασιών αυτών.

Οι παρακάτω μέθοδοι είναι εφαρμόσιμες στις περισσότερες χημικές ουσίες, χωρίς οποιονδήποτε περιορισμό όσον αφορά το βαθμό καθαρότητάς τους.

Η μέτρηση της επιφανειακής τάσεως με τη μέθοδο του μετρητή τάσεως με δακτύλιο, περιορίζεται στα υδατικά διαλύματα με δυναμικό ιξώδες μικρότερο των 200 mPa s περίπου.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Η ελεύθερη επιφανειακή ενθαλπία ανά μονάδα επιφάνειας αναφέρεται σαν επιφανειακή τάση.

Η επιφανειακή τάση δίνεται σαν:

N/m (SI μονάδα), ή

mN/m (SI υπο-μονάδα)

1 N/m = 10^3 dyn/cm,

1 mN/m = 1 dyn/cm στο απαρχαιωμένο σύστημα cgs.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Οι ουσίες αναφοράς δεν είναι ανάγκη να χρησιμοποιούνται σε όλες τις περιπτώσεις όταν ερευνάται μία νέα ουσία. Πρωταρχικά χρησιμεύουν για τη βαθμονόμηση της μεθόδου από καιρού σε καιρό, και για να προσφέρουν μία ευκαιρία συγκρίσεως των αποτελεσμάτων όταν εφαρμόζεται μία άλλη μέθοδος.

Οι ουσίες αναφοράς που καλύπτουν μία μεγάλη περιοχή επιφανειακών τάσεων, δίνονται στις βιβλιογραφίες (1) και (2).

1.4. **Αρχή των μεθόδων**

Οι μέθοδοι βασίζονται στη μέτρηση της μέγιστης δύναμης που απαιτείται να ασκηθεί κάθετα σε έναν αναβολέα ή σε ειδικό δακτύλιο που είναι σε επαφή με το προς εξέταση υγρό το οποίο βρίσκεται τοποθετημένο σε ένα δοχείο μετρήσεως, για να αποχωριστεί αυτός από αυτή την επιφάνεια ή σε ένα δίσκο, με τη μία πλευρά σε επαφή με την επιφάνεια, για να επανέλθει κανονικά στη θέση της η μεμβράνη που σχηματίστηκε.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Οι μέθοδοι αυτές είναι μεγαλύτερης ακρίβειας από αυτήν που φαίνεται να απαιτείται για περιβαλλοντική εκτίμηση.

1.6. **Περιγραφή των μεθόδων**

1.6.1. *Μέθοδος δίσκου*

Βλέπε ISO 304 (Επιφανειακά ενεργοί ουσίες — Προσδιορισμός της επιφανειακής τάσεως με σχηματισμό υγρών μεμβρανών).

1.6.2. *Μέθοδος αναβολέα*

Βλέπε ISO 304 (Επιφανειακά ενεργοί ουσίες — Προσδιορισμός της επιφανειακής τάσεως με σχηματισμό υγρών μεμβρανών).

1.6.3. *Μέθοδος δακτυλίου*

Βλέπε ISO 304 (Επιφανειακά ενεργοί ουσίες — Προσδιορισμός της επιφανειακής τάσεως με σχηματισμό υγρών μεμβρανών).

1.6.4. *Εναρμονισμένη μέθοδος δακτυλίου του ΟΟΣΑ*

1.6.4.1. Συσκευή

Οι μετρητές τάσεως που κυκλοφορούν στο εμπόριο είναι κατάλληλοι για τη μέτρηση αυτή. Αποτελούνται από τα κατωτέρω στοιχεία:

— κινητό τραπέζι δείγματος,

— σύστημα μετρήσεως δύναμης,

— σώμα μετρήσεως (δακτύλιος),

— δοχείο μετρήσεως.

1.6.4.1.1. Κινητό τραπέζι δείγματος

Το κινητό τραπέζι δείγματος χρησιμοποιείται σαν υποστήριγμα για το δοχείο μετρήσεως με ελεγχόμενη θερμοκρασία που περιέχει το υγρό το οποίο πρόκειται να υποστεί τη δοκιμασία. Μαζί με το σύστημα μετρήσεως της δύναμης, συναρμολογείται πάνω σε ένα βάθρο.

1.6.4.1.2. Σύστημα μετρήσεως της δύναμης

Το σύστημα μετρήσεως της δύναμης (βλέπε σχήμα 1) είναι τοποθετημένο πάνω από το τραπέζι του δείγματος. Το σφάλμα μετρήσεως της δύναμης δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 10^{-6}$ N, που αντιστοιχεί σε ένα όριο σφάλματος ± 0,1 mg σε μια μέτρηση μάζας. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η κλίμακα μετρήσεως των μετρητών τάσεως που κυκλοφορούν στο εμπόριο βαθμολογείται σε mN/m, έτσι ώστε η επιφανειακή τάση να μπορεί να μετρηθεί απευθείας σε mN/m, με μια ακρίβεια 0,1 mN/m.

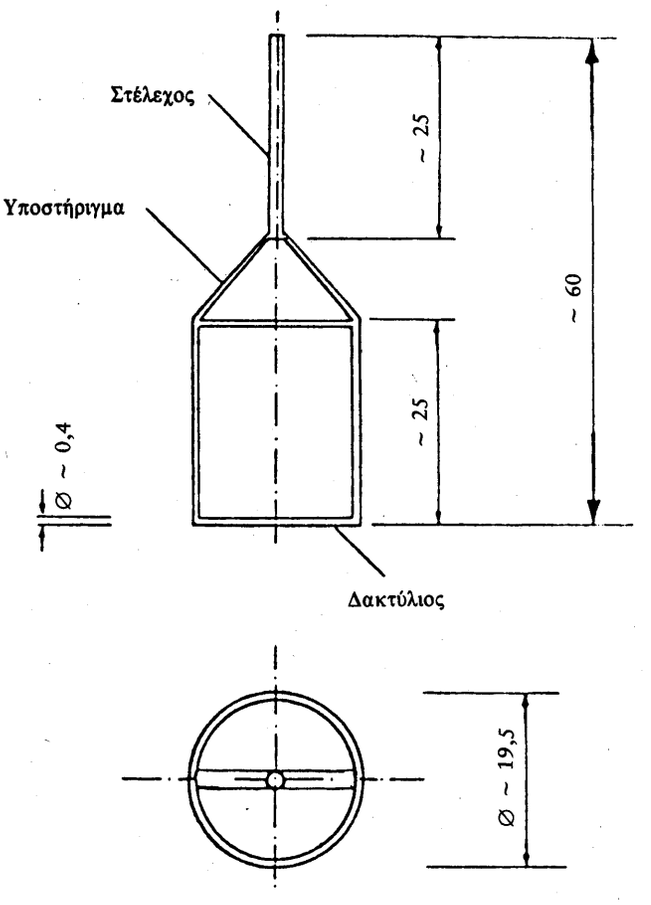
1.6.4.1.3. Σώμα μετρήσεως (δακτύλιος)

Ο δακτύλιος αποτελείται συνήθως από ένα σύρμα από κράμα λευκόχρυσου-ιριδίου πάχους 0,4 mm περίπου και μέσης περιφέρειας 60 mm. Ο συρμάτινος δακτύλιος κρέμεται οριζόντια από ένα μεταλλικό στέλεχος και από ένα συρμάτινο υποστήριγμα για να αποκαθίσταται η σύνδεση με το σύστημα μετρήσεως της δύναμης (βλέπε σχήμα).

Σχήμα

Σώμα μετρήσεως

(Όλες οι διαστάσεις εκφρασμένες σε mm)



1.6.4.1.4. Δοχείο μετρήσεως

Το δοχείο μετρήσεως που περιέχει το διάλυμα το οποίο πρόκειται να μετρηθεί θα είναι ένα γυάλινο δοχείο με ελεγχόμενη θερμοκρασία. Θα σχεδιαστεί έτσι ώστε κατά τη διάρκεια της μετρήσεως η θερμοκρασία του προς έλεγχο υγρού διαλύματος και η αέρια φάση πάνω από την επιφάνειά του να παραμένουν σταθερές και το δείγμα να μη μπορεί να εξατμίζεται. Κυλινδρικά γυάλινα δοχεία που έχουν εσωτερική διάμετρο όχι μικρότερη των 45 mm είναι αποδεκτά.

1.6.4.2. Προετοιμασία της συσκευής

1.6.4.2.1. Καθαρισμός

Τα γυάλινα δοχεία πρέπει να καθαρίζονται προσεκτικά. Εάν είναι ανάγκη θα πλύνονται με ζεστό χρωμοθειικό οξύ και μετά με σιροποειδές φωσφορικό οξύ (83—98 % κατά βάρος H_3PO_4), θα ξεπλύνονται πλήρως με τρεχούμενο νερό και τελικά θα πλύνονται με διπλά απεσταγμένο νερό μέχρι ουδέτερης αντιδράσεως, στη συνέχεια θα ξηραίνονται ή θα ξεπλύνονται με μέρος από το υγρό που πρόκειται να μετρηθεί.

Ο δακτύλιος θα ξεπλύνεται πλήρως με νερό για την απομάκρυνση κάθε ουσίας διαλυτής στο νερό, θα βυθίζεται για λίγο σε χρωμοθειικό οξύ, θα πλύνεται με διπλά απεσταγμένο νερό μέχρι ουδέτερης αντιδράσεως και τελικά θα θερμαίνεται σύντομα πάνω από φλόγα μεθανόλης.

Σημείωση

Οι τυχόν ουσίες που δεν διαλύονται ή δεν καταστρέφονται με χρωμοθειικό ή φωσφορικό οξύ, όπως οι σιλικόνες, θα πρέπει να απομακρύνονται με τη βοήθεια ενός κατάλληλου οργανικού διαλύτη.

1.6.4.2.2. Βαθμονόμηση της συσκευής

Η επαλήθευση της συσκευής συνίσταται στην επαλήθευση του μηδενικού σημείου ρυθμίζοντάς το έτσι ώστε η ένδειξη του οργάνου να επιτρέπει αξιόπιστο προσδιορισμό σε mN/m.

Συναρμολόγηση:

Η συσκευή οριζοντιώνεται, π.χ. με τη βοήθεια μιας στάθμης οινοπνεύματος στη βάση του μετρητή της τάσεως, ρυθμίζοντας τις βίδες οριζοντιώσεως στη βάση.

Ρύθμιση του μηδενικού σημείου:

Μετά τη συναρμολόγηση του δακτυλίου στη συσκευή και πριν αυτός να βυθιστεί στο υγρό, θα ρυθμιστεί η ένδειξη του μετρητή της τάσεως στο μηδέν και θα ελεγχθεί ότι ο δακτύλιος είναι παράλληλος προς την επιφάνεια του υγρού. Για το σκοπό αυτό, η υγρή επιφάνεια μπορεί να χρησιμεύσει σαν καθρέφτης.

Βαθμονομήσεις:

Ο έλεγχος βαθμονομήσεως μπορεί να γίνει με μία από τις δύο παρακάτω μεθόδους:

α) χρησιμοποίηση μιας μάζας: μέθοδος που χρησιμοποιεί ιππείς γνωστής μάζας μεταξύ 0,1 g και 1,0 g που τοποθετούνται πάνω στο δακτύλιο. Ο παράγων βαθμονομήσεως Φ_a, με τον οποίο πρέπει να πολλαπλασιάζονται όλες οι αναγνώσεις του οργάνου, θα καθορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (1):

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

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

m = μάζα του ιππέα (g),

g = επιτάχυνση βαρύτητας (981 cm · s^{-2} στην επιφάνεια της θάλασσας),

b = μέση περιφέρεια του δακτύλιου (cm),

σ_a = ανάγνωση του μετρητή τάσεως μετά την τοποθέτηση του ιππέα πάνω στο δακτύλιο (mN/m).

β) χρησιμοποίηση νερού: μέθοδος που χρησιμοποιεί καθαρό νερό, του οποίου η επιφανειακή τάση π.χ. στους 23 °C είναι ίση με 72,3 mN/m. Αυτή η μέθοδος εκτελείται πιο γρήγορα από τη βαθμονόμηση βάρους, αλλά υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να αλλοιωθεί η επιφανειακή τάση του νερού από ίχνη επιφανειακά ενεργών ουσιών.

Ο παράγων βαθμονομήσεως Φ_b, με τον οποίο πρέπει να πολλαπλασιάζονται όλες οι ενδείξεις του οργάνου, πρέπει να προσδιορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (2):

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

όπου:

σ_o = τιμή αναφερόμενη στη βιβλιογραφία για την επιφανειακή τάση του νερού mN/m),

σ = μετρηθείσα τιμή της επιφανειακής τάσεως του νερού (mN/m),

και οι δύο στην ίδια θερμοκρασία.

1.6.4.3. Παρασκευή των δειγμάτων

Θα παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα των ουσιών που πρόκειται να εξεταστούν, χρησιμοποιώντας τις απαιτούμενες συγκεντρώσεις στο νερό και δε θα πρέπει να περιέχουν αδιάλυτες ουσίες.

Το διάλυμα πρέπει να διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία (± 0,5 °C). Εάν η επιφανειακή τάση ενός διαλύματος εντός του δοχείου μετρήσεως μεταβάλλεται με το χρόνο, πρέπει να εκτελούνται μερικές

μετρήσεις σε διάφορους χρόνους και να χαράσσεται μια καμπύλη της επιφανειακής τάσεως σαν συνάρτηση του χρόνου. Όταν δεν παρατηρείται περαιτέρω μεταβολή, έχει επιτευχθεί μια κατάσταση ισορροπίας.

Σκόνη ή αέρια επιμόλυνση από άλλες ουσίες επηρεάζει τη μέτρηση. Γι' αυτό η εργασία θα πρέπει να γίνεται σ' αυτή την περίπτωση κάτω από προστατευτικό κάλυμμα.

1.6.5. *Συνθήκες ελέγχου*

Η μέτρηση θα εκτελείται στους 20 °C περίπου και θα ελέγχεται εντός ± 0,5 °C.

1.6.6. *Εκτέλεση του ελέγχου*

Τα διαλύματα που πρόκειται να μετρηθούν φέρονται στο προσεκτικά καθαρισμένο δοχείο μετρήσεως, προσέχοντας να αποφευχθεί τυχόν αφρισμός, και μετά το δοχείο μετρήσεως τοποθετείται στο τραπέζι της συσκευής. Το άνω μέρος του τραπεζιού με το δοχείο μετρήσεως ανυψώνεται μέχρις ότου ο δακτύλιος να βυθιστεί κάτω από την επιφάνεια του διαλύματος που πρόκειται να μετρηθεί. Μετά χαμηλώνεται βαθμιαία και ομαλά (με μια ταχύτητα περίπου 0,5 cm/min) για να αποσπαστεί ο δακτύλιος από την επιφάνεια μέχρις ότου επιτευχθεί η μέγιστη δύναμη. Η υγρή στοιβάδα που είναι προσκολλημένη στο δακτύλιο δεν πρέπει να αποχωριστεί από το δακτύλιο. Μετά το τέλος των μετρήσεων, ο δακτύλιος βυθίζεται πάλι κάτω από την επιφάνεια και οι μετρήσεις θα επαναλαμβάνονται μέχρις ότου επιτευχθεί μια σταθερή τιμή επιφανειακής τάσεως. Ο χρόνος από τη μεταφορά του διαλύματος στο δοχείο μετρήσεως καταγράφεται για κάθε προσδιορισμό. Οι αναγνώσεις λαμβάνονται στη μέγιστη δύναμη που απαιτείται προκειμένου να αποσπαστεί ο δακτύλιος από την υγρή επιφάνεια.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Προκειμένου να υπολογιστεί η επιφανειακή τάση, η τιμή αναγνώσεως, σε mN/m στη συσκευή, θα πολλαπλασιάζεται πρώτα με τον παράγοντα βαθμονομήσεως Φ_a ή Φ_b (που εξαρτάται από τη μέθοδο βαθμονομήσεως που έχει χρησιμοποιηθεί). Αυτό θα δώσει μια τιμή που ισχύει μόνο κατά προσέγγιση και γι' αυτό απαιτείται διόρθωση.

Οι Harkins και Jordan (3) έχουν εμπειρικά καθορίσει παράγοντες διορθώσεως για τις τιμές της επιφανειακής τάσεως που μετράται με τη μέθοδο του δακτυλίου και που εξαρτώνται από τις διαστάσεις του δακτυλίου, την πυκνότητα του υγρού και την επιφανειακή του τάση.

Επειδή είναι κουραστικό να προσδιορίζεται ο συντελεστής διορθώσεως από τους πίνακες των Harkins και Jordan για κάθε ξεχωριστή μέτρηση, προκειμένου να υπολογίζεται η επιφανειακή τάση στα υδατικά διαλύματα, μπορεί να χρησιμοποιείται η απλοποιημένη μέθοδος αναγνώσεως των διορθωμένων τιμών της επιφανειακής τάσεως απευθείας από τον πίνακα που ακολουθεί. (Για αναγνώσεις που περιλαμβάνονται μεταξύ των τιμών του πίνακα θα χρησιμοποιείται η μέθοδος υπολογισμού ενδιάμεσων τιμών).

ΠΙΝΑΚΑΣ: ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΘΕΙΣΑΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΑΣΕΩΣ

Μόνο για υδατικά διαλύματα, $\rho \simeq 1$ g/cm³

R = 9,55 mm (μέσος όρος ακτίνας δακτυλίου),

r = 0,185 mm (ακτίνα του σύρματος του δακτυλίου).

Πειραματική τιμή (mN/m)	Διορθωμένη τιμή (mN/m)	
	Βάρος βαθμονομήσεως [βλέπε σημείο 1.6.4.2.2 (α)]	Νερό βαθμονομήσεως [βλέπε σημείο 1.6.4.2.2 (β)]
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	—

Ο πίνακας αυτός έγινε με βάση τη διόρθωση των Harkins-Jordan και είναι παρόμοιος με εκείνον του DIN Standard (DIN 53914) για το νερό και τα υδατικά διαλύματα (πυκνότητα $\rho = 1$ g/cm³) και ισχύει για δακτύλιο του εμπορίου που να έχει διαστάσεις R = 9,55 mm (μέση ακτίνα δακτυλίου) και r = 0,185 mm (ακτίνα του σύρματος του δακτυλίου). Ο πίνακας παρέχει τις διορθωμένες τιμές για τις μετρήσεις της επιφανειακής τάσεως που λαμβάνονται μετά από τη βαθμονόμηση με βάρη ή τη βαθμονόμηση με νερό.

Εναλλακτικά, χωρίς την προηγούμενη βαθμονόμηση, η επιφανειακή τάση μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

F = η δύναμη που μετράται με δυναμόμετρο στο σημείο που θραύεται η μεμβράνη,

R = η ακτίνα του δακτυλίου,

f = ο συντελεστής διορθώσεως (1).

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Η έκθεση αυτή πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τουλάχιστον τις ακόλουθες πληροφορίες:

— τη χρησιμοποιηθείσα μέθοδο: την εναρμονισμένη με τον ISO ή τον ΟΟΣΑ μέθοδο μετρήσεως της τάσεως με δακτύλιο,

— τον τύπο του χρησιμοποιηθέντος νερού ή διαλύματος,

— την ακριβή προδιαγραφή της ουσίας (ταυτότητα και ξένες προσμείξεις),

— τα αποτελέσματα μετρήσεως: επιφανειακή τάση (ανάγνωση) που να περιλαμβάνει τις ξεχωριστές αναγνώσεις και τον αριθμητικό τους μέσο όρο, όσο και τη διορθωμένη μέση τιμή (λαμβάνοντας υπόψη τον παράγοντα της συσκευής και τον πίνακα διορθώσεως),

— τη συγκέντρωση του διαλύματος,

— τη θερμοκρασία του ελέγχου,

— την παλαιότητα του χρησιμοποιηθέντος διαλύματος, ιδιαίτερα το χρόνο μεταξύ παρασκευής και μετρήσεως του διαλύματος,

— περιγραφή της εξαρτήσεως από το χρόνο της επιφανειακής τάσεως μετά από τη μεταφορά του διαλύματος στο δοχείο μετρήσεως,

— κάθε πληροφορία και παρατηρήσεις σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να αναφέρονται, ειδικότερα οι σχετικές με τις ξένες προσμείξεις και τη φυσική κατάσταση της ουσίας.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

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

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

Α. 6. ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΝΕΡΟ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Οι περιγραφόμενες μέθοδοι βασίζονται στην κατευθυντήρια δοκιμασία του ΟΟΣΑ (1).

1.1. **Εισαγωγή**

Είναι χρήσιμο να υπάρχει προκαταρκτική πληροφορία για το συντακτικό τύπο, την τάση ατμών, τη σταθερά διαστάσεως και την υδρόλυση (σαν συνάρτηση του pH) της ουσίας, για την εκτέλεση του ελέγχου αυτού.

Δεν υπάρχει ενιαία μέθοδος που να καλύπτει όλη την περιοχή των διαλυτοτήτων στο νερό.

Η μέθοδος δεν εφαρμόζεται σε πτητικές ουσίες.

Οι δύο μέθοδοι δοκιμασίας που περιγράφονται παρακάτω καλύπτουν όλη την περιοχή διαλυτοτήτων:

— μία που εφαρμόζεται στις βασικά καθαρές ουσίες με χαμηλή διαλυτότητα ($< 10^{-2}$ g/l) και που είναι σταθερές στο νερό, η οποία αναφέρεται σαν «μέθοδος εκλούσεως στήλης»,

— η άλλη, που εφαρμόζεται στις βασικά καθαρές ουσίες με υψηλότερες διαλυτότητες ($> 10^{-2}$ g/l) και που είναι σταθερές στο νερό, η οποία αναφέρεται σαν «μέθοδος φιάλης».

Η διαλυτότητα στο νερό της ελεγχόμενης ουσίας μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από την παρουσία ξένων προσμείξεων.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Η διαλυτότητα στο νερό μιας ουσίας ορίζεται σαν η συγκέντρωση της μάζας κορεσμού της ουσίας στο νερό σε μια δεδομένη θερμοκρασία. Η διαλυτότητα στο νερό ορίζεται σε μονάδες μάζας ανά όγκο του διαλύματος. Η μονάδα SI είναι kg/m^3 (g/l μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Οι ουσίες αναφοράς δεν χρειάζεται να χρησιμοποιούνται σε όλες τις περιπτώσεις όταν ερευνάται μια νέα ουσία. Θα μπορούσε πρωταρχικά να χρησιμεύουν από καιρού σε καιρό για τον έλεγχο εκτελέσεως της μεθόδου, και για να προσφέρουν τη δυνατότητα συγκρίσεως των αποτελεσμάτων όταν εφαρμόζεται μια άλλη μέθοδος.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Η κατά προσέγγιση ποσότητα του δείγματος και ο αναγκαίος χρόνος για να επιτευχθεί η συγκέντρωση της μάζας κορεσμού θα μπορούσε να προσδιοριστεί σε μια απλή προκαταρκτική δοκιμασία.

1.4.1. *Μέθοδος στήλης εκλούσεως*

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην έκλουση της ελεγχόμενης ουσίας με νερό από μια μικροστήλη η οποία γεμίζεται με ένα αδρανές υλικό πληρώσεως, όπως υάλινα σφαιρίδια, silica gel ή άμμο και μια περίσσεια από την ελεγχόμενη ουσία. Η διαλυτότητα στο νερό προσδιορίζεται όταν η συγκέντρωση της μάζας του εκλούσματος είναι σταθερή. Αυτό φαίνεται από μια οριζόντια συγκέντρωση σαν συνάρτηση του χρόνου.

1.4.2. *Μέθοδος φιάλης*

Σ' αυτή τη μέθοδο, η ουσία (οι στερεές πρέπει να κονιοποιούνται) διαλύεται στο νερό σε μια θερμοκρασία λίγο ανώτερη από τη θερμοκρασία του ελέγχου. Όταν ο κορεσμός έχει πραγματοποιηθεί, το μείγμα ψύχεται και διατηρείται στη θερμοκρασία της δοκιμασίας, αναδεύοντας όσο είναι αναγκαίο για να επιτευχθεί η ισορροπία (2). Ακολούθως, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της μάζας της ουσίας στο υδατικό διάλυμα, το οποίο δεν πρέπει να περιέχει αδιάλυτα σωματίδια, με μια κατάλληλη αναλυτική μέθοδο.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

1.5.1. *Επαναληψιμότητα*

Για τη μέθοδο εκλούσεως στήλης μπορεί να ληφθεί < 30 %. Για τη μέθοδο φιάλης θα μπορούσε να παρατηρηθεί < 15 %.

1.5.2. *Ευαισθησία*

Αυτή εξαρτάται από τη μέθοδο αναλύσεως, αλλά μπορεί να επιτευχθούν προσδιορισμοί συγκεντρώσεως μάζας της τάξεως τουλάχιστον των 10^{-6} g/l.

1.6. **Περιγραφή της μέθοδου**

1.6.1. *Συνθήκες ελέγχου*

Η δοκιμασία διεξάγεται κατά προτίμηση σε 20 °C ± 0,5 °C. Εάν υποψιαζόμαστε μια εξάρτηση της διαλυτότητας από τη θερμοκρασία (>3 %/°C), θα ήταν δυνατόν να χρησιμοποιηθούν επίσης δύο άλλες θερμοκρασίες, τουλάχιστον 10 °C πάνω και κάτω από τη θερμοκρασία που είχε επιλεγεί αρχικά. Σ' αυτή την περίπτωση ο έλεγχος της θερμοκρασίας θα ήταν ± 0,1 °C. Η θερμοκρασία που έχει επιλεγεί θα μπορούσε να διατηρείται σταθερή σε όλα τα σχετικά μέρη της συσκευασίας.

1.6.2. *Προκαταρκτική δοκιμασία*

Σε 0,1 g του δείγματος περίπου (οι στερεές ουσίες πρέπει να κονιοποιούνται) προστίθενται, σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο με γυάλινο πώμα, αυξανόμενοι όγκοι απεσταγμένου νερού σε θερμοκρασία δωματίου, σύμφωνα με το σχήμα του παρακάτω πίνακα.

0,1 g διαλυτά σε «x» ml νερού	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Κατά προσέγγιση διαλυτότητα (g/l)	> 1 000	1 000—200	200—100	100—50	50—10	10—1	< 1

Μετά από κάθε προσθήκη της ποσότητας νερού που ενδείκνυται, το μείγμα ανακινείται δυνατά για 10 λεπτά και εξετάζεται οπτικά για τυχόν αδιάλυτα μέρη του δείγματος. Εάν μετά από την προσθήκη 10 ml νερού, το δείγμα ή μέρος από αυτό παραμένει αδιάλυτο, το περιεχόμενο του ογκομετρικού κυλίνδρου μεταφέρεται σε έναν όγκομετρικό κύλινδρο των 100 ml, ο οποίος γεμίζεται με νερό μέχρι τα 100 ml και ανακινείται. Σε μικρότερες διαλυτότητες, ο χρόνος που απαιτείται για να διαλυθεί μια ουσία μπορεί να είναι σημαντικά μακρύτερος (24 ώρες θα ήταν δυνατόν να επιτρέπονται). Η κατά προσέγγιση διαλυτότητα δίνεται στον πίνακα κάτω από τον όγκο του προστιθέμενου νερού, με τον οποίο το δείγμα διαλύεται πλήρως. Εάν η ουσία είναι ακόμα φαινομενικά αδιάλυτη, θα μπορούσε να επιχειρηθεί περαιτέρω αραίωση για να επιβεβαιωθεί ποια μέθοδος διαλυτότητας θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί, η έκλουση στήλης ή η μέθοδος της φιάλης.

1.6.3. *Μέθοδος εκλούσεως στήλης*

1.6.3.1. Υλικό πληρώσεως, διαλύτης και υγρό εκλούσεως

Το υλικό πληρώσεως για τη μέθοδο εκλούσεως στήλης θα πρέπει να είναι αδρανές. Πιθανά υλικά, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν, είναι γυάλινα σφαιρίδια και silica. Ένας κατάλληλος πτητικός διαλύτης (αναλυτικής καθαρότητας) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά της ουσίας που πρόκειται να δοκιμαστεί στο υλικό πληρώσεως. Διπλά απεσταγμένο νερό από γυάλινη ή χαλαζιακή συσκευή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν υγρό εκλούσεως ή σαν διαλύτης.

Σημείωση

Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό απευθείας από ανταλλάκτη οργανικών ιόντων.

1.6.3.2. Φόρτιση του υλικού πληρώσεως

Περίπου 600 mg του υλικού πληρώσεως ζυγίζεται και μεταφέρεται σε μια φιάλη με στρογγυλό πυθμένα των 50 ml.

Μια κατάλληλη, ζυγισθείσα, ποσότητα της υπό εξέταση ουσίας διαλύεται στο διαλύτη που έχει επιλεγεί. Μια ορισμένη ποσότητα του διαλύματος της υπό εξέταση ουσίας προστίθεται στο υλικό πληρώσεως. Ο διαλύτης πρέπει να εξατμισθεί πλήρως, π.χ. σε συσκευή υπό κενό. Διαφορετικά, ο κορεσμός με νερό του υλικού πληρώσεως δεν επιτυγχάνεται λόγω φαινομένων κατανομής στην επιφάνεια του υλικού πληρώσεως.

Η φόρτιση του υλικού πληρώσεως μπορεί να προκαλέσει προβλήματα (εσφαλμένα αποτελέσματα) εάν η ελεγχόμενη ουσία εναποτίθεται σαν έλαιο ή σαν διαφορετική κρυσταλλική φάση. Το πρόβλημα θα έπρεπε να εξετάζεται πειραματικά.

Το φορτισμένο υλικό πληρώσεως αφήνεται να εμποτισθεί για δύο περίπου ώρες σε 5 ml νερού και μετά το αιώρημα μεταφέρεται στη μικροστήλη. Εναλλακτικά, ξηρό φορτισμένο υλικό πληρώσεως μεταφέρεται στη μικροστήλη, η οποία έχει γεμίσει με νερό, και αφήνεται να ισορροπήσει για δύο ώρες περίπου.

Πορεία του ελέγχου:

Η έκλουση της ουσίας από το υλικό πληρώσεως μπορεί να διεξαχθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους:

— αντλία ανακυκλώσεως (βλέπε σχήμα 1).

— δοχείο αντισταθμίσεως (βλέπε σχήμα 4),

1.6.3.3. Μέθοδος εκλούσεως στήλης με αντλία ανακυκλώσεως

Συσκευή:

Μια σχηματική διάταξη ενός τυπικού συστήματος παρουσιάζεται στο σχήμα 1. Μια κατάλληλη μικροστήλη εικονίζεται στο σχήμα 2, αν και κάθε μέγεθος είναι αποδεκτό, αρκεί να πληροί τα κριτήρια αναπαραγωγιμότητας και ευαισθησίας. Η στήλη θα φέρει στο πάνω μέρος ένα χώρο εισαγωγής που θα έχει όγκο τουλάχιστον πέντε φορές τον βασικό όγκο της στήλης νερού και, επιπλέον, τουλάχιστον πέντε φορές τον όγκο του δείγματος. Εναλλακτικά, το μέγεθος μπορεί να μειωθεί, εάν χρησιμοποιείται συμπληρωματικός διαλύτης για να αντικαταστήσει τους αρχικούς πέντε βασικούς όγκους που έχουν απομακρυνθεί μαζί με τις ξένες προσμείξεις.

Η στήλη θα συνδέεται με μια αντλία ανακυκλώσεως ικανής να ελέγχει ροές περίπου 25 ml/ώρα. Η αντλία συνδέεται με συνδέσεις από πολυτετραφθοροαιθυλένιο ή/και γυαλί. Κατά τη συναρμολόγηση της στήλης και της αντλίας, θα προβλεφθεί η δυνατότητα δειγματοληψίας του εκλούσματος και της εξισορροπήσεως του χώρου εισαγωγής με την ατμοσφαιρική πίεση. Το υλικό της στήλης υποβαστάζεται με ένα μικρό βύσμα (5 mm) από υαλοβάμβακα, το οποίο χρησιμεύει, επίσης, για τη διήθηση των σωματιδίων. Η αντλία ανακυκλώσεως μπορεί π.χ. να είναι μια περισταλτική αντλία (πρέπει να ληφθεί φροντίδα ώστε να μη συμβεί μόλυνση ή προσρόφηση με το υλικό του σωλήνα) ή μια αντλία μεμβράνης.

Πορεία μετρήσεως:

Η ροή διά μέσου της στήλης αρχίζει. Συνιστάται να χρησιμοποιείται μια ταχύτητα ροής περίπου 25 ml/ώρα (περίπου 10 φορές ο βασικός όγκος της στήλης ανά ώρα, για τη στήλη που περιγράφεται). Οι πρώτοι πέντε βασικοί όγκοι (κατ' ελάχιστο) απορρίπτονται για να απομακρυνθούν οι υδατοδιαλυτές ξένες προσμείξεις. Μετά απ' αυτό, η αντλία ανακυκλώσεως τίθεται σε λειτουργία μέχρι να αποκατασταθεί ισορροπία, όπως καθορίζεται από πέντε διαδοχικά δείγματα των οποίων οι συγκεντρώσεις δεν διαφέρουν πάνω από ± 30 % κατά τυχαίο τρόπο. Τα δείγματα αυτά θα χωρίζονται μεταξύ τους με χρονικά διαστήματα που θα αντιστοιχούν με το πέρασμα τουλάχιστον δέκα βασικών όγκων του υγρού εκλούσεως.

1.6.3.4. Μέθοδος εκλούσεως στήλης με δοχείο σταθμίσεως

Συσκευή (βλέπε σχήματα 4 και 3):

Δοχείο σταθμίσεως: Η σύνδεση με το δοχείο σταθμίσεως γίνεται με τη χρησιμοποίηση ενός γυάλινου εσμυρισμένου συνδέσμου ο οποίος συνδέεται με σωληνώσεις PTFE. Συνιστάται η χρησιμοποίηση μιας ταχύτητας ροής περίπου 25 ml/ώρα. Θα συλλέγονται διαδοχικά κλάσματα εκλούσεως και θα αναλύονται με τη μέθοδο που έχει επιλεγεί.

Πορεία μετρήσεως:

Προκειμένου να προσδιοριστεί η διαλυτότητα στο νερό, χρησιμοποιούνται κλάσματα από τη μέση περιοχή του εκλούσματος, όπου οι συγκεντρώσεις είναι σταθερές (± 30 %) για τουλάχιστον πέντε διαδοχικά κλάσματα.

Ένα δεύτερο πέρασμα εκτελείται στο ήμισυ της ταχύτητας ροής του πρώτου. Εάν τα αποτελέσματα των δύο περασμάτων συμφωνούν, η δοκιμασία είναι ικανοποιητική. Εάν υπάρχει μεγαλύτερη φαινομενική διαλυτότητα με τη χαμηλότερη ταχύτητα ροής, τότε η διχοτόμηση της ταχύτητας ροής πρέπει να συνεχιστεί, μέχρις ότου δύο διαδοχικά περάσματα δώσουν την ίδια διαλυτότητα.

Και στις δύο περιπτώσεις (χρησιμοποιώντας μια αντλία ανακυκλώσεως ή ένα δοχείο σταθμίσεως) τα κλάσματα θα πρέπει να ελέγχονται για την παρουσία κολλοειδούς ουσίας με εξέταση του φαινομένου Tyndall (διάχυση του φωτός). Η παρουσία τέτοιων σωματιδίων ακυρώνει τα αποτελέσματα και η δοκιμασία θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, επαυξάνοντας τη διηθητική ικανότητα της στήλης. Το pH κάθε δείγματος θα πρέπει να καταγράφεται. Ένα δεύτερο πέρασμα θα πρέπει να εκτελείται στην ίδια θερμοκρασία.

1.6.4. *Μέθοδος φιάλης*

1.6.4.1. Συσκευή

Για τη μέθοδο φιάλης απαιτείται το παρακάτω υλικό:

— κανονικός εξοπλισμός εργαστηρίου σε γυάλινα σκεύη και σε όργανα,

— κατάλληλος μηχανισμός για την ανατάραξη των διαλυμάτων κάτω από ελεγχόμενες σταθερές θερμοκρασίες,

— μια φυγόκεντρος (κατά προτίμηση θερμοστατούμενη), εάν κρίνεται αναγκαίο με γαλακτώματα, και

— εξοπλισμός για αναλυτικό προσδιορισμό.

1.6.4.2. Πορεία μετρήσεως

Η αναγκαία ποσότητα υλικού, για να κορεστεί ο επιθυμητός όγκος νερού, εκτιμάται από την προκαταρκτική δοκιμασία. Ο όγκος του απαιτούμενου νερού θα εξαρτάται από την αναλυτική μέθοδο και από την περιοχή διαλυτότητας. Ζυγίζεται περίπου πέντε φορές η ποσότητα του υλικού που έχει καθοριστεί παραπάνω, σε κάθε ένα από τα τρία γυάλινα δοχεία με γυάλινα πώματα (π.χ. σωλήνες φυγοκέντρου, φιάλες). Προστίθεται σε κάθε δοχείο ο όγκος νερού που έχει επιλεγεί και τα δοχεία κλείνονται γερά. Τα κλειστά δοχεία αναταράσσονται μετά στους 30 °C. (Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένας μηχανισμός αναταράξεως ή αναδεύσεως ικανός να λειτουργεί σε σταθερή θερμοκρασία, π.χ. μαγνητικός αναδευτήρας σε ένα θερμοστατικά ελεγχόμενο υδρόλουτρο). Μετά από μία ημέρα το ένα από τα δοχεία απομακρύνεται και ισορροπείται ξανά για 24 ώρες στη θερμοκρασία του ελέγχου με ευκαιριακή ανάδευση. Τα περιεχόμενα του δοχείου φυγοκεντρούνται μετά στη θερμοκρασία του ελέγχου και η συγκέντρωση της ουσίας στην καθαρή υδατική φάση προσδιορίζεται με μια κατάλληλη αναλυτική μέθοδο. Οι άλλες δύο φιάλες υφίστανται την ίδια κατεργασία μετά από μια αρχική εξισορρόπηση στους 30 °C για δύο έως τρεις ημέρες, αντίστοιχα. Εάν τα αποτελέσματα της συγκεντρώσεως από τα δύο τουλάχιστον τελευταία δοχεία συμφωνούν με την απαιτούμενη αναπαραγωγιμότητα, η δοκιμασία είναι ικανοποιητική. Όλη η δοκιμασία θα επαναλαμβάνεται με μεγαλύτερους χρόνους εξισορροπήσεως, εάν τα αποτελέσματα από τα δοχεία 1, 2 και 3 δείχνουν μια τάση αυξήσεως των τιμών.

Το pH κάθε δείγματος θα πρέπει να καταγράφεται.

1.6.5. *Ανάλυση*

Μια ειδική αναλυτική μέθοδος για την ουσία προτιμάται για τους προσδιορισμούς αυτούς, αφού μικρές ποσότητες διαλυτών ξένων προσμείξεων μπορούν να προκαλέσουν μεγάλα σφάλματα στη μετρούμενη διαλυτότητα. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων είναι: αέρια ή υγρή χρωματογραφία, μέθοδοι τιτλοδοτήσεως, φωτομετρικές μέθοδοι, βολταμετρικές μέθοδοι.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. **Μέθοδος εκλούσεως στήλης**

Για κάθε πέρασμα θα υπολογίζεται η μέση τιμή και η σταθερή απόκλιση πέντε τουλάχιστον διαδοχικών δειγμάτων που λαμβάνονται από το επίπεδο κορεσμού.

2.2. **Μέθοδος φιάλης**

Τα ξεχωριστά αποτελέσματα θα πρέπει να δίνονται για καθεμιά από τις τρεις φιάλες και τα αποτελέσματα εκείνα που κρίνονται ότι είναι σταθερά (επαναληψιμότητα μικρότερη του 15 %) θα πρέπει να υπολογίζονται κατά μέσον όρο και να δίνονται σε μονάδες μάζας ανά όγκο διαλύματος. Αυτό μπορεί να απαιτήσει τη μετατροπή των μονάδων μάζας σε μονάδες όγκου, χρησιμοποιώντας την πυκνότητα όταν η διαλυτότητα είναι μεγαλύτερη των 100 g/l.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

3.1. **Μέθοδος εκλούσεως στήλης**

Η έκθεση πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει μία ένδειξη των αποτελεσμάτων της προκαταρκτικής δοκιμασίας και, επιπλέον, τις ακόλουθες πληροφορίες:

— ακριβή προδιαγραφή της ουσίας (ταυτότητα και ξένες προσμείξεις),

— τις ατομικές συγκεντρώσεις, ταχύτητες ροής και pH κάθε δείγματος,

— τη μέση και σταθερή απόκλιση πέντε τουλάχιστον δειγμάτων από το επίπεδο κορεσμού κάθε περάσματος,

— τον μέσο όρο δύο διαδοχικών και αποδεκτών περασμάτων,

— τη θερμοκρασία του νερού κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κορεσμού,

— τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο αναλύσεως,

— τη φύση του χρησιμοποιούμενου υλικού πληρώσεως της στήλης,

— τη φόρτιση του υλικού πληρώσεως,

— τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη,

— ενδείξεις για κάθε χημική αστάθεια της ουσίας κατά τη διάρκεια του ελέγχου και τη χρησιμοποιηθείσα μέθοδο,

— κάθε πληροφορία σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Μέθοδος φιάλης**

Η έκθεση πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— ακριβή προδιαγραφή της ουσίας (ταυτότητα και ξένες προσμείξεις),

— τους ξεχωριστούς αναλυτικούς προσδιορισμούς και τον μέσο όρο, όπου έχουν προσδιοριστεί τιμές περισσότερες της μιας για κάθε φιάλη,

— το pH κάθε δείγματος,

— τον μέσο όρο των τιμών για τις διάφορες φιάλες οι οποίες βρίσκονται σε συμφωνία,

— τη θερμοκρασία του ελέγχου,

— τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο.

— ενδείξεις για κάθε χημική αστάθεια της ουσίας κατά τη διάρκεια του ελέγχου και τη χρησιμοποιηθείσα μέθοδο,

— κάθε πληροφορία σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

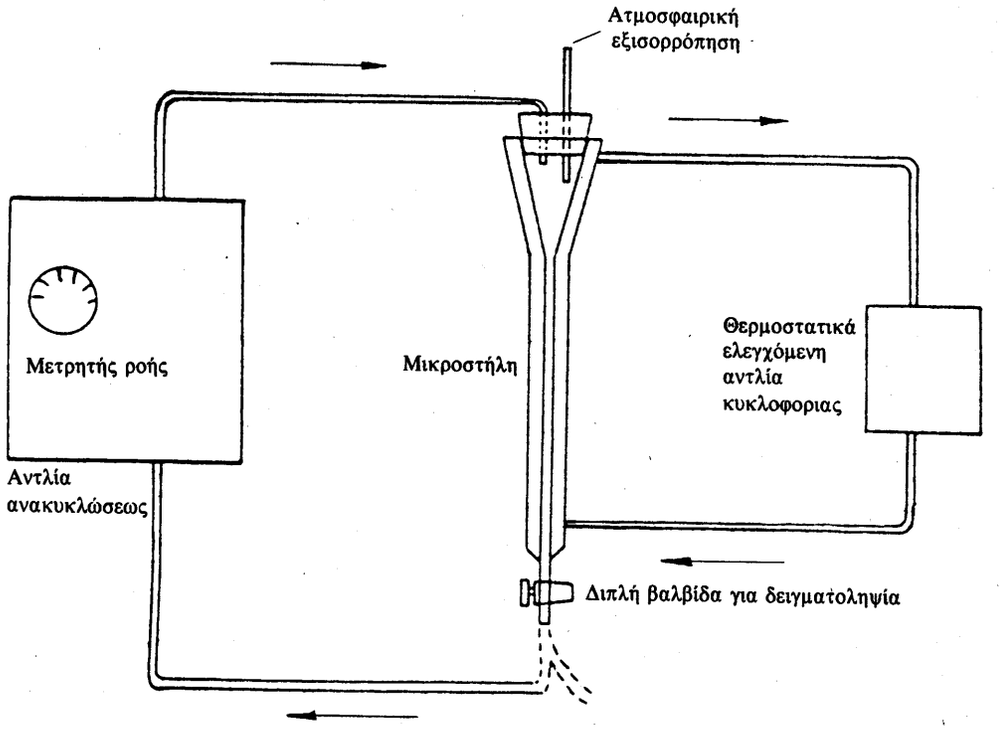
4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(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.

Προσάρτημα

Σχήμα 1

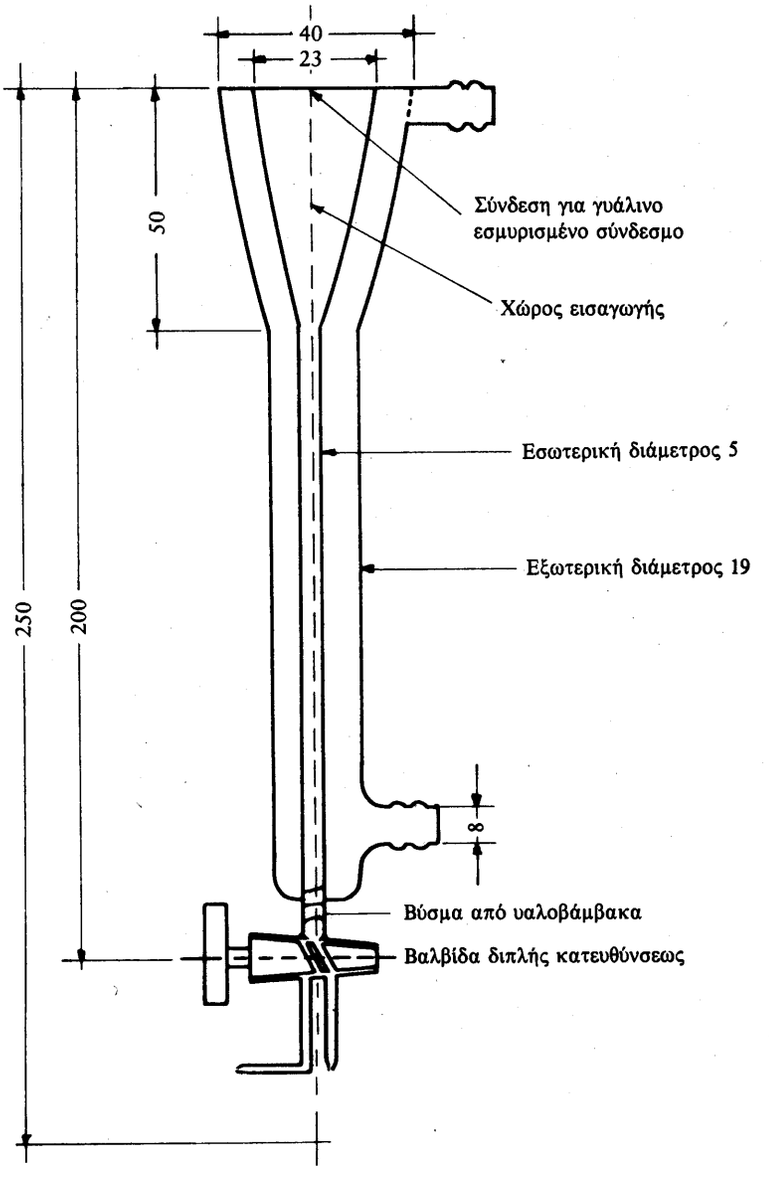
Σχηματική διάταξη του ελέγχου



Σχήμα 2

Μια τυπική μικροστήλη

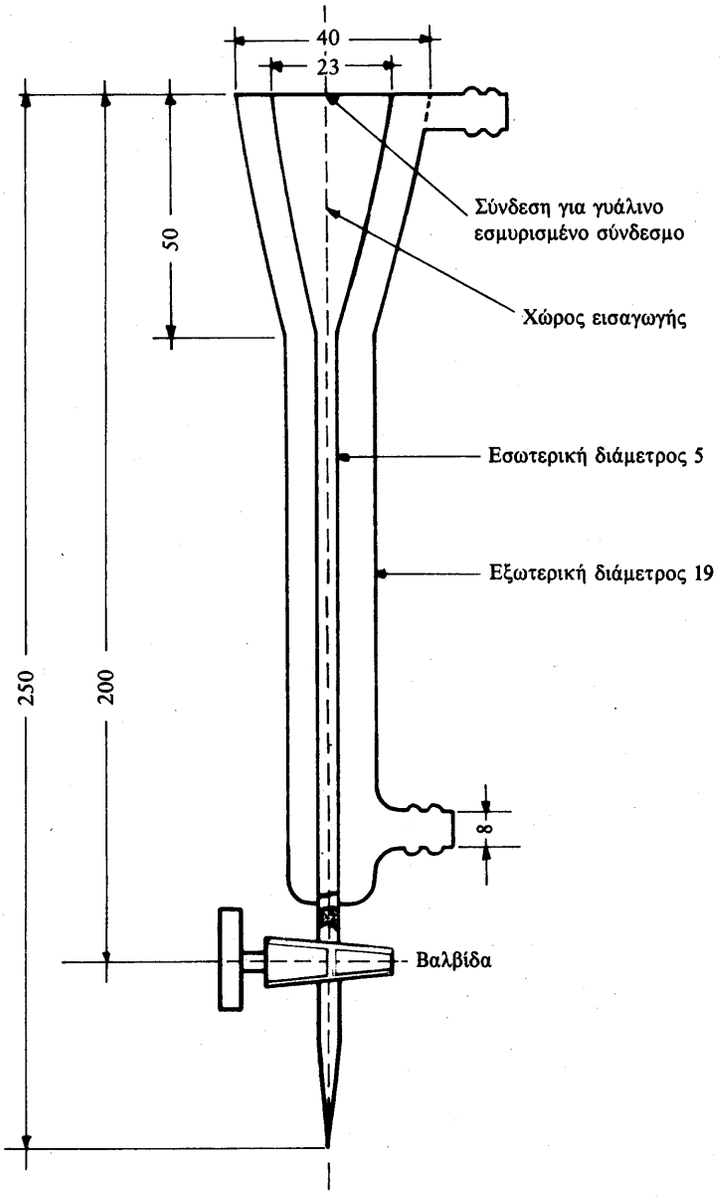
(Όλες οι διαστάσεις σε mm)



Σχήμα 3

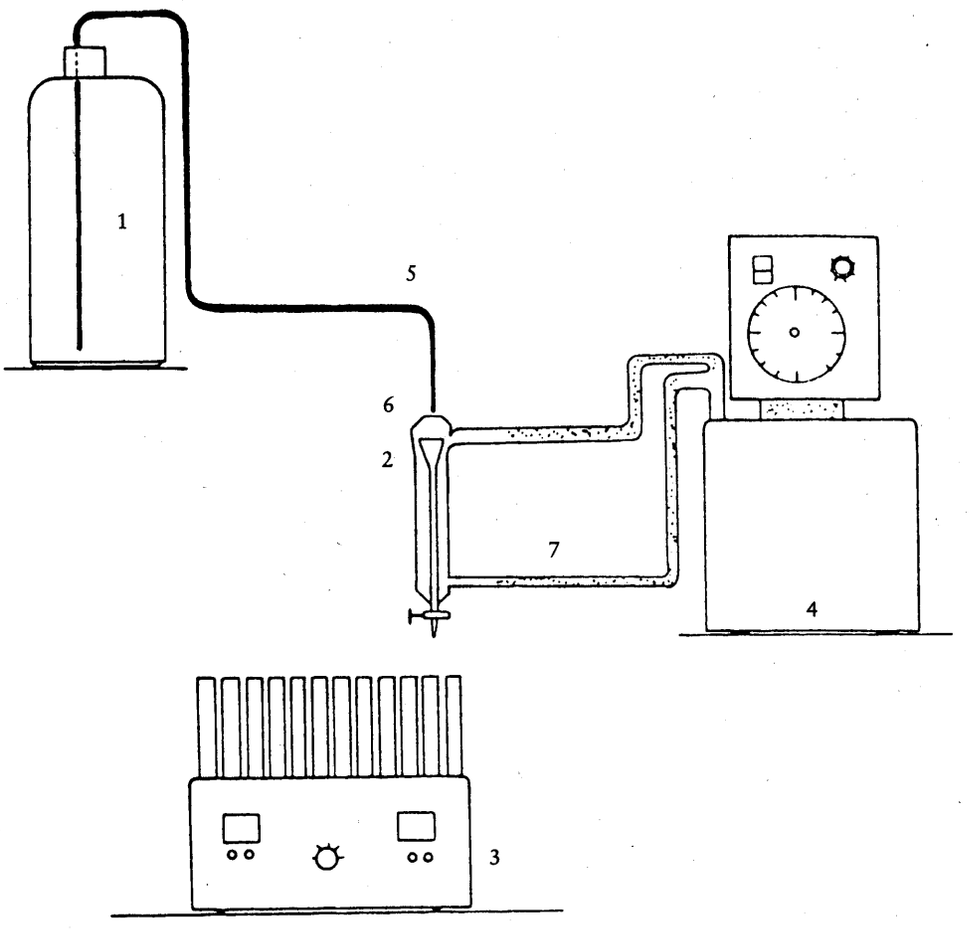
Μια τυπική μικροστήλη

(Όλες οι διαστάσεις σε mm)



Σχήμα 4

Διάταξη ελέγχου για τον προσδιορισμό της διαλυτότητας στο νερό των λίγο διαλυτών, των λίγο πτητικών ουσιών



1 = Δοχείο στάθμισης (π.χ. χημική φιάλη 2,5 λίτρων)
2 = Στήλη (βλέπε σχήμα 3)
3 = Κλασματικός συλλέκτης
4 = Θερμοστάτης
5 = Σωλήνας από τεφλόν
6 = Γυάλινο βύσμα εσμυρισμένο
7 = Σωλήνας νερού (μεταξύ θερμοστάτη και στήλης, εσωτερικής διαμέτρου 8 mm περίπου)

Α. 7. ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΛΙΠΟΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η περιγραφόμενη μέθοδος βασίζεται στην κατευθυντήρια δοκιμασία του ΟΟΣΑ (1).

1.1. Εισαγωγή

Είναι χρήσιμο, για την εκτέλεση της δοκιμασίας αυτής, να υπάρχει προκαταρκτική πληροφορία για το συντελεστή κατανομής, τη διαλυτότητα στο νερό, το συντακτικό τύπο και τη σταθερότητα στους 50 °C της ουσίας. Η μέθοδος είναι εφαρμόσιμη μόνο για εκείνες τις ουσίες που είναι ουσιαστικά καθαρές, οι οποίες είναι σταθερές στους 50 °C και οι οποίες δεν είναι αισθητά πτητικές κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για ουσίες οι οποίες αντιδρούν με τριγλυκερίδια.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Το κλάσμα μάζας μιας ουσίας, η οποία σχηματίζει μια ομοιογενή φάση με ένα υγρό λίπος (έλαιο) χωρίς να προκαλεί χημικές αντιδράσεις, ορίζεται σαν διαλυτότητα στο λίπος. Το μέγιστο αυτού του κλάσματος μάζας ονομάζεται κλάσμα μάζας κορεσμού και αυτό είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας.

Το κλάσμα μάζας κορεσμού μιας ουσίας θα δίνεται σε mg/100 g πρότυπου λίπους στους 37 °C ± 0,5 °C.

Υπάρχει η παρακάτω σχέση μεταξύ της διαλυτότητας σε g ανά 100 g διαλύματος (S′) και της διαλυτότητας σε g ανά 100 g διαλύτη (S):

$$S = \frac{100 \times S'}{100 - S'} \text{ g/100 g πρότυπου λίπους}$$

Ο πολλαπλασιασμός της αξίας του S με το 1 000 δίνει mg/100 g πρότυπου λίπους.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Οι ουσίες αναφοράς δε χρειάζεται να χρησιμοποιούνται σε όλες τις περιπτώσεις που ερευνάται μια νέα ουσία. Θα πρέπει βασικά να χρησιμοποιούνται από καιρού εις καιρό για τον έλεγχο της εκτελέσεως της μεθόδου, και για να προσφέρουν τη δυνατότητα συγκρίσεως των αποτελεσμάτων όταν εφαρμόζεται μια άλλη μέθοδος.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Η ουσία προστίθεται σε «πρότυπο λίπος» και αναδεύεται. Αρκετή ποσότητα της ουσίας προστίθεται ως περίσσεια ασφαλείας. Η διαλυόμενη ποσότητα της ουσίας ελέγχου προσδιορίζεται με μια κατάλληλη αναλυτική μέθοδο.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

1.5.1. *Ειδική εφαρμογή*

Η επαναληψιμότητα της μετρήσεως είναι άγνωστη επί του παρόντος.

Τα αποτελέσματα εφαρμόζονται στα πρότυπα λίπη και είναι κατάλληλα για σχετικά καθαρές ουσίες. Τα λίπη μπορούν να σχηματίζουν γαλακτώματα ή λεπτά αιωρήματα στερεών ουσιών ακόμα και στους 37 °C. Ο σχηματισμός τους θα πρέπει να αποφεύγεται επειδή επηρεάζουν τον προσδιορισμό του κλάσματος μάζας που ακολουθεί.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προπαρασκευή*

1.6.1.1. Συσκευή

Απαιτούνται τα ακόλουθα είδη εξοπλισμού:

— συνήθη εργαστηριακά γυάλινα είδη,

— ζυγός,

— φυγόκεντρος με θερμοστάτη

— αναδευτήρας ο οποίος να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με ένα σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας,

— θερμοστάτης.

1.6.1.2. Πρότυπα λίπη

Η χρησιμοποίηση προτύπων λιπών είναι αναγκαία. Τα πρότυπα αυτά λίπη θα πρέπει να είναι δυνατό να καθορίζονται εύκολα και ένα παράδειγμα ενός τέτοιου προτύπου λίπους δίνεται στο προσάρτημα.

1.6.1.3. Προκαταρκτικός έλεγχος

Θα πρέπει να εκτελείται ένας απλοποιημένος προκαταρκτικός έλεγχος για να προσδιορίζεται η κατά προσέγγιση ποσότητα της ουσίας που είναι αναγκαία για την αποκατάσταση του κλάσματος μάζας κορεσμού στη θερμοκρασία του ελέγχου (37 °C).

Σημείωση

Στην περίπτωση στερεών ουσιών, η ταχύτητα αποκαταστάσεως της ισορροπίας κορεσμού μπορεί να εξαρτάται σημαντικά από το μέγεθος των σωματιδίων. Γι' αυτό το λόγο, τέτοιου είδους υλικά θα πρέπει να κονιοποιούνται.

1.6.1.4. Προπαρασκευή της ουσίας

Οκτώ δείγματα ζυγίζονται μέσα σε φιάλες των 50 ml. Κανονικά, καθένα θα πρέπει να είναι η διπλάσια ποσότητα από αυτή που είναι αναγκαία για τον κορεσμό, όπως έχει προσδιοριστεί στην προκαταρκτική δοκιμασία.

Μετά από την προσθήκη μιας ζυγισμένης ποσότητας περίπου 25 g υγροποιημένου και αναμειχθέντος πρότυπου λίπους, οι φιάλες με προσαρμοσμένους τους αναδευτήρες κλείνονται καλά με γυάλινα εσμυρισμένα πώματα. Τα μισά (ομάδα I) αναδεύονται στους 30 °C, και τα άλλα μισά (ομάδα II) στους 50 °C περίπου, για μία ώρα τουλάχιστον το καθένα.

1.6.2. *Συνθήκες ελέγχου*

Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας στο λίπος διεξάγεται στους 37 °C ± 0,5 °C.

1.6.3. *Πορεία μετρήσεως*

Το περιεχόμενο των φιαλών και στις δύο ομάδες αναδεύεται στους 37 °C ± 0,5 °C μέχρι τέλειας αναμείξεως.

Ο χρόνος αναδεύσεως που απαιτείται για να αποκατασταθεί η ισορροπία δεν μπορεί γενικά να προλεχθεί. Στην περίπτωση υγρών ουσιών, ο κορεσμός μπορεί να επιτευχθεί μέσα σε λεπτά. Στην περίπτωση στερεών ουσιών, μπορεί να απαιτήσει ώρες. Γενικά, δεν απαιτείται ανάδευση πάνω από τρεις ώρες. Μετά από το χρόνο αυτό, η ανάδευση σε δύο από τις φιάλες και των δύο ομάδων θα σταματήσει και οι δύο αυτές φιάλες θα παραμείνουν τουλάχιστον μία ώρα στους 37 °C, για να αποχωριστεί η αδιάλυτη ποσότητα της ουσίας και να σχηματιστεί ομογενής φάση. Στην περίπτωση σχηματισμού γαλακτώματος ή αιωρήματος (π.χ. φαινόμενο Tyndall), αυτό πρέπει να απομακρύνεται με μια κατάλληλη μέθοδο, όπως η θερμοστατούμενη φυγοκέντρηση.

Η τρίτη και τέταρτη φιάλη και στις δύο ομάδες θα πρέπει να αναδεύονται για τουλάχιστον 24 ώρες πριν από την παραμονή τους για μία ώρα στους 37 °C ± 0,5 °C.

Σημείωση

Εάν δεν έχει σχηματιστεί ίζημα στο βυθό (για τις στερεές ουσίες) ή εάν (για τις υγρές ουσίες) δε συμβεί διαχωρισμός φάσεων μετά από αυτή την περίοδο, ο έλεγχος πρέπει να επαναλαμβάνεται με μεγαλύτερη ποσότητα ουσίας.

1.6.4. *Ανάλυση*

Λαμβάνεται για ανάλυση ένα δείγμα από καθεμιά κορεσμένη σε λίπος φάση. Το δείγμα ζυγίζεται και προσδιορίζεται το κλάσμα μάζας.

Μπορεί να εφαρμόζεται κάθε κατάλληλη αναλυτική μέθοδος είτε απευθείας είτε μετά από εκχύλιση με νερό ή έναν οργανικό διαλύτη είτε με οποιαδήποτε άλλη τεχνική διαχωρισμού.

Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων είναι:

— φασματοφωτομετρία,

— αέρια ή υγρή χρωματογραφία,

— βολταμετρία.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Εάν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα, είτε από υπο- ή υπερκορεσμό είτε από σύντομες και μακρές χρονικές περιόδους, ο έλεγχος θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με μακρότερους χρόνους ανάδευσης.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

Οι ακόλουθες πληροφορίες πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνονται στην έκθεση ελέγχου:

— ακριβής προδιαγραφή της ουσίας (ταυτότητα και ξένες προσμείξεις),

— ακριβείς προδιαγραφές του λίπους (π.χ. περιγραφή, χαρακτηριστικά, προέλευση, σύνθεση),

— μέθοδος αναλύσεως, αποκλίσεις και ειδικά χαρακτηριστικά.

Τα αποτελέσματα πρέπει να εκτιμώνται όπως περιγράφεται παραπάνω και αποτελούν μέρος της εκθέσεως ελέγχου. Εάν δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων τιμών που παρατηρούνται σε χιλιοστό του γραμμαρίου ανά 100 γραμμάρια, θα πρέπει να αναφέρονται οι ξεχωριστές τιμές, η μέση τιμή και η σταθερή απόκλιση. Εάν υπάρχουν σημαντικές διαφορές, ακόμα και μετά την επανάληψη του ελέγχου, τότε θα πρέπει να αναφέρονται μόνο τα ξεχωριστά αποτελέσματα·

— κάθε πληροφορία και παρατηρήσεις, σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, θα πρέπει να αναφέρονται.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

Προσάρτημα

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΓΙΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΛΙΠΗ

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει τη σύνθεση ενός τυπικού πρότυπου λίπους.

Κατανομή λιπαρού οξέος

Αριθμός ατόμων C στο τμήμα του λιπαρού οξέος	6	8	10	12	14	16	18	έτερα
Επιφάνειες GLC (%)	0,5	7,5	10,3	50,4	13,9	7,6	8,6	1

Κατανομή γλυκεριδίου

Ολικός αριθμός ατόμων C στα τμήματα των λιπαρών οξέων	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
Επιφάνειες GLC (%)	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

Καθαρότητα

Περιεκτικότητα σε μονογλυκερίδιο (ενζυματικά)	≤	0,1 %
Περιεκτικότητα σε διγλυκερίδιο (ενζυματικά)	≤	0,4 %
Περιεκτικότητα σε ασαπωνοποίητα	≤	0,1 %
Αριθμός Wijs	≤	0,5
Αριθμός οξέος		0,02
Περιεκτικότητα σε νερό (K. Fischer)	≤	0,1 %
Διαυγές σημείο τήξεως		28,5 °C

Τυπικό φάσμα απορροφήσεως (πάχος στοιβάδας d = 1 cm, σύγκριση: νερό, 35 °C)

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

Τουλάχιστον 10 % διαπερατότητα φωτός στα 303 nm

Αυτό το υποκατάστατο λίπους είναι ένα συνθετικό μείγμα κορεσμένων τριγλυκεριδίων με ένα λιπαρό οξύ και με κατανομή τριγλυκεριδίου όμοια με αυτή του λίπους του κοκκοκάρυδου.

Α. 8. ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η περιγραφόμενη μέθοδος βασίζεται στην κατευθυντήρια δοκιμασία του ΟΟΣΑ (1).

1.1. **Εισαγωγή**

Είναι χρήσιμο να υπάρχει προκαταρκτική πληροφορία για τη σταθερά διαστάσεως, τη διαλυτότητα στο νερό και την επιφανειακή τάση της ουσίας, προκειμένου να εκτελεστεί ο έλεγχος αυτός.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται μόνο στη βασικά καθαρή ουσία που είναι διαλυτή στο νερό και στην οκτανόλη. Δεν έχει εφαρμογή για τις επιφανειακά ενεργούς ουσίες.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Ο συντελεστής κατανομής (P) ορίζεται σαν ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας (c_i) μιας διαλυμένης ουσίας σε ένα διφασικό σύστημα, που αποτελείται από διαλύτες οι οποίοι δεν αναμειγνύονται καθόλου.

Στην περίπτωση n-οκτανόλης και νερού

$$P_{ow} = \frac{c_{\text{οκτανόλης}}}{c_{\text{νερού}}}$$

Ο συντελεστής κατανομής (P), λοιπόν, είναι το πηλίκον των δύο συγκεντρώσεων και συνήθως δίνεται υπό τον τύπο του δεκαδικού του λογαρίθμου (log P).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Οι ουσίες αναφοράς δε χρειάζεται να χρησιμοποιούνται σε όλες τις περιπτώσεις όταν ερευνάται μία νέα ουσία. Θα πρέπει να χρησιμεύουν πρώτιστα για τον έλεγχο από καιρού σε καιρό της εκτελέσεως της μεθόδου και για να προσφέρουν τη δυνατότητα συγκρίσεως των αποτελεσμάτων όταν εφαρμόζεται μία άλλη μέθοδος.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο συντελεστής κατανομής, πρέπει να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ όλων των συστατικών του συστήματος που αλληλοεπιδρούν και πρέπει να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των διαλυμένων ουσιών στις δύο φάσεις. Μία μελέτη της βιβλιογραφίας σ' αυτό το θέμα δείχνει ότι υπάρχουν πολλές και διάφορες τεχνικές, οι οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να λύσουν αυτό το πρόβλημα, π.χ. η πλήρης ανάμειξη των δύο φάσεων, που ακολουθείται από το χωρισμό τους, για να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις ισορροπίας της ουσίας που εξετάζεται.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

1.5.1. *Επαναληψιμότητα*

Με σκοπό την εξασφάλιση της ακρίβειας του συντελεστή κατανομής, εκτελούνται διπλοί προσδιορισμοί κάτω από τρεις διαφορετικές συνθήκες ελέγχου, υπό τις οποίες τόσο η ποσότητα της ουσίας που εξετάζεται όσο και ο λόγος των όγκων του διαλύτη μπορούν να διαφέρουν. Οι προσδιοριζόμενες τιμές του συντελεστή κατανομής, που εκφράζονται σαν οι κοινοί λογάριθμοί τους, θα πρέπει να εμπίπτουν σε μία περιοχή ± 0,3 μονάδων log.

1.5.2. *Ευαισθησία*

Η περιοχή μετρήσεως της μεθόδου προσδιορίζεται από το όριο ανιχνεύσεως της αναλυτικής πορείας. Αυτό θα μπορούσε να είναι αρκετό για να επιτρέψει την εκτίμηση τιμών του P_{ow} μέχρι 10^5, όταν η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας, σε καθεμία από τις φάσεις, δεν είναι μεγαλύτερη του 0,01 mol/l.

1.5.3. *Ειδική εφαρμογή*

Ο νόμος κατανομής του Nernst εφαρμόζεται μόνο σε σταθερή θερμοκρασία, πίεση και pH για αραιά διαλύματα. Εφαρμόζεται αυστηρά για μια καθαρή ουσία, διασπαρμένη μεταξύ δύο καθαρών διαλυτών. Εάν συμβούν μερικές διαφορετικές διαλύσεις της ουσίας συγχρόνως σε μία ή και στις δύο φάσεις, αυτό μπορεί να αλλοιώσει τα αποτελέσματα.

Κατά παρέκκλιση από το νόμο κατανομής του Nernst, συμβαίνει διάσταση ή συσσωμάτωση των διαλυμένων μορίων. Τέτοιες αποκλίσεις καταδεικνύονται από το γεγονός ότι ο συντελεστής κατανομής καταλήγει να εξαρτάται από τη συγκέντρωση του διαλύματος.

Εξαιτίας της πολλαπλής ισορροπίας που περικλείει αυτή η μέθοδος ελέγχου, δε θα έπρεπε να εφαρμόζεται σε ιοντικές ενώσεις χωρίς να γίνεται διόρθωση. (Θα πρέπει να γίνεται χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων αντί του νερού για τέτοιες ουσίες).

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής*

Η τιμή του συντελεστή κατανομής μπορεί να εκτιμηθεί είτε με τον τρόπο του απλού υπολογισμού (2) είτε με τη χρήση των διαλυτοτήτων της ελεγχόμενης ουσίας στους καθαρούς διαλύτες (1).

Γι' αυτό,

$$P_{\text{υπολογισμού}} = \frac{\text{κορεσμός } c_{n\text{-οκτανόλη}}}{\text{κορεσμός } c_{\text{νερό}}}$$

Εναλλακτικά, μπορεί να προσδιοριστεί χονδρικά με την εκτέλεση ενός απλοποιημένου προκαταρκτικού ελέγχου.

1.6.2. *Προπαρασκευή*

n-οκτανόλη: Ο προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής διεξάγεται με αντιδραστήρια υψηλού βαθμού καθαρότητας.

Νερό: πρέπει να χρησιμοποιείται απεσταγμένο ή διπλά απεσταγμένο νερό από γύαλινη ή χαλαζιακή συσκευή.

Σημείωση:

Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό που λαμβάνεται απευθείας από ιοντοανταλλάκτη.

1.6.2.1. Προκορεσμός των διαλυτών

Πριν από τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής, οι φάσεις του συστήματος των διαλυτών κορέννυνται αμοιβαία με ανατάραξη στη θερμοκρασία του πειράματος. Για να γίνει αυτό, είναι πρακτικό δύο μεγάλες φιάλες αποθηκεύσεως με υψηλό βαθμό αναλυτικής καθαρότητας *n*-οκτανόλη ή νερό, η κάθε μία με αρκετή ποσότητα από τον άλλο διαλύτη, να αναταράσσονται για 24 ώρες με ένα μηχανικό τάρακτρο και μετά να αφήνονται σε ηρεμία για αρκετό χρόνο, μέχρι να χωριστούν οι φάσεις και να επιτευχθεί μία κατάσταση κορεσμού.

1.6.2.2. Προπαρασκευή για τον έλεγχο

Ο συνολικός όγκος του διφασικού συστήματος θα πρέπει να γεμίζει σχεδόν το δοχείο ελέγχου. Αυτό θα βοηθάει στο να προλαμβάνεται απώλεια του υλικού που να οφείλεται σε πτητικότητα. Η αναλογία όγκου και οι ποσότητες της ουσίας που χρησιμοποιούνται καθορίζονται από τα κατωτέρω:

— την προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής (βλέπε ανωτέρω),

— την ελάχιστη ποσότητα που απαιτείται από τη δοκιμαζόμενη ουσία για την αναλυτική διαδικασία, και

— τον περιορισμό μιας μέγιστης συγκεντρώσεως και στις δύο φάσεις 0,01 mol/l.

Διεξάγονται τρεις έλεγχοι. Στον πρώτο προστίθεται η υπολογισθείσα αναλογία όγκου. Στον δεύτερο προστίθεται δύο φορές ο όγκος *n*-οκτανόλης και στον τρίτο προστίθεται ο μισός όγκος *n*-οκτανόλης.

1.6.2.3. Ελεγχόμενη ουσία

Για την ισορροπία υλικού κατά τη διάρκεια του ελέγχου, παρασκευάζεται ένα αρχικό διάλυμα σε *n*-οκτανόλη με μια συγκέντρωση μάζας μεταξύ 1 και 100 mg/ml. Η συγκέντρωση μάζας του διαλύματος αυτού θα πρέπει να προσδιορίζεται επακριβώς πριν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής. Το διάλυμα αυτό θα πρέπει να φυλάσσεται κάτω από σταθερές συνθήκες.

1.6.3. *Συνθήκες ελέγχου*

Η θερμοκρασία του ελέγχου θα πρέπει να διατηρείται σταθερή (± 1 °C) και να ευρίσκεται στην περιοχή από 20 μέχρι 25 °C.

1.6.4. *Πορεία μετρήσεως*

1.6.4.1. Αποκατάσταση της ισορροπίας κατανομής

Για καθεμία από τις συνθήκες ελέγχου θα πρέπει να ετοιμάζονται διπλά δοχεία ελέγχου που να περιέχουν τις απαιτούμενες και ακριβώς μετρηθείσες ποσότητες των δύο διαλυτών, μαζί με την αναγκαία ποσότητα του αρχικού διαλύματος.

Τα μέρη της οκτανόλης θα πρέπει να μετρούνται κατ' όγκον. Τα δοχεία του ελέγχου θα πρέπει είτε να τοποθετούνται σε ένα κατάλληλο τάρακτρο είτε να ταράσσονται με το χέρι. Μία μέθοδος που συνιστάται είναι να περιστρέφεται ο σωλήνας φυγοκεντρήσεως γρήγορα κατά 180° περί τον οριζόντιο άξονα, έτσι ώστε κάθε παγιδευμένος αέρας να ανέρχεται διά μέσου των δύο φάσεων.

1.6.4.2. Χωρισμός φάσεων

Προκειμένου να χωριστούν οι φάσεις θα πρέπει να γίνεται φυγοκέντρηση του μείγματος. Αυτό θα μπορούσε να γίνει σε μια φυγόκεντρο εργαστηρίου, που να διατηρείται στη θερμοκρασία του δωματίου, ή, εάν χρησιμοποιείται μια φυγόκεντρος όχι ελεγχόμενης θερμοκρασίας, οι σωλήνες φυγοκεντρήσεως θα πρέπει να ξαναϊσορροπούνται στη θερμοκρασία του ελέγχου για μία ώρα τουλάχιστον πριν από την ανάλυση.

1.6.5. *Ανάλυση*

Για τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής είναι αναγκαίο να προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας και στις δύο φάσεις. Αυτό μπορεί να γίνει λαμβάνοντας ένα μέρος από καθεμία από τις δύο φάσεις του κάθε σωλήνα για καθεμία συνθήκη ελέγχου και κάνοντας ανάλυση σ' αυτά με τη διαδικασία που έχει επιλεγεί. Η ολική ποσότητα της ουσίας που ευρίσκεται και στις δύο φάσεις θα πρέπει να υπολογίζεται και να συγκρίνεται με την ποσότητα της ουσίας που είχε είσαχθεί αρχικά.

Η υδατική φάση θα πρέπει να δειγματίζεται με μια διαδικασία η οποία να ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο να περικλείνει ίχνη οκτανόλης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια γυάλινη σύριγγα με μια αποσπώμενη βελόνα για τη δειγματοληψία της υδατικής φάσεως. Η σύριγγα θα πρέπει αρχικά να γεμίζεται μερικά με αέρα. Ο αέρας θα πρέπει να εκδιώκεται σιγά, ενώ θα βυθίζεται η βελόνα στη στιβάδα οκτανόλης. Κατάλληλος όγκος υδατικής φάσεως εισάγεται στη σύριγγα. Η σύριγγα αποσύρεται γρήγορα από το διάλυμα και η βελόνα αποσπάται. Τα περιεχόμενα της σύριγγας μπορούν τότε να χρησιμοποιηθούν σαν το υδατικό δείγμα. Η συγκέντρωση στις δύο χωριστές φάσεις θα πρέπει να προσδιορίζεται κατά προτίμηση με μία ειδική για την ουσία μέθοδο. Παραδείγματα φυσικοχημικών προσδιορισμών, που μπορεί να είναι κατάλληλοι, είναι:

— φωτομετρικές μέθοδοι,

— αέρια χρωματογραφία,

— υγρή χρωματογραφία υψηλής πιέσεως.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Εάν ο μετρηθείς P_{ow} είναι μεγαλύτερος του 10^4, συνιστάται να συγκρίνονται τα αποτελέσματα με μία τιμή P_{ow} εξ υπολογισμού, όπως π.χ. με εκείνη που λαμβάνεται με τη μέθοδο που δίδεται στη βιβλιογραφία (3).

Η αξιοπιστία των τιμών του P που προσδιορίσθηκαν μπορεί να ελεγχθεί με τη σύγκριση των μέσων τιμών των διπλών προσδιορισμών με τη συνολική μέση τιμή.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Στην έκθεση πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

— ακριβής προδιαγραφή της ουσίας (ταυτότητα και ξένες προσμείξεις),

— θερμοκρασία προσδιορισμού,

— δεδομένα της αναλυτικής πορείας που χρησιμοποιήθηκαν στον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων,

— οι μετρηθείσες συγκεντρώσεις και στις δύο φάσεις για κάθε προσδιορισμό (αυτό σημαίνει ότι θα αναφερθεί ένα σύνολο δώδεκα συγκεντρώσεων),

— το βάρος της ελεγχόμενης ουσίας, ο όγκος κάθε φάσεως που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε δοχείο του ελέγχου και η υπολογισθείσα συνολική ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας που είναι παρούσα σε κάθε μία φάση μετά την ισορρόπηση,

— θα πρέπει να αναφέρονται οι υπολογισθείσες τιμές του συντελεστή κατανομής (P) και η μέση τιμή για κάθε δέσμη συνθηκών ελέγχου, όπως και η μέση τιμή για όλους τους προσδιορισμούς. Εάν υπάρχει ένας υπαινιγμός εξαρτήσεως του συντελεστή κατανομής από τη συγκέντρωση, αυτό θα πρέπει να σημειωθεί στην έκθεση,

— θα πρέπει να αναφέρεται η σταθερή απόκλιση των ατομικών τιμών P από τη μέση τιμή,

— η μέση τιμή P από όλους τους προσδιορισμούς θα πρέπει , επίσης, να εκφράζεται σαν ο δεκαδικός της λογάριθμος,

— ο θεωρητικά υπολογισθείς P_{ow}, όταν αυτή η τιμή έχει προσδιορισθεί ή όταν η μετρηθείσα τιμή είναι $> 10^4$,

— το pH του νερού που χρησιμοποιήθηκε και της υδατικής φάσεως κατά τη διάρκεια του πειράματος,

— κάθε πληροφορία και παρατηρήσεις σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(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.

Α. 9. ΣΗΜΕΙΟ ΑΝΑΦΛΕΞΕΩΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. Εισαγωγή

Είναι χρήσιμο να έχουμε προκαταρκτική πληροφορία για την αναφλεξιμότητα της ουσίας, προκειμένου να εκτελέσουμε τον έλεγχο αυτό. Η μέθοδος ελέγχου είναι εφαρμόσιμη για τις υγρές ουσίες, στη μορφή που κυκλοφορούν, των οποίων οι ατμοί μπορούν να αναφλεγούν με πηγές αναφλέξεως. Οι περιγραφόμενες μέθοδοι ελέγχου σ' αυτό το κείμενο είναι αξιόπιστες μόνο για τις περιοχές των σημείων αναφλέξεως οι οποίες καθορίζονται σε ξεχωριστές μεθόδους.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Το σημείο αναφλέξεως είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία, διορθωμένη σε μια πίεση 101,325 kPa, στην οποία το ελεγχόμενο υγρό, σε κλειστό δοχείο ελέγχου, εκπέμπει ατμούς, κάτω από τις συνθήκες που έχουν καθοριστεί στη μέθοδο ελέγχου, σε τέτοια ποσότητα ώστε να παράγεται στο δοχείο ελέγχου ένα αναφλέξιμο μείγμα ατμών/αέρα.

Μονάδες: °C

$t = T - 273{,}15$

όπου t σε °C και T σε K.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Δε χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις όταν ερευνάται μια νέα ουσία. Θα πρέπει πρωταρχικά να χρησιμεύουν από καιρού σε καιρό για τη βαθμονόμηση της μεθόδου, και για να προσφέρουν μια ευκαιρία συγκρίσεως των αποτελεσμάτων όταν εφαρμόζεται μια άλλη μέθοδος.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Η ουσία τοποθετείται σε ένα δοχείο ελέγχου το οποίο θερμαίνεται προοδευτικά μέχρις ότου οι ατμοί φθάσουν σε μια αρκετά μεγάλη συγκέντρωση στον αέρα για να παραγάγουν ένα εύφλεκτο μείγμα, το οποίο να μπορεί να αναφλεγεί.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

1.5.1. *Επαναληψιμότητα*

Η επαναληψιμότητα ποικίλλει σύμφωνα με την περιοχή του σημείου αναφλέξεως και τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο ελέγχου, μέγιστο ± 2 °C.

1.5.2. *Ευαισθησία*

Η ευαισθησία εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο ελέγχου.

1.5.3. *Ειδική εφαρμογή*

Η ειδική εφαρμογή μερικών μεθόδων ελέγχου περιορίζεται σε μερικές περιοχές σημείων αναφλέξεως και υπόκειται σε δεδομένα σχετικά με την ουσία (π.χ. υψηλό ιξώδες).

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Δείγμα της ελεγχόμενης ουσίας τοποθετείται σε μία συσκευή ελέγχου σύμφωνα με το σημείο 1.6.3.1 ή/και με το σημείο 1.6.3.2.

1.6.2. *Συνθήκες ελέγχου*

Η συσκευή τοποθετείται, κατά προτίμηση, μακριά από ρεύματα αέρα.

1.6.3. *Εκτέλεση του ελέγχου*

1.6.3.1. Μέθοδος ισορροπίας

Βλέπε πρότυπα ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, και ISO 3679.

1.6.3.2. Μέθοδος μη ισορροπίας

Συσκευή Abel:

Βλέπε πρότυπα BS 2000, μέρος 170, NF M07-011 και NF T66-009

Συσκευή Abel-Pensky:

Βλέπε πρότυπα (EN 57), DIN 51755 μέρος 1 (για θερμοκρασίες από 5° έως 65 °C), DIN 51755 μέρος 2 (για θερμοκρασία κάτω των 5 °C) και NF M07-036.

Συσκευή Tag:

Βλέπε πρότυπα ASTM D 56 και ISO 2719.

Συσκευή Pensky — Martens:

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

Παρατηρήσεις

Όταν το σημείο αναφλέξεως, που προσδιορίζεται με μία μέθοδο μη ισορροπίας στο σημείο 1.6.3.2 ευρεθεί να είναι:

0 ± 2 °C, 21 · ± 2 °C, 55 ± 2 °C,

θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με μία μέθοδο ισορροπίας, με τη χρησιμοποίηση της ίδιας συσκευής.

Μόνο οι μέθοδοι οι οποίες μπορούν να δώσουν τη θερμοκρασία του σημείου αναφλέξεως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μια γνωστοποίηση.

Για τον προσδιορισμό του σημείου αναφλέξεως ιξωδών υγρών (βαφές, κόμμεα και παρόμοια) που περιέχουν διαλύτες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο συσκευές και μέθοδοι ελέγχου κατάλληλες για τον προσδιορισμό του σημείου αναφλέξεως ιξωδών υγρών. Βλέπε πρότυπα ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 και DIN 53213, μέρος 1.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Η έκθεση πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— την ακριβή προδιαγραφή της ουσίας (ταυτότητα και ξένες προσμείξεις),

— πρέπει να δηλώνεται η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος, όπως και κάθε δυνατή απόκλιση,

— πρέπει να αναφέρονται κάθε πληροφορία και παρατηρήσεις σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Καμία.

Α. 10. ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΣΤΕΡΕΑ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Είναι χρήσιμο να υπάρχει προκαταρκτική πληροφορία για τις δυνητικές εκρηκτικές ιδιότητες της ουσίας, πριν από την εκτέλεση του ελέγχου αυτού.

Η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να εφαρμοστεί μόνο για τις ουσίες με μορφή σκόνης, κόκκων και πάστας.

Για να μην περιληφθούν όλες οι ουσίες που μπορούν να αναφλεγούν, αλλά μόνον εκείνες που μπορούν να καούν γρήγορα ή εκείνες των οποίων η συμπεριφορά στο κάψιμο είναι κατά κάποιο τρόπο ιδιαίτερα επικίνδυνη, θεωρούνται ότι είναι λίαν αναφλέξιμες μόνον οι ουσίες των οποίων η ταχύτητα καύσεως υπερβαίνει μια κάποια περιοριστική τιμή. Επιπλέον, οι μεταλλικές σκόνες, οι οποίες μπορούν να πυρακτωθούν, θα πρέπει επίσης να θεωρούνται ότι είναι λίαν αναφλέξιμες, εάν η πυράκτωση επεκτείνεται σ' όλο το δείγμα. Τέτοια πυράκτωση και οι σχετικές δυσκολίες στο σβήσιμο μιας φωτιάς είναι ο κύριος λόγος για το ότι οι μεταλλικές σκόνες είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες. Κανονικοί παράγοντες αποσβέσεως, όπως το διοξείδιο του άνθρακα ή/και το νερό, μπορούν να αυξήσουν σημαντικά τον κίνδυνο.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Χρόνος καύσεως εκπεφρασμένος σε δευτερόλεπτα.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Δεν έχουν προσδιοριστεί.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Η ουσία στην εμπορική της μορφή μορφοποιείται σε στήλη 250 mm μήκους. Τότε γίνεται προσπάθεια εναύσεως του δείγματος υπό τις συνθήκες που καθορίζονται στο σημείο 1.6.3 και μετριέται ο χρόνος καύσεως.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

1.6. Περιγραφή της μεθόδου

1.6.1. *Προετοιμασία*

Στην περίπτωση ουσιών με μορφή σκόνης ή κόκκων, το προϊόν, στην εμπορική του μορφή, χύνεται χαλαρά σ' ένα καλούπι. Το καλούπι είναι κατασκευασμένο από μέταλλο, έχει μήκος 250 mm και τμήμα τριγωνικής τομής εσωτερικού ύψους 10 mm και εσωτερικού πλάτους 20 mm. Σε αμφότερες τις πλευρές του καλουπιού, στην κατά μήκος διεύθυνση, συνδέονται δύο μεταλλικά φύλλα σαν πλευρικά όρια, τα οποία προβάλλονται 2 mm πίσω από το άνω άκρο του τριγωνικού τμήματος (βλέπε σχήμα). Το καλούπι αφήνεται μετά να πέσει τρεις φορές από ύψος 2 cm πάνω σε μία στερεή επιφάνεια. Εάν είναι αναγκαίο, το καλούπι συμπληρώνεται με την ουσία.

Τότε τα πλευρικά όρια αφαιρούνται και η περίσσεια της ουσίας απομακρύνεται με ξύσιμο. Ένας άκαυστος και όχι πορώδης δίσκος τοποθετείται στην κορυφή του καλουπιού, η συσκευή αναστρέφεται και το καλούπι απομακρύνεται.

Οι ουσίες με μορφή πάστας απλώνονται πάνω σε μία άκαυστη επιφάνεια σε σχήμα σχοινιού, μήκους 250 mm με τομή 1 cm^2 περίπου.

Χρησιμοποιείται οποιαδήποτε κατάλληλη πηγή εναύσεως, όπως μία μικρή φλόγα ή ένα θερμό σύρμα ελάχιστης θερμοκρασίας 1000 °C για την έναυση της στήλης στο ένα άκρο.

1.6.2. *Συνθήκες ελέγχου*

Στην περίπτωση ουσίας ευαίσθητης στην υγρασία, ο έλεγχος θα πρέπει να διεξάγεται όσο το δυνατό γρηγορότερα μετά την απομάκρυνσή της από το δοχείο.

1.6.3. *Εκτέλεση του ελέγχου*

Ανάβεται το ένα άκρο της στήλης. Όταν η στήλη έχει καεί σε μήκος 80 mm, μετριέται η ταχύτητα καύσεως για τα επόμενα 100 mm. Ο έλεγχος εκτελείται έξι φορές, χρησιμοποιώντας κάθε φορά έναν καθαρό ψυχρό δίσκο.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Για την εκτίμηση, είναι αναγκαίες οι τιμές του χρόνου καύσεως που προσδιορίζονται μέσα σε έξι ελέγχους.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

3.1. Έκθεση ελέγχου

Η έκθεση πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— την ακριβή προδιαγραφή της ουσίας (ταυτότητα κα ξένες προσμείξεις),

— περιγραφή της ουσίας που πρόκειται να ελεγχθεί και φυσική κατάσταση, συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε υγρασία,

— το αποτελέσματα της μετρήσεως,

— κάθε πρόσθετη πληροφορία σχετική με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Ερμηνεία του αποτελέσματος

Ουσίες υπό μορφή σκόνης, κόκκων ή πάστας θεωρούνται ως λίαν αναφλέξιμες, όταν ο χρόνος καύσεως σε έναν από τους έξι ελέγχους που έχουν διεξαχθεί, σύμφωνα με τη διαδικασία του ελέγχου που περιγράφεται στο σημείο 1.6, είναι μικρότερος των 45 δευτερολέπτων. Σκόνες μετάλλων ή μεταλλικά κράματα θεωρούνται ότι είναι λίαν αναφλέξιμα, όταν μπορούν να ανάψουν και η φλόγα ή η ζώνη αντιδράσεως εξαπλώνεται πάνω στο σύνολο του δείγματος.

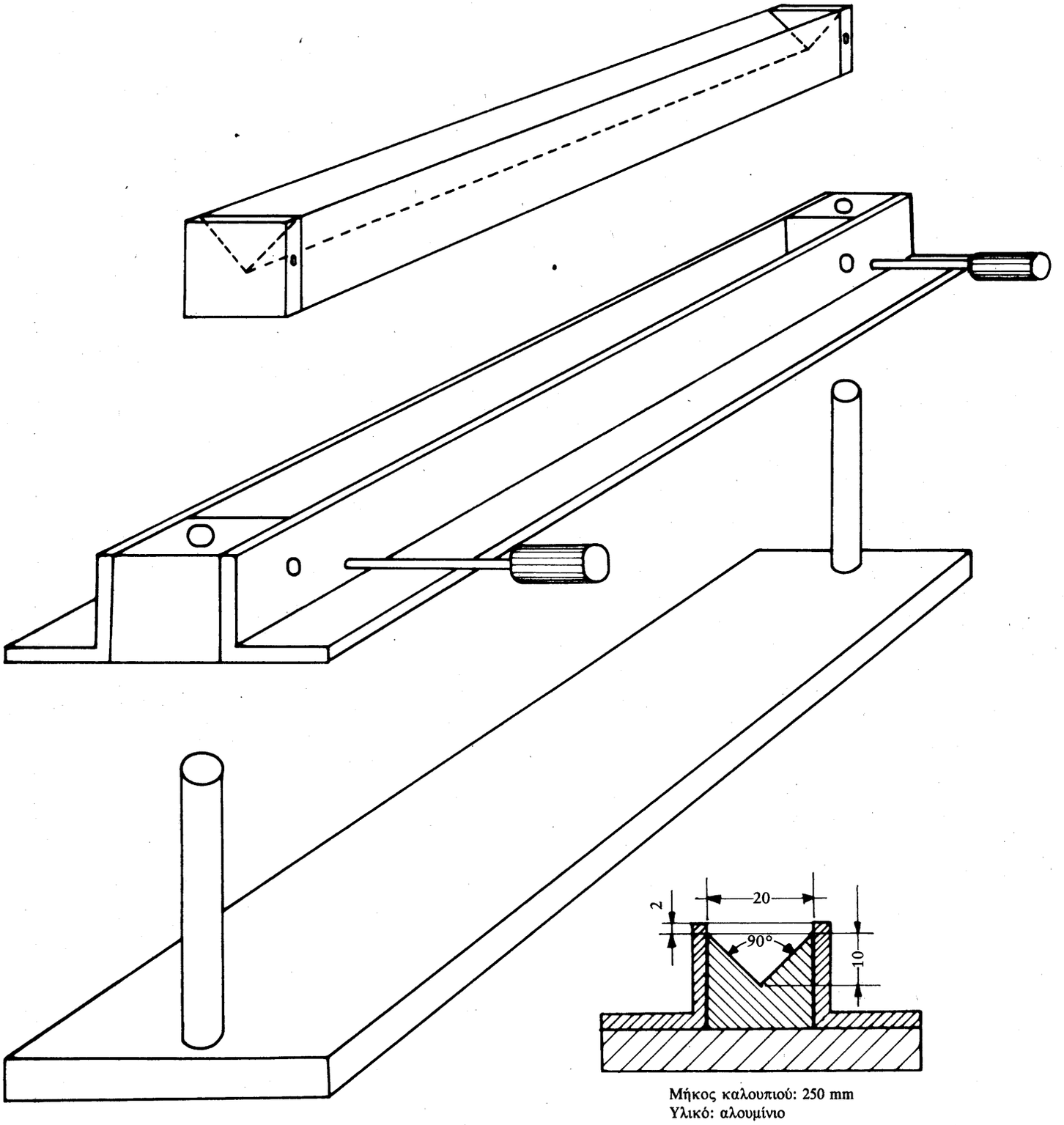
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Καμία.

Προσάρτημα

Σχήμα

Καλούπι και εξαρτήματα για την παρασκευή της στήλης
(Όλες οι διαστάσεις σε mm)



Μήκος καλουπιού: 250 mm
Υλικό: αλουμίνιο

Α. 11. ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΑΕΡΙΑ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει προσδιορισμό του κατά πόσο αέρια, αναμεμειγμένα με αέρα, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμοσφαιρική πίεση, έχουν μία περιοχή αναφλεξιμότητας. Μείγματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων του ελεγχόμενου αερίου με αέρα εκτίθενται σε ηλεκτρικό σπινθήρα και παρατηρείται εάν συμβαίνει έναυση.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Η περιοχή αναφλεξιμότητας είναι η περιοχή συγκεντρώσεως μεταξύ των χαμηλότερων και των υψηλότερων ορίων εκρήξεως. Τα χαμηλότερα και τα υψηλότερα όρια εκρήξεως είναι εκείνα τα όρια συγκεντρώσεως του εύφλεκτου αερίου, σε μείγμα με αέρα, στα οποία δεν συμβαίνει διάδοση της φλόγας.

1.3. Ουσία αναφοράς

Δεν έχει προσδιοριστεί.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Η συγκέντρωση αερίου στον αέρα αυξάνεται βαθμιαία και το μείγμα, σε κάθε στάδιο, εκτίθεται σε ηλεκτρικό σπινθήρα.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Δεν έχουν διατυπωθεί.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου

1.6.1. *Συσκευή*

Το δοχείο ελέγχου είναι ένας όρθιος γυάλινος κύλινδρος, εσωτερικής διαμέτρου 50 mm το ελάχιστο και ύψους 300 mm το ελάχιστο. Τα ηλεκτρόδια εναύσεως χωρίζονται με μία απόσταση 3 έως 5 mm και τοποθετούνται 60 mm πάνω από το βυθό του κυλίνδρου. Ο κύλινδρος προσαρμόζεται με ένα άνοιγμα απελεύθερώσεως της πιέσεως. Η συσκευή πρέπει να θωρακιστεί, ώστε να περιορίζει κάθε κίνδυνο από έκρηξη.

Χρησιμοποιείται σαν πηγή εναύσεως ένας διαρκής επαγωγικός σπινθήρας, διαρκείας 0,5 δευτερολέπτων, ο οποίος προκαλείται από μετασχηματιστή υψηλής τάσεως με έξοδο τάσεως 10 έως 15 kV (μέγιστο ισχύος εισαγωγής: 300 W).

1.6.2. *Συνθήκες ελέγχου*

Ο έλεγχος πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου.

1.6.3. *Εκτέλεση του ελέγχου*

Με χρησιμοποίηση αναλογικών αντλιών εισάγεται στο γυάλινο κύλινδρο γνωστή συγκέντρωση αερίου σε αέρα. Ένας σπινθήρας περνάει διά μέσου του μείγματος και παρατηρείται εάν η φλόγα αποσπάται από την πηγή εναύσεως και διαδίδεται ανεξάρτητα. Η συγκέντρωση του αερίου ποικίλλει στη βαθμίδα του 1 % κατ' όγκο μέχρις ότου επιτευχθεί η έναυση όπως περιγράφεται ανωτέρω.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Η πραγματοποίηση διαδόσεως της φλόγας είναι το μόνο σημαντικό πληροφοριακό δεδομένο για τον προσδιορισμό της ιδιότητας αυτής.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Η έκθεση πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— την ακριβή προδιαγραφή της ουσίας (ταυτότητα και ξένες προσμείξεις),

— περιγραφή, με τις διαστάσεις της συσκευής που χρησιμοποιήθηκε,

— τη θερμοκρασία δωματίου στην οποία εκτελείται ο έλεγχος,

— τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν,

— το αποτέλεσμα της δοκιμασίας: μη αναφλέξιμο αέριο ή λίαν αναφλέξιμο αέριο,

— στην περίπτωση συμπεράσματος «μη αναφλέξιμο», θα πρέπει να δηλώνεται ότι το πείραμα έγινε σε όλες τις συγκεντρώσεις, με αύξηση των συγκεντρώσεων ανά βαθμίδα 1 %, από 0 έως 100 %,

— πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις οι σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Καμία.

Α. 12. ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΕ ΕΠΑΦΗ ΜΕ ΝΕΡΟ Ή ΥΓΡΟ ΑΕΡΑ ΕΚΠΕΜΠΟΥΝ ΛΙΑΝ ΕΥΦΛΕΚΤΑ ΑΕΡΙΑ ΣΕ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΕΣ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Αυτή η μέθοδος ελέγχου μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να εξεταστεί αν η αντίδραση μιας ουσίας οδηγεί στην παραγωγή μιας επικίνδυνης ποσότητας αερίου ή αερίων που πιθανώς είναι λίαν εύφλεκτα ή τοξικά.

Η μέθοδος ελέγχου μπορεί να εφαρμοστεί και σε στερεές όπως και σε υγρές ουσίες. Δεν εφαρμόζεται για ουσίες που σε επαφή με τον αέρα αναφλέγονται αυθόρμητα.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Λίαν εύφλεκτα: Είναι ουσίες και παρασκευάσματα που, σε επαφή με το νερό ή με υγρό αέρα, παράγουν εξαιρετικά εύφλεκτα αέρια σε ποσότητες επικίνδυνες, της τάξεως του 1 l/kg·h τουλάχιστον. Για το όριο αυτό η τοξικότητα του αερίου δε λαμβάνεται υπόψη.

1.3. Αρχή της μεθόδου

Η ουσία ελέγχεται σύμφωνα με την ακόλουθη σταδιακή διαδικασία· αν σε κάποιο στάδιο συμβεί ανάφλεξη δε χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος.

1.3.1. *Στάδιο 1*

Η ελεγχόμενη ουσία τοποτεθείται σε δοχείο που περιέχει απεσταγμένο νερό 20 °C και σημειώνεται αν το παραγόμενο αέριο αναφλέγεται ή όχι.

1.3.2. *Στάδιο 2*

Η ελεγχόμενη ουσία τοποθετείται πάνω σε διηθητικό χαρτί που επιπλέει στην επιφάνεια δοχείου το οποίο περιέχει απεσταγμένο νερό 20 °C και σημειώνεται αν το παραγόμενο αέριο αναφλέγεται ή όχι. Το διηθητικό χαρτί είναι απλώς για να κρατήσει την ουσία σε μία θέση, πράγμα που αυξάνει τις πιθανότητες για ανάφλεξη.

1.3.3. *Στάδιο 3*

Η ελεγχόμενη ουσία διαμορφώνεται σε σωρό ύψους περίπου 2 cm και διαμέτρου 3 cm. Στο σωρό προσθέτονται λίγες σταγόνες νερό και σημειώνεται αν το παραγόμενο αέριο αναφλέγεται ή όχι.

1.3.4. *Στάδιο 4*

Η ελεγχόμενη ουσία ανακατεύεται με απεσταγμένο νερό 20 °C και μετριέται η παραγωγή αερίου για περίοδο 7 ωρών ανά διαστήματα 1 ώρας. Αν ο ρυθμός παραγωγής του αερίου μετά το επτάωρο είναι ασταθής ή αυξάνεται, η περίοδος μετρήσεων θα έπρεπε να επεκταθεί σε ένα μέγιστο χρόνο 5 ημερών. Ο έλεγχος πρέπει να διακοπεί αν η παραγωγή αερίου υπερβεί το 1 l/kg·h.

1.4. **Ουσία αναφοράς**

Δεν έχει προσδιοριστεί.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Δεν έχουν δηλωθεί.

1.6. **Περιγραφή των μεθόδων**

1.6.1. *Στάδιο 1*

1.6.1.1. Συνθήκες ελέγχου

Η ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιείται στη μορφή που κυκλοφορεί και ο έλεγχος εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου (γύρω στους 20 °C).

1.6.1.2. Εκτέλεση ελέγχου

Μικρή ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας (διαμέτρου περίπου 2 mm) τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει απεσταγμένο νερό. Σημειώνεται : i) αν παράγεται κανένα αέριο και ii) αν συμβεί ανάφλεξη του αερίου. Αν το αέριο αναφλεγεί, δε χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος της ουσίας, δεδομένου ότι η ουσία θεωρείται επικίνδυνη.

1.6.2. *Στάδιο 2*

1.6.2.1. Συσκευή

Ένα διηθητικό χαρτί επιπλέει επίπεδο στην επιφάνεια απεσταγμένου ύδατος σε οποιοδήποτε κατάλληλο δοχείο, π.χ. ένα κρυσταλλωτήριο εξατμίσεως διαμέτρου 100 mm.

1.6.2.2. Συνθήκες ελέγχου

Η ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιείται στη μορφή που διατίθεται και ο έλεγχος εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου (γύρω στους 20 °C).

1.6.2.3. Εκτέλεση ελέγχου

Μικρή ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας (διαμέτρου περίπου 2 mm) τοποθετείται στο κέντρο του διηθητικού χάρτου. Σημειώνεται : i) αν παράγεται κανένα αέριο και ii) αν συμβεί ανάφλεξη του αερίου. Αν το αέριο αναφλεγεί, δε χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος της ουσίας, δεδομένου ότι η ουσία θεωρείται επικίνδυνη.

1.6.3. *Στάδιο 3*

1.6.3.1. Συνθήκες ελέγχου

Η ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιείται στη μορφή που κυκλοφορεί και ο έλεγχος εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου.

1.6.3.2. Εκτέλεση ελέγχου

Η ελεγχόμενη ουσία γίνεται μία σωρός ύψους περίπου 2 cm και διαμέτρου 3 cm με κοίλωμα στην κορυφή. Προσθέτονται στο κοίλωμα μερικές σταγόνες νερού και σημειώνεται : i) αν παράγεται κανένα αέριο και ii) αν συμβεί ανάφλεξη του αερίου. Αν το αέριο αναφλεγεί, δε χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος της ουσίας, δεδομένου ότι η ουσία θεωρείται επικίνδυνη.

1.6.4. *Στάδιο 4*

1.6.4.1. Συσκευή

Η συσκευή τοποθετείται όπως φαίνεται στο σχήμα (βλέπε προσάρτημα).

1.6.4.2. Συνθήκες ελέγχου

Επιθεωρείται το δοχείο της ελεγχόμενης ουσίας για σκόνη μεγέθους σωματιδίων < 500 μm. Αν η σκόνη αποτελεί το περισσότερο από 1 % w/w του συνόλου ή αν το δείγμα είναι εύθρυπτο, θα έπρεπε το σύνολο της ουσίας να αλεσθεί σε σκόνη πριν από τον έλεγχο, ούτως ώστε να επιτευχθεί μείωση του μεγέθους των σωματιδίων κατά τη φύλαξη και χρήση. Αλλιώς, η ουσία πρέπει να χρησιμοποιηθεί στην εμπορεύσιμη μορφή. Ο έλεγχος εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C) και ατμοσφαιρική πίεση.

1.6.4.3. Εκτέλεση ελέγχου

Στο σταγονομετρικό χωνί της συσκευής τοποθετείται νερό και στην κωνική φιάλη αρκετή ουσία για να παράγει μεταξύ 100 cm^3 και 250 cm^3 αερίου (πάντως όχι περισσότερο από 25 g). Ο όγκος του αερίου που παράγεται μπορεί να μετρηθεί με οποιοδήποτε κατάλληλο μέσο. Ανοίγεται η στρόφιγγα του σταγονομετρικού δοχείου για να περάσει το νερό μέσα στην κωνική φιάλη και αρχίζει να μετράει ένα χρονόμετρο. Σημειώνεται ο χρόνος για όλο το παραγόμενο αέριο και, αν είναι δυνατό, παίρνονται και ενδιάμεσες αναγνώσεις. Ο έλεγχος θα έπρεπε να γίνεται εις τριπλούν.

Αν η χημική ταυτότητα του αερίου δεν είναι γνωστή, το αέριο πρέπει να αναλυθεί. Αν το αέριο περιέχει λίαν εύφλεκτα συστατικά, και είναι άγνωστο αν όλο το μείγμα είναι λίαν εύφλεκτο, πρέπει να παρασκευαστεί ένα μείγμα της ίδιας συνθέσεως και να ελεγχθεί σύμφωνα με τη μέθοδο ελέγχου (A. 11).

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Μια ανάφλεξη ή παραγωγή λίαν εύφλεκτου αερίου πάνω από 1 l/kg·h στις τρεις δοκιμές είναι αρκετή για να θεωρηθεί επικίνδυνη μία χημική ουσία (1.6.1, 1.6.2 και 1.6.3).

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Η έκθεση πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— την ακριβή προδιαγραφή και περιγραφή της ουσίας όπως παρελήφθη (π.χ. χρώμα, μέγεθος σωματιδίων και φυσική κατάσταση),

— οποιαδήποτε προπαρασκευή της ελεγχόμενης ουσίας,

— τα αποτελέσματα του ελέγχου,

— τη χημική ταυτότητα του παραγόμενου αερίου,

— την ταχύτητα εκλύσεως αερίου (1.6.4),

— οποιεσδήποτε συμπληρωματικές παρατηρήσεις σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) ISO 1773.

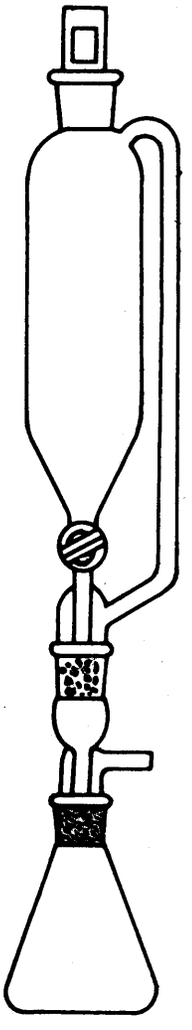
(2) OECD, Paris, Preliminary Test Guideline for the Determination of Substances which give off Highly Inflammable Gases in Dangerous Amounts on Contact with Water A 80/28 — Final Report of the OECD chemical testing programme.

(3) UN doc. No ST/SG/AC10/1 rev. 1.

Προσάρτημα

Σχήμα

Συσκευή



Α. 13. ΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΣΤΕΡΕΑ ΚΑΙ ΥΓΡΑ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Προκαταρκτικές πληροφορίες για την αυτοαναφλεξιμότητα μιας ουσίας είναι χρήσιμες. Η διαδικασία του ελέγχου εφαρμόζεται σε στερεές και υγρές ουσίες όπως κυκλοφορούν, που μπορεί να αναφλεγούν αυθόρμητα σε μικρές ποσότητες, σε μικρό διάστημα αφότου έλθουν σ' επαφή με τον αέρα, σε θερμοκρασία δωματίου.

Ουσίες που δεν καλύπτονται από αυτή τη μέθοδο ελέγχου είναι εκείνες που χρειάζονται ώρες ή μέρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν αυτοαναφλεγούν ή εκείνες που πρέπει να εκτεθούν σε σημαντικά υψηλότερη θερμοκρασία πριν συμβεί αυτοανάφλεξη.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Υγρά και στερεά θεωρούνται λίαν εύφλεκτα αν αναφλεγούν τουλάχιστον μία φορά μέσα σε έξι ελέγχους υπό τις συνθήκες που περιγράφονται στο σημείο 1.6.

Η αυτοαναφλεξιμότητα των υγρών μπορεί, επίσης, να πρέπει να ελεγχθεί κατά τη μέθοδο Α. 15: Αυτοαναφλεξιμότητα: προσδιορισμός της θερμοκρασίας αυτοαναφλέξεως πτητικών υγρών και αερίων.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Δεν έχουν προσδιοριστεί.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Η ουσία φέρεται σε επαφή με τον αέρα στη θερμοκρασία των 25 ± 10 °C για διάρκεια 5 λεπτών. Αν συμβεί ανάφλεξη, η ουσία θεωρείται λίαν εύφλεκτη.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Επαναληψιμότητα: δεδομένης της σημασίας για την ασφάλεια, και ένα μόνο θετικό αποτέλεσμα μέσα σε έξι ελέγχους είναι αρκετό να θεωρηθεί η ουσία λίαν εύφλεκτη.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου

1.6.1. *Συσκευή*

Μία κάψα πορσελάνης διαμέτρου περίπου 10 cm γεμίζεται με γη διατόμων σ' ένα ύψος περίπου 5 mm, σε θερμοκρασία δωματίου.

Σημείωση

Η γη διατόμων, ή οποιαδήποτε άλλη παρόμοια αδρανής ουσία που μπορεί να ληφθεί, γενικά πρέπει να θεωρείται αντιπροσωπευτική του εδάφους στο οποίο μπορεί να χύνεται η ελεγχόμενη ουσία, σε περίπτωση ατυχήματος.

1.6.2. *Εκτέλεση ελέγχου*

α) Στερεά με μορφή σκόνης

1 έως 2 cm^3 της ελεγχόμενης ουσίας χύνονται από ύψος 1 m περίπου πάνω σε μία άκαυστη επιφάνεια και παρατηρείται αν η ουσία αναφλέγεται κατά την απόχυση ή μέσα σε 5 λεπτά μετά την απόχυση.

β) Υγρά

Περίπου 5 cm^3 του ελεγχόμενου υγρού χύνονται μέσα σε μια προετοιμασμένη κάψα πορσελάνης και παρατηρείται αν η ουσία αναφλέγεται μέσα σε 5 λεπτά.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Για την αξιολόγηση χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα έξι ελέγχων.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Η έκθεση πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— περιγραφή της ελεγχόμενης ουσίας,

— τα αποτελέσματα του ελέγχου.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(1) OECD, Paris, Preliminary Test Guideline for the Determination of Pyrophoric Behaviour of Solids and Liquids. A 80/23 — Final report of the OECD chemical testing programme.

Α. 14. ΕΚΡΗΚΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Η μέθοδος παρέχει ένα σχήμα ελέγχου, για να προσδιοριστεί αν —ή δεν— μια στερεή, μια υγρή ή μια κολλώδης ουσία, ή ένα παρασκεύασμα αντιπροσωπεύει έναν κίνδυνο έκρηξης όταν υποβάλλεται στην επίδραση μιας φλόγας (θερμική ευαισθησία), ή σύγκρουσης, ή τριβής (ευαισθησία σε μηχανική διέγερση).

Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία μέρη:

α) έναν έλεγχο θερμικής ευαισθησίας,

β) έναν έλεγχο μηχανικής ευαισθησίας όσον αφορά το κτύπημα,

γ) έναν έλεγχο μηχανικής ευαισθησίας όσον αφορά την τριβή.

Η μέθοδος παρέχει δεδομένα για την εκτίμηση της πιθανότητας έναρξης εκρήξεων μέσω ορισμένων κοινών διεγέρσεων. Η μέθοδος δεν τείνει να εξακριβώσει αν η ουσία ή το παρασκευάσμα είναι ικανό να εκραγεί κάτω από κάποιες συνθήκες· ούτε και τείνει να προσδιορίσει την έκταση στην οποία αρχική αποσύνθεση μπορεί πιθανόν να πολλαπλασιαστεί και να προκαλέσει έκρηξη όλου του δείγματος.

Η μέθοδος είναι κατάλληλη προκειμένου να προσδιοριστεί αν μία ουσία ή ένα παρασκευάσμα αντιπροσωπεύει έναν κίνδυνο έκρηξης (θερμική και μηχανική ευαισθησία, κάτω από τις ιδιαίτερες συνθήκες που καθορίζονται στην οδηγία).

Οι έλεγχοι είναι ανεφάρμοστοι όταν η υπάρχουσα θερμοδυναμική πληροφόρηση [θερμότητα σχηματισμού, θερμότητα αποσύνθεσης, απουσία ορισμένων ενεργών ομάδων (1) στο συντακτικό τύπο] αποδεικνύει, πέρα από κάθε λογική αμφιβολία, ότι η ουσία ή το παρασκεύασμα είναι ανίκανα να αποσυντεθούν, να σχηματίσουν αέρια και να ελευθερώσουν θερμότητα με μεγάλη ταχύτητα (π.χ. το υλικό δεν αντιπροσωπεύει οποιονδήποτε κίνδυνο έκρηξης). Αναγνωρίζεται ότι η μέθοδος δεν είναι καθοριστική. Περιλαμβάνει έναν αριθμό επιλεγμένων τύπων ειδικών συσκευών που χρησιμοποιούνται ευρύτατα διεθνώς και που δίνουν συνήθως σημαντικά αποτελέσματα.

Το άτομο που εκτελεί τον έλεγχο μπορεί να επιλέξει τη χρήση εναλλακτικών συσκευών στις τρεις ειδικές μεθόδους, με την προϋπόθεση ότι αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί επιστημονικά και ότι η συσκευή είναι διεθνώς αναγνωρισμένη. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να προσδιοριστεί η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με εκείνα που θα προέκυπταν από τη χρήση των ειδικών συσκευών.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Σαν εκρηκτικές καθορίζονται:

Ουσίες και παρασκευάσματα που μπορεί να εκραγούν υπό την επίδραση φλόγας ή που είναι περισσότερο ευαίσθητα σε κτυπήματα ή τριβή από το δινιτροβενζόλιο.

1.3. Ουσία αναφοράς

Το μετα-δινιτροβενζόλιο, συνθετικό κρυσταλλικό προϊόν, για τη μέθοδο τριβής και κτυπήματος.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Ένας προκαταρκτικός έλεγχος απαιτείται για να καθορίσει ασφαλείς συνθήκες για την εκτέλεση των τριών ελέγχων ευαισθησίας:

1.4.1. *Προκαταρκτικός βασικός έλεγχος*

Πολύ μικρά δείγματα (περίπου 10 mg) της ουσίας ή του παρασκευάσματος υποβάλλονται σε θέρμανση χωρίς περιορισμό σε φλόγα Bunsen, σε σύγκρουση με οποιαδήποτε κατάλληλη μορφή συσκευής και σε τριβή, χρησιμοποιώντας σφυρί και αμόνη ή οποιαδήποτε μορφή μηχανικής τριβής. Ο αντικειμενικός σκοπός είναι να εξακριβωθεί αν η ουσία είναι τόσο ευαίσθητη και εκρηκτική έτσι που οι περιγραφόμενοι έλεγχοι ευαισθησίας θα έπρεπε να εκτελεστούν με ειδικές, προφυλάξεις προς αποφυγή τραυματισμού του πειραματιστή.

1.4.2. *Θερμική ευαισθησία*

Η μέθοδος περιλαμβάνει θέρμανση της ουσίας ή του παρασκευάσματος σε ένα χαλύβδινο σωλήνα, με περιορισμούς διαφόρου βαθμού που επιτυγχάνονται αν χρησιμοποιηθούν πλάκες με στόμιο διαφορετικής διαμέτρου, για να προσδιοριστεί αν η ουσία ή το παρασκεύασμα μπορεί να εκραγεί κάτω από συνθήκες θερμικής πίεσης.

1.4.3. *Μηχανική ευαισθησία* (κτύπημα)

Στη μέθοδο αυτή η ουσία, ή το παρασκεύασμα, υποβάλλεται σε κτύπημα ενός σφυριού που πέφτει πάνω σε χαλύβδινο αμόνι.

1.4.4. *Μηχανική ευαισθησία* (τριβή)

Στη μέθοδο αυτή η ουσία, ή το παρασκεύασμα, υποβάλλεται σε τριβή ανάμεσα σε πρότυπες επιφάνειες, υπό καθορισμένες συνθήκες φορτίου και σχετικής κίνησης.

1.5. **Κριτήρια ποιοτήτας**

Δεν δηλούνται.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Συσκευή*

1.6.1.1. Θερμική ευαισθησία (αποτέλεσμα φλόγας)

Ο χαλύβδινος σωλήνας είναι κατασκευασμένος από χαλύβδινο έλασμα (βλέπε προσάρτημα 1) με τη διαδικασία της έλασης. Έχει εσωτερική διάμετρο 24 mm, μήκος 75 mm και πάχος τοιχώματος 0,5 mm. Στο ανοιχτό άκρο, ο σωλήνας εφοδιάζεται με μια κυκλική πλάκα με στόμιο, από υλικό που αντέχει σε πίεση και έχει μια κεντρική τρύπα. Η πλάκα αυτή στερεώνεται καλά στο σωλήνα με δύο βιδωτά στηρίγματα (ένα παξιμάδι και το κάλυμμά του). Η κυκλική πλάκα (βλέπε σχήμα 1) έχει πάχος 6 mm και είναι φτιαγμένη από χάλυβα χρωμίου ανθεκτικού σε θέρμανση (βλέπε προσάρτημα).

Μια σειρά από πλάκες με ανοίγματα διαφορετικών διαμέτρων (1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ... mm) είναι στη διάθεση του πειραματιστή, για να προσδιορίσει το βαθμό κινδύνου έκρηξης που αντιπροσωπεύει η ουσία ή το παρασκεύασμα. Το παξιμάδι και το κάλυμμά του (βλέπε σχήμα 1) συνίσταται από χάλυβα χρωμίου-μαγγανίου (βλέπε προσάρτημα) που δεν κάνει σπινθήρα μέχρι τους 800 °C. Οι χαλύβδινοι σωλήνες χρησιμοποιούνται για ένα μόνο πείραμα.

1.6.1.2. Μηχανική ευαισθησία (κτύπημα)

Μια τυπική συσκευή βάρους που πέφτει αποτελείται βασικά από τεμάχιο φαιού χυμένου χάλυβα με βάση και αμόνι, στήλη, οδηγούς, βάρος που πέφτει και ένα μηχανισμό που το ελευθερώνει. Ο χαλύβδινος κορμός 230 mm (βάθος) × 250 mm (πλάτος) × 200 mm (ύψος) με τη χυμένη βάση 450 mm (βάθος) × 450 (πλάτος) × 60 mm (ύψος) φέρουν το χαλύβδινο αμόνι, διάμετρος 100 mm × 70 mm, που είναι βιδωμένο από πάνω.

Πίσω από το χαλύβδινο τεμάχιο βιδώνεται το στήριγμα και σ' αυτό η στήλη, πάνω στην οποία στερεώνεται ο σωλήνας από ελατό χάλυβα, χωρίς συρραφή, με εξωτερική διάμετρο 90 mm και εσωτερική 70 mm. Τέσσερις βίδες, που στηρίζονται σε ένα στερεό συμπαγές τεμάχιο 60 cm × 60 cm × 60 cm,

κρατούν το σφυρί που πέφτει με τέτοιο τρόπο ώστε οι γραμμές να είναι απολύτως κατακόρυφες και το βάρος που πέφτει να οδηγείται εύκολα. Το βάρος του σφυριού πρέπει να είναι 10 kg. Το βάρος αποτελείται από συμπαγή χάλυβα. Πρέπει να έχει επιφάνεια κρούσης από βαμένο χάλυβα HRC 60 έως 63 και ελάχιστη διάμετρο 25 mm. Τα πειράματα πρέπει να γίνουν με ύψος πτώσης 0,4 mm. Το δείγμα που θα ελεγχθεί τοποθετείται σε ένα καλούπι που αποτελείται από δύο ομοαξονικούς χαλύβδινους κυλίνδρους, ο ένας επάνω στον άλλο, και έναν κοίλο χαλύβδινο κύλινδρο σαν οδηγό. Οι συμπαγείς χαλύβδινοι κύλινδροι πρέπει να έχουν διάμετρο 10 (– 0,003, – 0,005) mm και ύψος 10 mm και στιλβωμένες επιφάνειες, κυρτωμένα άκρα (ακτίνα καμπυλώματος 0,5 mm) και σκληρότητα HRC 58 έως 65. Ο κοίλος κύλινδρος πρέπει να έχει εξωτερική διάμετρο 16 mm, ένα στιλβωμένο διάτρημα 10 (+ 0,005, + 0,010) mm και ύψος 13 mm. Αν συμβεί έκρηξη, οι χαλύβδινοι κύλινδροι και ο κοίλος κύλινδρος δε χρησιμοποιούνται για άλλα πειράματα. Το καλούπι αναρτάται σε ένα ενδιάμεσο αμόνι, διαμέτρου 26 mm και ύψους 26 mm, φτιαγμένο από χάλυβα και κεντρωμένο από έναν κεντρικό δακτύλιο τοποθετήσεως για την απομάκρυνση των καπνών της έκρηξης.

1.6.1.3. Μηχανική ευαισθησία (τριβή)

Η συσκευή τριβής αποτελείται από μία βασική πλάκα από χυτό χάλυβα, πάνω στην οποία αναρτάται η συσκευή τριβής, που αποτελείται από πάσσαλο πορσελάνης και κινητές πλάκες πορσελάνης. Η πλάκα πορσελάνης στηρίζεται σε έναν ολισθηρό υποδοχέα που κινείται μεταξύ δύο γραμμών. Ο υποδοχέας κινείται μέσω μιας ράβδου κινήσεως, μιας έκκεντρης τροχαλίας και με μετάδοση ταχύτητας από έναν ηλεκτρικό κινητήρα με τέτοιο τρόπο ώστε οι πλάκες πορσελάνης κινούνται κάτω από τον πορσελάνινο πάσσαλο με διεύθυνση εμπρός και πίσω κατά 10 mm. Ο πορσελάνινος πάσσαλος φορτίζεται με 360 Newtons περίπου.

Οι πλάκες πορσελάνης είναι φτιαγμένες από λευκή συνθετική πορσελάνη και έχουν διαστάσεις 25 mm (μήκος) × 25 mm (πλάτος) × 5 mm (ύψος). Οι δύο επιφάνειες τριβής των πλακών γίνονται τραχείες (βάθος ανωμαλιών 9 μm έως 32 μm) πριν από την πύρωση, πράγμα που επιτυγχάνεται με τρίψιμο με ένα σφουγγάρι.

Ο κυλινδρικός πορσελάνινος πάσσαλος είναι, επίσης, φτιαγμένος από λευκή συνθετική πορσελάνη. Έχει μήκος 15 mm, διάμετρο 10 mm, και είναι τραχύς κατά τη σφαιρική επιφάνεια με ακτίνα καμπυλώματος 10 mm.

1.6.2. *Συνθήκες ελέγχου*

1.6.2.1. Θερμική ευαισθησία (αποτέλεσμα φλόγας)

Η ουσία, στη φυσική μορφή που κυκλοφορεί, τοποθετείται μέσα στο σωλήνα μέχρι ύψους 60 mm σε τρεις ίσες δόσεις. Κάθε δόση γίνεται προσεκτικά συμπαγής μετά από κάθε προσθήκη, με εφαρμογή δυνάμεως περίπου 80 Newtons στην επιφάνειά της, χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο ξύλινο έμβολο κατά τι μικρότερο από το σωλήνα. Σε περίπτωση ζελατινώδους ουσίας, χρειάζεται προσοχή για την αποφυγή φυσαλλίδων αέρα κατά το γέμισμα.

1.6.2.2. Μηχανική ευαισθησία (κτύπημα)

Η ουσία ελέγχεται σε ξηρή κατάσταση. Το δείγμα πρέπει να έχει όγκο 40 mm^3 ή έναν όγκο κατάλληλο για την ορισμένη συσκευή. Για στερεές ουσίες, με εξαίρεση τις κολλώδεις, εφαρμόζονται τα εξής:

α) ουσίες σε μορφή σκόνης, κοσκινίζονται (μέγεθος κόσκινου 0,5 mm)· ό,τι έχει περάσει από το κόσκινο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο·

β) ουσίες που συμπυκνώθηκαν με πίεση ή χύση ή άλλον τρόπο, αλέθονται και κοσκινίζονται· το κλάσμα του κοσκινίσματος από 0,5 έως 1 mm χρησιμοποιείται για τον έλεγχο.

Για υγρές ουσίες, ο άνω χαλύβδινος κύλινδρος πιέζεται προς τα κάτω μέχρι να έχει απόσταση 1 mm από τον κάτω κύλινδρο και κρατείται σ' αυτή τη θέση.

1.6.2.3. Μηχανική ευαισθησία (τριβή)

Η ουσία ελέγχεται σε ξηρή κατάσταση. Το δείγμα πρέπει να έχει όγκο 10 mm^3. Για στερεές ουσίες, με εξαίρεση τις κολλώδεις, εφαρμόζονται τα εξής:

α) ουσίες σε μορφή σκόνης, κοσκινίζονται (μέγεθος κόσκινου 0,5 mm)· ό,τι έχει περάσει από το κόσκινο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο·

β) ουσίες που συμπυκνώθηκαν με πίεση, χύση ή άλλον τρόπο, αλέθονται και κοσκινίζονται· το κλάσμα του κοσκινίσματος διαμέτρου < 0,5 mm χρησιμοποιείται για τον έλεγχο.

1.6.3. *Εκτέλεση ελέγχου*

1.6.3.1. Θερμική ευαισθησία (αποτέλεσμα φλόγας)

Για τη θέρμανση χρησιμοποιείται προπάνιο προερχόμενο από βιομηχανικούς κυλίνδρους εφοδιασμένους με ρυθμιστή πιέσεως (500 mbar), μέσω μετρητή και διαμοιραζόμενο στους τέσσερις λύχνους με συλλέκτη. Οι τέσσερις λύχνοι δαπανούν 3,2 λίτρα προπανίου το λεπτό. Εάν χρησιμοποιηθούν διαφορετικά αέρια θέρμανσης, πρέπει να γίνει επιλογή κατάλληλων λύχνων, κατανάλωσης αερίου και εισαγωγής αέρα, έτσι ώστε για συγκρίσιμες μετρήσεις με αδρανείς ουσίες (άμμο, διβουτυλική φθαλεΐδη) να σημειωθούν παρόμοιες καμπόλες θερμοκρασίας/χρόνου όπως και με τη θέρμανση με προπάνιο.

Οι λύχνοι είναι τοποθετημένοι γύρω από το θαλαμίσκο ελέγχου, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.

Οι λύχνοι τακτοποιούνται έτσι που η κορυφή του εσωτερικού μπλε κώνου της φλόγας σχεδόν να αγγίζει το σωλήνα. Ο έλεγχος πρέπει να γίνει σε ένα χαλύβδινο θαλαμίσκο με διαστάσεις που δίνονται στο σχήμα 2.

Οι διαστάσεις των καυστήρων προπανίου περιέχονται στο σχήμα 3 (a, b).

Οι διαστάσεις των καυστήρων προπανίου περιέχονται στο σχήμα 3 (α, β). Απαιτούνται δύο σειρές των τριών ελέγχων, με χρησιμοποίηση στην πρώτη σειρά πλάκας με στόμιο, με διάτρημα διαμέτρου 2 mm και στη δεύτερη, διαμέτρου μεγαλύτερης των 2 mm (π.χ. 6 mm).

Αν συμβεί έκρηξη στην πρώτη σειρά (διάτρημα 2 mm), είναι περιττό να συνεχιστεί ο έλεγχος στην επόμενη σειρά. Αν δεν συμβεί έκρηξη μέσα σε 5 λεπτά, το πείραμα σταματά.

1.6.3.2. Μηχανική ευαισθησία (κτύπημα)

Στη συσκευή κρούσης που καθορίστηκε πραγματοποιούνται έξι έλεγχοι, ρίχνοντας το βάρος των 10 kg από ύψος 0,4 m. Σε άλλες συσκευές, το δείγμα συγκρίνεται με m-δινιτροβενζόλιο, χρησιμοποιώντας την καθορισμένη διαδικασία (τεχνική του επάνω και κάτω κλπ.).

1.6.3.3. Μηχανική ευαισθησία (τριβή)

Ο πάσσαλος πορσελάνης τοποθετείται πάνω από την ελεγχόμενη ουσία και προστίθεται το βάρος. Κατά την εκτέλεση του ελέγχου, τα σημάδια του σπόγγου της πορσελάνινης πλάκας πρέπει να είναι εγκάρσια προς τη διεύθυνση της κίνησης. Χρειάζεται προσοχή ώστε ο πάσσαλος να ακουμπά επάνω στο δείγμα, να υπάρχει αρκετή ουσία κάτω από τον πάσσαλο και, ακόμη, η πλάκα κάτω από τον πάσσαλο να κινείται σωστά. Η πλάκα πορσελάνης πρέπει να κινείται κάτω από τον πάσσαλο παλινδρομικά, καλύπτοντας απόσταση 10 mm σε κάθε κατεύθυνση σε χρόνο 0,44 δευτερόλεπτα. Κάθε μέρος της επιφάνειας πρέπει να χρησιμοποιηθεί μόνο για έναν έλεγχο.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

2.1. **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Ο έλεγχος μπορεί να διακοπεί αμέσως μόλις προκύψει ένα θετικό αποτέλεσμα σε ένα πείραμα.

2.2. **Αξιολόγηση**

Κατά κανόνα, μια ουσία ή παρασκεύασμα θεωρείται ότι παρουσιάζει κίνδυνο έκρηξης, κατά την έννοια της οδηγίας, αν:

α) συμβεί έκρηξη (π.χ. ο σωλήνας σκάσει σε τρία ή περισσότερα θραύσματα) σ' ένα από τον καθορισμένο αριθμό πειραμάτων για τη θερμική ευαισθησία· ή

β) μια έκρηξη (ξέσπασμα σε φλόγα είναι ισοδύναμο με έκρηξη) συμβαίνει σ' έναν τουλάχιστον στους έξι ελέγχους με την καθορισμένη συσκευή κρούσεως ή το δείγμα είναι πιο ευαίσθητο από το m-δινιτροβενζόλιο σε έναν εναλλακτικό έλεγχο κρούσης· ή

γ) μια έκρηξη (τριγμός ή ξέσπασμα σε φλόγα είναι ισοδύναμα με έκρηξη) συμβαίνει σε ένα τουλάχιστον στα έξι πειράματα με την καθορισμένη συσκευή τριβής, ήτοι το δείγμα είναι πιο ευαίσθητο από το m-δινιτροβενζόλιο σε έναν εναλλακτικό έλεγχο τριβής.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση ελέγχου θα έπρεπε να περιλαμβάνει τις εξής πληροφορίες:

— ταυτότητα, σύνθεση, καθαρότητα, περιεχόμενη υγρασία κλπ. της ελεγχόμενης ουσίας ή του παρασκευάσματος,

— τη φυσική μορφή του δείγματος και αν το δείγμα έχει κοσκινιστεί ή όχι,

— παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια του ελέγχου (τύπος αντιδράσεως, σπινθήρες, φλόγα, έκρηξη, αριθμός θραυσμάτων κλπ.),

— αποτελέσματα κάθε ελέγχου,

— αν έχει χρησιμοποιηθεί εναλλακτική συσκευή, επιστημονική αιτιολόγηση, καθώς και αποδείξεις συσχέτισης μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από την καθορισμένη συσκευή και εκείνων που ελήφθησαν με ισοδύναμη συσκευή,

— οποιαδήποτε χρήσιμα σχόλια όπως αναφορά σε έλεγχο με παρόμοιες ουσίες, πράγμα που μπορεί να σχετίζεται με μια κατάλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Ερμηνεία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων**

Η έκθεση των αποτελεσμάτων θα έπρεπε να αναφέρει και τα αποτελέσματα εκείνα που θεωρούνται ψευδή, ανώμαλα ή μη αντιπροσωπευτικά. Αν κανένα από τα αποτελέσματα θα έπρεπε να απορριφθεί, θα έπρεπε να δοθεί μια εξήγηση γι' αυτό, καθώς και τα αποτελέσματα από οποιονδήποτε εναλλακτικό ή συμπληρωματικό έλεγχο.

Μερικές φορές τα αποτελέσματα μπορεί να είναι λανθασμένα, πράγμα που σχετίζεται με τη φυσική μορφή ή την πτητική φύση της ουσίας ή του παρασκευάσματος κατά τη διάρκεια του ελέγχου. Σε τέτοιες περιπτώσεις, θα ήταν χρήσιμο να γνωρίζουμε τι είδους αποτελέσματα θα έπαιρνε κανείς όταν η ουσία, ή το παρασκεύασμα, είναι στη μορφή υπό την οποία κυκλοφορεί στην αγορά. Εναλλακτικός έλεγχος πιθανόν να μπορεί να δώσει τέτοια πληροφόρηση. Ένα ανώμαλο αποτέλεσμα, εφόσον μπορεί να εξηγηθεί μ' αυτό τον τρόπο, πρέπει να γίνει αποδεκτό σαν φαινομενική αξία και να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση της ουσίας ή του παρασκευάσματος, ανάλογα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

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

(2) Koenen H., K. H. Ide, Über die Prüfung explosiver Stoffe, I. Ermittlung der Reibempfindlichkeit; Explosive Stoffe 3 (1955), S. 58 – 65 und 89 – 93.

(3) Koenen H., K. H. Ide, 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, pp. 119 – 125, 143 – 148.

(4) Koenen H., K. H. Ide, Haupt W., Über die Prüfung Explosiver Stoffe, IV. Ermittlung der Schlagempfindlichkeit explosiver Stoffe von fester, flüssiger und gelatinoser Beschaffenheit; Explosive Stoffe, vol. 6, 1958, pp. 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).

Προσάρτημα

Παράδειγμα προδιαγραφών υλικού

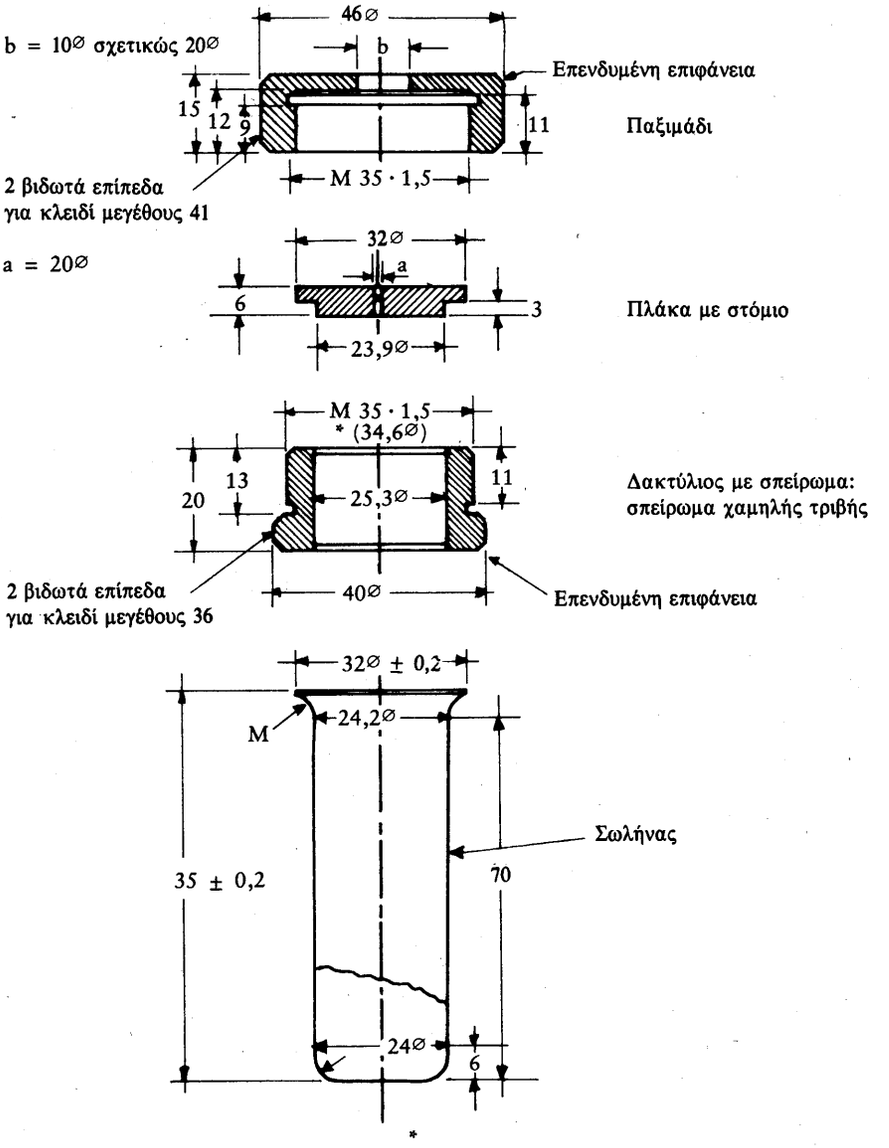
(1) Προδιαγραφές υλικού No 1.0336.505 g, σύμφωνα με το DIN 1623 φύλλο 1.

(2) Προδιαγραφές υλικού No 1.4873, σύμφωνα με το φύλλο «Stahl-Eisen-Werkstoff» 490 – 52.

(3) Προδιαγραφές υλικού No 1.3817, σύμφωνα με το φύλλο «Stahl-Eisen-Werkstoff» 490 – 52.

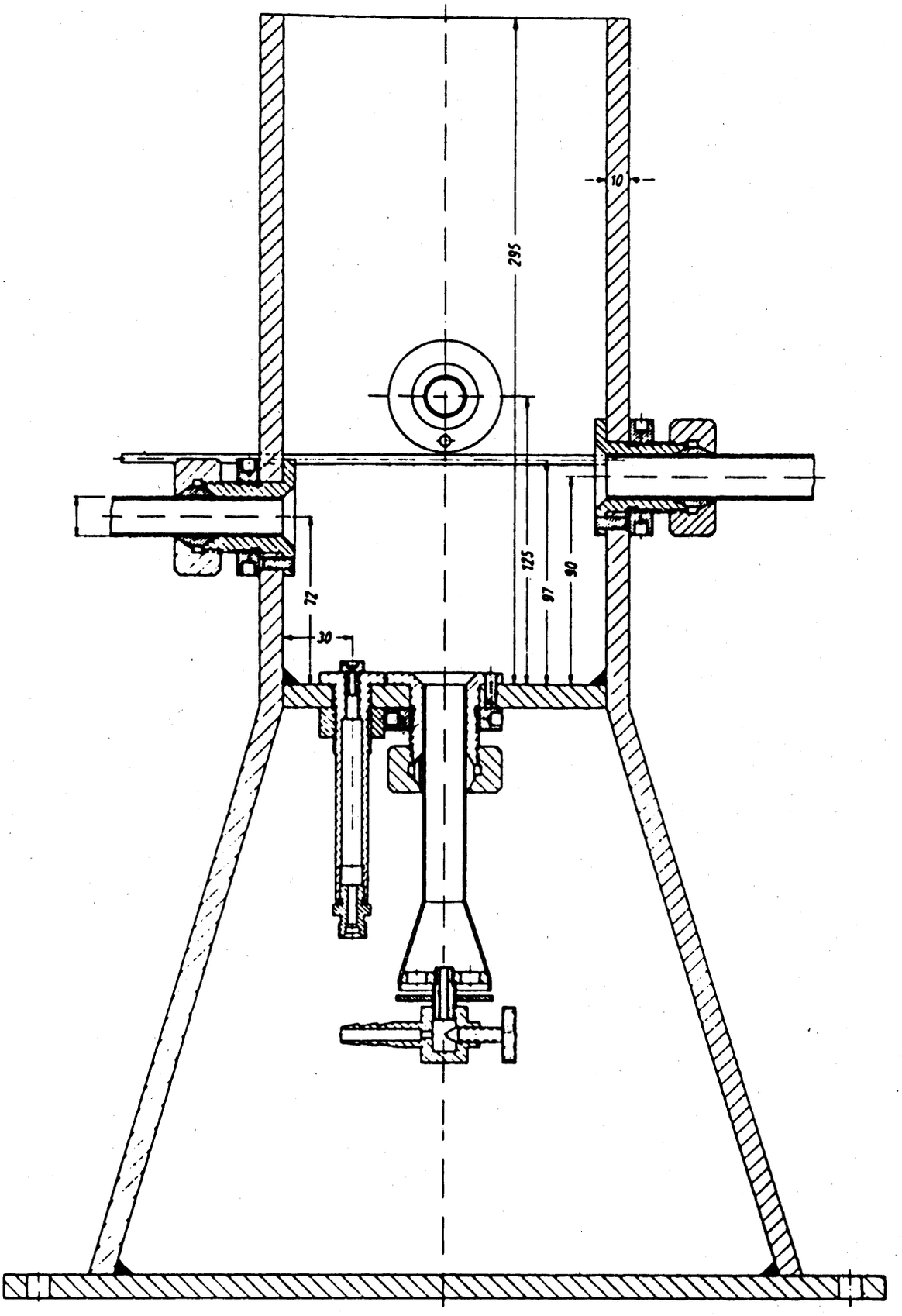
Σχήμα 1

(Διαστάσεις σε mm)



Σχήμα 2

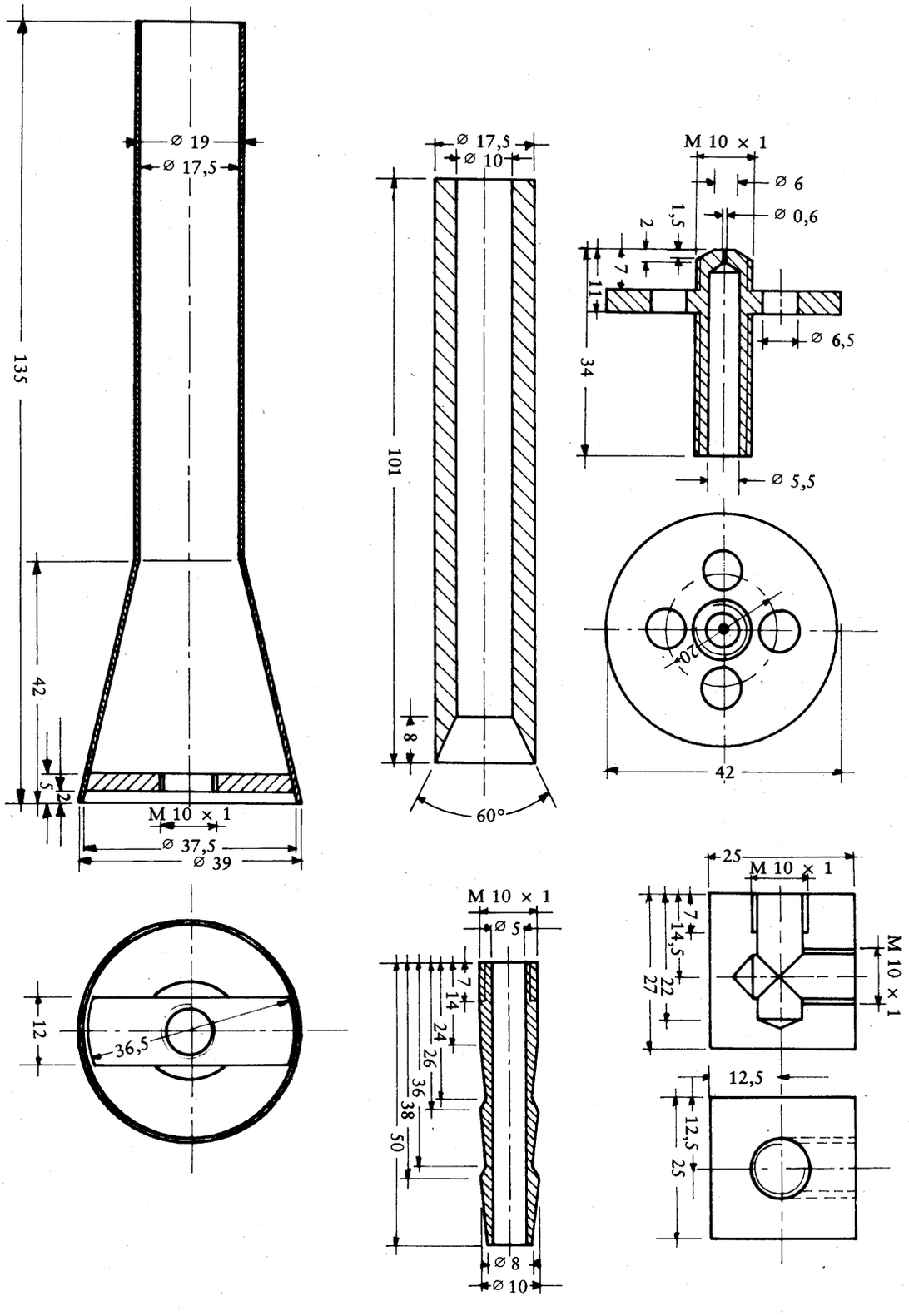
(Διαστάσεις σε mm)



Σχήμα 3α

Υλικό: ορείχαλκος

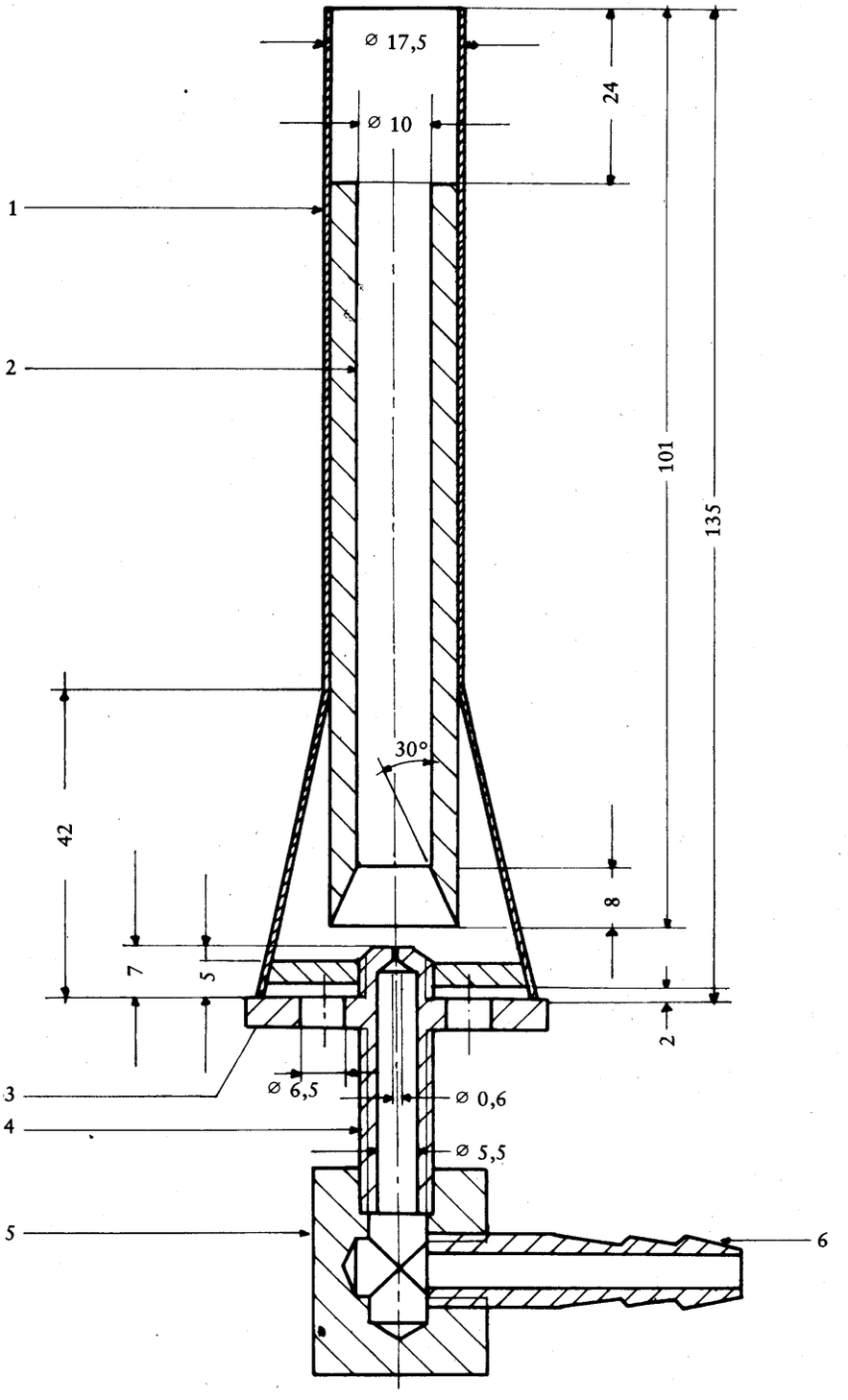
(Διαστάσεις σε mm)



Σχήμα 3β

Υλικό: ορείχαλκος

(Διαστάσεις σε mm)



Α. 15. ΑΥΤΟΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΥΤΟΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ ΚΑΙ ΑΕΡΙΩΝ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Είναι χρήσιμη η ύπαρξη προκαταρκτικής πληροφορήσεως για την αυτοαναφλεξιμότητα μιας ουσίας. Η διαδικασία του ελέγχου εφαρμόζεται σε αέριες και πτητικές υγρές ουσίες όπως κυκλοφορούν, που οι ίδιες ή οι ατμοί τους μπορεί να αναφλεγούν με την παρουσία αέρα, από μία θερμή επιφάνεια. Η θερμοκρασία αυτοαναφλέξεως μπορεί να μειωθεί σημαντικά με την παρουσία καταλυτικώς δρώντων ξένων προσμείξεων.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Ο βαθμός της αυτοαναφλεξιμότητας εκφράζεται σαν θερμοκρασία αυτοαναφλέξεως. Η θερμοκρασία αυτοαναφλέξεως είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία η ελεγχόμενη ουσία, σε μείγμα με αέρα και κάτω από τις συνθήκες που καθορίζονται σ' αυτή τη μέθοδο ελέγχου, θα αναφλεγεί.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Δεν έχουν προσδιοριστεί.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Η αυτοαναφλεξιμότητα των αερίων και ατμών προσδιορίζεται με τη χρήση της συσκευής που περιγράφεται στο IEC 79-4.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Η επαναληψιμότητα ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή θερμοκρασιών της αυτοαναφλεξιμότητας και τη μέθοδο ελέγχου που χρησιμοποιείται· μέγιστη ± 5 °C.

Η ευαισθησία εξαρτάται από τη μέθοδο ελέγχου που χρησιμοποιείται.

Η ειδική εφαρμογή, επίσης, εξαρτάται από τη μέθοδο ελέγχου που χρησιμοποιείται.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου

1.6.1. *Συσκευή*

Η συσκευή περιγράφεται στη μέθοδο που αναφέρεται στο σημείο 1.6.3.

1.6.2. *Συνθήκες ελέγχου*

Δείγμα της ελεγχόμενης ουσίας δοκιμάζεται σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στο σημείο 1.6.3.

1.6.3. *Εκτέλεση του ελέγχου*

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

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Αναγράφεται η θερμοκρασία του ελέγχου, η ατμοσφαιρική πίεση, η ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε, η καθυστέρηση μέχρι να γίνει η ανάφλεξη.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Η έκθεση πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— την ακριβή προδιαγραφή της ουσίας (ταυτότητα και ξένες προσμείξεις),

— την ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε και την ατμοσφαιρική πίεση,

— τα αποτελέσματα των μετρήσεων (θερμοκρασία ελέγχου, αποτελέσματα που αφορούν την ανάφλεξη, αντίστοιχες καθυστερήσεις),

— όλες τις συμπληρωματικές παρατηρήσεις τις σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Καμία.

Α. 16. ΑΥΤΟΑΝΑΦΛΕΞΙΜΟΤΗΤΑ (ΣΤΕΡΕΑ — ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΥΤΟΑΝΑΦΛΕΞΕΩΣ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Εκρηκτικές ουσίες και ουσίες που αναφλέγονται αυθόρμητα σε επαφή με τον αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος δε θα έπρεπε να υποβάλλονται σ' αυτόν τον έλεγχο.

Ο σκοπός αυτού του ελέγχου είναι να χορηγήσει προκαταρκτικές πληροφορίες στην αυτοαναφλεξιμότητα των στερεών ουσιών σε αυξημένες θερμοκρασίες.

Αν η θερμότητα που αναπτύσσεται είτε από την αντίδραση της ουσίας με οξυγόνο είτε από την εξωθερμική αποσύνθεση δε διαχέεται αρκετά γρήγορα στο περιβάλλον, συμβαίνει αυτοθέρμανση που οδηγεί δε αυτοανάφλεξη. Αυτοανάφλεξη, συνεπώς, συμβαίνει όταν η ταχύτητα παραγωγής θερμότητας υπερβαίνει την ταχύτητα διαχύσεως της θερμότητας.

Η εκτέλεση του ελέγχου είναι χρήσιμη σαν μια προκαταρκτική πληροφόρηση για τις στερεές ουσίες. Μπροστά στην πολύπλοκη φύση της αναφλέξεως και καύσεως των στερεών, ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας αυτοαναφλέξεως, κατά τη μέθοδο αυτή, θα έπρεπε να χρησιμοποιείται μόνο για συγκριτικούς σκοπούς.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Η θερμοκρασία αυτοαναφλέξεως, όπως λαμβάνεται κατά τη μέθοδο αυτή, είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία περιβάλλοντος σε °C στην οποία ένας ορισμένος όγκος μιας ουσίας αυτοαναφλέγεται υπό συνθήκες καθορισμένες.

1.3. Ουσία αναφοράς

Ουδεμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Ορισμένος όγκος της ελεγχόμενης ουσίας τοποθετείται σε φούρνο σε θερμοκρασία δωματίου· καταγράφεται η καμπύλη μεταβολής της θερμοκρασίας στο κέντρο του δείγματος σαν συνάρτηση του χρόνου, ενώ η θερμοκρασία του φούρνου ανέρχεται στους 400 °C με ρυθμό 0,5 °C/min. Η θερμοκρασία του φούρνου στην οποία η θερμοκρασία του δείγματος πλησιάζει τους 400 °C με αυτοανάφλεξη καλείται, για τους σκοπούς αυτού του ελέγχου, θερμοκρασία αυτοαναφλέξεως.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Ουδέν.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου

1.6.1. *Συσκευή*

1.6.1.1. Φούρνος

Ένας εργαστηριακός φούρνος (όγκου περίπου 2 l) με πρόγραμμα θερμοκρασίας, εφοδιασμένος με κυκλοφορία αέρα και διέξοδο εκρήξεως. Πρέπει να εξασφαλιστεί ότι τα οποιαδήποτε αέρια της αποσυνθέσεως δεν έρχονται σε επαφή με τα ηλεκτρικά θερμαντικά σύρματα, προς αποφυγή πιθανού κινδύνου εκρήξεως.

1.6.1.2. Κύβος από συρμάτινο πλέγμα

Ένα κομμάτι από χαλύβδινο συρμάτινο πλέγμα, με ανοίγματα 0,045 mm, κόβεται σύμφωνα με το υπόδειγμα του σχήματος 1 (βλέπε προσάρτημα). Το πλέγμα θα διπλωθεί και θα στερεωθεί με τη βοήθεια σύρματος σε σχήμα κύβου ανοικτού προς τα πάνω.

1.6.1.3. Θερμοστοιχεία

Κατάλληλα θερμοστοιχεία.

1.6.1.4. Καταγραφέας

Οποιοσδήποτε καταγραφέας δύο καναλιών βαθμονομημένος από 0 ° έως 600 °C ή αντίστοιχη τάση.

1.6.2. *Συνθήκες ελέγχου*

Οι ουσίες ελέγχονται στη μορφή που κυκλοφορούν.

1.6.3. *Εκτέλεση του ελέγχου*

Ο κύβος γεμίζεται με την ελεγχόμενη ουσία, κρούεται μαλακά και συμπληρώνεται με περαιτέρω προσθήκη ουσίας, μέχρι να γεμισθεί τελείως. Τότε το δείγμα αναρτάται στο κέντρο του φούρνου σε θερμοκρασία δωματίου. Το ένα θερμοστοιχείο τοποθετείται στο κέντρο του κύβου και το άλλο μεταξύ του κύβου και του τοιχώματος του φούρνου για να καταγράφει τη θερμοκρασία του φούρνου.

Οι θερμοκρασίες του φούρνου και του δείγματος καταγράφονται συνεχώς, ενώ η θερμοκρασία του φούρνου αυξάνεται μέχρι τους 400 °C ή μέχρι τη θερμοκρασία τήξεως του στερεού αν αυτή είναι χαμηλότερη, με ρυθμό 0,5 °C/min.

Όταν η ουσία αναφλεγεί, το θερμοστοιχείο του δείγματος θα δείξει μία πολύ οξεία άνοδο της θερμοκρασίας πάνω από τη θερμοκρασία του φούρνου.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Η θερμοκρασία του φούρνου στην οποία το δείγμα πλησιάζει τη θερμοκρασία των 400 °C με αυτοανάφλεξη είναι σχετική για την αξιολόγηση (βλέπε σχήμα 2 στο προσάρτημα).

3. **ΕΚΘΕΣΗ**

Η έκθεση πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— περιγραφή της ελεγχόμενης ουσίας,

— τα αποτελέσματα της μετρήσεως, συμπεριλαμβανομένης της καμπύλης θερμοκρασίας/χρόνου,

— όλες τις συμπληρωματικές παρατηρήσεις που είναι σχετικές με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

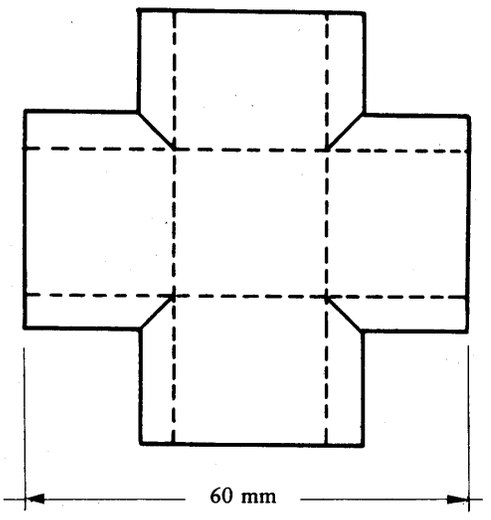
4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Καμία.

Προσάρτημα

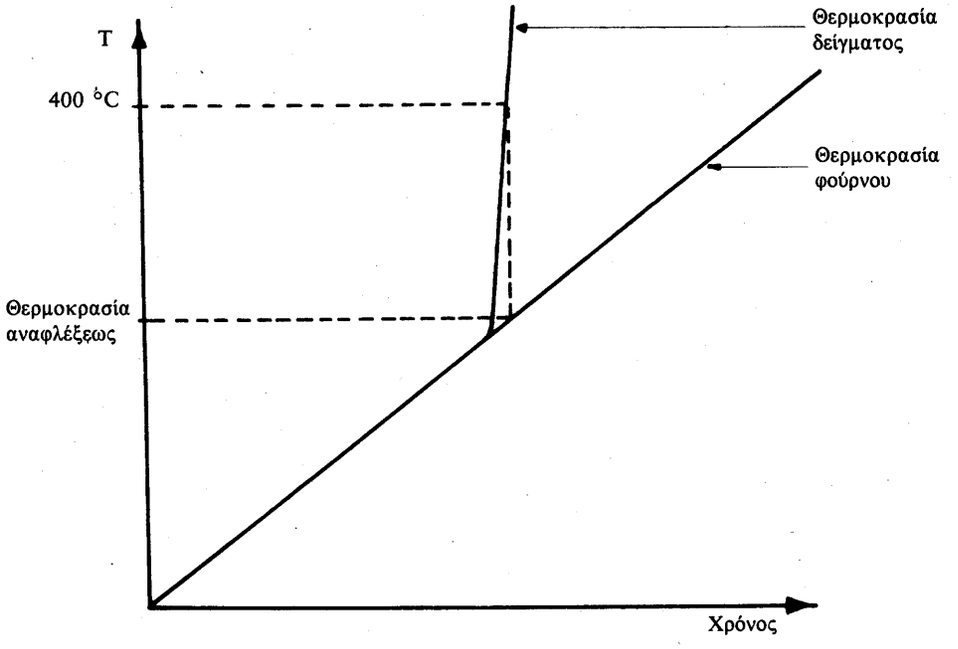
Σχήμα 1

Υπόδειγμα κύβου ελέγχου 20 mm



Σχήμα 2

Τυπική καμπύλη θερμοκρασίας/χρόνου



Α. 17. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Είναι χρήσιμο να υπάρχουν προκαταρκτικές πληροφορίες για τη δυνητικότητα εκρηκτικών ιδιοτήτων και τοξικότητας της ουσίας πριν πραγματοποιηθεί αυτός ο έλεγχος. Ο έλεγχος αυτός δεν εφαρμόζεται σε υγρές και αέριες, εκρηκτικές ή λίαν εύφλεκτες ουσίες, οργανικά υπεροξείδια ή καύσιμες ουσίες με τάση να τήκονται κάτω από τις συνθήκες του ελέγχου. Αυτός ο έλεγχος είναι ανεφάρμοστος όταν η εξέταση του συντακτικού τύπου της ουσίας επιβεβαιώνει, πέρα από κάθε δικαιολογημένη αμφιβολία, ότι η ουσία, ή παρασκεύασμα αυτής, είναι ανίκανη να αντιδράσει εξώθερμα με ένα καύσιμο υλικό. Για να προσδιοριστεί εάν πρέπει να ληφθούν ειδικές προφυλάξεις, θα πρέπει να εκτελεστεί ένας προκαταρκτικός έλεγχος.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Χρόνος καύσης: ο χρόνος αντίδρασης σε δευτερόλεπτα, ο απαιτούμενος για να διαδοθεί η ζώνη αντίδρασης κατά μήκος μιας στήλης, σύμφωνα με τη διαδικασία του σημείου 1.6.

Ταχύτητα καύσης: εκφραζόμενη σε mm/s.

Μέγιστη ταχύτητα καύσης: η υψηλότερη τιμή από τις ταχύτητες καύσης που λαμβάνονται με μείγματα που περιέχουν 10 % έως 90 % κατά βάρος οξειδωτικό.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Το νιτρικό βάριο (ποιότητας ανάλυσης) χρησιμοποιείται σαν ουσία αναφοράς για τον έλεγχο και τον προκαταρκτικό έλεγχο.

Στον προκαταρκτικό έλεγχο μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί το διχρωμικό κάλιο.

Ειδικές προφυλάξεις πρέπει να ληφθούν όταν χειριζόμαστε διχρωμικό κάλιο.

Το μείγμα αναφοράς είναι εκείνο το μείγμα νιτρικού βαρίου με σκόνη κυτταρίνης, παρασκευασμένο σύμφωνα με το σημείο 1.6, που έχει τη μέγιστη ταχύτητα καύσης (συνήθως μείγμα με 60 % κατά βάρος νιτρικό βάριο).

1.4. Αρχή της μεθόδου

Ένας προκαταρκτικός έλεγχος διεξάγεται για λόγους ασφαλείας. Ο έλεγχος θα είναι επαρκής όταν ο προκαταρκτικός έλεγχος δείχνει καθαρά ότι η ελεγχόμενη ουσία, ή παρασκεύασμα αυτής, έχει οξειδωτικές ιδιότητες. Όταν δεν είναι αυτή η περίπτωση, η ουσία ή το παρασκεύασμα αυτής θα υποβληθούν σε περαιτέρω έλεγχο. Κατά τον περαιτέρω έλεγχο, η ελεγχόμενη ουσία και μια καθορισμένη καύσιμη ουσία ανακατεύονται υπό διάφορες αναλογίες. Κάθε μείγμα μορφώνεται σε στήλη και η στήλη ανάβεται στη μια άκρη. Η μέγιστη προσδιοριζόμενη ταχύτητα καύσης συγκρίνεται με τη μέγιστη ταχύτητα καύσης του μείγματος αναφοράς.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Εάν είναι απαραίτητο, κάθε μέθοδος άλεσης και ανάμειξης θεωρείται κατάλληλη, εφόσον η διαφορά στη μέγιστη ταχύτητα καύσης στους έξι διαφορετικούς ελέγχους δε διαφέρει από τη μέση αριθμητική τιμή περισσότερο από 10 %.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προκαταρκτικός έλεγχος*

Η ουσία, ευρισκόμενη στην εμπορική της μορφή, ξηραίνεται. Η ξηραμένη ουσία ανακατεύεται με ξηρή κυτταρίνη με αναλογία, κατά βάρος, 2 μέρη της ελεγχόμενης ουσίας προς 1 μέρος της κυτταρίνης και σχηματίζεται με το μείγμα μια κωνική στήλη διαμέτρου βάσης 3,5 cm και ύψους 2,5 cm χρησιμοποιώντας ένα κωνικό σκεύος χωρίς συμπίεση (π.χ. μια εργαστηριακή χοάνη με το ένα άκρο της βουλωμένο).

Η στήλη τοποθετείται επάνω σε μια δροσερή, αδιαπέραστη, μη αγώγιμη επιφάνεια υπεράνω της πηγής ανάφλεξης, η οποία αποτελείται από ένα αδρανές μεταλλικό σύρμα, από πλατίνα ή νικέλιο (το οποίο μπορεί να θερμανθεί ηλεκτρικά μέχρι 1 000 °C περίπου), τοποθετημένη περίπου 1 mm επάνω από την επιφάνεια ελέγχου και η οποία καλύπτει τη βάση της κωνικού σχήματος στήλης. Ο έλεγχος πρέπει να διεξαχθεί εντός ατμαπαγωγού εστίας, όπως στο σημείο 1.6.3.

Η πηγή ανάφλεξης ανάβεται και τίθεται σε συνεχή λειτουργία. Η ισχύς και η διάρκεια της αντίδρασης παρατηρούνται και σημειώνονται.

Εάν η αντίδραση είναι ισχυρή, η ουσία, ή το παρασκεύασμα αυτής, θεωρείται σαν οξειδωτική.

Σε κάθε περίπτωση που το αποτέλεσμα αφήνει κάποια αμφιβολία, τότε είναι απαραίτητο να συμπληρωθεί ο πλήρης έλεγχος που περιγράφεται παρακάτω.

1.6.2. *Προετοιμασία*

1.6.2.1. Ελεγχόμενη ουσία

Το ελεγχόμενο δείγμα μετατρέπεται σε σωματίδια μεγέθους μικρότερου των 0,125 mm, χρησιμοποιώντας την ακόλουθη διαδικασία:

Κοσκινίζεται η ελεγχόμενη ουσία στην εμπορική της μορφή.

Κονιοποιείται το εναπομείναν κλάσμα, και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου να περάσει από το κόσκινο όλη η ποσότητα της ουσίας.

Κάθε μέθοδος κονιοποίησης και κοσκινίσματος που ικανοποιεί τα ποιοτικά κριτήρια μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

Πριν από την παρασκευή του μείγματος, η ουσία ξηραίνεται στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους.

Αν η θερμοκρασία αποσύνθεσης της ελεγχόμενης ουσίας είναι μικρότερη από 105 °C, η ουσία πρέπει να ξεραθεί σε κατάλληλη χαμηλότερη θερμοκρασία.

1.6.2.2. Καύσιμη ουσία

Σαν καύσιμη ουσία χρησιμοποιείται σκόνη κυτταρίνης. Η κυτταρίνη πρέπει να είναι του τύπου που χρησιμοποιείται για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή χρωματογραφία στήλης.

Έχει αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλος ο τύπος με μήκη ινών που σε ποσοστό πάνω από 85 % κυμαίνονται μεταξύ 0,020 mm και 0,075 mm.

Η σκόνη κυτταρίνης περνάει από κόσκινο με διάμετρο οπών 0,125 mm.

Πριν από την παρασκευή του μείγματος, η σκόνη κυτταρίνης πρέπει να ξεραθεί στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους.

Εάν στον προκαταρκτικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκε ξυλάλευρο, τότε προετοιμάζεται ξυλάλευρο από μαλακό ξύλο, συλλέγοντας τα κλάσματα που πέρασαν από ένα κόσκινο οπής 1 600 μm, ανακατεύονται επιμελώς, ύστερα ξεραίνονται στους 105 °C για τέσσερις ώρες, σε ένα στρώμα πάχους όχι περισσότερο από 25 mm.

Το μείγμα πρέπει να ψυχθεί και να διατηρηθεί σε αεροστεγές δοχείο που να γεμίσει όσο είναι πρακτικά δυνατό έως απαραίτητο, κατά προτίμηση εντός 24 ωρών από την ξήρανση.

1.6.2.3. Μείγμα

Παρασκευάζονται μείγματα οξειδωτικού/κυτταρίνης που περιέχουν 10 έως 90 % κατά βάρος οξειδωτικό με αυξανόμενο προοδευτικά ποσοστό κατά 10 %. Στις οριακές περιπτώσεις πρέπει να χρησιμοποιούνται ενδιάμεσα μείγματα οξειδωτικού/κυτταρίνης, ώστε να προσδιορίζεται ακριβέστερα η μέγιστη ταχύτητα καύσης.

Σημείωση:

Τα μείγματα οξειδωτικών με κυτταρίνη πρέπει να επεξεργάζονται σαν δυνάμενα να εκραγούν και να χειρίζονται με τη δέουσα προσοχή.

Η στήλη μορφώνεται με τη βοήθεια ενός καλουπιού. Το καλούπι είναι κατασκευασμένο από μέταλλο, έχει μήκος 250 mm και τριγωνική διατομή με εσωτερικό ύψος 10 mm και εσωτερικό πλάτος 20 mm. Στα δύο πλάγια του καλουπιού και στην κατά μήκος διεύθυνση τοποθετούνται δύο μεταλλικά φύλλα, σαν πλευρικές έδρες, που φθάνουν 2 mm ψηλότερα από την άνω ακμή της τριγωνικής διατομής (σχήμα).

Η κατασκευή αυτή γεμίζεται χαλαρά με μείγμα, σε μικρή περίσσεια. Αφήνεται το καλούπι να πέσει μια φορά από ύψος 2 cm σε μια στερεή επιφάνεια και η απομένουσα περίσσεια της ουσίας αποξύνεται με ένα φύλλο που μετακινείται λοξά. Αφαιρούνται ύστερα οι πλευρικές έδρες και η σκόνη που μένει λειαίνεται με τη βοήθεια κυλίνδρου. Τώρα, τοποθετείται στην κορυφή του καλουπιού μια πλάκα που δεν καίγεται, αναστρέφεται η συσκευή και αφαιρείται το καλούπι.

1.6.2.4. Πηγή ανάφλεξης

Σαν πηγή ανάφλεξης χρησιμοποιείται η φλόγα ενός λύχνου ή ένα σύρμα λευκοχρύσου που θερμαίνεται ηλεκτρικά στους 1 000 °C περίπου.

1.6.3. *Εκτέλεση του ελέγχου*

Η στήλη τοποθετείται στο ρεύμα μιας ατμαπαγωγού εστίας. Η ταχύτητα του αέρα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μη διαφεύγουν ατμοί μέσα στο εργαστήριο και, επίσης, δεν πρέπει να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του ελέγχου. Ένα κάλυμμα, προστατευτικό για τα ρεύματα, πρέπει να υπάρχει γύρω από τη συσκευή.

Λόγω της υγροσκοπικότητας της κυτταρίνης και των ελεγχόμενων ουσιών, ο έλεγχος πρέπει να διενεργείται όσο το δυνατό γρηγορότερα.

Ανάβεται η μια άκρη της στήλης φέροντας σε επαφή τη φλόγα ή το πυρακτωμένο σύρμα λευκοχρύσου.

Μετριέται ο χρόνος αντίδρασης μήκους 200 mm, αφού η ζώνη αντίδρασης έχει διαδοθεί σε αρχική απόσταση 30 mm.

Ο έλεγχος εκτελείται με την ουσία αναφοράς. Μετά ο έλεγχος διεξάγεται τουλάχιστον μία φορά για κάθε μείγμα της ελεγχόμενης ουσίας με την κυτταρίνη.

Εάν η μέγιστη ταχύτητα καύσης είναι σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη της ουσίας αναφοράς, ο έλεγχος μπορεί να τερματιστεί, διαφορετικά για τα τρία μείγματα που παρήγαγαν τις τρεις υψηλότερες ταχύτητες καύσης ο έλεγχος πρέπει να επαναληφθεί πέντε φορές.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Για λόγους ασφαλείας, η μέγιστη ταχύτητα καύσης — και όχι η μέση τιμή — πρέπει να θεωρείται σαν χαρακτηριστική των οξειδωτικών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης ουσίας. Η υψηλότερη τιμή ταχύτητας καύσης, σε μια σειρά έξι ελέγχων ενός δεδομένου μείγματος, είναι εκείνη που πρέπει να αξιολογηθεί.

Χαράσσεται καμπύλη της υψηλότερης τιμής ταχύτητας καύσης κάθε μείγματος ως προς το ποσοστό του οξειδωτικού.

Από την καμπύλη λαμβάνεται η μέγιστη ταχύτητα καύσης.

Οι έξι μετρηθείσες τιμές ταχύτητας καύσης, οι οποίες λαμβάνονται από μια σειρά μετρήσεων με το μείγμα που έχει τη μέγιστη ταχύτητα καύσης, δεν πρέπει να διαφέρουν από τη μέση αριθμητική τιμή περισσότερο από 10 %, διαφορετικά οι μέθοδοι άλεσης και ανάμειξης πρέπει να βελτιωθούν.

Συγκρίνεται η μέγιστη ταχύτητα καύσης που μετρήθηκε με τη μέγιστη ταχύτητα καύσης του μείγματος αναφοράς (βλέπε σημείο 1.3).

3. **ΕΚΘΕΣΗ**

3.1. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει, εάν είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες:

— περιγραφή της ελεγχόμενης ουσίας,

— κάθε επεξεργασία του ελεγχόμενου δείγματος (π.χ. κονιοποίηση, ξήρανση, κλπ.),

— τα αποτελέσματα των μετρήσεων,

— τον τρόπο αντίδρασης (π.χ. επιφανειακή καύση, καύση μέσα στη μάζα, πληροφορίες σχετικές με τα προϊόντα καύσης, κλπ.),

— κάθε πρόσθετη παρατήρηση που είναι απαραίτητη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της περιγραφής της ισχύος (ανάφλεξη, σπινθηρισμό, καπνό, αργή καύση, κλπ.).

Και κατά προσέγγιση, τη διάρκεια του προκαταρκτικού ελέγχου ασφαλείας για την ελεγχόμενη και την ουσία αναφοράς.

3.2. **Ερμηνεία των αποτελεσμάτων**

Μια ουσία πρέπει να θεωρείται σαν οξειδωτική ουσία όταν:

α) στον προκαταρκτικό έλεγχο η αντίδραση είναι ισχυρή·

β) η μέγιστη ταχύτητα καύσης των ελεγχόμενων μειγμάτων είναι μεγαλύτερη ή ίση προς τη μέγιστη ταχύτητα καύσης του μείγματος αναφοράς κυτταρίνης και νιτρικού βαρίου.

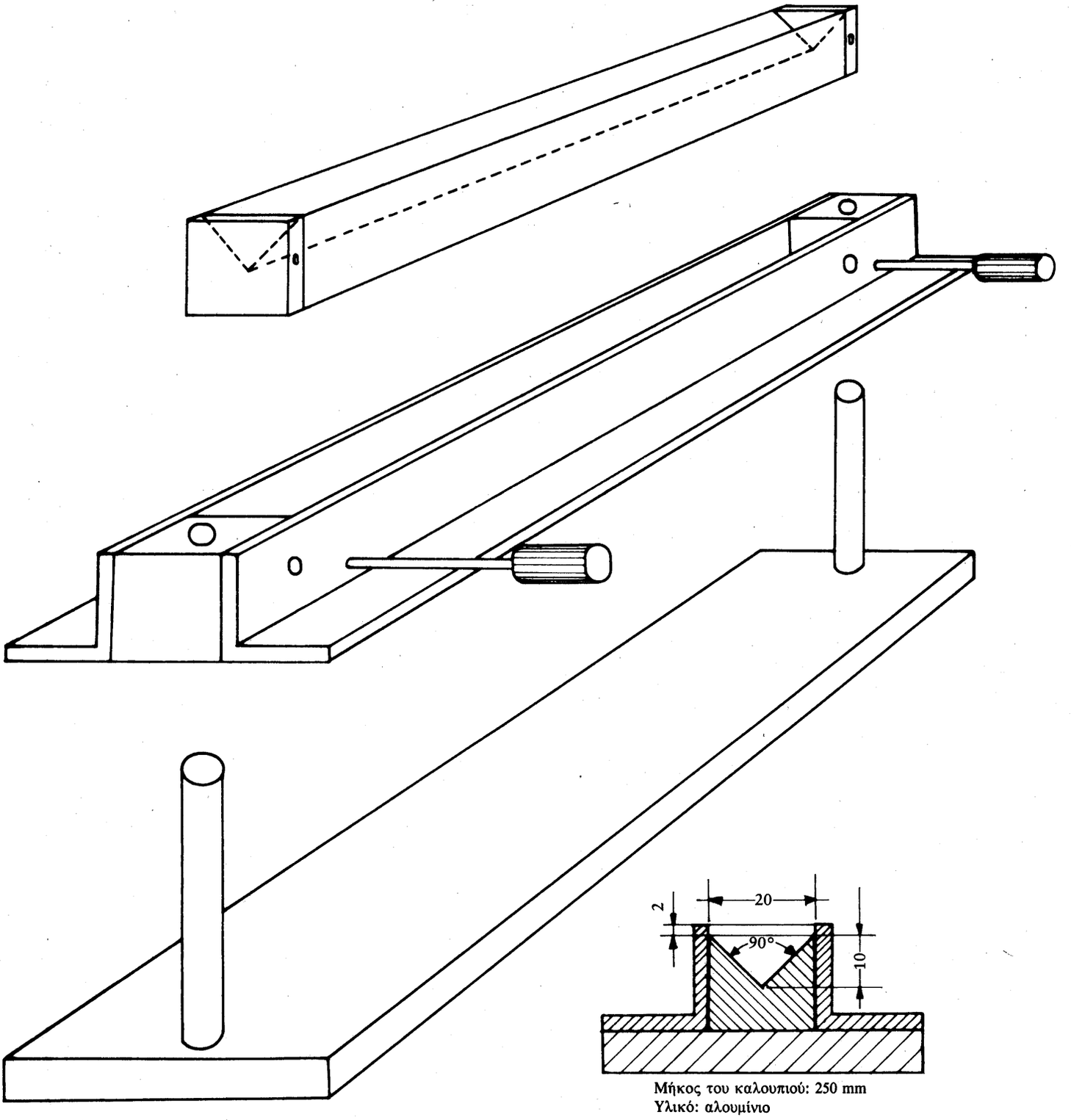
4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Καμία.

Προσάρτημα

Σχήμα

Καλούπι και εξαρτήματα για την ετοιμασία της στήλης
(Όλες οι διαστάσεις εκφράζονται σε mm)



Μήκος του καλουπιού: 250 mm
Υλικό: αλουμίνιο

ΜΕΡΟΣ Β: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΜΕΡΟΣ Β

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε γενική εισαγωγή.

B. ΟΡΙΣΜΟΙ

i) *Η οξεία τοξικότητα* περιλαμβάνει τις δυσμενείς επιδράσεις που εμφανίζονται μέσα σε δεδομένο χρονικό διάστημα (συνήθως 14 ημέρες) μετά από τη χορήγηση μιας και μόνο δόσεως μιας ουσίας.

ii) *Η LD_{50}* (μέση θανατηφόρος δόση) είναι η στατιστικά υπολογισμένη μία και μοναδική δόση μιας ουσίας η οποία αναμένεται να προκαλέσει το θάνατο σε 50 % των δηλητηριασμένων ζώων. Η τιμή της LD_{50} εκφράζεται με το βάρος της ελεγχόμενης ουσίας προς τη μονάδα βάρους του πειραματόζωου (mg/kg).

iii) *Η LC_{50}* (μέση θανατηφόρος συγκέντρωση) είναι η στατιστικά υπολογισμένη συγκέντρωση μιας ουσίας η οποία αναμένεται να προκαλέσει το θάνατο, κατά την έκθεση ή μέσα σε προκαθορισμένο χρόνο μετά την έκθεση, σε 50 % των ζώων που εκτέθηκαν σ' αυτή για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα. Η τιμή της LC_{50} εκφράζεται με το βάρος της ελεγχόμενης ουσίας ανά σταθερό όγκο αέρα (mg/l).

iv) *Το επίπεδο μη τοξικών επιδράσεων* είναι η μέγιστη δόση ή το μέγιστο επίπεδο εκθέσεως που χρησιμοποιούνται σε μία δοκιμασία και δεν προκαλούν κανένα εμφανές τοξικό φαινόμενο.

v) *Η υποξεία/υποχρόνια τοξικότητα* περιλαμβάνει τις δυσμενείς επιδράσεις που εμφανίζονται στα πειραματόζωα σαν αποτέλεσμα των επανειλημμένων ημερήσιων χορηγήσεων μιας χημικής ουσίας ή εκθέσεων σ' αυτή για ένα βραχύ χρονικό διάστημα, μέρος της αναμενόμενης διάρκειας ζωής τους.

vi) *Η μέγιστη ανεκτή δόση* (ΜΑΔ) είναι το υψηλότερο επίπεδο δόσεων που προκαλεί τοξικά συμπτώματα χωρίς όμως σοβαρές επιδράσεις για την επιβίωση των ζώων, επιβίωση σχετική με τη δοκιμασία π.χ. σε μελέτες καρκινογένεσης, επιδράσεις που την προκαλούν άλλες από οιδήματα.

vii) *Δερματική ερεθιστικότητα* είναι η δημιουργία αντιστρεπτών φλογώσεων στο δέρμα ύστερα από την εφαρμογή μιας ελεγχόμενης ουσίας.

viii) *Ερεθιστικότητα οφθαλμού* είναι η δημιουργία αντιστρεπτών μεταβολών στον οφθαλμό ύστερα από την εφαρμογή μιας ελεγχόμενης ουσίας στην εσωτερική επιφάνεια του οφθαλμού.

ix) *Ευαισθητοποίηση δέρματος* (αλλεργική δερματίτης επαφής) είναι μία δερματική αντίδραση σε μία ουσία ενεργούμενη ανοσιολογικά.

Γ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Υπάρχουν όρια για τη δυνατότητα απευθείας επεκτάσεως των αποτελεσμάτων δοκιμών στα πειραματόζωα και *in vitro,* στον άνθρωπο, και αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν γίνεται η αξιολόγηση και η ερμηνεία των δοκιμών.

Εφόσον υπάρχουν δεδομένα για τον άνθρωπο, αυτά θεωρούνται πιο σχετικά με τον προσδιορισμό των δυναμικών επιδράσεων των χημικών ουσιών σε πληθυσμό ανθρώπων.

ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ (συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου διαλογής της καρκινογένεσης)

Για την προκαταρκτική εκτίμηση της μεταλλαξογόνου δράσεως μιας ουσίας, είναι αναγκαία η απόκτηση πληροφοριών για δύο κατηγορίες τελικών στόχων, δηλαδή τη μετάλλαξη γόνων και τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Αυτοί οι δύο τελικοί στόχοι αξιολογούνται με τις ακόλουθες δοκιμασίες:

i) δοκιμασίες για την παραγωγή γονιδιακών μεταλλάξεων (μεταλλάξεις σημείων) σε προκαρυωτικά κύτταρα, όπως η *Salmonella typhimurium.* Δοκιμασίες με την *Escherichia coli* είναι, επίσης, επιτρεπτές. Η εκλογή ανάμεσα στους δύο αυτούς πειραματικούς οργανισμούς μπορεί να καθοριστεί από τη φύση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·

ii) δοκιμασίες για την παραγωγή χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε κύτταρα θηλαστικών αναπτυχθέντα *in vitro*. Διαδικασία *in vivo* (όπως αυτή του μικροπυρήνα ή της αναλύσεως της μεταφάσεως στα κύτταρα του μυελού των οστών) είναι επίσης επιτρεπτή.

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η τοξικολογία είναι μια αναπτυσσόμενη πειραματική επιστήμη. Υπάρχει άφθονη βιβλιογραφία για κάθε θέμα. Σχετικές πληροφορίες μπορούν να βρεθούν στις κατευθυντήριες δοκιμασίες του ΟΟΣΑ.

Πρόσθετες παρατηρήσεις

Περιποίηση ζώων

Για τις δοκιμασίες τοξικότητας, ο αυστηρός έλεγχος των συνθηκών του περιβάλλοντος και οι κατάλληλες τεχνικές για την περιποίηση των ζώων είναι ουσιώδεις.

i) Συνθήκες εγκλωβισμού

Οι συνθήκες περιβάλλοντος στους θαλάμους των πειραματοζώων πρέπει να είναι οι κατάλληλες για το κάθε είδος πειραματοζώου. Για τα τρωκτικά, η κατάλληλη θερμοκρασία είναι 22 °C (± 3 °C) με σχετική υγρασία 30—70 %. Για τα κουνέλια και τα ινδικά χοιρίδια, η θερμοκρασία πρέπει να είναι 20 °C (± 3°C) με σχετική υγρασία 30—70 %.

Μερικές πειραματικές τεχνικές είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην επίδραση της θερμοκρασίας και, σ' αυτές τις περιπτώσεις, η περιγραφή της πειραματικής μεθόδου πρέπει να περιλαμβάνει και λεπτομέρειες για τις κατάλληλες συνθήκες. Σε όλες τις έρευνες για τις τοξικές επιδράσεις, η θερμοκρασία και η υγρασία πρέπει να παρακολουθούνται, να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στη σύνταξη της τελικής εκθέσεως της μελέτης.

Όταν ο φωτισμός είναι τεχνητός, η φωτοπερίοδος πρέπει να αποτελείται από 12 ώρες φωτός και 12 ώρες σκότους. Λεπτομέρειες για τον προγραμματισμό της φωτοπεριόδου πρέπει να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στη σύνταξη της τελικής εκθέσεως της μελέτης.

Στις εκθέσεις πειραματισμού στα ζώα, είναι σημαντικό να αναφέρεται ο τύπος των χρησιμοποιουμένων κλωβών και οι αριθμοί των ζώων ανά κλωβό, τόσο κατά την περίοδο εκθέσεως στη χημική ουσία όσο και κατά την περίοδο των παρατηρήσεων.

ii) Συνθήκες διατροφής

Τα σιτηρέσια πρέπει να ανταποκρίνονται σε όλες τις τροφικές απαιτήσεις του χρησιμοποιούμενου πειραματοζώου. Όταν οι ουσίες χορηγούνται στα ζώα μαζί με την τροφή τους, η θρεπτική αξία του σιτηρεσίου μπορεί και να ελαττωθεί λόγω αλληλεπιδράσεών μεταξύ της ουσίας και των συστατικών της τροφής.

Η δυνατότητα μιας τέτοιας αντιδράσεως πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν γίνεται ερμηνεία των αποτελεσμάτων του πειράματος.

Τροφικές μολυσματικές ουσίες που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την τοξικότητα δεν πρέπει να περιέχονται στο σιτηρέσιο σε ικανές συγκεντρώσεις.

Β. 1. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. Ουσίες αναφοράς

Ουδεμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα, με οισοφαγική καθετηρίαση, σε διαβαθμισμένες δόσεις στις διάφορες ομάδες πειραματοζώων, μία δόση ανά ομάδα. Στη συνέχεια, γίνονται παρατηρήσεις για τοξικές επιδράσεις και θανάτους. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια του πειράματος νεκροτομούνται, όπως και αυτά που επιζούν, στο τέλος του πειράματος. Η μέθοδος αυτή είναι για προκαταρκτικές μελέτες σε είδη τρωκτικών.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Ουδέν.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Τα ζώα κρατούνται, για τουλάχιστον 5 ημέρες πριν από την έναρξη του πειράματος, στις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής. Πριν από τη δοκιμή, νεαρά, υγιή, ενήλικα ζώα λαμβάνονται με τυχαιοποίηση και κατανέμονται σε πειραματικές ομάδες. Η ελεγχόμενη ουσία, όταν χρειάζεται, διαλύεται ή γίνεται αιώρημα σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος, στη συνέχεια αντιμετωπίζεται η χρήση διαλυμάτων σε φυτικά λάδια και μετά διάλυση ή αιώρημα σε άλλους πιθανούς φορείς. Για τους μη υδατικούς φορείς, τα σχετικά τοξικά χαρακτηριστικά τους πρέπει να είναι γνωστά ή να προσδιορίζονται πριν ή κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Για τα τροκτικά, ο όγκος του φορέα δεν πρέπει κανονικά να υπερβαίνει τα 10 ml/kg βάρους του σώματος, εκτός από την περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων όπου μπορεί να χρησιμοποιείται όγκος φορέα 20 ml/kg. Διαφορές στον χορηγούμενο όγκο πρέπει να αποφεύγονται. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσαρμογή της συγκεντρώσεως, ώστε να εξασφαλίζεται ο σταθερός όγκος για όλες τις χορηγούμενες δόσεις.

1.6.2. *Συνθήκες ελέγχου*

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις, ο επίμυς είναι το προτιμώμενο είδος.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται οι συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Για κάθε φύλο, το εύρος της διαφοράς βάρους των χρησιμοποιουμένων ζώων σε μια δοκιμασία δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % της κανονικής μέσης τιμής.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Χρησιμοποιούνται 10 τουλάχιστον τρωκτικά (5 θηλυκά και 5 αρσενικά) για κάθε επίπεδο δόσεως. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

1.6.2.3. Επίπεδα δόσεων

Οι δόσεις πρέπει να είναι αρκετές σε αριθμό, τουλάχιστον τρεις, και κατάλληλα κατανεμημένες έτσι ώστε να δημιουργούνται πειραματικές ομάδες με εύρος τοξικών επιδράσεων και ποσοστών θνησιμότητας. Τα δεδομένα πρέπει να είναι αρκετά για την κατασκευή της καμπύλης τοξικότητας και, εφόσον είναι δυνατόν, τον προσδιορισμό της LD_{50}.

1.6.2.4. Οριακή δοκιμασία

Για τις περισσότερες περιπτώσεις, μπορεί να γίνει μια ικανοποιητική εκτίμηση της οξείας από στόματος δυναμικήςτοξικής ενέργειας μιας, αν μετά τη χορήγηση μιας δόσεως 5 000 mg/kg δεν παρατηρήθηκε μέσα σε 14 ημέρες θνησιμότητα (σε ομάδα 5 ζώων από κάθε φύλο) που να μπορεί να αποδοθεί στην ουσία.

1.6.2.5. Περίοδος παρατηρήσεων

Η περίοδος παρατηρήσεων πρέπει να είναι τουλάχιστον 14 ημέρες. Εντούτοις, η διάρκεια των παρατηρήσεων δεν πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένη. Αυτή θα προσδιορίζεται από τις τοξικές αντιδράσεις, την ταχύτητα εμφανίσεώς τους και τη διάρκεια του χρόνου που απαιτείται για την ανάρρωση. Έτσι η περίοδος μπορεί να επεκταθεί, αν αυτό κριθεί αναγκαίο. Ο χρόνος εμφανίσεως και εξαφανίσεως των τοξικών συμπτωμάτων και ο χρόνος θανάτου είναι σημαντικοί, κυρίως όταν παρατηρείται μία τάση για καθυστερημένη θνησιμότητα.

1.6.3. *Διαδικασία*

Τα ζώα πρέπει να υποβάλλονται σε νηστεία πριν από τη χορήγηση της ουσίας. Ο επίμυς πρέπει να μένει χωρίς τροφή όλη τη νύκτα. Για ζώα με υψηλότερο μεταβολισμό, συνιστάται μικρότερη περίοδος νηστείας. Για χορήγηση νερού δεν υπάρχει περιορισμός. Την επόμενη ημέρα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται και να τους χορηγείται η ελεγχόμενη ουσία, σε μία δόση ανά ομάδα, με στομαχική καθετηρίαση. Αν η χορήγηση μιας μόνο δόσεως δεν είναι δυνατή, η δόση μπορεί να χορηγείται σε μικρότερα κλάσματα, σε μία περίοδο που δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες. Μετά τη χορήγηση της ουσίας, δεν πρέπει να παρέχεται τροφή για άλλες 3 — 4 ώρες. Όταν μία δόση χορηγείται κατά κλάσματα μέσα σε μία χρονική περίοδο, ίσως χρειασθεί η χορήγηση τροφής και νερού και αυτό θα εξαρτηθεί από τη διάρκεια χορηγήσεως της χημικής ουσίας. Μετά τη χορήγηση της ουσίας, γίνονται παρατηρήσεις που θα πρέπει να καταγράφονται συστηματικά και ατομικά για κάθε ζώο. Κατά τη διάρκεια της πρώτης ημέρας, οι παρατηρήσεις πρέπει να γίνονται συχνά. Πρέπει να γίνεται μία προσεκτική κλινική εξέταση, τουλάχιστον μια φορά κάθε εργάσιμη ημέρα, άλλες παρατηρήσεις πρέπει να γίνονται καθημερινά και να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα για την ελάττωση απωλειών ζώων, π.χ. νεκροψία ή ψύξη των ζώων που βρέθηκαν νεκρά και απομόνωση ή θανάτωση των εξασθενημένων ή ετοιμοθάνατων ζώων. Οι παρατηρήσεις πρέπει να περιλαμβάνουν τις αλλαγές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στα μάτια κα στους βλεννογόνους, όπως επίσης και τις αλλαγές του αναπνευστικού, κυκλοφορικού, αυτόνομου και κεντρικού νευρικού συστήματος, της σωματοκινητικής δραστηριότητας και του τρόπου συμπεριφοράς. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στις παρατηρήσεις τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Ο χρόνος θανάτου πρέπει να καταγράφεται όσο το δυνατόν ακριβέστερα.

Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας και εκείνα που επιζούν στο τέλος του πειράματος υπόκεινται σε νεκροψία. Όλες οι μακροσκοπικά παρατηρούμενες παθολογικές αλλοιώσεις πρέπει να καταγράφονται. Όπου ενδείκνυται, πρέπει να λαμβάνονται ιστοί για ιστοπαθολογική εξέταση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να παρουσιάζονται συνοπτικά σε πίνακα, στον οποίο θα φαίνονται, για κάθε πειραματική ομάδα, ο αριθμός των ζώων κατά την έναρξη του πειράματος, ο χρόνος θανάτου για κάθε ζώο χωριστά, ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν άλλα συμπτώματα τοξικότητας, περιγραφή τοξικών συμπτωμάτων και τα αποτελέσματα της νεκροψίας. Το βάρος κάθε ζώου πρέπει να προσδιορίζεται και να καταγράφεται λίγο πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας, κατόπιν ανά εβδομάδα και κατά το θάνατο. Οι αλλαγές στο βάρος πρέπει να υπολογίζονται και να καταγράφονται, εφόσον τα ζώα επιζούν περισσότερο από μία ημέρα μετά τη χορήγηση. Η LD_{50} μπορεί να προσδιοριστεί με μια αναγνωρισμένη μέθοδο. Η αξιολόγηση των δεδομένων πρέπει να περιλαμβάνει τη σχέση, εάν υπάρχει, μεταξύ της

εκθέσεως των ζώων στην ελεγχόμενη ουσία και της συχνότητας και σοβαρότητας όλων των ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων των ανωμαλιών συμπεριφοράς και των κλινικών ανωμαλιών, μακροσκοπικών αλλοιώσεων, αλλαγών του σωματικού βάρους, της θνησιμότητας και άλλων τοξικών επιδράσεων.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

3.1. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— είδος, φυλή, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διατροφή, κλπ.,

— συνθήκες πειράματος,

— επίπεδα δόσεων (με φορέα, εάν χρησιμοποιείται, και συγκέντρωση),

— κατάταξη, σε πίνακα, των αντιδράσεων ανά φύλο και δόση (δηλαδή ο αριθμός των ζώων που πέθαναν, ο αριθμός των ζώων που έδειξαν συμπτώματα τοξικότητας και ο αριθμός ζώων που δηλητηριάστηκαν),

— χρόνος θανάτου μετά τη δηλητηρίαση,

— παρατηρήσεις επί των κλωβών,

— τιμή της LD_{50} για κάθε φύλο, προσδιορισμένη τη 14η ημέρα (η μέθοδος προσδιορισμού να ορίζεται λεπτομερώς),

— διάστημα εμπιστοσύνης 95 % για την LD_{50},

— καμπύλη τοξικότητας και κλίση καμπύλης (εφόσον το επιτρέπει η μέθοδος προσδιορισμού),

— αποτελέσματα νεκροψίας,

— κάθε ιστοπαθολογικό αποτέλεσμα,

— συζήτηση επί των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Β. 2. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ)

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Ουδεμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Διάφορες ομάδες πειραματοζώων εκτίθενται για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, μιας μόνο συγκεντρώσεως χρησιμοποιούμενης ανά ομάδα. Στη συνέχεια γίνονται παρατηρήσεις για τοξικές επιδράσεις και θανάτους. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας νεκροτομούνται, καθώς επίσης και εκείνα που επιζούν στο τέλος της δοκιμασίας.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Ουδέν.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Τα ζώα κρατούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής τουλάχιστον για 5 ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή, νεαρά ζώα λαβάνονται με τυχαιοποίηση και κατανέμονται στον απαιτούμενο αριθμό ομάδων. Τα ζώα δεν είναι ανάγκη να υφίστανται παρόμοιες εκθέσεις, εκτός εάν αυτό ενδείκνυται από τον τύπο της χρησιμοποιούμενης συσκευής εκθέσεως.

Μπορεί να προστεθεί, εάν χρειάζεται, ένας κατάλληλος φορέας στην ελεγχόμενη ουσία για να βοηθήσει την παραγωγή κατάλληλης συγκεντρώσεως στην ατμόσφαιρα. Σ' αυτή την περίπτωση, πρέπει να χρησιμοποιηθεί και μία ομάδα μάρτυρα με το φορέα. Αν φορέας ή άλλες προσθετικές ουσίες χρησιμοποιούνται για να διευκολύνουν τη χορήγηση, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Ιστορικά στοιχεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν, εάν είναι διαθέσιμα.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις, ο επίμυς είναι το είδος που προτιμάται. Πρέπει να χρησιμοποιούνται οι συνήθεις φυλές των εργαστηρίων. Για κάθε φύλο, η διαφορά βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % της κανονικής μέσης τιμής.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Για κάθε επίπεδο δόσεων, πρέπει να χρησιμοποιούνται 10 τουλάχιστον τρωκτικά (5 θηλυκά και 5 αρσενικά). Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

1.6.2.3. Συγκεντρώσεις εκθέσεως

Αυτές πρέπει να είναι αρκετές σε αριθμό, τουλάχιστον τρεις και κατάλληλα κατανεμημένες έτσι ώστε να δημιουργούνται πειραματικές ομάδες με εύρος τοξικών επιδράσεων και ποσοστών θνησιμότητας. Τα δεδομένα πρέπει να είναι αρκετά για την κατασκευή καμπύλης τοξικότητας και, εφόσον είναι δυνατόν, τον προσδιορισμό της LC_{50}.

1.6.2.4. Οριακή δοκιμασία

Εάν η έκθεση 5 αρσενικών και 5 θηλυκών πειραματοζώων σε 20 mg/l ενός αερίου ή 5 mg/l ενός αερολύματος ή σωματιδίων για 4 ώρες ή όταν αυτό δεν είναι δυνατό λόγω των φυσικών ή χημικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της εκρηκτικότητας της ελεγχόμενης ουσίας, στη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση, δεν προκάλεσε καμιά τοξικότητα σχετική με την ουσία, μέσα σε 14 ημέρες, τότε η περαιτέρω μελέτη μπορεί να μη θεωρείται απαραίτητη.

1.6.2.5. Χρόνος εκθέσεως

Η ελάχιστη χρονική περίοδος εκθέσεως πρέπει να είναι 4 ώρες.

1.6.2.6. Συσκευές

Η δοκιμή στα ζώα πρέπει να γίνεται με αναπνευστικές συσκευές, σχεδιασμένες για να διατηρούν μια δυναμική ροή του αέρα τουλάχιστον 12 αλλαγών την ώρα, να εξασφαλίζουν επάρκεια οξυγόνου και μια ομαλά κατανεμημένη ατμόσφαιρα εκθέσεως. Όταν χρησιμοποιείται θάλαμος, το σχήμα του πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να μειώνεται στο ελάχιστο ο συνωστισμός των πειραματοζώων και να αυξάνεται όσο το δυνατό περισσότερο η αναπνευστική τους έκθεση στην ελεγχόμενη ουσία. Γενικά, για να εξασφαλίζεται σταθερότητα στην ατμόσφαιρα ενός θαλάμου, ο ολικός όγκος των πειραματοζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του πειραματικού θαλάμου. Μπορεί να χρησιμοποιείται στοματορρινικός, κεφαλικός ή ολοκλήρου το σώματος ατομικός θάλαμος εκθέσεως. Οι δύο πρώτοι επιβοηθούν την ελάττωση στο ελάχιστο της λήψεως της ελεγχόμενης ουσίας από άλλες οδούς.

1.6.2.7. Περίοδος παρατηρήσεων

Η περίοδος παρατηρήσεων πρέπει να είναι τουλάχιστον 14 ημέρες. Εντούτοις, η διάρκεια των παρατηρήσεων δεν θα πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένη. Θα πρέπει να προσδιορίζεται από τις τοξικές αντιδράσεις, την τάξη εμφανίσεώς τους και τη διάρκεια της περιόδου αναρρώσεως. Έτσι, θα μπορεί να επεκταθεί όταν αυτό θεωρηθεί αναγκαίο. Ο χρόνος κατά τον οποίο εμφανίζονται και εξαφανίζονται τα συμπτώματα τοξικότητας και ο χρόνος θανάτου είναι σημαντικός, ιδίως αν υπάρχει τάση να εμφανίζονται οι θάνατοι καθυστερημένα.

1.6.3. *Πορεία*

Λίγο πριν την έκθεση τα ζώα ζυγίζονται και στη συνέχεια εκτίθενται στην υπό μελέτη συγκέντρωση μέσα στη συσκευή, για ένα διάστημα τουλάχιστον 4 ωρών, μετά από εξισορρόπηση της συγκεντρώσεως του θαλάμου. Ο χρόνος εξισορροπήσεως πρέπει να είναι βραχύς. Η θερμοκρασία, στην οποία εκτελείται η δοκιμασία, πρέπει να διατηρείται στους 22 °C ± 3 °C. Η ιδεώδης σχετική υγρασία πρέπει να διατηρείται μεταξύ 30 και 70 %, αλλά μερικές φορές (όπως στις δοκιμασίες με αερολύματα) αυτό δεν είναι πρακτικά πραγματοποιήσιμο. Τροφή και νερό δεν πρέπει να παρέχονται κατά τη διάρκεια της εκθέσεως. Πρέπει να χρησιμοποιείται ένα δυναμικό σύστημα αναπνευστικής εκθέσεως με ένα κατάλληλο σύστημα ελέγχου της συγκεντρώσεως. Για την πραγματοποίηση της κατάλληλης συγκεντρώσεως, συνιστάται μια προκαταρκτική δοκιμασία. Το σύστημα πρέπει να εξασφαλίζει την όσο το δυνατό ταχύτερη πραγματοποίηση σταθερών συνθηκών εκθέσεως. Η ταχύτητα του αέρα πρέπει να προσαρμόζεται έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιογένεια των συνθηκών σε όλο το θάλαμο εκθέσεως.

Πρέπει να γίνονται μετρήσεις ή παρακολούθηση:

α) της ταχύτητας του αέρα (συνεχώς)·

β) της πραγματικής συγκεντρώσεως της ελεγχόμενης ουσίας μετρουμένης στη ζώνη αναπνοής. Κατά τη διάρκεια της περιόδου εκθέσεως, η συγκέντρωση δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από ± 15 % της μέσης τιμής. Εντούτοις, στην περίπτωση των κόνεων και μερικών αερολυμάτων, αυτό το επίπεδο ελέγχου μπορεί να μην είναι εφικτό, τότε θα πρέπει να γίνεται δεκτό ένα μεγαλύτερο εύρος. Η ανάλυση των σωματιδίων και των αερολυμάτων πρέπει να γίνεται τόσο συχνά όσο είναι απαραίτητο, τουλάχιστον μια φορά, για να προσδιορίζεται η κατανομή του μεγέθους των·

γ) της θερμοκρασίας και υγρασίας·

δ) κατά τη διάρκεια και μετά την έκθεση, γίνονται τακτικά παρατηρήσεις και καταχωρούνται συστηματικά· πρέπει να γίνονται ξεχωριστές καταχωρήσεις για κάθε ζώο. Κατά την πρώτη ημέρα οι παρατηρήσεις πρέπει να γίνονται συχνά. Μια φορά την ημέρα πρέπει να γίνεται μια προσεκτική κλινική εξέταση. Πρόσθετες παρατηρήσεις πρέπει να γίνονται καθημερινά και να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα για να μειώνεται στο ελάχιστο η απώλεια των ζώων από τη μελέτη· δηλαδή νεκροψίες ή ψύξη των ζώων που βρέθηκαν νεκρά και απομόνωση ή θανάτωση των ετοιμοθάνατων και αδύνατων ζώων.

Οι παρατηρήσεις επί των κλωβών πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις του δέρματος και του τριχώματος, των οφθαλμών, των βλεννογόνων, του αναπνευστικού και του κυκλοφορικού συστήματος, του κεντρικού και του αυτόνομου νευρικού συστήματος καθώς και του τρόπου συμπεριφοράς και της σωματοκινητικής δραστηριότητας. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην αναπνευστική συμπεριφορά, στους τρόμους, στους σπασμούς, στη σιελόρροια, στη διάρροια, στο λήθαργο, στον ύπνο και το κώμα. Ο χρόνος θανάτου πρέπει να καταχωρείται όσο το δυνατό ακριβέστερα. Τα ατομικά βάρη των ζώων πρέπει να προσδιορίζονται ανά εβδομάδα μετά την έκθεση και κατά το θάνατο.

Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, όπως και αυτά που επιζούν στο τέλος της, υπόκεινται σε νεκροψία και ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις αλλοιώσεις του αναπνευστικού συστήματος, ανώτερου και κατώτερου. Όλες οι μακροσκοπικά παρατηρούμενες ανωμαλίες πρέπει να καταχωρούνται. Όπου αυτό ενδείκνυται, οι ιστοί πρέπει να λαμβάνονται για ιστοπαθολογική εξέταση.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε πειραματική ομάδα, ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο χρόνος θανάτου χωριστά για κάθε ζώο, ο αριθμός των ζώων που παρουσίασαν άλλα συμπτώματα τοξικότητας και περιγραφή των τοξικών επιδράσεων και των ευρημάτων της νεκροψίας. Αλλαγές στο βάρος πρέπει να υπολογίζονται και να καταχωρούνται όταν τα ζώα επιζούν περισσότερο από μια ημέρα. Η LC_{50} πρέπει να προσδιορίζεται με μια αναγνωρισμένη μέθοδο. Η αξιολόγηση των δεδομένων πρέπει να περιλαμβάνει τη σχέση, αν υπάρχει, μεταξύ της εκθέσεως των ζώων στην ελεγχόμενη ουσία και τη συχνότητα και σοβαρότητα όλων των ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων αυτών της συμπεριφοράς και των κλινικών ανώμαλιών, μακροσκοπικών αλλοιώσεων, αλλαγών του βάρους του σώματος, θνησιμότητας και κάθε άλλης τοξικής επιδράσεως.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

3.1. Έκθεση ελέγχου

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— είδος, φύλο, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διατροφή κλπ.

— συνθήκες ελέγχου:

περιγραφή της συσκευής εκθέσεως που περιλαμβάνει το σχήμα, τον τύπο, τις διαστάσεις, την πηγή του αέρα, το σύστημα παραγωγής σωματιδίων και αερολυμάτων, τη μέθοδο ρυθμίσεως του αέρα και τη μέθοδο εγκλωβισμού των ζώων σε έναν πειραματικό θάλαμο, όταν χρησιμοποιείται. Πρέπει, επίσης, να περιγράφονται οι συσκευές που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και της συγκεντρώσεως και του μεγέθους των σωματιδίων και αερολυμάτων.

Δεδομένα εκθέσεως:

τα δεδομένα πρέπει να κατατάσσονται σε πίνακα και να παρουσιάζονται μαζί με τις μέσες τιμές και με μια μέτρηση της παραλλακτικότητας (π.χ. σταθερή απόκλιση) και πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνουν:

α) ταχύτητα ροής αέρα διά μέσου της αναπνευστικής συσκευής,

β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα,

γ) φαινομένη συγκέντρωση (ολικό ποσό με το οποίο τροφοδοτήθηκε η αναπνευστική συσκευή, διαιρεμένο με τον όγκο του αέρα),

δ) φύση του φορέα, αν χρησιμοποιείται,

ε) πραγματικές συγκεντρώσεις στην πειραματική ζώνη αναπνοής,

ζ) μέσο μέγεθος τεμαχιδίων,

η) περίοδο εξισορροπήσεως,

θ) περίοδο εκθέσεως·

— κατάταξη σε πίνακα των αντιδράσεων ανά φύλο και επίπεδο εκθέσεως (δηλαδή αριθμό νεκρών ζώων, αριθμό ζώων που εμφανίζουν τοξικά συμπτώματα, αριθμό εκτεθέντων ζώων)·

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια ή μετά την έκθεση·

— παρατηρήσεις επί των κλωβών·

— LC_{50} για κάθε φύλο, προσδιορισμένη στο τέλος της περιόδου παρατηρήσεων (η μέθοδος υπολογισμού να ορίζεται λεπτομερώς)·

— 95 % διάστημα εμπιστοσύνης για την LC_{50}·

— καμπύλη δόσεως/θνησιμότητας και κλίση της καμπύλης (όταν το επιτρέπει η μέθοδος προσδιορισμού)·

— αποτελέσματα νεκροψίας·

— κάθε ιστοπαθολογικό αποτέλεσμα·

— συζήτηση των αποτελεσμάτων·

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Β. 3. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ)

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Ουδεμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Η ελεγχόμενη ουσία εφαρμόζεται στο δέρμα σε διαβαθμισμένες δόσεις, σε διαφορετικές ομάδες πειραματοζώων, μιας δόσεως χρησιμοποιούμενης ανά ομάδα. Στη συνέχεια, γίνονται παρατηρήσεις των επιδράσεων και των θανάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, καθώς και αυτά που επιζούν στη λήξη της, υπόκεινται σε νεκροψία.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Ουδέν.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Τα ζώα κρατούνται μέσα στους πειραματικούς κλωβούς τους, κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής, για 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία υγιή, νεαρά, ενήλικα ζώα λαμβάνονται με τυχαιοποίηση και κατανέμονται στις πειραματικές ομάδες. Περίπου 24 ώρες πριν από τη δοκιμασία, το τρίχωμα πρέπει να απομακρύνεται με τη βοήθεια ψαλιδιού ή ξυριστικής μηχανής, από την περιοχή της ράχης του κορμού των ζώων. Κατά το κούρεμα ή ξύρισμα του τριχώματος, προσοχή πρέπει να δίνεται ώστε να αποφεύγεται η απόξηση του δέρματος, πράγμα το οποίο μπορεί να μεταβάλει τη διαπερατότητά του. Η επιφάνεια της εφαρμογής δεν πρέπει να είναι μικρότερη από το 10 % της ολικής επιφάνειας του σώματος. Όταν δοκιμάζονται στερεά, τα οποία μπορούν να κονιοποιηθούν αν χρειάζεται, η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να υγραίνεται αρκετά με νερό ή, όπου είναι ανάγκη, με έναν κατάλληλο φορέα για να εξασφαλίζεται καλή επαφή με το δέρμα. Όταν χρησιμοποιείται φορέας, η επίδρασή του στη δίοδο της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Οι υγρές ουσίες χρησιμοποιούνται γενικά αδιάλυτες.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1 Πειραματόζωα

Μπορεί να χρησιμοποιούνται ο ενήλικας επίμυς και το κουνέλι. Άλλα είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης, αλλά η χρήση τους θα πρέπει να δικαιολογηθεί. Πρέπει να χρησιμοποιούνται οι συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Το εύρος της διαφοράς βάρους των ζώων που χρησιμοποιούνται σε μια δοκιμασία δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % της κανονικής μέσης τιμής για κάθε φύλο.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Τουλάχιστον 10 ζώα (5 θηλυκά και 5 αρσενικά), με υγιές ανέπαφο δέρμα, πρέπει να χρησιμοποιούνται για κάθε επίπεδο δόσεως. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Η χρησιμοποίηση μικρότερου αριθμού ζώων μπορεί μερικές φορές να δικαιολογηθεί, ιδίως στην περίπτωση των κουνελιών.

1.6.2.3. Επίπεδα δόσεων

Οι δόσεις πρέπει να είναι αρκετές σε αριθμό, τουλάχιστον τρεις, κατάλληλα κατανεμημένες ώστε να παράγονται πειραματικές ομάδες με εύρος τοξικών επιδράσεων και ποσοστών θνησιμότητας. Κάθε ερεθιστική ή διαβρωτική επίδραση πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, όταν αποφασίζονται τα επίπεδα των δόσεων. Τα δεδομένα πρέπει να είναι αρκετά για την παραγωγή μιας καμπύλης τοξικότητας και, όπου είναι δυνατό, να επιτρέπουν έναν παραδεκτό προσδιορισμό της LD_{50}.

1.6.2.4. Οριακή δοκιμασία

Άν, σε μία προκαταρκτική δοκιμασία, μία δόση 2 000 mg/kg ή μεγαλύτερη, εφαρμοσμένη στο ανέπαφο δέρμα 5 τουλάχιστον ζώων ανά φύλο, δεν προκάλεσε θνησιμότητα σχετική με την ουσία, μέσα σε 14 μέρες, μία επιπλέον δοκιμή με άλλα επίπεδα δόσεων μπορεί να μη θεωρείται απαραίτητη.

1.6.2.5. Περίοδος παρατηρήσεων

Η περίοδος παρατηρήσεων πρέπει να είναι τουλάχιστον 14 ημέρες. Εντούτοις, η διάρκεια των παρατηρήσεων δεν πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένη. Θα μπορεί να προσδιορίζεται από τις τοξικές αντιδράσεις, την τάξη εμφανίσεώς τους και τη διάρκεια της περιόδου αναρρώσεως· μπορεί έτσι να επεκτείνεται όταν αυτό θεωρηθεί αναγκαίο. Ο χρόνος εμφανίσεως και εξαφανίσεως των τοξικών συμπτωμάτων, η διάρκειά τους και ο χρόνος θανάτου είναι σημαντικά, ιδιαίτερα αν υπάρχει τάση να αργοπορούν οι θάνατοι.

1.6.3. *Διαδικασία*

Τα ζώα πρέπει να εγκλωβίζονται κατ' άτομο. Η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να εφαρμόζεται ομοιόμορφα σε μια περιοχή, η οποία είναι περίπου το 10 % της ολικής επιφάνειας του σώματος. Με πολύ τοξικές ουσίες η επιφάνεια που καλύπτεται μπορεί να είναι μικρότερη, αλλά η μεγαλύτερη δυνατή επιφάνεια πρέπει να καλύπτεται με μία στιβάδα τόσο λεπτή και ομοιόμορφη, όσο είναι δυνατό.

Η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να κρατείται σ' επαφή με το δέρμα καθ' όλη τη διάρκεια της εκθέσεως των 24 ωρών, με τη βοήθεια ενός επιδέσμου από πορώδη γάζα και μια μη ερεθιστική ταινία. Η ελεγχόμενη περιοχή πρέπει, επιπλέον, να καλύπτεται με τον κατάλληλο τρόπο για να συγκρατείται ο επίδεσμος και η ελεγχόμενη ουσία και να εξασφαλίζεται έτσι η αδυναμία καταπόσεως της ουσίας από τα ζώα. Επιτρέπεται η χρήση συσκευών περιορισμού για να εμποδίζεται η κατάποση, αλλά δεν συνιστάται η μέθοδος της απόλυτης ακινησίας.

Στο τέλος της περιόδου εκθέσεως, πρέπει να απομακρύνεται το υπόλειμμα της ελεγχόμενης ουσίας, όταν αυτό είναι πραγματοποιήσιμο, με τη χρήση νερού ή με μια άλλη κατάλληλη μέθοδο καθαρισμού του δέρματος.

Οι παρατηρήσεις πρέπει να καταχωρούνται συστηματικά, όπως γίνονται. Πρέπει να διατηρούνται ατομικά αρχεία για κάθε ζώο. Οι παρατηρήσεις, κατά τη διάρκεια της πρώτης ημέρας, πρέπει να γίνονται συχνά. Τουλάχιστον μια φορά την ημέρα πρέπει να γίνεται μια προσεκτική κλινική εξέταση. Πρόσθετες παρατηρήσεις θα πρέπει να γίνονται καθημερινά και να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα ώστε να μειώνεται στο ελάχιστο η απώλεια των ζώων από τη μελέτη. Λ.χ. νεκροψία ή ψύξη εκείνων των ζώων που βρέθηκαν νεκρά και απομόνωση ή θανάτωση των αδύνατων και ετοιμοθάνατων ζώων. Οι παρατηρήσεις στους κλωβούς πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις του τριχώματος, του ελεγχόμενου δέρματος, των οφθαλμών και των βλεννογόνων, όπως επίσης του αναπνευστικού, κυκλοφορικού, αυτόνομου και κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς και αλλοιώσεις στη σωματοκινητική δραστηριότητα και του τρόπου συμπεριφοράς. Με ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να γίνονται οι παρατηρήσεις των τρόμων, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κώματος. Ο χρόνος θανάτου πρέπει να καταχωρείται όσο το δυνατόν ακριβέστερα. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, όπως και αυτά που επιζούν στη λήξη της, υπόκεινται σε νεκροψία. Όλες οι μακροσκοπικά παρατηρούμενες αλλοιώσεις πρέπει να καταχωρούνται. Όπου ενδείκνυται, οι ιστοί πρέπει να λαμβάνονται για ιστοπαθολογική εξέταση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε πειραματική ομάδα, ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο χρόνος θανάτου για κάθε ζώο, ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν άλλα συμπτώματα τοξικότητας, περιγραφή των τοξικών επιδράσεων και τα αποτελέσματα της νεκροψίας. Τα ατομικά βάρη των ζώων πρέπει να προσδιορίζονται και να καταχωρούνται, λίγο πριν την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας, ανά εβδομάδα μετά, και κατά το θάνατο. Αλλαγές στο βάρος πρέπει να υπολογίζονται, εφόσον τα ζώα επιζούν περισσότερο από μία ημέρα. Η LD_{50} πρέπει να προσδιορίζεται με μια αναγνωρισμένη μέθοδο.

Η αξιολόγηση των δεδομένων πρέπει να περιλαμβάνει μια αξιολόγηση της σχέσεως, αν αυτή υπάρχει, μεταξύ της εκθέσεως των ζώων στην ελεγχόμενη ουσία και της συχνότητας και σοβαρότητας όλων των ανωμαλιών, περιλαμβανομένων των ανωμαλιών συμπεριφοράς και των κλινικών, μακροσκοπικών αλλοιώσεων, αλλαγών του βάρους του σώματος, θνησιμότητας και κάθε άλλης τοξικολογικής επιδράσεως.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

1.3. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— είδος, φυλή, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διατροφή κλπ.,

— συνθήκες πειραματισμού (με τη μέθοδο καθαρισμού του δέρματος),

— επίπεδα δόσεων (με το φορέα, αν χρησιμοποιείται, και τις συγκεντρώσεις),

— καταχώριση σε πίνακα των αντιδράσεων ανά φύλο και επίπεδο δόσεως (δηλαδή αριθμό νεκρών ζώων, αριθμό ζώων που παρουσιάζουν τοξικά συμπτώματα, αριθμό εκτεθέντων ζώων),

— χρόνο θανάτου μετά τη χορήγηση,

— παρατηρήσεις επί των κλωβών,

— τιμή της LD_{50} για κάθε φύλο, προσδιορισμένη τη 14η ημέρα (η μέθοδος προσδιορισμού να ορίζεται),

— 95 % διάστημα εμπιστοσύνης για την LD_{50} (όπου αυτό είναι δυνατό),

— καμπύλη τοξικότητας και κλίση καμπύλης, όταν το επιτρέπει η μέθοδος προσδιορισμού,

— αποτελέσματα νεκροψίας,

— κάθε ιστοπαθολογικό αποτέλεσμα,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Β. 4. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Ουδεμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Η ελεγχόμενη ουσία εφαρμόζεται, σε μια και μόνη δόση, στο δέρμα διαφόρων πειραματοζώων κα' κάθε ζώο χρησιμεύει σαν μάρτυρας του εαυτού του. Ο βαθμός ερεθισμού παρατηρείται και βαθμολογείται, μετά από ένα ειδικό χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια περιγράφεται για να χρησιμεύσει στην πλήρη αξιολόγηση των επιδράσεων. Η διάρκεια των παρατηρήσεων πρέπει να είναι αρκετή για την πλήρη αξιολόγηση της πιθανής επαναφοράς από τις παρατηρηθείσες επιδράσεις.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Ουδέν.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Το τρίχωμα πρέπει να απομακρύνεται, περίπου 24 ώρες πριν τη δοκιμασία, με τη βοήθεια κουρευτικής ή ξυριστικής μηχανής, από την περιοχή της ράχης του κορμού του ζώου.

Κατά το κούρεμα ή ξύρισμα του τριχώματος, πρέπει να δίνεται προσοχή για να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος. Μόνο ζώα με υγιές ανέπαφο δέρμα πρέπει να χρησιμοποιούνται.

Όταν δοκιμάζονται στερεές ουσίες (οι οποίες μπορεί να κονιοποιούνται, όταν αυτό κρίνεται αναγκαίο), η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να υγραίνεται αρκετά με νερό ή, όταν απαιτείται, με έναν κατάλληλο φορέα, για να εξασφαλίζεται η καλή επαφή της με το δέρμα. Όταν χρησιμοποιείται φορέας, η επίδρασή του στον ερεθισμό του δέρματος πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Υγρές ουσίες χρησιμοποιούνται γενικά αδιάλυτες.

Ουσίες οι οποίες είναι ισχυρά όξινες ή αλκαλικές, δεν είναι απαραίτητο να δοκιμάζονται για πρωτοπαθή δερματική ερεθιστικότητα, οφειλομένη στις προβλεπόμενες διαβρωτικές τους ιδιότητες. Η δοκιμασία υλικών που έχουν δείξει μεγάλη δερματική τοξικότητα μπορεί να μην είναι αναγκαία.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Αν και πολλά είδη θηλαστικών μπορεί να χρησιμοποιηθούν, το είδος που προτιμάται είναι το λευκό κουνέλι.

1.6.2.2. Αριθμός ζώων

Χρησιμοποιούνται 3 τουλάχιστον υγιή ενήλικα ζώα. Μπορεί να απαιτηθούν περισσότερα ζώα για να διαλευκανθούν διφορούμενα αποτελέσματα.

1.6.2.3. Επίπεδα δόσεων

Εκτός αν υπάρχουν αντενδείξεις, 0,5 ml ενός υγρού ή 0,5 g ενός στερεού ή ημιστερεού εφαρμόζονται στο δοκιμαζόμενο σημείο. Για μάρτυρες δεν απαιτούνται χωριστά ζώα. Σαν μάρτυρες της δοκιμασίας χρησιμεύουν παρακείμενες περιοχές του δέρματος κάθε ζώου που δεν έχουν υποστεί επέμβαση.

1.6.2.4. Περίοδος παρατηρήσεων

Η διάρκεια της περιόδου παρατηρήσεων δεν πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένη. Πρέπει όμως να είναι αρκετή για την πλήρη αξιολόγηση της επαναφοράς ή της μη επαναφοράς από τις παρατηρηθείσες επιδράσεις, αλλά δεν είναι ανάγκη, συνήθως, να υπερβαίνει τις 14 ημέρες μετά την εφαρμογή.

1.6.3. *Πορεία*

Τα ζώα πρέπει να εγκλωβίζονται χωριστά. Η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να εφαρμόζεται σε μια μικρή περιοχή (περίπου 6 cm^2) του δέρματος και να σκεπάζεται με ένα κομμάτι γάζας, που κρατιέται στη θέση της με μια μη ερεθιστική ταινία. Στην περίπτωση υγρών ή και αλοιφών μπορεί να χρειάζεται να εφαρμόζεται η ελεγχόμενη ουσία στο κομμάτι της γάζας και τότε να εφαρμόζεται αυτό στο δέρμα. Η γάζα κρατιέται σ' επαφή με το δέρμα, χαλαρά, με τη βοήθεια ενός ημιαδιαπέρατου επίδεσμου, για όλη τη διάρκεια της περιόδου εκθέσεως. Εντούτοις, σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να αποφασίζεται η χρήση ενός αδιαπέρατου επίδεσμου. Πρέπει να εμποδίζεται το ζώο να φθάνει τη γάζα και να καταπίνει ή να αναπνέει την ελεγχόμενη ουσία.

Η διάρκεια εκθέσεως είναι 4 ώρες. Μεγαλύτερης διάρκειας εκθέσεις μπορεί να ενδείκνυνται, κάτω από ορισμένες συνθήκες, λ.χ. αναμενόμενο υπόδειγμα χρήσεως και εκθέσεως ανθρώπου. Στο τέλος της περιόδου εκθέσεως, το υπόλειμμα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να απομακρύνεται, όταν αυτό είναι πραγματοποιήσιμο, με τη βοήθεια νερού, ή ενός κατάλληλου διαλύτη. Πρέπει όμως να δίνεται προσοχή στο να μην αλλοιωθούν τα αποτελέσματα ή η ακεραιότητα της επιδερμίδας.

1.6.3.1. Παρατηρήσεις και βαθμολογία

Τα ζώα πρέπει να εξετάζονται για σημάδια ερυθήματος και οιδήματος και η αντίδραση να βαθμολογείται σε 30 – 60 λεπτά και στη συνέχεια σε 24, 48 και 72 ώρες μετά την απομάκρυνση της γάζας. Ο ερεθισμός του δέρματος βαθμολογείται και καταχωρείται σύμφωνα με το σύστημα του πίνακα του προσαρτήματος. Πρόσθετες παρατηρήσεις μπορεί να χρειαστούν, σαν αναγκαίες, για τη διαπίστωση της επαναφοράς. Επιπλέον των παρατηρήσεων για την ερεθιστικότητα, πρέπει να περιγράφεται λεπτομερώς κάθε σοβαρή αλλοίωση του δέρματος, όπως η διάβρωση (μη αντιστρεπτή καταστροφή του δερματικού ιστού) και οποιαδήποτε άλλη τοξική επίδραση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνονται, για κάθε ζώο χωριστά, οι βαθμοί ερεθιστικότητας, για το ερύθημα και το οίδημα, για όλη τη διάρκεια της περιόδου παρατηρήσεων. Πρέπει να καταχωρούνται, κάθε σοβαρή αλλοίωση, μια περιγραφή της τάξεως και φύσεως του ερεθισμού, επαναφοράς ή διαβρώσεως και κάθε άλλη παρατηρούμενη τοξική επίδραση.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

3.1. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— είδος, φυλή, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διατροφή κλπ.,

— πειραματικές συνθήκες (να περιλαμβάνονται οι σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και η μέθοδος προετοιμασίας και καθαρισμού του δέρματος),

— καταχώριση σε πίνακα των στοιχείων των αντιδράσεων ερεθισμού για κάθε ζώο χωριστά και για κάθε χρονική περίοδο παρατηρήσεως (δηλαδή 1, 24, 48 και 72 ώρες κλπ., μετά την απομάκρυνση της γάζας),

— περιγραφή κάθε σοβαρής αλλοιώσεως που παρατηρήθηκε, περιλαμβανομένης και της διαβρωτικότητας,

— περιγραφή του βαθμού και της φύσεως του ερεθισμού που παρατηρήθηκε και κάθε ιστοπαθολογικού ευρήματος,

— περιγραφή κάθε τοξικής επιδράσεως, επιπλέον αυτών του ερεθισμού του δέρματος,

— συζήτηση για τα αποτελέσματα,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Προσάρτημα

ΠΙΝΑΚΑΣ: ΒΑΘΜΟΛΟΓΙΑ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΣ

Ερύθημα και σχηματισμός εσχάρας

	Τιμή
Απουσία ερυθήματος	0
Πολύ ελαφρό ερύθημα (μόλις διακρινόμενο)	1
Σαφές ερύθημα	2
Μέτριο προς σοβαρό ερύθημα	3
Σοβαρό ερύθημα (χρώμα βαθύ κόκκινο) μέχρι ελαφρού σχηματισμού εσχάρας	4

Σχηματισμός οιδήματος

Απουσία οιδήματος	0
Πολύ ελαφρό οίδημα (μόλις διακρινόμενο)	1
Ελαφρό οίδημα (άκρα της περιοχής καλά οριζόμενα από οριστική αύξηση)	2
Μέτριο οίδημα (άκρα υψωμένα περίπου ένα mm)	3
Σοβαρό οίδημα (άκρα υψωμένα περισσότερο από ένα mm εκτεινόμενα πέρα από την περιοχή εκθέσεως)	4

Β. 5. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΟΦΘΑΛΜΟΥ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Ουδεμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Η ελεγχόμενη ουσία εφαρμόζεται σε μια δόση, στον ένα οφθαλμό, σε κάθε ένα από τα διάφορα πειραματόζωα· ο άλλος οφθαλμός, ο χωρίς επέμβαση, χρησιμεύει σαν μάρτυρας. Ο βαθμός ερεθισμού αξιολογείται και βαθμολογείται σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα και, επιπλέον, περιγράφεται ώστε να γίνει πλήρης η αξιολόγηση των επιδράσεων. Η διάρκεια των παρατηρήσεων πρέπει να είναι αρκετή για να αξιολογείται εντελώς η επαναφορά ή όχι από τις παρατηρηθείσες επιδράσεις.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Ουδέν.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Και οι δύο οφθαλμοί κάθε πειραματόζωου, που διαλέχτηκε προσωρινά για τη δοκιμασία, πρέπει να εξετάζονται μέσα σε 24 ώρες πριν αρχίσει η δοκιμασία. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται πειραματόζωα που εμφανίζουν ερεθισμένους οφθαλμούς, οφθαλμικές ανωμαλίες ή άλλη προϋπάρχουσα βλάβη του κερατοειδή χιτώνα.

Ισχυρώς αλκαλικές ή όξινες ουσίες, καθώς και ουσίες που έδειξαν στη δοκιμασία της δερματικής ερεθιστικότητας ή σε άλλες δοκιμασίες ότι είναι αποδεδειγμένα διαβρωτικές, δεν είναι ανάγκη να δοκιμάζονται για ερεθιστικότητα οφθαλμού.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Άν και μια ποικιλία από είδη πειραματοζώων έχουν χρησιμοποιηθεί, συνιστάται για την εκτέλεση της δοκιμασίας να χρησιμοποιούνται υγιή, ενήλικα, λευκά κουνέλια.

1.6.2.2. Αριθμός ζώων

Τουλάχιστον 3 ζώα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Πρόσθετα ζώα πιθανόν να απαιτηθούν για τη διαλεύκανση διφορούμενων απαντήσεων.

1.6.2.3. Επίπεδα δόσεων

Μια δόση από 0,1 ml χρησιμοποιείται για τη δοκιμή των υγρών. Για τη δοκιμή των στερεών, αλοιφών και σωματιδίων, η χρησιμοποιούμενη ποσότητα πρέπει να έχει έναν όγκο 0,1 ml ή βάρος περίπου 0,1 g (το βάρος πρέπει πάντα να καταχωρείται). Αν το ελεγχόμενο υλικό είναι στερεό ή κοκκώδες πρέπει να αλέθεται σε λεπτή σκόνη. Ο όγκος των σωματιδίων πρέπει να μετριέται αφού συμπυκνωθούν ελαφρά, π.χ. χτυπώντας το δοχείο μετρήσεως.

1.6.2.4. Περίοδος παρατηρήσεων

Η διάρκεια της περιόδου παρατηρήσεων δεν πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένη. Πρέπει όμως να είναι αρκετή, για την αξιολόγηση της επαναφοράς ή της μη επαναφοράς των επιδράσεων που παρατηρήθηκαν, αλλά κανονικά δεν είναι ανάγκη να υπερβαίνει τις 21 ημέρες μετά την ενστάλλαξη.

1.6.3. *Πορεία*

Τα ζώα πρέπει να εγκλωβίζονται χωριστά. Η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να τοποθετείται στο τυφλό άκρο του επιπεφυκότος του ενός ματιού κάθε ζώου, αφού τραβηχθεί απαλά το κάτω βλέφαρο από το βολβό. Τα βλέφαρα τότε κρατιούνται απαλά μαζί για ένα περίπου δευτερόλεπτο, για να αποφευχθεί η απώλεια του υλικού. Το άλλο μάτι, το οποίο παραμένει χωρίς επέμβαση, χρησιμοποιείται για μάρτυρας.

Τα μάτια των πειραματοζώων δεν πρέπει να πλένονται για 24 ώρες μετά την ενστάλλαξη της ελεγχόμενης ουσίας. Σε 24 ώρες μπορεί να γίνει ένα πλύσιμο, αν αυτό θεωρηθεί απαραίτητο.

Για ουσίες που αποδείχτηκαν ερεθιστικές μ' αυτή τη δοκιμή, μπορεί να εξετάζεται η αποτελεσματικότητα του καταιονισμού σαν μέσου μειώσεως του ερεθισμού ή άλλων βλαβερών επιδράσεων. Σ' αυτή την περίπτωση, συνιστάται να χρησιμοποιούνται 6 κουνέλια. Τέσσερα δευτερόλεπτα μετά την ενστάλλαξη της ελεγχόμενης ουσίας, τα μάτια 3 κουνελιών πλένονται και 30 δευτερόλεπτα μετά την ενστάλλαξη της ελεγχόμενης ουσίας πλένονται τα μάτια των άλλων 3 κουνελιών. Και για τις δύο ομάδες, τα μάτια πλένονται για 5 λεπτά χρησιμοποιώντας έναν όγκο και μια ταχύτητα της ροής η οποία δεν θα προκαλέσει βλάβη.

1.6.3.1. Παρατηρήσεις και βαθμολογία

Τα μάτια πρέπει να εξετάζονται σε 1, 24, 48 και 72 ώρες. Αν δεν υπάρχει καμιά ένδειξη ερεθιστικότητας στις 72 ώρες, η μελέτη μπορεί να τελειώσει.

Εκτεταμένες παρατηρήσεις μπορεί να χρειαστούν αν υπάρχει έμμονη περιπλοκή του κερατοειδή χιτώνα ή άλλος οφθαλμικός ερεθισμός, ώστε να προσδιοριστεί η πορεία των αλλοιώσεων και η θεραπεία τους ή η μη επαναφορά τους. Επιπλέον των παρατηρήσεων του κερατοειδή χιτώνα, της ίριδας και των επιπεφυκότων, κάθε άλλη αλλοίωση που σημειώθηκε πρέπει να αναφερθεί και να καταχωρηθεί. Οι βαθμοί των οφθαλμικών αντιδράσεων (βλέπε πίνακα του προσαρτήματος) πρέπει να καταγράφονται σε κάθε εξέταση. (Η βαθμολογία των οφθαλμικών αντιδράσεων υπόκειται σε διαφορετικές ερμηνείες. Για να βοηθηθούν τα εργαστήρια που κάνουν τις δοκιμασίες και εκείνοι που κάνουν και ερμηνεύουν τις παρατηρήσεις, πρέπει να χρησιμοποιούν ένα διευκρινιστικό οδηγό ερεθισμού του ματιού).

Η εξέταση των αντιδράσεων μπορεί να διευκολυνθεί με τη χρήση στερεοσκοπίου, χειροκίνητης σχισμοειδούς λυχνίας, βιομικροσκοπίου ή άλλων κατάλληλων οργάνων. Μετά την καταχώριση των παρατηρήσεων των 24 ωρών, τα μάτια οποιουδήποτε ή όλων των κουνελιών μπορεί, επιπλέον, να εξεταστούν με τη βοήθεια φθορισμού.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο πρέπει να φαίνονται, για κάθε ζώο χωριστά, οι βαθμοί ερεθισμού στον ορισμένο χρόνο παρατηρήσεως, μια περιγραφή του βαθμού και της φύσεως του ερεθισμού, οι σοβαρές αλλοιώσεις όπως και οποιαδήποτε άλλη επίδραση παρατηρήθηκε εκτός των οφθαλμών.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

3.1. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— στοιχεία ζώων (είδος, φυλή, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διατροφή κλπ.),

— πειραματικές συνθήκες (να περιλαμβάνονται οι σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας),

— καταχώριση σε πίνακα των δεδομένων της ερεθιστικής/διαβρωτικής αντιδράσεως για κάθε ζώο χωριστά, σε κάθε σημείο του χρόνου παρατηρήσεως (δηλαδή σε 1, 24, 48 και 72 ώρες),

— περιγραφή κάθε σοβαρής αλλοιώσεως που παρατηρήθηκε,

— περιγραφική έκθεση της τάξεως και φύσεως του ερεθισμού ή της διαβρώσεως που παρατηρήθηκαν, της επαναφοράς συμπεριλαμβανομένης,

— περιγραφή της χρησιμοποιηθείσας μεθόδου για τη βαθμολόγηση του ερεθισμού σε 1, 24, 48 και 72 ώρες (δηλαδή χειροκίνητη σχισμοειδής λυχνία, βιομικροσκόπιο, φθορισμός),

— περιγραφή κάθε μη οφθαλμικής τοπικής επιδράσεως που σημειώθηκε,

— συζήτηση για τα αποτελέσματα,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Προσάρτημα

ΠΙΝΑΚΑΣ: ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ ΟΦΘΑΛΜΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ

Κερατοειδής

Θολερότητα: βαθμός πυκνότητας (η περιοχή η πιο πυκνή λαμβάνεται για εξέταση)

	Τιμή
Καμία εξέλκωση ή θολερότητα	0
Διασπαρμένες ή διάχυτες περιοχές θολερότητας (διαφορετικές από το ελαφρό θάμπωμα της φυσικής στιλπνότητας), λεπτομέρειες της ίριδας ευδιάκριτες	1
Εύκολα διακρινόμενη ημιδιαφανής περιοχή, λεπτομέρειες της ίριδας ελαφρά δυσδιάκριτες	2
Μαργαροειδής περιοχή, λεπτομέρειες της ίριδας αφανείς, το μέγεθος της ίριδας μόλις διακρίνεται	3
Κερατοειδής αδιαφανής, η ίρις δεν διακρίνεται δία μέσου της θολερότητας	4

Ίρις

Φυσιολογική	0
Σημαντική βαθειά πτύχωση, συμφόρηση, διόγκωση μέτρια, υπεραιμία του περιβάλλοντος τον κερατοειδή χιτώνα ιστού ή συμφόρηση, κάθε ένα από αυτά ή συνδυασμός τους, ίρις που ακόμη αντιδρά στο φως (αντίδραση νωθρότητας θετική)	1
Καμία αντίδραση στο φως, αιμορραγική αλλοίωση, (ένα από αυτά ή όλα)	2

Επιπεφυκότες

Κοκκινίλα (στους βλεφαρικούς και βολβικούς επιπεφυκότες, στον κερατοειδή και στην ίριδα)

Αιμοφόρα αγγεία φυσιολογικά	0
Μερικά αιμοφόρα αγγεία σαφώς υπεραιμικά (συμφορητικά)	1
Διάχυτο, έντονο κόκκινο χρώμα, αιμοφόρα αγγεία διακρινόμενα εύκολα	2
Διάχυτο, βαθύ κόκκινο χρώμα	3

Χόμωση: βλέφαρα ή/και νηκτικές μεμβράνες

Καμία διόγκωση	0
Κάθε διόγκωση πάνω από το φυσιολογικό (και για τις νηκτικές μεμβράνες)	1
Σαφής διόγκωση με μερική αναστροφή των βλεφάρων	2
Διόγκωση με βλέφαρα μισόκλειστα	3
Διόγκωση με βλέφαρα κλειστά περισσότερο από το μισό	4

Β. 6. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Ουδεμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου/«Δοκιμασία Μεγιστοποιήσεως στο Ινδικό Χοιρίδιο»**

Μετά την αρχική έκθεση στην ελεγχόμενη ουσία (περίοδος «διεγέρσεως»), τα ζώα υφίστανται, δύο εβδομάδες μετά την τελευταία έκθεση διεγέρσεως, μία έκθεση «προκλήσεως», για να διαπιστωθεί αν έχει προκληθεί μια κατάσταση υπερευαισθησίας. Η ευαισθητοποίηση πιστοποιείται με την εξέταση της δερματικής αντιδράσεως στην έκθεση προκλήσεως.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Ουδέν.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Υγιή νεαρά ζώα (μικρότερα του ενός χρόνου) λαμβάνονται με τυχαιοποίηση και κατανέμονται στις πειραματικές ομάδες και στις ομάδες των μαρτύρων. Πριν από τη χορήγηση, το τρίχωμα απομακρύνεται με τη βοήθεια κουρευτικής ή ξυριστικής μηχανής, από την περιοχή του ώμου. Πρέπει να δίνεται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η βλάβη του δέρματος.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιείται το λευκό ινδικό χοιρίδιο.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Μπορεί να χρησιμοποιηθούν θηλυκά ή αρσενικά ζώα. Αν χρησιμοποιηθούν θηλυκά, πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Χρησιμοποιούνται 20 ζώα στην ομάδα πειραματισμού και 10 τουλάχιστον στην ομάδα μαρτύρων. Αν χρησιμοποιηθούν λιγότερα ζώα, αυτό πρέπει να αιτιολογηθεί.

1.6.2.3. Επίπεδα δόσεων

Η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας να προσαρμόζεται στο υψηλότερο επίπεδο που μπορεί να γίνει ανεκτό για κάθε στάδιο διεγέρσεως.

Η συγκέντρωση προκλήσεως δεν πρέπει να προκαλεί ενδείξεις ερεθισμού του δέρματος σε ζώα μη ευαισθητοποιημένα. Οι συγκεντρώσεις αυτές μπορούν να προσδιορισθούν από μια προκαταρκτική μελέτη μικρής κλίμακας (2–3 ζώα).

1.6.2.4. Περίοδος παρατηρήσεων

Κατά τη διάρκεια της περιόδου διεγέρσεως, γίνονται εξετάσεις του δέρματος για να ελεγχθεί μια πιθανή ερεθιστική αντίδραση. Μετά την έκθεση προκλήσεως, οι αντιδράσεις του δέρματος καταγράφονται στις 48 και 72 ώρες.

1.6.3. *Διαδικασία*

Τα ζώα ζυγίζονται πριν από την έναρξη και στο τέλος της δοκιμασίας. Η περιοχή του ώμου καθαρίζεται από το τρίχωμα. Υπάρχουν δύο στάδια στη διαδικασία:

1.6.3.1. Διέγερση

Ημέρα 0 — δοκιμαζόμενη ομάδα

Τα ακόλουθα ζευγάρια ενδοδερμικών ενέσεων γίνονται στην περιοχή του ώμου, κατά τέτοιον τρόπο ώστε κάθε μία από το ζευγάρι να βρίσκεται σε κάθε πλευρά της μέσης γραμμής:

1. 0,1 ml Freunds Complete Adjuvant (FCA),
2. 0,1 ml της ελεγχόμενης ουσίας, σε φορέα, όταν χρειάζεται,
3. 0,1 ml ελεγχόμενης ουσίας σε FCA.

Οι ενέσεις 1 και 2 γίνονται κοντά η μια στην άλλη και πλησιέστερα προς το κεφάλι, ενώ η 3 γίνεται προς το μέρος της ουράς της ελεγχόμενης περιοχής.

Ημέρα 0 — ομάδα μάρτυρα

Τα ακόλουθα ζευγάρια ενδοδερμικών ενέσεων γίνονται στις ίδιες θέσεις όπως πιο πάνω:

1. 0,1 ml FCA,
2. 0,1 ml του φορέα,
3. 0,1 ml του φορέα μέσα σε FCA.

Ημέρα 7 — δοκιμαζόμενη ομάδα

Η ελεγχόμενη περιοχή καθαρίζεται πάλι από το τρίχωμα. Η ελεγχόμενη ουσία σ' έναν κατάλληλο φορέα (υγρές ουσίες, αν αυτό προσφέρεται, μπορούν να εφαρμοστούν απευθείας) απλώνεται σ' ένα διηθητικό χαρτί και εφαρμόζεται στην ελεγχόμενη περιοχή, όπου κρατιέται για 48 ώρες με τη βοήθεια κατάλληλου επίδεσμου.

Ημέρα 7 — ομάδα μάρτυρα

Η ελεγχόμενη περιοχή καθαρίζεται πάλι από το τρίχωμα. Ο φορέας μόνο εφαρμόζεται κατά τον ίδιο τρόπο όπως προηγουμένως και κρατείται σ' επαφή με το δέρμα με τη βοήθεια κατάλληλου επίδεσμου.

1.6.3.2. Πρόκληση

Ημέρα 21

Οι πλευρές των δοκιμαζόμενων ζώων και των μαρτύρων καθαρίζονται από το τρίχωμα. Μία γάζα ή μία κάψουλα που περιέχει την ελεγχόμενη ουσία εφαρμόζεται στο αριστερό πλευρό των ζώων που ελέγχονται και μία γάζα ή κάψουλα με το φορέα μόνο στο δεξί πλευρό.

Οι γάζες κρατιούνται σ' επαφή με το δέρμα για 24 ώρες, με τη βοήθεια ενός κατάλληλου επιδέσμου.

Η ομάδα του μάρτυρα υφίσταται τον ίδιο χειρισμό.

Ημέρες 23 και 24

— 21 ώρες μετά την απομάκρυνση της γάζας, η περιοχή προκλήσεως, αν χρειαστεί, καθαρίζεται και ξυρίζεται.

— 3 ώρες αργότερα (σε 48 ώρες από την έναρξη της εφαρμογής προκλήσεως), εξετάζεται και καταγράφεται η αντίδραση του δέρματος.

— 24 ώρες μετά από αυτή την παρατήρηση, μια δεύτερη παρατήρηση (72 ωρών) γίνεται και καταγράφεται.

Για να διευκρινιστούν τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στην πρώτη έκθεση προκλήσεως, μια δεύτερη, με μια νέα ομάδα μάρτυρα του φορέα, αν χρειαστεί, πρέπει να αντιμετωπιστεί μια βδομάδα περίπου μετά την πρώτη.

1.6.3.3. Παρατηρήσεις και βαθμολογία

Πρέπει να καταγράφονται και να αναφέρονται όλες οι δερματικές αντιδράσεις και κάθε μη συνηθισμένο δεδομένο που προκλήθηκαν από τις διαδικασίες διεγέρσεως και προκλήσεως.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα στον οποίο να φαίνονται, για κάθε ζώο, οι αντιδράσεις του δέρματος στην κάθε παρατήρηση.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

3.1. Έκθεση ελέγχου

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— φυλή των χρησιμοποιουμένων ινδικών χοιριδίων,

— πειραματικές συνθήκες,

— αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων,

— ατομικά βάρη των ζώων στην αρχή και στο τέλος της δοκιμασίας,

— κάθε παρατήρηση που έγινε για κάθε ζώο, περιλαμβανομένου του συστήματος βαθμολογίας, αν χρησιμοποιήθηκε κάποιο,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Παρατηρήσεις

Η «Δοκιμασία Μεγιστοποιήσεως στο Ινδικό Χοιρίδιο» (ΔΜΙΧ) είναι μία πολύ διαδεδομένη μέθοδος που χρησιμοποιεί επικουρική ουσία. Άν και διάφορες άλλες μέθοδοι, που αναφέρονται στο προσάρτημα, μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη διαπίστωση του δυναμικού προκλήσεως μιας αντιδράσεως δερματικής ευαισθητοποιήσεως μιας ουσίας, η ΔΜΙΧ θεωρείται η προτιμώμενη μέθοδος (μέθοδος αναφοράς). Η

ευαισθησία της και η ικανότητα για τη διαπίστωση των δυναμικών ευαισθητοποιητικών ουσιών του ανθρώπινου δέρματος θεωρείται σημαντική σ' ένα σύστημα κατατάξεως για την τοξικότητα τη σχετική με τη δημόσια υγεία. Η εκλογή οποιασδήποτε εναλλακτικής δοκιμασίας πρέπει να διέπεται από κριτήρια που να εξασφαλίζουν την εγκυρότητά της. Μεταξύ των κριτηρίων αυτών είναι η προσδοκώμενη αντίδραση σε πρότυπα αλλεργιογόνα σαν το 2,4-δινιτροχλωροβενζόλιο και την p-φαινυλενοδιαμίνη ή μία άλλη ισχυρή ευαισθητοποιητική ουσία, που να ταιριάζει στην τάξη των προς έλεγχο ουσιών.

Δεν υπάρχει μια μοναδική δοκιμασία η οποία να ταυτοποιεί ικανοποιητικά όλες τις ουσίες με ένα δυναμικό ευαισθητοποιήσεως του ανθρώπινου δέρματος και που να είναι σχετική με όλες τις ουσίες.

Για την εκλογή μιάς δοκιμασίας πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως τα φυσικά χαρακτηριστικά μιάς ουσίας, που περιλαμβάνουν την ικανότητά της να διαπερνά το δέρμα και τον τρόπο με τον οποίο έρχεται σε επαφή με τον ανθρώπινο πληθυσμό, που πιθανόν θα εκτεθεί. Οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούν το ινδικό χοιρίδιο μπορούν να υποδιαιρεθούν στις δοκιμασίες με επικουρική ουσία, κατά τις οποίες μία αλλεργιογόνος κατάσταση ενεργοποιείται με τη διάλυση ή τη διασπορά της ελεγχόμενης ουσίας στο Freunds Complete Adjuvant (FCA) και σ' εκείνες χωρίς επικουρική ουσία. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να δικαιολογείται η εκλογή μιας δοκιμασίας με τοπική εφαρμογή παρά με ενδοδερμική ένεση, όπως γίνεται στη Δοκιμασία Μεγιστοποιήσεως στο Ινδικό Χοιρίδιο. Και σ' αυτή την περίπτωση πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα φυσικά χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης ουσίας και οι συνθήκες της πιθανής εκθέσεως του ανθρώπινου πληθυσμού.

Ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο, η ευαισθησία της φυλής των ινδικών χοιριδίων, που θα χρησιμοποιηθούν για τις δοκιμασίες της δερματικής ευαισθητοποιήσεως, πρέπει να ελέγχεται κατά κανονικά διαστήματα (κάθε 6 μήνες) με τη χρησιμοποίηση ισχυρών και μέτριων ευαισθητοποιητικών ουσιών και με τη λήψη ικανοποιητικού αριθμού θετικών ανταποκρίσεων.

Προσάρτημα

Δοκιμασία	Draize	Freund's Complete Adjuvant (FCA)	Αριστοποίηση Mauer	Buehler	Ανοικτή επιδερματική δοκιμασία	Split Adjuvant
Πειραματόζωο	ινδικό χοιρίδιο	ινδικό χοιρίδιο	ινδικό χοιρίδιο	ινδικό χοιρίδιο	ινδικό χοιρίδιο	ινδικό χοιρίδιο
Οδός χορηγήσεως	ενδοδερμική (id)	ενδοδερμική (id)	επιδερματική (id)	επιδερματική (ec)	επιδερματική (ec)	(id & ec)
Αριθμός στις πειραματικές ομάδες	20	8 — 10	10 — 10	10 — 20	6 — 8	10 — 20
Αριθμός πειραματικών ομάδων	1	1	1	1	ως 6	1
Αριθμός στις ομάδες μαρτύρων	20	8 — 10	10 — 10	10 — 20	6 — 8	10 — 20
Έκθεση διεγέρσεως — οδός χορηγήσεως	id	id	id	δερματική	δερματική	id και δερματική
Αριθμός εκδέσεων	10	5	9	3	20 ή 21	4
Περίοδος εκθέσεως	—	—	24 ώρες	6 ώρες έκαστο	συνεχής	48 ώρες έκαστο
Είδος επιθέματος (γάζας)	—	—	—	κλειστό	ανοικτό	κλειστό
Πειραματικές ομάδες	ΕΟ (1)	ΕΟ σε FCA	ΕΟ σε FCA	ΕΟ	ΕΟ	ΕΟ
Ομάδες μαρτύρων	—	μόνο FCA	—	—	φορέας (ν) μόνο	—
Περιοχή	αριστερό πλευρό	δεξί πλευρό	πλάτη	αριστερό πλευρό	δεξί πλευρό	ώρος
Συχνότητα	κάθε δεύτερη ημέρα	κάθε δεύτερη ημέρα	κάθε δεύτερη ημέρα	κάθε 7 ημέρες	καθημερινά	0, 2, 4, 7 ημέρες
Διάρκεια	0 — 18 ημέρες	0 — 8 ημέρες	0 — 21 ημέρες	0 — 14 ημέρες	0 — 20 ημέρες	0 — 7 ημέρες
Συγκέντρωση	2 — 10 φορές της πρώτης	ίδια καθ' όλη τη διάρκεια	0,1 ml του 0,1 %	ίδια καθ' όλη τη διάρκεια	ίδια ανά ομάδα, διαφορετική μεταξύ ομάδων	ίδια καθ' όλη τη διάρκεια
Έκθεση προκλήσεως Οδός χορηγήσεως	id	δερματική	id	δερματική	δερματική	δερματική
Αριθμός εκθέσεων	1	2	2	1	2	1
Ημέρες	35	22 ή 35	14 ή 28	28	21 ή 35	20
Περίοδος εκθέσεως	—	—	24 ώρες	6 ώρες	—	24 ώρες
Τύπος επιθέματος	—	ανοικτό	—	κλειστό	ανοικτό	κλειστό
Πειραματικές ομάδες	ΕΟ	ΕΟ	ΕΟ	ΕΟ	ΕΟ	ΕΟ
Ομάδες μαρτύρων	ΕΟ	ΕΟ	ΕΟ	ΕΟ	ΕΟ	ΕΟ
Περιοχή	δεξί πλευρό	αριστερό πλευρό	πλάτη σε νέα περιοχή	δεξί πλευρό	αριστερό πλευρό	ώμος
Συγκέντρωση	ίδια σαν την πρώτη	4 διαφορετικές	0,1 ml του 0,1 %	ίδια της διεγέρσεως	4 διαφορετικές	η μισή της διεγέρσεως
Αξιολόγηση (ώρες μετά την πρόκληση)	24, 48	24, 48, 72	24	24, 48	24, 48 ή/και 72	24, 48

(1) ΕΟ = Ελεγχόμενη ουσία.

Β. 7. ΥΠΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Ουδεμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Η ελεγχόμενη ουσία, χορηγείται από το στόμα, σε ημερήσιες διαβαθμισμένες δόσεις, σε διάφορες ομάδες πειραματοζώων, μια δόση ανά ομάδα, για μια περίοδο 28 ημερών. Τα ζώα εξετάζονται καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου χορηγήσεως για τη διαπίστωση τοξικών συμπτωμάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, όπως και αυτά που επιζούν στο τέλος της, νεκροτομούνται.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Ουδέν.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προετοιμασία*

Τα ζώα κρατούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής, τουλάχιστον για 5 μέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα λαμβάνονται με τυχαιοποίηση και κατανέμονται στις πειραματικές ομάδες. Οι ελεγχόμενες ουσίες μπορεί να χορηγούνται μέσα στην τροφή, με στομαχική καθετηρίαση, σε κάψουλες ή και στο πόσιμο νερό. Όλα τα ζώα πρέπει να δηλητηριάζονται με την ίδια μέθοδο καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Εάν ένας φορέας ή άλλες προσθετικές ουσίες χρησιμοποιούνται για να διευκολύνουν τη χορήγηση της ουσίας, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν έχουν τοξικές επιδράσεις. Ιστορικά δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν, εφόσον είναι διαθέσιμα.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις, το προτιμώτερο είδος είναι ο επίμυς. Πρέπει να χρησιμοποιούνται οι συνήθεις εργαστηριακές φυλές από νεαρά υγιή ζώα. Στην πιό ιδανική περίπτωση, η χορήγηση πρέπει να αρχίζει προτού οι επίμυες φθάσουν την ηλικία των 6 και, σε ορισμένες περιπτώσεις, των 8 εβδομάδων. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους των χρησιμοποιουμένων ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20 % της μέσης τιμής.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Για κάθε επίπεδο δόσεων, πρέπει να χρησιμοποιούνται 10, τουλάχιστον, ζώα (5 θηλυκά και 5 αρσενικά). Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Εάν έχουν σχεδιαστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, ο αριθμός των ζώων ανά ομάδα πρέπει να αυξηθεί με τον αριθμό των ζώων που προγραμματίστηκε να θανατωθούν πριν από τη συμπλήρωση της μελέτης. Επιπλέον, μια δορυφορική ομάδα από 10 ζώα (5 ζώα ανά φύλο) πρέπει να υποστεί την επέμβαση με την υψηλότερη δόση για 28 μέρες, ώστε να επιτρέψει παρατηρήσεις για την επαναφορά, εμμονή ή αργοπορημένη εμφάνιση των τοξικών συμπτωμάτων για 14 μέρες μετά το τέλος των χορηγήσεων.

1.6.2.3. Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία, τουλάχιστον, επίπεδα δόσεων και ένας μάρτυρας. Εκτός από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας, τα ζώα της ομάδας του μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση όπως και οι υπόλοιπες ομάδες. Όταν χρησιμοποιείται φορέας για τη διευκόλυνση της χορηγήσεως, τα ζώα του μάρτυρα πρέπει να λαμβάνουν το φορέα με τον ίδιο τρόπο όπως και οι πειραματικές ομάδες και να δέχονται το ίδιο ποσό φορέα που δέχονται τα ζώα της ομάδας των υψηλότερων δόσεων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσεων πρέπει μεν να προκαλεί τοξικές επιδράσεις αλλά καθόλου ή πολύ λίγους θανάτους. Το χαμηλότερο επίπεδο δόσεων δεν πρέπει να προκαλεί κανένα τοξικό σύμπτωμα. Όπου υπάρχει ευχέρεια εκτιμήσεως εκθέσεως του ανθρώπου, το κατώτερο επίπεδο δόσεων πρέπει να την υπερβαίνει. Στην ιδεώδη περίπτωση, το ενδιάμεσο επίπεδο δόσεων πρέπει να προκαλεί ελάχιστα διακρινόμενα τοξικά συμπτώματα. Εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μια ενδιάμεσες δόσεις, τα επίπεδα πρέπει να είναι κατανεμημένα με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατή η κλιμάκωση των τοξικών επιδράσεων.

Στις ομάδες των χαμηλών και ενδιάμεσων δόσεων, καθώς και στους μάρτυρες, η συχνότητα εμφανίσεως θανάτων πρέπει να είναι χαμηλή, έτσι που να επιτρέπεται μια σημαντική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Όταν η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται με την τροφή, πρέπει να χρησιμοποιείται είτε η σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (ppm ή mg/kg τροφής) είτε το σταθερό επίπεδο δόσεων εκφρασμένο επί του βάρους του σώματος του ζώου. Άλλος εναλλακτικός τρόπος, εάν χρησιμοποιηθεί, πρέπει να οριστεί με λεπτομέρειες.

Για ουσίες που χορηγούνται με καθετηρίαση, η χορήγηση πρέπει να γίνεται ακριβώς την ίδια ώρα, κάθε ημέρα. Οι δόσεις πρέπει να προσαρμόζονται κατά διαστήματα (μία ή δύο φορές την εβδομάδα), ώστε να διατηρείται ένα σταθερό επίπεδο δόσεων σε αναλογία με το βάρος.

1.6.2.4. Οριακή δοκιμασία

Εάν μία μελέτη 28 ημερών γίνει σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται παρακάτω, σε ένα επίπεδο δόσεων 1 000 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα, ή και σε ψηλότερο επίπεδο σχετιζόμενο με τη δυνατή έκθεση του ανθρώπου, όταν αυτό είναι γνωστό, και δεν προκαλέσει κανένα τοξικό σύμπτωμα, τότε δεν θεωρείται αναγκαία η περαιτέρω συνέχιση της μελέτης. Για ουσίες με χαμηλή τοξικότητα, είναι σημαντικό να εξασφαλίζεται ότι, όταν η ουσία χορηγείται με την τροφή, οι ποσότητες και σε σχετικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας δεν παρεμβαίνουν στις φυσιολογικές ανάγκες διατροφής.

1.6.2.5. Περίοδος παρατηρήσεων

Όλα τα ζώα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και να καταγράφονται όλα τα τοξικά συμπτώματα, συμπεριλαμβανομένων του χρόνου εμφανίσεώς τους, του βαθμού σοβαρότητας και της διάρκειας. Πρέπει να καταγράφονται, επίσης, ο χρόνος θανάτου και οι χρόνοι εμφανίσεως και εξαφανίσεως των τοξικών συμπτωμάτων.

1.6.3. *Διαδικασία*

Στην πιο ιδανική περίπτωση, η χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας γίνεται επί 7 ημέρες την εβδομάδα για μια περίοδο 28 ημερών. Τα ζώα μιας δορυφορικής ομάδας σχεδιασμένης για τις επακόλουθες παρατηρήσεις πρέπει να διατηρούνται 14 ακόμα ημέρες χωρίς χορήγηση, ώστε να γίνει δυνατή η εξακρίβωση των φαινομένων της επαναφοράς ή της εμμονής των τοξικών επιδράσεων.

Οι παρατηρήσεις στους κλωβούς πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις στο δέρμα, στο τρίχωμα, στα μάτια, στο βλεννογόνο, στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, καθώς και στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στη συμπεριφορά. Πρέπει να γίνονται κάθε βδομάδα μετρήσεις της καταναλώσεως τροφής (και του νερού, όταν η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται μέσα στο

πόσιμο νερό) και του βάρους των ζώων. Οι κανονικές παρατηρήσεις είναι απαραίτητες για να αποφευχθούν, όσο το δυνατόν, οι απώλειες οι οφειλόμενες σε αιτίες όπως ο αννιβαλισμός, η αυτόλυση ιστών ή η κακή τοποθέτηση των ζώων. Στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας, γίνεται νεκροψία σε όλα τα επιζώντα ζώα των ομάδων όπου έγινε η χορήγηση. Η απομάκρυνση και η νεκροψία των ετοιμοθανάτων ζώων πρέπει να γίνονται μόλις αυτό πέσει στην αντίληψή μας.

Στο τέλος της δοκιμασίας, για όλα τα ζώα ακόμα και του μάρτυρα, πρέπει να γίνουν οι ακόλουθες εξετάσεις:

1. αιματολογικές εξετάσεις που περιλαμβάνουν, τουλάχιστον, τις μετρήσεις του δείκτη αιματοκρίτη, τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, αριθμό ερυθροκυττάρων, αριθμό λευκοκυττάρων και λευκοκυτταρικό τύπο και μία μέτρηση της πηκτικότητας του αίματος·

2. κλινικές βιοχημικές δοκιμασίες στο αίμα που περιλαμβάνουν, τουλάχιστον, μία παράμετρο της λειτουργίας του ήπατος και των νεφρών: αλανίνο αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμίνη-πυροσταφυλική trans-αμινάση του ορού), ασπαρική αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμινική οξαλοοξική trans-αμινάση του ορού), άζωτο ουρίας, λεύκωμα, κρεατινίνη αίματος, ολική χολερυθρίνη και ολικές πρωτεΐνες ορού.

Άλλοι προσδιορισμοί, οι οποίοι μπορεί να είναι απαραίτητοι για μια ικανοποιητική τοξικολογική αξιολόγηση, περιλαμβάνουν το ασβέστιο, τον φωσφόρο, το χλώριο, το νάτριο, το κάλιο, τη δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, ανάλυση λιπιδίων, ορμόνες, σχέση οξέων/βάσεων, μεθαιμοσφαιρίνη και χολινεστερασική δραστηριότητα.

Πρόσθετες κλινικές βιοχημικές δοκιμασίες μπορεί να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχει ανάγκη επεκτάσεως της έρευνας των παρατηρηθεισών επιδράσεων.

1.6.3.1. Νεκροψία

Όλα τα ζώα του πειράματος πρέπει να υπόκεινται σε πλήρη νεκροψία. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγίζονται νωπά αμέσως μετά την ανατομή, όσο το δυνατό γρηγορότερα, ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση. Όργανα και ιστοί (ήπαρ, νεφρά, σπλήνας, επινεφρίδια και καρδιά και όποιο άλλο όργανο παρουσιάζει μακροσκοπικές αλλοιώσεις ή αλλαγές στο μέγεθος) πρέπει να διατηρούνται σε κατάλληλο μέσο για μια πιθανή μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση.

1.6.3.2. Ιστοπαθολογική εξέταση

Η ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να γίνεται σε διατηρημένους ιστούς και όργανα των ζώων των ομάδων υψηλών δόσεων και μάρτυρα. Τα όργανα και οι ιστοί που εμφανίζουν βλάβες αποδιδόμενες στην επίδραση της υψηλότερης δόσεως της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να εξετάζονται και σε όλες τις χαμηλότερες δόσεις. Τα ζώα της δορυφορικής ομάδας πρέπει να εξετάζονται ιστολογικά, με ιδιαίτερη έμφαση για εκείνα τα όργανα και ιστούς που εμφάνισαν επιδράσεις στα ζώα άλλων πειραματικών ομάδων.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, όπου για κάθε ομάδα της δοκιμασίας θα φαίνονται ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν καθέναν από τους τύπους αλλοιώσεων.

Όλα τα παρατηρηθέντα αποτελέσματα πρέπει να υφίστανται επεξεργασία με μια κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

3.1. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— είδος, φυλή, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, τροφή, κλπ.,

— πειραματικές συνθήκες,

— επίπεδα δόσεων (περιλαμβανομένου και του φορέα, εάν χρησιμοποιείται) και συγκεντρώσεις,

— δεδομένα τοξικής αντιδράσεως ανά φύλο και δόση,

— επίπεδα μη τοξικά, εάν είναι δυνατόν,

— χρόνο θανάτου κατά τη δοκιμασία ή εάν τα ζώα επιζούν στο τέλος της δοκιμασίας,

— τοξικές και άλλες επιδράσεις,

— το χρόνο παρατηρήσεως κάθε ανώμαλου συμπτώματος και τη μετέπειτα πορεία του,

— δεδομένα τροφής και βάρους σώματος,

— αιματολογικές δοκιμασίες και όλα τα αποτελέσματα,

— κλινικές βιοχημικές δοκιμασίες και όλα τα αποτελέσματα,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών αποτελεσμάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εφόσον είναι δυνατόν,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Β. 8. ΥΠΟΞΕΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. Ορισμοί

Βλεπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. Ουσίες αναφοράς

Ουδεμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Διάφορες ομάδες πειραματοζώων εκτίθενται καθημερινά, για μια ορισμένη περίοδο, σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, μιας συγκεντρώσεως χρησιμοποιουμένης ανά ομάδα, για μια χρονική περίοδο 28 ημερών. Όταν χρησιμοποιείται φορέας για να βοηθήσει στην παραγωγή της κατάλληλης συγκεντρώσεως της ελεγχόμενης ουσίας, τότε πρέπει να χρησιμοποιείται και μια ομάδα μάρτυρα του φορέα. Κατά τη διάρκεια της χορηγήσεως, πρέπει να γίνονται καθημερινές παρατηρήσεις στα ζώα, για τη διαπίστωση συμπτωμάτων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, όπως και αυτά που επιζούν στο τέλος της, πρέπει να νεκροτομούνται.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Ουδέν.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Τα ζώα κρατούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής για 5 ημέρες τουλάχιστον πριν από την έναρξη του πειράματος. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα λαμβάνονται με τυχαιοποίηση και κατανέμονται στις απαιτούμενες πειραματικές ομάδες. Ένας κατάλληλος φορέας μπορεί να προστεθεί στην ελεγχόμενη ουσία, όταν χρειαστεί, για να βοηθήσει την παραγωγή της κατάλληλης συγκεντρώσεως της ουσίας στην ατμόσφαιρα. Αν ένας φορέας ή άλλες προσθετικές ουσίες χρησιμοποιούνται για να διευκολυνθεί η χορήγηση των δόσεων, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Ιστορικά στοιχεία, αν υπάρχουν, μπορεί να χρησιμοποιηθούν.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Ο επίμυς είναι το είδος που προτιμάται, εκτός αν υπάρχουν αντενδείξεις. Πρέπει να χρησιμοποιούνται οι συνηθισμένες εργαστηριακές φυλές και νεαρά υγιή ζώα. Στην αρχή της μελέτης, το εύρος της διαφοράς βάρους των ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το ± 20 % της κανονικής μέσης τιμής.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Για κάθε δοκιμαζόμενη ομάδα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 ζώα (5 θηλυκά και 5 αρσενικά). Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, τότε ο αριθμός των ζώων, ανά ομάδα, πρέπει να

αυξηθεί με τον αριθμό των ζώων που έχουν προγραμματιστεί να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Επιπλέον, μια δορυφορική ομάδα από 10 ζώα (5 θηλυκά και 5 αρσενικά) μπορεί να δηλητηριαστούν με το υψηλότερο επίπεδο συγκεντρώσεως, για 28 ημέρες και να παρατηρούνται για επαναφορά, εμμονή ή όψιμη εμφάνιση των τοξικών επιδράσεων. Η περίοδος παρατηρήσεων είναι 14 ημέρες μετά το τέλος της εκθέσεως.

1.6.2.3. Συγκεντρώσεις εκθέσεως

Απαιτούνται τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις, με ένα μάρτυρα ή ένα μάρτυρα φορέα (που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του φορέα στην υψηλότερη δόση), αν χρησιμοποιείται φορέας. Τα ζώα στην ομάδα του μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια μεταχείριση, της χορηγήσεως της ελεγχόμενης ουσίας εξαιρουμένης, με τα ζώα της ελεγχόμενης ομάδας. Η υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να προκαλεί τοξικές επιδράσεις, αλλά καθόλου ή λίγους θανάτους. Η χαμηλότερη συγκέντρωση δεν πρέπει να προκαλεί ενδείξεις τοξικότητας. Όπου υπάρχει μια ευχερής εκτίμηση ανθρώπινης εκθέσεως, τότε η χαμηλότερη συγκέντρωση πρέπει να την υπερβαίνει. Στην πιό ιδανική περίπτωση, η ενδιάμεση συγκέντρωση πρέπει να προκαλεί ελάχιστα, αλλά φανερά, τοξικά συμπτώματα. Αν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία ενδιάμεσες συγκεντρώσεις, τότε πρέπει να κατανέμονται έτσι που να παράγεται μια διαβάθμιση των τοξικών επιδράσεων. Στα κατώτερα και ενδιάμεσα επίπεδα συγκεντρώσεων, όπως και στους μάρτυρες, η συχνότητα των θανάτων πρέπει να είναι χαμηλή, ώστε να επιτρέπεται μια σημαντική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

1.6.2.4. Χρόνος εκθέσεως

Η διάρκεια της εκθέσεως ανά ημέρα πρέπει να είναι 6 ώρες, αλλά και άλλες χρονικές περίοδοι μπορεί να απαιτηθούν σε ειδικές περιπτώσεις.

1.6.2.5. Συσκευές

Τα ζώα πρέπει να δοκιμάζονται μέσα σε μια αναπνευστική συσκευή σχεδιασμένη για να διατηρεί μια δυναμική ροή αέρα, τουλάχιστον 12 αλλαγών του αέρα ανά ώρα, ώστε να εξασφαλίζεται έτσι μια επάρκεια σε οξυγόνο και μια ομαλά κατανεμημένη ατμόσφαιρα εκθέσεως. Όπου χρησιμοποιείται θάλαμος, το σχήμα του πρέπει να μειώνει στο ελάχιστο το συνωστισμό των ζώων και να αυξάνει στο μεγαλύτερο βαθμό την αναπνευστική τους έκθεση στην ελεγχόμενη ουσία. Σαν γενικός κανόνας για να εξασφαλιστεί σταθερότητα στην ατμόσφαιρα ενός θαλάμου, ο ολικός «όγκος» των πειραματοζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του δοκιμαστικού θαλάμου. Μπορεί να χρησιμοποιείται στοματορρινικός ή κεφαλικός, ή ολόκληρου του σώματος ατομικός θάλαμος εκθέσεως. Οι δύο πρώτοι θα μειώσουν στο ελάχιστο τη λήψη της ουσίας από άλλες οδούς.

1.6.2.6. Περίοδος παρατηρήσεων

Τα πειραματόζωα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά για συμπτώματα τοξικότητα καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού, όπως και κατά την περίοδο της θεραπείας. Ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος εμφανίσεως και εξαφανίσεως των τοξικών συμπτωμάτων πρέπει να καταχωρούνται.

1.6.3. *Διαδικασία*

Τα ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία καθημερινά, 5 έως 7 ημέρες την εβδομάδα, για μια περίοδο 28 ημερών. Τα ζώα κάθε δορυφορικής ομάδας, προγραμματισμένα για συνεχείς παρατηρήσεις, θα κρατηθούν για 14 επιπλέον ημέρες χωρίς χορήγηση της ουσίας, για να διαπιστωθεί η θεραπεία ή η εμμονή των τοξικών συμπτωμάτων. Η θερμοκρασία στην οποία πρέπει να πραγματοποιείται η δοκιμασία, πρέπει να διατηρείται στους 22 °C ± 3 °C. Η ιδανική σχετική υγρασία πρέπει να διατηρείται μεταξύ 30 και 70 %, αλλά για ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. δοκιμασίες αερολυμάτων) αυτό μπορεί να μην είναι πραγματοποιήσιμο. Η τροφή και το νερό πρέπει να απομακρύνονται κατά τη διάρκεια της εκθέσεως.

Πρέπει να χρησιμοποιείται ένα δυναμικό αναπνευστικό σύστημα εφοδιασμένο με ένα κατάλληλο σύστημα μετρήσεως της συγκεντρώσεως. Για να διαπιστωθεί η κατάλληλη συγκέντρωση εκθέσεως,

συνιστάται μια προκαταρκτική δοκιμασία. Η ροή του αέρα πρέπει να προσαρμόζεται για να εξασφαλίζεται η ομοιογένεια των συνθηκών στο θάλαμο εκθέσεως. Το σύστημα πρέπει να εξασφαλίζει την όσο το δυνατό γρηγορότερη εγκατάσταση σταθερών συνθηκών εκθέσεως.

Πρέπει να γίνονται μετρήσεις ή παρακολούθηση:

α) της ταχύτητας της ροής του αέρα (συνεχώς)·

β) της πραγματικής συγκεντρώσεως της ελεγχόμενης ουσίας στην αναπνευστική ζώνη. Κατά τη διάρκεια της ημερήσιας εκθέσεως, η συγκέντρωση δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 15 % από τη μέση τιμή. Πάντως, στην περίπτωση των αερολυμάτων και κόνεων, αυτό το επίπεδο ελέγχου μπορεί να μην είναι κατορθωτό και τότε ένα μεγαλύτερο εύρος θα μπορούσε να γίνει δεκτό. Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης η συγκέντρωση από ημέρα σε ημέρα πρέπει να διατηρείται τόσο σταθερή όσο είναι πρακτικά πραγματοποιήσιμο. Όσον αφορά τα σωματίδια και τα αερολύματα που σκοπεύουμε να προσδιορίσουμε τη σύνθεση κατανομής των σωματιδίων των, πρέπει να λαμβάνονται μετρήσεις τόσο συχνά όσο είναι απαραίτητο·

γ) της θερμοκρασίας και της υγρασίας·

δ) κατά τη διάρκεια, και στη συνέχεια της εκθέσεως, γίνονται συστηματικές παρατηρήσεις. Πρέπει να διατηρείται ατομικό αρχείο για κάθε ζώο. Όλα τα ζώα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά και τα συμπτώματα τοξικότητας πρέπει να καταγράφονται, περιλαμβανομένου του χρόνου εμφανίσεως της σοβαρότητας και της διάρκειάς τους. Οι παρατηρήσεις στους κλωβούς πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις στο δέρμα και στο τρίχωμα, αλλοιώσεις των οφθαλμών, των βλεννογόνων, αλλοιώσεις του αναπνευστικού, κυκλοφοριακού, του αυτόνομου και κεντρικού νευρικού συστήματος, της σωματοκινητικής δραστηριότητας και του τρόπου συμπεριφοράς. Τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται εβδομαδιαία. Επίσης, συνιστάται να γίνονται μετρήσεις της κατανάλωσης της τροφής μια φορά την εβδομάδα. Οι τακτικές παρατηρήσεις των ζώων είναι απαραίτητες για να εξασφαλίζεται ότι τα ζώα δεν χάνονται από τη μελέτη για λόγους όπως ο καννιβαλισμός, η αυτόλυση των ιστών και η κακή τοποθέτηση. Στο τέλος της περιόδου μελέτης, όλα τα επιζώντα στις μη δορυφορικές ομάδες νεκροτομούνται. Τα ετοιμοθάνατα ζώα, μόλις διακρίνονται, πρέπει να απομακρύνονται και να νεκροτομούνται.

Οι ακόλουθες εξετάσεις πρέπει να γίνονται στο τέλος της δοκιμασίας σε όλα τα ζώα, των μαρτύρων συμπεριλαμβανομένων:

i) αιματολογικές, που να περιλαμβάνουν, τουλάχιστον, το δείκτη αιματοκρίτη, συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, μέτρηση ερυθροκυττάρων, μέτρηση λευκοκυττάρων και λευκοκυτταρικό τύπο και μια μέτρηση της πηκτικότητας του αίματος·

ii) κλινικούς βιοχημικούς προσδιορισμούς στο αίμα, περιλαμβανομένης, τουλάχιστον, μιας παραμέτρου της λειτουργίας του ήπατος και των νεφρών: αλανίνο αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμίνη-πυροσταφυλική trans-αμίναση του ορού), ασπαρτική αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμινική οξαλοοξική trans-αμινάση του ορού), άζωτο ουρίας, λεύκωμα, κρεατινίνη αίματος, ολική χολερυθρίνη και ολικές πρωτεΐνες ορού.

Άλλοι προσδιορισμοί, οι οποίοι μπορεί να είναι απαραίτητοι για μια ικανοποιητική τοξικολογική αξιολόγηση, περιλαμβάνουν το ασβέστιο, φωσφόρο, χλωριούχα, νάτριο, κάλιο, δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, ανάλυση λιπιδίων, ορμόνες, σχέση οξέων/βάσεων, μεθαιμοσφαιρίνη και δραστικότητα χοληνεστεράσης.

Πρόσθετες κλινικές βιοχημικές δοκιμασίες μπορεί να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχει ανάγκη επεκτάσεως της έρευνας των παρατηρηθεισών επιδράσεων.

1.6.3.1. Νεκροψία

Όλα τα ζώα του πειράματος πρέπει να υπόκεινται σε πλήρη νεκροψία. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγίζονται νωπά, όσο το δυνατό γρηγορότερα μετά την ανατομή, ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση. Όργανα και ιστοί (το αναπνευστικό σύστημα, το ήπαρ, τα νεφρά, ο σπλήνας, τα επινεφρίδια, η καρδιά και κάθε όργανο που έδειξε μακροσκοπικές αλλοιώσεις ή αλλαγές στο βάρος) πρέπει να διατηρούνται σε κατάλληλο μέσο για μια πιθανή μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση. Ο ρινοφάρυγγας και οι πνεύμονες πρέπει να λαμβάνονται ολόκληροι, να ζυγίζονται και να συντηρούνται με ένα κατάλληλο προσηλωτικό μέσο, ώστε να εξασφαλίζεται η διατήρηση της δομής των πνευμόνων. Μια διαδικασία που θεωρείται αποτελεσματική είναι η έγχυση με ένα προσηλωτικό υγρό.

1.6.3.2. Ιστοπαθολογική εξέταση

Στις ομάδες των υψηλών συγκεντρώσεων και στις ομάδες των μαρτύρων, πρέπει να γίνει ιστολογική εξέταση σε συντηρημένα όργανα και ιστούς. Όργανα και ιστοί που παρουσιάζουν ανωμαλίες στην υψηλότερη δόση και που μπορούν να αποδοθούν στην ελεγχόμενη ουσία, πρέπει να εξετάζονται σε όλες τις ομάδες των χαμηλότερων δόσεων. Τα ζώα κάθε δορυφορικής ομάδας πρέπει να εξετάζονται ιστολογικά, με ιδιαίτερη έμφαση σ' αυτά τα όργανα και ιστούς που εμφάνισαν επιδράσεις στα ζώα των άλλων ομάδων.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε δοκιμαζόμενη ομάδα, ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν κάθε τύπο αλλοιώσεως. Όλα τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν πρέπει να αξιολογηθούν με μία κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

3.1. Έκθεση ελέγχου

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— είδος, φυλή, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διατροφή κλπ.·

— πειραματικές συνθήκες:

περιγραφή της συσκευής εκθέσεως που να περιλαμβάνει το σχήμα, τον τύπο, τις διαστάσεις, την πηγή αέρα, το σύστημα παραγωγής σωματιδίων και αερολυμάτων, τη μέθοδο ρυθμίσεως αέρα, την αγωγή του εξερχόμενου αέρα και τη μέθοδο εγκλωβισμού των ζώων σε πειραματικό θάλαμο, εάν αυτός χρησιμοποιείται. Πρέπει να περιγραφεί η συσκευή για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και της σταθερότητας των συγκεντρώσεων των αερολυμάτων ή του μεγέθους των σωματιδίων.

Δεδομένα εκθέσεως

Αυτά πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα και να παρουσιάζονται μαζί με τις μέσες τιμές και μετρήσεις του εύρους διασποράς (π.χ. σταθερά απόκλιση). Πρέπει, αν είναι δύνατο, να περιλαμβάνουν:

α) ταχύτητες αέρα διά της συσκευής αναπνευστικής εκθέσεως,

β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα,

γ) φαινόμενες συγκεντρώσεις (ολικό ποσό της ελεγχόμενης ουσίας που τροφοδοτεί τη συσκευή, διαιρεμένο διά του όγκου του αέρα),

δ) φύση φορέα, εάν χρησιμοποιείται,

ε) πραγματικές συγκεντρώσεις στην πειραματική αναπνευστική ζώνη,

ζ) μέσο μέγεθος σωματιδίων (όταν είναι διαθέσιμο)·

— δεδομένα τοξικών αντιδράσεων ανά φύλο και συγκέντρωση,

— χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια του πειράματος ή, εάν τα ζώα επέζησαν, στο τέλος της δοκιμασίας·

— περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων, δόσεις χωρίς επίδραση·

— το χρόνο παρατηρήσεως κάθε ανώμαλου συμπτώματος και την επακόλουθη πορεία του·

— δεδομένα βάρους τροφής και σώματος·

— χρησιμοποιηθείσες αιματολογικές δοκιμασίες και αποτελέσματα·

— κλινικές βιοχημικές δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν και αποτελέσματα·

— αποτελέσματα νεκροψίας·

— μια λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων που βρέθηκαν·

— μια στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό·

— συζήτηση των αποτελεσμάτων·

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Β. 9. ΥΠΟΞΕΙΑ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. Ουσιές αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Η ελεγχόμενη ουσία εφαρμόζεται καθημερινά στο δέρμα σε διαβαθμισμένες δόσεις, σε διάφορες ομάδες πειραματοζώων, μια δόση ανά ομάδα, για μια χρονική περίοδο 28 ημερών. Κατά τη διάρκεια της περιόδου εφαρμογής, τα ζώα εξετάζονται καθημερινά για τη διαπίστωση τοξικών συμπτωμάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, όπως και αυτά που επιζούν στη λήξη της, νεκροτομούνται.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Τα ζώα κρατούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής για 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία υγιή νεαρά ζώα λαμβάνονται με τυχαιοποίηση και κατανέμονται στις πειραματικές ομάδες και τις ομάδες μαρτύρων. Λίγο πριν αρχίσει η δοκιμασία το τρίχωμα ψαλιδίζεται από την περιοχή της ράχης του κορμού των πειραματοζώων. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί το ξύρισμα για την απομάκρυνση του τριχώματος, αλλά αυτό πρέπει να γίνεται 24 ώρες περίπου πριν από τη δοκιμασία. Επανάληψη του ψαλιδίσματος ή του ξυρίσματος χρειάζεται συνήθως κάθε εβδομάδα. Το κούρεμα ή ψαλίδισμα πρέπει να γίνεται με προσοχή, ώστε να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος. Πρέπει να καθαρίζεται μια περιοχή για την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας, η οποία δεν πρέπει να είναι μικρότερη από το 10 % της επιφάνειας του σώματος. Όταν αποφασίζονται οι διαστάσεις της περιοχής που πρέπει να καθαριστεί και να καλυφθεί με την ελεγχόμενη ουσία, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το βάρος του ζώου. Όταν ελέγχονται στερεά, τα οποία μπορούν να κονιοποιηθούν, πρέπει να υγραίνονται αρκετά με νερό ή αν χρειαστεί με κατάλληλο φορέα, για να εξασφαλιστεί η καλή επαφή με το δέρμα. Οι υγρές ουσίες χρησιμοποιούνται συνήθως αδιάλυτες. Η εφαρμογή γίνεται καθημερινά 5 έως 7 ημέρες την εβδομάδα.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Ο ενήλικας επίμυς, το ινδικό χοιρίδιο ή το κουνέλι μπορεί να χρησιμοποιούνται. Άλλα είδη, επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθούν, αλλά η χρήση τους θα πρέπει να δικαιολογηθεί. Κατά την έναρξη της δοκιμασίας το εύρος της διαφοράς του βάρους πρέπει να μην υπερβαίνει το 20 % του μέσου βάρους.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Σε κάθε επίπεδο δόσεων πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 ζώα (5 θηλυκά και 5 αρσενικά) με υγιές δέρμα. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, τότε ο αριθμός των ζώων ανά ομάδα πρέπει να αυξηθεί με τον αριθμό των ζώων που είναι προγραμματισμένο να θανατωθούν πριν από τη συμπλήρωση της μελέτης. Επιπλέον, μια δορυφορική ομάδα από 10 ζώα (5 ζώα ανά φύλο) μπορεί να δηλητηριαστούν με την υψηλότερη δόση για 28 ημέρες και να εξετάζονται για επαναφορά, εμμονή ή την αργοπορημένη εμφάνιση των τοξικών επιδράσεων για ένα χρονικό διάστημα 14 ημερών μετά το πέρας της δηλητηριάσεως.

1.6.2.3. Επίπεδα δόσεων

Απαιτούνται τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσεων και ένας μάρτυρας ή ένας μάρτυρας του φορέα, αν χρησιμοποιείται φορέας. Η περίοδος εκθέσεως πρέπει να είναι τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα. Η εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να γίνεται την ίδια ώρα κάθε ημέρα και να προσαρμόζεται κατά διαστήματα (ανα εβδομάδα ή ανά δύο εβδομάδες), έτσι ώστε να διατηρείται ένα σταθερό επίπεδο δόσεων σε σχέση με το βάρος του σώματος των ζώων. Τα ζώα στην ομάδα του μάρτυρα πρέπει να υπόκεινται στην ίδια μεταχείριση με τα πειραματόζωα, εξαιρουμένης της χορηγήσεως της ελεγχόμενης ουσίας. Όταν χρησιμοποιείται φορέας για διευκόλυνση χορηγήσεως της δόσεως, η ομάδα του μάρτυρα πρέπει να παίρνει τη δόση κατά τον ίδιο τρόπο με την ομάδα των πειραμοτοζώων και η ποσότητα της δόσεως να είναι ίδια με την υψηλότερη δόση που παίρνουν τα πειραματόζωα. Η υψηλότερη δόση θα πρέπει να προκαλεί τοξικές επιδράσεις, αλλά λίγους ή καθόλου θανάτους. Η χαμηλότερη δόση δεν θα πρέπει να προκαλεί συμπτώματα τοξικότητας. Όταν υπάρχει μια εύχρηστη εκτίμηση της ανθρώπινης εκθέσεως, η χαμηλότερη δόση θα πρέπει να την υπερβαίνει. Η ενδιάμεση δόση, στην πιό ιδανική περίπτωση, θα πρέπει να προκαλεί ελάχιστα ευδιάκριτα τοξικά συμπτώματα. Εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία ενδιάμεσες δόσεις, τότε αυτές πρέπει να απέχουν έτσι μεταξύ τους ώστε να προκαλούν διαβαθμισμένες τοξικές επιδράσεις. Στη χαμηλή και στις ενδιάμεσες ομάδες, όπως και στους μάρτυρες, η συχνότητα των θανάτων θα πρέπει να είναι χαμηλή, ώστε να επιτρέπει μια χρήσιμη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Εάν η εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας προκαλεί σοβαρό δερματικό ερεθισμό, η συγκέντρωση θα πρέπει να ελαττωθεί και αυτό μπορεί να ελαττώσει ή να εξαφανίσει τις άλλες τοξικές επιδράσεις στην υψηλότερη δόση. Επιπλέον, αν το δέρμα έχει υποστεί σοβαρή βλάβη, είναι δυνατόν να χρειστεί να ακυρωθεί η μελέτη και να επιχειρηθεί ένα νέο πείραμα με χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

1.6.2.4. Οριακή δοκιμασία

Άν μια προκαταρκτική μελέτη με μια δόση 1 000 mg/kg ή και μεγαλύτερη, σχετική με το πιθανό όριο εκθέσεως του ανθρώπινου πληθυσμού, όταν αυτό είναι γνωστό, δεν προκαλέσει καμιά τοξική επίδραση, ο περαιτέρω πειραματισμός μπορεί να μη θεωρηθεί αναγκαίος.

1.6.2.5. Περίοδος παρατηρήσεως

Τα πειραματόζωα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά για φαινόμενα τοξικότητας. Ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος κατά τον οποίο εμφανίζονται και εξαφανίζονται τα τοξικά συμπτώματα πρέπει να καταγράφονται.

1.6.3. *Διαδικασία*

Τα ζώα πρέπει να εγκλωβίζονται ανά άτομο. Η επέμβαση στα ζώα με την ελεγχόμενη ουσία γίνεται, στην πιο ιδανική περίπτωση, 7 ημέρες την εβδομάδα, για μια περίοδο 28 ημερών. Τα ζώα κάθε δορυφορικής ομάδας που προγραμματίστηκαν για συνεχείς παρατηρήσεις πρέπει να διατηρηθούν για 14 επιπλέον ημέρες χωρίς επέμβαση, για να εξακριβωθεί η ανάρρωση από τις τοξικές επιδράσεις ή η εμμονή τους. Ο χρόνος εκθέσεως πρέπει να είναι τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα.

Η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να εφαρμόζεται ομοιόμορφα σε μια έκταση, η οποία είναι περίπου το 10 % της όλης επιφάνειας του σώματος. Με πολύ τοξικές ουσίες η καλυπτόμενη επιφάνεια μπορεί να είναι μικρότερη, αλλά όσο γίνεται περισσότερη από την επιφάνεια πρέπει να καλύπτεται με μία λεπτή και ομοιόμορφη στιβάδα ουσίας.

Η ελεγχόμενη ουσία, κρατιέται σ' επαφή με το δέρμα κατά τη διάρκεια της εκθέσεως, με τη βοήθεια επίδεσμου από πορώδη γάζα και μιας μη ερεθιστικής ταινίας. Η δοκιμαζόμενη περιοχή πρέπει, επιπλέον, να καλύπτεται κατάλληλα, ώστε να συγκρατείται ο επίδεσμος και η ελεγχόμενη ουσία και έτσι να

εξασφαλίζεται η μη κατάποσή της από τα πειραματόζωα. Για να αποφευχθεί η κατάποση της ελεγχόμενης ουσίας, μπορεί να χρησιμοποιούνται επίσης συσκευές περιορισμού των ζώων, αλλά δεν συνιστάται η μέθοδος της απόλυτης ακινησίας.

Η ουσία που μένει σαν υπόλειμμα, στο τέλος της περιόδου εκθέσεως, θα πρέπει να απομακρύνεται όταν αυτό είναι πραγματοποιήσιμο με νερό ή άλλη κατάλληλη μέθοδο καθαρισμού του δέρματος.

Όλα τα πειραματόζωα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά και να καταγράφονται τα τοξικά συμπτώματα, ο χρόνος ενάρξεώς τους, ο βαθμός και η διάρκεια τους. Οι παρατηρήσεις πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις του δέρματος και του τριχώματος, των οφθαλμών και των βλεννογόνων, όπως επίσης του αναπνευστικού, κυκλοφορικού, αυτόνομου και κεντρικού νευρικού συστήματος, της σωματοκινητικής δραστηριότητας και του τρόπου συμπεριφοράς. Πρέπει, επίσης, να γίνονται μετρήσεις της καταναλώσεως τροφής και του βάρους των ζώων μια φορά την εβδομάδα. Η κανονική παρατήρηση των ζώων είναι απαραίτητη για να εξασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει απώλεια πειραματοζώων εξαιτίας καννιβαλισμού, αυτοπεψίας των ιστών, ή κακής στεγάσεως. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου, όλα τα επιζώντα ζώα στις μη δορυφορικές ομάδες νεκροτομούνται. Τα ημιθανή ζώα πρέπει να νεκροτομούνται μόλις παρατηρηθούν.

Οι παρακάτω εξετάσεις θα πρέπει να γίνουν στο τέλος του πειράματος σε όλα τα ζώα, των μαρτύρων συμπεριλαμβανομένων:

1. αιματολογικές που να περιλαμβάνουν τουλάχιστον μετρήσεις αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης, μετρήσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών και λευκοκυτταρικού τύπου, και μια μέτρηση του δυναμικού πήξεως·

2. κλινικές βιοχημικές μετρήσεις του αίματος που περιλαμβάνουν τουλάχιστον μια παράμετρο της λειτουργίας του ήπατος και των νεφρών: αλανίνο αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμίνη-πυροσταφυλική trans-αμινάση του ορού), ασπαρτική αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμινική οξαλοοξική trans-αμινάση του όρου), άζωτο ουρίας, αλβουμίνη, κρεατινίνη αίματος, ολική χολερυθρίνη και ολικές πρωτεΐνες του ορού.

Άλλοι προσδιορισμοί, οι οποίοι μπορεί να είναι αναγκαίοι για την τοξικολογική αξιολόγηση, περιλαμβάνουν το ασβέστιο, φωσφόρο, χλώριο, νάτριο, κάλιο, δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, ανάλυση λιπιδίων, ορμονών, οξεοβασική ισορροπία, μεθαιμοσφαιρίνη και δραστικότητα χολινεστεράσης.

Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθούν και άλλοι βιοχημικοί προσδιορισμοί για την επέκταση της έρευνας των παρατηρηθεισών επιδράσεων.

1.6.4. *Μακροσκοπική νεκροψία*

Όλα τα ζώα της μελέτης πρέπει να υποβληθούν σε μια πλήρη μακροσκοπική νεκροψία. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγιστούν νωπά, όσο το δυνατό γρηγορότερα μετά την ανατομή για την αποφυγή αποξηράνσεως. Τα όργανα και οι ιστοί των δηλητηριασμένων και μη ζώων, το δέρμα, το ήπαρ, οι νεφροί και άλλα στοχούμενα όργανα (δηλαδή εκείνα που εμφάνισαν μακροσκοπικές αλλοιώσεις ή αλλαγές μεγέθους) θα πρέπει να διατηρούνται σ' ένα κατάλληλο μέσο για την πιθανή, μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση.

1.6.5. *Ιστοπαθολογική εξέταση*

Η ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να γίνεται στα διατηρηθέντα όργανα των ζώων της ομάδας της υψηλότερης δόσεως και των μαρτύρων. Τα όργανα και οι ιστοί που παρουσιάζουν ανωμαλίες, που μπορεί να αποδοθούν στην ελεγχόμενη ουσία, στην υψηλότερη δόση, πρέπει να εξετάζονται και στις χαμηλότερες δόσεις. Τα ζώα της δορυφορικής ομάδας πρέπει να εξετάζονται ιστολογικά με ιδιαίτερη έμφαση για κείνα τα όργανα που διαπιστώθηκε ότι δείχνουν ανωμαλίες στις άλλες ομάδες.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε πειραματική ομάδα, ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν κάθε τύπο αλλοιώσεως.

Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με μια κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

3.1. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— δεδομένα ζώων (είδος, φυλή, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διατροφή, κλπ.),

— πειραματικές συνθήκες,

— επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του φορέα, αν χρησιμοποιείται) και συγκεντρώσεις,

— μη τοξικά επίπεδα, όταν είναι δυνατόν,

— δεδομένα τοξικών αντιδράσεων ανά δόση και φύλο,

— χρόνο θανάτου των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης ή αν τα ζώα επιζούν έως το τέλος,

— τοξικές ή άλλες επιδράσεις,

— το χρόνο που παρατηρήθηκε κάθε ανωμαλία και τη διαδοχική πορεία τους,

— δεδομένα βάρους σώματος και καταναλώσεως τροφής,

— αιματολογικές δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν και αποτελέσματα,

— κλινικές βιοχημικές δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν και αποτελέσματα,

— ευρήματα νεκροψίας,

— λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,

— στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Β. 10. ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ — ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ

ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ IN VITRO

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. **Ουσιές αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Η in vitro κυτταρογενετική δοκιμασία είναι μια βραχείας διάρκειας δοκιμασία μεταλλαξογενέσεως για τη διαπίστωση δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών. Χρησιμοποιούνται καλλιέργειες καθορισμένων κυτταρικών σειρών όπως και πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων. Μετά από έκθεση στην ελεγχόμενη ουσία με και χωρίς μείγμα ενεργοποιήσεως των ενζύμων του ήπατος (ένας συνεργός παράγων με συμπλήρωμα με το μετα-μιτοχονδριακό κλάσμα), στις καλλιέργειες κυττάρων προστίθενται παρεμποδιστές της μιτωτικής ατράκτου, όπως η κολχικίνη ή κολσεμίδη με σκοπό την συσσώρευση κυττάρων που βρίσκονται στο στάδιο της μετάφασης κατά τη μίτωση (c-μετάφαση). Τα κύτταρα συλλέγονται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα και ετοιμάζονται χρωμοσωμικά παρασκευάσματα. Στη συνέχεια γίνεται η χρώση των παρασκευασμάτων και τα κύτταρα, στο στάδιο της μιτώσεως, αναλύονται για τη διαπίστωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Οι ελεγχόμενες ουσίες παρασκευάζονται, στο μέσο καλλιέργειας ή διαλύονται σε κατάλληλο φορέα πριν από την επέμβαση στα κύτταρα. Χρησιμοποιούνται καθορισμένες κυτταρικές σειρές ή πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων, π.χ. κύτταρα κινέζικων χάμστερς και λεμφοκύτταρα ανθρώπου.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

Αριθμός καλλιεργειών

Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο καλλιέργειες για κάθε πειραματικό σημείο.

Χρήση αρνητικού και θετικού μάρτυρα

Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιούνται ο διαλύτης (όταν ο διαλύτης δεν είναι το θρεπτικό υλικό ή νερό), το μείγμα ενεργοποιήσεως ηπατικών ενζύμων, ο διαλύτης και οι μη κατεργασμένοι μάρτυρες.

Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνεται και ένας θετικός μάρτυρας. Όπου χρησιμοποιείται μείγμα ενεργοποιήσεως των ηπατικών ενζύμων για να ενεργοποιηθεί η ελεγχόμενη ουσία, ένα προϊόν γνωστό ότι χρειάζεται μεταβολική ενεργοποίηση πρέπει να χρησιμοποιείται σαν θετικός μάρτυρας.

Επίπεδα δόσεων

Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις δόσεις της ελεγχόμενης ουσίας σε κλίμακα λογαριθμική· η υψηλότερη δόση πρέπει να μειώνει τη μιτωτική δράση κατά 50 % περίπου.

Συνθήκες καλλιέργειας

Χρησιμοποιούνται κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας, κατάλληλο θρεπτικό υλικό και επωαστικές συνθήκες (δηλαδή θερμοκρασία, χρησιμοποιούμενα σκεύη καλλιέργεας, συγκεντρώσεις CO_2 και υγρασία).

1.6.3. *Διαδικασία*

1.6.3.1. Παρασκευή καλλιεργειών

Καθορισμένες κυτταρικές σειρές: τα κύτταρα παράγονται από παρακαταθήκες καλλιεργειών (π.χ. με επεξεργασία με τρυψίνη ή με τίναγμα), τοποθετούνται σε δοχεία καλλιέργειας στην κατάλληλη πυκνότητα και επωάζονται στους 37 °C.

Λεμφοκύτταρα ανθρώπου: ολόκληρο το αίμα, μετά από προσθήκη ηπαρίνης, προστίθεται στο θρεπτικό υλικό που περιέχει φυτοαιμογλουτινίνη, ορό εμβρύου βοός και αντιβιοτικά και επωάζεται στους 37 °C.

1.6.3.2. Επέμβαση στις καλλιέργειες με την ελεγχόμενη ουσία

i) Επέμβαση χωρίς προσθήκη μείγματος ενεργοποιήσεως των ηπατικών ενζύμων

Όλες οι επεμβάσεις πρέπει να καλύπτουν την περίοδο ενός ολόκληρου κυτταρικού κύκλου και το σχήμα προσηλώσεως πρέπει να εξασφαλίζει την ανάλυση των πρώτων μιτώσεων μετά την επέμβαση σε κύτταρα που βρίσκονται σε διάφορα στάδιο του κύκλου.

Εάν η επέμβαση δεν καλύπτει το μήκος ενός κυτταρικού κύκλου, εκλέγονται διάφοροι χρόνοι προσηλώσεως για τα κύτταρα που βρίσκονται σε διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου κατά την επέμβαση, δηλαδή G_1, S και G_2.

Η ελεγχόμενη ουσία προστίθεται στις καλλιέργειες των καθορισμένων κυτταρικών σειρών, όταν βρίσκονται σε εκθετική ανάπτυξη. Η επέμβαση στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων γίνεται όταν αυτά είναι ακόμη σε μια ημισύγχρονη κατάσταση.

Εάν η ελεγχόμενη ουσία αλλοιώνει το μήκος του κυτταρικού κύκλου, τα χρονικά διαστήματα προσηλώσεως πρέπει να αλλάζουν ανάλογα.

ii) Επέμβαση με προσθήκη μείγματος ενεργοποιήσεως ηπατικών ενζύμων

Κατά την επέμβαση, η ελεγχόμενη ουσία σε συνδυασμό με το μείγμα ενεργοποιήσεως πρέπει να παραμένει όσο το δυνατό περισσότερο, χωρίς όμως να ασκεί τοξική επίδραση στα κύτταρα. Αν, εξαιτίας μιας τοξικότητας, η επέμβαση αυτή δεν καλύπτει το μήκος ενός πλήρους κυτταρικού κύκλου, εκλέγονται πολλαπλοί χρόνοι προσηλώσεως, ώστε να λαμβάνονται κύτταρα που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου κατά την επέμβαση, δηλαδή G_1, S και G_2.

Συλλογή κυττάρων

Μία έως δύο ώρες πριν από τη συλλογή των κυττάρων γίνεται επέμβαση στις καλλιέργειες με παρεμποδιστή της μιτωτικής ατράκτου. Τα κύτταρα κάθε καλλιέργειας συλλέγονται και επεξεργάζονται χωριστά για την πραγματοποίηση των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων.

1.6.3.3. Χρωμοσωμικά παρασκευάσματα

Η παρασκευή των χρωμοσωμάτων περιλαμβάνει επέμβαση στα κύτταρα με υποτονικό διάλυμα, προσήλωση, επίθεση σε αντικειμενοφόρους πλάκες και χρώση.

Ανάλυση

Τουλάχιστον 100 καλοφτιαγμένα παρασκευάσματα μεταφάσεων ανά καλλιέργεια αναλύονται για τη διαπίστωση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Πριν από την ανάλυση γίνεται κωδικοποίηση των αντικειμενοφόρων.

Στα λεμφοκύτταρα του ανθρώπου αναλύονται μόνον εκείνες οι μεταφάσεις που περιέχουν 46 κεντρομερίδια.

Στις καθορισμένες κυτταρικές σειρές αναλύονται μόνον οι μεταφάσεις που περιέχουν ± 2 κεντρομερίδια του υπολογισθέντος αριθμού.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα παρουσιάζονται υπό μορφή πίνακα. Οι ανωμαλίες τύπου χρωματίδης (κενά, θραύσματα, αμοιβαίες μετατοπίσεις), οι ανωμαλίες τύπου χρωμοσώμων (κενά, θραύσματα, minutes, δικεντρικοί και πολυκεντρικοί δακτύλιοι) και ο αριθμός των ανωμάλων μεταφάσεων (με ή χωρίς κενά) κατατάσσονται χωριστά για όλες τις καλλιέργειες με ελεγχόμενη ουσία και τους μάρτυρες.

Τα δεδομένα αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

3.1. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— χρησιμοποιηθέντα κύτταρα,

— πειραματικές συνθήκες: σύνθεση θρεπτικού υλικού, συγκέντρωση CO_2, θερμοκρασία επωάσεως, διάρκεια επωάσεως, επίπεδα δόσεων, χρόνο επεμβάσεως, διάρκεια επεμβάσεως, με παρεμποδιστή του μιτωτικού δικτύου καθώς και η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση αυτού, τύπο μείγματος ενεργοποιήσεως ηπατικών ενζύμων, θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες,

— αριθμό κυτταρικών καλλιεργειών,

— αριθμό αναλυθεισών μεταφάσεων (τα δεδομένα χωριστά για κάθε καλλιέργεια).

— μιτωτικό δείκτη,

— τύπο και αριθμό ανωμαλιών χωριστά για κάθε καλλιέργεια με επέμβαση και των μαρτύρων, τον αναμενόμενο αριθμό χρωμοσωμάτων στις καθορισμένες σειρές κυττάρων,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή μέρος Β (σημείο Δ).

Β. 11. ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ — ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ

IN VIVO ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΣΕ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ — ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Η in vivo κυτταρογενετική αυτή δοκιμασία είναι βραχείας διάρκειας δοκιμασία μεταλλαξογενέσεως για τη διαπίστωση των ανωμαλιών στη δομή των χρωμοσωμάτων. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες αξιολογούνται εν γένει στην πρώτη μετά τη δηλητηρίαση μίτωση. Με τα χημικά μεταλλαξογόνα η πλειονότητα των προκαλουμένων ανωμαλιών είναι τύπου χρωματίδης.

Η μέθοδος χρησιμοποιεί κύτταρα του μυελού των οστών θηλαστικών, τα οποία έχουν εκτεθεί στις ελεγχόμενες ουσίες διά μέσου της κατάλληλης οδού και θανατώθηκαν σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα. Στα ζώα χορηγείται επιπλέον, πριν από τη θανάτωση, η παρεμποδιστική της μιτωτικής ατράκτου ουσία, όπως η κολχικίνη, με σκοπό τη συγκέντρωση κυττάρων που βρίσκονται σε κάποιο στάδιο μεταφάσεως της μιτώσεως (μετάφαση-c). Ξηραμένα στον αέρα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα χρωματίζονται και οι μεταφάσεις αναλύονται στο μικροσκόπιο για τη διαπίστωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Οι υπό έλεγχο ουσίες διαλύονται σε φυσιολογικό ορό. Αν είναι αδιάλυτες σ' αυτόν, διαλύονται ή αιωρούνται σε κατάλληλους φορείς.

Χρησιμοποιούνται πρόσφατες διαλύσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται κάποιος φορέας για να διευκολυνθεί η χορήγηση, δεν πρέπει να παρεμποδίζει τη δράση της ελεγχόμενης ουσίας ή να προκαλεί τοξικές επιδράσεις.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιούνται διάφορα είδη τρωκτικών, όπως επίμυες, μύες και χάμστερς. Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα λαμβάνονται με τυχαιοποίηση και κατανέμονται στις διάφορες ομάδες επεμβάσεως και μαρτύρων.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Χρησιμοποιούνται πέντε (5) τουλάχιστον θηλυκά και πέντε (5) αρσενικά ζώα ανά ομάδα επεμβάσεως και ομάδα μάρτυρα. Έτσι, θανατώνονται 10 ζώα ανά χρονική περίοδο και ανά ομάδα, αν έχουν προγραμματιστεί διάφοροι πειραματικοί χρόνοι μετά την επέμβαση.

1.6.2.3. Οδός χορηγήσεως

Οι ελεγχόμενες ουσίες πρέπει γενικά να χορηγούνται εφάπαξ. Επανειλημμένες χορηγήσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν αν υπάρχουν βιβλιογραφικά στοιχεία που να το υποδεικνύουν. Εντούτοις, ένα πρόγραμμα με επανειλημμένες χορηγήσεις μπορεί να εφαρμοστεί μόνο αν η ελεγχόμενη ουσία δεν προκαλεί κυτταροτοξικές επιδράσεις στο μυελό των οστών. Οι συνήθεις οδοί χορηγήσεως είναι η από στόματος και η ενδοπεριτοναϊκή. Άλλες επίσης οδοί χορηγήσεως μπορεί να είναι κατάλληλες.

1.6.2.4. Χρησιμοποίηση θετικών και αρνητικών μαρτύρων

Μια ουσία, γνωστή ότι προκαλεί in vivo χρωμοσωμικές ανωμαλίες, χρησιμοποιείται σαν θετικός μάρτυρας και ένας αρνητικός με το διαλύτη μάρτυρας περιλαμβάνεται, επίσης, στο σχεδιασμό κάθε πειράματος.

1.6.2.5. Επίπεδα δόσεων

Μια δόση της ελεγχόμενης ουσίας χρησιμοποιείται για το βασικό επίπεδο, η οποία πρέπει να είναι η μέγιστη ανεκτή δόση ή αυτή που δίνει κάποια ένδειξη κυτταροτοξικότητας, δηλαδή μερική ανάσχεση της μιτώσεως.

Όπου για επιστημονικούς λόγους ενδείκνυται, μπορεί να χρησιμοποιηθούν επιπλέον επίπεδα δόσεων.

Εάν η δοκιμασία χρησιμεύει σαν μέθοδος επαληθεύσεως, δύο τουλάχιστον επιπλέον επίπεδα δόσεων πρέπει να χρησιμοποιηθούν.

1.6.3. *Διαδικασία*

Η δοκιμασία μπορεί να εκτελεστεί με δύο τρόπους:

i) τα ζώα δηλητηριάζονται εφάπαξ με την ελεγχόμενη ουσία, στη μέγιστη ανεκτή δόση. Δείγματα λαμβάνονται τρεις φορές μετά τη δηλητηρίαση. Το χρονικό διάστημα της κεντρικής δειγματοληψίας είναι 24 ώρες. Εφόσον η κινητική του κυτταρικού κύκλου μπορεί να επηρεαστεί απο τη χημική δοκιμασία, εφαρμόζονται μία δειγματοληψία ενωρίτερα και μία αργότερα, κατάλληλα κατανεμημένες μέσα στα όρια των 6 έως 48 ωρών.

   Αν χρησιμοποιούνται επιπλέον δόσεις, πρέπει να λαμβάνονται δείγματα στα ιδιαιτέρως ευαίσθητα χρονικά διαστήματα ή, όταν αυτά δεν είναι γνωστά, 24 ώρες μετά τη δηλητηρίαση·

ii) εάν πληροφορίες που αφορούν το μεταβολισμό και την κινητική του φαρμάκου υποδεικνύουν ένα πρόγραμμα επανειλημμένων χορηγήσεων, τότε επανειλημμένες χορηγήσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν και δείγματα πρέπει να λαμβάνονται 6 και 24 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση.

Παρασκευάσματα μυελού οστών

Πριν από τη θανάτωση, χορηγείται στα ζώα ενδοπεριτοναϊκώς κατάλληλη δόση του παρεμποδιστή της μιτωτικής ατράκτου για τη λήψη ικανού αριθμού κυττάρων στην κατάσταση της c-μεταφάσεως. Ο μυελός των οστών λαμβάνεται από τα δύο μηριαία οστά μόλις θανατωθέντων ζώων, με τη βοήθεια ισοτονικού διαλύματος. Μετά από κατάλληλη επεξεργασία με υποτονικό διάλυμα, τα κύτταρα προσηλώνονται και απλώνονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Μετά την ξήρανση, τα παρασκευάσματα χρωματίζονται.

Ανάλυση

Πριν από τη μικροσκοπική ανάλυση, οι αντικειμενοφόροι πλάκες κωδικοποιούνται. Αναλύονται τουλάχιστον 50 καλά παρασκευάσματα μεταφάσεων με τον πλήρη αριθμό κεντρομερών, για τη διαπίστωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Επιπλέον, για κάθε ζώο μπορεί να προσδιορίζονται οι μιτωτικοί δείκτες.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα παρουσιάζονται υπό μορφή πίνακα. Ανωμαλίες τύπου χρωματίδης και ισοχρωματίδης (κενά, θραύσματα, αμοιβαίες μετατοπίσεις) και ο αριθμός των ανωμάλων μεταφάσεων (περιλαμβανομένων και μη των κενών) και οι μιτωτικοί δείκτες, όταν προσδιορίζονται, παρατίθενται χωριστά για όλα τα δηλητηριασμένα και μη ζώα. Παρατίθενται, επίσης, οι μέσοι όροι και οι σταθερές αποκλίσεις για κάθε πειραματική ομάδα και ομάδα μαρτύρων. Τα δεδομένα αξιολογούνται με την κατάλληλη στατιστική μέθοδο.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

3.1. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— είδος και φυλή των χρησιμοποιηθέντων ζώων: ηλικία των ζώων,

— αριθμό ζώων, για κάθε φύλο στις πειραματικές ομάδες και ομάδες μαρτύρων,

— πειραματικές συνθήκες: λεπτομερή περιγραφή της δηλητηριάσεως και του προγράμματος δειγματοληψίας, επίπεδα δόσεων, διάρκεια δηλητηριάσεως και συγκέντρωση του χρησιμοποιημένου παρεμποδιστή της μιτωτικής ατράκτου,

— αριθμό αναλυθεισών μεταφάσεων ανά ζώο,

— μιτωτικούς δείκτες, όταν προσδιορίζονται,

— αριθμό και τύπο ανωμαλιών, χωριστά για κάθε δηλητηριασμένο ή όχι ζώο,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Β. 12. ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ — ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΑ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Η δοκιμασία του μικροπυρήνα είναι μια in vivo δοκιμασία στα θερμόαιμα, μικρής διάρκειας, η οποία γίνεται για την εξακρίβωση χρωμοσωμικών ή μιτωτικών ανωμαλιών, που προκλήθηκαν από χημικές ουσίες. Η δοκιμασία αυτή βασίζεται σε μία αύξηση του αριθμού των μικροπυρήνων στα πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα των δηλητηριασμένων ζώων, σχετικά με το μάρτυρα.

Οι μικροί πυρήνες σχηματίζονται από κλάσματα ή από ολόκληρα χρωμοσώματα που μειώνονται κατά τη μίτωση. Όταν οι ερυθροβλάστες αναπτύσσονται, ο κύριος πυρήνας εξωθείται, ενώ ο μικροπυρήνας μπορεί να παραμείνει στο κυτταρόπλασμα. Νεαρά πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα του μυελού των οστών των πειραματοζώων, που έχουν εκτεθεί στην ελεγχόμενη ουσία με κατάλληλη μέθοδο, χρησιμοποιούνται σ' αυτή τη δοκιμασία. Ο μυελός των οστών εξάγεται, γίνεται επίχρισμα σε αντικειμενοφόρους πλάκες που χρωματίζονται. Τα πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα εξετάζονται ως προς τα μικροπύρηνα με μικροσκόπιο και γίνεται ο υπολογισμός του λόγου πολυχρωματικών προς τα ορθοχρωματικά ερυθροκύτταρα.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προετοιμασίες*

Οι ελεγχόμενες ουσίες διαλύονται σε ισοτονικό διάλυμα. Εφόσον δεν διαλύονται σ' αυτόν, διαλύονται ή γίνονται αιωρήματα σε κατάλληλους φορείς. Εάν χρησιμοποιηθεί φορέας, αυτός δεν πρέπει να επηρεάζει τις ελεγχόμενες ουσίες ή να προκαλεί τοξικότητα. Συνήθως, χρησιμοποιούνται διαλύματα της ελεγχόμενης ουσίας πρόσφατα παρασκευασμένα.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Συνιστώνται οι μύες, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν κι άλλα ζώα. Λαμβάνονται με τυχαιοποίηση νεαρά υγιή ενήλικα ζώα και κατανέμονται στις ομάδες δηλητηριάσεως και του μάρτυρα.

1.6.2.2. Αριθμός και Φύλο

Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε (5) θηλυκά και πέντε (5) αρσενικά ζώα κατά πειραματική ομάδα και μάρτυρα.

Έτσι, 10 ζώα θα θανατωθούν ανά χρονική περίοδο και ομάδα, εάν έχουν προγραμματιστεί διαφορετικές χρονικές περίοδοι μετά τη χορήγηση.

1.6.2.3. Οδός χορηγήσεως

Γενικά οι ελεγχόμενες ουσίες πρέπει να χορηγούνται μόνον εφάπαξ. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και επανειλημμένες χορηγήσεις, εφόσον υπάρχουν τοξικολογικές πληροφορίες. Όμως, ο προγραμματισμός επανειλημμένων χορηγήσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνον όταν η ελεγχόμενη ουσία δεν προκαλεί κυτταροτοξικές επιδράσεις στο μυελό των οστών. Οι συνηθισμένες οδοί χορηγήσεως είναι από στόματος και ενδοπεριτοναϊκή. Και άλλες οδοί χορηγήσεως μπορεί να είναι κατάλληλες.

1.6.2.4. Χρησιμοποίηση θετικών και αρνητικών μαρτύρων

Σε κάθε πείραμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν θετικοί και αρνητικοί (διάλυμα) μάρτυρες.

1.6.2.5. Επίπεδα δόσεων

Για τη βασική σειρά, χρησιμοποιείται μία δόση της ελεγχόμενης ουσίας, σαν η μέγιστη ανεκτή δόση ή η δόση που προκαλεί ενδείξεις κυτταροτοξικότητας, π.χ. μία αλλαγή του λόγου των πολυχρωματικών ερυθροκυττάρων προς τα ορθοχρωματικά.

Όταν για επιστημονικούς λόγους ενδείκνυται, μπορεί να χρησιμοποιηθούν και επιπλέον επίπεδα δόσεων.

Εάν η δοκιμασία χρησιμεύει σαν μέθοδος επαληθεύσεως, δύο τουλάχιστον επιπλέον επίπεδα δόσεων πρέπει να χρησιμοποιηθούν.

1.6.3. *Διαδικασία*

Το πείραμα μπορεί να εκτελεστεί κατά δύο τρόπους:

i) τα ζώα δηλητηριάζονται με μία εφάπαξ δόση της ελεγχόμενης ουσίας, με την υψηλότερη ανεκτή δόση. Οι χρόνοι δειγματοληψίας πρέπει να συμπίπτουν με τη μέγιστη ανταπόκριση της δοκιμασίας, η οποία ποικίλλει με την ελεγχόμενη ουσία. Γι' αυτό, χρησιμοποιώντας την υψηλότερη δόση, τα δείγματα λαμβάνονται τρεις τουλάχιστον φορές. Η πρώτη δειγματοληψία δεν πρέπει να γίνεται ενωρίτερα από 12 ώρες μετά τη χορήγηση, και τα χρονικά διαστήματα των ακόλουθων δειγματοληψιών δεν πρέπει να υπερβαίνουν τις 72 ώρες.

   Όταν χρησιμοποιούνται επιπλέον επίπεδα δόσεων, τα δείγματα πρέπει να λαμβάνονται στην περίοδο της μέγιστης ευαισθησίας, ή, αν αυτή είναι γνωστή, 24 ώρες μετά τη χορήγηση·

ii) αν από πληροφορίες φαρμακοκινητικής και μεταβολισμού ενδείκνυται ο προγραμματισμός επανειλημμένων χορηγήσεων, μπορεί να χρησιμοποιηθούν επανειλημμένες χορηγήσεις και τα δείγματα πρέπει να λαμβάνονται, τουλάχιστον, τρεις φορές. Η πρώτη δειγματοληψία πρέπει να γίνεται όχι ενωρίτερα από 12 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση και οι υπόλοιπες δειγματοληψίες σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα, πάντως όχι περισσότερο από 72 ώρες.

Παρασκευάσματα μυελού οστών:

Ο μυελός οστών λαμβάνεται και από τα δύο οστά του μηρού, λίγο μετά τη θανάτωση των ζώων, με ορό εμβρύου βοός. Με φυγοκέντρηση τα κύτταρα καθιζάνουν και το υγρό που επιπλέει απορρίπτεται. Σταγόνες από το ομογενές αιώρημα των κυτταρων τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και απλώνονται σαν επίχρισμα. Μετά από ξήρανση στον αέρα, οι αντικειμενοφόροι πλάκες χρωματίζονται.

Ανάλυση

Οι αντικειμενοφόροι κωδικοποιούνται πριν υποστούν τη μικροσκοπική ανάλυση. Για τη διαπίστωση της συχνότητας των μικροπυρήνων, εξετάζονται τουλάχιστον 1 000 πολυχρωματικά ερυθροκύτταρα ανά ζώο.

Ο λόγος ορθοχρωματικών ερυθροκυττάρων προς τα πολυχρωματικά προσδιορίζεται, για κάθε ζώο, μετρώντας συνολικά 1 000 ερυθροκύτταρα.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα. Μετριέται ο αριθμός των πολυχρωματικών ερυθροκυττάρων, ο αριθμός των πολυχρωματικών ερυθροκυττάρων με μικροπύρηνα και καταγράφονται σε χωριστές καταστάσεις, για κάθε πειραματική ομάδα και το μάρτυρα, το επί τοις εκατό των κυττάρων με τα μικροπύρηνα και ο λόγος των ορθοχρωματικών ερυθροκυττάρων προς τα πολυχρωματικά. Καταγράφονται, επίσης, οι μέσοι όροι και οι σταθερές αποκλίσεις για κάθε πειραματική ομάδα και το μάρτυρα. Τα δεδομένα αυτά αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

3.1. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— είδος, φυλή και ηλικία χρησιμοποιούμενων ζώων,

— αριθμό ζώων κατά φύλο για κάθε πειραματική ομάδα και το μάρτυρα,

— πειραματικές συνθήκες: λεπτομερή περιγραφή χορηγήσεως και προγράμματος δειγματοληψίας, επίπεδα δόσεων, δεδομένα τοξικότητας, αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες,

— κριτήρια για βαθμολόγηση μικροπυρήνων,

— σχέση δόσεων και επιδράσεων, εφόσον είναι δυνατόν,

— στατιστική αξιολόγηση,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Β. 13. ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ — ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ

ESCHERICHIA COLI — ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΠΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Το σύστημα επαναφοράς της *Escherichia coli* τρυπτοφάνης (trp) είναι μια μικροβιακή δοκιμασία, η οποία μετράει την επαναφορά $trp^- \rightarrow trp^+$ με χημικές ουσίες που προκαλούν βασικές μεταβολές στο γένωμα του οργανισμού.

Τα βακτήρια εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία με ή χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Μετά από επαρκή περίοδο επωάσεως σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό, οι αποικίες των επαναφορών μετρούνται και συγκρίνονται με εκείνες των αυθόρμητων επαναφορών σε μια αποικία χωρίς ελεγχόμενη ουσία ή/και σε μια αποικία μάρτυρα με διαλύτη.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου

Οι ακόλουθες μέθοδοι μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας: 1) η προεπωαστική μέθοδος, και 2) η μέθοδος της απευθείας ενσωματώσεως, κατά την οποία βακτήρια και ελεγχόμενη ουσία μείγνυνται με το υπερκείμενο άγαρ και χύνονται στην επιφάνεια ενός δίσκου με εκλεκτικό άγαρ.

1.6.1. *Προετοιμασία*

1.6.1.1. Βακτήρια

Τα βακτήρια αναπτύσσονται στους 37 °C μέχρι το πέρας της λογαριθμικής φάσεως, ή την αρχή της φάσεως στάσεως της αναπτύξεως. Η κατά προσέγγιση πυκνότητα των κυττάρων πρέπει να ειναι $10^8 - 10^9$ κύτταρα ανά ml.

1.6.1.2. Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα βακτήρια πρέπει να εκθέτονται στην ελεγχόμενη ουσία με την παρουσία και την απουσία κατάλληλου μείγματος ενεργοποιήσεως των ενζύμων του ήπατος θηλαστικών (ένας συνεργός παράγων συμπληρωμένος με το μετα-μιτοχονδριακό κλάσμα), παρασκευασμένου από μύες ή επίμυες, στους οποίους έχουν χορηγηθεί προηγουμένως παράγοντες διεγέρσεως των ενζύμων.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1. Δοκιμαζόμενες φυλές

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις φυλές, οι WP2, WP2 uvr A και WP2 uvr A pKM 101. Πρέπει, επίσης, να χρησιμοποιούνται αναγνωρισμένες μέθοδοι για την παρασκευή των αποθεματικών καλλιεργειών και τη συντήρησή τους. Πρέπει να ελέγχονται οι απαιτήσεις αναπτύξεως και η γενετική ταυτότητα των φυλών, η ευαισθησία τους στις υπεριώδεις ακτίνες ή τη μιτομυκίνη C και η αντίσταση στην αμπικιλλίνη της φυλής WP2 uvr A pKM 101. Οι φυλές πρέπει, επίσης, να παράγουν αυθόρμητες επαναφορές μέσα στα αναμενόμενα όρια συχνότητας.

1.6.2.2. Θρεπτικά υποστρώματα

Για την ανάπτυξη και επιλογή των μεταλλακτών χρησιμοποιείται το κατάλληλο θρεπτικό υλικό με το απαραίτητο υπερκείμενο άγαρ.

1.6.2.3. Χρησιμοποίηση αρνητικών και θετικών μαρτύρων

Πρέπει να εκτελούνται μάρτυρες χωρίς ελεγχόμενη ουσία και μάρτυρες του διαλύτη. Οι θετικοί μάρτυρες πρέπει, επίσης, να δοκιμάζονται για δύο λόγους:

i) Την επιβεβαίωση της ευαισθησίας των βακτηριακών φυλών.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν το σουλφονικό μεθυλομεθάνιο, το οξείδιο της 4-νιτροκινολίνης ή η αιθυλονιτρωδοουρία σαν θετικοί μάρτυρες για τις δοκιμές χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση.

ii) Την εξασφάλιση της δραστηκότητας των κατάλληλων μεταβολικών συστημάτων.

Το 2-αμινοανθρακένιο είναι ένας θετικός μάρτυρας για τη δραστηριότητα ενός μεταβολικού συστήματος για όλες τις φυλές. Ένας θετικός μάρτυρας της ίδιας χημικής τάξεως, όπως και η ελεγχόμενη ουσία, πρέπει να χρησιμοποιηθεί, εφόσον είναι διαθέσιμος.

1.6.2.4. Ποσότητα της ελεγχόμενης ουσίας ανά δίσκο

Δοκιμάζονται 5 τουλάχιστον διαφορετικές ποσότητες της ελεγχόμενης ουσίας, με ημιλογαριθμικά διαστήματα μεταξύ των δίσκων. Οι ποσότητες των ουσιών δοκιμάζονται έως τα όρια της διαλυτότητας ή της τοξικότητας. Η τοξικότητα εμφανίζεται με τη μείωση του αριθμού των αυθόρμητων επαναφορών, τη διαύγαση του υποκείμενου στρώματος ή το βαθμό επιβίωσης των δηλητηριασμένων καλλιεργειών. Οι μη τοξικές χημικές ουσίες, πριν χαρακτηρισθούν ως αρνητικές, πρέπει να δοκιμαστούν σε ποσότητα 5 mg ανά δίσκο.

1.6.2.5. Συνθήκες επωάσεως

Οι δίσκοι επωάζονται για 48 έως 72 ώρες στους 37 °C.

1.6.3. *Διαδικασία*

Για τη μέθοδο της απευθείας ενσωματώσεως στο δίσκο χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, η χημική ουσία και 0,1 ml μιάς πρόσφατης βακτηριακής καλλιέργειας προστίθενται σε 2,0 ml υπερκείμενου άγαρ. Για δοκιμασίες με μεταβολική ενεργοποίηση, 0,5 ml μείγματος μεταβολικής ενεργοποιήσεως των ενζύμων του ήπατος, που περιέχει μια επαρκή ποσότητα μεταμιτοχονδριακού κλάσματος, προστίθενται στο υπερκείμενο άγαρ, μετά την προσθήκη της χημικής ουσίας και των βακτηρίων. Τα περιεχόμενα κάθε δοκιμαστικού σωλήνα μείγνυνται και απλώνονται πάνω σ' ένα δίσκο με εκλεκτικό άγαρ. Το υπερκείμενο άγαρ αφήνεται να στερεοποιηθεί και οι δίσκοι επωάζονται για 48 έως 72 ώρες σε 37 °C. Στο τέλος της επωαστικής περιόδου, μετρούνται οι αποικίες επαναφορών ανά δίσκο.

Για την προεπωαστική μέθοδο, ένα μείγμα από την ελεγχόμενη ουσία, 0,1 ml μιας πρόσφατης βακτηριακής καλλιέργειας, και μια επαρκής ποσότητα από το μείγμα της ενεργοποιήσεως των ενζύμων του ήπατος, ή η ίδια ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος, προεπωάζονται πριν προστεθούν τα 2,0 ml του υπερκείμενου άγαρ. Όλες οι άλλες διαδικασίες είναι οι ίδιες όπως και στη μέθοδο ενσωματώσεως.

Όλοι οι δίσκοι και για τις δύο μεθόδους παρασκευάζονται τουλάχιστον τριπλοί.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Ο αριθμός των αποικιών επαναφοράς ανά δίσκο καταγράφεται για τους μάρτυρες και τους δίσκους με την ελεγχόμενη ουσία. Μετρήσεις για κάθε δίσκο χωριστά, ο μέσος όρος των αποικιών επαναφοράς ανά δίσκο και οι σταθερές αποκλίσεις πρέπει να παρουσιάζονται για τους δίσκους με ελεγχόμενη και μη ουσία. Όλα τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται σ' ένα ανεξάρτητο πείραμα. Τα δεδομένα πρέπει να αξιολογούνται με τις κατάλληλες στατιστικές μεθόδους.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

3.1. Έκθεση ελέγχου

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— βακτήρια, χρησιμοποιηθείσες φυλές,

— πειραματικές συνθήκες: επίπεδα δόσεων, τοξικότητα, σύνθεση του θρεπτικού υλικού, διαδικασίες (προεπωαστική — επωαστική), μίγμα ενεργοποιήσεως των ηπατικών ενζύμων, ουσίες αναφοράς — αρνητικούς μάρτυρες,

— μετρήσεις ανά δίσκο — το μέσο όρο των επαναφορών ανά δίσκο — σταθερή απόκλιση — και όταν είναι δυνατόν τη σχέση δόσεως/αποτελέσματος,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

Β. 14. ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ — ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ

SALMONELLA TYPHIMURIUM — ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΠΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Α).

1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Β).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Το σύστημα επαναφοράς της Salmonella typhimurium histidine (his) είναι μια μικροβιακή δοκιμασία, η οποία μετράει την επαναφορά της $his^- \rightarrow his^+$ με χημικές ουσίες που προκαλούν βασικές αντικαταστάσεις ή μεταλλαγές στο γένωμα του οργανισμού αυτού.

Το σύστημα επαναφοράς της Salmonella typhimurium histidine (his) είναι μια μικροβιακή δοκιμασία, η οποία μετράει την επαναφορά της $his^- \rightarrow his^+$ με χημικές ουσίες που προκαλούν βασικές αντικαταστάσεις ή μεταλλαγές στο γένωμα του οργανισμού αυτού.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Προετοιμασίες*

1.6.1.1. Βακτήρια

Πρόσφατες βακτηριακές καλλιέργειες αναπτύσσονται στους 37 °C μέχρι το πέρας της λογαριθμικής φάσεως της αναπτύξεώς τους ή την αρχή της φάσεως στάσεως της αναπτύξεως τους. Η κατά προσέγγιση πυκνότητα των κυττάρων πρέπει να είναι 10^{-8} — 10^{-9} κύτταρα ανά ml.

1.6.1.2. Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα βακτήρια πρέπει να εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία αφενός μαζί με ένα κατάλληλο μείγμα ενεργοποιήσεως των ενζύμων του ήπατος θηλαστικών (ένας συνεργός παράγων, συμπληρωμένος με το μετα-μιτοχονδριακό κλάσμα), παρασκευασμένο από μύες ή επίμυες, στους οποίους είχαν χορηγηθεί προηγουμένως παράγοντες διεγέρσεως των ενζύμων.

1.6.2. *Πειραματικές συνθήκες*

1.6.2.1. Δοκιμαζόμενες φυλές

Τέσσερις τουλάχιστον φυλές μπορούν να χρησιμοποιηθούν, οι TA 1535, TA 1537, TA 98 και TA 100. Και άλλες φυλές, όπως η TA 1538 μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν. Πρέπει, επίσης, να χρησιμοποιού-

νται αναγνωρισμένες μέθοδοι παρασκευής των αποθεματικών καλλιεργειών και συντηρήσεώς τους. Πρέπει να ελέγχονται οι απαιτήσεις αναπτύξεως και η γενετική ταυτότητα των φυλών, η ευαισθησία τους στις υπεριώδεις ακτίνες και στο ιώδες της γεντιανής, ως και η αντίστασή τους στην αμπικιλλίνη. Οι φυλές πρέπει, επίσης, να παράγουν επαναφορές μέσα στα αναμενόμενα όρια συχνότητας.

1.6.2.2. Θρεπτικά υποστρώματα

Χρησιμοποιείται ένα κατάλληλο, εκλεκτικό θρεπτικό, υλικό μ' ένα επαρκές στρώμα υπερκείμενου άγαρ.

1.6.2.3. Χρησιμοποίηση θετικών και αρνητικών μαρτύρων

Πρέπει οι συμφωνούντες μάρτυρες χωρίς ελεγχόμενη ουσία και οι μάρτυρες διαλύτη να δοκιμάζονται. Επίσης, πρέπει να γίνονται δοκιμές στους θετικούς μάρτυρες για δύο σκοπούς:

i) την επιβεβαίωση της ευαισθησίας των βακτηριακών φυλών. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ακόλουθες ουσίες για τις δοκιμασίες χωρίς μεταβολικές ενεργοποιήσεις:

Φυλές	*Επαναφορές με:*
TA 1535, TA 100,	Νατραζίδιο,
TA 1538, TA 98,	2-νιτροφλουορένιο
TA 1537,	9-αμινοακριδίνη

ii) την εξασφάλιση της δραστικότητας του κατάλληλου μεταβολικού συστήματος.

Το 2-αμινοανθρακένιο είναι ένας θετικός μάρτυρας για τη δραστικότητα ενός μεταβολικού συστήματος για όλες τις φυλές. Ένας θετικός μάρτυρας της ίδιας χημικής τάξεως όπως η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να χρησιμοποιηθεί, εφόσον είναι διαθέσιμος.

1.6.2.4. Ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας ανά δίσκο

Δοκιμάζονται 5 τουλάχιστον διαφορετικές ποσότητες της ελεγχόμενης ουσίας σε ημιλογαριθμικά διαστήματα μεταξύ των δίσκων. Οι ουσίες δοκιμάζονται σε ποσότητες που φθάνουν στα όρια διαλυτότητας ή τοξικότητας. Η τοξικότητα εμφανίζεται με τη μείωση του αριθμού των αυθόρμητων επαναφορών, τη διαύγαση του υποκείμενου στρώματος ή το βαθμό επιβιώσεως των δηλητηριασμένων καλλιεργειών. Οι μη τοξικές χημικές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται σε ποσότητες 5 mg ανά δίσκο, προτού χαρακτηριστούν σαν αρνητικές.

1.6.2.5. Συνθήκες επωάσεως

Οι δίσκοι επωάζονται στους 37 °C για 48 έως 72 ώρες.

1.6.3. *Διαδικασία*

Για τη μέθοδο της απευθείας ενσωματώσεως στους δίσκους χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, προστίθεται 0,1 ml πρόσφατης βακτηριακής καλλιέργειας σε 2,0 ml υπερκείμενου άγαρ. Για δοκιμασίες με μεταβολική ενεργοποίηση, 0,5 ml μείγματος ενεργοποιήσεως ηπατικών ενζύμων που περιέχει επαρκή ποσότητα μεταμιτοχονδριακού κλάσματος προστίθεται στο υπερκείμενο άγαρ, μετά από προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας και των βακτηρίων. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα ανακατεύεται και απλώνεται στην επιφάνεια ενός δίσκου με άγαρ εκλεκτικό. Μετά τη στερεοποίηση του υπερκείμενου άγαρ, οι δίσκοι επωάζονται στους 37 °C για 48 έως 72 ώρες. Στο τέλος της περιόδου επωάσεως, μετρούνται οι αποικίες επαναφοράς ανά δίσκο. Για τη μέθοδο προεπωάσεως, πριν απο την προσθήκη 2,0 ml υπερκείμενου άγαρ, προεπωάζεται μείγμα της ελεγχόμενης ουσίας, 0,1 ml πρόσφατης βακτηριακής καλλιέργειας και κατάλληλης ποσότητας μείγματος ενεργοποιήσεως ηπατικών ενζύμων ή ίδιας ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος. Όλες οι άλλες διαδικασίες είναι οι ίδιες όπως και για τη μέθοδο της απεύθειας ενσωματώσεως στους δίσκους.

Και για τις δύο μεθόδους χρησιμοποιούνται τρεις δίσκοι-επαναλήψεις.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Αναφέρεται ο αριθμός των αποικιών επαναφοράς για το μάρτυρα και τις πειραματικές σειρές.

Πρέπει να αναφέρονται οι μετρήσεις για κάθε δίσκο, ο μέσος όρος των αποικιών επαναφοράς ανά δίσκο και η σταθερή απόκλιση, για την ελεγχόμενη ουσία και τους μάρτυρες.

Όλα τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται μ' ένα ανεξάρτητο πείραμα.

Η αξιολόγηση των δεδομένων πρέπει να γίνεται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

3.1. **Έκθεση ελέγχου**

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— βακτήρια, χρησιμοποιηθείσες φυλές,

— συνθήκες δοκιμών: επίπεδα δόσεων, τοξικότητα, σύνθεση του θρεπτικού υλικού, τρόπους επεμβάσεως (προεπώαση — επώαση, μείγμα ενεργοποιήσεως ηπατικού ενζύμου, ουσίες αναφοράς, αρνητικούς μάρτυρες,

— μετρήσεις για κάθε δίσκο — ο μέσος αριθμός των αποικιών επαναφοράς ανά δίσκο — σταθερή απόκλιση — σχέση δόσεως και επιδράσεως, εφόσον είναι δυνατόν,

— συζήτηση των αποτελεσμάτων,

— ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Γ).

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β (σημείο Δ).

ΜΕΡΟΣ Γ: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Γ. 1. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΨΑΡΙΑ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Για την εκλογή της πιο κατάλληλης μεθόδου (στατική, ημιστατική ή συνεχούς ροής), που θα εξασφαλίσει ικανοποιητικές σταθερές συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας κατά τη διάρκεια του ελέγχου, είναι επιθυμητή η ύπαρξη όσο το δυνατόν περισσότερων πληροφοριών για τη διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας στο νερό, την τάση ατμών, τη χημική σταθερότητα, τη σταθερά διαστάσεως και τη βιοδιασπασιμότητά της.

Άλλες απαιτούμενες πληροφορίες, π.χ. συντακτικός τύπος, βαθμός καθαρότητας, φύση και περιεκτικότητα σημαντικών ξένων προσμείξεων, παρουσία και ποσότητα προσθέτων και συντελεστής κατανομής σε n-οκτανόλη/νερό, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και στην προετοιμασία του ελέγχου και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Οξεία τοξικότητα είναι το εμφανές, δυσμενές αποτέλεσμα που προκαλείται σε έναν οργανισμό μέσα σε μικρό διάστημα (ημέρες) εκθέσεώς του σε μία ουσία. Σ' αυτόν τον έλεγχο, η οξεία τοξικότητα εκφράζεται ως η μέση θανατηφόρα συγκέντρωση (LC_{50}), που είναι η συγκέντρωση σε νερό, η οποία σκοτώνει 50 % από την ομάδα ψαριών του πειράματος, μέσα σε μία συνεχή περίοδο εκθέσεως η οποία πρέπει να δηλώνεται.

Όλες οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας δίνονται σε βάρος κατ' όγκο (mg/l), καθώς επίσης εκφράζονται και σε βάρος κατά βάρος (ppm = μέρη στο εκατομμύριο).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Μία ουσία αναφοράς μπορεί να ελέγχεται για να αποδείξει ότι, κάτω από τις εργαστηριακές συνθήκες ελέγχου, η ανταπόκριση των ειδών ελέγχου δεν έχει αλλάξει σημαντικά.

Για τον έλεγχο αυτό δεν καθορίζονται ουσίες αναφοράς.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Τα ψάρια εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία που έχει προστεθεί στο νερό σε μία περιοχή συγκεντρώσεων για μια ελάχιστη περίοδο 48 ωρών, και κατά προτίμηση για 96 ώρες. Σημειώνονται οι θάνατοι σε διαστήματα τουλάχιστον 24 ωρών και υπολογίζονται, όπου είναι δυνατό, οι συγκεντρώσεις που σκοτώνουν 50 % των ψαριών (LC_{50}) σε κάθε παρατήρηση.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Η θνησιμότητα στους ελέγχους δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % στο τέλος του ελέγχου.

Η συγκέντρωση οξυγόνου, κατά τη διάρκεια του ελέγχου, πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα.

Πρέπει να υπάρχει απόδειξη, είτε από την ανάλυση είτε από τις χημικές ιδιότητες του συστήματος ελέγχου που χρησιμοποιήθηκε, ότι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας διατηρήθηκε ικανοποιητικά σταθερή (π.χ. γύρω στο 80 % της αρχικής συγκεντρώσεως καθ' όλη την περίοδο του ελέγχου).

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

Τρεις τύποι μεθόδων μπορεί να χρησιμοποιηθούν:

Στατικός έλεγχος: έλεγχος τοξικότητας με υδρόβιους οργανισμούς στον οποίο δεν γίνεται ροή του διαλύματος ελέγχου. (Τα διαλύματα παραμένουν χωρίς να αλλάξουν καθ' όλη τη διάρκεια του ελέγχου).

Ημιστατικός έλεγχος: έλεγχος χωρίς ροή του διαλύματος, στον οποίο όμως κατά τακτά διαστήματα γίνεται ομαδικά αλλαγή των διαλυμάτων της ελεγχόμενης ουσίας μετά από παρατεταμένες περιόδους (π.χ. 24 ώρες).

Έλεγχος συνεχούς ροής: έλεγχος τοξικότητας στον οποίο το νερό στους θαλάμους ελέγχου ανανεώνεται σταθερά, ενώ η ελεγχόμενη χημική ουσία μεταφέρεται με το νερό που χρησιμοποιείται για την ανανέωση του περιβάλλοντος του ελέγχου.

1.6.1. *Αντιδραστήρια*

1.6.1.1. Διαλύματα των ελεγχόμενων ουσιών

Τα αρχικά διαλύματα της απαιτουμένης συγκεντρώσεως παρασκευάζονται με διάλυση της ουσίας σε απιονισμένο νερό ή νερό σύμφωνα με την περιγραφή του σημείου 1.6.1.2.

Τα αρχικά διαλύματα των χημικών ουσιών που έχουν χαμηλή υδατική διαλυτότητα παρασκευάζονται με διασπορά με συσκευή υπερήχων ή, αν είναι αναγκαίο, με χρήση οργανικών διαλυτών, γαλακτωματοποιητών ή παραγόντων διασποράς. Όταν χρησιμοποιούνται τέτοιες βοηθητικές ουσίες, τα υπό έλεγχο ψάρια πρέπει να εκτεθούν σε συγκεντρώσεις της βοηθητικής ουσίας ίδιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Οι συγκεντρώσεις τέτοιων βοηθητικών δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 0,1 g/l.

Οι συγκεντρώσεις που έχουν επιλεγεί για τον έλεγχο παρασκευάζονται με αραίωση του αρχικού διαλύματος. Αν χρησιμοποιηθούν μεγάλες συγκεντρώσεις για τον έλεγχο, η ουσία μπορεί να διαλυθεί κατευθείαν στο νερό αραιώσεως.

Ο έλεγχος πρέπει να γίνει χωρίς ρύθμιση του pH. Αν υπάρχει ένδειξη αξιοσημείωτης αλλαγής του pH, είναι καλύτερα ο έλεγχος να επαναληφθεί με ρύθμιση του pH και τα αποτελέσματα να συμπεριληφθούν στην έκθεση. Σ' αυτή την περίπτωση, το pH του αρχικού διαλύματος πρέπει να γίνει όσο το pH του νερού αραιώσεως, εκτός αν υπάρχουν ειδικοί λόγοι που κάτι τέτοιο δεν επιτρέπεται. Γι' αυτό το σκοπό συνιστάται HCl και NaOH. Η ρύθμιση του pH πρέπει να γίνει έτσι που να μην αλλάξει σημαντικά τη συγκέντωση της ελεγχόμενης ουσίας στο αρχικό διάλυμα. Εάν από τη ρύθμιση του pH προκληθεί κάποια χημική αντίδραση ή φυσική καθίζηση της ελεγχόμενης ουσίας, αυτό πρέπει να αναφερθεί.

1.6.1.2. Νερό συντηρήσεως ψαριών και αραιώσεως

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί πόσιμο νερό δικτύου υδρεύσεως (ελεύθερο από επικίνδυνες συγκεντρώσεις χλωρίου, βαρέων μετάλλων, ή άλλων ουσιών), φυσικό νερό καλής ποιότητας, ή νερό από ανασύσταση (βλέπε προσάρτημα 1).

Προτιμώνται νερά με ολική σκληρότητα μεταξύ 50 και 250 mg/l (ως $CaCO_3$) και με pH 6,0 – 8,5.

1.6.2. *Συσκευή*

Όλες οι συσκευές πρέπει να είναι φτιαγμένες από χημικώς αδρανές υλικό:

— αυτόματο σύστημα άραιώσεως (για τον έλαγχο συνεχούς ροής),

— μετρητή οξυγόνου,

— συσκευή προσδιορισμού της σκληρότητας του νερού,

— αρκετά όργανα για τον έλεγχο της θερμοκρασίας,

— πεχάμετρο.

1.6.3. *Ψάρια ελέγχου*

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ένα ή περισσότερα είδη που η επιλογή τους αφήνεται στην προαίρεση του εργαστηρίου ελέγχου.

Συνιστάται η επιλογή των ειδών να βασιστεί σε σημαντικά πρακτικά κριτήρια όπως είναι η εύκολη ανεύρεσή τους καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, η εύκολη συντήρησή τους, η καταλληλότητά τους για τον έλεγχο, η σχετική τους ευαισθησία και οποιοσδήποτε οικονομικός, βιολογικός ή οικολογικός παράγοντας που έχει σχέση. Τα ψάρια πρέπει να έχουν καλή υγεία και να είναι απαλλαγμένα από κάθε φανερή δυσμορφία.

Είδη ψαριών που συνιστώνται για τον έλεγχο δίνονται στο προσάρτημα 2.

1.6.3.1. Συντήρηση ψαριών

Τα ψάρια ελέγχου προέρχονται, κατά προτίμηση, από μία ποσότητα με παρόμοιο μάκρος και ηλικία. Τα ψάρια πρέπει να κρατηθούν για 12 ημέρες τουλάχιστον στις παρακάτω συνθήκες:

Δεξαμενές:

Συνιστώνται δεξαμενές 300 λίτρων τουλάχιστον για ψάρια κρύου νερού, και 100 λίτρων τουλάχιστον για ψάρια ζεστού νερού.

Φορτίο:

Ανάλογο με το σύστημα (ανακυκλοφορία ή συνεχής ροή) και το είδος των ψαριών.

Νερό:

Βλέπε σημείο 1.6.1.2.

Φως:

Περίοδος φωτισμού 12 έως 16 ώρες ημερησίως.

Συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου:

80 % τουλάχιστον της τιμής κορεσμού με αέρα.

Διατροφή:

Τρεις φορές την εβδομάδα ή καθημερινά και σταματά 24 ώρες πριν αρχίσει ο έλεγχος.

1.6.3.2. Θνησιμότητα

Μετά από περίοδο εγκαταστάσεως 48 ωρών, καταγράφονται οι θάνατοι και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

— για θνησιμότητα μεγαλύτερη του 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: απορρίπτεται όλη η ομάδα·

— για θνησιμότητα 5 έως 10 % του πληθυσμού: η περίοδος συντηρήσεως συνεχίζεται για επτά ακόμη ημέρες. Αν δεν παρατηρηθούν άλλοι θάνατοι, η ομάδα ψαριών εγκρίνεται, αλλιώς πρέπει να απορριφθεί·

— για θνησιμότητα μικρότερη του 5 % του πληθυσμού: η ομάδα ψαριών εκγρίνεται.

1.6.4. *Προσαρμογή*

Όλα τα ψάρια πρέπει να εκτεθούν σε νερό της ποιότητας και θερμοκρασίας που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στον έλεγχο για επτά τουλάχιστον ημέρες πριν να χρησιμοποιηθούν.

1.6.5. *Διαδικασία ελέγχου*

Ένας προκαταρκτικός έλεγχος μπορεί να προηγηθεί από τον τελικό. Παρέχει πληροφορίες για τη σειρά των συγκεντώσεων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στον κυρίως έλεγχο.

Ένας παράλληλος έλεγχος, χωρίς την ελεγχόμενη ουσία, γίνεται χρησιμοποιώντας τη βοηθητική ουσία αν υπάρχει, συμπληρωματικά με τη βασική σειρά ελέγχου.

Οι συγκεντρώσεις δεν πρέπει να πέφτουν περισσότερο από 20 % κατά την περίοδο του ελέγχου. Ανάλογα με τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας μπορεί να επιλεγεί σαν πλέον κατάλληλος ένας στατικός, ημιστατικός ή συνεχούς ροής έλεγχος.

Τα ψάρια εκτίθενται στην ουσία όπως περιγράφεται παρακάτω.

Διάρκεια:

Τουλάχιστον 48 ώρες άλλα προτιμότερο 96 ώρες.

Αριθμός ζώων:

Τουλάχιστον 10 για κάθε συγκέντρωση.

Δεξαμενές:

Κατάλληλης χωρητικότητας σε σχέση με το φορτίο που συνιστάται.

Φορτίο:

Το μέγιστο φορτίο που συνιστάται είναι 1,0 g/l για τον στατικό και ημιστατικό έλεγχο· για συστήματα συνεχούς ροής μπορεί να γίνουν αποδεικτές και υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Συγκεντρώσεις ελέγχου:

Ένας έλεγχος: πέντε τουλάχιστον συγκεντρώσεις που να διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα σταθερό παράγοντα που δεν υπερβαίνει το 1,8 και να καλύπτουν την περιοχή θνησιμότητας από 0 έως 100 %.

Νερό:

Βλέπε σημείο 1.6.1.2.

Φως:

Περίοδος φωτισμού 12 έως 16 ώρες ημερησίως.

Θερμοκρασία:

Κατάλληλη για τα είδη ψαριών (προσάρτημα 2) αλλά με προσέγγιση ± 1 °C για κάθε ιδιαίτερο έλεγχο.

Συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου:

Όχι λιγότερο από 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα στη θερμοκρασία που διαλέχθηκε.

Διατροφή:

Καθόλου.

Τα ψάρια επιθεωρούνται μετά τις πρώτες 2 έως 4 ώρες και σε διαστήματα 24 ωρών τουλάχιστον. Τα ψάρια θεωρούνται νεκρά όταν άγγιγμα του ουραίου μίσχου δεν προκαλεί αντίδραση και δεν είναι ορατές αναπνευστικές κινήσεις. Τα νεκρά ψάρια απομακρύνονται όταν παρατηρηθούν και οι θάνατοι καταγράφονται.

Κρατούνται σημειώσεις των ορατών ανωμαλιών (π.χ. απώλεια ισορροπίας, αλλαγές συμπεριφοράς στην κολύμβηση, αναπνευστική λειτουργία, χρωματισμός κλπ.).

Μετρήσεις του pH, του διαλελυμένου οξυγόνου και της θερμοκρασίας πρέπει να γίνονται καθημερινά.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Σχεδιάζεται το ποσοστό θνησιμότητας για κάθε περίοδο εκθέσεως σαν συνάρτηση της συγκεντρώσεως σε λογαριθμικό χαρτί. Με το μάτι, γίνεται η καλύτερη προσαρμογή γραμμής στα σημεία και βρίσκεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε θνησιμότητα 50 % (βλέπε σχήμα στο προσάρτημα 3).

Αυτή είναι η LC_{50} για την ανάλογη περίοδο εκθέσεως.

Όταν τα δεδομεανα ειναι αρκετά, η μέση συγκέντρωση LC_{50} και τα όρια εμπιστοσύνης ($\rho = 0,05$) μπορεί να εκτιμηθούν με τη χρήση προτύπων διαδικασιών.

Η τιμή LC_{50} πρέπει να στρογγυλευθεί σε ένα (ή το πολύ δύο) σημαντικά ψηφία.

Στις περιπτώσεις που η κλίση της καμπύλης συγκεντρώσεων είναι πολύ μεγάλη για να επιτρέψει τον υπολογισμό της τιμής LC_{50}, μια γραφική εκτίμηση αυτής της τιμής είναι αρκετή.

Όταν δύο συνεχόμενες συγκεντρώσεις με σχέση 1,8 δίνουν μόνο 0 και 100 % θνησιμότητα, οι δύο αυτές τιμές είναι αρκετές να δείξουν την περιοχή μέσα στην οποία πέφτει η LC_{50}.

Αν παρατηρηθεί ότι η σταθερότητα ή η ομοιογένεια της ελεγχόμενης ουσίας δεν μπορεί να διατηρηθεί, αυτό θάπρεπε να αναφερθεί και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων να γίνει με προσοχή.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει:

— πληροφορίες για τους ελεγχόμενους οργανισμούς (επιστημονική ονομασία, είδος, προμηθευτής, οποιαδήποτε προετοιμασία, το μέγεθος και ο αριθμός των ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε συγκέντρωση),

— κατάλογο των συγκεντρώσεν που χρησιμοποιήθηκαν και οποιεσδήποτε διαθέσιμες πληροφορίες για τη σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα διαλύματα ελέγχου,

— περιγραφή των συσκευών ελέγχου,

— αν εκτελέστηκαν χημικές αναλύσεις, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα πρέπει να αναφερθούν,

— προέλευση νερού αραιώσεως και τα κυριότερα χημικά χαρακτηριστικά του (pH, σκληρότητα, θερμοκρασία),

— συγκεντρώσεις των τυχόν βοηθητικών ουσιών,

— στις περιπτώσεις ουσιών με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, τη μέθοδο για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος και του διαλύματος ελέγχου,

— τους λόγους για την επιλογή και τις λεπτομέρειες της διαδικασίας του ελέγχου που χρησιμοποιήθηκε (π.χ. διάρκεια ελέγχου, στατικός, ημιστατικός έλεγχος, συχνότητα χορηγήσεως της ουσίας, ταχύτητα συνεχούς ροής, αν αεριζόταν, φορτίο ψαριών, κλπ.),

— περίοδο φωτισμού ημερησίως,

— υψηλότερες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας που δεν προκαλούν θνησιμότητα μέσα στην περίοδο του ελέγχου,

— χαμηλότερες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας που προκαλούν θνησιμότητα 100 % μέσα στην περίοδο του ελέγχου,

— συσσωρευτική θνησιμότητα σε κάθε συγκέντρωση και στο τυφλό πείραμα (έλεγχο με τις βοηθητικές ουσίες αν χρησιμοποιήθηκαν) στους χρόνους παρατηρήσεως που έχουν υποδειχθεί,

— LC_{50} τιμές στους χρόνους παρατηρήσεως που έχουν υποδειχθεί (με 95 % όριο εμπιστοσύνης αν είναι δυνατό),

— στατιστικές διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των LC_{50} τιμών,

— γραφική παράσταση της καμπύλης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση στο τέλος του ελέγχου,

— κλίση της καμπύλης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις στο τέλος του ελέγχου, αν είναι δυνατόν και τα όρια εμπιστοσύνης της σε ποσοστό 95 %,

— συγκεντρώσεις διαλελυμένου οξυγόνου, τιμές pH, θερμοκρασία του διαλύματος ελέγχου κάθε 24 ώρες,

— αν χρησιμοποιήθηκε ουσία αναφοράς, τα αποτελέσματα που προέκυψαν πρέπει να αναφερθούν,

— ενδείξεις για την εκπλήρωση κριτηρίων ποιότητας.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council, C(81) 30 final.

Προσάρτημα 1

Νερό από ανασύσταση

Παράδειγμα ενός κατάλληλου νερού αραιώσεως

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικού βαθμού. Το νερό πρέπει να είναι καλής ποιότητας απεσταγμένο νερό ή απιονισμένο νερό με αγωγιμότητα μικρότερη από $5 \mu Scm^{-1}$.

Αρχικό διάλυμα

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (δι-ενυδροχλωριούχο ασβέστιο) διαλύονται σε νερό και συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο:	11,76 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (επτα-ενυδρο θειικό μαγνήσιο) ίδια διαδικασία:	4,93 g
$NaHCO_3$ (όξινο ανθρακικό νάτριο) ίδια διαδικασία:	2,59 g
KCl (χλωριούχο κάλιο) ίδια διαδικασία:	0,23 g

Νερό αραιώσεως από ανασύσταση

Ανακατεύονται 25 ml από κάθε ένα από τα τέσσερα αρχικά διαλύματα και συμπληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο.

Αερίζεται μέχρις ότου η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου εξισωθεί με την τιμή κορεσμού με αέρα.

Το pH πρέπει να είναι 7,9 ± 0,3.

Το pH διορθώνεται αν είναι ανάγκη με NaOH (καυστικό νάτριο) ή HCl (υδροχλωρικό οξύ).

Το νερό αραιώσεως που παρασκευάζεται έτσι αφήνεται για 12 ώρες περίπου και δεν χρειάζεται περαιτέρω αερισμό.

Το σύνολο των ιόντων Ca και Mg σ' αυτό το διάλυμα είναι 2,5 mmol/l. Η σχέση των ιόντων Ca : Mg είναι 4 : 1 και του Na : K 10 : 1. Η συνολική αλκαλικότητα του διαλύματος είναι 0,8 mmol/l.

Οποιαδήποτε εκτροπή στην παρασκευή του νερού αραιώσεως δεν πρέπει να αλλάζει τη σύσταση ή τις ιδιότητες του νερού.

Προσάρτημα 2

Είδη ψαριών που συνιστώνται για τον έλεγχο

Είδη που συνιστώνται	Περιοχή θερμοκρασιών ελέγχου που συνιστώνται (°C)	Ολικό μήκος ζώων ελέγχου που συνιστάται (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebra-fish	20 έως 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) Fathead minnow	20 έως 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Common carp	20 έως 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) Red killifish	20 έως 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 έως 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Linnaeus 1758) Bluegill	20 έως 24	5,0 ± 2,0
Salmo gairdneri (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Rainbow trout	13 έως 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Golden orfe	20 έως 24	6,0 ± 2,0

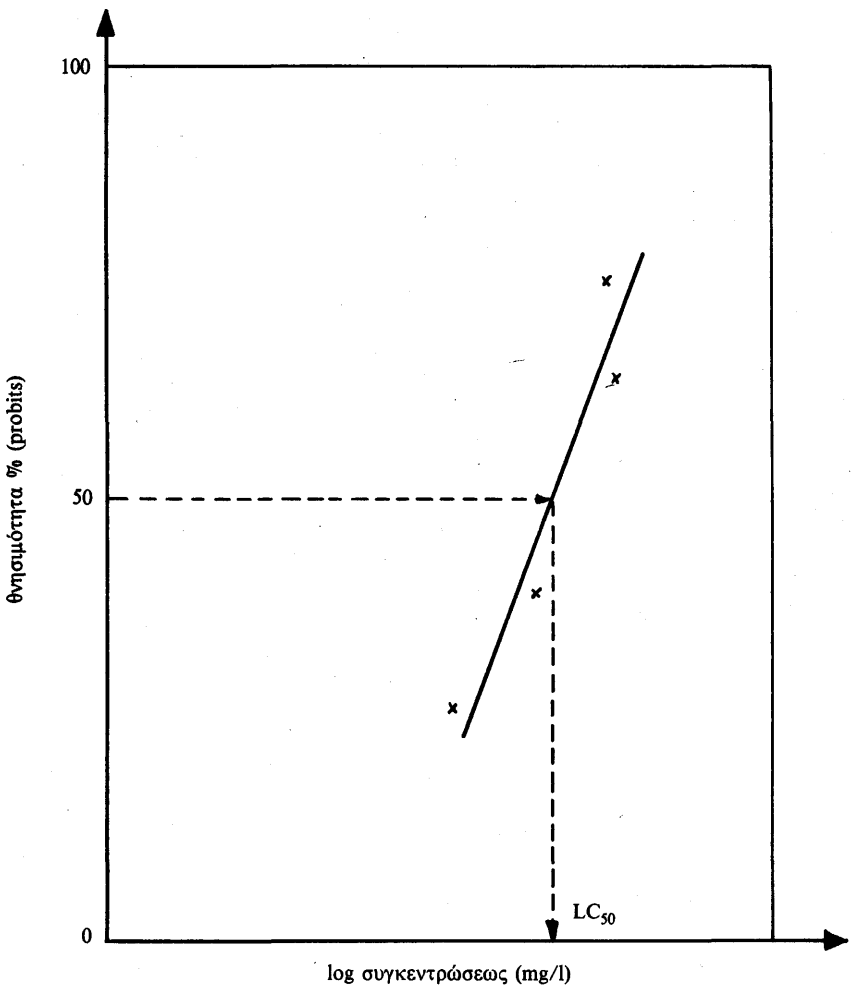
Συλλογή

Τα ψάρια που αναφέρονται παραπάνω εκτρέφονται εύκολα ή/και είναι ευρέως διαθέσιμα κατά τη διάρκεια του έτους. Είναι δυνατό να τραφούν και καλλιεργηθούν είτε σε ιχθυοτροφεία είτε στο εργαστήριο, με συνθήκες ελεγχόμενες για παθήσεις και παράσιτα, έτσι που τα ζώα ελέγχου να είναι υγιή και από γνωστή καταγωγή. Αυτά τα ψάρια είναι διαθέσιμα σε πολλά μέρη του κόσμου.

Προσάρτημα 3

Παράδειγμα καμπύλης συγκεντρώσεως – θνησιμότητας

Παράδειγμα προσδιορισμού της LC_{50} με χρησιμοποίηση χάρτη log-probit



Προσάρτημα 4

Πίνακας παραδειγμάτων πρότυπης διαδικασίας

(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) Eidgenössisches 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 toxicité aigué 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, Volumes I and II, Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands 1980.

(8) Environmental Protection Agency 1975. Methods for the Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates and Amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms. Ecological Research Series EPA-660-75-009.

(9) Environmental Protection Agency. January 1978. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development. EPA-600/4-78-012.

(10) Environmental Protection Agency: Toxic Substance Control, 16 March 1979, Part IV.

(11) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition 1975 APHA-AWWA-WPCF.

(12) Commission of the European Communities. Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish, EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(13) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. Exp. Therap., vol 96, 1949, p. 99.

Γ. 2. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΓΙΑ DAPHNIA

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Η ύπαρξη όσο το δυνατόν περισσοτέρων πληροφοριών για τη διαλυτότητα στο νερό, την τάση ατμών, τη χημική σταθερότητα, τη σταθερά διαστάσεως και τη βιοδιασπασιμότητα της χημικής ουσίας είναι επιθυμητή πριν την έναρξη του ελέγχου.

Συμπληρωματικές πληροφορίες (π.χ. συντακτικός τύπος, βαθμός καθαρότητας, φύση και ποσοστό των σημαντικών ξένων προσμείξεων, παρουσία και ποσότητα προσθέτων, και συντελεστής κατανομής σε n-οκτανόλη/νερό) πρέπει να ληφθούν υπόψη και στο σχεδιασμό του ελέγχου και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Η απαίτηση της οδηγίας για την τιμή LC_{50} για τις Daphnia πληρούται με τον προσδιορισμό της τιμής EC_{50} όπως περιγράφεται σ' αυτό τον έλεγχο.

Ο οξεία τοξικότητα σ' αυτό τον έλεγχο εκφράζεται ως η μέση αποτελεσματική συγκέντρωση (EC_{50}) ή ακινητοποίηση. Αυτή είναι η συγκέντρωση (της αρχικής τιμής) που ακινητοποιεί το 50 % των Daphnia στην ομάδα ελέγχου, σε περίοδο εκθέσεως 24 ωρών. Η EC_{50} για ακινητοποίηση σε 48 ώρες επίσης μπορεί να προσδιοριστεί, αν είναι πρακτικώς δυνατό.

Ακινητοποίηση

Τα ζώα εκείνα που δεν είναι ικανά να κολυμπούν για μια περίοδο ή για 15 δευτερόλεπτα μετά από ελαφρά ανατάραξη του δοχείου ελέγχου θεωρούνται ακινητοποιημένα.

Όλες οι συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας εκφράζονται σε βάρος κατά βάρος (ppm: μέρη στο εκατομμύριο).

1.3. Ουσίες αναφοράς

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία ουσία αναφοράς σαν μέσο αποδείξεως ότι, κάτω από τις εργαστηριακές συνθήκες ελέγχου, η ευαισθησία του ελεγχόμενου είδους δεν άλλαξε σημαντικά.

Για τον έλεγχο αυτό δεν καθορίζονται ουσίες αναφοράς.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Οι *Daphnia* εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία, που προστίθεται στο νερό σε μια σειρά συγκεντρώσεων, για 24 ώρες· αν είναι απαραίτητο, η διάρκεια εκθέσεως μπορεί να επεκταθεί στις 48 ώρες.

Για μια επαρκή σειρά συγκεντρώσεων της ελεγχόμενης ουσίας και κάτω από κατά τα άλλα παρόμοιες συνθήκες ελέγχου, διάφορες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας ασκούν διαφορετικούς μέσους βαθμούς αποτελεσμάτων στην ικανότητα κολυμβήσεως των *Daphnia*. Διαφορετικές συγκεντρώσεις έχουν σαν αποτέλεσμα διαφορετικά ποσοστά των *Daphnia*, που στο τέλος του ελέγχου δεν μπορούν πλέον να κολυμβούν. Οι συγκεντρώσεις που προκαλούν 0 ή 100 % ακινητοποίηση προσδιορίζονται απευθείας από τις παρατηρήσεις, ενώ οι τιμές των EC_{50} για 24 ώρες (όπως και EC_{50} για 48 ώρες) προσδιορίζονται με υπολογισμό, εφόσον είναι δυνατό.

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ένα στατικό σύστημα, όπου τα διαλύματα ελέγχου δεν ανανεώνονται κατά την περίοδο ελέγχου.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Η ακινητοποίηση στους ελέγχους συγκρίσεως δεν πρέπει να υπερβεί το 10 % στο τέλος του ελέγχου.

Η συγκέντρωση οξυγόνου στο τέλος του ελέγχου δεν πρέπει να είναι μικρότερη από 2 mg/l.

Η ομάδα των *Daphnia* ελέγχου δεν πρέπει να παγιδευθεί στην επιφάνεια του νερού και ιδίως εκείνες του ελέγχου συγκρίσεως.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Αντιδραστήρια*

1.6.1.1. Διαλύματα των ελεγχομένων ουσιών

Αρχικά διαλύματα, της απαιτουμένης συγκεντρώσεως, παρασκευάζονται με διάλυση της ουσίας σε απιονισμένο νερό ή νερό σύμφωνα με το σημείο 1.6.1.2.

Αρχικά διαλύματα ουσιών με χαμηλή υδατική διαλυτότητα μπορούν να παρασκευασθούν με διασπορά σε συσκευή υπερήχων ή, αν είναι ανάγκη, με τη χρήση οργανικών διαλυτών, γαλακτωματοποιητών ή παραγόντων διασποράς. Όταν χρησιμοποιούνται τέτοιες βοηθητικές ουσίες, οι Daphnia του ελέγχου συγκρίσεως πρέπει να εκτεθούν στις ίδιες συγκεντρώσεις βοηθητικών ουσιών όπως εκείνες που χρησιμοποιούνται για τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας. Οι συγκεντρώσεις τέτοιων βοηθητικών δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 0,1 g/l.

Οι συγκεντρώσεις ελέγχου που έχουν επιλεγεί παρασκευάζονται με αραίωση του αρχικού διαλύματος. Αν ελέγχονται υψηλές συγκεντρώσεις, η ουσία πρέπει να διαλυθεί απευθείας στο νερό αραιώσεως.

Ο έλεγχος πρέπει να διενεργηθεί χωρίς διόρθωση του pH. Αν υπάρχει απόδειξη σημαντικής μεταβολής του pH, συνιστάται επανάληψη του ελέγχου με διόρθωση του pH και αναφορά των αποτελεσμάτων που θα ληφθούν. Σ' αυτή την περίπτωση, η τιμή pH του αρχικού διαλύματος πρέπει να διορθωθεί στο pH του νερού αραιώσεως, εκτός αν ειδικοί λόγοι δεν το επιτρέπουν. Για το σκοπό αυτό προτιμούνται το HCl και το NaOH. Η διόρθωση αυτή του pH πρέπει να γίνει έτσι, που να μην αλλάξει σημαντικά τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στο αρχικό διάλυμα. Εάν από τη διόρθωση του pH προκληθεί κάποια χημική αντίδραση ή φυσική καθίζηση της ουσίας, ο έλεγχος πρέπει να επαναληφθεί.

1.6.1.2. Νερό συντηρήσεως και αραιώσεως

Σ' αυτό τον έλεγχο μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε νερό κατάλληλο για καλλιέργεια των *Daphnia*, είτε φυσικής προελεύσεως είτε από ανασύσταση (βλέπε προσάρτημα 1). Προς αποφυγή της αναγκαιότητας προσαρμογής πριν από τον έλεγχο, συνιστάται το νερό καλλιέργειας να είναι ίδιο με το νερό του ελέγχου.

1.6.2. *Συσκευή*

Πρέπει να χρησιμοποιηθούν κανονικές εργαστηριακές συσκευές και εξοπλισμός. Ο εξοπλισμός που θα έλθει σε επαφή με διαλύματα ελέγχου πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι όλος από γυαλί:

— μετρητής οξυγόνου (με μικροηλεκτρόδιο ή άλλο κατάλληλο εξάρτημα για τη μέτρηση οξυγόνου σε δείγματα μικρού όγκου),

— αρκετά όργανα για τον έλεγχο της θερμοκρασίας,

— πεχάμετρο,

— εξοπλισμός για τον προσδιορισμό σκληρότητας στα νερά.

1.6.3. *Οργανισμοί ελέγχου*

Daphnia magna ή *Daphnia pulex*, ηλικίας μεταξύ 6 και 24 ωρών κατά την έναρξη του ελέγχου, εργαστηριακά καλλιεργημένη, ελεύθερη από φανερή ασθένεια και με γνωστή ιστορία (π.χ. διατροφή, προετοιμασία κλπ.).

1.6.4. *Διαδικασία ελέγχου*

Ένας προκαταρκτικός έλεγχος μπορεί να γίνει πριν από τον τελικό. Παρέχει πληροφορίες για την περιοχή συγκεντρώσεων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στον κυρίως έλεγχο. Συμπληρωματικά με τη σειρά ελέγχων πρέπει να διεξαχθεί και ένας έλεγχος συγκρίσεως με τις τυχόν βοηθητικές ουσίες χωρίς όμως την ελεγχόμενη ουσία.

Οι *Daphnia* εκτίθενται στην ουσία όπως περιγράφεται παρακάτω:

Διάρκεια:

24 ώρες τουλάχιστον.

Αριθμός ζώων:

20 τουλάχιστον ζώα για κάθε συγκέντρωση, μοιρασμένα κατά προτίμηση σε τέσσαρες ομάδες των πέντε ζώων η καθεμία ή δύο ομάδες των δέκα.

Φορτίο:

Για κάθε ζώο θα 'πρεπε να αντιστοιχούν τουλάχιστον 2 ml διαλύματος ελέγχου.

Συγκεντρώσεις ελέγχου:

Το διάλυμα ελέγχου πρέπει να παρασκευασθεί αμέσως πριν την εισαγωγή των *Daphnia*, κατά προτίμηση χωρίς τη χρήση άλλων διαλυτών παρά νερού. Οι συγκεντρώσεις γίνονται σε γεωμετρική σειρά με σχέση μεταξύ τους 1,8 και θα 'πρεπε μαζί με τον έλεγχο συγκρίσεως να ελεγχθούν συγκεντρώσεις ικανές να δώσουν ακινητοποίηση 0 και 100 % μετά από 24 ώρες, καθώς και μια σειρά από ενδιάμεσες ακινητοποιήσεις που επιτρέπουν τον υπολογισμό της EC_{50} για 24 ώρες.

Νερό:

Βλέπε σημείο 1.6.1.2.

Φως:

Η εναλλαγή φως – σκότος είναι προαιρετική και είναι αποδεκτό και το τέλειο σκοτάδι.

Θερμοκρασία:

Η θερμοκρασία ελέγχου πρέπει να είναι μεταξύ 18 και 22 °C, αλλά για καθένα έλεγχο ξεχωριστά πρέπει να είναι σταθερή κατά ± 1,0 °C.

Αερισμός:

Τα διαλύματα ελέγχου δεν πρέπει να αερίζονται με φυσαλίδες αέρα.

Διατροφή:

Καθόλου.

Το pH και η συγκέντρωση οξυγόνου στον έλεγχο συγκρίσεως και στους ελέγχους όλων των συγκεντρώσεων πρέπει να μετριέται στο τέλος του ελέγχου· το pH του διαλύματος ελέγχου δεν πρέπει να τροποποιηθεί.

Πτητικές ενώσεις πρέπει να ελεγχθούν σε εντελώς γεμάτα κλειστά δοχεία, αρκετά μεγάλα ώστε να μην παρατηρηθεί έλλειψη οξυγόνου.

Οι Daphnia επιθεωρούνται τουλάχιστον μετά από έκθεση 24 ωρών και ξανά μετά 48 ώρες, αν ο έλεγχος έχει επεκταθεί.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Σχεδιάζεται το συσσωρευτικό ποσοστό ακινητοποιήσεως για κάθε συγκέντρωση μετά από έκθεση 24 ωρών τουλάχιστον, σαν συνάρτηση της συγκεντρώσεως, σε λογαριθμικό χαρτί. Γίνεται η καλύτερη προσαρμογή γραμμής στα σημεία και βρίσκεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ακινητοποίηση 50 %.

Όταν τα δεδομένα είναι αρκετά, η μέση συγκέντρωση και τα όρια εμπιστοσύνης ($p = 0,05$) μπορεί να εκτιμηθούν με τη χρήση προτύπων διαδικασιών.

Η τιμή EC_{50} πρέπει να στρογγυλευτεί σε ένα (ή το πολύ σε δύο) σημαντικό ψηφίο.

Στις περιπτώσεις που η κλίση της καμπύλης συγκεντρώσεων είναι πολύ μεγάλη για να επιτρέψει τον υπολογισμό της τιμής EC_{50}, είναι αρκετή μία γραφική εκτίμηση της τιμής αυτής.

Όταν δύο συνεχόμενες συγκεντρώσεις με σχέση 1,8 δίνουν μόνο 0 και 100 % ακινητοποίηση, οι δύο αυτές τιμές είναι αρκετές να δείξουν την περιοχή μέσα στην οποία πέφτει ή EC_{50}.

Αν παρατηρηθεί ότι η σταθερότητα ή η ομοιογένεια της ελεγχόμενης ουσίας δεν μπορεί να διατηρηθεί, αυτό θα 'πρεπε να αναφερθεί και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων να γίνει με προσοχή.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει:

— πληροφορίες για τους οργανισμούς ελέγχου (επιστημονική ονομασία, είδος, προμηθευτής ή πηγή, οποιαδήποτε προετοιμασία, μέθοδος καλλιέργειας, περιλαμβανομένης της πηγής, είδος και ποσότητα της τροφής, συχνότητα διατροφής),

— αριθμό των Daphnia που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε συγκέντρωση ελέγχου,

— κατάλογο των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν και οποιεσδήποτε διαθέσιμες πληροφορίες για τη σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα διαλύματα ελέγχου,

— περιγραφή των δοχείων ελέγχου, όγκοι διαλύματος στο καθένα, αριθμός ζώων ανά δοχείο,

— αν εκτελέσθηκαν χημικές αναλύσεις, τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα,

— προέλευση νερού αραιώσεως και τα κυριότερα χημικά χαρακτηριστικά του,

— μεθόδους παρασκευής του αρχικού διαλύματος και των διαλυμάτων ελέγχου,

— συγκεντρώσεις των τυχόν βοηθητικών ουσιών (οργανικοί διαλύτες, παράγοντες διασποράς κλπ.),

— περιόδους φωτισμού ημερησίως,

— υψηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές που ελέγχθηκαν, που δεν προκαλούν ακινητοποίηση μέσα στην περίοδο του ελέγχου,

— χαμηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές που ελέγχθηκαν, που προκαλούν ακινητοποίηση μέσα στην περίοδο του ελέγχου 100 %,

— συσσωρευτική ακινητοποίηση στον έλεγχο συγκρίσεως με τις βοηθητικές ουσίες και σε κάθε ελεγχόμενη συγκέντρωση, στους χρόνους παρατηρήσεως που έχουν υποδειχθεί (24 ώρες ή 24 και 48 ώρες),

— τιμές EC_{50} σε καθέναν από τους χρόνους παρατηρήσεως που έχουν υποδειχθεί (με όριο εμπιστοσύνης 95 % αν είναι δυνατό),

— γραφική παράσταση της καμπύλης αυτής σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση στο τέλος του ελέγχου,

— στατιστικές διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των τιμών EC_{50},

— κλίση της καμπύλης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις, αν είναι δυνατόν, στις 24 ώρες και τα όρια εμπιστοσύνης της 95 %,

— τις συγκεντρώσεις διαλελυμένου οξυγόνου, τιμές pH και θερμοκρασία των διαλυμάτων ελέγχου,

— αν χρησιμοποιήθηκε ουσία αναφοράς, το όνομά της και τα αποτελέσματα που προέκυψαν πρέπει να αναφερθούν,

— ενδείξεις για την εκπλήρωση των κριτηρίων ποιότητας,

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(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 (April 1974).

(4) DIN *Testverfahren mit Wasserorganismen* 38412 (L1) und (L11).

Προσάρτημα 1

Νερό από ανασύσταση

Παράδειγμα ενός κατάλληλου νερού αραιώσεως

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικού βαθμού. Το νερό πρέπει να είναι καλής ποιότητας απεσταγμένο νερό, ή απιονισμένο νερό, με αγωγιμότητα μικρότερη από 5 μScm^{-1}.

Αρχικό διάλυμα

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (δι-ενυδρο χλωριούχο ασβέστιο) διαλύονται σε νερό και συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο:	11,76 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (επτά-ενυδρο θειικό μαγνήσιο) ίδια διαδικασία:	4,93 g
$NaHCO_3$ (όξινο ανθρακικό νάτριο) ίδια διαδικασία:	2,59 g
KCl (χλωριούχο κάλιο) ίδια διαδικασία:	0,23 g

Νερό αραιώσεως από ανασύσταση

Ανακατεύονται 25 ml από καθένα από τα τέσσερα αρχικά διαλύματα και συμπληρώνονται με νερό μέχρι 1 λίτρο.

Αερίζεται μέχρις ότου η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου εξισωθεί με την τιμή κορεσμού με αέρα.

Το pH πρέπει να είναι 7,9 ± 0,3.

Το pH διορθώνεται, αν είναι ανάγκη, με NaOH (καυστικό νάτριο) ή HCl (υδροχλωρικό οξύ).

Το νερό αραιώσεως που παρασκευάζεται έτσι αφήνεται για 12 περίπου ώρες και δεν χρειάζεται περαιτέρω αερισμό.

Το σύνολο των ιόντων Ca και Mg σ' αυτό το διάλυμα είναι 2,5 mmol/l. Η σχέση των ιόντων Ca : Mg είναι 4:1 και των Na : K 10 : 1. Η συνολική αλκαλικότητα του διαλύματος είναι 0,8 mmol/l.

Οποιαδήποτε εκτροπή στην παρασκευή του νερού αραιώσεως δεν πρέπει να αλλάζει τη σύσταση ή τις ιδιότητες του νερού.

Γ. 3. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ: ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΒΑΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ OECD

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Ο σκοπός της μεθόδου αυτής είναι η μέτρηση της βιοδιασπασιμότητας υδατοδιαλυτών, μη πτητικών οργανικών ενώσεων σε ένα αερόβιο υδατικό μέσο με αρχική συγκέντρωση της ουσίας αντίστοιχη με 5 έως 40 mg DOC/l (διαλελυμένος οργανικός άνθρακας ανά λίτρο). Αν η ευαισθησία στα όρια ανιχνεύσεως των αναλυτών οργανικού άνθρακα είναι προηγμένη, η χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων ελέγχου μπορεί να είναι πλεονεκτική, ειδικά στις τοξικές ουσίες. Η περιεκτικότητα του οργανικού άνθρακα της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να καθορισθεί.

Η μέθοδος έχει εφαρμογή μόνο σ' εκείνες τις ελεγχόμενες οργανικές ουσίες, που για τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο:

— είναι υδατοδιαλυτές, τουλάχιστον στις συγκεντρώσεις που πρόκειται να ελεγχθούν (5 – 40 mg DOC/l),

— έχουν ασήμαντη τάση ατμών,

— δεν δρούν παρεμποδιστικά στα βακτηρίδια,

— δεν απορροφώνται σημαντικά σε γυάλινες επιφάνειες.

Πληροφορίες για τις σχετικές αναλογίες των κυριοτέρων συστατικών της ελεγχόμενης ουσίας είναι χρήσιμες για την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων, ιδίως στις περιπτώσεις εκείνες όπου τα αποτελέσματα είναι χαμηλά ή περιθωριακά.

Πληροφορίες για την τοξικότητα των χημικών ουσιών στους μικροοργανισμούς μπορεί να είναι χρήσιμες για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Η διασπασιμότητα καθορίζεται σαν το ποσοστό DOC που καταναλίσκεται σε σχέση με την ελεγχόμενη ουσία.

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

όπου:

D_t = διασπασιμότητα σε % DOC που καταναλίσκεται σε χρόνο t

C_0 = αρχική συγκέντρωση DOC του μέσου καλλιέργειας (mg DOC/l)

C_t = συγκέντρωση DOC του μέσου καλλιέργειας σε χρόνο t (mg DOC/l)

$C_{bl(0)}$ = αρχική συγκέντρωση DOC του τυφλού (mg DOC/l)

$C_{bl(t)}$ = συγκέντρωση DOC του τυφλού σε χρόνο t (mg DOC/l).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Η χρήση καταλλήλων χημικών ουσιών για τον έλεγχο της δραστικότητας του εμβολίου είναι επιθυμητή. Γι' αυτό το σκοπό μπορεί να χρησιμοποιηθεί, π.χ., η ανιλίνη, το οξικό νάτριο ή το βενζοϊκό νάτριο που παρουσιάζουν κατανάλωση DOC $\geqslant$ 70 % μέσα σε 10 ημέρες, υπολογίζοντας από την ημέρα που για πρώτη φορά παρατηρείται επίπεδο βιοδιασπασιμότητας μεγαλύτερο του 10 %. Τα αποτελέσματα αυτά πρέπει να ληφθούν κατά τη διάρκεια του ελέγχου των 28 ημερών, αλλιώς ο έλεγχος θεωρείται άκυρος και θα πρέπει να επαναληφθεί χρησιμοποιώντας ένα εμβόλιο που προέρχεται από διαφορετική πηγή.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Μια προκαθορισμένη ποσότητα της ουσίας διαλύεται σ' ένα ανόργανο μέσο (θρεπτικό διάλυμα ανοργάνων, ενισχυμένο με ιχνοστοιχεία και διάλυμα ουσιωδών βιταμινών), παρέχοντας μια συγκέντρωση αντίστοιχη του 5 έως 40 mg DOC/l. Το διάλυμα εμβολιάζεται με μικρό αριθμό μικροοργανισμών διαφόρων ειδών και αερίζεται στους 20 έως 25 °C, στο σκοτάδι ή τουλάχιστο μόνο σε διάχυτο φως.

Η διάσπαση παρακολουθείται με αναλύσεις του DOC για μια περίοδο 28 ημερών.

Η διαδικασία ελέγχεται χρησιμοποιώντας σαν μέσο μία ουσία συγκρίσεως.

Σ' έναν παράλληλο έλεγχο που δεν περιέχει ελεγχόμενη ουσία ή ουσία συγκρίσεως πρέπει να γίνεται κι ένας τυφλός προσδιορισμός του DOC.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου έχει καθοριστεί από διασυγκριτικά πειράματα του ΟΟΣΑ και της ΕΟΚ.

Η χαμηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας για την οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτή η μέθοδος καθορίζεται, κυρίως, από το όριο ανιχνεύσεως της αναλύσεως του οργανικού άνθρακα (0,5 mg C/l στην παρούσα φάση της τεχνολογίας) και τη συγκέντρωση του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό διάλυμα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Αντιδραστήρια*

1.6.1.1. Νερό

Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό, ελεύθερο τοξικών ουσιών (ειδικά χαλκού) για γενική χρήση σαν διαλύτης. Νερό που προκύπτει από απιονισμό με απόσταξη ή ανταλλαγή ιόντων είναι κατάλληλο.

Το απεσταγμένο νερό δεν πρέπει να περιέχει περισσότερο από 10 % του οργανικού άνθρακα που εισάγεται με την ελεγχόμενη ουσία.

Νερό υψηλής καθαρότητας είναι απαραίτητο για αναλύσεις DOC στην περιοχή συγκεντρώσεων 0 έως 40 mg/l. Οι μολύνσεις προέρχονται από περιεχόμενες ξένες προσμείξεις αλλά επίσης και από τις ιοντοανταλλακτικές ρητίνες και την ανάπτυξη μικροβίων (βακτηρίδια, φύκη υπό την επίδραση του φωτός κλπ.). Για μια σειρά ελέγχων πρέπει να χρησιμοποιηθεί νερό ίδιας προελεύσεως, στο οποίο έχει γίνει από πριν ανάλυση του DOC. Κατάλληλο νερό, αν είναι ανάγκη, μπορεί να ληφθεί με χρήση ακτινοβολίας UV ή άλλων μέσων.

1.6.1.2. Θρεπτικό διάλυμα

Το θρεπτικό διάλυμα περιέχει ανά λίτρο, 1 ml από καθένα από τα ακόλουθα διαλύματα α) έως στ) σε νερό (1.6.1.1) (ΑΚ σημαίνει αντιδραστήριο αναλυτικής καθαρότητας):

α) KH_2PO_4 (δισόξινο φωσφορικό κάλιο): 8,50 g ΑΚ
K_2HPO_4 (όξινο φωσφορικό κάλιο): 21,75 g ΑΚ
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (δι-ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο): 33,40 g ΑΚ
NH_4Cl (χλωριούχο αμμώνιο): 20,00 g ΑΚ
Διαλύονται και συμπληρώνονται μέχρι 1 000 ml με νερό (1.6.1.1). Το pH πρέπει να είναι 7,2.

β) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (επτα-ένυδρο θειικό μαγνήσιο): 22,50 g ΑΚ
Διαλύονται και συμπληρώνονται μέχρι 1 000 ml με νερό (1.6.1.1).

γ) $CaCl_2$ (χλωριούχο ασβέστιο): 27,50 g ΑΚ
Διαλύονται και συμπληρώνονται μέχρι 1 000 ml με νερό (1.6.1.1).

δ) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (έξα-ένυδρος τριχλωριούχος σίδηρος): 0,25 g AK

Διαλύονται και συμπληρώνονται μέχρι 1 000 ml με νερό (1.6.1.1).

Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται αμέσως πριν από τη χρήση του.

ε) Διάλυμα ιχνοστοιχείων $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (II) (τετρα-ένυδρο θειικό μαγγάνιο):

(= 30,23 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$)	39,9 mg AK
H_3BO_3 (βορικό οξύ):	57,2 mg AK
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ επτα-ένυδρος θειικός ψευδάργυρος):	42,8 mg AK
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (= 36,85 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) [μολυβδικό αμμώνιο (ντ)]:	34,7 mg AK
Fe-χηλικό ($FeCL_3$ · EDTA):	100 mg AK

Διαλύονται και συμπληρώνονται μέχρι 1 000 ml με νερό (1.6.1.1).

Η αποστείρωση του αρχικού διαλύματος ιχνοστοιχείων γίνεται στους 120 °C, υπό 2 atm., επί 20 λεπτά.

στ) Διάλυμα βιταμινών

Βιοτίνη:	0,2 mg AK
Νικοτιναμίδιο:	2,0 mg AK
Θειαμίνη:	1,0 mg AK
p-αμινοβενζοϊκό οξύ:	1,0 mg AK
Παντοθενικό οξύ:	1,0 mg AK
Πυριδοξαμίνη:	5,0 mg AK
Κυανοκοβαλαμίνη:	2,0 mg AK
Φολικό οξύ:	5,0 mg AK

Διαλύονται και συμπληρώνονται μέχρι 100 ml με νερό (1.6.1.1).

Το διάλυμα διηθείται με συνθήκες αποστειρώσεως από φίλτρα μεμβράνης 0,2 μm. Αντί του διαλύματος 1.6.1.2 [στ)] μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκχύλισμα 15 mg ζύμης ανά 100 ml νερού (1.6.1.1).

1.6.1.3. Ουσίες συγκρίσεως (ελέγχου)

Ανιλίνη (πρόσφατα απεσταγμένη), οξικό νάτριο, βενζοϊκό νάτριο.

1.6.1.4. Διάλυμα χλωριούχου υδραργύρου

$HgCl_2$ 1 % σε νερό (1.6.1.1).

1.6.2. *Συσκευή*

1.6.2.1. Συσκευή αναταράξεως που παίρνει κωνικές φιάλες (Erlenmeyer) 2 λίτρων είτε με αυτόματο έλεγχο θερμοκρασίας είτε σ' ένα δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας (20 έως 25 °C).

1.6.2.2. Κωνικές φιάλες 2 λίτρων με στενό στόμιο (συνιστώνται φιάλες με πτυχές ή ραβδώσεις). Οι φιάλες πρέπει να καθαριστούν προσεκτικά πριν από τη χρήση, π.χ. με αλκοολικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, να ξεπλυθούν και να ξηρανθούν, ούτως ώστε να αποφευχθεί μόλυνση από κατάλοιπα προηγουμένων ελέγχων. Οι φιάλες πρέπει να καθαρισθούν επίσης και πριν από την πρώτη τους χρήση γιατί μπορεί να είναι ήδη μολυσμένες.

1.6.2.3. Συσκευή διηθήσεως με μεμβράνη.

1.6.2.4. Φίλτρα μεμβράνης 0,2 μm.

1.6.2.5. Αναλυτής άνθρακος.

1.6.3. *Προετοιμασία εμβολίου*

Οποιαδήποτε από τις ακόλουθες τέσσερις πηγές μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εμβόλιο, του οποίου η ζωτικότητα ελέγχεται με τη χρήση μιας ορισμένης ουσίας ελέγχου (1.6.1.3).

1.6.3.1. Εμβόλιο από δευτερογενή λύματα

Το εμβόλιο λαμβάνεται κατά προτίμηση από δευτερογενή λύματα καλής ποιότητας, που συλλέγονται από μία εγκατάσταση βιολογικού καθαρισμού, που δέχεται κυρίως αστικά λύματα. Τα συλλεγέντα λύματα μέχρι τη χρήση τους πρέπει να συντηρηθούν υπό συνθήκες αερόβιες. Για την προετοιμασία του εμβολίου το δείγμα διηθείται από σκληρό ηθμό και τα πρώτα 200 ml απορρίπτονται. Το διήθημα συντηρείται υπό συνθήκες αερόβιες μέχρι τη χρήση του. Το εμβόλιο πρέπει να χρησιμοποιηθεί κατά την ημέρα της συλλογής του.

1.6.3.2. Εμβόλιο από χώμα

100 g χώματος (γόνιμου, όχι άγονου) αιωρούνται σε 1 000 ml πόσιμου νερού χωρίς χλώριο (χώματα με μεγάλη περιεκτικότητα σε άργιλλο, σε άμμο ή σε οργανικό άνθρακα είναι ακατάλληλα). Αφού αναδευτεί καλά, το αιώρημα αφήνεται να καθιζάνει για 30 λεπτά.

Το υπερκείμενο υγρό διηθείται από σκληρό χάρτινο ηθμό και τα πρώτα 200 ml απορρίπτονται. Το διήθημα αερίζεται αμέσως και ο αερισμός συνεχίζεται μέχρι τη χρήση του. Το εμβόλιο πρέπει να χρησιμοποιηθεί κατά την ημέρα της συλλογής του.

1.6.3.3 Εμβόλιο από επιφανειακά νερά

Ένα εμβόλιο μπορεί να παραχθεί από ένα κατάλληλο επιφανειακό νερό. Το δείγμα διηθείται από σκληρό χάρτινο ηθμό και τα πρώτα 200 ml απορρίπτονται. Το διήθημα συντηρείται αερόβια μέχρι τη χρήση του. Το εμβόλιο πρέπει να χρησιμοποιηθεί κατά την ημέρα της συλλογής του.

1.6.3.4. Σύνθετο εμβόλιο

Ίσοι όγκοι από τα τρία δείγματα εμβολίων ανακατεύονται καλά και το τελικό εμβόλιο εξάγεται από το μείγμα αυτό.

Η κατάλληλότητα του εμβολίου ελέγχεται με τη χρήση μιας ορισμένης ουσίας ελέγχου (1.6.1.3).

1.6.4. *Διαδικασία ελέγχου*

Οι ελεγχόμενες ουσίες εκτιμώνται συγχρόνως, εις διπλούν, μαζί και με μια ουσία συγκρίσεως (1.6.1.3). Ένας τυφλός έλεγχος σύγκρισης με εμβόλιο αλλά χωρίς ελεγχόμενη ουσία ή ουσία συγκρίσεως που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του DOC σαν τυφλό πείραμα διεξάγεται επίσης.

Παρασκευάζεται ένα αρχικό διάλυμα της ελεγχόμενης ουσίας σε νερό (1.6.1.1). Ένας όγκος του αρχικού αυτού διαλύματος προστίθεται στο θρεπτικό διάλυμα (1.6.1.2), ούτως ώστε να επιτευχθεί μια συγκέντρωση άνθρακα 5 έως 40 mg DOC/l. Η ουσία συγκρίσεως (1.6.1.3) ελέγχεται σε μία αρχική συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε 20 mg DOC/l.

900 ml θρεπτικού διαλύματος τοποθετούνται σε δύο φιάλες αντιδράσεως (1.6.2.2) και εμβολιάζονται με 0,5 ml/l εμβολίου (1.6.3). Το άνοιγμα των φιαλών καλύπτεται, π.χ. με φύλλο αλουμινίου, ούτως ώστε η ανταλλαγή αέρα της φιάλης και της ατμόσφαιρας να μην εμποδίζεται (το βαμβάκι είναι ακατάλληλο λόγω της αναλύσεως DOC). Εν συνεχεία οι φιάλες εισάγονται στη συσκευή αναταράξεως. Η θερμοκρασία των 20 έως 25 °C πρέπει να διατηρηθεί σταθερή κατά τη διάρκεια του ελέγχου και οι φιάλες πρέπει να προφυλάσσονται από το φως. Ο αέρας πρέπει να μην περιέχει ρύπους και τοξικές ουσίες (χλωριωμένους διαλύτες κλπ.).

Κατά την πορεία του ελέγχου βιοδιασπασιμότητας γίνονται προσδιορισμοί DOC εις διπλούν την πρώτη ημέρα και την 27η και 28η ημέρα. Τρεις τουλάχιστον πρόσθετες αναλύσεις (γύρω στην έβδομη, την 14η και την 21η ημέρα) πρέπει να εκτελεστούν για την παρακολούθηση της πορείας της διασπάσεως.

Για κάθε προσδιορισμό πρέπει να εξαχθούν μόνο οι απαραίτητοι όγκοι του μέσου καλλιέργειας. Η φυγοκέντρηση ή η διήθηση από φίλτρο μεμβράνης, που προηγείται από τον κυρίως προσδιορισμό του άνθρακα, απαιτεί διαφορετικούς όγκους υγρού αναλόγως με τη συσκευή. Απώλειες λόγω εξατμίσεως του μέσου καλλιέργειας πρέπει να αποκαθιστώνται με προσθήκη των απαιτουμένων ποσοστήτων νερού (1.6.1.1). Το μέσο καλλιέργειας πρέπει να αναμειχθεί καλά πριν από την εξαγωγή του δείγματος. Το υλικό που προσκολλάται στα τοιχώματα του δοχείου πρέπει να διαλυτοποιηθεί ή να τεθεί σε αιώρηση πριν τη

δειγματοληψία. Η διήθηση από μεμβράνη ή η φυγοκέντρηση πρέπει να γίνει αμέσως. Τα διηθημένα ή φυγοκεντρημένα δείγματα πρέπει να αναλυθούν την ίδια ημέρα, αλλιώς πρέπει να συντηρηθούν είτε με προσθήκη 0,05 ml διαλύματος $HgCl_2$ (1.6.1.4) για κάθε 10 ml του μέσου καλλιέργειας ή με φύλαξή τους στους 2 έως 4 °C για 24 ώρες ή στους − 18 °C για μακρότερες περιόδους.

Αν παρατηρηθεί κατάσταση ισορροπίας πριν από την 28η ημέρα, ο έλεγχος μπορεί να σταματήσει. Αν η διάσπαση άρχισε την 28η ημέρα αλλά δεν πλησίασε την κατάσταση ισορροπίας, θεωρείται καλή πρακτική η επέκταση του πειράματος για μία έως δύο εβδομάδες περισσότερο.

Όλα τα στάδια απαιτούν εξαιρετική προσοχή και πρέπει να είναι σίγουρη η καθαρότητα (όχι αποστείρωση) των δοχείων, σιφωνίων κλπ.

1.6.5. *Προσδιορισμοί DOC*

Τα φίλτρα μεμβράνης είναι κατάλληλα, εφόσον διαπιστωθεί ότι ούτε ελευθερώνουν άνθρακα ούτε προσροφούν την ουσία στο στάδιο της διηθήσεως.

Αν τα δείγματα φυγοκεντρούνται, η φυγοκέντρηση πρέπει να γίνει για 15 λεπτά σε 40 000 ms^{-2} (~ 4 000 g), κατά προτίμηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και εν πάση περιπτώσει < 40 °C.

[*Σημείωση:* η διαφοροποίηση TOC:DOC κατά τη φυγοκέντρηση δεν φαίνεται να είναι επιτυχής για πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, επειδή είτε δεν απομακρύνονται όλα τα βακτηρίδια ή άνθρακας σαν μέρος του πλάσματος των βακτηριδίων επαναδιαλύεται. Για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (≥ 10 mg C/l) και το ίδιο μικρό εμβόλιο, το λάθος φυγοκεντρήσεως φαίνεται να είναι συγκριτικά μικρό].

Το δείγμα που εξάγεται από το μέσο καλλιέργειας (περίπου 30 ml) φυγοκεντρείται ή διηθείται αμέσως στη συσκευή διηθήσεως (1.6.2.3) με χρήση των φίλτρων μεμβράνης σύμφωνα με το 1.6.2.4. Τα πρώτα 20 ml του διηθήματος απορρίπτονται.

Η συγκέντρωση του DOC προσδιορίζεται εις διπλούν στο διήθημα που απομένει (περίπου 10 ml) σε αναλυτή TOC/DOC (1.6.2.5). Αν το διήθημα δεν μπορεί να αναλυθεί την ίδια ημέρα, πρέπει να διατηρηθεί σύμφωνα με το 1.6.4.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Τα αναλυτικά αποτελέσματα καταγράφονται στη συνημμένη έντυπη σελίδα (προσάρτημα 1) και οι τιμές της βιοδιασπασιμότητας υπολογίζονται σύμφωνα με το σημείο 1.2.

Οι συγκεντρώσεις του DOC υπολογίζονται στο πλησιέστερο 0,1 mg/l. Οι μέσες τιμές του D_t στρογγυλεύονται στον πλησιέστερο ακέραιο επί τοις εκατό.

Η πορεία της διασπάσεως ακολουθείται γραφικώς σε διάγραμμα, όπως φαίνεται στο σηνημμένο παράδειγμα (προσάρτημα 2).

Τα αποτελέσματα του ελέγχου διασπάσεως είναι έγκυρα αν πληρούνται οι ακόλουθες συνθήκες:

ότι στην ίδια σειρά ελέγχων, η ουσία συγκρίσεως παρουσιάζει μείωση του DOC της τάξεως του ≥ 70 % μέσα σε 10 ημέρες, αρχίζοντας από την ημέρα του παρατηρήθηκε για πρώτη φορά επίπεδο βιοδιασπασιμότητας υπερβαίνον το 10 %. Το αποτέλεσμα αυτό πρέπει να ληφθεί μέσα στη διάρκεια των 28 ημερών του ελέγχου, αλλιώς όλη η σειρά απορρίπτεται.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

3.1. Έκθεση ελέγχου

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει:

— τα δεδομένα που πρέπει να αναφέρονται σύμφωνα με την έντυπη σελίδα (προσάρτημα I),

— την πορεία του ελέγχου διασπασιμότητας που να αναπαρίσταται γραφικά με ένα διάγραμμα που δείχνει τη φάση καθυστέρησης, τη φάση διάσπασης, την κλίση και τον χρόνο-παράθυρο («χρόνος-παράθυρο» εδώ σημαίνει ένα χρονικό διάστημα 10 ημερών που αρχίζει την ημέρα όπου το παρατηρούμενο επίπεδο διασπασιμότητας κατ' αρχήν φθάνει το 10 %),

— απόδειξη της εγκυρότητας του ελέγχου (ουσία συγκρίσεως ⩾ 70 % μείωση του DOC σε 10 ημέρες, αρχίζοντας από την ημέρα που η διάσπαση υπερβαίνει το 10 %, και ότι το αποτέλεσμα αυτό λήφθηκε μέσα στη διάρκεια των 28 ημερών του ελέγχου).

3.2. **Ερμηνεία των αποτελεσμάτων**

Λόγω της αυστηρότητας του ελέγχου αυτού, ένα χαμηλό αποτέλεσμα δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν είναι βιοδιασπάσιμη σε συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά ότι θα χρειαστεί περισσότερη δουλειά για τον καθορισμό της βιοδιασπασιμότητάς της.

Ελεγχόμενες χημικές ουσίες που δείχνουν υψηλή μείωση DOC στον έλεγχο αυτό, θα 'πρεπε να θεωρηθούν εύκολα βιοδιασπάσιμες, με την προϋπόθεση ότι το επίπεδο αυτό επιτεύχθηκε μέσα σε διάστημα 10 ημερών, υπολογίζοντας από την ημέρα που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά επίπεδο βιοδιασπασιμότητας μεγαλύτερο από 10 %.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(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 – 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 Envivonmental Safety vol. 5, No 1, 1981, p. 45 – 55.

Προσάρτημα 1

Βιοδιασπασιμότητα: Τροποποιημένος βασικός ελέγχος του OECD

Εργαστήριο ελέγχου: .....

Ελεγχόμενη ουσία: .....

Πείραμα αριθ.: .....

Δεδομένα ελέγχου

Θεωρητική συγκέντρωση: ..... mg/l DOC

Προσδιορισμοί άνθρακα

	Φιάλη αριθ.		Συγκεντρώσεις DOC μετά από x ημέρες (mg/l)							
			0 (C_0)							
Έλεγχος: Θρεπτικό διάλυμα *με* ελεγχόμενη ουσία και *με* εμβόλιο	1	a_1								
		a_2								
		$C_{a(t)} = \frac{a_1 + a_2}{2}$								
	2	b_1								
		b_2								
		$C_{b(t)} = \frac{b_1 + b_2}{2}$								
Τυφλό: Θρεπτικό διάλυμα *χωρίς* ελεγχόμενη ουσία αλλά *με* εμβόλιο	3	bl_1								
		bl_2								
		$C_{bl(t)} = \frac{bl_1 + bl_2}{2}$								

Αξιολόγηση ακατέργαστων δεδομένων

Φιάλη αριθ.	Υπολογισμός των αποτελεσμάτων	% κατανάλωση DOC μετά από x ημέρες							
		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							
Μέσος όρος	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0							

(*) Ο μέσος όρος των τιμών D_1 και D_2 δεν πρέπει να εξαχθεί αν υπάρχει μεταξύ τους μια σημαντική διαφορά.

Βιοδιασπασιμότητα: Τροποποιημένος βασικός έλεγχος του OECD (Έντυπη σελίδα)

Εργαστήριο ελέγχου: .....

Διευθυντής της έρευνας: .....

Ημερομηνία ενάρξεως του ελέγχου: ..... Πείραμα αριθ.: .....

Ελεγχόμενη ουσία: .....

Χημική σύνταξη: .....

Αρχικό διάλυμα:

	mg/l	mg/l TOC (*)	mg/l DOC (**)
Συγκεντρώση ελεγχόμενης ουσίας			

(*) Ασυμφωνία μεταξύ των τιμών DOC και TOC συνηγορεί για ανεπαρκή διαλυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας.

(**) Όλες οι τιμές DOC που προσδιορίσθηκαν μετά από διήθηση από φίλτρο μεμβράνης ή φυγοκέντρηση.

Αναλυτής άνθρακα: .....

Εμβόλιο: .....

Αποτέλεσμα ελέγχου

D_t = ... % κατανάλωση DOC μετά από ..... ημέρες

Αξιολόγηση του αποτελέσματος

Ουσία συγκρίσεως: .....

Αποτέλεσμα: ..... % κατανάλωση DOC μετά από ..... ημέρες.

Αναφορά στο πείραμα άριθ.: .....

Παρατηρήσεις:

....

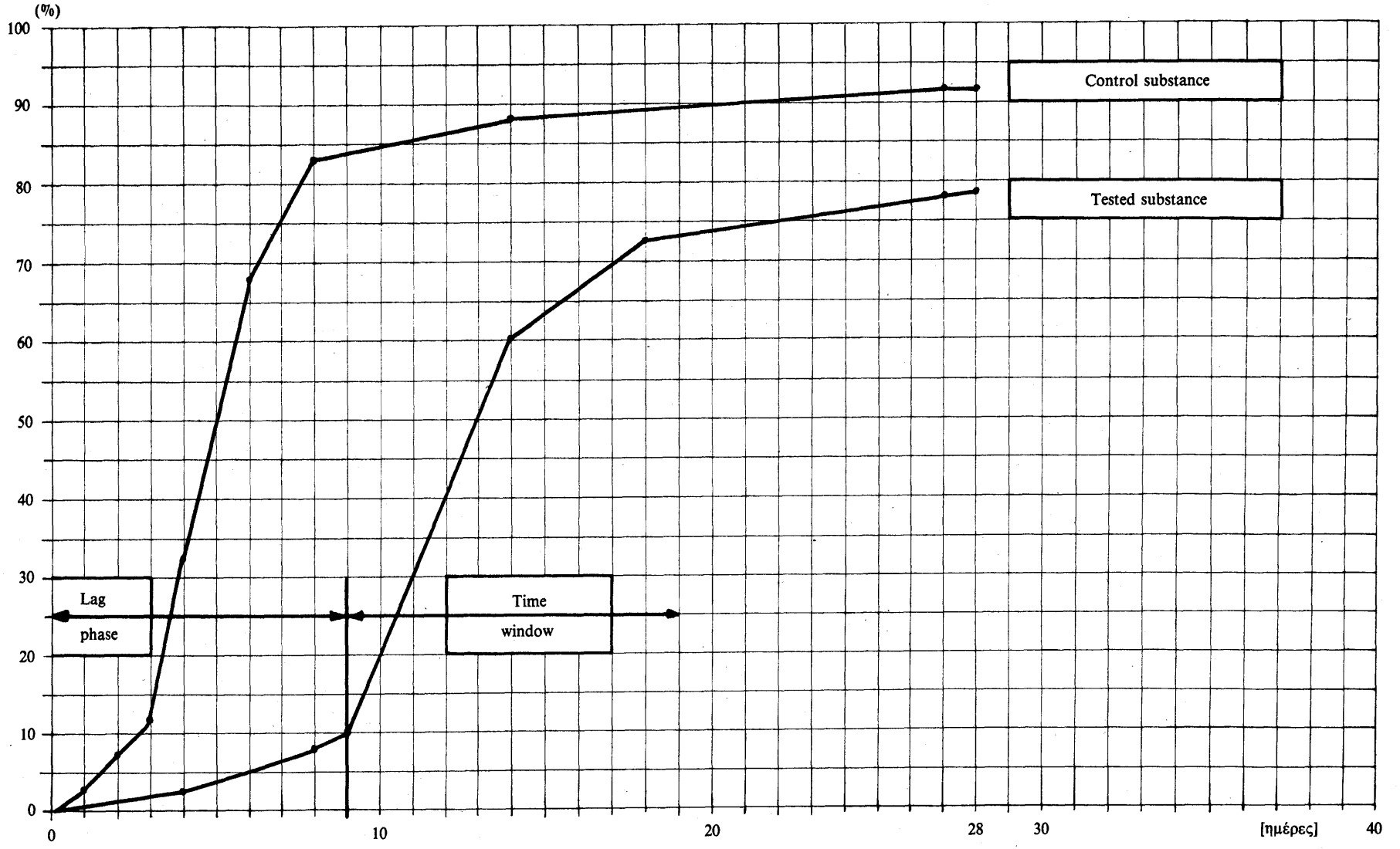
Ημερομηνία Υπογραφή

Προσάρτημα 2

Τροποποιημένος βασικός έλεγχος του OECD

Εργαστήριο ελέγχου: ..... Ελεγχόμενη ουσία: ..... Πείραμα αριθ.: .....

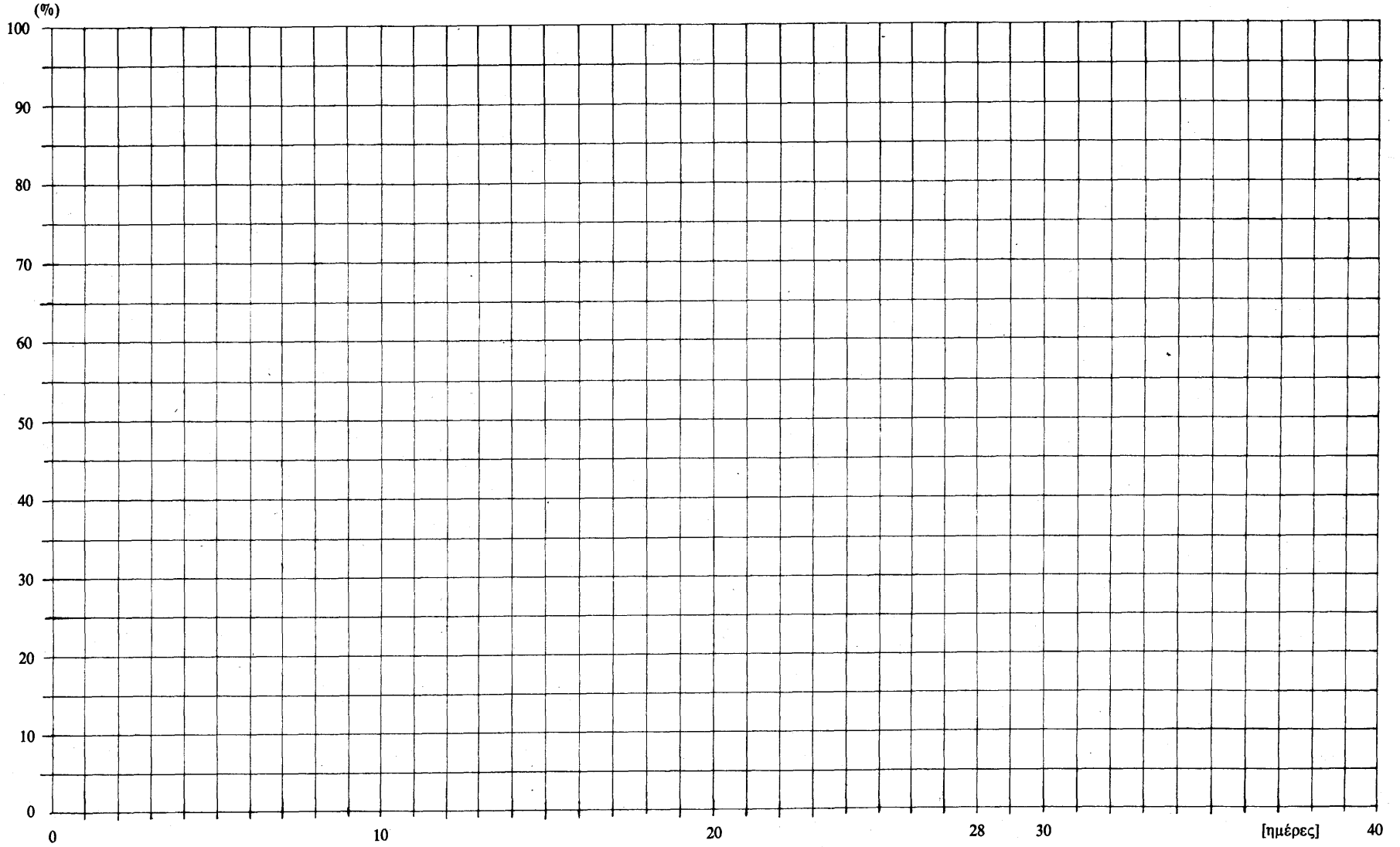
Κατανάλωση DOC



Τροποποιημένος βασικός έλεγχος του OECD

Εργαστήριο ελέγχου: ..... Ελεγχόμενη ουσία: ..... Πείραμα αριθ.: .....

Κατανάλωση DOC



Γ. 4. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ: ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ AFNOR NF T 90/302

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Σκοπός της μεθόδου είναι η μέτρηση της βιοδιασπασιμότητας υδατοδιαλυτών, μη πτητικών οργανικών ενώσεων, σε ένα αερόβιο, υδαρές μέσο και για αρχική συγκέντρωση ελέγχου αντίστοιχη με 40 mg DOC/l (διαλελυμένος οργανικός άνθρακας ανά λίτρο). Αν τα όρια ευαισθησίας των αναλυτών οργανικού άνθρακα είναι βελτιωμένα, αυτό είναι πλεονέκτημα για τη χρησιμοποίηση χαμηλοτέρων συγκεντρώσεων ελέγχου, ειδικά στην περίπτωση τοξικών ουσιών.

Πρέπει να προσδιορισθεί ο περιεχόμενος οργανικός άνθρακας στην ελεγχόμενη ουσία.

Η μέθοδος εφαρμόζεται μόνο στις οργανικές ουσίες που για τις ελεγχόμενες συγκεντρώσεις:

— είναι υδατοδιαλυτές τουλάχιστον σιτς συγκεντρώσεις που πρόκειται να ελεγχθούν (40 mg DOC/l),

— έχουν ασήμαντη τάση ατμών,

— δεν παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηριδίων,

— δεν προσροφούνται σημαντικά σε επιφάνειες υάλου.

Πληροφορίες για τη σχετική αναλογία των κυριοτέρων συστατικών της ελεγχόμενης ουσίας θα αποβούν χρήσιμες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων που θα ληφθούν, και ειδικότερα στις περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα είναι χαμηλά.

Πληροφορίες για την τοξικότητα της ουσίας για μικροοργανισμούς θα αποβούν χρήσιμες στην ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Σαν βιοδιασπασιμότητα ορίζεται η επί τοις εκατό κατανάλωση του DOC σε σχέση με την ελεγχόμενη ουσία:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

όπου:

D_t = διασπασιμότητα, σε κατανάλωση επί τοις % ποσοστού DOC, σε χρόνο t

C_0 = αρχική συγκέντρωση DOC του μέσου καλλιέργειας (mg DOC/l)

C_t = συγκέντρωση DOC του μέσου καλλιέργειας, σε χρόνο t (mg DOC/l)

$C_{bl(0)}$ = αρχική συγκέντρωση DOC του τυφλού (mg DOC/l)

$C_{bl(t)}$ = συγκέντρωση DOC του τυφλού, σε χρόνο t (mg DOC/l).

1.3. Ουσίες αναφοράς

Είναι επιθυμητή η χρήση ουσιών συγκρίσεως (ελέγχου) για τη διαπίστωση της δραστικότητας του εμβολίου.

Η ανιλίνη, το οξικό νάτριο ή το βενζοϊκό νάτριο, π.χ., μπορούν να χρησιμοποιηθούν γι' αυτό το σκοπό και αυτές πρέπει να προκαλέσουν καταναλώσεις DOC $\geqslant$ 70 % μέσα σε 28 ημέρες, αλλιώς ο έλεγχος θεωρείται άκυρος και πρέπει να επαναληφθεί με χρήση εμβολίου από άλλη πηγή.

Σ' αυτή τη συγκεκριμένη μέθοδο, χρησιμοποιείται ειδικά η γλυκόζη για τον έλεγχο παρεμποδίσεως της αναπτύξεως βακτηριδίων και της δραστικότητας του εμβολίου, που επίσης μπορεί να ελεγχθεί με ανιλίνη, οξικό νάτριο και βενζοϊκό νάτριο.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Οργανικές ουσίες διαλυμένες σε νερό, βιοδιασπώνται από χημειοοργανοτροφικούς μικρο-οργανισμούς, που χρησιμοποιούν τις ουσίες σαν τη μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Τα προϊόντα αυτά εξετάζονται σαν τέτοιες συγκεντρώσεις ώστε η αρχική συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα να είναι 40 mg/l. Ο οργανικός άνθρακας που απομένει στο διάλυμα προσδιορίζεται τουλάχιστον μετά από 3, 7, 14 και 28 ημέρες. Παράλληλα η ελεγχόμενη ουσία δοκιμάζεται για πιθανή παρεμποδιστική δράση στο εμβόλιο. Η διαδικασία ελέγχεται με τη χρήση μιας ουσίας συγκρίσεως (ελέγχου).

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου έχει καθοριστεί από τα διασυγκριτικά πειράματα του ΟΟΣΑ και της ΕΟΚ.

Η χαμηλότερη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας, για την οποία μπορεί η μέθοδος αυτή να χρησιμοποιηθεί, καθορίζεται κυρίως από το όριο ευαισθησίας της αναλύσεως του οργανικού άνθρακα που στο σημερινό στάδιο της τεχνολογίας είναι 0,5 mg C/l καθώς και από τη συγκέντρωση του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό διάλυμα.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Αντιδραστήρια*

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας.

1.6.1.1. Απεσταγμένο νερό

Το απεσταγμένο νερό δεν πρέπει να περιέχει περισσότερο του 10 % από τον οργανικό άνθρακα που εισάγεται με την ελεγχόμενη ουσία.

1.6.1.2. Θρεπτικό διάλυμα

Το μέσο ελέγχου παρασκευάζεται όπως δείχνεται παρακάτω, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα υλικά. Για ένα λίτρο διαλύματος, τα ακόλουθα διαλύονται σε απεσταγμένο νερό (ΑΚ σημαίνει αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας):

$(NH_4)_2SO_4$ (θειικό αμμώνιο):	0,300 g ΑΚ
NH_4NO_3 (νιτρικό αμμώνιο):	0,150 g ΑΚ
KH_2PO_4 (δισόξινο φωσφορικό κάλιο):	0,300 g ΑΚ
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (δώδεκα-ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο):	2,000 g ΑΚ
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (επτα-ένυδρο θειικό μαγνήσιο):	0,050 g ΑΚ
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (δι-ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο):	0,050 g ΑΚ
Εκχύλισμα ζύμης:	0,005 g ΑΚ

Το pH είναι 7,5 ± 0,1.

Προστίθεται 1 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων της κατωτέρω συνθέσεως:

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ [επτα-ένυδρος θειικός σίδηρος (II)]:	0,100 g ΑΚ
$MnSO_4 \cdot H_2O$ (ενυδρο-θειικό μαγγάνιο):	0,100 g ΑΚ
K_2MoO_4 (μολυβδικό κάλιο):	0,025 g ΑΚ
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (δεκα-ένυδρο τετραβορικό νάτριο):	0,025 g ΑΚ

$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ [εξα-ένυδρο νιτρικό κοβάλτιο (II)]:	0,025 g AK
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (δι-ένυδρος χλωριούχος χαλκός):	0,025 g AK
$ZnCl_2$ (χλωριούχος ψευδάργυρος):	0,025 g AK
NH_4VO_3 (μεταβαναδικό αμμώνιο):	0,010 g AK.

Απεσταγμένο νερό μέχρι 100.

(Το διάλυμα ιχνοστοιχείων μπορεί να συντηρηθεί επί ένα μήνα σε θερμοκρασία μεταξύ + 1 και + 4 °C).

Ο όγκος συμπληρώνεται (μέχρι 1 λίτρο) και ανακατεύεται. Το μέσο πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε 12 ώρες.

1.6.1.3. Ουσίες συγκρίσεως (έλεγχου)

Ανιλίνη (πρόσφατα απεσταγμένη), οξικό νάτριο, βενζοϊκό νάτριο, γλυκόζη.

1.6.2. *Συσκευή*

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και:

— συσκευή για την ανάλυση οργανικού άνθρακα,

— φασματοφωτόμετρο,

— φυγόκεντρος 4 000 g,

— συσκευή αναταράξεως που επιτρέπει επαρκή αερισμό και ανατάραξη,

— συσκευή αναλύσεως διαλελυμένου οξυγόνου, πεχάμετρο, κωνικές συσκευές 500 ml με ευρύ στόμιο, αποστειρωμένες,

— συσκευή για διήθηση υπό συνθήκες αποστειρώσεως (φίλτρα μεμβράνης με πόρους των 0,22 μm).

Ο γυάλινος εξοπλισμός πρέπει να καθαρισθεί πολύ καλά και να είναι απολύτως ελεύθερος από κάθε ίχνος οργανικής ή τοξικής ουσίας.

1.6.3. *Παρασκευή του εμβολίου*

Λαμβάνεται ένας επαρκής όγκος από το μείγμα τριών δειγμάτων από επιφανειακά ύδατα με ρύπανση και από το προϊόν εξόδου εγκαταστάσεως βιολογικού καθαρισμού αστικών λυμάτων, απαλλαγμένα από τους κυριότερους ειδικούς ρυπαντές. Ο αριθμός των βακτηριδίων σε κάθε δείγμα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10^5 βακτηρίδια/ml.

Τα δείγματα πρέπει να χρησιμοποιηθούν για εμβολιασμό σε μια περίοδο 12 ωρών, περιλαμβανομένης και της μεταφοράς και δεν πρέπει να παραμείνουν χωρίς αερισμό πάνω από 6 ώρες.

Διηθείται από χάρτινο ηθμό για την απομάκρυνση των μεγαλυτέρων αδιαλύτων σωματιδίων, το διήθημα συγκεντρώνεται και διέρχεται από φίλτρο μεμβράνης με πόρους μεγέθους 0,22 μm.

Ξεπλένεται με ένα ισοτονικό διάλυμα. Τα βακτηρίδια που εναποτέθηκαν στο φίλτρο μεμβράνης συλλέγονται με μικρό όγκο ενός ισοτονικού διαλύματος. Ανακατεύονται καλά. Μετριέται η απορρόφηση στα 620 nm και από αυτήν εξάγεται η συγκέντρωση βακτηριδίων σε σχέση με μια πρότυπη καμπύλη, που έχει γίνει προηγουμένως με τη χρήση ποσοτήτων ποικιλίας της Pseudomonas fluorescens ATCC 15453, σε στερεό μέσο. Προστίθεται ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος για τη ρύθμιση της συγκεντρώσεως των βακτηριδίων σε $(5 \pm 3) \times 10^7$/ml. Το εμβόλιο πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα στην επόμενη ώρα.

1.6.4. *Διαδικασία ελέγχου*

Η επώαση πρέπει να γίνει μακρυά από έντονο φως, σε ένα επωαστή θερμοκρασίας 20 έως 25 °C απαλλαγμένο από ατμούς τοξικών ουσιών.

Παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα:

1. Διάλυμα της ελεγχόμενης ουσίας στο μέσο ελέγχου έτσι ώστε να ληφθεί συγκέντρωση οργανικού άνθρακα 40 mg/l.
2. Διάλυμα γλυκόζης στο μέσο ελέγχου έτσι ώστε να ληφθεί συγκέντρωση οργανικού άνθρακα 40 mg/l.
3. Διάλυμα που να περιέχει στο μέσο ελέγχου τις συγκεντρώσεις ελεγχόμενης ουσίας και γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκαν.
4. Επαρκής όγκος του μέσου ελέγχου πρέπει να υπάρχει διαθέσιμος.

Τα τέσσερα διαλύματα αναταράσσονται και αποστειρώνονται χωριστά με διήθηση από φίλτρο μεμβράνης.

Τα φίλτρα μεμβράνης είναι κατάλληλα αν είναι βέβαιο ότι ούτε ελευθερώνουν άνθρακα ούτε προσροφούν την ουσία κατά το στάδιο της διηθήσεως.

Όλοι οι απαραίτητοι χειρισμοί πρέπει να γίνουν υπό συνθήκες αποστειρώσεως. Κατανέμονται τα διαλύματα στις φιάλες ελέγχου (που προηγουμένως έχουν αποστειρωθεί) σύμφωνα με τα ακόλουθα:

φιάλη αριθ. 1 (έλεγχος)	150 ml διάλυμα 1
φιάλη αριθ. 2 (έλεγχος)	150 ml διάλυμα 1
φιάλη αριθ. 3 (έλεγχος)	150 ml διάλυμα 1
φιάλη αριθ. 4 (αποστειρωμένος μάρτυρας)	150 ml διάλυμα 1
φιάλη αριθ. 5 (μάρτυρας γλυκόζης)	150 ml διάλυμα 2
φιάλη αριθ. 6 (ανίχνευση παρεμποδιστικής δράσεως)	150 ml διάλυμα 3
φιάλη αριθ. 7 (τυφλό)	150 ml διάλυμα 4

Εμβολιάζονται οι φιάλες αριθ. 1, 2, 3, 5, 6 και 7 με 1,5 ml εμβολίου και αναμειγνύονται καλά με ανατάραξη με τα χέρια.

Λαμβάνεται ένα κλάσμα 3 έως 5 ml από κάθε φιάλη.

Τα κλάσματα φυγοκεντρούνται επί 15 λεπτά στα 4 000 g, ενώ η θερμοκρασία διατηρείται κάτω των 26 °C.

Τα υπερκείμενα υγρά συλλέγονται για ανάλυση οργανικού άνθρακα σε χρόνο 0.

Οι φιάλες τοποθετούνται στη συσκευή αναταράξεως, όπου και αφήνονται καθ' όλη τη διάρκεια του ελέγχου: η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου κατά την τρίτη ημέρα στη φιάλη 5 πρέπει να είναι τουλάχιστο 5 mg/l.

Κατά τον ίδιο τρόπο με την ανάλυση οργανικού άνθρακα σε χρόνο 0, εκτελείται ανάλυση στις φιάλες αριθ. 1, 2, 3, 5, 6 και 7 τουλάχιστον μετά από 3, 7, 14, 28 ημέρες επωάσεως. Πάντως, αν η μείωση του περιεχομένου άνθρακα πλησιάζει το 95 % της αρχικής περιεκτικότητος στις φιάλες αριθ. 1, 2 και 3, ο έλεγχος θεωρείται τελειωμένος.

Ο έλεγχος μπορεί να τελειώσει πριν από την 28η ημέρα αν παρατηρηθεί νωρίτερα κατάσταση ισορροπίας.

Αν μία διάσπαση φαίνεται να αρχίζει την 28η ημέρα, αλλά δεν πλησιάζει μια κατάσταση ισορροπίας, θεωρείται καλή πρακτική η επέκταση του πειράματος για μία έως δύο εβδομάδες περισσότερο.

Στο τέλος του ελέγχου, εκτελείται και μια ανάλυση οργανικού άνθρακα στη φιάλη αριθ. 4, κατά τον ίδιο τρόπο όπως σε χρόνο 0, και ελέγχονται οι συνθήκες αποστειρώσεως, εμβολιάζοντας υγρό μέσο καλλιέργειας μέσα σε σωλήνα, το οποίο και επωάζεται για πέντε ημέρες στους 25 °C.

Μέσο καλλιέργειας:

Αφυδατωμένο εκχύλισμα ζύμης	3 g
Πεπτόνη παγκρεατικής καζεΐνης	6 g
Νερό	1 000 ml.

Τα συστατικά του εντελώς αφυδατωμένου προϊόντος διαλύονται σε νερό που βράζει. Αν είναι απαραίτητο, το pH ρυθμίζεται ούτως ώστε μετά την αποστείρωση να είναι 7,2 ± 0,2 στους 20 °C.

Αν οι αναλύσεις του οργανικού άνθρακα πρέπει να αναβληθούν, τα υπερκείμενα υγρά φυλάγονται στους 4 °C, στο σκοτάδι, σε ερμητικά σφραγισμένες γυάλινες φιάλες· η μέγιστη αποδεκτή διάρκεια φυλάξεως

είναι 24 ώρες. Αν οι αναλύσεις δεν μπορεί να εκτελεστούν σε 24 ώρες, τα δείγματα καταψύχονται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από – 18 °C.

Για την εξισορρόπηση απωλειών νερού λόγω εξατμίσεως, πριν από κάθε δειγματοληψία, ελέγχεται ο όγκος του μέσου στη φιάλη και, αν είναι ανάγκη, ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό, αποστειρωμένο με διήθηση από φίλτρο μεμβράνης πόρων μεγέθους 0,22 μm, για την αποκατάσταση του όγκου στο μέτρο που ήταν μετά την προηγούμενη δειγματοληψία.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Τα αναλυτικά αποτελέσματα καταγράφονται στη συνημμένη έντυπη σελίδα (προσάρτημα 1) και οι τιμές της βιοδιασπασιμότητας υπολογίζονται σύμφωνα με το σημείο 1.2.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου της διασπασιμότητας είναι έγκυρα, υπό τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

— το επίπεδο της διασπασιμότητας της γλυκόζης στη φιάλη αριθ. 5 πρέπει να είναι 80 % τουλάχιστο κατά την έβδομη ημέρα,

— στο τέλος του ελέγχου η φιάλη αριθ. 4 πρέπει να είναι ακόμη σε κατάσταση αποστειρώσεως,

— η συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου την τρίτη ημέρα στη φιάλη αριθ. 5 πρέπει να είναι τουλάχιστο 5 mg/l.

Το επίπεδο βιοδιασπασιμότητας της γλυκόζης στη φιάλη αριθ. 6 πρέπει κατά την έβδομη ημέρα να είναι 75 % τουλάχιστο αυτής που παρατηρήθηκε στη φιάλη αριθ. 5. Αν το όριο αυτό δεν προσεγγισθεί, πρέπει να υποτεθεί ότι η ελεγχόμενη ουσία που υπόκειται στον έλεγχο, ασκεί παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη των παρόντων βακτηριδίων και, ως εκ τούτου, η μέθοδος δεν είναι εφαρμόσιμη στις συγκεντρώσεις που έχουν καθορισθεί.

Σημειώσεις:

Η σύγκριση της ποσοστιαίας αφαιρέσεως του άνθρακα, στις φιάλες αριθ. 1, 2 και 3 αφενός και στη φιάλη αριθ. 4 αφετέρου, επιτρέπει τη διαφοροποίηση των αιτίων της διασπασιμότητας που παρατηρήθηκε σύμφωνα με:

— το φυσικοχημικό μηχανισμό στη φιάλη αριθ. 4

— το φυσικοχημικό και το βιολογικό μηχανισμό στις φιάλες αριθ. 1, 2 και 3.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

3.1. Έκθεση ελέγχου

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει όλα τα πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν την ελεγχόμενη ουσία, την ουσία αναφοράς και τα τυφλά πειράματα.

Ιδιαίτερα πρέπει να μνημονευθούν τα ακόλουθα σημεία:

— έκταση της εξαφανίσεως του προϊόντος στη φιάλη αριθ. 4 κατά το τέλος του ελέγχου,

— οποιαδήποτε παρεμποδιστικά φαινόμενα που παρατηρήθηκαν,

— απόδειξη εγκυρότητας.

Η πορεία του ελέγχου διασπασιμότητας φαίνεται γραφικά σε ένα διάγραμμα που δείχνει τη φάση καθυστερήσεως, τη φάση της διασπάσεως, την κλίση και τον χρονο-παράθυρο («χρόνος-παράθυρο» εδώ σημαίνει το χρονικό διάστημα 10 ημερών αρχίζοντας από την ημέρα όπου το παρατηρούμενο επίπεδο διασπασιμότητας φθάνει κατ' αρχήν το 10 %).

3.2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Λόγω της αυστηρότητας του ελέγχου αυτού, χαμηλά αποτελέσματα δεν σημαίνουν απαραίτητως ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν είναι βιοδιασπάσιμη σε συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά ότι απαιτείται περισσότερη δουλειά για τον καθορισμό της βιοδιασπασιμότητάς της.

Ελεγχόμενες ουσίες που δίνουν υψηλό αποτέλεσμα απώλειας DOC κατά τον έλεγχο αυτό, πρέπει να θεωρηθούν ότι βιοδιασπώνται εύκολα, με την προϋπόθεση ότι το επίπεδο αυτό διασπάσεως επιτεύχθηκε μέσα σε 10 ημέρες, υπολογίζοντας από την ημέρα που για πρώτη φορά το επίπεδο βιοδιασπάσεως που παρατηρήθηκε ήταν μεγαλύτερο του 10 %.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(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 – 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 – 55.

(4) AFNOR: Method for the evaluation in aqueous medium of the biodegradability of so called «total» of organic products, T 90-302.

Προσάρτημα 1

Έντυπο για την τροποποιημένη μέθοδο AFNOR

Πείραμα αριθ.: .....

Ημερομηνία ενάρξεως του ελέγχου: .....

Ελεγχόμενη ουσία και ουσία συγκρίσεως: .....

Θεωρητικτή συγκέντρωση ελέγχου: .....

Ανάλυση άνθρακα: .....

Προσδιορισμοί άνθρακα

Μέσο καλλιέργειας	Φιάλη αριθ.	Συγκεντρώσεις DOC μετά από x ημέρες (mg/l)				
		t = 0	3	7	14	28 (ημέρες)
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	$\bar{C}_0$	$\bar{C}_3$	$\bar{C}_7$	$\bar{C}_{14}$	$\bar{C}_{28}$
Sterile control	4	4_{C_0}				$4_{C_{28}}$
Glucose control	5	5_{C_0}	5_{C_3}	5_{C_7}	$5_{C_{14}}$	$5_{C_{28}}$
Inhibitory control	6	6_{C_0}	6_{C_3}	6_{C_7}	$6_{C_{14}}$	$6_{C_{28}}$
Blank	7	$C_{bl(0)}$	$C_{bl(3)}$	$C_{bl(7)}$	$C_{bl(14)}$	$C_{bl(28)}$

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

	t = 0	3	7	24	28 (ημέρες)
Test $\left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Glucose control $\left[1 - \frac{5_{Ct} - C_{bl(t)}}{5_{C_0} - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Inhibitory controle $\left[1 - \frac{6_{Ct} - C_{bl(t)}}{6_{C_0} - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				

Εγκυρότητα:

— Διαλελυμένο οξυγόνο στη φιάλη αριθ. 5, την τρίτη ημέρα: ..... mg/l

— Βιοδιασπασιμότητα % στη φιάλη αριθ. 5, την έβδομη ημέρα: ..... %

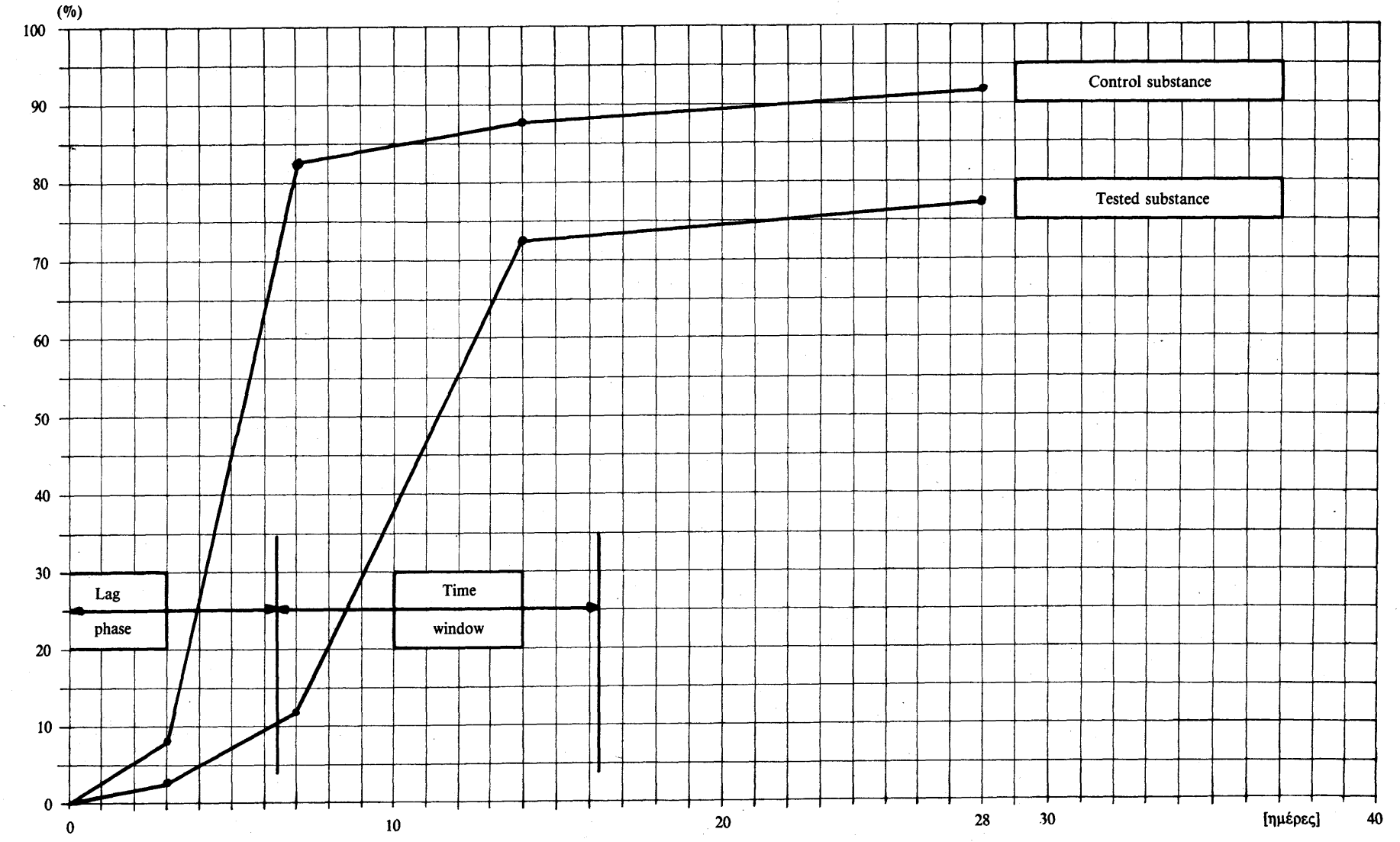
— Βιοδιασπασιμότητα % στη φιάλη αριθ. 6, την έβδομη ημέρα: ..... %

— Ελέγχος αποστειρώσεως στη φιάλη αριθ. 4: .....

Προσάρτημα 2

Τροποποιημένη μέθοδος ελέγχου AFNOR NF T 90/302

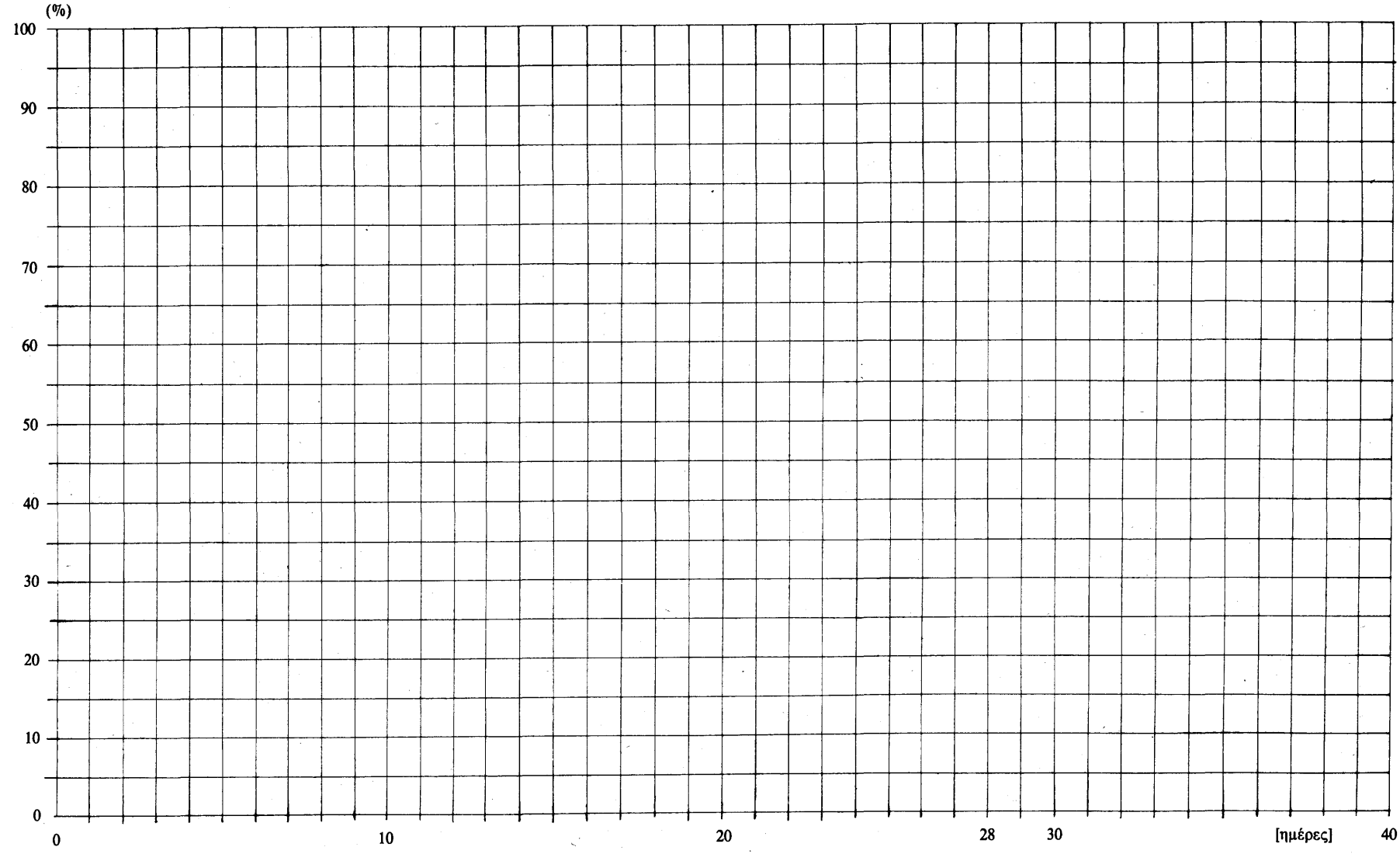
Εργαστήριο ελέγχου: ..... Ελεγχόμενη ουσία: ..... Πείραμα αριθ.: .....



Τροποποιημένη μέθοδος ελέγχου AFNOR NF T 90/302

Εργαστήριο ελέγχου: ..... Ελεγχόμενη σύσια: ..... Πείραμα αριθ.: .....

Κατανάλωση DOC



Γ. 5. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ: ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ STURM

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Ο σκοπός της μεθόδου είναι η μέτρηση της βιοδιασπασιμότητας των μη πτητικών οργανικών ουσιών, σε ένα αερόβιο, υδατικό μέσο, σε δύο αρχικές συγκεντρώσεις των 10 και 20 mg/l (πρότυπες συγκεντρώσεις).

Πρέπει να δίνεται η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα του ελεγχόμενου υλικού. (Ανάλυση TOC ή εκτίμηση με χρησιμοποίηση του εμπειρικού τύπου που θα επιτρέψει τον υπολογισμό της θεωρητικής αποδόσεως σε CO_2.)

Η μέθοδος είναι εφαρμόσιμη μόνον για εκείνα τα ελεγχόμενα οργανικά υλικά τα οποία στην χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση:

— έχουν αμελητέα τάση ατμών,

— δεν παρεμποδίζουν τη δράση των βακτηριδίων.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμόζεται τουλάχιστον κατ' αρχήν για ουσίες οι οποίες είναι λίγο διαλυτές στις συγκεντρώσεις της μεθόδου.

Πληροφορίες για τις σχετικές αναλογίες των σημαντικότερων συστατικών του ελεγχόμενου υλικού θα είναι χρήσιμες στην ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα σε εκείνες τις περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα είναι χαμηλά.

Πληροφορίες για την τοξικότητα της χημικής ουσίας επί των μικροοργανισμών μπορεί να είναι χρήσιμες για την ερμηνεία των χαμηλών αποτελεσμάτων και στην εκλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Η διασπασιμότητα ορίζεται σαν το CO_2 που παράγεται από την ουσία, σαν το επί τοις εκατό ποσοστό του CO_2 που θα έπρεπε θεωρητικά να είχε παραχθεί («$ThCO_2$»), υπολογιζόμενο από τον οργανικό άνθρακα που περιέχεται στην ουσία.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Είναι επιθυμητή η χρησιμοποίηση μιας κατάλληλης χημικής ουσίας ελέγχου συγκρίσεως για τη διαπίστωση της δραστικότητας του εμβολίου.

Η ανιλίν και το οξικό νάτριο η το βενζοϊκό νάτριο μπορούν, π.χ., να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό και θα πρέπει να παράγουν $CO_2 \geqslant 60$ % εντός 28 ημερών. Διαφορετικά ο έλεγχος θεωρείται άκυρος και θα πρέπει να επαναλαμβάνεται χρησιμοποιώντας ένα εμβόλιο από διαφορετική πηγή.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Το ελεγχόμενο υλικό προστίθεται σε ένα χημικώς καθορισμένο υγρό μέσο, που έχει εμβολιασθεί με μικροοργανισμούς λυμάτων και έχει αεριστεί σε 20 έως 25 °C. Η θερμοκρασία καταγράφεται κατά τή διάσκεια της περιόδου ελέγχου.

Το εκλυόμενο CO_2 δεσμεύεται σαν $BaCO_3$ και η διασπασιμότητα ακολουθείται από ανάλυση του CO_2 για περίοδο πάνω από 28 ημέρες. Μετά από αναφορά σε κατάλληλο(υς) τυφλό(ούς) έλεγχο(ους), η ολική

ποσότητα του παραγόμενου από την ελεγχόμενη ένωση CO_2 προσδιορίζεται για την περίοδο ελέγχου και υπολογίζεται σαν επί τοις εκατό ποσοστό του ολικού CO_2, που το ελεγχόμενο υλικό, βάσει της περιεκτικότητάς του σε άνθρακα, θα μπορούσε θεωρητικά να είχε παραγάγει.

Η μέθοδος ελέγχεται με τη βοήθεια μιας συγκριτικής ουσίας ελέγχου του εμβολίου (βλέπε σημείο 1.6.1.3).

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου έχει καθοριστεί από τα διασυγκριτικά πειράματα του ΟΟΣΑ και της ΕΟΚ.

Η ενδογενής παραγωγή CO_2 του εμβολίου, που έχει μετρηθεί στη φιάλη του τυφλού πειράματος, είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας μικρότερη των 5 mg/l. (Όταν η μέθοδος ελέγχου αναφέρεται σε ελεγχόμενη ουσία μαρκαρισμένη με ^{14}C, η συγκέντρωση μπορεί να είναι πολύ μικρότερη.)

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Αντιδραστήρια*

1.6.1.1. Νερό υψηλής ποιότητας (ΝΥΠ)

Διπλά απεσταγμένο νερό, ελεύθερο τοξικών ουσιών (ιδιαίτερα χαλκού), με μικρή περιεκτικότητα σε άνθρακα (< 2,0 mg/l TOC) και ειδική αντίσταση ⩾ 18 megohms.cm. Το απεσταγμένο νερό δεν θα πρέπει να περιέχει περισσότερο από 10 % οργανικό άνθρακα, που να έχει εισαχθεί με το ελεγχόμενο υλικό.

1.6.1.2. Θρεπτικό διάλυμα

α) Αρχικό διάλυμα

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ [εξα-ένυδρος τριχλωριούχος σίδηρος (II)]: διαλύεται και συμπληρώνεται στα 1 000 ml με νερό 1.6.1.1.	0,250 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (επτα-ένυδρο θειικό μαγνήσιο): διαλύεται και συμπληρώνεται στα 1 000 ml με νερό 1.6.1.1.	22,50 g
$CaCl_2$ (χλωριούχο ασβέστιο): διαλύεται και συμπληρώνεται στα 1 000 ml με νερό 1.6.1.1.	27,50 g
KH_2PO_4 (δισόξινο φωσφορικό κάλιο):	8,50 g
K_2HPO_4 (όξινο φωσφορικό κάλιο):	21,75 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (δι-ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο):	33,40 g
NH_4Cl (χλωριούχο αμμώνιο): διαλύονται και συμπληρώνονται στα 1 000 ml με νερό 1.6.1.1.	1,70 g
$(NH_4)_2SO_4$ (θειικό αμμώνιο): διαλύεται και συμπληρώνεται στα 1 000 ml με νερό 1.6.1.1.	40,00 g

β) Μέσο ελέγχο

Το μέσο αυτό πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα αντιδραστήρια ανά λίτρο νερού (1.6.1.1):

— 4 ml του ανωτέρω διαλύματος τριχλωριούχου σιδήρου,

— 1 ml του ανωτέρω διαλύματος θειικού μαγνησίου,

— 1 ml του ανωτέρω διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου,

— 2 ml του ανωτέρω φωσφορικού διαλύματος,

— 1 ml του ανωτέρω διαλύματος θειικού αμμωνίου.

Η τιμή του pH πρέπει να είναι pH = 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Ουσίες συγκρίσεως (ελέγχου)

Ανιλίνη (πρόσφατα απεσταγμένη), οξικό νάτριο, βενζοϊκό νάτριο.

1.6.1.4. Υδροξείδιο του βαρίου 0,025 N (0,0125 M)

Διαλύονται 4,0 g $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ ανά λίτρο ΝΥΠ. Διηθούνται διά μέσου διηθητικού χάρτου και σφραγίζεται το διαυγές διάλυμα, για να αποφευχθεί απορρόφηση CO_2 από τον αέρα. Είναι σωστό να παρασκευάζονται περισσότερα από 5 λίτρα τη φορά όταν υπάρχουν πολλές σειρές.

1.6.2. *Συσκευή*

1.6.2.1. Συσκευή παρατηρήσεως του CO_2

Μια σειρά από 12 carboys (3 ελεγχόμενα υλικά) (Σαν «carboys» εννοούνται εδώ γυάλινες φιάλες των 4 έως 5 λίτρων, καστανού χρώματος. Εάν χρησιμοποιούνται λευκά γυάλινα δοχεία, η μέθοδος πρέπει να διεξάγεται στα σκοτεινά.)

Τέσσερις πλαστικές φιάλες ενός λίτρου, γεμάτες με 700 ml 10 N (10 M) NaOH.

Μια φιάλη Erlenmeyer του ενός λίτρου περιέχουσα 700 ml 0,025 N (0,0125 M) διαλύματος $Ba(OH)_2$.

Μια άδεια φιάλη Erlenmeyer του ενός λίτρου για να προλαμβάνεται η μεταφορά του υγρού.

Οι φιάλες αυτές συνδέονται σε σειρά, χρησιμοποιώντας σωληνώσεις από αδρανές υλικό προς μια πηγή πεπιεσμένου αέρα, και εμφυσάται αέρας με σταθερή ταχύτητα διά μέσου των διαλυμάτων παρακρατήσεως.

Για κάθε πρόσθετη ομάδα τεσσάρων carboys, προστίθεται μια πρόσθετη πλαστική φιάλη του ενός λίτρου γεμάτη με 700 ml 10 N (10 M) NaOH.

1.6.2.2. Συσκευή παραγωγής CO_2

Τέσσερις διαθέσιμες καστανόχρωμες carboys των 4 έως 5 λίτρων.

Βύσματα, εύκαμπτοι σωλήνες, πλαστικοί σωλήνες.

1.6.2.3. Φιάλες απορροφήσεως CO_2

Φιάλες απορροφήσεως με υδροξείδιο του βαρίου των 100 ml.

1.6.3. *Παρασκευή του εμβολίου*

Η πηγή των μικροοργανισμών ελέγχου είναι ενεργοποιημένη λάσπη που έχει πρόσφατα ληφθεί από ένα δημοτικό δίκτυο επεξεργασίας λυμάτων καλής λειτουργίας. Το δίκτυο αυτό επεξεργασίας λυμάτων δεν θα δέχεται ή θα δέχεται ελάχιστα βιομηχανικά απόβλητα.

Μετά την άφιξή της στο εργαστήριο, η ενεργοποιημένη λάσπη αερίζεται για 4 ώρες. 500 ml καλά αναμειχθέντος υγρού δειγματίζεται και ομοιογενοποιείται για 2 λεπτά με μηχανικό αναδευτήρα. Αφήνεται κατόπιν να κατακαθίσει για $^1/_2$ της ώρας.

Εάν το υπερκείμενο υγρό στο τέλος των 30 λεπτών περιέχει ακόμα υψηλό ποσοστό στερεάς λάσπης, μπορεί να αφεθεί σε ηρεμία για 30 έως 60 πρόσθετα λεπτά ακόμη, για να κατακαθίσει ή να προσαρμοσθεί στις συνθήκες του εργαστηρίου, προκειμένου να βελτιωθεί η ικανότητα καθιζήσεώς του.

Το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζεται για να εξασφαλισθεί επαρκής όγκος εμβολίου 1 % για κάθε φιάλη ελέγχου CO_2. Πρέπει να αποφεύγεται μεταφορά στερεάς λάσπης που θα μπορούσε να επηρεάσει τη μέτρηση παραγωγής CO_2.

Αν και προαιρετικές, είναι χρήσιμο να εκτελούνται βιώσιμες αριθμήσεις στο υπερκείμενο τμήμα, για τον προσδιορισμό του αριθμού μικροβίων. Το εμβόλιο αυτό θα πρέπει κανονικά να περιέχει 10^6 έως 20×10^6 μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά ml. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα της παρασκευής του.

1.6.4. *Πορεία του ελέγχου*

1.6.4.1. Αρχικό διάλυμα

Παρασκευάζεται αρχικό διάλυμα της ουσίας που πρόκειται να ελεγχθεί με διάλυσή της σε νερό υψηλής ποιότητας, συγκεντρώσεως 1 000 mg/l.

Τα αρχικά διαλύματα γίνονται με βάση το ποσοστό οργανικού άνθρακα στο ελεγχόμενο υλικό. Εάν η εκατοστιαία σύσταση του υλικού είναι άγνωστη, τα αρχικά διαλύματα συμπληρώνονται σε κάποια συγκέντρωση επί τη βάσει βάρους. Για να ληφθεί ένα ομοιογενές δείγμα, είναι αναγκαία καλή ανάμειξη, με αποφυγή κάθε αφρισμού, που θα μπορούσε να προκαλέσει συμπύκνωση της ουσίας ελέγχου. Για στερεά δείγματα μπορεί να είναι αναγκαίο να τακούν και το σύνολο του περιεχομένου της φιάλης να αναμειχθεί πριν ληφθεί μέρος απ' αυτό. Το μέρος αυτό της διαδικασίας είναι εξαιρετικά σημαντικό γιατί οι υπολογισμοί του ποσοστού βιοδιασπασιμότητας εξαρτώνται από το πόσο υπάρχει η σωστή ποσότητα άνθρακα στο ελεγχόμενο σύστημα.

Το pH του αρχικού διαλύματος δεν χρειάζεται να ρυθμισθεί, εκτός εάν είναι έξω από την περιοχή του 3 – 10 αφού θα το ελέγχει το φωσφορικό διάλυμα στο μέσο ελέγχου. Εάν το pH είναι έξω από την περιοχή αυτή, ρυθμίζεται ένα μέρος του αρχικού διαλύματος σε pH 7,0 (± 1,0) με 1N (1M) HCl ή NaOH εξασφαλίζοντας ότι το διάλυμα αναμειγνύεται καλά κατά την προσθήκη του οξέος ή της βάσεως.

Για επιβεβαίωση της ονομαστικής συγκεντρώσεως ή του οργανικού άνθρακα της ελεγχόμενης ουσίας, το αρχικό παρασκεύασμα (ή το εξουδετερωμένο μέρος) μπορεί να αναλυθεί για τον ολικό οργανικό άνθρακα. Μια ανάλυση TOC απαιτείται επίσης και για τον συγκριτικό έλεγχο του αρχικού διαλύματος.

Εάν ένα ελεγχόμενο υλικό είναι αδιάλυτο στο νερό, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα απ' αυτό απευθείας στη φιάλη carboy με βάση το βάρος ή τον όγκο.

Εάν το ελεγχόμενο υλικό δεν είναι διαλυτό στη συγκέντρωση του ελέγχου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ειδικές διαδικασίες, όπως η χρήση διασποράς με υπερήχους, για να επιτευχθεί μια καλή διασπορά του ελεγχόμενου υλικού.

1.6.4.2. Συνθήκες

Αφού στη μέθοδο CO_2 χρησιμοποιείται εμβόλιο 1 %, είναι αναγκαίο να γίνουν αραιώσεις στο μέσο ελέγχου του CO_2.

Αυτό επιτυγχάνεται πολύ εύκολα όπως κατωτέρω:

α) Σε καθεμία από τις φιάλες ελέγχου των 4 έως 5 λίτρων, προστίθενται 2 470 ml του νερού υψηλής ποιότητας (ΝΥΠ, βλέπε σημείο 1.6.1.1).

β) Σε καθεμία από τις φιάλες ελέγχου των 4 έως 5 λίτρων προστίθενται 3 ml από καθένα από τα αρχικά διαλύματα θειικού αμμωνίου, θειικού μαγνησίου και χλωριούχου ασβεστίου, προστίθενται 6 ml φωσφορικού αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος και 12 ml διαλύματος τριχλωριούχου σιδήρου.

γ) Σε καθεμία από τις φιάλες ελέγχου των 4 έως 5 λίτρων, προστίθενται 30 ml από το ενεργοποιημένο εμβόλιο λάσπης.

Το μείγμα αυτό αερίζεται επί 24 ώρες με αέρα απαλλαγμένο από CO_2, προκειμένου να καθορισθεί το σύστημα του διοξειδίου του άνθρακα.

Μετά την περίοδο αερισμού, τρεις φιάλες απορροφήσεως CO_2 γεμίζονται μέ 100 ml 0,025 N (0,0125 M) $Ba(OH)_2$ και συνδέονται σε σειρά με τη γραμμή εξόδου του αέρα από καθεμία από τις φιάλες ελέγχου carboy.

1.6.4.3. Εκτέλεση του ελέγχου

Το ελεγχόμενο υλικό προστίθεται σε δύο από τις τέσσερις φιάλες carboys και αρχίζει η περίοδος ελέγχου. Κάθε υλικό ελέγχεται σε δύο συγκεντρώσεις: 10 και 20 mg/l.

Η ποσότητα αρχικού διαλύματος του ελεγχόμενου υλικού που απαιτείται στην φιάλη carboy υπολογίζεται ως ακολούθως:

$$\text{ml του αρχικού διαλύματος ανά carboy} = \frac{B \times C}{A}$$

όπου:

B είναι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στη φιάλη ελέγχου (mg/l)

A είναι η συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας στο αρχικό διάλυμα (mg/l)

C είναι ο τελικός όγκος του μέσου ελέγχου στη φιάλη carboy (ml).

Στις κατάλληλες φιάλες carboy προστίθεται αρκετό αρχικό διάλυμα μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση ελέγχου, όπως υπολογίστηκε ανωτέρω, και επιπλέον αρκετό απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 473 ml (αρχικό διάλυμα + ΝΥΠ). Στην τρίτη φιάλη carboy που χρησιμοποιείται σαν τυφλό πείραμα και δεν περιέχει ελεγχόμενο υλικό, προστίθενται 473 ml ΝΥΠ. Ο τελικός όγκος τώρα σε κάθε φιάλη είναι 3 000 ml.

Προστίθεται μια ουσία συγκρίσεως σε συγκέντρωση 20 mg/l, στην τελευταία από τις τέσσερις φιάλες carboy.

Ο έλεγχος αρχίζει με την εμφύσηση αέρα διά μέσου του διαλύματος, απαλλαγμένου από CO_2, με ταχύτητα 50 έως 100 ml/min ανά carboy (= 1 έως 2 φυσαλίδες/δευτερόλεπτο).

Αδιάλυτα στο νερό ελεγχόμενα υλικά μπορούν να τοποθετηθούν ξηρά στη φιάλη carboy CO_2 και να αναδεύονται με μαγνητικό αναδευτήρα. Για χημικές ουσίες που αφρίζουν, η εμφύσηση αέρα απαλλαγμένου CO_2 μπορεί να αντικατασταθεί με αερισμό του νεκρού χώρου και μαγνητική ανάδευση.

Το παραγόμενο CO_2 σε κάθε φιάλη αντιδρά με το υδροξείδιο του βαρίου και καταβυθίζεται σαν ανθρακικό βάριο. Η ποσότητα CO_2 που παράγεται προσδιορίζεται με τιτλοδότηση του εναπομείναντος $Ba(OH)_2$ με 0,05N (0,05M) HCl. Περιοδικά (κάθε δύο ή τρεις ημέρες) αφαιρείται ο απορροφητής CO_2 κοντά στη φιάλη carboy για τιτλοδότηση. Οι δύο απορροφητές που παραμένουν μετακινούνται ο καθένας μια θέση πιο κοντά στη φιάλη carboy και ένας νέος απορροφητής τοποθετείται στο τέλος της σειράς με 100 ml πρόσφατου 0,025 N (0,0125 M) $(Ba(OH)_2$.

Οι τιτλοδοτήσεις γίνονται όταν χρειάζονται (πριν εμφανισθεί στη δεύτερη παγίδα ίζημα $BaCO_3$) κατά προσέγγιση ημέρα παρά ημέρα για τις πρώτες 10 ημέρες και κάθε πέντε ημέρες μέχρι την 28η ημέρα.

Την 27η ημέρα μετριέται πάλι το pH του περιεχομένου στη φιάλη carboy και προστίθεται 1 ml πυκνού HCl σε καθεμία από τις φιάλες ελέγχου, για την απομάκρυνση ανοργάνων ανθρακικών αλάτων. Οι carboy αερίζονται όλη τη νύχτα και λαμβάνονται δείγματα από κάθε φιάλη για ανάλυση DOC. Η τελική τιτλοδότηση γίνεται την 28η ημέρα.

Γίνονται τιτλοδοτήσεις στο διάλυμα 100 ml $Ba(OH)_2$ μετά την αφαίρεση των φιαλών που βρίσκονται πλησιέστερα στις carboy. Το $Ba(OH)_2$ τιτλοδοτείται με 0,05 N (0,05 M) HCl με δείκτη φαινολοφθαλεΐνη.

Η μέθοδος διεξάγεται στη θερμοκρασία δωματίου 20 έως 25 °C και η θερμοκρασία καταγράφεται κατά τη διάρκεια της περιόδου ελέγχου.

Εάν πριν από την 28η ημέρα παρατηρηθεί ένα πλατώ, ο έλεγχος μπορεί να θεωρηθεί τελειωμένος.

Εάν προφανώς η βιοδιάσπαση έχει αρχίσει περί από την 28η ημέρα, αλλά δεν έχει φθάσει ένα πλατώ την 28η ημέρα, θεωρείται ότι είναι καλή πρακτική η παράταση του πειράματος για μία έως δύο εβδομάδες περισσότερο.

1.6.5. *Προσδιορισμός CO_2*

Θα μπορούσε να ληφθούν υπόψη άλλοι τρόποι μετρήσεως της εκλύσεως CO_2 εκτός από την τιτλοδότηση της περίσσειας $Ba(OH)_2$ σε παγίδες. Αυτό δεν αλλάζει την αρχή της μεθόδου αυτής και είναι δυνατόν να μπορούσε να οδηγήσει σε συνεχή ανάγνωση της βιοδιασπάσεως όπως αυτή εξελίσσεται.

Το πρώτο βήμα στον υπολογισμό της ποσότητας του CO_2 που παράγεται είναι η διόρθωση του ελεγχόμενου υλικού των φιαλών carboy για ενδογενή παραγωγή CO_2. Η carboy του συγκριτικού ελέγχου χρησιμεύει σαν τυφλό πείραμα για τη διόρθωση του CO_2 που μπορεί να παράγεται μέσω ενδογενούς αναπνοής των βακτηριδίων. Η ποσότητα CO_2 που παράγεται από ένα ελεγχόμενο υλικό προσδιορίζεται από τη διαφορά (σε ml διαλύματος) μεταξύ του πειραματικού και του τυφλού $Ba(OH)_2$ των παγίδων.

Όταν χρησιμοποιείται 0,05 N (0,05 M) HCl στην τιτλοδότηση της φιάλης στην οποία γίνεται η απορρόφηση, κάθε ml HCl αντιστοιχεί σε 1,1 mg παραγόμενου CO_2.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ**

Τα αναλυτικά αποτελέσματα καταγράφονται στο συνημμένο ειδικό φύλλο (προσάρτημα 1) και οι τιμές βιοδιασπασιμότητας υπολογίζονται σύμφωνα με το σημείο 1.2.

Οι συγκεντρώσεις CO_2 υπολογίζονται στο πλησιέστερο 0,1 mg/l. Οι τιμές βιοδιασπασιμότητας στρογγυλεύονται στην πλησιέστερη επί τοις εκατό μονάδα.

Η πορεία του ελέγχου διασπασιμότητας παρακολουθείται γραφικά σε ένα διάγραμμα, όπως φαίνεται στο συνημμένο παράδειγμα (προσάρτημα 2).

Τα αποτελέσματα του ελέγχου διασπασιμότητας ισχύουν, αν πληρούνται οι ακόλουθες συνθήκες:

— ότι στις σειρές του ίδιου ελέγχου το υλικό συγκρίσεως παρέχει βιοδιασπασιμότητα $\geqslant$ 60 % μέσα σε 28 ημέρες (Αν δεν συμβαίνει αυτό, όλες οι σειρές απορρίπτονται και επαναλαμβάνονται με εμβόλιο από άλλη πηγή.)·

— ότι δεν εκλύεται σημαντική ποσότητα CO_2 από τη φιάλη του τυφλού κατά τη διάρκεια του ελέγχου (μόλυνση του μέσου, των γυάλινων σκευών και εξαρτημάτων και του αέρα). Η συνολική έκλυση CO_2 στο τέλος του ελέγχου δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 50 mg CO_2/3 l μέσου.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

3.1. Έκθεση ελέγχου

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει:

— τα δεδομένα που πρέπει να αναφέρονται σύμφωνα με το ειδικό φύλλο (προσάρτημα 2),

— την πορεία του ελέγχου διασπασιμότητας που να αναπαριστάται γραφικά σε ένα γράμμα που δείχνει τη φάση καθυστερήσεως, τη φάση διασπάσεως, την κλίση και το χρόνο-παράθυρο («χρόνος-παράθυρο» εδώ σημαίνει ένα χρονικό διάστημα 10 ημερών που αρχίζει από την ημέρα όπου το παρατηρούμενο επίπεδο διασπασιμότητας φθάνει κατ' αρχήν το 10 %),

— τις συνθήκες διασποράς για ουσίες που δεν είναι διαλυτές υπό τις συνθήκες του ελέγχου,

— την ένδειξη της χρονολογίας και του τόπου όπου οι οργανισμοί δειγματίστηκαν και της μεταχειρίσεως που έτυχαν πριν τον εμβολιασμό,

— η περιοχή θερμοκρασίας που έχει καταγραφεί κατά τη διάρκεια της περιόδου ελέγχου,

— τον αριθμό των μικροοργανισμών ανά ml (μονάδες σχηματισμού αποικιών — ΜΣΑ/ml), εάν έχουν μετρηθεί, όπως έχει υποδειχθεί στο σημείο 1.6.2,

— απόδειξη εγκυρότητας του ελέγχου (ουσία συγκρίσεως 60 %, διασπασιμότητα σε 28 ημέρες).

3.2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Ένεκα της αυστηρότητας του ελέγχου αυτού, χαμηλό αποτέλεσμα δεν σημαίνει ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν είναι βιοδιασπάσιμη υπό συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά δείχνει ότι χρειάζεται περισσότερη δουλειά για να αποδειχθεί αυτό.

Χημικές ουσίες που δίνουν υψηλό αποτέλεσμα βιοδιασπασιμότητας στον έλεγχο αυτό πρέπει να θεωρούνται σαν εύκολα βιοδιασπάσιμες, αρκεί να φθάνουν σ' αυτό το αποτέλεσμα εντός 10 ημερών από την ημέρα που η στάθμη βιοδιασπασιμότητας ξεπέρασε για πρώτη φορά το 10 %.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(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 – 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 – 55.

(4) Larson, R. J., Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 38, 1979, p. 1153 – 1161.

Προσάρτημα 1

Ειδικό φύλλο για την τροποποιημένη μέθοδο Sturm

Πείραμα αριθ.: .....

Ημερομηνία ενάρξεως του ελέγχου: .....

Υλικό ελέγχου συγκρίσεως: .....

Θεωρητική συγκέντρωση ελέγχου: .....

Ανάλυση άνθρακα: .....

Θεωρητικό $ThCO_2$: .....

Περιοχή θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του ελέγχου: .....

Παραγωγή CO_2: .....

Ημέρες	Ευρεθέν CO_2 mg	Συσσωρευτικό CO_2 mg	% $ThCO_2$
28			

Εγκυρότητα:

— % βιοδιασπασιμότητα του υλικού συγκρίσεως,

— συνολικό εκλυθέν ποσό CO_2 στη φιάλη του τυφλού.

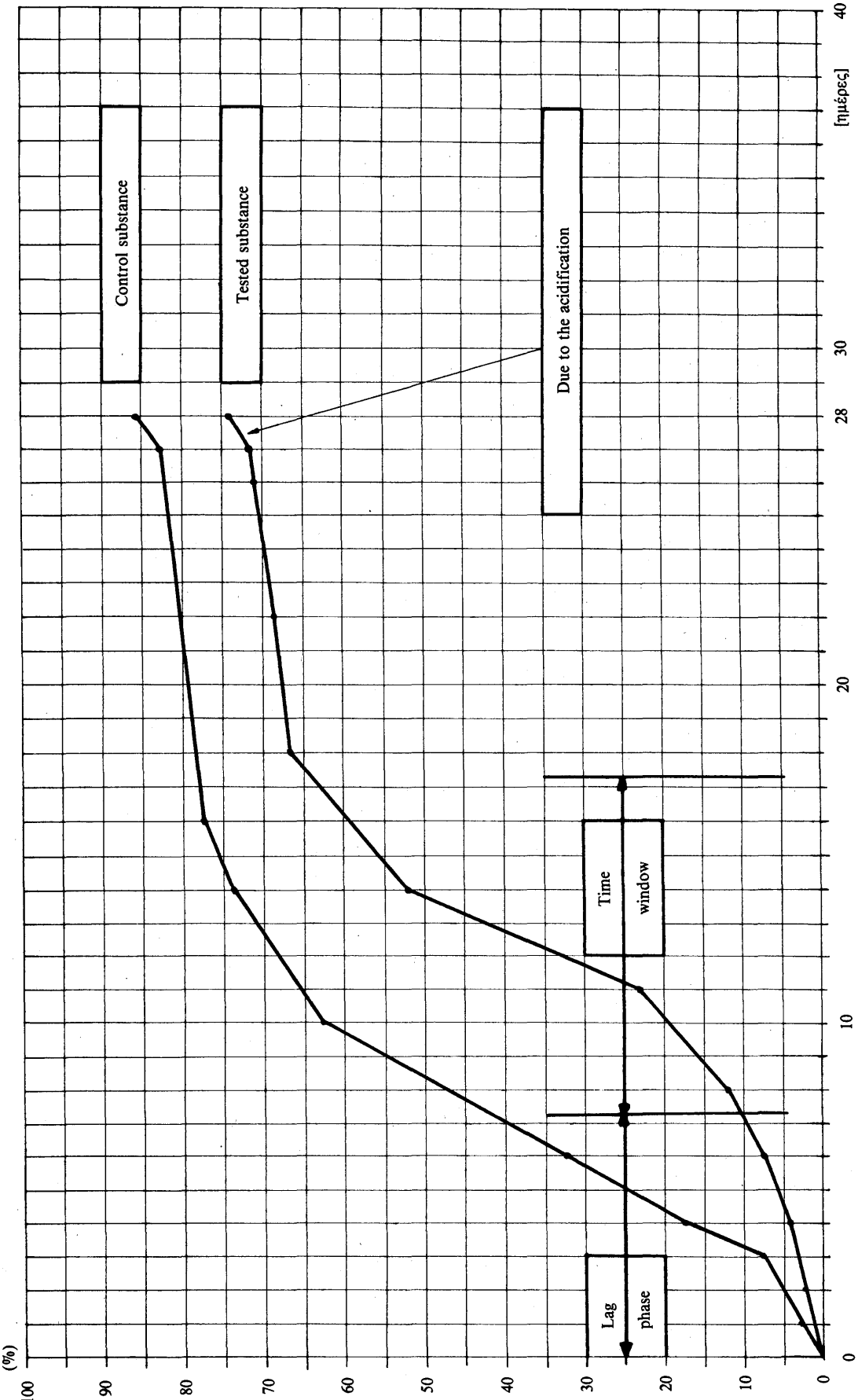
Προσάρτημα 2

Τροποποιημένη μέθοδος Sturm

Εργαστήριο ελέγχου: ..... Πείραμα αριθ.: .....

Ελεγχόμενη ουσία: .....

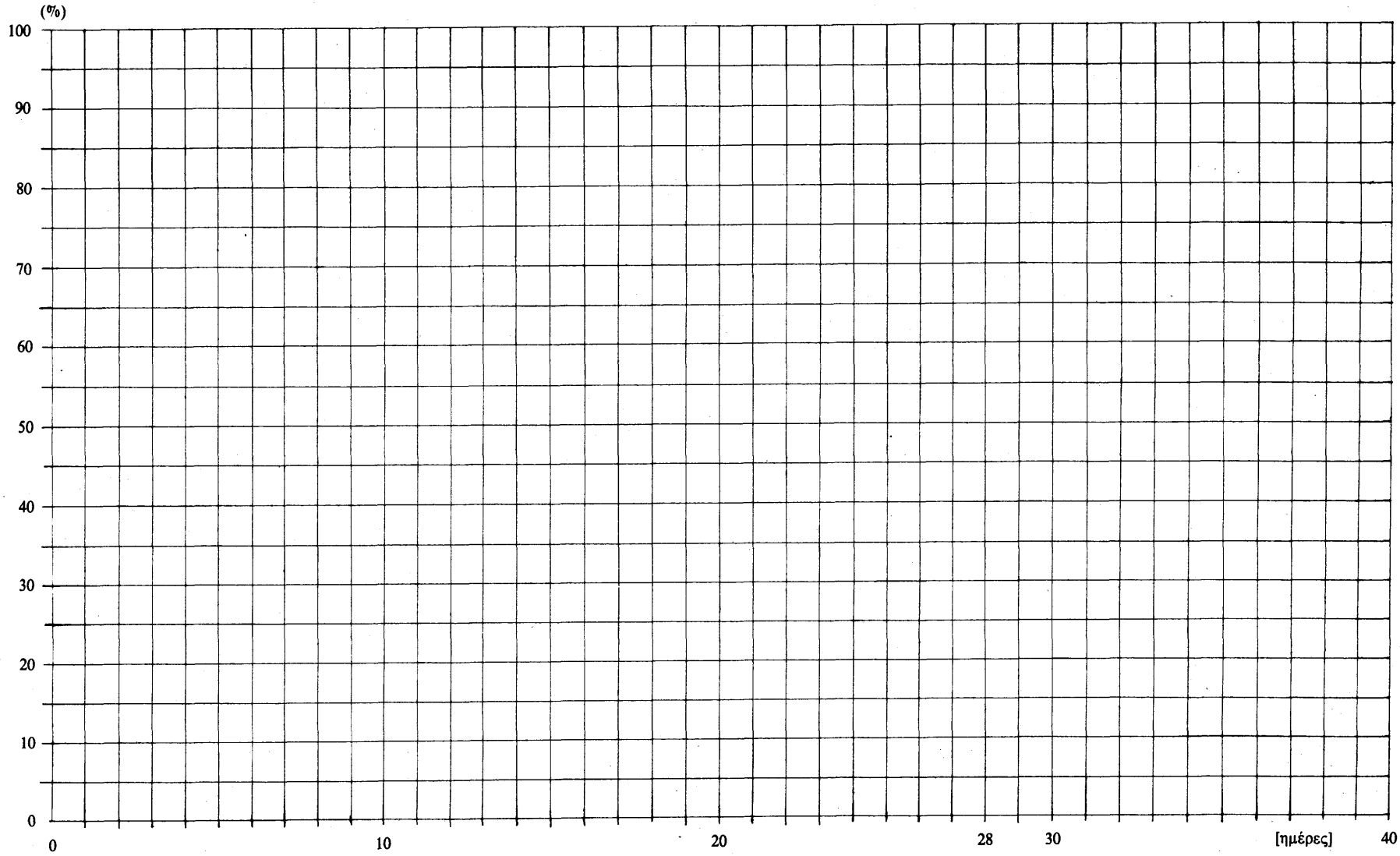
Βιοδιασπασιμότητα (%)



Τροποποιημένη μέθοδος Sturm

Εργαστήριο ελέγχου: ..... Ελεγχόμενη ουσία: ..... Πείραμα αριθ.: .....

Βιοδιασπασιμότητα



Γ. 6. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ: ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Σκοπός της μεθόδου είναι η μέτρηση της βιοδιασπασιμότητας των οργανικών ουσιών σε αερόβιο υδατικό μέσο, σε συγκέντρωση 2 (πρότυπη συγκέντρωση) έως 10 mg/l της ελεγχόμενης ουσίας.

Στην παρούσα κατάσταση αναπτύξεως, ο έλεγχος είναι ειδικά κατάλληλος για την εκτίμηση της βιοδιασπασιμότητας των υδατοδιαλυτών ενώσεων. Πάντως, μπορούν να ελεγχθούν επίσης, τουλάχιστον κατ' αρχήν, τόσο οι πτητικές ενώσεις όσο και οι λίγο διαλυτές ενώσεις.

Απαιτείται ο εμπειρικός τύπος του ελεγχόμενου υλικού για να μπορεί να υπολογισθεί το θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD). Εάν δεν είναι γνωστό, μπορεί να χρησιμεύσει σαν τιμή αναφοράς, το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD), (προσάρτημα 1).

Η μέθοδος είναι εφαρμόσιμη μόνο για τα ελεγχόμενα οργανικά υλικά, τα οποία, στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο, δεν παρεμποδίζουν την ανάπτυξη βακτηριδίων. Εάν το ελεγχόμενο υλικό δεν είναι διαλυτό στη συγκέντρωση του ελέγχου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ειδικές μετρήσεις, όπως η χρήση διασποράς με υπερήχους, για να επιτευχθεί καλή διασπορά του ελεγχόμενου υλικού.

Είναι χρήσιμες, για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται, πληροφορίες για τις σχετικές αναλογίες των σπουδαιοτέρων συστατικών του ελεγχόμενου υλικού, ιδιαίτερα για τις περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα είναι χαμηλά.

Πληροφορίες για την τοξικότητα της χημικής ουσίας στους μικροοργανισμούς μπορεί να είναι χρήσιμες για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και για την επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του BOD.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

Το βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (BOD) υπολογίζεται ως η διαφορά της ελαττώσεως του οξυγόνου, μεταξύ ενός τυφλού και ενός διαλύματος του ελεγχόμενου υλικού κάτω από τις συνθήκες της μεθόδου. Μετά από διαίρεση με τη συγκέντρωση (W/V) της ουσίας, λαμβάνεται η καθαρή ελάττωση του οξυγόνου σε mg BOD/mg ουσίας.

Η διασπασιμότητα καθορίζεται ως ο λόγος του βιοχημικώς απαιτούμενου οξυγόνου είτε προς το θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD) είτε προς το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD), εκπεφρασμένος επί τοις εκατό.

Παρατήρηση:

Πολλές φορές οι δύο τρόποι υπολογισμού (επί τοις % του ThOD ή επί τοις % του COD) δεν δίνουν τα ίδια αποτελέσματα.

$$\% \text{ βιοδιασπασιμότητα (ThOD)} = \frac{\text{mg } O_2/\text{mg ελεγχόμενης ουσίας}}{\text{ThOD}} \times 100$$

ή

$$\% \text{ βιοδιασπασιμότητα (COD)} = \frac{\text{mg } O_2/\text{mg ελεγχόμενης ούσιας}}{\text{mg COD/mg ελεγχόμενης ούσιας}} \times 100$$

όπου:

ThOD = θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο (για τον υπολογισμό βλέπε προσάρτημα 1)

COD = χημικώς αποιτούμενο οξυγόνο, προσδιοριζόμενο πειραματικά.

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Είναι επιθυμητή η χρήση κατάλληλων χημικών ουσιών συγκρίσεως για τη δραστικότητα του εμβολίου.

Η ανιλίνη, το οξικό νάτριο ή το βενζοϊκό νάτριο (για παράδειγμα) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό και θα πρέπει να παράγουν διασπασιμότητα ⩾ 60 % σε 28 ημέρες, διαφορετικά ο έλεγχος θεωρείται άκυρος και θα πρέπει να επαναλαμβάνεται χρησιμοποιώντας ένα εμβόλιο από διαφορετική πηγή.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Γνωστή ποσότητα ουσίας διαλύεται σε ένα ανόργανο μέσο (θρεπτικό διάλυμα ανοργάνων αλάτων), παρέχουσα συγκέντρωση ελεγχόμενης ουσίας συνήθως 2 mg ανά λίτρο. Το διάλυμα εμβολιάζεται με μικρό αριθμό μικροοργανισμών από ανάμεικτο πληθυσμό και διατηρείται στα σκοτεινά, σε κλειστές φιάλες και σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας ή θάλαμο (20 έως 21 °C).

Η διασπασιμότητα ακολουθείται από αναλύσεις οξυγόνου για περίοδο άνω των 28 ημερών. Η πορεία ελέγχεται μέσω μιας συγκριτικής ουσίας εμβολίου.

Πρέπει να γίνεται παράλληλα ένα τυφλό πείραμα οξυγόνου, στο οποίο δεν θα περιέχεται ούτε το ελεγχόμενο υλικό ούτε το υλικό συγκρίσεως.

Ταυτόχρονα η ελεγχόμενη ουσία μπορεια να ελέγχεται για πιθανή παρεμποδιστική επίδραση πάνω στο εμβόλιο.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου έχει καθοριστεί από τα διασυγκριτικά πειράματα του ΟΟΣΑ και της ΕΟΚ.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Αντιδραστήρια*

1.6.1.1. Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, που περιέχει όχι περισσότερο του 0,01 mg Cu/l κεκορεσμένο αέρα. Ο όγκος, σύμφωνα με τις ανάκγες της ημέρας (π.χ. 50 l), φυλάσσεται στη θερμοκρασία δωματίου όσο το δυνατό πλησιέστερα στους 20 °C και αερίζεται δυνατά για 20 λεπτά με καθαρό συμπιεσμένο αέρα. Γενικά, το νερό είναι έτοιμο για χρήση μετά από παραμονή 20 ωρών στους 20 °C. Το οξυγόνο προσδιορίζεται για λόγους συγκριτικού ελέγχου. Η συγκέντρωση στους 20 °C πρέπει να είναι 9,09 mg O_2/l. Κάθε εργασία μεταφοράς και συμπληρώσεως του κεκορεσμένου με αέρα νερού, πρέπει να γίνεται χωρίς παφλασμό, με σιφώνιο.

1.6.1.2. Θρεπτικό διάλυμα

α) Αρχικά διαλύματα:

KH_2PO_4 (δισόξινο φωσφορικό κάλιο):	8,50 g
K_2HPO_4 (όξινο φωσφορικό κάλιο):	21,75 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (δι-ενυδρο-όξινο φωσφορικό νάτριο):	33,30 g
NH_4Cl (χλωριούχο αμμώνιο):	1,70 g

διαλύονται και συμπληρώνονται σε 1 000 ml με απεσταγμένο νερό.

Η τιμή pH πρέπει να είναι pH = 7,2

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (επτα-ένυδρο θειικό μαγνήσιο):	22,50 g

διαλύεται και συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό στα 1 000 ml.

$CaCl_2$ (χλωριούχο ασβέστιο):	27,50 g

διαλύεται και συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό στα 1 000 ml.

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ [εξα-ένυδρος τριχλωριούχος σίδηρος (III)]:	0,25 g

διαλύεται και συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό στα 1 000 ml.

β) Μέσο ελέγχου

Το μέσο ελέγχου θα περιέχει 1 ml από καθένα από τα παραπάνω αρχικά διαλύματα ανά λίτρο νερού.

Η τιμή pH πρέπει να είναι pH = 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Ουσίες συγκρίσεως (ελέγχου)

Ανιλίνη (πρόσφατα απεσταγμένη), οξικό νάτριο, βενζοϊκό νάτριο.

1.6.2. *Συσκευή*

1.6.2.1. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν βαθμονομημένες φιάλες BOD, 250 έως 300 ml, με γυάλινα πώματα, ή μη βαθμονομημένες φιάλες με στενό λαιμό των 250 ml, με γυάλινα πώματα των οποίων ο όγκος έχει προσδιορισθεί.

1.6.2.2. Αρκετές φιάλες των 2, 3 και 5 l, με σημείο χαραγής του λίτρου, για την προετοιμασία του πειράματος και για το γέμισμα των φιαλών του BOD.

1.6.2.3. Σιφώνια όγκου 1 μέχρι 10 ml

Χωνιά και κοινό διηθητικό χαρτί.

Φιάλες για την παρασκευή του εμβολίου.

1.6.2.4. Υδρόλουτρο για τη διατήρηση των φιαλών σε σταθερή θερμοκρασία και με αποκλεισμό φωτός.

1.6.3. *Παρασκευή του εμβολίου*

Οποιαδήποτε από τις ακόλουθες τέσσερις πηγές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν εμβόλιο του οποίου η βιωσιμότητα ελέγχεται μέσω των συγκριτικών ουσιών ελέγχου (1.6.1.3).

1.6.3.1. Εμβόλιο από το έδαφος

Υδατικό αιώρημα εδάφους από κήπο που δεν έχει λιπανθεί, 100 g εδάφους κήπου που δεν έχει πρόσφατα λιπανθεί (είναι ιδιαίτερα προνομιούχο το έδαφος από θερμοκήπιο, σταθερής θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του έτους) διασπείρονται σε 1 λίτρο ύδατος υδρεύσεως, όχι χλωριωμένο. Μετά από 30 λεπτά το αιώρημα διηθείται από κοινό διηθητικό χαρτί και τα πρώτα 200 ml του διηθήματος απορρίπτονται. Το επόμενο μεγαλύτερο μέρος του διηθήματος χρησιμεύει για τον εμβολιασμό (μία σταγόνα από ένα αιχμηρό σιφώνιο ανά λίτρο τελικού όγκου). Το εμβόλιο παρασκευάζεται αμέσως πριν από το πείραμα. Πρέπει να αεριστεί, εάν πρόκειται να μείνει για μερικές ώρες. Ο αριθμός των βακτηριδίων μπορεί να προσδιορισθεί με δίσκο αριθμήσεως ή με ειδικές διατάξεις με θρεπτικό υλικό. Δεν πρέπει να είναι περισσότερα από 10^3 έως 10^5 βακτηρίδια ανά χιλιοστόλιτρο τελικού όγκου.

1.6.3.2. Εμβόλιο από δευτερογενή απόβλητα

Το εμβόλιο παρασκευάζεται κατά προτίμηση από δευτερογενή εγκατάσταση (εγκατάσταση ενεργοποιημένης λάσπης ή από βραδέως ρέον φίλτρο συνδεδεμένο με οικιακά κυρίως λύματα). Τα απόβλητα στην περίοδο μεταξύ δειγματοληψίας και χρησιμοποιήσεως πρέπει να διατηρούνται κάτω από αερόβιες συνθήκες. Για την παρασκευή του εμβολίου το δείγμα διηθείται μέσω κοινού διηθητικού χάρτου. Τα πρώτα 200 ml απορρίπτονται. Το υπόλοιπο του διηθήματος φυλάσσεται κάτω από αερόβιες συνθήκες μέχρι της χρησιμοποιήσεώς του. Το εμβόλιο πρέπει να χρησιμοποιηθεί την ημέρα της συλλογής.

1.6.3.3. Εμβόλιο από εργαστηριακά ενεργοποιημένη λάσπη

Χρησιμοποιούνται τα απόβλητα από ισχυρώς αεριζόμενη και εργαστηριακά ενεργοποιημένη λάσπη. Το εμβόλιο παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο 1.6.3.2.

1.6.3.4. Σύνθετο εμβόλιο

Ίσοι όγκοι από τρία δείγματα εμβολίου (1.6.3.1 έως 1.6.3.3) αναμειγνύονται καλά και το τελικό εμβόλιο λαμβάνεται από το μείγμα αυτό.

1.6.4. *Πορεία ελέγχου*

Όλοι οι αναγκαίοι χειρισμοί πριν από την επώαση εκτελούνται περίπου στους 20 °C.

Ετοιμάζονται ομάδες φιαλών (1.6.2.1) για τον προσδιορισμό του BOD της ελεγχόμενης ουσίας και της ουσίας συγκρίσεως σε ταυτόχρονες πειραματικές σειρές. Εάν εκτελούνται συγχρόνως και χημικές αναλύσεις, πρέπει να ετοιμαστεί επαρκής αριθμός φιαλών (συμπεριλαμβανομένων των συγκριτικών ελέγχων για το εμβόλιο και το τυφλό)· π.χ. ετοιμάζονται επτά ή 15 παράλληλες φιάλες για κάθε ελεγχόμενο υλικό για τους ελέγχους των 0, 5, 15 και 28 ημερών αφού ετοιμασθεί σε μεγάλες φιάλες ένας επαρκής όγκος νερού (1.6.2.2).

Οι μεγάλες αυτές φιάλες γεμίζονται πρώτα με σιφώνιο κατά το ένα τρίτο του όγκου τους με απεσταγμένο νερό (1.6.1.1). Μετά, τα ατομικά αλατούχα αρχικά διαλύματα (1.6.1.2) μεταφέρονται στις φιάλες αυτές σύμφωνα με τον τελικό όγκο και προστίθεται το αντίστοιχο ελεγχόμενο υλικό ή το υλικό συγκρίσεως, σε τέτοιες ποσότητες, ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις να φθάσουν τα 2 και καμιά φορά τα 5 ή 10 mg/l.

Η συγκέντρωση των 9 mg περίπου διαλελυμένου οξυγόνου ανά λίτρο ύδατος αραιώσεως, στους 20 °C, περιορίζει την πιθανή αρχική συγκέντρωση του ελεγχόμενου υλικού σε 2 mg/l περίπου, προκειμένου να εξασφαλισθεί μια σημαντική συγκέντρωση παραμένοντος οξυγόνου μετά από την οξείδωση της ελεγχόμενης ουσίας.

Οι ουσίες που είναι λίγο διασπάσιμες ή είναι χαμηλού ThOD ελέγχονται κατά τρόπο πλεονεκτικό εκ παραλλήλου, σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ακολούθως γίνεται ο εμβολισμός των διαλυμάτων με μία σταγόνα, με τη βοήθεια σιφωνίου, για κάθε λίτρο τελικού όγκου και κατά τον ίδιο τρόπο το τυφλό.

Τελικά το διάλυμα συμπληρώνεται στον κανονικό όγκο με σιφώνιο, το οποίο φθάνει στον πυθμένα της φιάλης. Αυτό εξασφαλίζει επαρκή ανάμειξη. Μετά κάθε ετοιμαζόμενο διάλυμα, συμπληρώνεται αμέσως στην αντίστοιχη ομάδα φιαλών, με σιφώνιο, από το χαμηλότερο τέταρτο της φιάλης (όχι από τον πυθμένα).

Περαιτέρω, γίνονται ή φυλάσσονται για τη μετέπειτα αναλύση οι έλεγχοι του μηδενός [για τον προσδιορισμό του O_2 με καταβύθιση με $MnCL_2$ (χλωριούχο μαγγάνιο) και NaOH (υδροξείδιο νατρίου)].

Οι υπόλοιπες φιάλες τοποθετούνται σε υδρόλουτρο στους 20 °C, φυλάσσονται στα σκοτεινά, παίρνονται από το λουτρό ή το θάλαμο ύστερα από 5, 15 και 28 ημέρες, αντίστοιχα, και μετά αναλύονται.

Κάθε σειρά συνοδεύεται από μια πλήρη παράλληλη σειρά για τον προσδιορισμό του τυφλού, της ελαττώσεως του οξυγόνου χωρίς εμβολιασμό και της ουσίας συγκριτικού ελέγχου.

Έλεγχος παρεμποδίσεως

Οι ουσίες μπορούν εύκολα και απλά να ελεγχθούν για φαινόμενα παρεμποδίσεως στη μέθοδο της κλειστής φιάλης:

σειρά αριθ. 1: 2 mg/l μιας καλά διασπάσιμης ουσίας, π.χ. λιπαράς αλκοόλης συμπυκνωμένης με αιθυλενοξείδιο, σε μοριακή αναλογία 1/10, ή οποιαδήποτε από τις χημικές ουσίες συγκρίσεως·
σειρά αριθ. 2: x mg/l ελεγχόμενου υλικού (x είναι συνήθως 2)·
σειρά αριθ. 3: 2 mg/l της καλά διασπάσιμης ουσίας και x mg/l ελεγχόμενου υλικού.

Εάν οι τιμές του BOD της σειράς αριθ. 3 είναι μικρότερες από το άθροισμα των σειρών αριθ. 1 και 2, το ελεγχόμενο υλικό μπορεί να θεωρηθεί ότι δρα, γι' αυτή τη συγκέντρωση, παρεμποδιστικά για τα βακτηρίδια. Αυτό το συγκριτικό πείραμα είναι πάντα αναγκαίο, εάν φαίνεται παράλογο ένα αποτέλεσμα αρνητικό ή πτωχό σε διασπασιμότητα, ενόψει της δομής του ελεγχόμενου υλικού, εάν υπάρχουν ενδείξεις ότι αυτό μπορεί να προέρχεται από παρεμποδιστική δράση.

1.6.5. *Προσδιορισμός διαλελυμένου οξυγόνου*

Το διαλελυμένο οξυγόνο προσδιορίζεται σύμφωνα με μια διεθνώς ή εθνικώς αναγνωρισμένη χημική ή ηλεκτροχημική μέθοδο.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Τα αναλυτικά αποτελέσματα καταγράφονται στο συνημμένο ειδικό φύλλο (προσάρτημα 3).

Η πορεία της μεθόδου διασπασιμότητας ακολουθείται γραφικά σε ένα διάγραμμα, όπως φαίνεται στο προσαρτημένο παράδειγμα (προσάρτημα 4).

Τα αποτελέσματα του ελέγχου διασπασιμότητας είναι έγκυρα εάν πληρούνται οι ακόλουθες συνθήκες:

— ότι στην ίδια σειρά ελέγχου το υλικό συγκρίσεως δίνει βιοδιασπασιμότητα $\geqslant$ 60 % εντός 28 ημερών. Εάν δεν συμβαίνει αυτό, το σύνολο της σειράς απορρίπτεται·

— ότι η ελάττωση του οξυγόνου στη φιάλη χωρίς εμβολιασμό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,3 mg O_2/l μετά 5 ημέρες και 0,4 mg O_2/l μετά 28 ημέρες, αντίστοιχα· το τυφλό με εμβολιασμό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,5 mg O_2/l μετά πέντε ημέρες και 0,6 mg O_2/l μετά 15 και 28 ημέρες.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

3.1. Έκθεση ελέγχου

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει:

— τα δεδομένα που πρέπει να καταγράφονται σύμφωνα με το ειδικό φύλλο (βλέπε προσάρτημα),

— την πορεία ελέγχου διασπασιμότητας που αναπαρίσταται γραφικά σε ένα διάγραμμα που δείχνει τη φάση καθυστέρησης, τη φάση διάσπασης, την κλίση και το χρόνο-παράθυρο («χρόνος-παράθυρο» εδώ σημαίνει μια περίοδο 10 ημερών αρχίζοντας από την ημέρα όπου το παρατηρούμενο επίπεδο διασπασιμότητας φθάνει κατ' αρχήν 10 %),

— τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τον προσδιορισμό του COD,

— τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τις μετρήσεις οξυγόνου,

— τη διαδικασία διασποράς για ουσίες που είναι λίγο διαλυτές στις συνθήκες του ελέγχου,

— απόδειξη εγκυρότητας του ελέγχου.

3.2. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η δυνατότητα που έχουν ενώσεις που περιέχουν άζωτο να μπορούν να επηρεάζουν τα αποτελέσματα.

Εξαιτίας της αυστηρότητας του ελέγχου αυτού, ένα χαμηλό αποτέλεσμα δεν σημαίνει αναγκαστικά ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν είναι βιοδιασπάσιμη υπό συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά δείχνει ότι για να επιτευχθεί αυτό είναι αναγκαία περισσότερη εργασία.

Ελεγχόμενες χημικές ουσίες με υψηλό αποτέλεσμα προσλήψεως οξυγόνου, με τον έλεγχο αυτό, πρέπει να θεωρούνται σαν εύκολα βιοδιασπάσιμες, αρκεί να έχει επιτευχθεί η στάθμη αυτή εντός χρονικού διαστήματος 10 ημερών από την ημέρα που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά υπέρβαση κατά 10 % της στάθμης βιοδιασπασιμότητας.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(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—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—55.

Προσάρτημα 1

Υπολογισμός του θεωρητικά βιοχημικώς αποιτούμενου οξυγόνου

Το ThOD της ουσίας $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ του μοριακού βάρους MW υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Ο υπολογισμός αυτός προϋποθέτει μετατροπή του C προς CO_2, του H προς H_2O, του P προς P_2O_5 και του Na προς Na_2O.
Το αλογόνο απομακρύνεται σαν υδραλογόνο και το άζωτο σαν αμμωνία.

Παράδειγμα:

Γλυκόζη $C_6H_{12}O_6$, MW = 180.

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg γλυκόζης.}$$

Τα μοριακά βάρη των αλάτων, εκτός των αλκαλίων, υπολογίζονται με την προϋπόθεση ότι τα άλατα αυτά έχουν υδρολυθεί.

Το θείο θεωρείται ότι είναι οξειδωμένο στην κατάσταση + 6.

Παράδειγμα:

n-αλκυλοβενζολοσουλφονικό νάτριο, $C_{18}H_{29}SO_3Na$,

MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg ουσίας.}$$

Στην περίπτωση ουσίας που περιέχει άζωτο, τούτο μπορεί να απομακρυνθεί σαν αμμωνία, νιτρώδη ή νιτρικά, που αντιστοιχεί σε διαφορετικό θεωρητικά βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο.

$$ThOD_{NO_2^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO_3^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

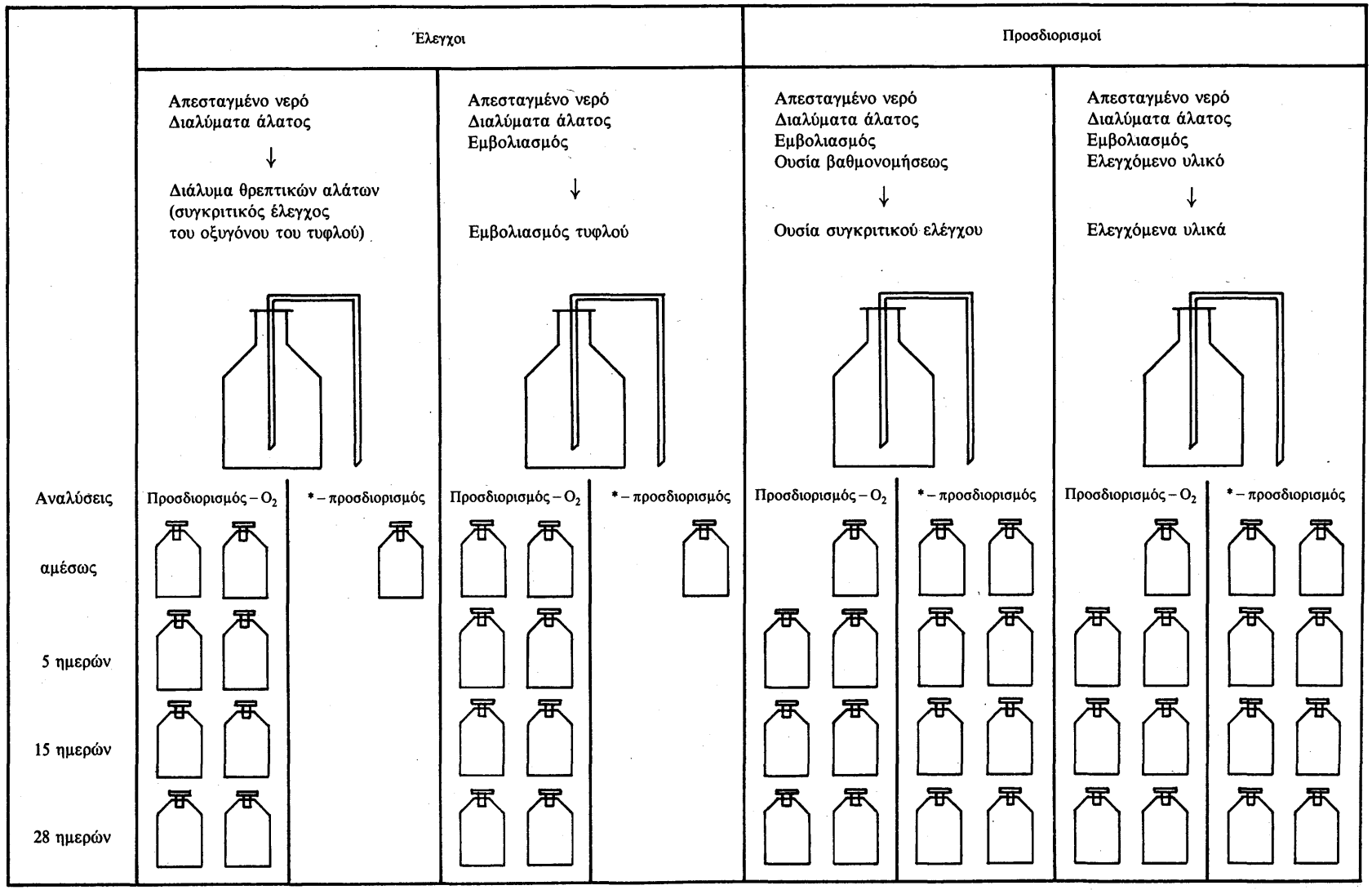
Εάν υποθετικά είχε παρατηρηθεί πλήρης σχηματισμός νιτρικών στην περίπτωση μιάς δευτεροταγούς αμίνης:
$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW: 353

$$ThOD_{NO_3^-} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg ουσίας}$$

Προσάρτημα 2

Σχήμα για τη διάταξη των φιαλών στη μέθοδο κλειστής φιάλης

(* = ειδική ανάλυση, εάν υπάρχει)



Προσάρτημα 3

Βιοδιασπασιμότητα: Μέθοδος κλειστής φιάλης (ειδικό φύλλο)

Ινστιτούτο ελέγχου: .....

Διευθυντής μελετών: .....

Ημερομηνία ενάρξεως του ελέγχου: ..... Πείραμα αριθ.: .....

Ελεγχόμενο υλικό: .....

Χημική σύνταξη: .....

Ανάλυση (μέθοδος Winkler ή ηλεκτρόδιο οξυγόνου): .....

ThOD ή COD του ελεγχόμενου υλικού: ..... mg O_2/mg

Θερμοκρασία του νερού αραιώσεως μετά τον αερισμό: .....

Συγκέντρωση O_2 στο νερό μετά τον αερισμό και την περίοδο ηρεμίας πριν από την έναρξη της μεθόδου:

..... mg O_2/l

Εμβόλιο: .....

Αποτέλεσμα ελέγχου

D_t = ... BOD εκφρασμένο σε επί τοις % ThOD μετά από 28 ημέρες, ή

D_t = ... BOD εκφρασμένο σε επί τοις % COD μετά από 28 ημέρες.

Εγκυρότητα αποτελέσματος

Χημική ουσία συγκρίσεως: .....

Αποτέλεσμα: .....BOD εκφρασμένο σε επί τοις % ThOD μετά από 28 ημέρες.

Αναφορά: Πείραμα αριθ.: .....

Παρατηρήσεις:

Βιοδιασπασιμότητα: Μέθοδος κλειστής φιάλης

Ινστιτούτο ελέγχου: .....

Ελεγχόμενο υλικό: .....

Πείραμα αριθ.: .....

A: *Προσδιορισμός* O_2

	Φιάλη αριθ.		mg O_2/l μετά από χ ημέρες			
			0	5	15	28
Διάλυμα θρεπτικών αλάτων *χωρίς* ελεγχόμενο υλικό και *χωρίς* εμβόλιο	O_2 -συγκριτικού ελέγχου	c_1		—	—	—
		c_2		—	—	—
	μέση τιμή	$m_o = \frac{c_1 + c_2}{2}$				
Διάλυμα θρεπτικών αλάτων *χωρίς* ελεγχόμενο υλικό αλλά *με* εμβόλιο	1	c_3				
	2	c_4				
	μέση τιμή τυφλού	$m_b = \frac{c_3 + c_4}{2}$				
Διάλυμα θρεπτικών αλάτων *με* ελεγχόμενο υλικό και *με* εμβόλιο	1	a_1				
	2	a_2				
	μέση τιμή ελεγχόμενου υλικού	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

B: *Ελαττώσεις O_2 (mg BOD/l) μετά από χ ημέρες*

$BOD_x - (m_o - m_{t_x}) - (ml - m_{b_x})$ (*)

mg BOD/l μετά από χ ημέρες		
5	15	28

(*) Αυτή η διαφορά είναι σημαντική σαν έλεγχος γιά την εγκυρότητα της μεθόδου.

Γ: *Εκτίμηση:*

$$D_t = \frac{\text{mg BOD}_x/l}{\text{mg}_{\text{ουσίας}}/l \cdot \text{ThOD}} \cdot 100 \quad \text{ή} \quad \% \text{ BOD}_x/\text{COD} = \frac{\text{mg BOD}_x/l}{\text{mg}_{\text{ουσίας}}/l \cdot \text{COD}} \cdot 100$$

	μετά από ημέρες		
	5	15	28
% BOD/ThOD			
% BOD_x/COD			

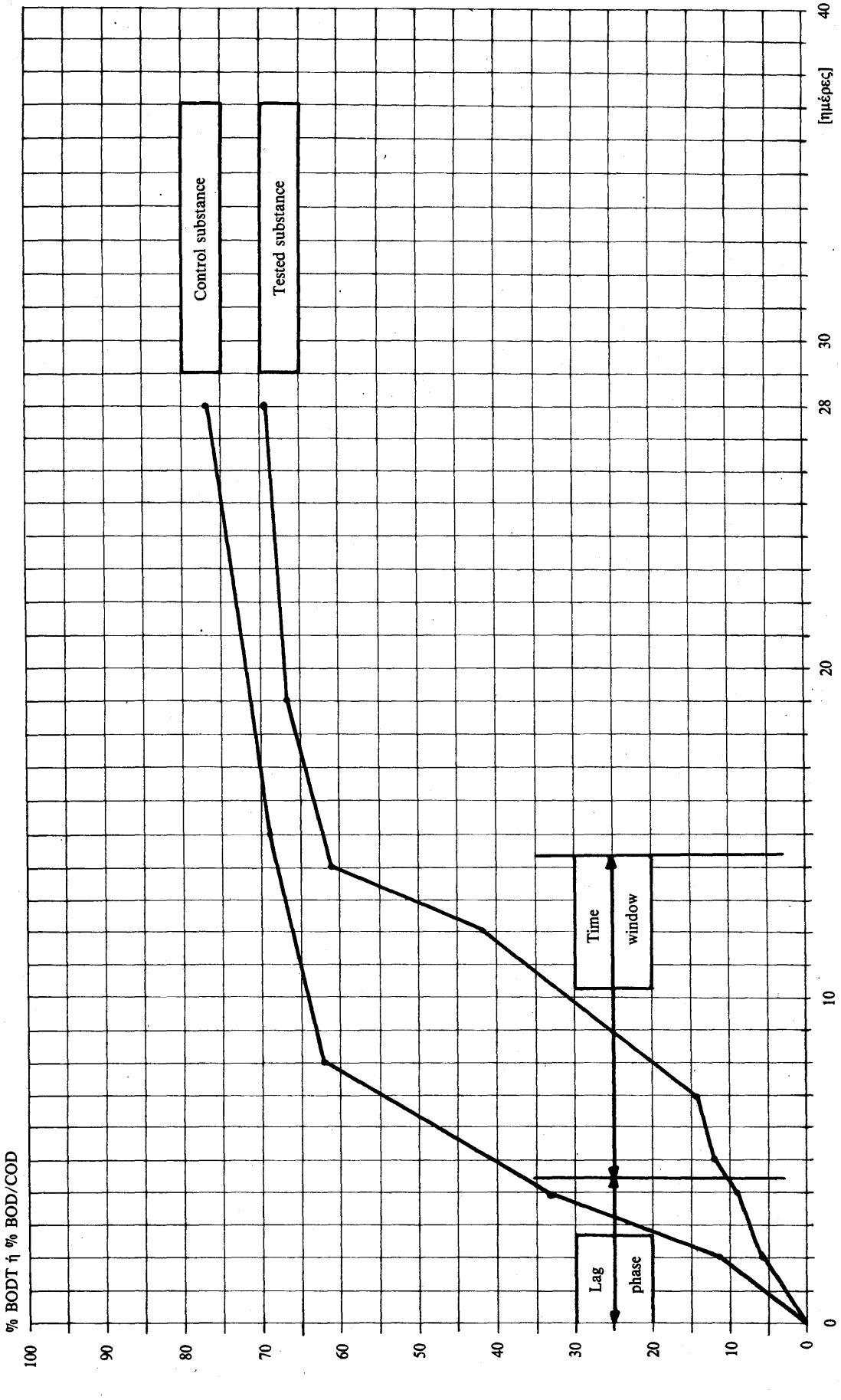
Προσάρτημα 4

Μέθοδος κλειστής φιάλης

Εργαστήριο ελέγχου: .....

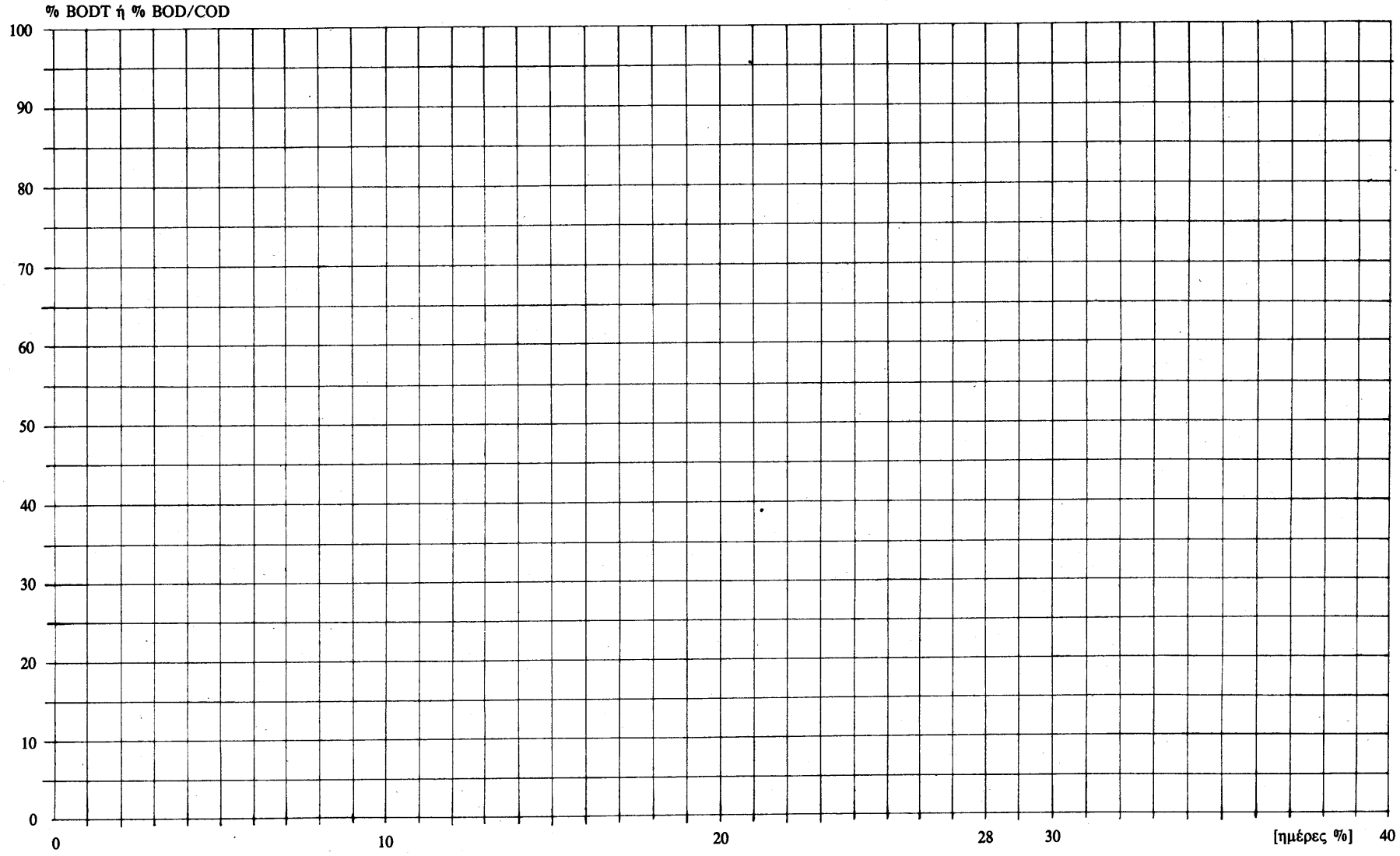
Ελεγχόμενο υλικό: .....

Πείραμα αριθ.: .....



Μέθοδος κλειστής φιάλης

Εργαστήριο ελέγχου: . . . . . Ελεγχόμενο υλικό: . . . . . Πείραμα αριθ.: . . . . . .



Γ. 7. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ: ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΙΤΙ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Σκοπός αυτής της μεθόδου ελέγχου είναι η μέτρηση της βιοδιασπασιμότητας οργανικών ουσιων σε υδατικό μέσο με ένα αναπνευστήρα-μετρητή, που δίνει ενδείξεις για το βιοχημικώς αποιτούμενο όξυγόνο.

Για τον υπολογισμό του θεωρητικώς απαιτούμενου οξυγόνου (ThOD) είναι απαραίτητος ο εμπειρικός τύπος του ελεγχόμενου υλικού, διαφορετικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί το COD.

Η μέθοδος εφαρμόζεται μόνο σ' εκείνες τις οργανικές ελεγχόμενες ουσίες, που στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο:

— έχουν αμελητέα τάση ατμών,

— δεν εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηριδίων,

— δεν έρχονται σε επαφή και δεν αντιδρούν με τον προσροφητή CO_2.

Εάν το ελεγχόμενο υλικό δεν είναι διαλυτό στη συγκέντρωση του ελέγχου, πρέπει ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν ειδικές τεχνικές τέτοιες όπως η χρήση διασκορπιστή υπερήχων, για να επιτευχθεί καλή διασπορά της ελεγχόμενης ουσίας.

Για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και για την επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου μπορεί να είναι χρήσιμες οι πληροφορίες για την τοξικότητα των χημικών ουσιών στους μικροοργανισμούς.

Για την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων είναι χρήσιμες οι πληροφορίες για τις σχετικές αναλογίες των κυρίων συστατικών της ελεγχόμενης ουσίας.

1.2. **Ορισμοί και μονάδες**

$$\text{Επί τοις \% διασπασιμότητα} = \frac{(\text{BOD} - \text{B})}{\text{ThOD (ή COD)}} \times 100\ \%$$

ή

$$\text{Επί τοις \% διασπασιμότητα} = \frac{(\text{Sb} - \text{Sa})}{\text{Sb}} \times 100\ \%$$

όπου:

BOD: βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο της ελεγχόμενης ουσίας (πειραματικό) (mg) μετρούμενο στην καμπύλη BOD·

B: κατανάλωση οξυγόνου του βασικού καλλιεργητικού μέσου, στο οποίο έχει προστεθεί εμβόλιο (πειραματικό) (mg) μετρούμενο στην καμπύλη BOD·

ThOD: θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο χρησιμοποιούμενο όταν η ελεγχόμενη ουσία έχει τελείως οξειδωθεί (πειραματικό) (mg)·

Sa: υπόλοιπο ποσό της ελεγχόμενης ουσίας μετά τη συμπλήρωση του ελέγχου βιοδιασπασιμότητας (πειραματικό) (mg)·

Sb: υπόλοιπο ποσό της ελεγχόμενης ουσίας στον τυφλό έλεγχο με νερό, στο οποίο έχει προστεθεί μόνο η ελεγχόμενη ουσία (πειραματικό) (mg).

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Για τον έλεγχο της δραστικότητας του εμβολίου, είναι επιθυμητή η χρησιμοποίηση ουσιών συγκρίσεως. Για το σκοπό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθούν ανιλίνη, οξικό νάτριο ή βενζοϊκό νάτριο. Εάν το

εκατοστιαίο ποσοστό διασπασιμότητας της ανιλίνης, υπολογιζόμενο από την κατανάλωση του οξυγόνου, δεν υπερβαίνει το 40 % μετά επτά ημέρες και το 65 % μετά 14 ημέρες, ο έλεγχος θεωρείται άκυρος.

Εάν η ταχύτητα ανακτήσεως του Sb βρεθεί μάλλον χαμηλή, ο έλεγχος θεωρείται επίσης άκυρος.

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Οι χημικές ουσίες ελέγχου είναι αποκλειστικά πηγές οργανικού άνθρακα και δεν είναι παραδεκτή η παρουσία μικροοργανισμών σ' αυτές.

Χρησιμοποιείται σαν συσκευή μετρήσεως της καταναλώσεως οξυγόνου ένα αυτόματο κλειστό σύστημα (μετρητής BOD). Οι υπό έλεγχο χημικές ουσίες εμβολιάζονται με μικροοργανισμούς στα δοχεία ελέγχου. Κατά τη διάρκεια της περιόδου του ελέγχου το βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο μετριέται συνεχώς με τον μετρητή BOD. Η βιοδιασπασιμότητα υπολογίζεται με βάση το BOD και γίνεται συμπληρωματική χημική ανάλυση, όπως η μέτρηση της συγκεντρώσεως του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα, της συγκεντρώσεως των υπολειμμάτων χημικών ουσιών, κλπ.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

1.5.1. *Αναπαραγωγιμότητα*

Γενικά καλή, ειδικότερα για χημικές ουσίες με διαλυτότητα στο νερό μεγαλύτερη από 0,1 g/l.

1.5.2. *Ευαισθησία*

A. Κατανάλωση οξυγόνου: όριο ανιχνεύσεως = 1 mg (κατανάλωση οξυγόνου από μικροοργανισμούς).

B. Χημική ανάλυση: εξαρτάται από την ευαισθησία των μεθόδων αναλύσεως.

1.5.3. *Ειδική εφαρμογή*

Εφαρμόσιμη για κάθε είδος χημικών ουσιών για τις οποίες $(C)_{\text{νερό}}/(C)_{\text{αέρας}} \geqslant 1$. Για πτητικές χημικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιείται ένας «τροποποιημένος μετρητής BOD», αποτελούμενος από τριχοειδείς σωληνώσεις, και κανονικό μετρητή BOD (βλέπε προσάρτημα 1).

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Αντιδραστήρια*

1.6.1.1. Το απεσταγμένο νερό δεν πρέπει να περιέχει άνθρακα περισσότερο από το 10 % του άνθρακα που εισάγεται με την ελεγχόμενη ουσία.

1.6.1.2. Βασικό καλλιεργητικό μέσο

Σε 3 ml από καθένα από τα διαλύματα A, B, Γ και Δ προστίθεται νερό μέχρι 1 000 ml. (Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιείται νερό απιονισμένο.)

A. K_2HPO_4 (όξινο φωσφορικό):	21,75 g
KH_2PO_4 (δισ-όξινο φωσφορικό κάλιο):	8,50 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (δωδεκα-ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο):	44,60 g

NH_4Cl (χλωριούχο αμμώνιο): 1,70 g

Διαλύονται σε νερό και συμπληρώνονται μέχρι 1 000 ml με νερό (1.6.1.1).
Η τιμή του pH πρέπει να είναι: pH = 7,2.

Β. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (επτα-ένυδρο θειικό μαγνήσιο): 22,50 g

Διαλύονται σε νερό και συμπληρώνονται μέχρι 1 000 ml με νερό (1.6.1.1)

Γ. $CaCl_2$ (χλωριούχο ασβέστιο): 27,50 g

Διαλύονται σε νερό και συμπληρώνονται μέχρι 1 000 ml με νερό (1.6.1.1)

Δ. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ [εξα-ένυδρος τριχλωριούχος σίδηρος (III)]: 0,25 g

Διαλύονται σε νερό και συμπληρώνονται μέχρι 1 000 ml με νερό (1.6.1.1)

1.6.2. *Συσκευή*

Μετρητής BOD εφοδιασμένος με έξι φιάλες (300 ml εκάστη):

φιάλες αριθ. 1 και 2:

απιονισμένο νερό 300 ml + ελεγχόμενη χημική ουσία 30 mg

φιάλες αριθ. 3 και 4:

βασικό καλλιεργητικό μέσο 300 ml + ενεργοποιημένη λάσπη 9 mg (σε ξηρή βάση) + ελεγχόμενη χημική ουσία 30 mg

φιάλη αριθ. 5:

βασικό καλλιεργητικό μέσο 300 ml + ενεργοποιημένη λάσπη 9 mg (σε ξηρή βάση) + ανιλίνη ή άλλη ουσία αναφοράς 30 mg

φιάλη αριθ. 6:

βασικό καλλιεργητικό μέσο 300 ml + ενεργοποιημένη λάσπη 9 mg (σε ξηρή βάση).

1.6.3. *Παρασκευή του εμβολίου*

1.6.3.1. Ενεργοποιημένη λάσπη

Τοποθεσίες δειγματοληψίας λάσπης: Η δειγματοληψία λάσπης γίνεται, κατά κανόνα, από όχι λιγότερες από 10 τοποθεσίες από όλη τη χώρα, κυρίως από εκείνες τις περιοχές όπου μπορεί να θεωρηθεί ότι ποικιλία χημικών ουσιών καταναλώνονται και απορρίπτονται.

Π.χ., στην Ιαπωνία, η πρότυπη ενεργοποιημένη λάσπη του Ιαπωνικού Χημικού Κέντρου Βιολογικού Ελέγχου λαμβάνεται από τις ακόλουθες τοποθεσίες και αναμειγνύεται:

— κοινοτική εγκατάσταση αποχετεύσεως: τρεις εγκαταστάσεις που λειτουργούν στο βόρειο, κεντρικό και νότιο τμήμα της Ιαπωνίας·

— βιομηχανική εγκατάσταση αποχετεύσεως: μία εγκατάσταση που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία υδατικών αποβλήτων χημικών βιομηχανικών·

— ποταμός: τρεις ποταμοί βρισκόμενοι στο βόρειο, κεντρικό και νοτιο τμήμα της Ιαπωνίας·

— λίμνη: μία λίμνη που βρίσκεται στη μέση της Ιαπωνίας·

— θάλασσα: δύο θάλασσες νησιών της Ιαπωνίας.

Συχνότητα δειγματοληψίας λάσπης: Η δειγματοληψία λάσπης πρέπει να γίνεται, κατά κανόνα, τέσσερις φορές το χρόνο, τον Μάρτιο, τον Ιούνιο, τον Σεπτέμβριο και τον Δεκέμβριο.

Μέθοδοι δειγματοληψίας λάσπης

— κοινοτική αποχέτευση: 1 λίτρο λάσπης από ανακύκλωση σε μία εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων·

— ποταμοί, λίμνες και βάλτοι ή θάλασσα: 1 λίτρο επιφανειακού νερού και 1 λίτρο επιφανειακού εδάφους της ακτής, που βρίσκεται σε επαφή με την ατμόσφαιρα.

Παρασκευή:

Τα δείγματα λάσπης που συλλέγονται από τις περιοχές δειγματοληψίας αναμειγνύονται με ανάδευση στο ίδιο δοχείο και το μείγμα αφήνεται να παραμείνει. Απομακρύνονται τα επιπλέοντα ξένα σώματα και το υπερκείμενο υγρό διηθείται από χάρτινο φίλτρο αριθ. 2. Το διήθημα ρυθμίζεται σε pH 7,0 ± 1,0 με υδροξείδιο του νατρίου ή φωσφορικό οξύ, μεταφέρεται σε δοχείο καλλιέργειας και αερίζεται.

Καλλιέργεια:

30 λεπτά μετά τη λήξη του αερισμού του ανωτέρω διαλύματος απομακρύνεται το $^1/_3$ περίπου του συνολικού όγκου του υπερκείμενου υγρού. Προστίθεται στην υπόλοιπη ποσότητα του υπερκείμενου υγρού ίσος όγκος 0,1 % συνθετικού λύματος (0,1 % συνθετικό λύμα: 1 g γλυκόζης, 1 g πεπτόνης και 1 g φωσφορικού μονοκαλίου διαλύονται σε 1 λίτρο νερού και το διάλυμα ρυθμίζεται σε pH 7,0 ± 1,0 με υδροξείδιο του νατρίου) και το μείγμα αερίζεται πάλι. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μία φορά κάθε μέρα. Η καλλιέργεια γίνεται στους 25 ± 2 °C.

Έλεγχος:

Για τον έλεγχο της καλλιεργητικής βαθμίδας ελέγχονται τα ακόλουθα σημεία και γίνονται οι αναγκαίες ρυθμίσεις:

— εμφάνιση του υπερκείμενου υγρού: το υπερκείμενο υγρό της ενεργοποιημένης λάσπης πρέπει να είναι διαυγές·

— ιδιότητες καθιζήσεως της ενεργοποιημένης λάσπης: η ενεργοποιημένη λάσπη, υπό τη μορφή μεγάλων θυσάνων, πρέπει να έχει καλές ιδιότητες καθιζήσεως·

— κατάσταση σχηματισμού της ενεργοποιημένης λάσπης: σε περίπτωση όπου δεν παρατηρείται ανάπτυξη θυσάνων, αυξάνεται είτε ο όγκος του 0,1 % συνθετικού λύματος που προστίθεται είτε η συχνότητα προσθήκης του συνθετικού λύματος·

— το pH του υπερκείμενου υγρού είναι 7,0 ± 1,0·

— θερμοκρασία: η θερμοκρασία καλλιέργειας της ενεργοποιημένης λάσπης είναι 25 ± 2 °C.

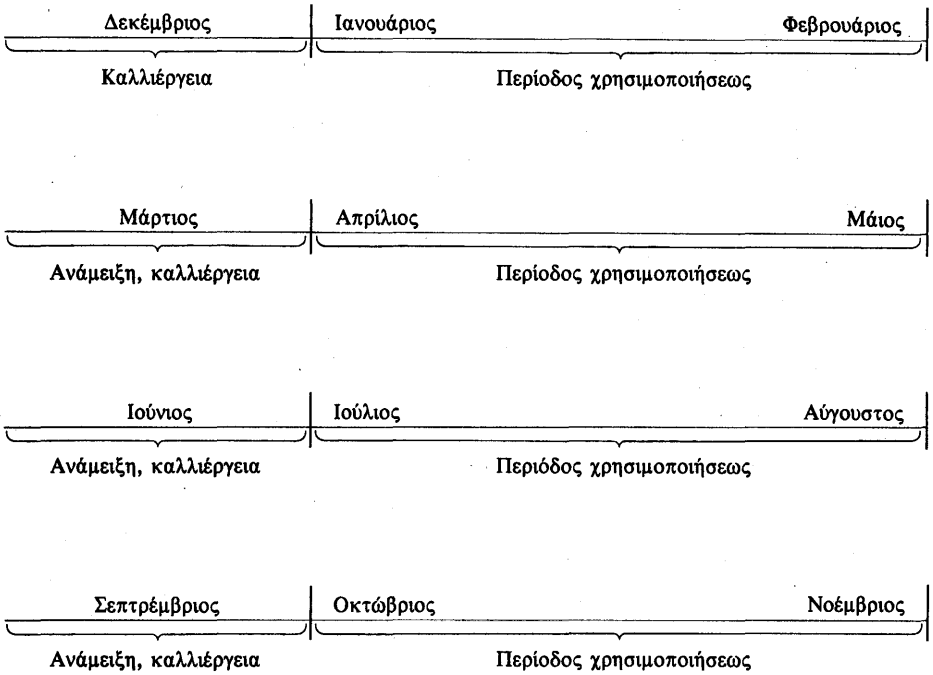
— ποσότητα αερισμού: κατά την αντικατάσταση του υπερκείμενου υγρού με το συνθετικό λύμα το αιώρημα στο δοχείο καλλιέργειας πρέπει να αερίζεται ικανοποιητικά, ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου πάνω από 5 mg/l.

Μικροχλωρίδα ενεργοποιημένης λάσπης: Όταν παρατηρείται με μικροσκόπιο η ενεργοποιημένη λάσπη (σε μεγέθυνση × 100 ~ 400), πρέπει να διακρίνονται αρκετά πρωτόζωα διαφόρων ειδών μαζί με νεφοειδείς θυσάνους.

Ανάμειξη πρόσφατης και παλαιάς ενεργοποιημένης λάσπης: Για να διατηρηθούν η πρόσφατη και η παλαιά ενεργοποιημένη λάσπη στην ίδια δραστικότητα, το διήθημα του υπερκείμενου υγρού μιας ενεργοποιημένης λάσπης που είναι σε χρήση, στον έλεγχο, αναμειγνύεται με ίσο όγκο του διηθήματος του υπερκείμενου υγρού μιας ενεργοποιημένης λάσπης που έχει συλλεγεί πρόσφατα και το μείγμα καλλιεργείται.

Έλεγχος της δραστικότητας της ενεργοποιημένης λάσπης: Πρέπει να ελέγχεται περιοδικά η δραστικότητα της ενεργοποιημένης λάσπης, τουλάχιστον μία φορά κάθε τρεις μήνες, με πρότυπες ουσίες και κατά τη μέθοδο ελέγχου που δίνεται κατωτέρω. Ειδικά στην περίπτωση όπου αναμειγνύονται δείγματα πρόσφατης και παλαιάς ενεργοποιημένης λάσπης, πρέπει να γίνεται προσεκτικός έλεγχος σχετικά με την παλαιά ενεργοποιημένη λάσπη.

Παράδειγμα παρασκευής δειγμάτων ενεργοποιημένης λάσπης και περίοδος χρησιμοποιήσεως:



(Ακολουθεί το ίδιο σχήμα παρασκευής και χρησιμοποιήσεως.)

1.6.4. *Προκατεργασία της ελεγχόμενης χημικής ουσίας*

Εάν η ελεγχόμενη ουσία δεν είναι διαλυτή στο νερό μέχρι τη συγκέντρωση ελέγχου, πρέπει να κονιοποιηθεί όσο το δυνατό περισσότερο λεπτά.

1.6.5. *Προσθήκη της ελεγχόμενης ουσίας και προπαρασκευή για τον έλεγχο*

Απαιτούνται τα ακόλουθα δοχεία ελέγχου (βλέπε σημείο 1.6.2) και ρυθμίζονται στη θερμοκρασία ελέγχου:

1. Δύο δοχεία ελέγχου, που περιέχουν νερό, στο οποίο προστίθενται 100 mg/l της ελεγχόμενης ουσίας (δοχεία αριθ. 1 και αριθ. 2).
2. Δύο δοχεία ελέγχου, που περιέχουν το βασικό καλλιεργητικό μέσο, στο οποίο προστίθενται 100 mg/l της ελεγχόμενης ουσίας. Το pH του διαλύματος αυτού ρυθμίζεται σε pH = 7, αν είναι ανάγκη, πριν από τον εμβολιασμό με την ενεργοποιημένη λάσπη (δοχεία αριθ. 3 και αριθ. 4).
3. Δοχείο ελέγχου, που περιέχει βασικό καλλιεργητικό μέσο, στο οποίο προστίθενται 100 mg/l ανιλίνης ή οποιασδήποτε άλλης πρότυπης ουσίας (δοχείο αριθ. 5).
4. Δοχείο ελέγχου, για το τυφλό πείραμα ελέγχου, που περιέχει μόνο το βασικό καλλιεργητικό μέσο (δοχείο αριθ. 6).

1.6.5.1. Εμβολιασμός με ενεργοποιημένη λάσπη

Στα δοχεία ελέγχου αριθ. 3, 4, 5 και 6, ανωτέρω, προστίθεται εμβόλιο, έτσι ώστε το αιωρούμενο υλικό που ορίζεται στα Ιαπωνικά Βιομηχανικά Πρότυπα [3], σαν παράδειγμα, να περιέχεται σε συγκέντρωση 30 mg/l.

1.6.5.2. Συνθήκες ελέγχου

— συγκέντρωση ελεγχόμενων χημικών ουσιών: 100 mg/l,

— συγκέντρωση ενεργοποιημένης λάσπης: 30 mg/l,

— θερμοκρασία ελέγχου: 20 έως 25 °C,

— περίοδος: 28 ημέρες,

— εκτέλεση στο σκοτάδι· κάθε μέρα πρέπει να ελέγχονται η θερμοκρασία και η αλλαγή του χρώματος του περιεχομένου του δοχείου καλλιέργειας,

— ισχυρή ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα.

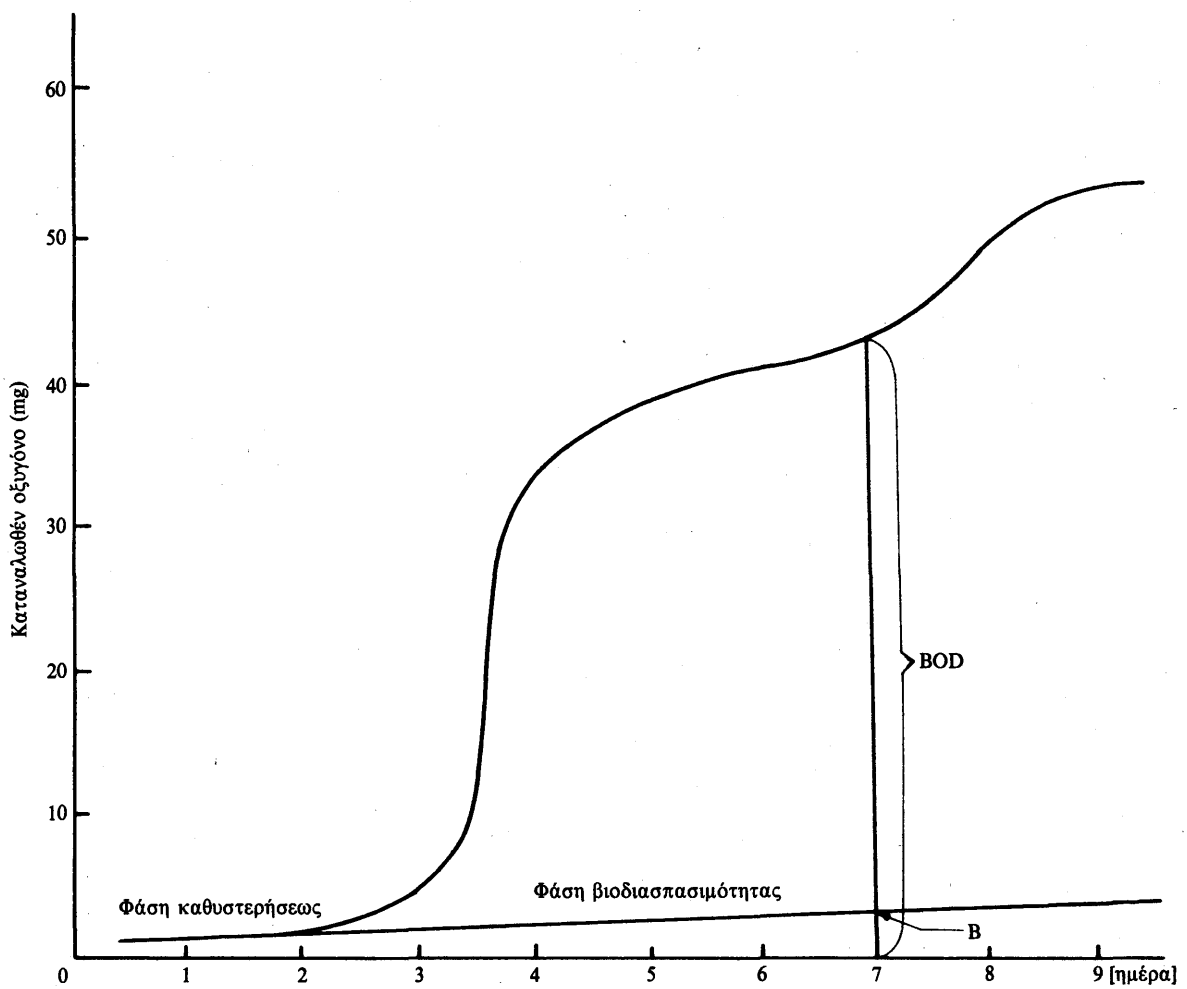
1.6.6. *Εκτέλεση του ελέγχου*

Η καμπύλη BOD καταγράφεται ως συνεχής γραμμή για 28 ημέρες (βλέπε σχήμα).

Μετά περίοδο ελέγχου 28 ημερών προσδιορίζονται το pH και η συγκέντρωση των υπολοίπων των χημικών ουσιών και των ενδιαμέσων στα δοχεία ελέγχου.

Σχήμα

Καμπύλη BOD ανιλίνης



Αναλύονται επίσης οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες στο δοχείο ελέγχου χωρίς ενεργοποιημένη λάσπη, για να επιβεβαιωθεί κατά πόσο έχει γίνει οποιαδήποτε αλλαγή στην ελεγχόμενη χημική ουσία κατά τη διάρκεια της περιόδου ελέγχου ή οποιαδήποτε απώλεια της αρχικής ελεγχόμενης χημικής ουσίας από εξάτμιση ή προσρόφηση στα τοιχώματα των δοχείων ελέγχου, κλπ.

1.6.7. *Αναλυτικές συσκευές*

Εάν η ελεγχόμενη ουσία είναι διαλυτή στο νερό, προσδιορίζεται επίσης στο τέλος του ελέγχου το υπόλοιπο ποσό του ολικού οργανικού άνθρακα.

α) Όταν χρησιμοποιείται αναλυτής ολικού οργανικού άνθρακα:

Λαμβάνεται δείγμα 10 ml του ελεγχόμενου διαλύματος από το δοχείο ελέγχου και φυγοκεντρείται στα 3 000 g για πέντε λεπτά. Προσδιορίζεται με αναλυτή ολικού οργανικού άνθρακα το υπόλοιπο ποσό του ολικού οργανικού άνθρακα στο υπερκείμενο υγρό.

β) Όταν χρησιμοποιούνται άλλοι αναλυτές:

Εκχυλίζεται, με κατάλληλο για την ελεγχόμενη ουσία διαλύτη, το συνολικό ποσό ενός δοχείου ελέγχου και, κατόπιν κατάλληλης προκατεργασίας, όπως η συμπύκνωση, προσδιορίζεται το υπόλοιπο ποσό της ελεγχόμενης ουσίας με κάποιο αναλυτικό όργανο (αεριοχρωματογράφο, φασματογράφο μάζας, φασματοφωτόμετρο, κλπ.).

Για πτητικές χημικές ουσίες, το λουτρό ελέγχου θερμοκρασίας του μετρητή BOD πρέπει να ψυχθεί στους 10 °C και η θερμοκρασία αυτή να διατηρηθεί τουλάχιστον 30 λεπτά, για να εμποδισθεί η εξάτμιση. Τότε αρχίζουν οι αναλυτικές διαδικασίες α) και β).

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

2.1. *Επεξεργασία αποτελεσμάτων*

Η μέθοδος για τον υπολογισμό του επί τοις % ποσοστού διασπασιμότητας από την κατανάλωση οξυγόνου και από το αποτέλεσμα της απευθείας αναλύσεως ορίζεται στο σημείο 1.2.

2.2. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Το θεωρητικώς απαιτούμενο οξυγόνο μπορεί να υπολογισθεί είτε όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 2 είτε χρησιμοποιώντας την αρχική μέθοδο MITI:

Στοιχείο	*Οξειδωμένη μορφή*
C	CO_2
H	H_2O
N	NO_2
S	SO_2
X (αλογόνο)	X

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ

3.1. Έκθεση ελέγχου

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τα ακόλουθα σημεία:

— πληροφορίες επί των ελεγχομένων χημικών ουσιών: ονομασία, συντακτικός τύπος, μοριακό βάρος, καθαρότητα, φύση των ξένων προσμείξεων, φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, στοιχεία ταυτοποιήσεως της ελεγχόμενης χημικής ουσίας,

— συνθήκες ελέγχου,

— ενεργοποιημένη λάσπη: τοποθεσία δειγματοληψίας και συγκέντρωση λάσπης,

— ελεγχόμενη χημική ουσία: συγκέντρωση,

— περίοδος ελέγχου,

— θερμοκρασία ελέγχου,

— αναλυτική διαδικασία:
προκατεργασία
αναλυτικές συνθήκες οργάνου
ταχύτητα αποκαταστάσεως της αναλυτικής διαδικασίας
ταυτοποίηση ενδιαμέσων,

— αποτελέσματα:

καμπύλες βιοδιασπασιμότητας (έλεγχος της δραστικότητας του εμβολίου + καμπύλη της ουσίας).

BOD (mg)

B (mg)

Sa (mg)

Sb (mg)

ThOD (mg)

Επί τοις % ποσοστό διασπασιμότητας με βάση το BOD.

Επί τοις % ποσοστό διασπασιμότητας με χημική ανάλυση.

Χρωματογραφήματα ή φάσματα των ελεγχόμενων χημικών ουσιών που λήφθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της αναλύσεως,

— απόδειξη εγκυρότητας (βλέπε σημείο 1.3).

3.2. **Ερμηνεία των αποτελεσμάτων**

Πρέπει να ληφθεί υπόψη η πιθανότητα ότι ενώσεις που περιέχουν άζωτο μπορεί να επηρεάζουν τα αποτελέσματα.

Αν βρεθεί ότι η ταχύτητα αποκαταστάσεως του Sb είναι της τάξεως του 10 % ή μικρότερη, αυτό μπορεί να οφείλεται σε αναλυτικά προβλήματα ή, π.χ., σε υδρόλυση· στην περίπτωση αυτή, πρέπει να δοθεί ειδική προσοχή στην ερμηνεία.

Λόγω της αυστηρότητας του ελέγχου αυτού, ένα χαμηλό αποτέλεσμα δεν σημαίνει, κατ' ανάγκη, ότι η ελεγχόμενη ουσία δεν είναι βιοδιασπάσιμη υπό συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά σημαίνει ότι είναι ανάγκη να γίνει περισσότερη εργασία για να επιβεβαιωθεί αυτό.

Ελεγχόμενες χημικές ουσίες που δείχνουν ψηλό αποτέλεσμα προσλήψεως οξυγόνου στον έλεγχο αυτό, πρέπει να θεωρούνται σαν εύκολα βιοδιασπάσιμες, υπό την προϋπόθεση ότι το επίπεδο αυτό πραγματοποιείται σε χρονικό διάστημα 10 ημερών μετρώντας από την ημέρα από την οποία το παρατηρούμενο επίπεδο βιοδιασπασιμότητας ξεπέρασε για πρώτη φορά το 10 %.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

(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.

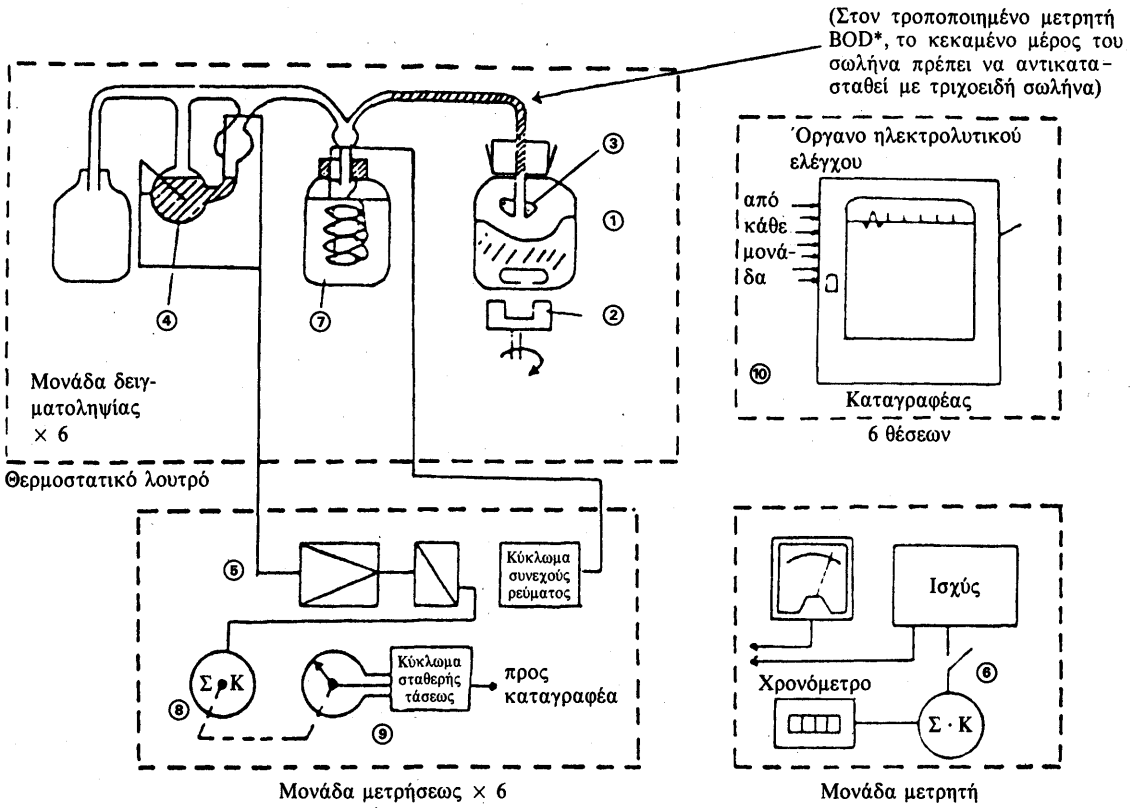
(4) The biodegradability and bioaccumulation of new and existing chemical substances, 5, 8 (C-3/78/JAP), 1978.

Προσάρτημα 1

Αρχή λειτουργίας της συσκευής μετρήσεως κλειστού συστήματος καταναλώσεως οξυγόνου

Η κατανάλωση οξυγόνου από μικροοργανισμούς μπορεί να προσδιορισθεί χρησιμοποιώντας διαδικασία ηλεκτροχημικής αναλύσεως (π.χ. κουλομετρία).

Το ακόλουθο είναι ένα παραστατικό διάγραμμα:



Το δείγμα που περιέχεται στη φιάλη καλλιέργειας (1) αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα (2). Κατά την πρόοδο της αντιδράσεως καταναλώνεται το διαλελυμένο στο υγρό οξυγόνο. Το οξυγόνο (O_2) που βρίσκεται στο χώρο της φιάλης καλλιέργειας διαλύεται στο υγρό με αποτέλεσμα τη δημιουργία CO_2 στη θέση του.

Καθώς το CO_2 αυτό απορροφάται από νατράσβεστο (3), η μερική πίεση οξυγόνου στο χώρο και η ολική πίεση ελαττώνονται.

Η ελάττωση της πιέσεως ανιχνεύεται και μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα με τη βοήθεια μανομέτρου τύπου ηλεκτροδίου (4) και ενισχύεται με έναν ενισχυτή (5), για να θέσει σε λειτουργία ένα κύκλωμα μετρονόμου (6), που στη συνέχεια θέτει σε λειτουργία ένα σύγχρονο κινητήρα (8). Συγχρόνως, με διαβίβαση συνεχούς ρεύματος, παράγεται ηλεκτρολυτικό οξυγόνο από διάλυμα χαλκού σε θειικό οξύ που βρίσκεται σε μιά φιάλη ηλεκτρολύσεως (7).

Το οξυγόνο αυτό διαβιβάζεται στη φιάλη καλλιέργειας και ανιχνεύεται η αποκατάσταση της πιέσεως με το μανόμετρο, που διακόπτει τη λειτουργία του κυκλώματος του μετρονόμου και σταματά έτσι τον ηλεκτρολυτικό και τον σύγχρονο κινητήρα.

Ο άνω χώρος της φιάλης καλλιέργειας διατηρείται πάντα υπό σταθερή πίεση οξυγόνου και η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλίσκεται στη φιάλη καλλιέργειας είναι ανάλογη με την ποσότητα του ηλεκτρολυτικού οξυγόνου. Επειδή η ποσότητα αυτή του ηλεκτρολυτικού οξυγόνου είναι ανάλογη προς το χρόνο ηλεκτρολύσεως, παράγεται ένα σταθερό ρεύμα ηλεκτρολύσεως. Κατ' αυτό τον τρόπο η στροφική γωνία ενός σύγχρονου κινητήρα (9) μετατρέπεται σε σήμα mV, μέσω του διασυνδεδεμένου ποτενσιόμετρου, με αποτέλεσμα μία ένδειξη της ποσότητας του καταναλωθέντος οξυγόνου στον καταγραφέα (10).

Προσάρτημα 2

Υπολογισμός του θεωρητικού βιοχημικώς απαιτούμενου οξυγόνου

Το ThOD της ουσίας $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ μοριακού βάρους MW, υπολογίζεται σύμφωνα με:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Ο υπολογισμός αυτός εξυπονοεί ότι ο C μετατρέπεται σε CO_2, το H σε H_2O, ο P σε P_2O_5 και το Na σε Na_2O. Το αλογόνο απομακρύνεται σαν υδραλογόνο και το άζωτο σαν αμμωνία.

Παράδειγμα:

Γλυκόζη $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg γλυκόζης}$$

Τα μοριακά βάρη των αλάτων, εκτός των αλάτων των αλκαλιμετάλλων, υπολογίζονται με την υπόθεση ότι τα άλατα έχουν υδρολυθεί.

Το θείο υποτίθεται ότι έχει οξειδωθεί στην κατάσταση + 6.

Παράδειγμα:

n-αλκυλοβενζολοσουλφονικό νάτριο, $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg ουσίας}$$

Στην περίπτωση ουσίας που περιέχει άζωτο, το άζωτο μπορεί να απομακρυνθεί σαν αμμωνία, νιτρώδες ή νιτρικό, με αντιστοιχία σε διάφορες τιμές θεωρητικού βιοχημικώς απαιτούμενου οξυγόνου.

$$ThOD_{NO_2^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO_3^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Εάν είχε παρατηρηθεί με ανάλυση πλήρης σχηματισμός νιτρικών στην περίπτωση δευτεροταγούς αμίνης:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353.

$$ThOD_{NO_3^-} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg ουσίας}$$

Προσάρτημα 3

Βιοδιασπασιμότητα: Τροποποιημένη μέθοδος MITI

Ινστιτούτο ελέγχου: .....

Διευθυντής μελετών: .....

Ημερομηνία ενάρξεως του ελέγχου: .....

Ελεγχόμενο υλικό: ..... Πείραμα αριθ.: .....

Χημική σύνταξη: .....

Αναλυτική διαδικασία: .....

ThOD ή COD του ελεγχόμενου υλικού: .....

Εμβόλιο: .....

Θέση λαμβανομένου δείγματος: .....

Συγκέντρωση: .....

Αποτέλεσμα ελέγχου

..... επί τοις % διασπασιμότητα = $\frac{BOD - B}{ThOD} \times 100$ % μετά από 28 ημέρες

ή

..... επί τοις % διασπασιμότητα = $\frac{BOD - B}{COD} \times 100$ % μετά από 28 ημέρες

..... επί τοις % διασπασιμότητα = $\frac{Sb - Sa}{Sb} \times 100$ % μετά από 28 ημέρες

Εγκυρότητα αποτελέσματος

Χημική ουσία συγκρίσεως: .....

Αποτέλεσμα: ..... % διασπασιμότητα μετά από 28 ημέρες .....

Αναφορά: .....

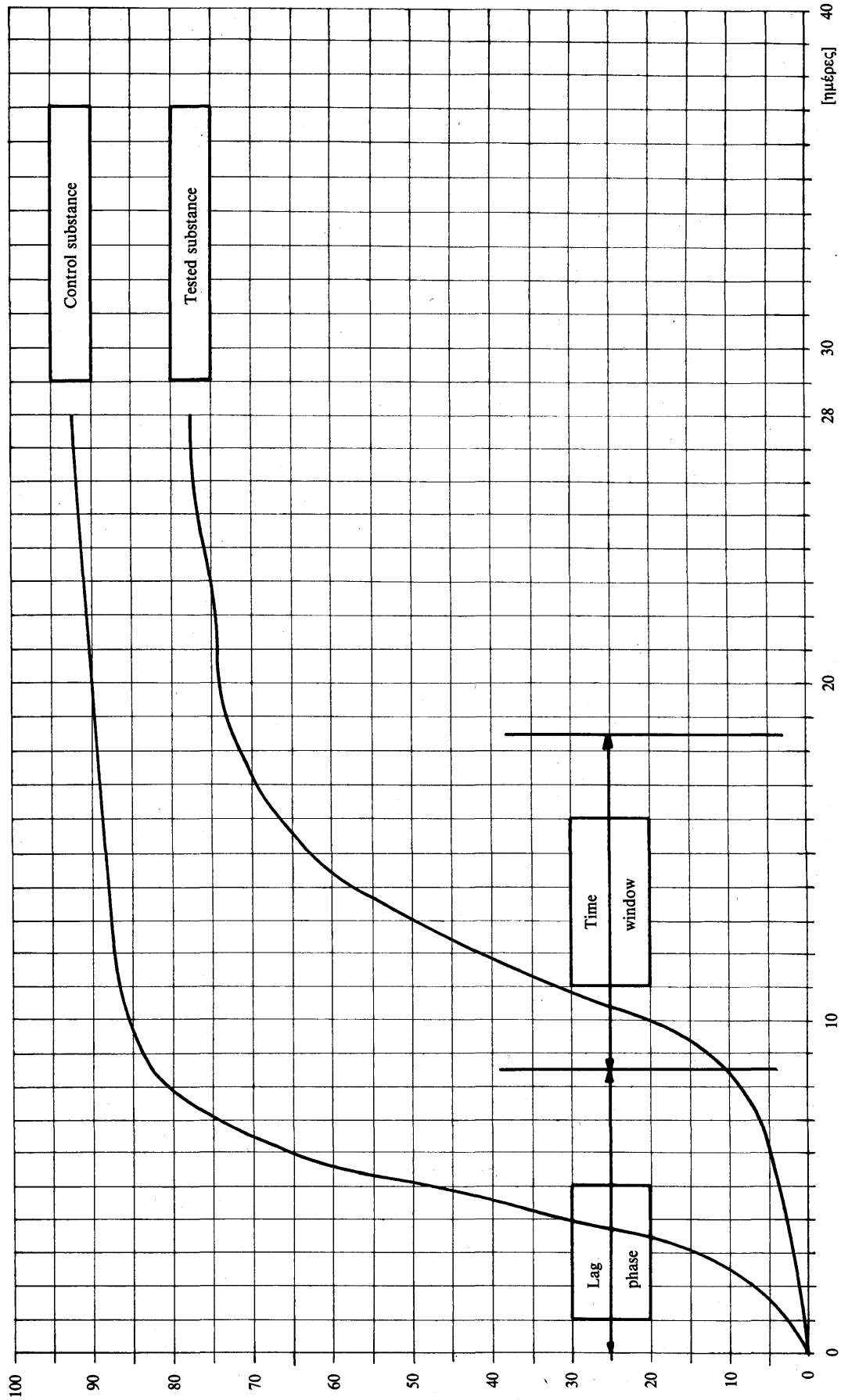
Πείραμα αριθ.: .....

Παρατηρήσεις: .....

Προσάρτημα 4

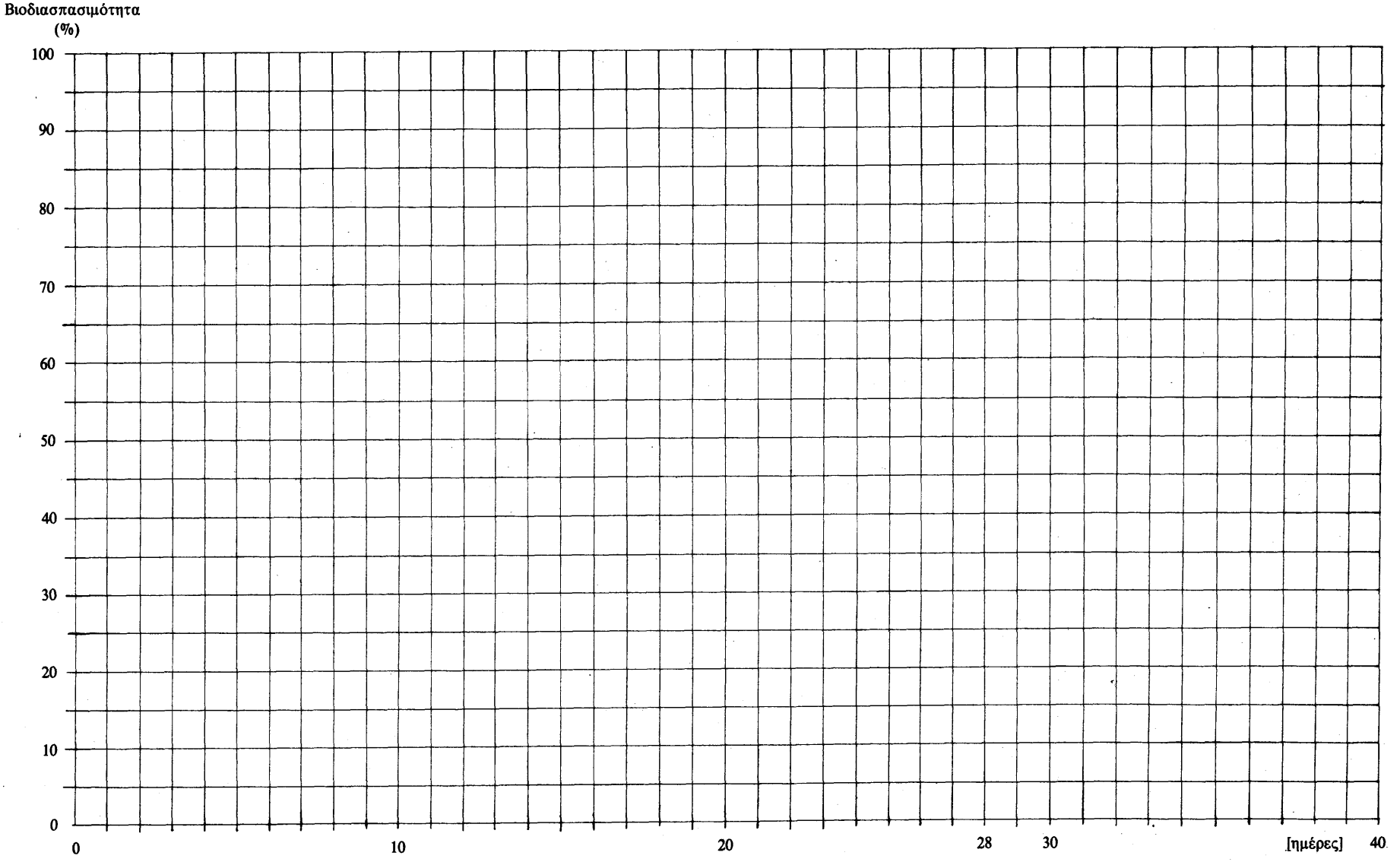
Τροποποιημένη μέθοδος ΜΙΤΙ

Εργαστήριο ελέγχου: ..... Ελεγχόμενη ουσία: ..... Πείραμα αριθ. .....



Τοποποιημένη μέθοδος MITI

Εργαστήριο ελέγχου: . . . . . Ελεγχόμενη ουσία: . . . . . Πείραμα αριθ.: . . . . . .



Γ. 8. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΣ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Σκοπός της μεθόδου είναι η μέτρηση του βιοχημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (BOD) στερεών ή υγρών οργανικών ουσιών.

Δεδομένα που λαμβάνονται με τη μέθοδο αυτή αναφέρονται σε υδατοδιαλυτές ενώσεις· πάντως, πτητικές ενώσεις καθώς και εκείνες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα μπορούν επίσης, τουλάχιστον κατ' αρχήν, να ελεγχθούν.

Η μέθοδος εφαρμόζεται μόνο σ' εκείνα τα οργανικά ελεγχόμενα υλικά που δεν παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηριδίων στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στον έλεγχο. Αν το ελεγχόμενο υλικό δεν είναι διαλυτό στη συγκέντρωση του ελέγχου, μπορεί να χρειασθεί να χρησιμοποιηθούν ειδικές τεχνικές, τέτοιες όπως η χρήση διασκορπιστή υπερήχων, για να επιτευχθεί καλή διασπορά της ελεγχόμενης ουσίας.

Πληροφορίες για την τοξικότητα της χημικής ουσίας μπορεί να είναι χρήσιμες για την ερμηνεία χαμηλών αποτελεσμάτων και για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων ελέγχου.

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Ως BOD ορίζεται η μάζα του διαλελυμένου οξυγόνου που απαιτείται από ορισμένο όγκο διαλύματος της ουσίας για τη διαδικασία της βιοχημικής οξειδώσεως υπό καθορισμένες συνθήκες.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε g BOD ανά g ελεγχόμενης ουσίας.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Δεν έχουν υποδειχθεί πρότυπες ουσίες για βαθμονόμηση.

Είναι επιθυμητή η χρήση κατάλληλης χημικής ουσίας συγκρίσεως για τον έλεγχο της δραστικότητας του εμβολίου.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Γνωστή ποσότητα της ουσίας, διαλελυμένη ή σε διασπορά, σε καλώς αεριζόμενο κατάλληλο μέσο, εμβολιάζεται με μικροοργανισμούς και επωάζεται σε σταθερή καθορισμένη θερμοκρασία, στο σκοτάδι.

Το BOD προσδιορίζεται από τη διαφορά στη συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου στην αρχή και στο τέλος του ελέγχου.

Η διάρκεια του ελέγχου πρέπει να είναι το λιγότερο πέντε και όχι περισσότερο από 28 ημέρες.

Πρέπει να γίνει ένας τυφλός προσδιορισμός σε παράλληλη δοκιμασία που δεν περιέχει ελεγχόμενη ουσία.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Ο προσδιορισμός του BOD δεν μπορεί να θεωρηθεί ως έγκυρος προσδιορισμός της βιοδιασπασιμότητας μιας ουσίας. Ο έλεγχος αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σαν βασικός έλεγχος.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου

Παρασκευάζεται προκαταρκτικό διάλυμα ή αιώρημα της ουσίας με συγκέντρωση BOD κατάλληλη για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Προσδιορίζεται ακολούθως το BOD με οποιαδήποτε κατάλληλη πρότυπη εθνική μέθοδο. Θα ήταν προτιμότερη μία διεθνής μέθοδος, που αναμένεται να καθιερωθεί.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Υπολογίζεται το BOD που περιέχεται στο προκαταρκτικό διάλυμα σύμφωνα με την κανονικοποιημένη μέθοδο που διαλέχθηκε και μετατρέπεται σε g BOD ανά g ελεγχόμενης ουσίας.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Πρέπει να δηλώνεται η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος.

Το βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο πρέπει να είναι ο μέσος όρος τριών τουλάχιστον εγκύρων μετρήσεων.

Πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ειδικά ως προς τις ξένες προσμείξεις, φυσική κατάσταση, τοξικές επιδράσεις και σχετική σύνθεση της ουσίας που μπορεί να επηρεάζει τα αποτελέσματα.

Πρέπει να αναφέρεται η χρήση προσθετικών για την παρεμπόδιση της βιολογικής διατροφής.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Κατάλογος προτυποποιημένων μεθόδων, π.χ.:

NF T 90—103: Determination of the Biochemical Oxygen Demand.

NBN 407: Biochemical Oxygen Demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The Determination of Biochemical Oxygen Demand (Methods for the examination of Water and Associated Materials, HMSO, London).

Γ. 9. ΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

ΧΗΜΙΚΩΣ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Σκοπός της μεθόδου είναι η μέτρηση του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD) στερεών ή υγρών οργανικών ουσιών με ένα πρότυπο αυθαίρετο τρόπο, υπό καθορισμένες εργαστηριακές συνθήκες.

Πληροφορίες για τον τύπο της ουσίας θα είναι χρήσιμες κατά την εκτέλεση του ελέγχου και την ερμηνεία του λαμβανόμενου αποτελέσματος (π.χ. αλογονούχα άλατα, σιδηρούχα άλατα οργανικών ενώσεων, οργανοχλωριούχες ενώσεις).

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο είναι μέτρο της επιδεκτικότητας προς οξείδωση μιας ουσίας και εκφράζεται ως το ισοδύναμο ποσό σε οξυγόνο ενός οξειδωτικού παράγοντα, που καταναλώνεται από την ουσία, υπό καθορισμένες εργαστηριακές συνθήκες.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε g COD ανά g ελεγχόμενης ουσίας.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Ουσίες αναφοράς δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάζεται μια νέα ουσία. Αυτό θα χρησίμευε, κατ' αρχήν, για τη βαθμονόμηση της μεθόδου, από καιρού εις καιρό, και για να προσφέρει τη δυνατότητα συγκρίσεως αποτελεσμάτων σε περιπτώσεις που εφαρμόζεται άλλη μέθοδος.

1.4. Αρχή της μεθόδου

Γνωστή ποσότητα της ουσίας διαλύεται ή διασπείρεται σε νερό, οξειδώνεται με διχρωμικό κάλιο σε ισχυρώς όξινο με θειικό οξύ περιβάλλον, με θειικό άργυρο σαν καταλύτη, επί δύο ώρες υπό επαναρροή. Το υπόλοιπο διχρωμικό προσδιορίζεται με τιτλοδότηση με κανονικό διάλυμα εναμμώνιου θειικού σιδήρου.

Στην περίπτωση ουσιών που περιέχουν χλώριο, προστίθεται θειικός υδράργυρος για να ελαττώσει την παρεμπόδιση από τα χλωριόντα.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Λόγω του αυθαίρετου τρόπου του προσδιορισμού, το COD πρέπει να θεωρείται περισσότερο σαν «δείκτης οξειδωτικότητας» παρά σαν μέτρο οργανικής ύλης.

Σ' αυτό τον έλεγχο τα χλωριόντα μπορεί να παρεμποδίζουν· ανόργανοι αναγωγικοί ή οξειδωτικοί παράγοντες μπορεί επίσης να παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του COD.

Μερικές κυκλικές ενώσεις δεν οξειδώνονται πλήρως με τον έλεγχο αυτό.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου

Παρασκευάζεται προκαταρκτικό διάλυμα ή διασπορά της ουσίας με το COD μεταξύ 250 και 600 mg/l.

Παρατήρηση:

Στην περίπτωση ουσιών με χαμηλή διαλυτότητα και οι οποίες δεν μπορούν να σχηματίσουν διασπορά, ζυγίζεται ποσότητα λεπτής σκόνης της ουσίας, ή υγρής ουσίας, αντίστοιχη με 5 mg COD και φέρεται στην πειραματική συσκευή με νερό.

Προσδιορίζεται ακολούθως το COD με οποιαδήποτε κατάλληλη πρότυπη εθνική μέθοδο, ενώ αναμένεται η δημοσίευση μιας διεθνούς πρότυπης μεθόδου, που θα ήταν προτιμότερη.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Υπολογίζεται το COD που περιέχεται στην πειραματική φιάλη, σύμφωνα με την κανονικοποιημένη μέθοδο που διαλέχθηκε και μετατρέπεται σε g COD ανά g ελεγχόμενης ουσίας.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΕΩΣ**

Πρέπει να δηλώνεται η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος.

Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο πρέπει να είναι ο μέσος όρος τριών τουλάχιστον μετρήσεων. Πρέπει να αναφέρονται όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ειδικά ως προς τις ξένες προσμείξεις, φυσική κατάσταση και σχετικές ιδιότητες της ουσίας (αν είναι γνωστές) που μπορεί να επηρεάζουν τα αποτελέσματα.

Πρέπει να αναφέρεται η χρήση θειικού υδραργύρου που μειώνει την παρεμπόδιση των χλωριόντων.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Κατάλογος προτύπων μεθόδων, π.χ.:

NBN T 91—201:	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
ISBN O 11 7512494:	Chemical Oxygen Demand (dichromate value) of polluted and waste waters.
NF T 90—101:	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
DS 217: Water Analysis:	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
DIN 38409 — H — 41:	Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD) within the range above 15 mg/l.
NEN 3235 5.3:	Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.
ISO DP 6060:	Water Quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate Methods.

Γ. 10. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ: ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΣΑΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΤΟΥ pH

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην κατευθυντήρια οδηγία ελέγχου του ΟΟΣΑ (1).

1.1. Εισαγωγή

Η υδρόλυση είναι σημαντική αντίδραση που ελέγχει την αβιοτική αποικοδόμηση. Η ιδιότητα αυτή αφορά ιδιαίτερα τις ουσίες με χαμηλή βιοαποικοδόμηση· μπορεί να επηρεάσει τη διάρκεια παραμονής μιας ουσίας στο περιβάλλον.

Οι περισσότερες αντιδράσεις υδρολύσεως είναι ψευδο-πρώτης τάξεως και γι' αυτό οι ημιπερίοδοι ζωής τους ανεξάρτητες της συγκεντρώσεως. Αυτό συνήθως επιτρέπει τον υπολογισμό διά προεκτάσεως των αποτελεσμάτων που βρίσκει κανείς όταν εργάζεται με συγκεντρώσεις εργαστηρίου, στις συνθήκες του περιβάλλοντος.

Επιπλέον έχουν αναφερθεί αρκετά παραδείγματα (2), που δείχνουν ικανοποιητική σχέση μεταξύ των ευρισκομένων αποτελεσμάτων και των αποτελεσμάτων που παρατηρούνται στα καθαρά και φυσικά νερά, και τούτο για αρκετούς τύπους χημικών ουσιών.

Για την εκτέλεση της μεθόδου αυτής για έλεγχο μιας ουσίας, χρήσιμο είναι να έχουμε προκαταρκτικές πληροφορίες για την τάση ατμών αυτής.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε ουσίες διαλυτές στο νερό. Οι προσμείξεις επηρεάζουν συνήθως τα αποτελέσματα.

Η υδρολυτική συμπεριφορά των χημικών ουσιών πρέπει να εξετάζεται σε τιμές pH που απαντούν συχνότερα στο περιβάλλον (pH 4 έως 9).

1.2. Ορισμοί και μονάδες

Η υδρόλυση αναφέρεται στην αντίδραση χημικής ουσίας RX με νερό. Η αντίδραση αυτή μπορεί να παρασταθεί με την πλήρη ανταλλαγή της ομάδας X με OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Η ταχύτητα με την οποία ελαττώνεται η συγκέντρωση του RX δίνεται από τη σχέση:

$$\text{Ταχύτητα} = k\,[H_2O] \cdot [RX] \qquad [2]$$

Επειδή το νερό υπάρχει σε μεγάλη περίσσεια σε σχέση με την ουσία, ο τύπος αυτός της αντιδράσεως περιγράφεται συνήθως στην αντίδραση ψευδο-πρώτης τάξεως, στην οποία η παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας δίνεται από τη σχέση:

$$k_{παρ} = K \times [H_2O] \qquad [3]$$

Η σταθερά αυτή μπορεί να προδιοριστεί για μια τιμή pH και μια θερμοκρασία T_1 με τη βοήθεια του τύπου:

$$k_{παρ} = \frac{2{,}303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \qquad [4]$$

όπου:

t = χρόνος

C_0 = η συγκέντρωση της ουσίας σε χρόνο 0

C_t = η συγκέντρωση της ουσίας σε χρόνο t και

2,303 = ο συντελεστής μετατροπής μεταξύ φυσικών και δεκαδικών λογαρίθμων.

Οι συγκεντρώσεις εκφράζονται σε g/l ή mole/l.

Σαν «ημιπερίοδος ζωής $t_{1/2}$» ορίζεται ο χρόνος που απαιτείται για να ελαττωθεί η συγκέντρωση της εξεταζομένης ουσίας κατά 50 %, δηλαδή:

$$C_t = ½ C_0 \qquad [5]$$

Από τις σχέσεις [4] και [5] μπορεί να αποδείξει κανείς ότι:

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{παρ} \qquad [6]$$

1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται ουσίες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάζεται μια νέα ουσία. Αυτές χρησιμεύουν κυρίως για τον έλεγχο αποδόσεως της μεθόδου από καιρό σε καιρό και για να δώσουν τη δυνατότητα συγκρίσεως αποτελεσμάτων όταν εφαρμόζεται άλλη μέθοδος.

Ακετυλοσαλυκιλικό οξύ (ασπιρίνη)

Φωσφοροθειοϊκό οξύ 0,0-διαιθυλο 0-(6-μεθυλο-2-(1 μεθυλαιθυλο)4-πυριμιδινυλο εστέρας (Διμπυλάτ, Διαζινόν) έχουν χρησιμοποιηθεί σαν ουσίες αναφοράς (1).

1.4. **Αρχή της μεθόδου**

Η ουσία διαλύεται σε νερό σε χαμηλή συγκέντρωση και ελέγχονται το pH και η θερμοκρασία.

Η ελάττωση της συγκεντρώσεως της ουσίας με την πάροδο του χρόνου παρακολουθείται με οποιαδήποτε κατάλληλη αναλυτική μέθοδο. Χαράσσεται γραφική παράσταση με το λογάριθμο της συγκεντρώσεως έναντι του χρόνου και, εάν η γραμμή είναι ευθεία, μπορεί από την κλίση της να ληφθεί η σταθερά της ταχύτητας πρώτου βαθμού (σημείο 2). Εάν πρακτικά δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί η σταθερά της ταχύτητας απευθείας για μια ιδιαίτερη θερμοκρασία, είναι συνήθως δυνατό να εκτιμηθεί η σταθερά αυτή με την βοήθεια της σχέσεως του Arrhenius, που δίνει την εξάρτηση της σταθεράς της ταχύτητας από τη θερμοκρασία. Από την ευθεία που λαμβάνεται με τη χάραξη του λογαρίθμου της σταθεράς της ταχύτητας, που προσδιορίστηκε σε κατάλληλες θερμοκρασίες σαν συνάρτηση του αντιστρόφου της απόλυτης θερμοκρασίας (K), είναι δυνατόν να εκτιμηθεί η τιμή της σταθεράς της ταχύτητας, που δεν ήταν δυνατό να μετρήσουμε απευθείας.

1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Αναφέρεται στην παραπομπή (2) ότι οι μετρήσεις των σταθερών της ταχύτητας της υδρολύσεως σε 13 κατηγορίες οργανικών δομών μπορεί να είναι μεγάλης ακρίβειας. Η επαναληψιμότητα εξαρτάται ιδιαίτερα από την τιμή του pH και τη συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου, μπορεί δε να επηρεασθεί από την παρουσία μικροοργανισμών.

1.6. **Περιγραφή της μεθόδου**

1.6.1. *Αντιδραστήρια*

1.6.1.1. Ρυθμιστικά διαλύματα

Ο έλεγχος γίνεται σε τρεις τιμές pH: 4,0, 7,0 και 9,0

Για το σκοπό αυτό πρέπει να παρασκευασθούν ρυθμιστικά διαλύματα με αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας και απεσταγμένο ή απιονισμένο αποστειρωμένο νερό. Μερικά παραδείγματα συστημάτων ρυθμιστικών διαλυμάτων παρουσιάζονται στο προσάρτημα 1.

Το χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό σύστημα μπορεί να επηρεάσει την ταχύτητα υδρολύσεως και, σε περίπτωση που παρατηρείται κάτι τέτοιο, πρέπει να χρησιμοποιηθεί άλλο εναλλακτικό ρυθμιστικό διάλυμα. Στην παραπομπή (2) συνιστάται η χρήση βορικού ή οξικού ρυθμιστικού αντί φωσφορικού.

Εάν το pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων δεν είναι γνωστό στη θερμοκρασία στην οποία γίνεται ο έλεγχος, η τιμή του προσδιορίζεται με βαθμονομημένο πεχάμετρο για την επιλεγμένη αυτή θερμοκρασία και με ακρίβεια ± 0,1 μονάδων pH.

1.6.1.2. Διαλύματα ελέγχου

Η εξεταζόμενη ουσία πρέπει να διαλυθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα που έχει επιλεγεί για το σκοπό αυτό, η δε συγκέντρωσή της (της ουσίας) δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,01 M ή το ήμισυ της συγκεντρώσεως κορεσμού της ουσίας και, πάντως, να μην υπερβαίνει τη χαμηλότερη από τις δύο αυτές συγκεντρώσεις. Η χρήση οργανικών διαλυτών, αναμείξιμων με νερό, συνιστάται μόνο για ουσίες χαμηλής διαλυτότητας στο νερό. Το ποσό του διαλύτη πρέπει να είναι κάτω του 1 % και να μην παρεμποδίζει την υδρολυτική διαδικασία.

1.6.2. *Συσκευή*

Πρέπει να χρησιμοποιούνται πωματισμένες φιάλες και να αποφεύγεται το γράσσο στις εσμυρισμένες ενώσεις.

Εάν η χημική ουσία ή το ρυθμιστικό σύστημα είναι πτητικά ή αν ο έλεγχος γίνεται σε ανεβασμένες θερμοκρασίες, είναι προτιμότεροι οι σφραγισμένοι ή κλειστοί με διάφραγμα (septum) σωλήνες, στους οποίους πρέπει ν' αποφεύγεται ο κενός χώρος.

1.6.3. *Αναλυτική μέθοδος*

Η αναλυτική μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί θα εξαρτηθεί από τη φύση της ουσίας και πρέπει να είναι αρκετά ακριβής και ευαίσθητη για να μπορεί να προσδιορίσει μια ελάττωση της αρχικής συγκεντρώσεως κατά 10 %. Η μέθοδος πρέπει να είναι ειδική για τον προσδιορισμό της εξεταζόμενης ουσίας στις συγκεντρώσεις του διαλύματος ελέγχου και μπορεί να απότελεί συνδυασμό κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών.

1.6.4. *Συνθήκες ελέγχου*

Οι έλεγχοι (προσδιοριστικοί) γίνονται σε κλειστό χώρο θερμοστατικά ελεγχόμενο ή σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας ± 0,5 °C. Η θερμοκρασία θα μετράται με ακρίβεια ± 0,1 °C. Με κατάλληλα μέσα πρέπει να αποφεύγονται φωτολυτικές επιδράσεις. Πρέπει επίσης να λαμβάνονται όλες οι κατάλληλες προφυλάξεις για να αποκλεισθεί η παρουσία διαλελυμένου οξυγόνου (π.χ. διάσπαση αζώτου ή αργού για 5 λεπτά πριν από την παρασκευή του διαλύματος).

1.6.5. *Πορεία ελέγχου*

1.6.5.1. Προκαταρκτικός έλεγχος

Για όλες τις ουσίες πρέπει να γίνεται προκαταρκτικός έλεγχος στους 50 ± 0,5 °C και για τρεις τιμές pH: 4,0, 7,0 και 9,0. Γίνονται αρκετές μετρήσεις για να καταστεί δυνατό να εκτιμηθεί αν, για κάθε τιμή pH στους 50 °C, η ημιπερίοδος ζωής ($t_{\frac{1}{2}}$) είναι μικρότερη από 2,4 ώρες ή αν, μετά την πάροδο πέντε ημερών, παρατηρείται υδρόλυση κάτω του 10 %. [Μπορεί κανείς να εκτιμήσει ότι οι τιμές αυτές αντιστοιχούν σε ημιπεριόδους ζωής χαμηλότερες της μιας ημέρας ή υψηλότερες του ενός χρόνου υπό συνθήκες που αντιπροσωπεύουν καλύτερα τις συνθήκες του περιβάλλοντος (25 °C)].

Εάν ο προκαταρκτικός έλεγχος δείξει ότι 50 % ή περισσότερο του 50 % της εξεταζόμενης ουσίας έχει υδρολυθεί σε 2,4 ώρες, σε 50 °C, ή ότι λιγότερο του 10 % αυτής υδρολύθηκε μετά από πέντε ημέρες, σε καθεμία από τις τιμές pH (4, 7 και 9) δεν χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος.

Σε άλλες περιπτώσεις και για ειδικές τιμές pH, για τις οποίες δεν πληρώθηκε ο όρος αυτός, γίνεται ο έλεγχος αριθ. 1.

1.6.5.2. Έλεγχος αριθ. 1

Ο έλεγχος αριθ. 1 εκτελείται σε μια θερμοκρασία κατά προτίμηση στους 50 ± 0,5 °C υπό άσηπτες συνθήκες (αποστειρώσεως), για εκείνες τις τιμές του pH για τις οποίες ο προκαταρκτικός έλεγχος έχει δείξει την ανάγκη περαιτέρω ελέγχου.

Επιλέγεται αρκετός αριθμός δειγμάτων (όχι λιγότερα από τέσσερα), που να καλύπτει την περιοχή μεταξύ 20 και 70 % της υδρολύσεως, για να ελεγχθεί αν η συμπεριφορά της ουσίας στην ειδική αυτή τιμή του pH είναι ψευδοπρώτης τάξεως.

Προσδιορίζεται η τάξη της αντιδράσεως για καθεμία από τις τιμές pH για την οποία εκτελείται ο έλεγχος αριθ. 1.

Εκτίμηση της σταθεράς της ταχύτητας στους 25 °C:

Η απόφαση για το πώς θα προχωρήσουμε πειραματικά εξαρτάται από το αν μπορεί να βγει συμπέρασμα από τον έλεγχο αριθ. 1, ότι η αντίδραση είναι ή όχι ψευδο-πρώτης τάξεως.

Εάν μπορεί να προκύψει με βεβαιότητα το συμπέρασμα από τον έλεγχο αριθ. 1, ότι η αντίδραση είναι ψευδο-πρώτης τάξεως, τα πειράματα πρέπει να συνεχιστούν, όπως περιγράφεται στον έλεγχο αριθ. 2.

Εάν δεν μπορεί να προκύψει με βεβαιότητα από τον έλεγχο αριθ. 1, ότι αντίδραση είναι ψευδο-πρώτης τάξεως, τα πειράματα πρέπει να συνεχιστούν, όπως περιγράφεται στον έλεγχο αριθ. 3.

Εναλλακτικά, μπορεί υπό ειδικές συνθήκες να είναι δυνατόν να υπολογισθούν οι σταθερές της ταχύτητας στους 25 °C από τις σταθερές στους 50 °C, που έχουν υπολογισθεί από τα αποτελέσματα του ελέγχου αριθ. 1 (βλέπε σημείο 3.2).

1.6.5.3. Έλεγχος αριθ. 2

Ο έλεγχος αυτός εκτελείται για κάθε τιμή του pH για την οποία τα απολέσματα του ελέγχου αριθ. 1 έδειξαν την ανάγκη γι' αυτό, ή σε μία θερμοκρασία χαμηλότερη των 40 °C ή σε δύο θερμοκρασίες υψηλότερες των 50 °C, που διαφέρουν μεταξύ τους τουλάχιστον κατά 10 °C.

Για κάθε τιμη pH και θερμοκρασία, για την οποία εκτελείται ο έλεγχος αριθ. 2, πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον έξι κατάλληλα απέχοντα σημεία δεδομένων, ώστε οι βαθμοί υδρολύσεως να βρίσκονται στην περιοχή 20 έως 70 %.

Για μία τιμή pH και μία θερμοκρασία ο προσδιορισμός εκτελείται εις διπλούν. Όταν ο έλεγχος αριθ. 2 γίνεται σε δύο θερμοκρασίες πάνω από τους 50 °C, προσδιορισμός εις διπλούν γίνεται κατά προτίμηση στη χαμηλότερη από τις δύο αυτές θερμοκρασίες.

Για κάθε τιμή pH και θερμοκρασία, στην οποία εκτελείται ο έλεγχος αριθ. 2, πρέπει, εφόσον είναι δυνατόν, να δίνεται μια γραφική εκτίμηση της ημιπεριόδου ζωής ($t_{1/2}$).

1.6.5.4. Έλεγχος αριθ. 3

Ο έλεγχος αυτός εκτελείται σε κάθε τιμή του pH για την οποία τα αποτελέσματα του ελέγχου αριθ. 1 έδειξαν ότι είναι απαραίτητος, ή σε μια θερμοκρασία κάτω των 40 °C ή σε δύο θερμοκρασίες άνω των 50 °C, που διαφέρουν μεταξύ τους τουλάχιστον κατά 10 °C.

Για κάθε τιμή pH και θερμοκρασία, για την οποία εκτελείται ο έλεγχος αριθ. 3, επιλέγονται τρία σημεία δεδομένων, το πρώτο στο χρόνο 0 και το δεύτερο και το τρίτο όταν ο βαθμός υδρολύσεως είναι μεγαλύτερος του 30 %· υπολογίζεται η παρατηρούμενη σταθερά $k_{παρ}$ και ο $t_{1/2}$.

2. **Δεδομένα**

Για συμπεριφορά ψευδο-πρώτης κατηγορίας, οι τιμές $k_{παρ}$ για κάθε τιμή pH και κάθε θερμοκρασία, στην οποία έγιναν οι έλεγχοι, μπορεί να ληφθούν από τις γραφικές παραστάσεις του λογαρίθμου της συγκεντρώσεως έναντι του χρόνου, από τη σχέση:

$k_{παρ}$ = κλίση × 2,303

Επιπλέον, μπορεί να υπολογισθεί ο $t_{1/2}$ σύμφωνα με την εξίσωση [6]. Υπολογίσατε k_{25} εφαρμόζοντας την εξίσωση του Arrhenius, όπου τούτου είναι εφικτό.

Για συμπεριφορά μη ψευδο-πρώτης τάξεως, βλέπε σημείο 3.1.

3. **ΕΚΘΕΣΗ**

3.1. **Σύνταξη εκθέσεως**

Η έκθεση ελέγχου πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

— προδιαγραφή της ουσίας (ταυτότητα και ξένες προσμείξεις),

— ότι αποτελέσματα έχουν ληφθεί με ουσίες αναφοράς,

— την αρχή και λεπτομέρειες της αναλυτικής μεθόδου που έχει χρησιμοποιηθεί,

— για κάθε έλεγχο, τη θερμοκρασία, την τιμή του pH, τη σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος και έναν πίνακα με όλα τα δεδομένα συγκεντρώσεως-χρόνου,

— για την αντίδραση ψευδο-πρώτης τάξεως, τις τιμές $k_{παρ}$ και $t_{1/2}$ και τη διαδικασία υπολογισμού τους,

— για την μη ψευδο-πρώτης τάξεως αντίδραση, τα αποτελέσματα γραφικής παραστάσεως του λογαρίθμου της συγκεντρώσεως έναντι του χρόνου,

— κάθε πληροφορία και παρατήρηση που έχει σχέση με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Ερμηνεία των αποτελεσμάτων**

Ενδέχεται να είναι δυνατόν να υπολογισθούν παραδεκτές τιμές των σταθερών ταχύτητας (στους 25 °C) των εξεταζομένων ουσιών, αρκεί να υπάρχουν ήδη πειραματικές τιμές της ενέργειας ενεργοποιήσεως της εξεταζόμενης ουσίας οι οποίες προσομοιάζουν με τις πειραματικές αυτές τιμές.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

(1) ΟΟΣΑ, Παρίσι 1981, Κατευθυντήρια οδηγία ελέγχου 111, Απόφαση του Συμβουλίου C(81) 30 final.
(2) ΟΟΣΑ, Παρίσι 1981, Κατευθυντήρια οδηγία ελέγχου 111, Απόφαση του συμβουλίου C(81) 30 final — παραπομπή (2).

Προσάρτημα

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

A. CLARK και LUBS

Οι τιμές pH που αναφέρονται σ' αυτούς τους πίνακες έχουν υπολογιστεί από τις βασικές μετρήσεις, χρησιμοποιώντας τις πρότυπες εξισώσεις του Sörensen (1909). Οι πραγματικές τιμές του pH είναι 0,04 μονάδες υψηλότερες από τις τιμές που εκτίθενται στον πίνακα.

Σύνθεση

	pH
0,1 M όξινο φθαλικό κάλιο + 0,1 N HCl se 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml φθαλικό στα 100 ml	3,8
0,1 M όξινο φθαλικό κάλιο + 0,1 N NaOH σε 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml φθαλικό στα 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml φθαλικό στα 100 ml	4,2
0,1 M φωσφορικό μονοκάλιο + 0,1 N NaOH σε 20 °C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml φωσφορικό στα 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml φωσφορικό στα 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml φωσφορικό στα 100 ml	7,2
0,1 M H_3BO_3 σε 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH σε 20 °C	
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml βορικό οξύ στα 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml βορικό οξύ στα 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml βορικό οξύ στα 100 ml	9,2

KOLTHOFF & VLEESCHOUWER

Σύνθεση

	pH
0,1 M κιτρικό μονοκάλιο και 0,1 N NaOH σε 18 °C (Προσθέσατε μικρούς κρυστάλλους θυμόλης ή μερικά χιλιοστά του γραμμαρίου ιωδιούχου υδραργύρου προς αποφυγή αναπτύξεως μούχλας.)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml κιτρικό στα 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml κιτρικό στα 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml κιτρικό στα 100 ml	4,2

C. SÖRENSEN

0,05 M βόρακας + 0,1 N HCl

Σύνθεση		pH			
ml βόρακα	ml HCl	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M βόρακας + 0,1 N NaOH

Σύνθεση		pH			
ml βόρακα	ml NaOH	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12