392L0069

29.12.92 *EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI* N:o L 383/113

KOMISSION DIREKTIIVI 92/69/ETY,

annettu 31 päivänä heinäkuuta 1992,

vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen seitsemännentoista kerran

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 27 päivänä kesäkuuta 1967 annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY(1), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna direktiivillä 92/32/ETY(2), ja erityisesti sen 28 ja 29 artiklan,

sekä katsoo, että

direktiivin 67/548/ETY 3 artiklan 1 kohdassa ja vaarallisten valmisteiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien jäsenvaltioiden lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 7 päivänä kesäkuuta 1988 annetun neuvoston direktiivin 88/379/ETY(3), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission direktiivillä 90/492/ETY(4), 3 artiklassa säädetään, että aineiden ja valmisteiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, myrkyllisyys ja ympäristömyrkyllisyys määritetään direktiivin 67/548/ETY liitteessä V määrätyin menetelmin,

direktiivin 67/548/ETY liite on julkaistu kahdessa osassa, jotka ovat komission direktiivin 84/449/ETY liite(5) ja komission direktiivin 88/302/ETY(6) liite,

tekniikan kehityksen huomioon ottamiseksi on tarpeen muuttaa komission direktiivin 84/449/ETY liitteessä olevia testausmenetelmiä,

tekniikan kehityksen huomioon ottamiseksi on tarpeen muuttaa myös tällä hetkellä komission direktiivin 88/302/ETY liitteessä määrättyä testausmenetelmää leväkasvun estämiseksi, ja tässä tapauksessa siirtää tämä testausmenetelmä direktiivin 84/449/ETY liitteeseen,

koetarkoituksiin käytettävien eläinten lukumäärä on tarpeen vähimmäistää kokeisiin ja muihin tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelua koskevien jäsenvaltioiden lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä, ja 24 päivänä marraskuuta 1986 annetun komission direktiivin 86/609/ETY(7) mukaisesti, ja

tämän direktiivin säännökset ovat vaarallisten aineiden ja valmisteiden kaupan teknisten esteiden poistamiseksi annettujen direktiivien mukauttamista tekniikan kehitykseen käsittelevän komitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Korvataan direktiivin 84/449/ETY liite tämän direktiivin liitteellä.

2 artikla

Poistetaan direktiivin 88/302/ETY liitteessä tarkoitettu levän kasvunestoa koskeva testausmenetelmä.

3 artikla

Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 30 päivänä lokakuuta 1993. Jäsenvaltioiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niitä virallisesti julkaistaessa niihin on

(1) EYVL N:o 196, 16.8.1967, s. 1
(2) EYVL N:o L 154, 5.6.1992, s. 1
(3) EYVL N:o L 187, 16.7.1988, s. 14
(4) EYVL N:o L 275, 5.10.1990, s. 35
(5) EYVL N:o L 251, 19.9.1984, s. 1
(6) EYVL N:o L 133, 30.5.1988, s. 1 ja EYVL N:o L 136, 2.6.1988, s. 20
(7) EYVL N:o L 358, 18.12.1986, s. 1

liitettävä viittaus tähän direktiiviin. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

4 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 31 päivänä heinäkuuta 1992.

Komission puolesta

Karel VAN MIERT

Komission jäsen

LIITE

Vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen seitsemännentoista kerran 31 päivänä heinäkuuta 1992 annetun komission direktiiviin 92/69/ETY liite(1)

(1) EYVL N:o L 383, 29.12.1992, s. 113

SISÄLLYS

OSA A:	FYSIKAALIS-KEMIALLISTEN OMINAISUUKSIEN MÄÄRITYSMENETELMÄT ...	9
A.1	Sulamis-/jäätymislämpötila ...	9
A.2	Kiehumislämpötila ...	19
A.3	Suhteellinen tiheys ...	25
A.4	Höyrynpaine ...	30
A.5	Pintajännitys ...	51
A.6	Vesiliukoisuus ...	58
A.8	Jakaantumiskerroin ...	67
A.9	Leimahduspiste ...	78
A.10	Syttyvyys (kiinteät aineet) ...	80
A.11	Syttyvyys (kaasut) ...	83
A.12	Syttyvyys (kosketus veden kanssa) ...	85
A.13	Kiinteiden aineiden ja nesteiden itsesyttyvyys ...	89
A.14	Räjähtävyys ...	91
A.15	Itsesyttymislämpötila (nesteet ja kaasut) ...	102
A.16	Kiinteiden aineiden suhteellinen itsesyttymislämpötila ...	103
A.17	Hapettavat ominaisuudet (kiinteät aineet) ...	106
OSA B:	MYRKYLLISYYDEN MÄÄRITTÄMISMENETELMÄT ...	111
Yleinen johdanto: osa B ...		111
B.1	Akuutti oraalinen myrkyllisyys ...	114
B.1 bis	Akuutti oraalinen myrkyllisyys — Kiinteän annoksen menetelmä ...	117
B.2	Akuutti myrkyllisyys (hengitettynä) ...	121
B.3	Akuutti myrkyllisyys (ihon kautta) ...	125
B.4	Akuutti myrkyllisyys (ihoärsytys) ...	128
B.5	Akuutti myrkyllisyys (silmien ärsytys) ...	131
B.6	Ihon herkistyminen ...	135
B.7	Toistetun oraalisen annoksen (28 päivää) myrkyllisyys ...	140
B.8	Toistetun annoksen (28 päivää) myrkyllisyys (hengitettynä) ...	144
B.9	Toistetun annoksen (28 päivää) myrkyllisyys (ihon kautta nautittavat aineet) ...	148
B.10	Mutageenisyys (sytogeneettinen *in vitro* -koe nisäkkäillä) ...	152
B.11	Mutageenisyys (selkäydinsolujen sytogeneettinen *in vivo* -koe nisäkkäillä, kromosomianalyysi) ...	155
B.12	Mutageenisyys (mikrotumakoe) ...	158
B.13	Mutageenisyys (*escherichia coli*, reversiomutaation määritys) ...	161
B.14	Mutageenisyys (*salmonella typhimurium*, reversiomutaation määritys) ...	164

OSA C:	EKOMYRKYLLISYYDEN MÄÄRITTÄMISMENETELMÄT	167
C.1	Akuutti myrkyllisyys kalalle	167
C.2	Akuutti myrkyllisyys vesikirpulle	176
C.3	Levän inhibitiokoe	183
C.4	Biohajoavuuden määritys	191
	C.4.A Doc die-away-koe	198
	C.4.B Muunneltu OECD-seulontakoe	201
	C.4.C Hiilidioksidin muodostumiskoe	206
	C.4.D Manometrinen respirometriakoe	211
	C.4.E Suljetun pullon menetelmä	215
	C.4.F Miti-koe	220
	Liite	225
C.5	Hajoaminen — Biokemiallinen hapenkulutus	230
C.6	Hajoaminen — Kemiallinen hapenkulutus	231
C.7	Hajoaminen — Abioottinen degradaatiohydrolyysi pH:N funktiona	233

JOHDANTO

Tässä liitteessä kuvataan direktiivin 79/831/ETY liitteissä VII ja VIII lueteltujen fysikaalis-kemiallisten, myrkyllisten ja ympäristölle myrkyllisten ominaisuuksien määritykseen käytettäviä testimenetelmiä. Tässä liitteessä kuvattavat menetelmät perustuvat kansainvälisten viranomaiselinten (erityisesti OECD:n) hyväksymiin ja suosittelemiin menetelmiin.

Kun tällaisia hyväksyttyjä menetelmiä ei ole ollut käytettävissä, kuvauksien tietolähteinä on käytetty kansallisia standardeja tai yleisesti hyväksyttyjä tieteellisiä menetelmiä. Testit on yleensä tehtävä direktiivissä määritellyllä aineella. Epäpuhtauksien mahdolliseen vaikutukseen testituloksiin on kiinnitettävä huomiota.

Jos tämän liitteen mukaiset menetelmät eivät sovellu tietyn ominaisuuden tutkimiseen, ja päädytään käyttämään vaihtoehtoista menetelmää, menettely on perusteltava.

Eläinkokeet ja -tutkimukset on tehtävä kansallisten määräysten mukaisesti. Näissä kokeissa on otettava huomioon inhimillisyyden periaatteet ja eläinten hyvinvointiin liittyvät kansainväliset säännökset.

Kahdesta samanarvoisesta menetelmästä on valittava se, jossa tarvittava eläinmäärä on pienempi.

OSA A: FYSIKAALIS-KEMIALLISTEN OMINAISUUKSIEN MÄÄRITYSMENETELMÄT

A.1 SULAMIS-/JÄÄTYMISLÄMPÖTILA

1 MENETELMÄ

Tässä kuvattavat menetelmät perustuvat pääosin OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteissä (2) ja (3).

1.1 JOHDANTO

Kuvattuja menetelmiä ja laitteita voidaan soveltaa aineiden sulamislämpötilan määritykseen ilman rajoituksia aineiden puhtausasteen suhteen.

Sopiva menetelmä valitaan testattavan aineen luonteen mukaan. Aineet voivat olla helposti, vaikeasti tai ei lainkaan jauhettavissa.

Joidenkin aineiden kohdalla on käytännöllisempää määrittää jäätymis- tai jähmettymislämpötila, ja tästä syystä menetelmään on myös otettu mukaan tällaisten määritysten standardit.

Jos aineen ominaisuudet ovat sellaiset, että mikään edellä mainituista parametreista ei ole mitattavissa, voidaan joissakin tapauksissa käyttää jähmettymispistettä.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan sulamislämpötila on se lämpötila, jossa tapahtuu faasimuutos kiinteästä olomuodosta nestemäiseen olomuotoon ilmakehän paineessa. Ihannetapauksissa sulamislämpötila on sama kuin jäätymislämpötila.

Koska faasimuutos kattaa usein määrätyn lämpötila-alueen, voidaan käyttää myös käsitettä sulamisalue.

Yksiköiden muuntaminen (K > °C)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius-lämpötila, Celsius-astetta (°C)

T: termodynaaminen lämpötila, kelviniä (K)

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

Viitteessä (4) kuvataan joitakin kalibrointiaineita.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATTEET

Määritetään lämpötila (lämpötila-alue), jossa tapahtuu faasimuutos kiinteästä olomuodosta nestemäiseen olomuotoon tai päinvastoin. Käytännössä määritetään sulamisen tai jäätymisen alku- ja loppulämpötila kuumennettaessa tai jäähdytettäessä näytettä ilmakehän paineessa. Jäljempänä kuvataan viisi menetelmätyyppiä: kapillaarimenetelmä, kuuma-alustamenetelmät, jäätymislämpötilan määritykset, terminen analyysi ja jähmettymispisteen määritys (kehitetty paloöljyjä varten).

Joissakin tapauksissa voi olla käytännöllisempää määrittää sulamislämpötilan sijasta jäätymislämpötila.

1.4.1 **Kapillaarimenetelmä**

1.4.1.1 *Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet*

Pieni määrä hienoksi jauhettua näytettä pakataan tiiviisti kapillaariputkeen. Putkea kuumennetaan yhdessä lämpömittarin kanssa siten, että lämpötilan nousu on alle 1 K minuutissa varsinaisen sulamisen aikana. Määritetään sulamisen alku- ja loppulämpötila.

1.4.1.2 *Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet*

Periaate on muutoin sama kuin kohdassa 1.4.1.1, mutta kapillaariputki ja lämpömittari asetetaan kuumennettavaan metallikappaleeseen, jossa on reiät niiden tarkastelua varten.

1.4.1.3 *Valokennoilmaisin*

Kapillaariputkessa olevaa näytettä kuumennetaan metallisylinterissä automaattisesti. Aineen läpi johdetaan valonsäde sylinterin reiän kautta tarkasti kalibroituun valokennoon. Digitaalisesta osoittimesta nähdään kuumennuskammiossa sijaitsevan platinavastuslämpömittarin mittaama lämpötila. Useimpien aineiden optiset ominaisuudet muuttuvat sulamisen myötä valoaläpäisemättömäksi läpinäkyvään, jolloin valokennoon tulevan valonsäteen intensiteetti kasvaa ja digitaalinen osoitin saa pysäytyssignaalin. Menetelmä ei sovellu voimakkaanväristen aineiden mittauksiin.

1.4.2 **Kuuma-alustamenetelmät**

1.4.2.1 *Koflerin kuumasauva*

Koflerin kuumasauvassa on kaksi metalliosaa, joilla on eri lämmönjohtavuus. Sähkölämmitteinen sauva on suunniteltu siten, että lämpötilagradientti on lähes lineaarinen sauvan pituussuunnassa. Sauvan mitattava lämpötila-alue on 283 — 573 K, ja mittaus tehdään sauvatyyppikohtaisella erikoislaitteella, jossa on osoitinkisko. Aineen sulamislämpötilan määritystä varten näytettä levitetään ohuelti suoraan kuuman sauvan pinnalle. Muutamassa sekunnissa muodostuu selvä raja nestemäisen ja kiinteän faasin välille. Rajan lämpötila luetaan siirtämällä osoitin rajan kohdalle.

1.4.2.2 *Sulamismikroskooppi*

Sulamismikroskoopin avulla sulamislämpötila voidaan määrittää hyvin pienestä näytemäärästä. Sulamismikroskooppeja on monia eri tyyppejä. Useimmissa malleissa lämpötila mitataan herkän termoparin avulla, mutta myös elohopeamittaria käytetään. Tyypillisessä sulamismikroskoopissa on kuumennuskammio ja tämän sisällä metallilevy, jolle näytettä sisältävä objektilasi asetetaan. Tarvittava valo saadaan kammioon mikroskoopin valaisupeilistä metallilevyn keskiön reiän kautta. Kammion sulkeva lasilevy estää ilman pääsyn näytealueelle mittauksen aikana.

Näytteen kuumentamista säätää reostaatti. Hyvin tarkoissa optisesti anisotrooppisten aineiden mittauksissa voidaan käyttää polarisoitua valoa.

1.4.2.3 *Meniskimenetelmä*

Tätä menetelmää käytetään erityisesti polyamidien ominaisuuksien mittauksissa.

Määritetään visuaalisesti lämpötila, jossa polyamidinäytteellä lepäävä kuumennusalustan ja lasilevyn välinen silikoniöljymeniski liikkuu.

1.4.3 **Jäätymislämpötilan määritysmenetelmä**

Näyte pannaan erityiseen koeputkeen, joka asetetaan jäätymislämpötilan määrityslaitteeseen. Näytettä hämmennetään kevyesti koko jäähdyttämisen ajan. Mitataan lämpötila sopivin välein. Kun lämpötila on pysynyt samana muutaman mittauksen ajan, tämä lämpötila (lämpömittarin virheellä korjattuna) katsotaan jäätymislämpötilaksi.

Alijäähtymistä on vältettävä pitämällä yllä kiinteän ja nestemäisen faasin välistä tasapainoa.

1.4.4 **Terminen analyysi**

1.4.4.1 *Differentiaaliterminen analyysi (DTA)*

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä olomuodon muutos, muutos näkyy endotermisenä (sulaminen) tai eksotermisenä (jäätyminen) poikkeamana lämpötilakäyrän perusviivasta.

1.4.4.2 *Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria (DSC)*

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen energianottoero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Tämä energiaero on energiamäärä, joka tarvitaan pienentämään näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero nollaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä muodonmuutos, muutos näkyy endotermisenä (sulaminen) tai eksotermisenä (jäätyminen) poikkeamana lämpövirran perusviivasta.

1.4.5 **Jähmettymispiste**

Tätä paloöljyjä varten kehitettyä menetelmää voidaan käyttää alhaisen sulamispisteen omaavien öljymäisten aineiden tutkimiseen.

Alustavan kuumennuksen jälkeen näytettä jäähdytetään määrätyllä nopeudella. Jäähtymisen aikana näytteen virtausominaisuuksia tarkastellaan 3 K:n välein. Alin lämpötila, jossa vielä esiintyy liikettä, on aineen jähmettymispiste.

1.5 LAATUKRITEERIT

Sulamislämpötilan tai sulamisalueen määritykseen tarkoitettujen menetelmien soveltuvuus ja tarkkuus kuvataan seuraavassa taulukossa.

TAULUKKO: MENETELMIEN SOVELTUVUUS

A. Kapillaarimenetelmät

Mittausmenetelmä	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus(1)	Nykyinen standardi
Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet	kyllä	vain harvat	273 — 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet	kyllä	vain harvat	293... > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Valokennoilmaisin	kyllä	useat (erikoislaitteiden avulla)	253 — 573 K	± 0,5 K	

(1) Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan

B. Kuuma-alusta- ja jäätymismenetelmät

Mittausmenetelmä	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus(1)	Nykyinen standardi
Koflerin kuuma sauva	kyllä	ei	283... > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Sulamismikroskooppi	kyllä	vain harvat	273... > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniskimenetelmä	ei	erityisesti polyamidit	293... > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Jäätymislämpötila-menetelmät	kyllä	kyllä	223 — 573 K	± 0,5 K	esim. BS 4695
(1) Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan					

C. Terminen analyysi

Mittausmenetelmä	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus(1)	Nykyinen standardi
Differentiaaliterminen analyysi	kyllä	kyllä	173 — 1 273 K	enintään 600 K: ± 0,5 K enintään 1 273 K: ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria	kyllä	kyllä	173 — 1 273 K	enintään 600 K: ± 0,5 K enintään 1 273 K: ± 2,0 K	ASTM E 537-76
(1) Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan					

D. Jähmettymispiste

Mittausmenetelmä	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus(1)	Nykyinen standardi
Jähmettymispiste	paloöljyt ja öljymäiset aineet	paloöljyt ja öljymäiset aineet	223 — 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66
(1) Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan					

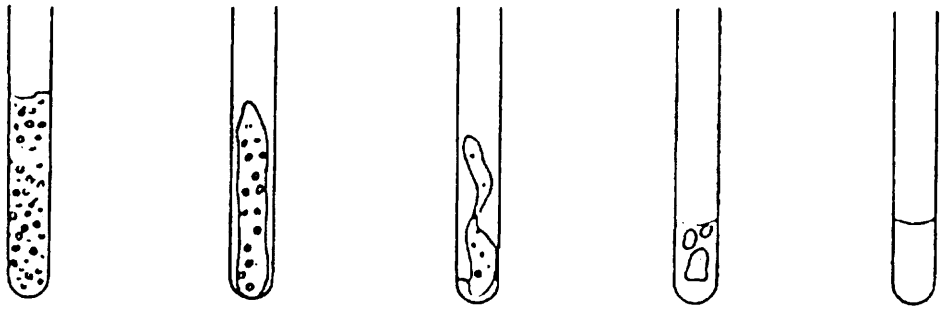
1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

Testimenetelmien työjärjestys on pääosin kuvattu kansainvälisissä ja kansallisissa standardeissa (katso liitettä 1).

1.6.1 Kapillaariputkimenetelmät

Kun hienoksi jauhettua ainetta kuumennetaan hitaasti, siinä on yleensä havaittavissa kuvassa 1 esitettävät sulamisvaiheet.

Kuva 1



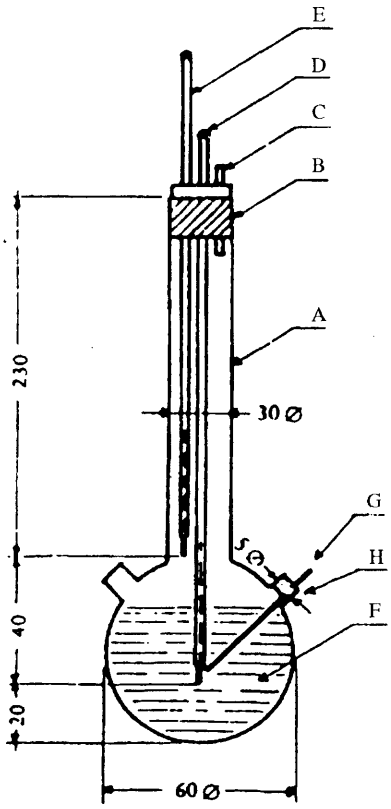
Vaihe A	Sulaminen alkaa: Kapillaariputken sisäseinälle muodostuu yhtenäinen kerros pieniä pisaroita.
Vaihe B	Kutistuminen: Näytteen ja putken sisäseinän väliin muodostuu tyhjä tila.
Vaihe C	Kutistunut näyte vajoaa kasaan ja muuttuu nestemäiseksi.
Vaihe D:	Yhtenäinen meniski muodostuu koeputken sisällön pinnalle, mutta huomattava osa näytettä on vielä kiinteässä muodossa.
Vaihe E:	Sulamisen loppuvaihe: Nesteen seassa ei enää ole kiinteitä hiukkasia.

Sulamislämpötila määritetään rekisteröimällä sulamisen alku- ja loppulämpötila.

1.6.1.1 *Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet*

Kuvassa 2 on lasista valmistettu standardoitu sulamislämpötilalaite (JIS K 0064). Kaikki mitat ovat millimetreinä.

Kuva 2



A: Mitta-astia
B: Tulppa
C: Ilmaputki
D: Lämpömittari
E: Apulämpömittari
F: Haudeneste
G: Lasinen kapillaariputki, pituus 80–100 mm, sisähalkaisija 1,0 ± 0,2 mm, lasiseinän paksuus 0,2–0,3 mm
H: Sivuputki

Haudeneste:

Haudeneste valitaan määritettävän sulamislämpötilan mukaan. Jos esimerkiksi sulamislämpötila on enintään 473 K, käytetään paloöljyä, ja jos sulamislämpötila on enintään 573 K, käytetään silikoniöljyä.

Jos sulamislämpötila on suurempi kuin 523 K, voidaan käyttää seosta, jossa on kolme paino-osaa rikkihappoa ja kaksi paino-osaa kaliumsulfaattia. Tätä seosta käytettäessä on noudatettava tarpeellisia varotoimenpiteitä.

Lämpömittari

Käytettävän lämpömittarin tulee täyttää seuraavat tai niitä vastaavat standardit:

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

Työjärjestys:

Kuiva näyte hienonnetaan huhmareessa ja siirretään kapillaariputkeen, jonka toinen pää on suljettu. Näytettä pannaan putkeen sellainen määrä, että sen korkeus tiiviiksi pakattuna on noin 3 mm. Yhtenäisen pakkaustiiviyden saavuttamiseksi kapillaariputki pudotetaan noin 700 mm:n korkeudelta kohtisuoraan lasiputken läpi kellonlasille.

Täytetty kapillaariputki asetetaan hauteeseen siten, että lämpömittarin elohopeanuppi koskettaa kapillaariputkea näytteen kohdalta. Kun kapillaariputki asetetaan hauteeseen, sen lämpötila on yleensä noin 10 K alle sulamislämpötilan.

Hauteen nestettä kuumennetaan siten, että lämpötilan nousu on noin 3 K/min. Nestettä on hämmennettävä. Kun lämpötila on noin 10 K alle sulamislämpötilan, kuumenemista säädetään, niin että lämpötilan nousu on enintään 1 K/min.

Tuloksen laskenta:

Sulamislämpötila lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan:

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

jossa:

T = korjattu sulamislämpötila kelvineinä

T_D = D-lämpömittarin lukema kelvineinä

T_E = E-lämpömittarin lukema kelvineinä

n = D-lämpömittarin nesteen yläpuolella olevan varren elohopeapylvään astejakojen määrä

1.6.1.2 *Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet*

Laitteisto:

Laitteiston osat ovat seuraavat:

— sylinterinmuotoinen metallikappale, jonka yläosa on ontto ja muodostaa kammion (katso kuvaa 3)

— metallitulppa, jossa on vähintään kaksi reikää, joiden kautta metallikappaleeseen voidaan työntää putkia

— metallikappaleen kuumennusjärjestelmä, esimerkiksi kappaleen sisällä oleva sähkövastus

— reostaatti tehonsäätöä varten (jos käytössä on sähkölämmitys)

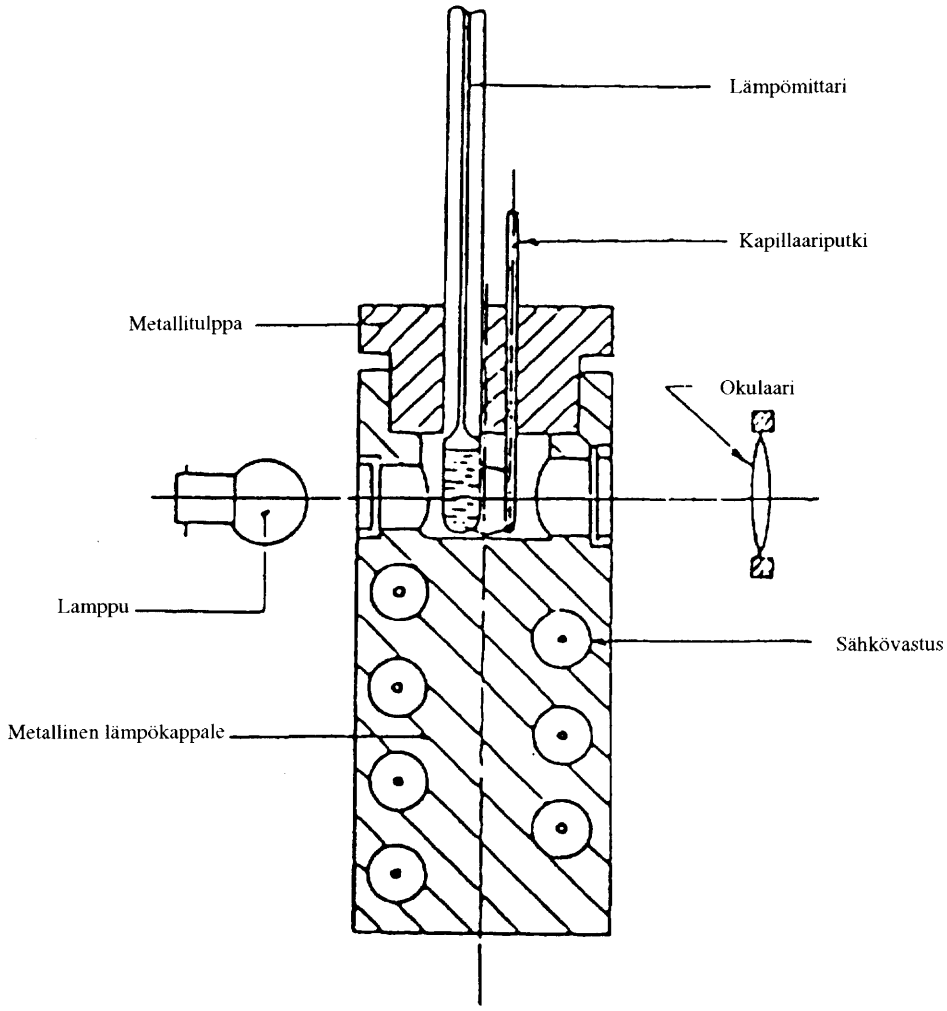
— kammion sivuseinissä neljä lämmönkestävää lasi-ikkunaa, jotka ovat vastakkain ja toisiinsa nähden suorassa kulmassa; yhden ikkunan edessä on okulaari kapillaariputken tarkastelua varten, muiden ikkunoiden läpi johdetaan lampuista valoa kammion sisäosaan

— lämmönkestävästä lasista valmistettu kapillaariputki, jonka toinen pää on suljettu (katso kohtaa 1.6.1.1).

Lämpömittari:

Katso kohdassa 1.6.1.1 mainittavia standardeja. Myös riittävän tarkkoja lämpösähköisiä mittauslaitteita voidaan käyttää.

Kuva 3



1.6.1.3 *Valokennoilmaisin*

Laitteisto ja työjärjestys:

Laitteisto on automaattisella kuumennusjärjestelmällä varustettu metallikammio. Kolme kapillaariputkea täytetään kohdan 1.6.1.1 ohjeiden mukaan ja asetetaan uuniin.

Laitteiston kalibroinnin avulla saadaan useita lineaarisia lämpötilan nousukäyriä. Kuumennus säädetään sähköisesti valitun vakion ja lineaarisen nousukäyrän mukaan. Uunin lämpötila ja kapillaariputkessa olevien näytteiden lämpötila ilmenevät rekisteröintilaitteesta.

1.6.2 **Kuuma- alustat**

1.6.2.1 *Koflerin kuumasauva*

Katso liitettä.

1.6.2.2 *Sulamismikroskooppi*

Katso liitettä.

1.6.2.3 *Meniskimenetelmä (polyamidit)*

Katso liitettä.

Sulamislämpötilan alueella lämpötilan nousun on oltava alle 1 K/min.

1.6.3 **Jäätymislämpötilan määritysmenetelmät**

Katso liitettä.

1.6.4 **Terminen analyysi**

1.6.4.1 *Differentiaaliterminen analyysi*

Katso liitettä.

1.6.4.2 *Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria*

Katso liitettä.

1.6.5 **Jähmettymispisteen määritys**

Katso liitettä.

2 **TIEDOT**

Joissakin tapauksissa lämpömittarin korjaus on tarpeen.

3 **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset

— arvio tarkkuudesta.

Sulamislämpötilana raportoidaan vähintään kahden arvioidulla tarkkuusalueella (katso taulukoita) olevan mittauksen keskiarvo.

Jos sulamisen alku- ja loppulämpötilan ero on menetelmän tarkkuusrajojen sisällä, sulamislämpötilana raportoidaan sulamisen loppuvaiheen lämpötila. Muussa tapauksessa molemmat lämpötilat raportoidaan.

Jos aine hajoaa tai höyrystyy ennen sulamislämpötilaa, raportoidaan lämpötila, jossa hajoaminen tai höyrystyminen on tapahtunut.

Raporttiin tulee sisällyttää myös kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

4 VIITTEET

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

(2) UIPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II, 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

(4) UICPA, Physiochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505 — 515.

Liite

Lisää teknisiä tietoja on seuraavissa standardeissa.

1 Kapillaarimenetelmät

1.1 Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet

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

1.2 Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet

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

2 Kuuma-alustat

2.1 Koflerin kuumasauva

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

2.2 Sulamismikroskooppi

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3 Meniskimenetelmä (polyamidit)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of 'melting point'
ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du 'point de fusion'. Méthode du ménisque.

3 **Jäätymislämpötilan määritysmenetelmät**

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

4 **Terminen analyysi**

4.1 Terminen differentiaalianalyysi

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2 Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5 **Jähmettymispisteen määritys**

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

A.2 KIEHUMISLÄMPÖTILA

1 MENETELMÄ

Tässä kuvattavat menetelmät perustuvat pääosin OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteissä (2) ja (3).

1.1 JOHDANTO

Tässä kuvattuja menetelmiä ja laitteita voidaan soveltaa nesteiden ja matalissa lämpötiloissa sulavien aineiden kiehumispisteen määritykseen, edellyttäen että aineissa ei tapahdu kemiallisia reaktioita ennen kiehumista (esimerkiksi itsehapettumista, rakennemuutoksia, hajoamista tms.). Menetelmät soveltuvat sekä puhtaisiin että epäpuhtaisiin nestemäisiin aineisiin.

Päähuomion kohteena ovat valokennoilmaisimiin ja termiseen analyysiin perustuvat menetelmät, koska näiden menetelmien avulla voidaan määrittää sekä sulamis- että kiehumislämpötila. Lisäksi mittaukset voidaan suorittaa automaattisesti.

Ns. dynaamisen menetelmän etu on se, että menetelmää voidaan käyttää höyrynpaineen määritykseen. Tällöin kiehumislämpötilaa ei tarvitse korjata normaaliin paineeseen (101,325 kPa), koska normaalipainetta voidaan mittauksen aikana säätää painekytkimen avulla.

Huomautuksia:

Epäpuhtauksien vaikutus kiehumislämpötilan määritykseen vaihtelee huomattavasti niiden luonteen mukaan. Jos näyte sisältää haihtuvia epäpuhtauksia, jotka voivat vaikuttaa tulokseen, aine voidaan puhdistaa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan normaali kiehumislämpötila on lämpötila, jossa nesteen höyrynpaine on 101,325 kPa.

Jos kiehumislämpötilaa ei mitata normaalissa ilmakehän paineessa, lämpötilan riippuvuus höyrynpaineesta voidaan esittää Clausius-Clapeyronin yhtälön avulla:

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

jossa:

p = aineen höyrynpaine (Pa)

ΔH_v = höyrystymislämpö (J mol^{-1})

R = yleinen molaarinen kaasuvakio (8,314 J mol^{-1} K^{-1})

T = termodynaaminen lämpötila (K)

Kiehumislämpötilan rekisteröinnissä otetaan huomioon mittauksen aikana vallitseva ympäristön paine.

Muunnokset:

Paine (yksikkö: kPa)

100 kPa = 0,1 bar = 0,1 MPa
(yksikköä bar (baari) saa edelleen käyttää, mutta sitä ei suositella)

133 Pa = 1 mmHg = 1 Torr
(yksiköitä mmHg ja Torr ei saa käyttää)

1 atm = normaali-ilmakehä = 101 325 Pa
(yksikköä atm ei saa käyttää)

Lämpötila (yksikkö: K)

$t = T - 273,15$

t: Celsius-lämpötila, Celsius-asteina (°C)

T: termodynaaminen lämpötila, kelvineinä (K)

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

Liitteessä kuvattavissa menetelmissä mainitaan joitakin kalibrointiaineita.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATTEET

Kiehumislämpötilan (kiehumisalueen) määritysmenetelmistä viisi perustuu kiehumislämpötilan mittaamiseen ja kaksi termiseen analyysiin.

1.4.1 Ebulliometrimenetelmä

Ebulliometrit kehitettiin alun perin molekyylipainon määritykseen kiehumispisteen kohoamisen avulla, mutta niitä voidaan myös käyttää tarkan kiehumislämpötilan määritykseen. Standardissa ASTM D 1120-72 (katso liitettä) kuvataan yksinkertainen laitteisto, jolla neste kuumennetaan tasapaino-olosuhteissa kiehumispisteeseen.

1.4.2 Dynaaminen menetelmä

Mitataan höyryn jälleenlauhtumislämpötila pitämällä tarkoitukseen soveltuvaa lämpömittaria höyryn palautusvirrassa nesteen kiehuessa. Tämä menetelmä sallii paineen vaihtelun.

1.4.3 Tislausmenetelmä

Neste tislataan ja höyryn jälleenlauhtumislämpötila sekä tisleen määrä mitataan.

1.4.4 Siwoloboffin menetelmä

Näyte kuumennetaan putkiottimessa, joka upotetaan kuumahauteen nesteeseen. Putkiottimeen pannaan suljettu kapillaari, jonka alaosassa on ilmakupla.

1.4.5 Valokennomenetelmä

Tehdään automaattisia valosähköisiä mittauksia nousevien ilmakuplien avulla Siwoloboffin menetelmän mukaan.

1.4.6 Differentiaaliterminen analyysi

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä olomuodon muutos, muutos näkyy endotermisenä (kiehuminen) poikkeamana lämpötilakäyrän perusviivasta.

1.4.7 **Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria**

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen energianottoero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Tämä energiaero on energiamäärä, joka tarvitaan pienentämään näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero nollaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä olomuodon muutos, muutos näkyy endotermisenä (sulaminen) poikkeamana lämpövirran perusviivasta.

1.5 LAATUKRITEERIT

Kiehumislämpötilan ja kiehumisalueen määritykseen tarkoitettujen menetelmien soveltuvuus ja tarkkuus kuvataan taulukossa 1.

TAULUKKO 1: MENETELMIEN VERTAILU

Mittausmenetelmä	Arvioitu tarkkuus	Nykyinen standardi
Ebulliometri	± 1,4 K (enintään 373 K)(1)(2) ± 2,5 K (enintään 600 K)(1)(2)	ASTM D 1120-72(1)
Dynaaminen menetelmä	± 0,5 K (enintään 600 K)(2)	
Tislausprosessi (kiehumisalue)	± 0,5 K (enintään 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboffin menetelmä	± 2 K (enintään 600 K)(2)	
Valokennomenetelmä	± 0,3 K (373 K)(2)	
Differentiaaliterminen analyysi	± 0,5 K (enintään 600 K) ± 2,0 K (enintään 1 273 K)	ASTM E 537-76
Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria	± 0,5 K (enintään 600 K) ± 2,0 K (enintään 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Koskee vain esimerkiksi ASTM D 1120-72:ssa kuvattujen yksinkertaisten laitteiden avulla tehtäviä määrityksiä. Tarkkuutta voidaan parantaa käyttämällä kehittyneempiä laitteita
(2) Koskee vain puhtaita aineita. Menetelmän käyttö muissa olosuhteissa on perusteltava

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

Joidenkin testimenetelmien työjärjestys on kuvattu kansainvälisissä ja kansallisissa standardeissa (katso liitettä).

1.6.1 **Ebulliometrimenetelmä**

Katso liitettä.

1.6.2 **Dynaaminen menetelmä**

Katso testimenetelmää A4, höyrynpaineen määritys.

Rekisteröidään havaittu kiehumislämpötila 101,325 kPa:n paineessa.

1.6.3 **Tislausmenetelmä**

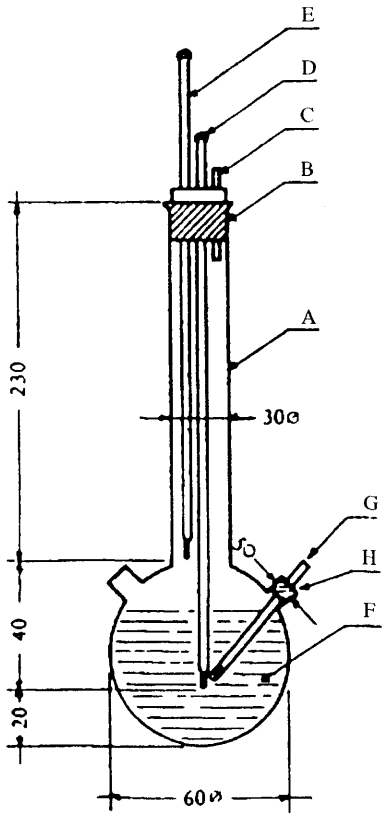
Katso liitettä.

1.6.4 **Siwoloboffin menetelmä**

Näyte pannaan putkiottimeen, jonka halkaisija on noin 5 mm (kuva 1). Putkiotinta kuumennetaan sulamislaitteella.

Kuvassa 1 on lasista valmistettu standardisoitu sulamis- ja kiehumislämpötilalaite (JIS K 0064). Kaikki mitat ovat millimetreinä.

Kuva 1



A: Mitta-astia
B: Korkki
C: Ilmanvaihtoputki
D: Lämpömittari
E: Apulämpömittari
F: Haudeneste
G: Putkiotin, jonka ulkohalkaisija on enintään 5 mm, ja sen sisällä kapillaariputki, jonka pituus on noin 100 mm, sisähalkaisija noin 1 mm ja lasiseinän paksuus 0,2–0,3 mm
H: Sivuputki

Kapillaariputki (kiehumiskapillaari), joka on suljettu noin 1 cm alareunan yläpuolelta, asetetaan putkiottimeen. Näytettä lisätään niin paljon, että kapillaariputken suljettu osa on nestepinnan alapuolella. Kiehumiskapillaarin sisältävä putkiotin kiinnitetään lämpömittariin kuminauhan avulla tai tuetaan sivulta muulla tavoin (katso kuva 2).

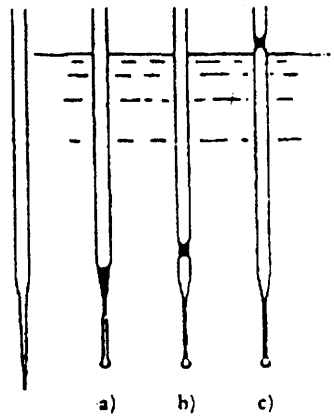
Kuva 2

Siwoloboffin periaate



Kuva 3

Muunneltu periaate



Haudeneste valitaan mitattavan kiehumislämpötilan mukaan. Mitattaessa alle 573 K:n lämpötiloja voidaan käyttää silikoniöljyä. Parafiiniöljyä voidaan käyttää vain 473 K:iin asti. Alussa haudenestettä kuumennetaan siten, että lämpötila nousee 3 K/min. Kuumentamisen aikana nestettä on hämmennettävä. Kun lämpötila on noin 10 K odotetun kiehumispisteen alapuolella, kuumennusta hidastetaan, niin että lämpötilan nousee alle 1 K/min. Kun lämpötila on saavuttanut kiehumispisteen, kiehumiskapillaarista alkaa nopeasti nousta kuplia.

Kiehumislämpötila on lämpötila, jossa kuplien nousu lakkaa ja neste alkaa nousta nopeasti kapillaariputkessa hetkellisen jäähdyttämisen seurauksena. Lämpömittarin lukema osoittaa tällöin näytteen kiehumislämpötilaa.

Muunnetun periaatteen mukaan (kuva 3) kiehumispiste määritetään sulamislämpötilakapillaarin avulla. Kapillaariputkeen imetään näytettä, kunnes näytepatsaan korkeus kapillaarissa on noin 2 cm (a). Kapillaariputken kapea pää suljetaan sulattamalla ja pieni ilmakupla jätetään ääripäähän. Kun putkea kuumennetaan sulamislämpötilalaitteessa (b), ilmakupla laajenee. Kiehumislämpötila on se lämpötila, jossa näytteen muodostama tulppa saavuttaa haudenesteen pinnan (c).

1.6.5 **Valokennomenetelmä**

Tässä menetelmässä kuumennettava näyte on metallikappaleeseen asetetussa kapillaariputkessa.

Metallikappaleen reikien kautta johdetaan valonsäde näytteen läpi tarkasti kalibroituun valokennoon.

Kun näytteen lämpötila nousee, kiehumiskapillaarista nousee yksittäisiä kuplia. Kun kiehumislämpötila saavutetaan, kuplien määrä lisääntyy huomattavasti. Tämä aiheuttaa muutoksen valokennon rekisteröimässä valon intensiteetissä. Valokennosta lähtee pysäytyssignaali osoitinlaitteeseen, joka lukee metallikappaleessa sijaitsevan platinavastuslämpömittarin lukeman.

Tämä menetelmä on erityisen käytännöllinen, koska sillä voidaan tehdä määrityksiä kylmissä lämpötiloissa — jopa 253,15 K:ssa (– 20 °C:ssa) asti — ilman laitteeseen tehtäviä muutoksia. Riittää, kun laite asetetaan jäähdytyshauteeseen.

1.6.6 **Terminen analyysi**

1.6.6.1 *Differentiaaliterminen analyysi*

Katso liitettä.

1.6.6.2 *Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria*

Katso liitettä.

2 **TIEDOT**

Kun poikkeamat normaalipaineesta ovat pieniä (enintään ± 5 kPa), kiehumislämpötilat normalisoidaan T_n:ään Sidney Youngin yhtälön avulla:

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

jossa:

Δp = (101,325 - p) [huomaa etumerkki]

p = paine (kPa)

f_T = kiehumislämpötilan muutos paineen funktiona (K/kPa)

T = mitattu kiehumislämpötila (K)

T_n = normaalipaineeseen korjattu kiehumislämpötila (K).

Lämpötilan korjausvakiot (f_T) ja yhtälöt näiden vakioiden likiarvojen laskemista varten sisältyvät monien aineiden kohdalla edellä mainittuihin kansainvälisiin ja kansallisiin standardeihin.

Esimerkiksi DIN 53171 -menetelmä mainitsee seuraavat karkeat korjaukset maaleissa käytettävien liuottimien osalta:

TAULUKKO 2: LÄMPÖTILAT JA VASTAAVAT KORJAUSKERTOIMET f_T

Lämpötila T (K)	Korjauskerroin f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

3 RAPORTOINTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset

— arvio tarkkuudesta.

Kiehumislämpötilana raportoidaan vähintään kahden, arvioidun tarkkuusalueen (katso taulukoita) sisällä olevan mittauksen keskiarvo.

Ilmoitetaan mitatut kiehumislämpötilat ja näiden keskiarvo. Mittaushetkellä vallinnut paine ilmoitetaan kilopascaleina (kPa). Paineen tulisi olla lähellä normaalia ilmakehän painetta.

Raporttiin tulee sisällyttää myös kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

4 VIITTEET

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

(2) UICPA, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

Liite

Lisää teknisiä tietoja on seuraavissa standardeissa.

1 **Ebulliometri**

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

2 **Tislausprosessi (kiehumisalue)**

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

3 **Differentiaaliterminen analyysi ja differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definition of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

A.3 SUHTEELLINEN TIHEYS

1 **MENETELMÄ**

Tässä kuvattavat menetelmät perustuvat pääosin OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteessä (2).

1.1 JOHDANTO

Tässä kuvattavia suhteellisen tiheyden määritysmenetelmiä voidaan soveltaa kiinteisiin ja nestemäisiin aineisiin, ilman rajoituksia aineiden puhtauden suhteen. Luettelo menetelmistä on taulukossa 1.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Kiinteiden ja nestemäisten aineiden suhteellinen tiheys (D_4^{20}) ilmaisee tutkittavan aineen (t = 20 °C) tilavuuden massan ja saman vesimäärän (t = 4 °C) massan suhteen. Suhteellisella tiheydellä ei ole yksikköä.

Aineen tiheys (ϱ) on sen massan (m) ja tilavuuden (v) suhde.

Tiheys (ϱ) ilmaistaan SI-yksikköinä (kg/m^3).

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATTEET

Käytössä on neljä menetelmäluokkaa.

1.4.1 **Nesteeseen perustuvat menetelmät**

1.4.1.1 *Hydrometri* (nestemäiset aineet)

Nesteen tiheys voidaan määrittää nopeasti ja tyydyttävän tarkasti kelluvan hydrometrin avulla, jonka asteikosta voidaan lukea uppoamissyvyyteen perustuva tiheyslukema.

1.4.1.2 *Hydrostaattinen vaaka* (nestemäiset ja kiinteät aineet)

Aineen tiheys voidaan määrittää punnitsemalla näyte ensin ilmassa ja sen jälkeen sopivassa nesteessä (esimerkiksi vedessä).

Kiinteiden aineiden kohdalla mitattu tiheys on edustava vain kyseisen näytteen osalta. Nesteiden tiheys määritetään siten, että tunnettu tilavuus (v) punnitaan ensin ilmassa ja sen jälkeen nesteessä.

1.4.1.3 *Uppokappalemenetelmä* (nestemäiset aineet) (4)

Tässä menetelmässä nesteen tiheys määritetään kahden punnitustuloksen eron perusteella. Kun näyte on ensin punnittu, siihen upotetaan kappale, jonka tilavuus on tunnettu, ja punnitus toistetaan.

1.4.2 **Pyknometrimenetelmät**

Erimuotoisia pyknometrejä, joiden tilavuus on tunnettu, voidaan käyttää kiinteiden ja nestemäisten aineiden tiheyksien määritykseen. Tiheys lasketaan täyden ja tyhjän pyknometrin painoeron ja sen tunnetun tilavuuden perusteella.

1.4.3 **Kaasuvertailupyknometri** (kiinteät aineet)

Kaasuvertailupyknometrin avulla voidaan mitata minkä tahansa aineen tiheys huoneenlämpötilassa, olipa aineen muoto mikä tahansa. Aineen tilavuus mitataan ilmassa tai inerttikaasussa sylinterissä, jonka tilavuus on muutettavissa ja kalibroitu. Tiheyden laskemista varten mitataan tilavuusmittauksen jälkeen aineen massa.

1.4.4 **Oskilloiva densitometri** (5) (6) (7)

Tämän laitteen avulla voidaan mitata nesteen tiheys. U-putken muotoinen mekaaninen oskillaattori asetetaan värähtelemään oskillaattorin resonanssitaajuudella, joka määräytyy oskillaattorin massan mukaan. Kun oskillaattoriin pannaan näyte, resonanssitaajuus muuttuu. Laitteen kalibroinnissa käytetään kahta nestemäistä ainetta, joiden tiheys tunnetaan. Kalibrointiaineet valitaan siten, että niiden tiheydet kattavat mitattavan alueen.

1.5 LAATUKRITEERIT

Jäljempänä olevassa taulukossa esitetään suhteellisen tiheyden määritysmenetelmien soveltuvuus eri tarkoituksiin.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

Lisätietoja teknisistä yksityiskohdista on mm. liitteessä mainituissa standardeissa.

Testit tulee suorittaa lämpötilassa 20 °C. Vähintään kaksi mittausta vaaditaan.

2 **TIEDOT**

Katso standardeja.

3 **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset

Suhteellinen tiheys (D_4^{20}) raportoidaan kohdan 1.2 määrityksen mukaan. Lisäksi on mainittava mitattavan aineen fysikaalinen olomuoto.

Raporttiin tulee sisällyttää myös kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

TAULUKKO: MENETELMIEN SOVELTUVUUS

Mittausmenetelmä	Tiheys		Suurin mahdollinen dynaaminen viskositeetti	Nykyiset standardit
	kiinteä aine	neste		
1.4.1.1 Hydrometri		kyllä	5 Pa s	ISO 387 ISO 649-2 NF T 20-050
1.4.1.2 Hydrostaattinen vaaka				
(a) kiinteät aineet	kyllä			ISO 1183 (A)
(b) nesteet		kyllä	5 Pa s	ISO 901 ja 758
1.4.1.3 Uppokappalemenetelmä		kyllä	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2 Pyknometri				ISO 3507
(a) kiinteät aineet	kyllä			ISO 1183 (B), NF T 20-053
(b) nesteet		kyllä	500 Pa s	ISO 758
1.4.3 Kaasuvertailupyknometri	kyllä			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4 Oskilloiva densitometri		kyllä	5 Pa s	

4 **VIITTEET**

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

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realisation of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

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

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297 — 302.

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

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253 — 255.

Liite

Lisää teknisiä tietoja on seuraavissa standardeissa:

1 NESTEESEEN PERUSTUVAT MENETELMÄT

1.1 Hydrometri

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use
	Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation
	Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 Hydrostaattinen vaaka

Kiinteät aineet

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

Nestemäiset aineet

ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Testing of mineral oil and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 ja 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 Uppokappalemenetelmät

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

2 PYKNOMETRISET MENETELMÄT

2.1 Nestemäiset aineet

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100×10^{-6} m^2s^{-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^2s^{-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 pycnoneter (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
NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pykonometric method

2.2 Kiinteät aineet

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pykonometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3 **KAASUVERTAILUPYKNOMETRI**

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

A.4 HÖYRYNPAINE

1 MENETELMÄ

Tässä kuvatut menetelmät perustuvat pääosin OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteissä (2) ja (3).

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa ensin selvittää tutkittavan aineen rakenne, sulamislämpötila ja kiehumislämpötila.

Koska koko höyrynpainealuetta kattavaa yksittäistä mittausmenetelmää ei ole, seuraavassa suositellaan useita eri menetelmiä, joita voidaan käyttää höyrynpainealueella $< 10^{-4}$ — 10^5 Pa.

Epäpuhtaudet vaikuttavat yleensä höyrynpaineeseen. Vaikutuksen voimakkuus vaihtelee epäpuhtauden laadun mukaan.

Jos näyte sisältää haihtuvia epäpuhtauksia, jotka voivat vaikuttaa tulokseen, aine voidaan puhdistaa. Joissakin tapauksissa on suositeltavaa ilmoittaa teknisen aineen höyrynpaine.

Joissakin kuvatuissa menetelmissä käytetään metalliosia sisältäviä laitteita, mikä on otettava huomioon syövyttävien aineiden testauksissa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan aineen höyrynpaine on kiinteään tai nestemäiseen aineeseen ylhäältä kohdistuva kyllästyspaine. Termodynaamisen tasapainon vallitessa puhtaan aineen höyrynpaine vaihtelee ainoastaan lämpötilan funktiona.

Höyrynpaineen SI-yksikkö, jota tulee käyttää, on pascal (Pa).

Aiemmin käytetyt yksiköt ja niiden muunnostekijät ovat seuraavat:

1 Torr	= $1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 ilmakehä	= $1{,}013 \times 10^5$ Pa
1 baari (bar)	= 10^5 Pa

Lämpötilan SI-yksikkö on kelvin (K).

Yleinen molaarinen kaasuvakio R on 8,314 J mol^{-1} K^{-1}.

Lämpötilan ja höyrynpaineen välinen riippuvuus voidaan laskea Clausiuksen ja Clapeyronin yhtälön avulla:

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

jossa:

p	= aineen höyrynpaine (Pa)
ΔH_v	= aineen höyrystymislämpö (J mol^{-1})
R	= yleinen molaarinen kaasuvakio (J mol^{-1} K^{-1})
T	= Termodynaaminen lämpötila (K)

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATTEET

Seuraavassa ehdotetaan höyrynpaineen määritystä varten seitsemää menetelmää, joita voidaan soveltaa höyrynpaineen eri alueilla. Jokainen menetelmä sisältää höyrynpaineen mittaamisen eri lämpötiloissa. Rajoitetulla lämpötila-alueella puhtaan aineen höyrynpaineen logaritmi on suoraan verrannollinen lämpötilan käänteisarvoon.

1.4.1 **Dynaaminen menetelmä**

Dynaamisessa menetelmässä mitataan tiettyä painetta vastaava kiehumislämpötila.

Suositeltava alue:

10^3 — 10^5 Pa.

Menetelmää on myös suositeltu normaalin kiehumislämpötilan määritykseen. Tällöin yläraja on 600 K.

1.4.2 **Staattinen menetelmä**

Staattisessa menetelmässä mitataan tiettyä lämpötilaa vastaavaa höyrynpaine suljetussa järjestelmässä, jossa vallitsee termodynaaminen tasapaino. Menetelmä soveltuu kiinteiden ja nestemäisten yksi- tai monikomponenttiaineiden tutkimiseen.

Suositeltava alue:

10 — 10^5 Pa.

Menetelmää voidaan huolellisuutta noudattaen käyttää myös alueella 1 — 10 Pa.

1.4.3 **Isoteniskooppi**

Tämä standardoitu menetelmä on myös staattinen menetelmä, mutta se ei yleensä sovellu monikomponenttijärjestelmien tutkimiseen. Lisätietoja on menetelmäkuvauksessa ASTM D-2879-86.

Suositeltava alue:

100 — 10^5 Pa.

1.4.4 **Effuusiomenetelmä: Höyrynpainevaaka**

Ainemäärä, joka aikayksikköä kohti virtaa kennosta tunnetun aukon läpi, määritetään tyhjössä olosuhteissa, joissa aineen paluuvirta on häviävän pieni (esimerkiksi mittaamalla höyrysuihkeen aiheuttaman pulssin vaikutus herkkään vaakaan tai mittaamalla painohäviö).

Suositeltava alue:

10^{-3} — 1 Pa.

1.4.5 **Effuusiomenetelmä: Painohäviön laskenta tai höyryn talteenkeräys**

Menetelmässä mitataan Knudsen-kennosta (4) aikayksikköä kohti virtaavan, höyrymäisen näytteen massa. Virtaus tapahtuu mikroaukon läpi äärityhjössä. Ulos virtaavan höyryn massa saadaan joko määrittämällä kennon painohäviö tai tiivistämällä höyry alhaisessa lämpötilassa, minkä jälkeen höyrystyneen aineen määrä voidaan määrittää kromatografia-analyysilla. Höyrynpaine lasketaan Hertz-Knudsenin yhtälön avulla.

Suositeltava alue:

10^{-3} — 1 Pa.

1.4.6 **Kaasunkyllästysmenetelmä**

Näytteen yli johdetaan inerttiä kantokaasua siten, että näytteen höyry kyllästää kantokaasun. Tunnetun kantokaasun kuljettama ainemäärä voidaan mitata talteenkeräämällä tai suora-analyysitekniikalla. Mittaustuloksen avulla voidaan laskea aineen höyrynpaine määrätyssä lämpötilassa.

Suositeltava alue:

10^{-4} — 1 Pa.

Menetelmää voidaan huolellisuutta noudattaen käyttää myös alueella 1 — 10 Pa.

1.4.7 **Pyörivä roottori -menetelmä**

Tässä mittarissa varsinainen mittauselementti on pieni teräspallo, joka magneettikentän vaikutuksesta pyörii suurella nopeudella. Kaasun paine voidaan päätellä määrittämällä teräspallon nopeuden pieneneminen paineen vaikutuksesta.

Suositeltava alue:

10^{-4} — 0,5 Pa.

1.5 LAATUKRITEERIT

Seuraavassa taulukossa on höyrynpaineen eri määritysmenetelmien vertailu soveltuvuuden, toistettavuuden, uusittavuuden, mittausalueen ja nykyisen standardin suhteen.

LAATUKRITEERIT

Mittausmenetelmä	Aineet		Arvioitu toistettavuus(1)	Arvioitu uusittavuus(1)	Suositettu alue	Nykyinen standardi
	kiinteät aineet	nestemäiset aineet				
1.4.1 Dynaaminen menetelmä	Alhainen sulamispiste	kyllä	enintään 25 %	enintään 25 %	10^3 Pa — 2×10^3 Pa	—
			1 — 5 %	1 — 5 %	2×10^3 Pa — 10^5 Pa	—
1.4.2 Staattinen menetelmä	kyllä	kyllä	5 — 10 %	5 — 10 %	10 Pa — 10^5 Pa(2)	NFT 20-048 (5)
1.4.3 Isoteniskooppi	kyllä	kyllä	5 — 10 %	5 — 10 %	10^2 Pa — 10^5 Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4 Effuusiomenetelmä, höyrynpainevaaka	kyllä	kyllä	5 — 20 %	enintään 50 %	10^{-3} Pa — 1 Pa	NFT 20-047 (6)
1.4.5 Effuusiomenetelmä, painohäviön laskenta	kyllä	kyllä	10 — 30 %	—	10^{-3} Pa — 1 Pa	—
1.4.6 Kaasunkyllästysmenetelmä	kyllä	kyllä	10 — 30 %	enintään 50 %	10^{-4} Pa — 1 Pa(2)	—
1.4.7 Pyörivä roottori -menetelmä	kyllä	kyllä	10 — 20 %	—	10^{-4} Pa — 0,5 Pa	—

(1) Vaihtelee puhtausasteen mukaan
(2) Menetelmiä voidaan huolellisuutta noudattaen käyttää myös alueella 1 — 10 Pa

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

1.6.1 **Dynaaminen mittaus**

1.6.1.1 *Laite*

Tyypillisessä mittauslaitteessa on keittokattila, johon on liitetty lasinen tai metallinen jäähdytin (kuva 1), lämpötilan mittausosa sekä paineensäädin ja painemittari. Piirroksen mukainen tyypillinen mittauslaitteisto on valmistettu lämmönkestävästä lasista, ja siinä on seuraavat osat:

Suuri, osittain kaksoisseinällä varustettu putki, jossa on lasihios, jäähdytin, jäähdytysastia ja sisääntulo.

Putken kiehuntaosassa sijaitsevan, Cottrell-pumpulla varustetun lasisylinterin pinta on murskattua lasia, mikä ehkäisee nesteen "poukkoilua" kiehunnan aikana.

Lämpötilan mittaukseen käytetään sopivaa lämpötilanilmaisinta (esimerkiksi vastuslämpömittaria, vaippatermoparia), joka upotetaan mittauspisteeseen (kuva 1, osa 5) sopivan sisääntulon (esimerkiksi urospuolisen maadoitusliitoksen) kautta.

Paineensäätimeen ja painemittariin tehdään tarvittavat liitännät.

Pallomainen laajennus, joka toimii tilavuuspuskurina, on liitetty mittalaitteeseen kapillaariputkella.

Keittoastian kuumentamiseen käytetään kuumennuselementtiä (esimerkiksi kasettilämmitintä), joka asetetaan lasilaitteistoon alakautta. Kuumennustehoa säädetään termoparin avulla.

Tarvittava tyhjö (10^2 — 10^5 Pa) saadaan aikaan tyhjöpumpulla.

Paineensäätöä varten tarvittava ilman tai typen mittaus (painealue noin 10^2 — 10^5) ja ilmanvaihto tapahtuvat venttiilin kautta.

Paine mitataan manometrilla.

1.6.1.2 *Työjärjestys*

Höyrynpaine määritetään mittaamalla näytteen kiehumislämpötila useassa eri paineessa alueella 10^2 — 10^5 Pa. Kun lämpötila pysyy vakiona määrätyssä vakiopaineessa, näytteen katsotaan saavuttaneen kiehumispisteen. Menetelmä ei sovellu vaahtoavien aineiden mittaukseen.

Näyte pannaan puhtaaseen, kuivaan näyteastiaan. Jos näyte ei ole jauheena, mahdolliset ongelmat voidaan yrittää ratkaista kuumentamalla jäähdytysvaippaa. Näyteastian täytön jälkeen laite suljetaan laipan kohdalta ja tehdään kaasunpoisto. Sitten asetetaan alin haluttu paine ja aloitetaan kuumennus. Lämpötilanilmaisin kytketään rekisteröintilaitteeseen.

Järjestelmässä vallitsee tasapaino, kun vakiopaineessa mitattu kiehumislämpötila pysyy vakiona. Kiehumisen aikana on erityisesti vältettävä näytteen "poukkoilua". Lisäksi jäähdyttimellä tulee tapahtua täydellinen tiivistyminen. Jos näytteen sulamispiste on alhainen, on varottava lauhduttimen tukkeutumista.

Tasapainopisteen kirjaamisen jälkeen asetetaan uusi, suurempi paine. Mittauksia jatketaan 10^5 Pa:n paineeseen asti (yhteensä 5 — 10 mittausta). Tulokset tarkistetaan toistamalla mittaukset laskevassa painejärjestyksessä.

1.6.2 **Staattinen mittaus**

1.6.2.1 *Laite*

Laitteessa on näyteastia, näytteen lämpötilaa säätävä kuumennus- ja jäähdytysjärjestelmä sekä paineen asetin ja painemittari. Laitteen periaatepiirrokset ovat kuvissa 2a ja 2b.

Näytekammion (kuva 2a) toiselle puolelle on liitetty tyhjöventtiili ja toiselle puolelle on liitetty painemittarinestettä sisältävä U-putki. U-putken toinen pää on liitetty linjaan, jossa on tyhjöpumppu, typpisylinteri tai ilmaventtiili ja manometri.

U-putken sijasta voidaan käyttää osoitinlaitteella varustettua painemittaria (kuva 2b).

Näytteen lämpötilaa säädetään pitämällä näyteastiaa venttiileineen ja U-putkineen tai painemittareineen hauteessa, jonka lämpötila pidetään vakiona (± 0,2 K). Lämpötila mitataan näyteastian ulkopuolelta tai astian sisältä.

Laite evakuoidaan tyhjöpumpulla, jonka tulopuolella on kylmäloukku.

Menetelmässä 2a näytteen höyrynpaine mitataan epäsuorasti nollaosoitinlaitteella. Menetelmä perustuu siihen, että U-putkessa olevan nesteen tiheys muuttuu, jos lämpötilassa tapahtuu suuria muutoksia.

U-putken nollaosoittimia varten voidaan painealueen ja näytteen kemiallisen käyttäytymisen mukaan käyttää silikoninesteitä tai ftalaatteja. Näyte ei saa mainittavassa määrin liueta U-putken nesteeseen tai reagoida sen kanssa.

Manometrissa voidaan käyttää elohopeaa normaalista ilmanpaineesta 10^2 Pa:iin asti ja silikoninesteitä sekä ftalaatteja painealueella 10^2 — 10 Pa. Kuumakalvomanometreja voidaan käyttää jopa alle 10^{-1} Pa:n paineessa. Käytössä on myös muuntyyppisiä painemittareita alle 10^2 Pa:n mittauksia varten.

1.6.2.2 *Työjärjestys*

Ennen mittauksia laitteen kaikki osat (katso kuvaa 2) on puhdistettava ja kuivattava huolella.

Menetelmässä 2a U-putki täytetään valitulla nesteellä, jolle on tehtävä kaasunpoisto korkeassa lämpötilassa ennen mittauksia.

Näytettä pannaan laitteeseen, joka suljetaan. Lämpötilaa lasketaan kaasunpoistoa varten niin paljon, että ilma saadaan ulos. Lämpötilaa ei saa laskea niin paljon, että näytteen koostumus muuttuu (monikomponenttijärjestelmät). Tarvittaessa näytettä voidaan hämmentää, jotta tasapaino saavutettaisiin nopeammin.

Näyte alijäähdytetään käyttäen nestemäistä typpeä (jolloin on varottava ilmankosteuden tai pumppunesteen lauhtumista) tai etanolin ja hiilihappojään seosta. Alhaisen lämpötilan mittauksissa käytetään lämpötilasäädettyä haudetta, johon on kytketty ultrakryometri.

Näyteastian venttiili avataan ja ilma poistetaan ylläpitämällä imua usean minuutin ajan. Venttiili suljetaan ja näytteen lämpötila säädetään alimmalle mitattavalle tasolle. Tarvittaessa ilmanpoisto toistetaan useita kertoja.

Kun näytettä kuumennetaan, höyrynpaine suurenee, mikä vaikuttaa U-putken nestepatsaan tasapainoon. Tämä kompensoidaan päästämällä typpeä tai ilmaa venttiilin kautta laitteeseen, kunnes paineosoittimen nestepatsas palaa nollaan. Tähän vaadittavan paineen lukema voidaan katsoa tarkkuuspainemittarista huoneenlämmössä. Paine vastaa näytteen höyrynpainetta kyseisessä mittauslämpötilassa.

Menetelmä 2 b on muuten samanlainen, mutta höyrynpaineen lukema saadaan suoraan.

Höyrynpaineen lämpötilariippuvuus määritetään sopivin välein (yhteensä 5 — 10 mittauspistettä) haluttuun maksimilämpötilaan asti. Alhaisen lämpötilan mittaukset on toistettava tarkistuksen vuoksi.

Jos toistomittauksista saadut tulokset eivät ole yhteneviä lämpötilan noston aikana saatujen tulosten kanssa, syy voi olla jokin seuraavista:

1 Näyte sisältää edelleen ilmaa (esimerkiksi aineet, joiden viskositeetti on suuri) tai alhaisessa lämpötilassa kiehuvaa ainetta, joka vapautuu kuumentamisen aikana ja joka voidaan poistaa imemällä alijäähtymisen yhteydessä.

2 Jäähdytyslämpötila ei ole tarpeeksi alhainen. Tällöin jäähdytysaineena käytetään nestemäistä typpeä.

Jos syy on jokin edellisistä, mittaukset on toistettava.

3 Näytteessä tapahtuu kemiallinen reaktio (esimerkiksi hajoaminen tai polymerisoituminen) mitattavalla lämpötila-alueella.

1.6.3 Isoteniskooppi

Menetelmän kattava kuvaus on viitteessä 7. Mittauslaitteen periaatepiirros on kuvassa 3. Isoteniskooppi soveltuu kohdassa 1.6.2 kuvatun staattisen menetelmän tavoin kiinteiden ja nestemäisten aineiden tutkimiseen.

Nestemäiset näytteet toimivat samalla apumanometrin nesteenä. Isoteniskooppiin lisätään nestettä niin paljon, että manometrin laajennus ja manometrin lyhyempi jalka täyttyvät. Isoteniskooppi liitetään tyhjöjärjestelmään ja siitä poistetaan ilma, minkä jälkeen se täytetään typellä. Tämä toistetaan kaksi kertaa hapenjäännösten poistamiseksi. Täytetty isoteniskooppi asetetaan vaaka-asentoon siten, että näyte leviää ohueksi kerrokseksi laajennuksessa ja manometriosassa (U-osassa). Järjestelmän paine lasketaan arvoon 133 Pa ja näytettä kuumennetaan varovasti, kunnes se alkaa kiehua (näytteeseen liuenneiden kaasujen poisto). Isoteniskoopin asentoa muutetaan niin, että näyte palaa manometrin laajennukseen ja lyhyeen jalkaan täyttäen molemmat. Painetta pidetään yllä kuten kaasunpoistossa: laajennuksen nokkaa kuumennetaan pienen liekin avulla, kunnes näytteestä vapautuu niin paljon höyryä, että näytettä työntyy laajennuksen yläosasta ja manometrin varresta isoteniskoopin manometriosaan, jolloin muodostuu höyrytäytteinen tila, jossa ei ole typpeä.

Tämän jälkeen isoteniskooppi asetetaan hauteeseen, jonka lämpötila on vakio ja typen painetta säädetään, kunnes se on sama kuin näytteen paine. Paineiden tasapaino voidaan nähdä isoteniskoopin manometriosasta. Tässä tilanteessa typen ja näytteen höyrynpaine on sama.

Kiinteiden aineiden tutkimiseen käytetään jotakin kohdassa 1.6.2.1 mainituista manometrinesteistä mitattavan paine- ja lämpötila-alueen mukaan. Manometrineste, josta on poistettu kaasut, pannaan isoteniskoopin pidemmän varren pullistumaan. Näyte pannaan laajennukseen, ja sille tehdään kaasunpoisto korkeassa lämpötilassa, minkä jälkeen isoteniskooppia kallistetaan, kunnes manometrineste virtaa U-putkeen. Höyrynpaine mitataan lämpötilan funktiona kohdan 1.6.2 mukaan.

1.6.4 Effuusiomenetelmä: Höyrynpainevaaka

1.6.4.1 *Laite*

Kirjallisuudessa on usean laiteversion kuvaukset (1). Tässä käsiteltävä laite kuvaa menetelmän yleisperiaatetta (kuva 4). Kuvassa 4 ovat laitteen pääosat: ruostumattomasta teräksestä tai lasista valmistettu tyhjöastia, tyhjön tuottamiseen ja mittaamiseen tarkoitetut laitteet sekä sisäänrakennetut osat höyrynpaineen mittaamiseksi vaa'alla. Laite sisältää seuraavat osat:

— Laipalla ja pyörivällä sisääntulolla varustettu haihdutinuuni, joka on valmistettu sylinterin muotoon esimerkiksi kuparista tai kemikaaleja kestävästä seoksesta, jonka lämmönjohtavuus on hyvä. Kupariseinällä varustettua lasiastiaa voidaan myös käyttää. Uunin läpimitta on 3 — 5 cm ja korkeus 2 — 5 cm. Höyryvirtaa varten on 1 — 3 erikokoista aukkoa. Kuumennus tehdään uunin alla sijaitsevalla kuumennuslevyllä tai uunia

ympäröivällä kuumennuskierukalla. Lämmön johtuminen aluslevyyn on estetty liittämällä kuumennin aluslevyyn metallilla, jonka lämmönjohtavuus on heikko (nikkelihopealla tai krominikkeliteräksellä), esimerkiksi nikkelihopeaputkella, joka on liitetty pyörivään tuloliitäntään (tämä edellyttää sitä, että käytetään moniaukkoista uunia. Tällaisen järjestelyn etuna on mahdollisuus panna uuniin kuparitanko, jolla voidaan hoitaa jäähdytys ulkopuolelta jäähdytyshauteiden avulla.

— Sijoittamalla kupariuunin kanteen kolme erikokoista aukkoa 90 asteen kulmaan toisiinsa nähden saadaan mahdollisuus mitata erilaisia höyrynpaineita mitta-alueen sisällä (aukkojen halkaisija noin 0,30 — 4,50 mm). Suuret aukot ovat alhaisia höyrynpaineita ja pienet aukot suuria höyrynpaineita varten. Uunia pyörittämällä höyryvirtaan voidaan asettaa haluttu aukko tai väliasento (uunin aukko - suoja - vaakakuppi), ja näin molekyylivirta joko pääsee uunin aukon läpi vaakakupille, tai molekyylivirran pääsy vaakakupille on estetty. Näytteen lämpötila mitataan sopivaan pisteeseen asetetulla termoparilla tai vastuslämpömittarilla.

— Suojan yläpuolella on erittäin herkkään mikrovaakaan kuuluva vaakakuppi (lisätietoja on jäljempänä), jonka läpimitta on noin 30 mm. Vaakakupin aineeksi suositellaan kultapäällysteistä alumiinia.

— Vaakakuppia ympäröi sylinterinmuotoinen messingistä tai kuparista tehty jäähdytyslaatikko. Vaakatyypin mukaan siinä on aukot vaa'an palkkia varten ja suojan aukko molekyylivirtaa varten. Jäähdytyslaatikon tulisi taata höyryn täydellinen tiivistyminen vaakakupille. Lämmön johtuminen ulkopuolelle tapahtuu esimerkiksi jäähdytyslaatikkoon liitetyn kuparitangon kautta. Tanko kulkee aluslevyn kautta, ja se on eristetty siitä termisesti esimerkiksi krominikkeliteräsputken avulla. Tanko pannaan Dewar-astiaan, jonka aluslevyn alla on nestemäistä typpeä (vaihtoehtoisesti nestemäistä typpeä kierrätetään tangon läpi). Täten jäähdytyslaatikon lämpötila pysyy –120 °C:een tuntumassa. Vaakakupin jäähdytys tapahtuu vain säteilyn avulla, ja vaakakuppi on sopiva paineiden mittaukseen tutkittavalla alueella (jäähdytys aloitetaan noin tunti ennen mittauksia).

— Vaaka sijaitsee jäähdytyslaatikon yläpuolella. Sopivia vaakoja ovat esimerkiksi kaksivartinen elektroninen mikrovaaka (8) tai erittäin herkkä kiertokäämimittauslaite (katso OECD:n testiohjetta 104, 12.5.81).

— Aluslevyssä on myös sähköiset liitännät termopareja tai vastuslämpömittareita ja kuumennuskäämiä varten.

— Astiaan imetään tyhjö alipaine- tai tyhjöpumpulla (tarvittava tyhjö on noin 1 — 2×10^{-3} Pa, mikä vaatii kahden tunnin pumppauksen). Painetta säädetään sopivan ionisaatiomanometrin avulla.

1.6.4.2 *Työjärjestys*

Astia täytetään näytteellä ja kansi suljetaan. Suoja ja jäähdytyslaatikko työnnetään uunin läpi. Laite suljetaan ja tyhjöpumput käynnistetään. Mittaukset voidaan aloittaa, kun paine on laskenut noin 10^{-4} Pa:n tasolle. Jäähdytyslaatikon jäähdytysmekanismi käynnistyy, kun paine on 10^{-2} Pa.

Kun laitteessa on vaadittava tyhjö, käynnistetään kalibrointisarjat alimmassa vaaditussa lämpötilassa. Kun kannen vastaava aukko avataan, höyryvirta kulkee suojan läpi suoraan aukon yläpuolella ja osuu jäähdytettyyn vaakakuppiin. Vaakakupin on oltava niin suuri, että suojan kautta ohjattu virta osuu siihen kokonaisuudessaan. Höyryvirran momentti toimii voimana vaakakuppia kohti, ja molekyylit tiivistyvät kupin kylmälle pinnalle.

Momentista ja samanaikaisesti tapahtuvasta tiivistymisestä syntyy rekisteröintilaitteeseen signaali. Signaaleja analysoimalla saadaan kahdenlaista tietoa:

1 Tässä kuvatussa laitteessa höyrynpaine määritetään suoraan vaakakuppiin kohdistuvasta momentista (tätä varten ei tarvita tietoja molekyylipainosta (2)). Geometriset tekijät, kuten uunin aukko ja molekyylivirran kulma, on otettava huomioon lukemien arvioinnissa.

2 Samalla voidaan mitata tiivistyneen höyryn massa ja sen perusteella voidaan edelleen laskea haihtumisnopeus. Höyrynpaine voidaan laskea myös haihtumisnopeudesta ja molekyylipainosta Hertzin yhtälön (2) avulla.

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

jossa

G = haihtumisnopeus (kg s^{-1} m^{-2})
M = moolimassa (g mol^{-1})
T = lämpötila (K)
R = yleinen molaarinen kaasuvakio (J mol^{-1} K^{-1})
p = höyrynpaine (Pa)

Kun tyhjö on saavuttanut halutun arvon, mittaukset aloitetaan alimmasta mittauslämpötilasta.

Mittauksia jatketaan nostamalla lämpötilaa vähitellen korkeimpaan haluttuun mittauslämpötilaan asti. Tämän jälkeen näyte jäähdytetään ja mittaukset toistetaan. Jos toinen sarja ei vahvista ensimmäisen sarjan mittaustuloksia, syynä saattaa olla näytteen hajoaminen mitattavalla lämpötila-alueella.

1.6.5 **Effuusiomenetelmä: Painohäviön laskenta**

1.6.5.1 *Laite*

Effuusiolaitteen perusosat ovat seuraavat:

— effuusiokennoja sisältävä säiliö, jonka lämpötila on säädettävissä ja johon saadaan tyhjö

— tyhjömittarilla varustettu tyhjöpumppu (esimerkiksi diffuusiopumppu tai molekyyliahtopumppu)

— nestemäiseen typpeen tai hiilihappojäähän perustuva loukku.

Kuvassa 5 on esimerkkinä sähkölämmitteinen, alumiinirakenteinen tyhjösäiliö, jossa on neljä ruostumattomasta teräksestä valmistettua effuusiokennoa. Teräskalvon paksuus on noin 0,3 mm ja sen effuusioaukon läpimitta on 0,2 — 1,0 mm. Teräskalvo on kiinnitetty effuusiokennoon kierrekannella.

1.6.5.2 *Työjärjestys*

Toinen kenno täytetään vertailuaineella ja toinen näytteellä. Aukolla varustettu metallikalvo kiinnitetään kierrekannella ja kumpikin kenno punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella. Kenno pannaan termostaatilla varustettuun säiliöön, joka evakuoidaan yhden kymmenyksen alle odotetun paineen. Määrätyin (5 — 30 tunnin) välein laitteeseen päästetään ilmaa ja effuusiokennon painohäviö määritetään punnitsemalla.

Kenno on punnittava uudelleen määrätyin välein, jotta voitaisiin todeta, että haihtumisnopeus pysyy vakiona vähintään kahden aikajakson ajan. Näin varmistetaan, että näytteeseen mahdollisesti sisältyvät haihtuvat epäpuhtaudet eivät vaikuta tulokseen.

Effuusiokennon höyrynpaine lasketaan seuraavan suureyhtälön avulla:

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

jossa

p = höyrynpaine (Pa)
m = massa, joka aikajakson t kuluessa poistuu kennosta (kg)
t = aika (s)
A = aukon pinta-ala (m^2)
K = korjauskerroin
R = yleinen molaarinen kaasuvakio (J mol^{-1} K^{-1})
T = lämpötila (K)
M = molekyylimassa (kg mol^{-1})

Korjauskerroin vaihtelee sylinterinmuotoisen aukon pituuden ja säteen keskinäisen suhteen mukaan seuraavasti:

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

Yhtälö voidaan kirjoittaa seuraavaan muotoon:

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

jossa $E = \frac{1}{KA} \sqrt{2 \pi R}$ muodostaen effuusiokennovakion.

Effuusiokennovakio E voidaan määrittää käyttämällä vertailuaineita (2, 9) ja seuraavaa yhtälöä:

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

jossa

p(r) = vertailuaineen höyrynpaine (Pa)
M(r) = vertailuaineen molekyylimassa (kg mol^{-1})

1.6.6 Kaasunkyllästysmenetelmä

1.6.6.1 *Laite*

Kuvassa 6a on tyypillisen laitteen osat (1):

Inertti kaasu

Kantokaasu ei saa reagoida kemiallisesti näytteen kanssa. Yleensä voidaan käyttää typpeä, mutta eräissä tapauksissa on käytettävä muuta kaasua (19). Kaasun on oltava kuivaa (kuva 6a, 4: suhteellisen kosteuden ilmaisin).

Virtausohjaus

Kaasunohjausjärjestelmä valvoo, että virtaus kyllästymiskolonnin läpi pysyy vakiona ja halutussa arvossa.

Höyryloukut

Loukut vaihtelevat näytteen ominaisuuksien ja valitun analyysimenetelmän mukaan. Kaikki höyry on kerättävä talteen myöhemmin tehtävää analyysiä varten. Joillekin näytteille sopii nestettä (esimerkiksi heksaania tai etyleeniglykoolia) sisältävä loukku, toisten kohdalla voi olla parempi käyttää kiinteitä absorbentteja.

Höyryn keräämisen ja tätä seuraavan analyysin vaihtoehtona tunnetun kaasumäärän kuljettama ainemäärä voidaan määrittää myös suora-analyysin (esimerkiksi kromatografian) avulla.

Lämmönvaihdin

Kun mittauksia tehdään eri lämpötiloissa, laitteeseen voidaan lisätä lämmönvaihdin.

Kyllästymiskolonni

Näytettä kaadetaan nesteestä sopivalle inertille alustalle. Päällystetty alusta pakataan kyllästymiskolonniin, jonka mitat ja virtausnopeus valitaan siten, että kantokaasu kyllästyy täysin. Kyllästymiskolonnissa on oltava lämpötilan säätömekanismi. Kun tehdään mittauksia huoneenlämpötilaa korkeammassa lämpötilassa, näytteen lauhtuminen on estettävä lämmittämällä kyllästymiskolonnin ja loukkujen välistä aluetta.

Diffuusion kautta tapahtuvaa massankuljetusta voidaan vähentää asentamalla kyllästymiskolonnin perään kapillaariputki (kuva 6b).

1.6.6.2 *Työjärjestys*

Kyllästymiskolonnin valmistelu:

Näytettä ja voimakkaasti haihtuvaa liuotinta sisältävä liuos kaadetaan sopivalle alustalle. Näytettä lisätään sellainen määrä, että sillä varmistetaan kyllästyminen koko testin ajaksi. Liuotin haihdutetaan täysin ilmassa tai pyörivässä haihduttimessa, ja huolella sekoitettu aine lisätään kyllästinkolonniin. Näytteen lämpötila säädetään toivotulle tasolle ja kuivaa typpeä johdetaan laitteen läpi.

Mittaus

Kytketään loukut tai suora-analyysi-ilmaisin kolonnin poistolinjaan ja mitataan aika. Virtausnopeus tarkistetaan testin alussa ja sen jälkeen säännöllisin välein testin aikana kuplavirtausmittarilla (tai jatkuvasti massavirtausmittarilla).

Kyllästimen ulostulon paine mitataan jollakin seuraavista menetelmistä:

(a) Kyllästimen ja loukkujen väliin lisätään painemittari. (Tämä menetelmä voi olla epätyydyttävä, koska se lisää kuollutta tilaa ja suurentaa adsorptiopintaa.)

(b) Tehdään erillinen mittaus, jossa määritetään käytettävän loukkujärjestelmän aiheuttamat paineen laskut virtausnopeuden funktiona. (Tämä menetelmä voi olla nesteloukkujen osalta epätyydyttävä.)

Näytteen kvantitatiiviseen keräämiseen tarvittava aika eri analyysimenetelmissä määritetään alustavien ajojen tai arvioiden perusteella. Vaihtoehtona näytteen keräämiselle myöhemmin tehtävää analyysiä varten ainemäärä voidaan määrittää myös suora-analyysin (esimerkiksi kromatografian) avulla. Ennen höyrynpaineen määritystä annetussa lämpötilassa on alustavien ajojen avulla löydettävä suurin virtausnopeus, jolla näytehöyry vielä kyllästää kantokaasun täysin. Virtausnopeus on tarpeeksi pieni, kun sen pienentäminen ei enää suurenna höyrynpaineen laskettua arvoa.

Jos käytetään analyyttisiä menetelmiä, menetelmä (esimerkiksi kaasukromatografia tai painoanalyysi) valitaan testattavan aineen luonteen mukaan.

Määritetään tunnetun kantokaasumäärän kuljettama ainemäärä.

1.6.6.3 *Höyrynpaineen laskeminen*

Höyrynpaine lasketaan höyryn tiheyden (W/V) perusteella seuraavan suureyhtälön mukaan:

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

jossa:

p = höyrynpaine (Pa)
W = haihdutetun näytteen massa (g)
V = kyllästetyn kaasun tilavuus (m^3)
R = yleinen molaarinen kaasuvakio (J mol^{-1} K^{-1})
T = lämpötila (K)
M = näytteen moolimassa (g mol^{-1})

Mitatut tilavuudet on korjattava virtausmittarin ja lämpötilasäädetyn kyllästimen välisten paine- ja lämpötilaerojen suhteen. Jos virtausmittari sijaitsee höyryloukusta alavirtaan, voi olla tarpeen ottaa huomioon myös loukun sisältämät höyrystyneet aineet (1).

1.6.7 **Pyörivä roottori (8, 11, 13)**

1.6.7.1 *Laite*

Pyörivän roottorin tekniikkaa voidaan soveltaa käyttämällä pyörivään roottoriin perustuvaa viskositeettimittaria (kuva 8). Laitteen periaatepiirros on kuvassa 7.

Tyypillisessä laitteessa on pyörivään roottoriin perustuva mittapää, joka on suljettu lämpötilasäädettyyn tilaan (säätötarkkuus 0,1 °C). Näytesäiliö asetetaan lämpötilasäädettyyn koteloon (säätötarkkuus 0,01 °C), ja järjestelmän kaikkia muita osia pidetään lämmitettyinä tiivistymisen estämiseksi. Järjestelmään on liitetty tyhjöpumppu tyhjöventtiilien avulla.

Mittapäässä on putkeen asetettu teräspallo (halkaisija 4 — 5 mm). Pallo leijuu stabiloituna magneettikentässä, joka luodaan kestomagneettien ja ohjauskäämien yhdistelmällä.

Pallon pyörii käämien tuottamien pyörivien kenttien vaikutuksesta. Pallon pyörimisnopeus saadaan pallon jatkuvaa heikkoa sivuttaista magnetisointia mittaavien vastaanottokäämien avulla.

1.6.7.2 *Työjärjestys*

Kun pallo on saavuttanut annetun pyörimisnopeuden v(o) (yleensä noin 400 kierrosta sekunnissa), magnetointi lopetetaan, jolloin pyöriminen hidastuu kaasukitkan vaikutuksesta.

Pyörimisnopeuden pienenemiset mitataan ajan funktiona. Koska magneettisen leijunnan aiheuttama kitka on häviävän pieni kaasukitkaan verrattuna, kaasun paine saadaan seuraavasti:

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

jossa

$\bar{c}$ = kaasumolekyylien keskinopeus

r = pallon säde

ρ = pallon massatiheys

σ = tangentiaalisen momentinsiirron vakio ($\varepsilon = 1$, kun pallon pinnan pyöreys on ihanteellinen)

t = aika

v(t) = pyörimisnopeus ajan t jälkeen

v(o) = pyörimisnopeuden alkuarvo

Yhtälö voidaan myös kirjoittaa seuraavaan muotoon:

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

jossa t_n, t_{n-1} ilmaisevat annettuun kierrosmäärään N kuluvan ajan. Aikavälit t_n ja t_{n-1} seuraavat toisiaan, ja $t_n > t_{n-1}$.

Kaasumolekyylin keskinopeus c saadaan seuraavan suureyhtälön mukaan:

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

jossa

T = lämpötila

R = yleinen molaarinen kaasuvakio

M = moolimassa

2 **TIEDOT**

Kaikissa edellä kuvatuissa menetelmissä höyrynpaine määritetään vähintään kahdessa lämpötilassa. Lämpötila-alueella 0 — 50 °C suositellaan vähintään kolmea mittausta, jotta höyrynpainekäyrän lineaarisuus voitaisiin tarkistaa.

3 **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset

— vähintään kaksi höyrynpaine- ja lämpötila-arvoa, mieluiten alueelta 0 — 50 °C

— kaikki lähtöarvot

— käyrä, joka kuvaa log p:n muuttumista 1/T:n funktiona

— arvio höyrynpaineesta 20 tai 25 °C:n lämpötilassa.

Jos aineessa tapahtuu muutoksia (olomuodon muutos, hajoaminen), on lisäksi ilmoitettava:

— muutoksen luonne

— lämpötila, jossa muutos tapahtui ilmakehän paineessa

— höyrynpaine 10 °C ja 20 °C muutoslämpötilan alapuolella sekä 10 °C ja 20 °C tämän lämpötilan yläpuolella (ellei kyseessä ole muutos kiinteästä olomuodosta kaasuksi).

Raporttiin tulee sisällyttää myös kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

4 **VIITTEET**

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

(2) Ambrose, D. in B. Le Neindre; B. Vodar, (Eds.): Experimental Thermodynamics, Butterworths, London, 1975, Vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Chapter IX, Interscience Publ. New York, 1959, Vol. I, Part I.

(4) Knudsen, M. Ann Phys. Lpz., 1909, vol. 29, 1979; 1911, vol. 34, 593.

(5) NF T 20-048 AFNOR (septembe 1985). Produits chimiques à usage industriel - Détermination de la pression de vapeur des solides et des liquides dans le domaine 10^{-1} à 10^{5} Pa. Méthode statique.

(6) NF T 20-047 AFNOR (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel - Détermination de la pression de vapeur des solides et des liquides dans le domaine 10^{-3} à 1 Pa. Méthode de la balance de pression de vapeur.

(7) ASTM D 2879-86 Standard test method for vapour pressure-temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(8) G. Messer, P. Röhl, G. Grosse and W. Jitschin. J. Vac Sci. Technol.(A), 1987, vol. 5 (4), 2440.

(9) Ambrose, D.; Lawrenson, I. J.; Sprake, C. H. S. J. Chem Thermodynamics 1975, vol. 7, 1173.

(10) B. F. Rordorf. Thermochimica Acta, 1985, vol. 85, 435.

(11) G. Comsa, J. K. Fremerey anb B. Lindenau. J. Vac. Sci. Technol., 1980, vol. 17 (2), 642.

(12) G. Reich. J. Vac. Sci. Technol., 1982, vol. 20 (4), 1148.

(13) J. K. Fremerey. J. Vac Sci. Technol.(A), 1985, vol. 3 (3), 1715.

Liite 1

Arviointimenetelmä

JOHDANTO

Höyrynpaineen laskettuja arvoja voidaan käyttää, kun halutaan

— päättää, mikä kokeellisista menetelmistä on sopiva

— saada arvio tai raja-arvo tapauksissa, joissa kokeellista menetelmää ei voida käyttää teknisistä syistä (esimerkiksi jos höyrynpaine on hyvin alhainen)

— apua sellaisten tapausten tunnistamisessa, joissa kokeellisia mittauksia ei tarvita, koska höyrynpaine huoneenlämmössä on todennäköisesti pienempi kuin 10^{-5}.

ARVIOINTIMENETELMÄ

Nesteiden ja kiinteiden aineiden höyrynpaine voidaan arvioida muunnetun Watson-korrelaation (a) avulla. Ainoa tarvittava kokeellinen tieto on normaali kiehumispiste. Menetelmää voidaan käyttää painealueella 10^{5} — 10^{-5} Pa.

Tarkemmat tiedot menetelmästä on kirjassa Handbook of Chemical Property Estimation Methods (b).

LASKENTA

Höyrynpaine voidaan kirjallisuusviitteen (b) mukaan laskea seuraavan suureyhtälön mukaan:

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

jossa

T = lämpötila

T_b = normaali kiehumispiste

P_{vp} = höyrynpaine lämpötilassa T

ΔH_{vb} = höyrystymislämpö

ΔZ_b = puristuvuustekijä (arvioitu arvo = 0,97)

m = empiirinen kerroin, joka vaihtelee fysikaalisen olomuodon mukaan kyseisessä lämpötilassa.

Lisäksi

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

jossa K_F on empiirinen vakio, jolla otetaan huomioon aineen polaarisuus. Viitteessä (b) on lueteltu K_F-vakiot useille sekoitetyypeille.

Usein on saatavana tietoja kiehumispisteestä alennetussa paineessa. Tällöin höyrynpaine voidaan viitteen (b) mukaan laskea seuraavasti:

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

jossa T_1 on kiehumispiste alennetussa paineessa P_1.

RAPORTTI

Kun käytetään laskentamenetelmää, raporttiin tulee sisällyttää yksityiskohtaiset selvitykset laskennasta.

KIRJALLISUUS

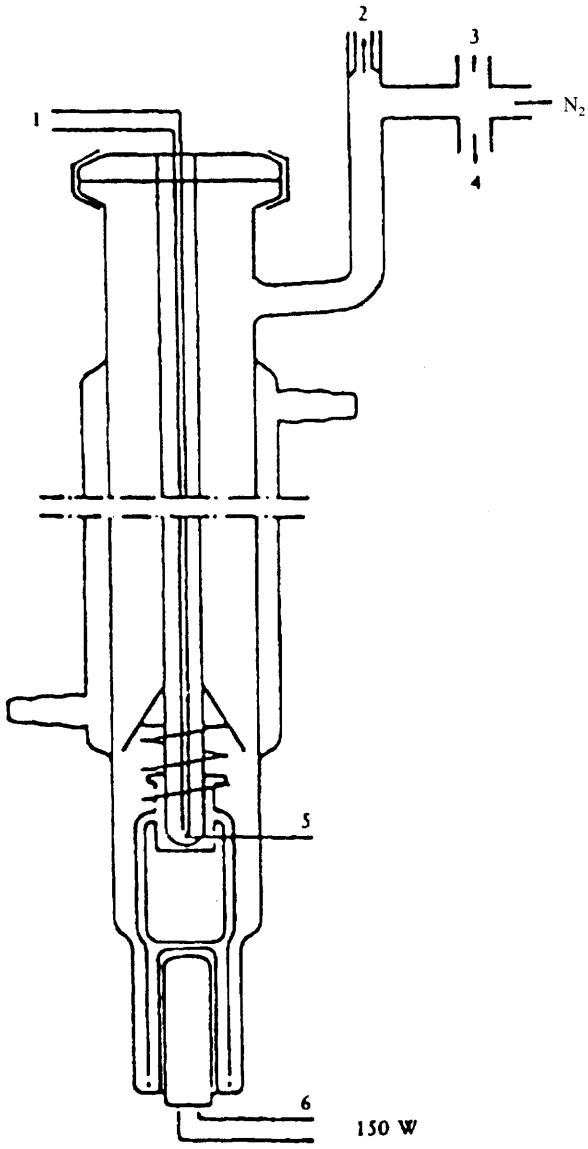
(a) K. M. Watson, Ind. Eng. Chem., 1943, vol. 35, 398.

(b) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt. Handbook of Chemical Property Estimation Methods, Mc Graw-Hill, 1982.

Liite 2

Kuva 1

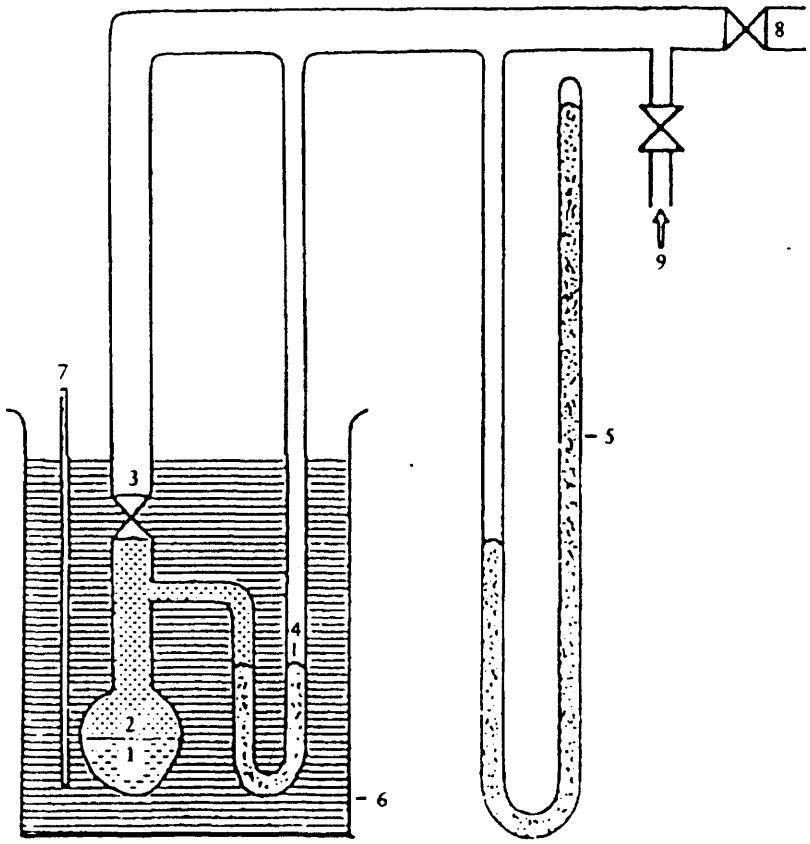
Laite dynaamisen menetelmän mukaan tehtävää höyrynpainekäyrän määritystä varten.



1. Termopari
2. Tyhjön puskuritilavuus
3. Painemittari
4. Tyhjö
5. Mittapiste
6. Kuumennusvastus, *noin* 150 W

Kuva 2a

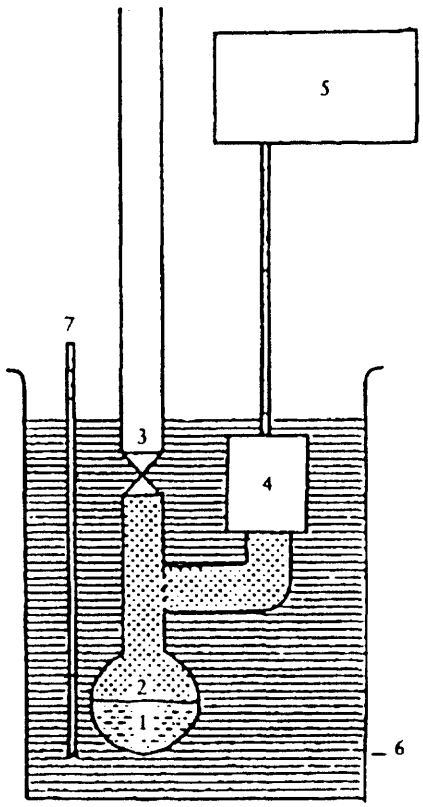
Laite staattisen menetelmän mukaan U-putkimanometrin avulla tehtävää höyrynpainekäyrän määritystä varten.



1. Näyte
2. Höyryfaasi
3. Tyhjöventtiili
4. U-putki (apumanometri)
5. Manometri
6. Lämpötilahaude
7. Lämpötilamittari
8. Tyhjöpumppuun johtava linja
9. Ilmaus

Kuva 2b

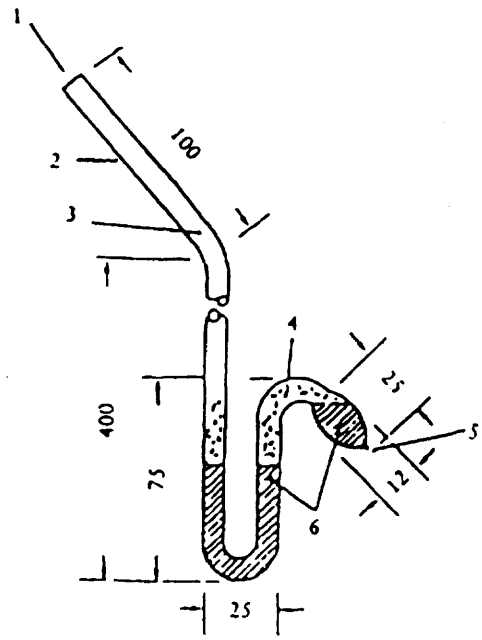
Laite staattisen menetelmän mukaan paineenosoittimen avulla tehtävää höyrynpainekäyrän määritystä varten



1. Näyte
2. Höyryfaasi
3. Tyhjöventtiili
4. Painemittari
5. Paineenosoitin
6. Lämpötilahaude
7. Lämpötilamittari

Kuva 3

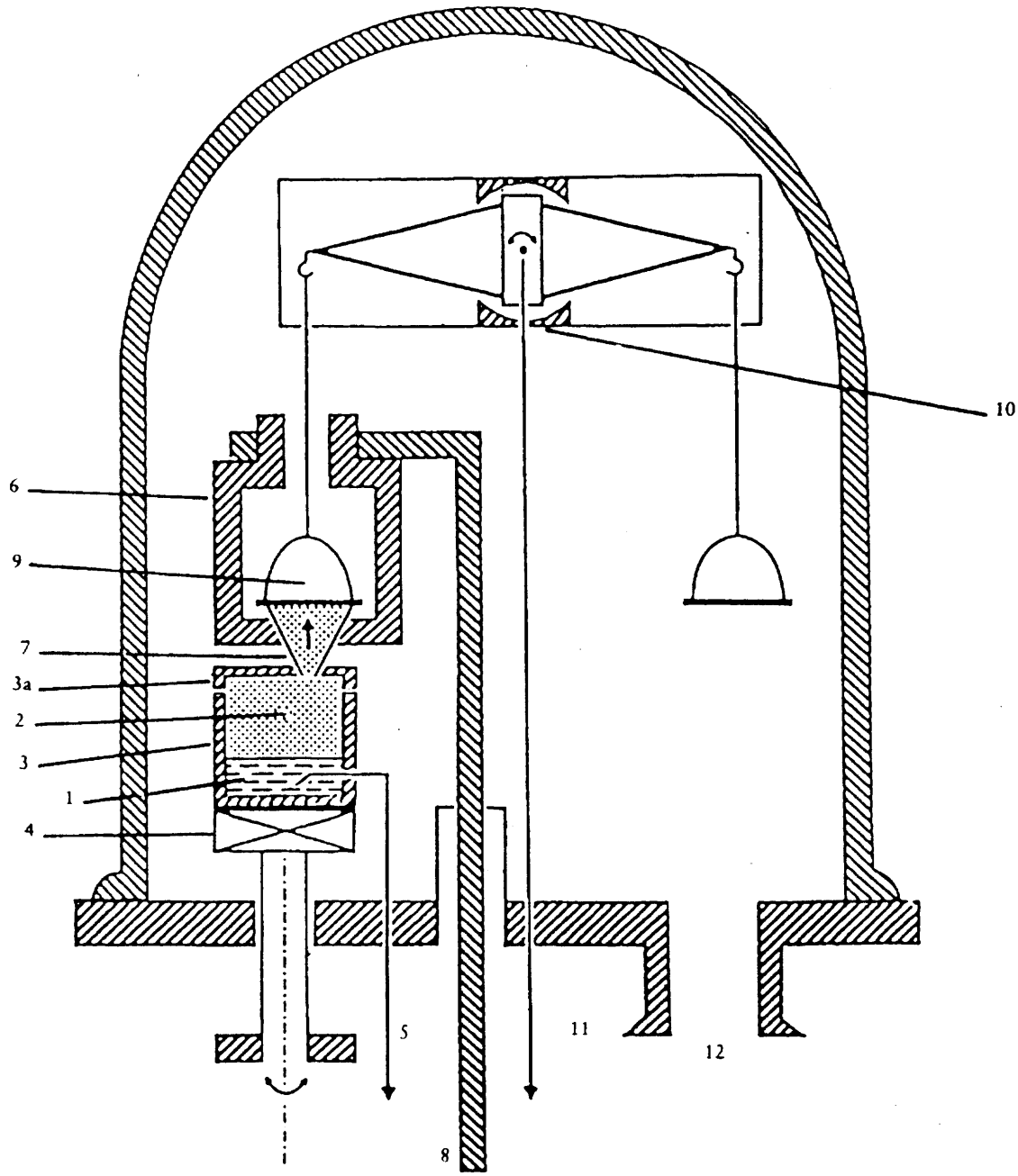
Isoteniskooppi (katso viitettä 7)



1. Paineensäätöön ja mittausjärjestelmään johtava linja
2. Halk. 8 mm putki
3. Painejärjestelmän kuiva typpi
4. Näytteen höyry
5. Pieni nokka
6. Nestemäinen näyte

Kuva 4

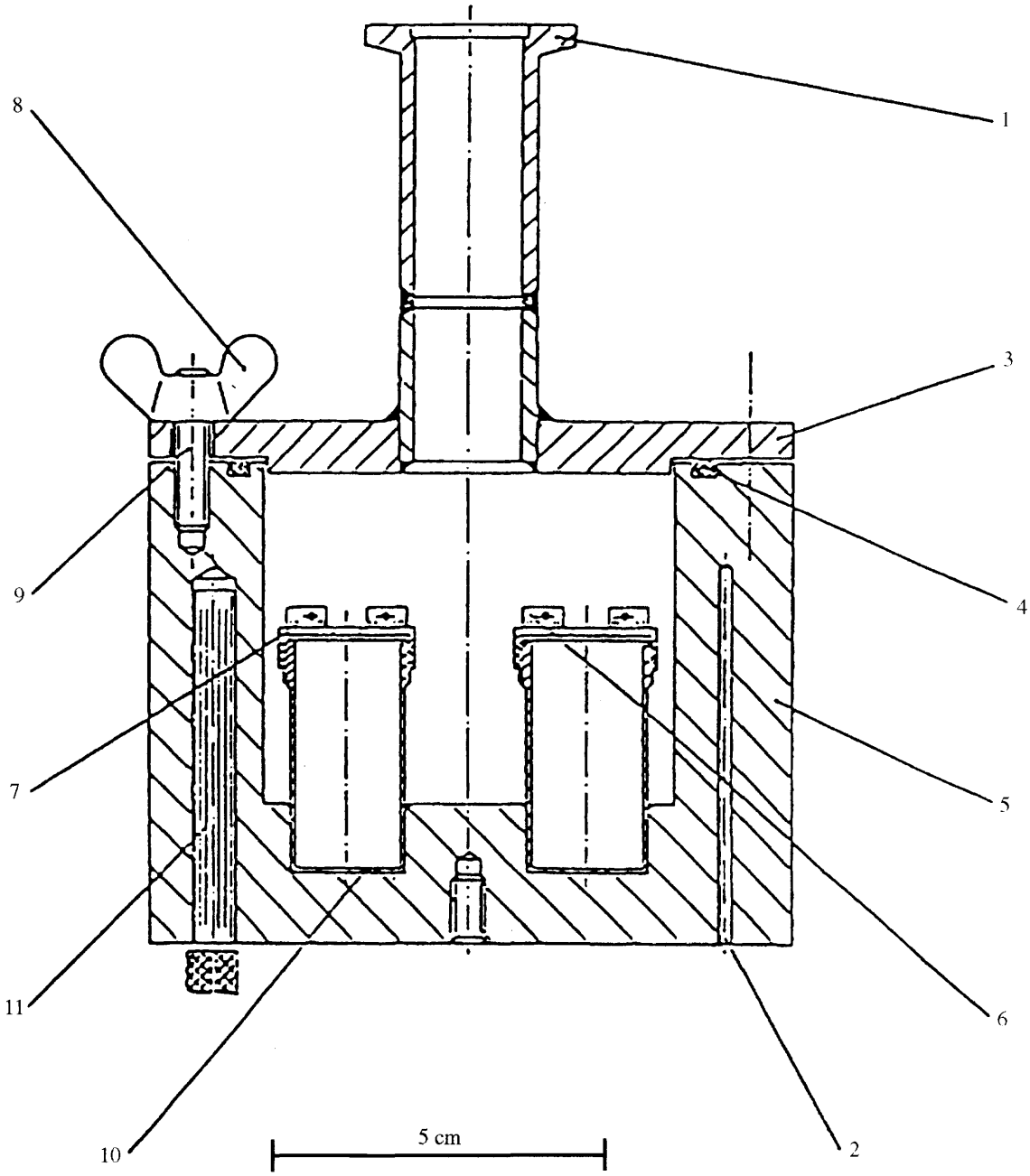
Laite höyrynpainevaakaan perustuvan menetelmän mukaan tehtävää höyrynpainekäyrän määritystä varten



1. Näyte
2. Höyryfaasi ja höyryvirtaus
3. Pyörivällä sisääntulolla varustettu haihdutinuuni
3a. Aukolla varustettu uunin kansi
4. Uunin kuumennus (jäähdytys)
5. Näytteen lämpötilan mittaus
6. Jäähdytyslaatikko
7. Suoja
8. Jäähdytyslaatikon kylmätanko
9. Vaakakuppi
10. Mikrovaaka
11. Rekisteröintilaitteeseen
12. Tyhjöpumppuun

Kuva 5

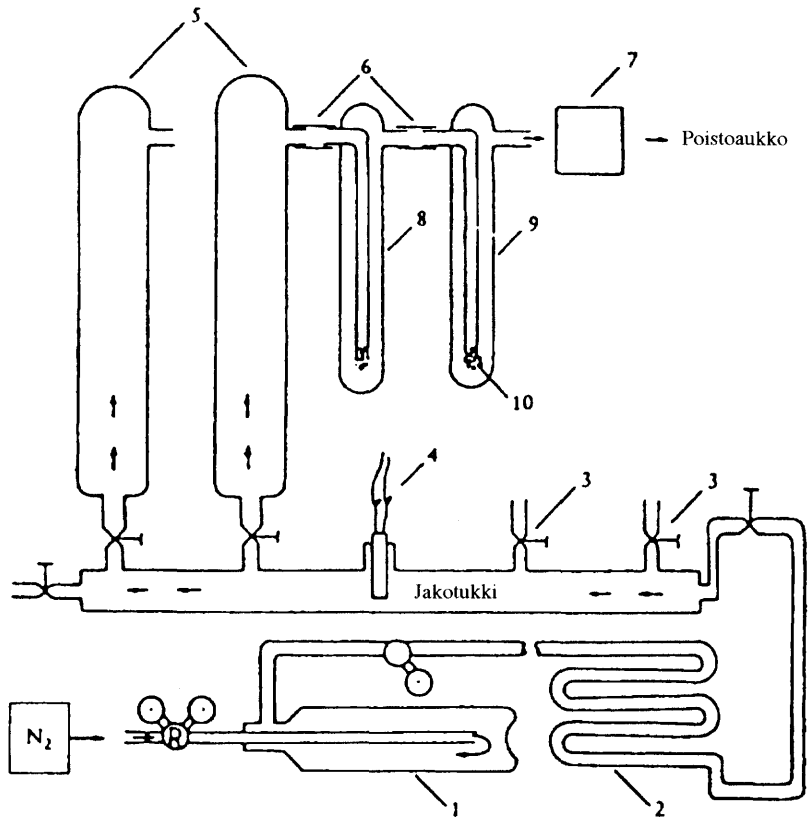
Esimerkki alhaisen paineen effuusiomenetelmän mukaan toimivasta haihdutuslaitteesta, jonka effuusiokennon tilavuus on 8 cm^3



1. Tyhjöliitäntä
2. Suojatasku platinavastuslämpömittaria tai lämpötilan mittausta ja säätöä (2) varten
3. Tyhjösäiliön kansi
4. O-rengas
5. Tyhjösäiliö (alumiinia)
6. Effuusiokennojen asetus- ja poistolaite
7. Kierrekansi
8. Siipimutterit (6)
9. Pultit (6)
10. Effuusiokennot (ruostumatonta terästä)
11. Kuumennuskasetit (6)

Kuva 6a

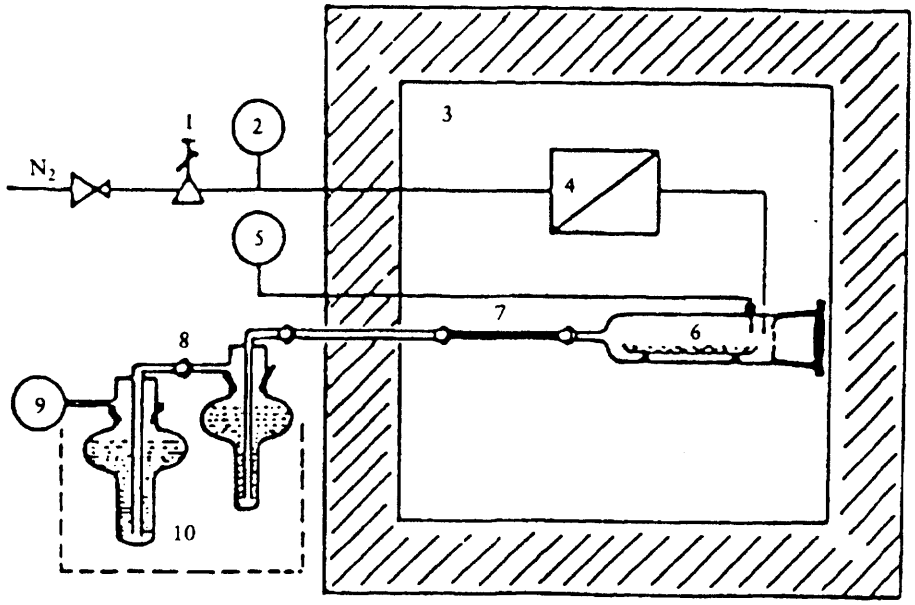
Esimerkki virtausjärjestelmästä, jolla määritetään höyrynpaine kaasunkyllästysmenetelmän mukaan



1. Virtaussäädin
2. Lämmönvaihdin
3. Neulaventtiilit
4. Suhteellisen kosteuden ilmaisin
5. Kyllästyskolonnit
6. PTFE-liitännät
7. Virtausmittari
8. Loukku (imeytin)
9. Öljyloukku
10. Kuplavirtausmittari

Kuva 6b

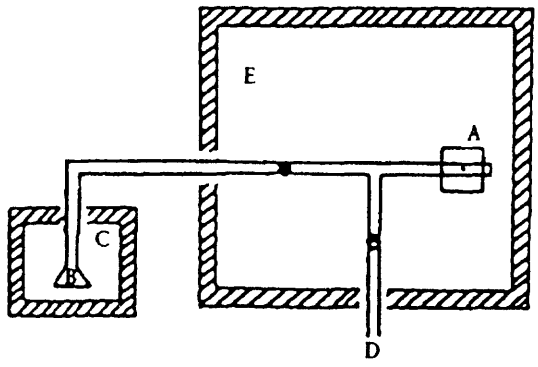
Esimerkki järjestelmästä, jolla määritetään höyrynpaine kaasunkyllästymismenetelmällä ja jossa on kapillaariputki kyllästyskammion jälkeen



1. Termisen massan virtausmittari
2. Manometri
3. Lämpötilasäädetty kammio
4. Kantokaasun lämpötilan säätökäämi
5. Lämpömittari (Pt 100)
6. Kaasunkyllästyskammio
7. Kapillaariputki
8. Absorptioastiat
9. Kaasumittari
10. Kylmäloukku

Kuva 7

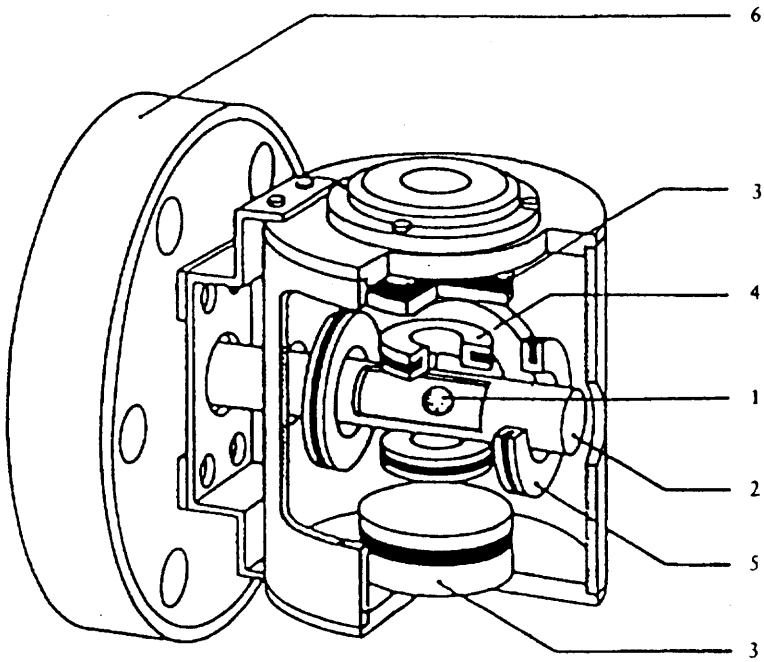
Esimerkki kokeellisesta järjestelystä pyörivän roottorin menetelmää varten



Höyrynpainelaite
A. Pyörivällä roottorilla varustettu mittapää
B. Näytekenno
C. Termostaatti
D. Tyhjölinja (turbopumppu)
E. Ilmatermostaatti

Kuva 8

Esimerkki pyörivällä roottorilla varustetusta mittapäästä



1. Pallo
2. Liitäntälaipan evakuoitu jatkokappale
3. Kestomagneetit (2)
4. Käämit (2) pystysuoraa stabilointia varten
5. Käyttökäämit (4)
6. Liitäntälaippa

A.5 PINTAJÄNNITYS

1 MENETELMÄ

Tässä kuvatut menetelmät perustuvat OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteessä (2).

1.1 JOHDANTO

Kuvattuja menetelmiä voidaan soveltaa vesiliuosten pintajännityksen mittaamiseen.

On suositeltavaa selvittää ensin tutkittavan aineen vesiliukoisuus, rakenne, hydrolysoitumisominaisuudet ja misellimuodostuksen kriittinen pitoisuus.

Kuvattuja menetelmiä voidaan käyttää lähes kaikkiin kemiallisiin aineisiin ilman rajoituksia aineiden puhtausasteen suhteen.

Pintajännityksen mittaaminen rengastensiometrillä on rajoitettu vesiliuoksiin, joiden dynaaminen viskositeetti on alle 200 mPa s.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Vapaan pinnan entalpiaa pintayksikköä kohti kutsutaan pintajännitykseksi.

Pintajännityksen yksiköt ovat seuraavat:

N/m (SI-yksikkö) tai

mN/m (SI-alayksikkö)

1 N/m = 10^3 dyniä/cm

1 mN/m = 1 dyni käytöstä poistuneessa cgs-järjestelmässä

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

Viitteissä (1) ja (3) esitetään vertailuaineita, jotka kattavat laajan pintajännitysalueen.

1.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATTEET

Menetelmä perustuu sen pystysuoran vetovoiman mittaamiseen, joka tarvitaan erottamaan sanka tai rengas mittaastiassa olevan tutkittavan nesteen pinnasta vetämällä kohtisuoraan ylöspäin. Voidaan myös panna neste lautaselle ja mitata voima, joka tarvitaan kappaleen reunan ja nestepinnan välisen kalvon irrottamiseen.

Aineet, joiden vesiliukoisuus on vähintään 1 mg/l, tutkitaan vesiliuoksessa yhtenä ainoana pitoisuutena.

1.5 LAATUKRITEERIT

Menetelmillä on mahdollista saavuttaa tarkkuus, joka on todennäköisesti suurempi kuin mitä ympäristöllisiä arviointeja varten tarvitaan.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

Ainetta liuotetaan tislattuun veteen. Liuoksen pitoisuuden tulee olla 90 % aineen kyllästymispitoisuudesta veteen liuotettaessa. Jos kyllästymispitoisuus ylittää arvon 1 g/l, testiin käytetään pitoisuutta 1 g/l. Aineita, joiden vesiliukoisuus on alle 1 mg/l, ei tarvitse testata.

1.6.1 **Lautasmenetelmä**

Katso standardeja ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing upp liquid films)

1.6.2 **Sinkilämenetelmä**

Katso standardeja ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing upp liquid films)

1.6.3 **Rengasmenetelmä**

Katso standardeja ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing upp liquid films)

1.6.4 **OECD-maiden yhtenäistetty rengasmenetelmä**

1.6.4.1 *Laite*

Tähän mittaukseen voidaan käyttää kaupallisesti saatavia tensiometrejä. Tensiometrin osat ovat seuraavat:

— liikkuva näytepöytä

— mittauskappale (rengas)

— voimanmittausjärjestelmä

— mittausastia.

1.6.4.1.1 Liikkuva näytepöytä

Liikkuva näytepöytä toimii näytettä paikallaanpitävän, termostaatilla varustetun mittausastian tukena. Näytepöytä ja voimanmittausjärjestelmä on kiinnitetty telineeseen.

1.6.4.1.2 Voimanmittausjärjestelmä

Voimanmittausjärjestelmä (katso kuvaa) sijaitsee näytepöydän yläpuolella. Voimanmittauksen virhe ei saa ylittää arvoa $\pm 10^{-6}$ N, mikä vastaa virherajaa ± 0,1 mg massamittauksissa. Useimmissa tapauksissa kaupallisten tensiometrien mitta-asteikko on mN/m-yksikköinä, jolloin pintajännityslukema saadaan suoraan mN/m-yksikköinä 0,1 mN/m:n tarkkuudella.

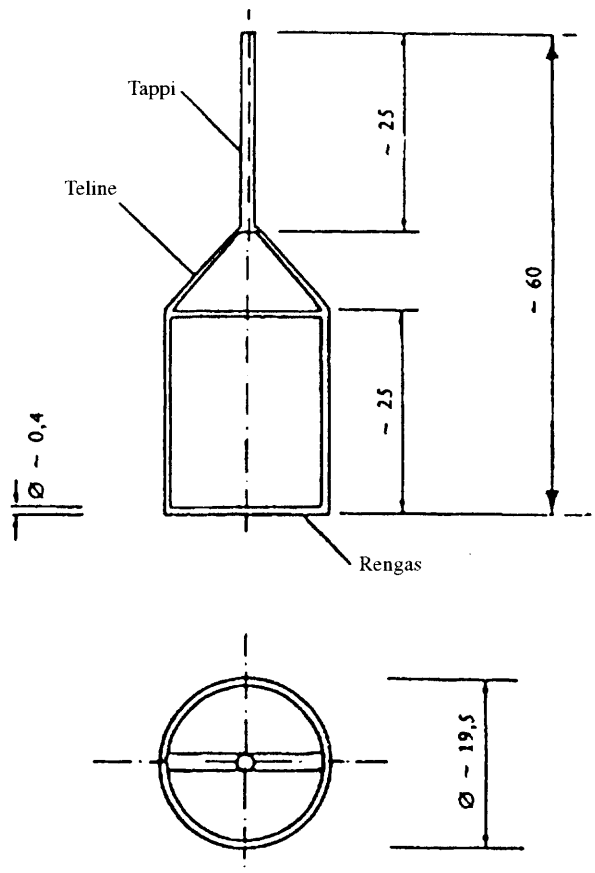
1.6.4.1.3 Mittauskappale (rengas)

Rengas on yleensä tehty noin 0,4 mm:n paksuisesta platina-iridiumlangasta. Keskiympärysmitta on 60 mm. Rengas riippuu vaakasuorassa metallitapista ja lankatelineestä ja on tätä kautta yhteydessä voimanmittausjärjestelmään (katso kuvaa).

Kuva

Mittauskappale

(Kaikki mitat ovat millimetreinä.)



1.6.4.1.4 Mittausastia

Näyteliuosta sisältävän mittausastian on oltava termostaatilla varustettu ja lasista valmistettu. Astian tulee olla siten muotoiltu, että näyteliuoksen ja sen yläpuolella olevan kaasufaasin lämpötila pysyy mittauksen aikana vakiona eikä näytettä pääse haihtumaan. Hyväksyttävän sylinterinmuotoisen mittausastian sisähalkaisijan on oltava vähintään 45 mm.

1.6.4.2 *Valmistelutoimet*

1.6.4.2.1 Puhdistus

Lasiastiat on puhdistettava huolella. Tarvittaessa ne on pestävä kuumalla kromi-rikkihapolla ja sen jälkeen väkevällä fosforihapolla (83 — 98 painoprosenttia H_3PO_4:ää), ja sen jälkeen huuhdeltava huolellisesti vesijohtovedellä. Lopuksi astiat on pestävä kaksoistislatulla vedellä, niin että saadaan neutraali reaktio, ja kuivattava, tai huuhdeltava pienellä määrällä näyteliuosta.

Rengas huuhdellaan ensin huolellisesti vedellä kaikkien vesiliukoisten aineiden poistamiseksi. Tämän jälkeen se upotetaan hetkeksi kromi-rikkihappoon, ja sitten se pestään kaksoistislatulla vedellä, niin että saadaan neutraali reaktio. Lopuksi rengasta kuumennetaan vähän aikaa metanoliliekin yllä.

Huomautus:

Epäpuhtaudet, jotka eivät liukene tai tuhoudu kromi-rikkihapon tai fosforihapon vaikutuksesta, poistetaan sopivalla orgaanisella liuottimella.

1.6.4.2.2 Laitteen kalibrointi

Laite kalibroidaan vahvistamalla nollapiste ja säätämällä se siten, että instrumentin lukema sallii luotettavan mN/m-lukeman määrityksen.

Asennus:

Laite tasapainoitetaan esimerkiksi tensiometrin jalustalla olevan vesiva'an avulla. Jalustan tasapainoitusruuveja säädetään tarpeen mukaan.

Nollapisteen säätö:

Kun rengas on kiinnitetty laitteeseen, tensiometrin lukema on ennen mittauksia säädettävä nollaan ja renkaan yhdensuuntaisuus nesteen pinnan suhteen on tarkistettava. Nesteen pintaa voidaan käyttää peilinä.

Kalibrointi:

Varsinainen kalibrointi voidaan tehdä jollakin seuraavista menetelmistä:

(a) Massamenetelmä: Renkaalle asetetaan kappaleita, joiden massa on tunnettu (0,1 — 1,0 g). Kalibrointikerroin (Φ_a), jolla instrumentin kaikki lukemat on kerrottava, määritetään yhtälön (1) mukaisesti:

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

jossa

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

m = kappaleen massa (g)

g = putoamiskiihtyvyys (981 cm s^{-2} merenpinnan tasolla)

b = renkaan keskiympärysmitta (cm)

σ_a = tensiometrin lukema, kun renkaalle on asetettu kappaleita (mN/m).

(b) Vesimenetelmä: Käytetään vettä, jonka pintajännitys esimerkiksi 23 °C:ssa on 72,3 mN/m. Menetelmä on nopeampi kuin painokalibrointi, mutta siihen liittyy vaara veden pintajännitysarvon vääristymisestä pinta-aktiivisten epäpuhtauksien vaikutuksesta.

Kalibrointikerroin (Φ_b), jolla instrumentin kaikki lukemat on kerrottava, määritetään yhtälön (2) mukaisesti:

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

jossa

σ_o = lähdekirjallisuudesta saatu veden pintajännityksen arvo (mN/m)

σ_g = veden pintajännityksen mitattu arvo (mN/m)

molemmat samassa lämpötilassa.

1.6.4.3 *Näytteiden valmistelu*

Näytteistä valmistetaan vaadittavan pitoiset vesiliuokset, jotka eivät saa sisältää liukenemattomia aineita.

Liuosten lämpötila on pidettävä vakiona (± 0,5 °C). Koska mittausastiassa olevan liuoksen pintajännitys muuttuu ajan kuluessa, on tehtävä useita mittauksia eri ajankohtina ja tuloksista on piirrettävä käyrä, joka ilmaisee pintajännityksen muuttumisen ajan funktiona. Kun muutoksia ei enää tapahdu, järjestelmä on saavuttanut tasapainon.

Pölyt ja muiden aineiden kaasumaiset epäpuhtaudet häiritsevät mittauksia. Siksi mittaukset on suoritettava suojan alla.

1.6.5 **Testiolosuhteet**

Mittaukset tehdään noin 20 °C:ssa. Lämpötila on säädettävä ± 0,5 °C:n tarkkuudella.

1.6.6 **Työjärjestys**

Näyteliuokset kaadetaan huolella puhdistettuun mittausastiaan välttäen tarkoin vaahdon muodostumista. Mittausastia asetetaan laitteen pöydälle. Pöytää mittausastioineen nostetaan, kunnes rengas on kokonaan näyteliuoksen pinnan alla. Tämän jälkeen pöytää lasketaan hitaasti ja tasaisesti (noin 0,5 cm minuutissa), niin että saavutetaan maksimivoima renkaan noustessa pintaan irtoamatta siitä ja pintaa yhdistävästä vesikerroksesta. Mittauksen jälkeen rengas lasketaan uudelleen pinnan alle ja mittauksia toistetaan, kunnes pintajännitysarvo ei enää muutu. Jokaisen mittauksen yhteydessä rekisteröidään aika, joka on kulunut näyteliuoksen kaatamisesta mittausastiaan. Mittaustulokseksi valitaan maksimivoima, joka tarvitaan nostamaan rengas nesteen pinnan yläpuolelle.

2 **TIEDOT**

Yksikkönä mN/m saadut mittaustulokset kerrotaan ensin kalibrointikertoimella Φ_a tai Φ_b (käytetyn kalibrointimenetelmän mukaan). Näin saadaan kuitenkin vain likiarvo, jota on vielä korjattava.

Harkins ja Jordan (4) ovat määritelleet empiirisesti korjauskertoimia rengasmenetelmällä mitatuille arvoille renkaan mittojen, nesteen tiheyden ja pintajännityksen mukaan.

Koska korjauskertoimen määritys Harkinsin ja Jordanin taulukosta jokaista yksittäistä mittausta varten on työlästä, voidaan vesiliuosten pintajännityksen laskemista varten käyttää yksinkertaistettua menetelmää, jossa korjatut pintajännitysarvot luetaan suoraan taulukosta. (Väliarvoja varten käytetään interpolointia.)

TAULUKKO: MITATUN PINTAJÄNNITYKSEN KORJAAMINEN

Vain vesiliuoksille, joiden tiheys on noin 1 g/cm³

R = 9,55 mm (renkaan säteen keskiarvo)

r = 0,185 mm (renkaan langan säde)

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

Taulukko perustuu Harkinsin-Jordanin korjaukseen. Taulukko vastaa vettä ja vesiliuoksia käsittelevän DIN-standardin (DIN 53914) taulukkoa (tiheys = 1 g/cm³). Se on tarkoitettu mittauksiin, joissa käytetään kaupallista rengasta, jonka mitat ovat R = 9,55 mm (renkaan säteen keskiarvo) ja r = 0,185 mm (renkaan langan säde). Taulukossa on pintajännitysmittauksien korjatut arvot, jotka tehdään paino- tai vesikalibroinnin jälkeen.

Vaihtoehtoisesti pintajännitys, joka on mitattu ilman ensin tehtyä kalibrointia, voidaan laskea seuraavan suureyhtälön mukaan:

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

jossa

F = dynamometrin mittaama voima kalvon murtuessa

R = renkaan säde

f = korjauskerroin (1)

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä

— käytetyn veden tai liuoksen tyyppi

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet)

— mittaustulokset: pintajännitys (lukema); ilmoitetaan sekä yksilölliset lukemat aritmeettisine keskiarvoineen että korjattu keskiarvo (laitekerroin ja korjaustaulukko huomioon ottaen)

— liuoksen pitoisuus

— testilämpötila

— liuoksen ikä; erityisesti aika liuoksen valmistelusta mittaushetkeen

— selvitys liuoksen pintajännityksen verrannollisuudesta aikaan siitä hetkestä lähtien, jolloin liuos on siirretty mittausastiaan

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Koska tislatun veden pintajännitys on 20 °C:ssa 72,75 mN/m, aineet, joiden pintajännitys on alle 60 mN/m kuvatun menetelmän kaltaisissa olosuhteissa, on katsottava pinta-aktiivisiksi aineiksi.

4 VIITTEET

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

(2) R. Weissberger ed., Technique of organic chemistry, Chapter XIV, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Interscience Publ. New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

(4) Harkins, W. D., Jordan, H. F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

A.6 VESILIUKOISUUS

1 MENETELMÄ

Tässä kuvatut menetelmät perustuvat OECD:n testiohjeeseen (1).

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää ensin tutkittavan aineen rakennekaava, dissosiaatiovakio ja hydrolysoituminen (pH:n funktiona).

Yksittäistä, koko vesiliukoisuusalueen kattavaa menetelmää ei ole.

Seuraavat kaksi testimenetelmää kattavat yhdessä koko liukoisuusalueen, mutta niitä ei voi soveltaa haihtuviin aineisiin:

— Ensimmäistä menetelmää voidaan soveltaa huomattavan puhtaisiin aineisiin, joiden liukoisuus on alhainen (< 10^{-2} grammaa litraa kohti) ja jotka ovat stabiileja vedessä. Menetelmää kutsutaan jäljempänä kolonnieluutiomenetelmäksi.

— Toista menetelmää voidaan soveltaa huomattavan puhtaisiin aineisiin, joiden liukoisuus on suuri (> 10^{-2} grammaa litraa kohti) ja jotka ovat stabiileja vedessä. Menetelmää kutsutaan jäljempänä pullomenetelmäksi.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan aineen vesiliukoisuus on sen kyllästyspitoisuus vedessä määrätyssä lämpötilassa. Vesiliukoisuus ilmoitetaan massayksikkönä liuostilavuutta kohti. SI-yksikkö on kg/m³ (myös yksikköä g/l voidaan käyttää).

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

Viitteissä (1) ja (3) kuvataan vertailuaineita, jotka kattavat laajan pintajännitysalueen.

1.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATTEET

Yksinkertaisen alustavan testin avulla selvitetään näytteen likimääräinen määrä ja kyllästyspitoisuuden saavuttamiseksi tarvittava aika.

1.4.1 Kolonnieluutiomenetelmä

Menetelmä perustuu veden avulla suoritettavaan näytteen eluutioon mikrokolonnista, jossa on inerttiä, runsaalla määrällä näytettä päällystettyä kantaja-ainetta, esimerkiksi lasihelmiä tai hiekkaa. Vesiliukoisuus voidaan määrittää, kun eluaatin massapitoisuus on vakio (vakiotila näkyy pitoisuus-aika-käyrässä tasanteena).

1.4.2 Pullomenetelmä

Näyte (kiinteät aineet on jauhettava) liuotetaan veteen lämpötilassa, joka on hieman testilämpötilan yläpuolella. Kun kyllästyminen saavutetaan, seos jäähdytetään, ja sitä pidetään sen jälkeen testilämpötilassa. Seosta ravistellaan tässä lämpötilassa, kunnes nestejärjestelmä saavuttaa tasapainon. Vaihtoehtoisesti mittaus voidaan suorittaa suoraan testilämpötilassa, edellyttäen, että kyllästymistasapaino varmistetaan soveltuvalla näytteenotolla. Tämän jälkeen määritetään aineen massapitoisuus sopivalla analyyttisella menetelmällä. Määritys tehdään vesiliuoksessa, joka ei saa sisältää liukenemattomia hiukkasia.

1.5 LAATUKRITEERIT

1.5.1 **Toistettavuus**

Kolonnieluutiomenetelmällä voidaan saavuttaa arvo < 30 %. Pullomenetelmällä tulisi saavuttaa arvo < 15 %.

1.5.2 **Herkkyys**

Herkkyys vaihtelee analyysimenetelmän mukaan, mutta massapitoisuuksia voidaan määrittää arvoon 10^{-6} g/l asti.

1.6 MENETELMIEN KUVAUKSET

1.6.1 **Testiolosuhteet**

Testi on mieluiten tehtävä lämpötilassa 20 ± 0,5 °C. Jos epäillään, että vesiliukoisuus vaihtelee lämpötilan mukaan, (> 3 % astetta kohti), on käytettävä kahta ylimääräistä lämpötilaa vähintään 10 °C ensin valitun lämpötilan ylä- ja alapuolella. Tässä tapauksessa lämpötilansäädön on toimittava ± 0,1 °C:n tarkkuudella. Valittua lämpötilaa on pidettävä yllä laitteen kaikissa tärkeissä osissa.

1.6.2 **Alustava testi**

Noin 0,1 g näytettä (kiinteät aineet on ensin jauhettava) pannaan lasilla suljettuun, 10 ml:n asteikolla varustettuun sylinteriin. Sylinteriin lisätään huoneenlämpöistä tislattua vettä seuraavan taulukon mukaan:

0,1 g liukenee 'x' ml:aan vettä	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Likimääräinen liukoisuus (g/l)	> 1 000	1000 — 2000	200 — 100	100 — 50	50 — 10	10 — 1	< 1

Jokaisen taulukon mukaisen vedenlisäyksen jälkeen seosta ravistetaan voimakkaasti 10 minuuttia ja tarkistetaan silmämääräisesti, ettei liuokseen ole jäänyt liukenemattomia hiukkasia. Jos näyte tai sen osa jää liukenematta 10 ml:n vedenlisäyksen jälkeen, koe on toistettava 100 ml:n sylinterissä aiempaa suuremmalla vesimäärällä. Huonosti liukenevien aineiden kohdalla liukenemisaika voi olla huomattavasti pitempi (on käytettävä vähintään 24 tuntia). Likimääräinen liukoisuus ilmenee taulukosta sen vesimäärän alta, jonka lisäyksen jälkeen näyte on täysin liuennut. Jos näyte edelleen vaikuttaa liukenemattomalta, odotetaan enemmän kuin 24 tuntia (enintään 96 tuntia), tai liuosta laimennetaan edelleen, jotta voitaisiin päättää, käytetäänkö kolonnieluutio- vai pullomenetelmää.

1.6.3 **Kolonnieluutiomenetelmä**

1.6.3.1 *Kantaja-aine, liuotin ja eluentti*

Kolonnieluutiota varten on valittava inertti kantaja-aine, esimerkiksi lasihelmet tai hiekka. Näyte kaadetaan kantaja-aineelle sopivaan, analyyttisen puhtaaseen haihtuvaan liuottimeen liuotettuna. Eluenttina käytetään lasi- tai kvartsilaitteessa kahdesti tislattua vettä.

Huomautus:

Suoraan orgaanisesta ioninvaihtimesta otettua vettä ei pidä käyttää.

1.6.3.2 *Kantaja-aineen lisääminen*

Noin 600 mg kantaja-ainetta punnitaan ja siirretään 50 ml:n pyörökolviin.

Sopiva, punnittu määrä näytettä liuotetaan valittuun liuottimeen. Kantaja-aine täytetään sopivalla määrällä tätä liuosta. Liuottimen on haihduttava täysin, esimerkiksi pyörivässä haihduttimessa, muutoin kantaja-aine ei kyllästy vedellä kantaja-aineen pinnalla tapahtuvien jakaantumisilmiöiden takia.

Kantaja-aineen täyttö saattaa aiheuttaa ongelmia (vääriä tuloksia), jos näyte lisätään öljynä tai erilaisena kristallifaasina. Ongelmaa on tutkittava kokeellisesti ja yksityiskohdat on raportoitava.

Täytön jälkeen kantaja-ainetta pidetään noin 5 ml:ssa vettä kahden tunnin ajan, minkä jälkeen suspensio kaadetaan mikrokolonniin. Vaihtoehtoisesti voidaan kaataa kuivaa, täytettyä kantaja-ainetta vedellä täytettyyn mikrokolonniin ja jättää se tasapainottumaan kahden tunnin ajaksi.

Testi:

Näytteen eluointi kantaja-aineesta voidaan tehdä kahdella eri tavalla:

— kiertopumpun avulla (kuva 1)

— tasausastian avulla (kuva 4).

1.6.3.3 *Kolonnieluutiomenetelmä ja kiertopumppu*

Laite

Kuvassa 1 esitetään tyypillisen järjestelmän periaatteellinen järjestely. Kuvassa 2 on sopiva mikrokolonni, mutta koko voidaan valita vapaasti, edellyttäen, että laite täyttää toistettavuus- ja herkkyysvaatimukset. Kolonnin ylätilaan on mahduttava vähintään viisi tilavuutta vettä, ja kolonniin on mahduttava vähintään viisi näytettä. Vaihtoehtoisesti kokoa voidaan pienentää, jos liuotinta lisäämällä voidaan korvata ensimmäiset viisi epäpuhtauksien poistoon tarkoitettua tilavuutta.

Kolonni kytketään kiertopumppuun, joka pystyy säätämään virtauksia, joiden nopeus on noin 25 ml tunnissa. Pumppuliitännät ovat polytetrafluorietyleeniä (PTFE:tä) tai lasia. Asennetussa kolonni-pumppujärjestelmässä pitää olla mahdollisuus näytteenottoon ulos virtaavasta nesteestä ja mahdollisuus ylätilan paineen tasaamiseen ilmanpaineen suhteen. Kolonniainetta tukee pieni (5 mm:n) lasivillatulppa, joka samalla suodattaa pois hiukkasia. Kiertopumppu voi olla esimerkiksi peristaltiikkapumppu tai kalvopumppu (on huolehdittava siitä, ettei putken materiaali aiheuta saastumista tai adsorptiota).

Mittauksen tekeminen

Käynnistetään virtaus kolonnin läpi. Suositeltava virtausnopeus on noin 25 ml tunnissa (vastaa 10 tilavuutta tunnissa kuvatun kolonnin kohdalla). Vesiliukoiset epäpuhtaudet poistetaan hylkäämällä vähintään ensimmäiset viisi tilavuutta. Tämän jälkeen kiertopumppu saa käydä, kunnes tasapaino on saavutettu. Tasapainotila voidaan todeta saavutetuksi, kun viiden peräkkäin otetun näytteen pitoisuudet vaihtelevat enintään ± 30 % satunnaisella tavalla. Näytteenottovälin on vastattava vähintään eluentin kymmenen tilavuuden läpivirtausta.

1.6.3.4 *Kolonnieluutiomenetelmä ja tasausastia*

Laite (katso kuvia 4 ja 3)

Tasausastia: Liitokset tasausastiaan toteutetaan lasihioksella, joka on yhdistetty PTFE-putkeen. Suositeltava virtausnopeus on 25 ml tunnissa. Peräkkäiset eluaattifraktiot kerätään ja analysoidaan valitun menetelmän mukaan.

Mittauksen tekeminen

Vesiliukoisuuden määritykseen käytetään vähintään viisi peräkkäin otettua fraktiota eluaatin keskialueelta, jossa pitoisuudet pysyvät vakiona (± 30 %).

Molemmissa tapauksissa (kiertopumppu- tai tasausastiajärjestelmä) on tehtävä toinen ajo, jossa virtausnopeus on puolet ensimmäisen ajon virtausnopeudesta. Jos molempien ajojen tulokset ovat yhtenevät, testin katsotaan olevan tyydyttävä. Jos alempi virtausnopeus antaa suuremman liukoisuuden, virtausnopeuden puolittamista on jatkettava, kunnes saadaan kaksi peräkkäistä, saman liukoisuuden antavaa ajoa.

Molemmissa tapauksissa (kiertopumppu- tai tasausastiajärjestelmä) fraktioista on etsittävä kolloideja Tyndall-ilmiön (valon sironta) avulla. Kolloidien esiintyminen mitätöi tulokset, ja tällöin testi on toistettava kolonnin suodatustehon parantumisen jälkeen.

Jokaisen näytteen pH on kirjattava. Toinen ajo on tehtävä samassa lämpötilassa.

1.6.4 **Pullomenetelmä**

1.6.4.1 *Laite*

Pullomenetelmää varten tarvitaan seuraavat osat:

— laboratoriolaseja ja -instrumentteja

— laite, jolla liuoksia voidaan ravistaa säädetyissä vakiolämpötiloissa

— sentrifugi (mieluiten termostaatilla varustettu), jos sellainen tarvitaan emulsion käsittelyyn

— laitteet analyyttisia määrityksiä varten.

1.6.4.2 *Mittausten tekeminen*

Alustavan testin avulla saadaan tieto halutun vesimäärän kyllästämiseen tarvittavasta ainemäärästä. Tarvittava vesimäärä vaihtelee analyyttisen menetelmän ja liukoisuusalueen mukaan. Noin viisinkertainen määrä ainetta punnitaan kolmeen eri lasitulpalla varustettuun lasiastiaan (esimerkiksi sentrifugiputkiin tai pulloihin). Valittu vesimäärä lisätään astioihin, jotka suljetaan tiiviisti. Suljettuja astioita ravistetaan 30 °C:ssa. (Tarkoitukseen käytetään ravistus- tai sekoitustapaa, jossa voidaan pitää yllä vakiolämpötilaa, esimerkiksi magneettisekoitusta termostaatilla varustetussa vesihauteessa.) Vuorokauden kuluttua yksi astioista poistetaan, ja astian sisältö tasapainoitetaan uudelleen 24 tunnin aikana testilämpötilassa astiaa ajoittain ravistamalla. Astian sisältö lingotaan testilämpötilassa ja näytteen pitoisuus määritetään kirkkaasta vesifaasista sopivan analyyttisen menetelmän mukaisesti. Toista jäljellä olevaa astiaa käsitellään ensimmäisen 30 °C:ssä tapahtuneen tasapainoituksen jälkeen samalla tavoin kaksi vuorokautta ja toista astiaa kolme vuorokautta. Jos pitoisuustulokset vähintään kahdesta viimeisestä astiasta täyttävät toistettavuusvaatimukset, testi hyväksytään. Jos astioista 1, 2 ja 3 saadut tulokset osoittavat nousevaa suuntausta, koko testi on toistettava pidempiä tasapainoitusaikoja käyttäen.

Mittaus voidaan myös toteuttaa ilman 30 °C:ssa tapahtuvaa esi-inkubaatiota. Kyllästystasapainon saavuttamisnopeutta voidaan arvioida jatkamalla näytteidenottoa, kunnes sekoitusaika ei enää vaikuta liuoksen pitoisuuteen.

Jokaisen näytteen pH on kirjattava.

1.6.5 **Analyysi**

Näitä määrityksiä varten suositellaan ainekohtaista analyyttista menetelmää, koska pienet määrät liukoisia epäpuhtauksia voivat aiheuttaa suuria virheitä mitatussa liukoisuudessa. Esimerkkejä tällaisista menetelmistä ovat kaasu- tai nestekromatografia, titrausmenetelmät, fotometriset menetelmät ja kulometriset menetelmät.

2 TIEDOT

2.1 KOLONNIELUUTIOMENETELMÄ

Jokaista ajoa kohti on laskettava vähintään viiden peräkkäisen kyllästysalueelta otetun näytteen keskiarvo ja näytteiden keskihajonta. Tulokset ilmoitetaan massayksikköinä liuostilavuutta kohti.

Verrataan keskenään kahden eri virtauksilla tehdyn testin keskiarvoja. Toistettavuuden on oltava pienempi kuin 30 %.

2.2 PULLOMENETELMÄ

Jokaisen yksittäisen pullon yksittäinen tulos ilmoitetaan, ja vakiona pidettävistä tuloksista (toistettavuus alle 15 %) lasketaan keskiarvo. Näin saatu tulos ilmoitetaan massayksikköinä liuostilavuutta kohti. Tämä saattaa edellyttää massayksiköiden muuntamista tilavuusyksiköiksi. Tällöin käytetään tiheyttä, jossa liukoisuus on hyvin suuri (> 100 g/l).

3 RAPORTOINTI

3.1 KOLONNIELUUTIOMENETELMÄ

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— alustavan testin tulokset

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet)

— jokaisen näytteen pitoisuus, virtausnopeus ja pH

— jokaisen ajon vähintään viiden kyllästysalueelta otetun näytteen keskiarvot ja keskihajonnat

— kahden peräkkäisen hyväksyttävän ajon keskiarvo

— veden lämpötila kyllästysprosessin aikana

— käytetty analyysimenetelmä

— käytetyn kantaja-aineen luonne

— kantaja-aineen täyttö

— käytetty liuotin

— näytteet aineen mahdollisesta kemiallisesta epästabiliteetista testin ja menetelmän suorittamisen aikana

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

3.2 PULLOMENETELMÄ

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— alustavan testin tulokset

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet)

— yksittäiset analyyttiset määritykset sekä keskiarvo, jos jokaista pulloa kohti on määritetty useampia arvoja

— jokaisen näytteen pH

— keskiarvo niistä eri astioista, joiden tulokset olivat yhteneviä

— testilämpötila

— käytetty analyyttinen menetelmä

— todisteet aineen mahdollisesta kemiallisesta epästabiliteetista testin ja menetelmän suorittamisen aikana

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

4 **VIITTEET**

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

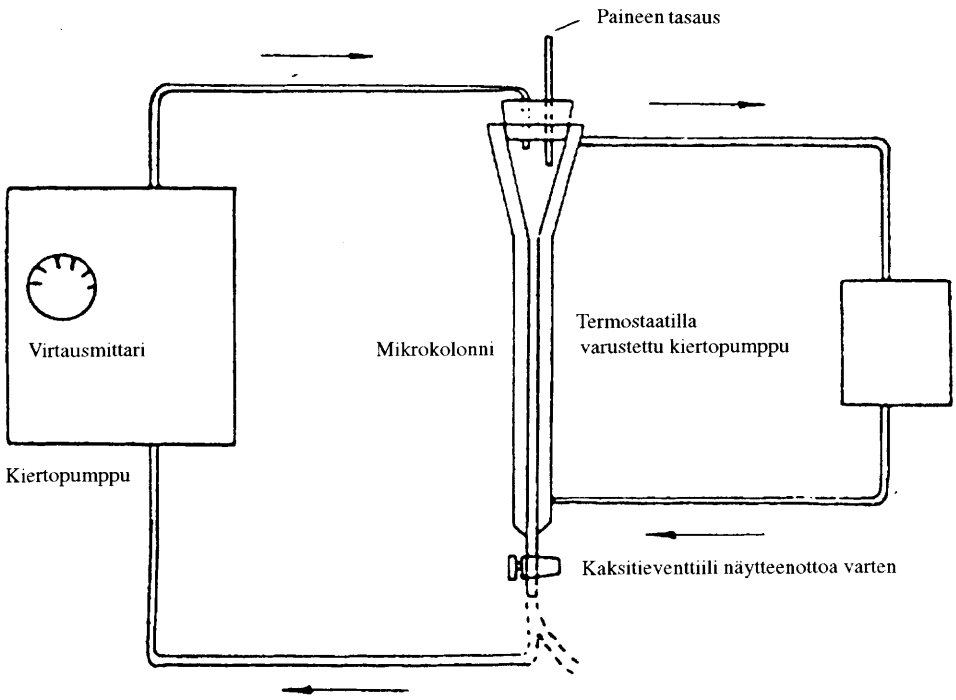
(2) NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solulibity of solids and liquids with low solulibility — Column elution method

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (Sept. 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solulibility of solids and liquids with high solulibity — Flask method

Liite

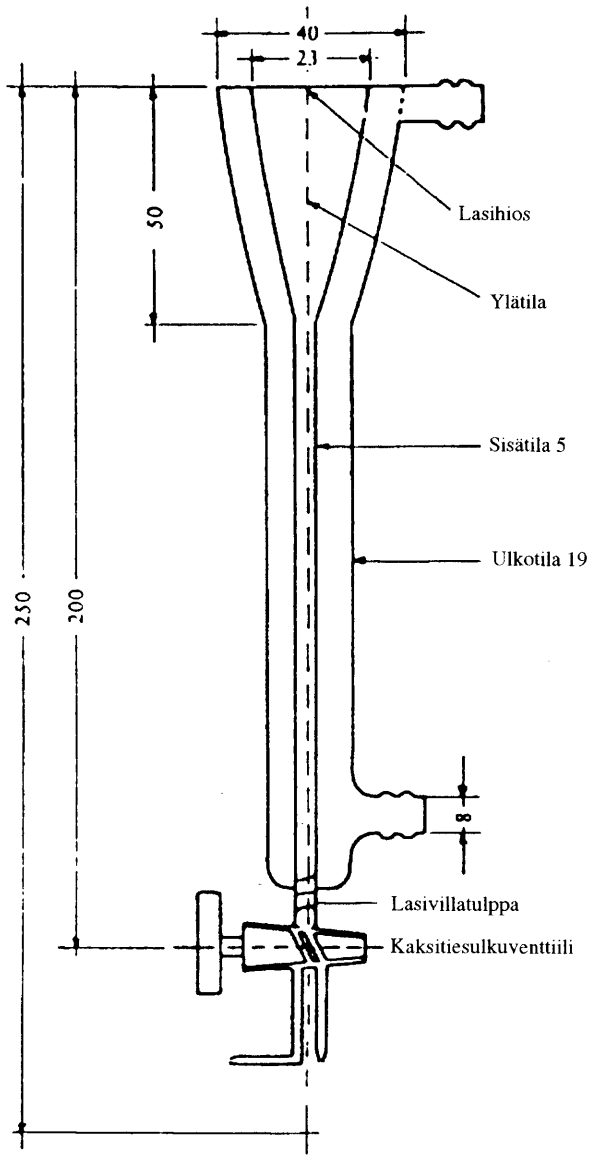
Kuva 1

Kolonnieluutiomenetelmä ja kiertopumppu



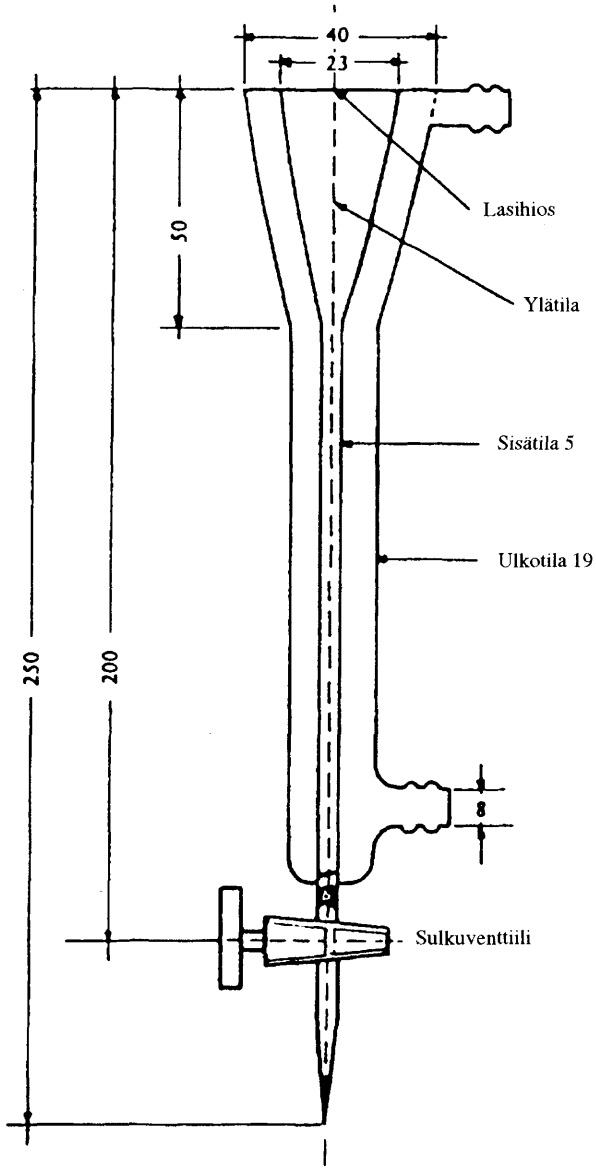
Kuva 2

Tyypillinen mikrokolonni
(Kaikki mitat ovat millimetreinä.)



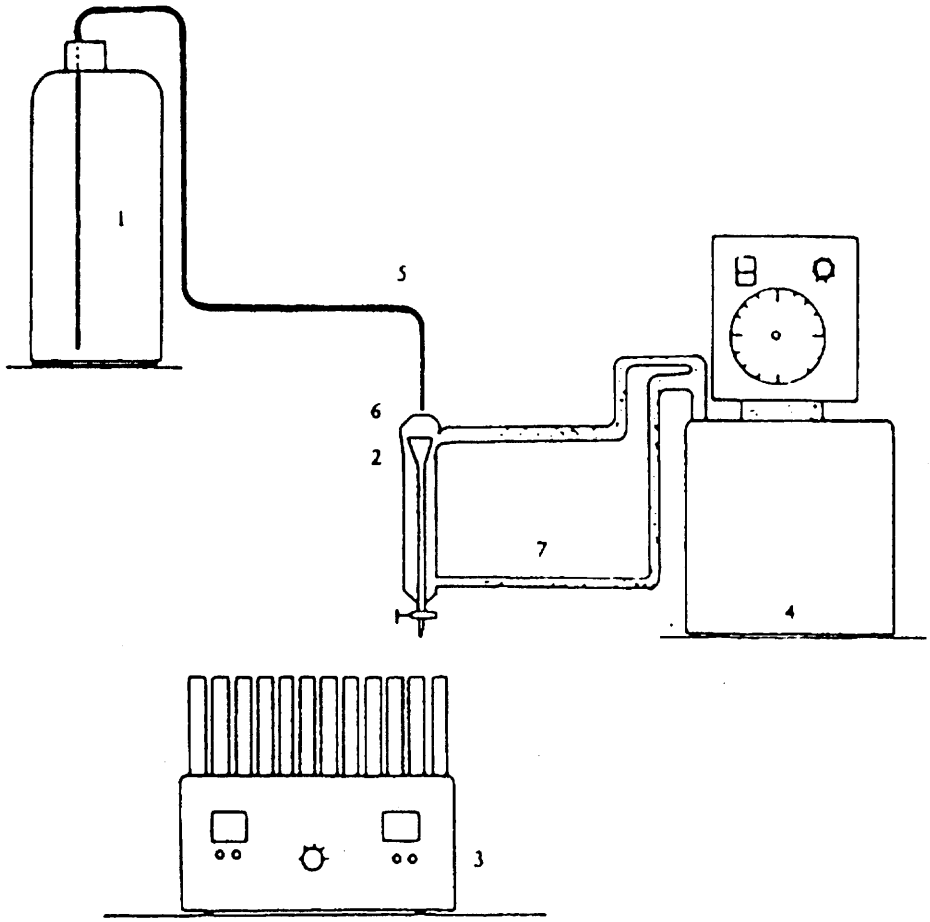
Kuva 3

Tyypillinen mikrokolonni
(Kaikki mitat ovat millimetreinä.)



Kuva 4

Kolonnieluutiomenetelmä ja tasausastia



1. Tasausastia (esimerkiksi 2,5 litran pullo)
2. Kolonni (katso kuvaa 3)
3. Fraktionkeräin
4. Termostaatti
5. Teflonputki
6. Lasihios
7. Vesilinja (termostaatin ja kolonnin välillä, sisähalkaisija noin 8 mm)

A.8 JAKAANTUMISKERROIN

1 MENETELMÄ

Tässä kuvattu ravistuspullomenetelmä perustuu OECD:n testiohjeeseen (1).

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää ensin tutkittavan aineen rakennekaava, dissosiaatiovakio, vesiliukoisuus, hydrolysoituminen, n-oktanoliliukoisuus ja pintajännitys.

Mitattaessa ionisoituvia aineita on aina käytettävä aineiden ionisoitumatonta muotoa (vapaata happoa tai vapaata emästä), joka on saatu sellaisen sopivan puskurin avulla, jonka pH on vähintään yhden pH-yksikön pK-arvoa pienempi (vapaa happo) tai suurempi (vapaa emäs).

Testi voidaan tehdä kahdella eri menetelmällä: ravistuspullomenetelmällä tai HPLC-nestekromatografialla. Ensimmäistä menetelmää voidaan soveltaa, kun P_{ow}-arvo (katso jäljempänä olevaa määritelmää) on -2...4, ja toista menetelmää arvon ollessa 0...6. Alustavan kokeen avulla saadaan arvio näytteen jakaantumiskertoimesta, minkä jälkeen valitaan sopiva menetelmä.

Ravistuspullomenetelmää voidaan soveltaa vain huomattavan puhtaiden, vesi- ja n-oktanoliliukoisten aineiden testaukseen. Menetelmää ei voida soveltaa pinta-aktiivisten aineiden testaukseen (näiden kohdalla on esitettävä laskettu arvo tai arvio, joka perustuu yksittäisiin vesi- ja n-oktanoliliukoisuuksiin).

HPLC-menetelmää ei voida soveltaa vahvojen happojen ja emästen, metallikompleksien, pinta-aktiivisten aineiden tai eluentin kanssa reagoivien aineiden testaukseen. Näiden aineiden kohdalla on esitettävä laskettu arvo tai arvio, joka perustuu yksittäisiin vesi- ja n-oktanoliliukoisuuksiin.

HPLC-menetelmä ei ole yhtä herkkä näytteessä oleville epäpuhtauksille kuin ravistuspullomenetelmä. Kuitenkin epäpuhtaudet voivat joissakin tapauksissa vaikeuttaa tulosten tulkintaa, koska kärkien kohdentaminen on tällöin epävarmaa. Jos seoksen testauksessa saadaan määrittämätön kaista, on ilmoitettava log P:n ylä ja alaraja.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan jakaantumiskerroin (P) on liuotetun aineen tasapainopitoisuuksien (c_i) välinen suhde kaksifaasijärjestelmässä, jossa on kaksi toisiinsa heikosti sekoittuvaa liuotinta:

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{n-oktanoli}}}{C_{\text{vesi}}}$$

Jakaantumiskerroin (P) on siis kahden pitoisuuden välinen suhde, ja se ilmoitetaan normaalisti kymmenkantaisena logaritmina (log P).

1.3 VERTAILUAINEET

Ravistuspullomenetelmä

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

HPLC-menetelmä

Aineen HPLC-mittaustulosten ja yhdisteen P-arvon välinen vastaavuus saadaan kalibrointikäyrästä, jossa log P esitetään kromatografisten tietojen funktiona. Kalibrointikäyrän kromatografisten tietojen on katettava vähintään 6 vertailupistettä. Käyttäjä valitsee sopivat vertailuaineet. Mahdollisuuksien mukaan on valittava vähintään yksi vertailuaine, jonka P_{ow}-arvo on pienempi kuin näytteen P_{ow}-arvo, ja yksi vertailuaine, jonka P_{ow}-arvo on suurempi.

Kun log P -arvo on pienempi kuin 4, kalibrointi voi perustua ravistuspullomenetelmällä saatuihin tuloksiin. Kun log P -arvo on suurempi kuin 4, kalibrointi voi perustua validoituihin, lähdekirjallisuudesta saatuihin arvoihin, jotka ovat yhteneviä laskettujen arvojen kanssa. Tarkkuutta voidaan parantaa käyttämällä vertailuaineita, joiden rakenne muistuttaa näytteen rakennetta.

Lähdekirjallisuudessa on laajat luettelot monen kemikaaliryhmän log P_{ow} -arvoista (2), (3). Jos näytteen kanssa samankaltaisen rakenteen omaavien yhdisteiden tietoja ei ole käytettävissä, voidaan käyttää yleisempää kalibrointia, joka perustuu muihin vertailuaineisiin.

Liitteessä 2 on luettelo suositeltavista vertailuaineista ja niiden P_{ow}-arvoista.

1.4 MENETELMIEN PERIAATTEET

1.4.1 Ravistuspullomenetelmä

Jakaantumiskertoimen määritystä varten järjestelmän kaikkien keskinäisessä vuorovaikutuksessa olevien osien on saavutettava tasapaino, minkä jälkeen määritetään järjestelmän kahteen faasiin liuotetun aineen pitoisuudet. Lähdekirjallisuudessa esitetään useita tekniikoita, joiden avulla molemmat faasit voidaan sekoittaa huolella ja joiden avulla niistä voidaan määrittää näytteen tasapainopitoisuudet kummassakin faasissa faasien erotuksen jälkeen.

1.4.2 HPLC-menetelmä

HPLC tapahtuu analyyttisessa kolonnissa, joka on täytetty kaupallisesti saatavana olevalla, pitkiä hiilivetyketjuja (esimerkiksi C_8, C_{18}) sisältävällä kiinteällä faasilla, joka on kemiallisesti sidottu piidioksidiin. Kolonniin ruiskutetut kemikaalit liikkuvat eri nopeuksilla sen mukaan, mikä on niiden jakaantumiskerroin liikkuvan faasin ja kiinteän hiilivetyfaasin välillä. Kemikaaliseokset eluoituvat hydrofobisuuden perusteella siten, että vesiliukoiset kemikaalit eluoituvat ensin ja öljyliukoiset viimeisenä suhteessa niiden hiilivety-vesi-jakaantumiskertoimeen. Näin voidaan määrittää vastafaasikolonnin retention ja n-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen välinen suhde. Jakaantumiskerroin voidaan laskea *käyttökertoimen* k perusteella seuraavasti:

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

jossa t_R = näytteen retentio ja t_0 = liuotinmolekyylin keskimääräinen läpäisyaika (viive).

Kvantitatiivisia analyyttisia menetelmiä ei tarvita. Eluointiaikojen määritys riittää.

1.5 LAATUKRITEERIT

1.5.1 Toistettavuus

Ravistuspullomenetelmä

Jakaantumiskertoimen tarkkuus varmistetaan tekemällä kolme määritystä eri testiolosuhteissa, joissa näytteen määrä ja liuotintilavuuksien suhde voivat vaihdella. Saadut jakaantumiskertoimen arvot saavat vaihdella enintään ± 0,3 logaritmiyksikköä kymmenkantaisina logaritmeina ilmaistuna.

HPLC-menetelmä

Mittaustulokset varmistetaan tekemällä kaksi määritystä. Yksittäisten mittausten perusteella saadut log P -arvot saavat vaihdella enintään ± 0,1 logaritmiyksikköä.

1.5.2 **Herkkyys**

Ravistuspullomenetelmä

Menetelmän mittausalue määräytyy analyyttisen menetelmän havaintorajojen mukaan. Yleensä log P_{ow} -arvoja voidaan määrittää alueella -2...4 (määrätyissä olosuhteissa jopa arvoon log P_{ow} = 5 asti), kun liuenneen aineen pitoisuus kummassakin faasissa on enintään 0,01 moolia litrassa.

HPLC-menetelmä

HPCL-menetelmällä voidaan laskea jaakaantumiskerroin P_{ow}-alueella 0 — 6.

Yleensä yhdisteen jakaantumiskertoimeksi voidaan arvioida ± 1 logaritmista yksikköä ravistuspullomenetelmän arvosta. Tyypillisiä korrelaatioita löytyy lähdekirjallisuudesta (4), (5), (6), (7), (8). Yleensä on mahdollista saada tarkempia tuloksia, kun korrelaatiopisteet on saatu rakenteellisesti samankaltaisten vertailuyhdisteiden tiedoista (9).

1.5.3 **Spesifisyys**

Ravistuspullomenetelmä

Nernstin jakaantumislakia voidaan laimennettujen liuosten kohdalla soveltaa vain vakiolämpötilassa, vakiopaineessa ja vakio-pH:ssa. Suoraan sovellettuna laki koskee vain puhtaita aineita, jotka jakautuvat kahden puhtaan liuottimen välillä. Jos toisessa tai molemmissa faaseissa on samanaikaisesti useita erilaisia liuoksia, tämä saattaa vaikuttaa tuloksiin.

Liuotettujen molekyylien assosiaatiosta tai dissosiaatiosta seuraa poikkeamia Nernstin jakaantumislaista. Tällaiset poikkeamat voidaan osoittaa sillä, että jakaantumiskerroin vaihtelee liuoksen pitoisuuden mukaan.

Koska tasapainoja on useita, testimenetelmää ei pidä soveltaa ionisoituviin yhdisteisiin ilman korjausta. Tällaisten yhdisteiden kohdalla on harkittava veden korvaamista puskuriliuoksilla, ja puskurin pH:n tulisi poiketa vähintään yhden pH-yksikön verran aineen pKa-arvosta. Lisäksi on otettava huomioon valitun pH:n sovellettavuus kyseiseen ympäristöön.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Jakaantumiskertoimen alustava arviointi**

Alustavaan arviointiin tulisi mieluiten käyttää laskentamenetelmää (katso liitettä 1). Määrätyissä tapauksissa arviointiin voidaan käyttää myös näytteen liukoisuutta puhtaisiin liuottimiin (10).

1.6.2 **Ravistuspullomenetelmä**

1.6.2.1 *Valmistelutoimet*

n-oktanoli: Jakaantumiskertoimen määritykseen käytetään analyyttisen puhdasta reagenssia.

Vesi: Tarkoitukseen käytetään lasi- tai kvartsilaitteessa tislattua tai kaksoistislattua vettä. Ionisoituvien aineiden kohdalla on tarpeen mukaan käytettävä puskuriliuoksia veden sijasta.

Huomautus:

Suoraan ioninvaihtimesta otettua vettä ei pidä käyttää.

1.6.2.1.1 Liuottimien esikyllästys

Ennen jakaantumiskertoimen määritystä molemmat liuotinjärjestelmän faasit kyllästetään ravistamalla testilämpötilassa. Käytännöllinen toteutustapa on käyttää kahta suurta, analyyttisen puhtaalla n-oktanolilla tai vedellä täytettyä varastopulloa, joissa on tarpeellinen määrä toista liuotinta, pitää pulloja vuorokauden ajan mekaanisessa ravistimessa ja antaa tämän jälkeen pullojen levätä, kunnes faasit erottuvat ja kyllästyspiste saavutetaan.

1.6.2.1.2 Testin valmistelutoimet

Kaksifaasijärjestelmän on täytettävä testausastia lähes kokonaan. Näin voidaan pienentää haihtumisesta aiheutuvaa ainehukkaa. Aineen tilavuussuhde ja määrät määräytyvät seuraavien tekijöiden mukaan:

— jakaantumiskertoimen alustava määritys (katso edellä)

— pienin määrä näytettä, joka tarvitaan analyyttistä menetelmää varten

— rajoitus, jonka mukaan pitoisuus ei saa ylittää 0,01 moolia litrassa kummassakaan faasissa.

Tehdään kolme testiä. Ensimmäisessä käytetään laskettua n-oktanolin ja veden tilavuussuhdetta, toisessa suhde puolitetaan ja kolmannessa se kerrotaan kahdella (esimerkiksi 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3 Näyte

Valmistetaan varastoliuos esikyllästämällä n-oktanolia vedellä. Varastoliuoksen pitoisuus määritetään tarkasti juuri ennen liuoksen käyttöä jakaantumiskertoimen määritykseen. Liuosta on pidettävä olosuhteissa, joissa sen stabiliteetti voidaan taata.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Lämpötila on pidettävä vakiona (± 1 °C) alueella 20 — 25 °C.

1.6.2.3 *Mittauksen suorittaminen*

1.6.2.3.1 Jakaantumistasapainon luominen

Jokaista testiolosuhdetta varten valmistetaan kaksi testausastiaa, joissa on tarkasti mitatut määrät kumpaakin liuotinta ja tarpeellinen määrä varastoliuosta.

Mitataan n-oktanolifaasit tilavuuden mukaan. Testausastiat pannaan sopivaan ravistuslaitteeseen tai niitä ravistetaan käsin. Jos käytössä on sentrifugiputki, suositellaan sen kääntämistä nopeasti poikittaisakselillaan 180 astetta, jolloin mahdollisesti loukkuun jäänyt ilma nousee molempien faasien läpi. Käytäntö on osoittanut, että 50:llä tällaisella käännöllä voidaan saavuttaa jakaantumistasapaino. Varmuuden vuoksi suositellaan kuitenkin 100:aa kääntöä viidessä minuutissa.

1.6.2.3.2 Faasierotus

Tarvittaessa faasien erotukseen on käytettävä sentrifugointia. Tämä tehdään laboratoriosentrifugissa huoneenlämmössä. Jos sentrifugissa ei ole termostaattia, sentrifugiputket on pidettävä testilämpötilassa vähintään yhden tunnin ajan ennen analyysia.

1.6.2.4 *Analyysi*

Jakaantumiskertoimen määritystä varten on määritettävä näytteen pitoisuus kummassakin faasissa. Tämä voidaan toteuttaa ottamalla alikvootti kumpaakin faasia kummastakin putkesta testiolosuhdetta kohti ja analysoimalla otokset valitulla menetelmällä. Aineen kokonaismäärä kummassakin faasissa lasketaan ja arvoja verrataan alun perin lisättyyn määrään.

Näytteenotto vesifaasista on tehtävä menetelmällä, joka minimoi n-oktanolin mukaanpääsyn riskin. Poistettavalla neulalla varustettu lasiruisku on hyvä vaihtoehto. Näytteenottoa varten ruisku täytetään osittain ilmalla, joka työnnetään varovasti ulos vietäessä ruisku n-oktanolikerroksen läpi. Tämän jälkeen ruiskuun vedetään sopiva määrä vesifaasia. Ruisku poistetaan nopeasti liuoksesta ja neula irrotetaan. Ruiskun sisältöä voidaan tämän jälkeen käyttää vesinäytteenä. Aineen pitoisuus kummassakin erotetussa faasissa määritetään mieluiten ainekohtaisella menetelmällä. Sopivia analyyttisiä menetelmiä ovat esimerkiksi

— fotometriset menetelmät

— kaasukromatografia

— nestekromatografia (HPLC).

1.6.3 **HPLC-menetelmä**

1.6.3.1 *Valmistelutoimet*

Laite

Menetelmää varten tarvitaan sykkimättömällä pumpulla ja sopivalla ilmaisulaitteella varustettu nestekromatografi, jossa tulisi olla suihkusilmukoilla varustettu suihkuventtiili. Kiinteässä faasissa olevat polaariset ryhmät saattavat vakavasti häiritä HPCL-kolonnin tehokkuutta, minkä vuoksi polaaristen ryhmien määrä kiinteissä faaseissa (1) on minimoitava. Menetelmässä voidaan käyttää kaupallisesti saatavana olevia mikrohiukkas-vastafaasipakkauksia tai valmiiksi pakattuja kolonneja. Ruiskutusjärjestelmän ja analyyttisen kolonnin välissä voidaan pitää suojakolonnia.

Liikkuva faasi

Eluutioliuotin valmistetaan HPLC-laatuisesta metanolista ja HPLC-laatuisesta vedestä. Liuottimelle tehdään kaasunpoisto ennen käyttöä. On käytettävä isokraattista eluutiota. Metanoli-vesiseoksessa on oltava vähintään 25 % vettä. Yleensä seos, jossa on metanolia ja vettä tilavuussuhteessa 3:1, on tyydyttävä log P 6 -yhdisteiden eluoimiseksi yhdessä tunnissa, kun virtausnopeus on 1 ml/min. Jos yhdisteiden log P -arvo on suuri, saattaa olla tarpeen lyhentää eluointiaikaa (myös vertailuaineiden kohdalla) vähentämällä liikkuvan faasin polaarisuutta tai kolonnin pituutta.

Aineilla, jotka liukenevat n-oktanoliin hyvin heikosti, on yleensä poikkeavan alhainen HPLC-menetelmällä saatu log P_{ow} -arvo. Joskus tällaisten yhdisteiden tuottamat kärjet eivät ylitä liuottimen tasoa. Syynä on todennäköisesti se, että jakaantumisprosessi on liian hidas, eikä tasapaino ehdi asettua HPLC-erotteluun normaalisti käytetyssä ajassa. Tulosten luotettavuutta voidaan yleensä parantaa pienentämällä virtausnopeutta tai metanolin ja veden välistä suhdetta.

Näytteiden ja vertailuaineiden liukoisuuden liikkuvaan faasiin on oltava tarpeeksi suuri niiden havaitsemista varten. Vain poikkeustapauksissa voidaan käyttää lisäaineita metanoli-vesiseoksen yhteydessä, koska lisäaineet muuttavat kolonnin ominaisuuksia. Jos käytetään lisäaineita kromatogrammin tuottamiseen, on ehdottomasti käytettävä erillistä, samantyyppistä kolonnia. Jos metanoli-vesiseos ei sovellu tarkoitukseen, voidaan käyttää muita orgaanisen liuottimen ja veden seoksia, esimerkiksi etanoli-vesi- tai asetonitriili-vesiseosta.

Ionisoivien yhdisteiden osalta eluentin pH on kriittinen. Sen on oltava kolonnin pH-alueella, yleensä 2 — 8. Puskurointia suositellaan. On varottava suolan saostumista ja kolonnin huononemista, mitä voi tapahtua eräiden orgaanisten faasi-puskuriseosten yhteydessä. HPLC-mittauksia, joissa piidioksidipohjaisen kiinteän faasin pH on yli 8, ei suositella, koska emäksinen liikkuva faasi voi aiheuttaa kolonnin suorituskyvyn nopeaa huononemista.

Liuokset

Vertailuaineiden on oltava mahdollisimman puhtaita. Testi- ja kalibrointitarkoituksiin käytettävät yhdisteet liuotetaan liikkuvaan faasiin mahdollisuuksien mukaan.

Testiolosuhteet

Mittausten aikana lämpötila saa vaihdella enintään ± 2 K.

1.6.3.2 *Mittaukset*

Viiveen t_o laskeminen

Viive t_0 voidaan määrittää käyttämällä homologista sarjaa (esimerkiksi n-alkyylimetyyliketoneja) tai kolonnin läpi pidättymättä kulkevia orgaanisia yhdisteitä (esimerkiksi tiokarbamidia tai formamidia). Ensimmäistä vaihtoehtoa käytettäessä kolonniin ruiskutetaan vähintään seitsenosainen homologinen sarja ja vastaavat retentiot määritetään. Suoraan saadut retentiot $t_{r(n_c + 1)}$ piirretään ajan $t_{r(n_c)}$ funktiona, ja regressioyhtälön

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

Poikkeama ja kaltevuus b määritetään (n_c = hiiliatomien määrä). Viive t_0 saadaan tämän jälkeen seuraavasta yhtälöstä:

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

Kalibrointikäyrä

Seuraavaksi laaditaan korrelaatiokäyrä, joka esittää soveltuvien vertailuaineiden log k -arvot log P -arvojen funktiona. Tätä varten ruiskutetaan samanaikaisesti sarja, jossa on 5 — 10 vakiovertailuainetta, joiden log P kattaa odotetun alueen. Retentiot on suositeltavaa määrittää ilmaisinjärjestelmään kytketyllä tallentavalla integraattorilla. Käyttökertoimen k vastaavat logaritmit lasketaan ja merkitään käyrään ravistuspullomenetelmällä saatujen log P -arvojen funktiona. Kalibrointi tehdään määrätyin välein, vähintään kerran päivässä, jotta kolonnin suorituskyvyn mahdolliset muutokset voidaan havaita.

Näytteen käyttökertoimen määritys

Näytettä ruiskutetaan mahdollisimman pieneen määrään liikkuvaa faasia. Retentio määritetään kaksi kertaa. Tuloksen perusteella voidaan laskea käyttökerroin k. Näytteen jakaantumiskerroin voidaan interpoloida vertailuaineiden korrelaatiokäyrästä. Jos jakaantumiskerroin on hyvin pieni tai hyvin suuri, on käytettävä ekstrapolointia. Tällöin on erityisesti otettava huomioon regressiosuoran luottamusrajat.

2 TIEDOT

Ravistuspullomenetelmä

Määritettyjen log P -arvojen luotettavuus voidaan tarkistaa vertaamalla kaksoismääritysten keskiarvoa kokonaiskeskiarvoon.

3 RAPORTOINTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet)

— jos menetelmiä ei voida soveltaa (esimerkiksi aineen pinta-aktiivisuuden vuoksi), laskettu arvo tai arvio, joka perustuu yksittäisiin n-oktanoli- tai vesiliukoisuuksiin

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

Ravistuspullomenetelmän osalta:

— alustavan arvioinnin tulos (jos sellainen on tehty)

— määrityslämpötila

— tiedot pitoisuuden määritykseen käytetyistä analyyttisista menetelmistä

— sentrifugointiaika ja -nopeus (jos sentrifugointia on käytetty)

— kummastakin faasista mitatut pitoisuudet (eli raportoidaan yhteensä 12 pitoisuutta) jokaista määritystä kohti

— näytteen paino, yksittäisten testausastioiden faasien tilavuudet ja näytteen laskettu kokonaismäärä jokaisessa faasissa tasapainon saavuttamisen jälkeen

— jakaantumiskertoimen (P) lasketut arvot, keskiarvo ja kaikkien määritysten keskiarvo jokaista testiolosuhdetta kohti. Jos on havaittu merkkejä jakaantumiskertoimen vaihtelusta pitoisuuden mukaan, tästä on oltava maininta raportissa

— yksittäisten P-arvojen keskihajonta keskiarvon suhteen

— kaikkien määritysten P-keskiarvo ilmoitetaan kymmenkantaisena logaritmilukuna

— laskettu teoreettinen P_{ow}, kun tällainen on määritetty tai kun mittausten perusteella saatu arvo on > 10^4

— käytetyn veden ja vesifaasin pH

— jos on käytetty puskureita veden sijasta, on ilmoitettava syy, puskureiden kokoonpano, pitoisuus ja pH sekä vesifaasin pH ennen testiä ja sen jälkeen.

HPLC-menetelmän osalta:

— alustavan arvioinnin tulos (jos sellainen on tehty)

— näytteet ja vertailuaineet sekä niiden puhtausaste

— määritysten lämpötila-alue

— pH, jossa määritykset on tehty

— analyyttisen kolonnin, suojakolonnin, liikkuvan faasin ja ilmaisumenetelmän tiedot

— retentiotiedot ja lähdekirjallisuudesta saadut, kalibroinnissa käytettyjen vertailuaineiden log P -arvot

— regressiosuoran tiedot (log k:n riippuvuus log P:stä)

— retentiotietojen keskiarvo ja näytteen interpoloitu log P -arvo

— laitteen ja käyttöolosuhteiden kuvaus

— eluointiprofiilit

— kolonniin pantujen näytteiden ja vertailuaineiden määrät

— viiveet ja niiden mittaustavat.

4 VIITTEET

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

(2) C. Hansch and A. J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A. J. Leo, dir.) - Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström and K. Dundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219 (1981).

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W. E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

(8) J. E. Haky and A. M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (édité par E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223-339.

(11) R. F. Rekker and H. M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(13) R. F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.

(15) C. V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev, 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A. Leo, S. H. Unger, K. H. Kim, D. Nikaitani and E. J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.

(18) W. B. Neely, D. R. Branson and G. E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.

(19) D. S. Brown and E. W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J. K. Seydel and K. J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.

(22) Y. C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel, 1978.

(23) N. S. Nirrlees, S. J. Noulton, C. T. Murphy, P. J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

Liite 1

Laskenta- ja arviointimenetelmät

JOHDANTO

Julkaisussa *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (a) on yleinen johdatus aiheeseen (laskentamenetelmiä, tietoja ja esimerkkejä).

Laskettuja P_{ow}-arvoja voidaan käyttää seuraviin tarkoituksiin:

— päättäminen soveltuvasta kokeellisesta menetelmästä (ravistuspullomenetelmän alue: log P_{ow}: -2...4, HPLC-menetelmän alue: log P_{ow}: 0...6)

— sopivien testiolosuhteiden (esimerkiksi HPLC-menetelmän vertailuaineiden ja ravistuspullomenetelmän n-oktanoli-vesisuhteen) valinta

— laboratorion sisäiset tarkistukset menetelmävirheiden löytämiseksi

— P_{ow}-arvion antaminen tapauksissa, joissa kokeellisia menetelmiä ei voida soveltaa teknisistä syistä.

ARVIOINTIMENETELMÄ

Jakaantumiskertoimen alustava arviointi

Jakaantumiskertoimen arvo voidaan arvioida näytteen liukoisuudesta puhtaisiin liuottimiin, joka voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$P_{arvio} = \frac{\text{kyllästys } c_{n\text{-oktanoli}}}{\text{kyllästys } c_{vesi}}$$

LASKENTAMENETELMÄT

Laskentamenetelmien periaate

Kaikki laskentamenetelmät perustuvat molekyylin muodolliseen fragmentointiin sopiviin alarakenteisiin, joille on tiedossa luotettavat log P_{ow} -differentiaalit. Koko molekyylin log P_{ow} -arvo voidaan tämän jälkeen laskea fragmenttiarvojensa summana lisättynä korjaustermeillä, jotka perustuvat molekyylin sisäisiin vuorovaikutuksiin.

Luettelot fragmenttivakioista ja korjaustermeistä on saatavana lähteistä (b), (c), (d) ja (e). Joitakin niistä päivitetään säännöllisesti.

Laatukriteerit

Yleisesti ottaen laskentamenetelmien luotettavuus heikkenee tutkittavan yhdisteen monimutkaisuuden kasvaessa. Kun tutkitaan yksinkertaisia molekyyleja, joilla on alhainen molekyylipaino ja yksi tai kaksi funktionaalista ryhmää, voidaan odottaa, että poikkeama fragmentaatiomenetelmien ja mitatun arvon välillä on 0,1 — 0,3 log P_{ow} -yksikköä. Kun käsitellään monimutkaisempia molekyyleja, virhemarginaali voi olla tät suurempi. Tämä vaihtelee fragmenttivakioiden luotettavuuden ja saatavuuden mukaan sekä sen mukaan, miten hyvin molekyylin sisäiset vuorovaikutukset (esimerkiksi vetysidokset) ovat tunnistettavissa ja miten hyvin korjaustermejä osataan käyttää (ongelma pienenee käytettäessä tietokoneohjelmaa CLOGP-3) (b). Kun käsitellään ionisoivia yhdisteitä, on tärkeää, että lataus tai ionisointiaste otetaan huomioon oikealla tavalla.

Laskentamenetelmät

Hanschin Π-menetelmä

Alkuperäinen hydrofobinen substituenttivakio, π, jonka ovat esittäneet Fujita et al. (f), määritetään seuraavasti:

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

jossa P_{ow} (PhX) on aromaattisen johdannaisen jakaantumiskerroin ja P_{ow} (PhH) on emoyhdisteen jakaantumiskerroin. Esimerkki:

$$(\pi_{Cl} = \log P_{ow}(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}(C_6H_6)$$

$$= 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71).$$

Tämän määritelmän mukaan p-menetelmä soveltuu lähinnä aromaattiseen substituutioon. p-arvot suurelle määrällä substituentteja on yhdistetty taulukkomuotoon (b), (c), (d). Arvoja käytetään aromaattisten molekyylien tai alarakenteiden log P_{ow} -arvojen laskentaan.

Rekker-menetelmä

Rekkerin mukaan (g) log P_{ow} -arvo lasketaan seuraavasti:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{vuorovaikutustermit})$$

jossa f_i edustaa eri molekyylifragmenttivakioita ja a_i niiden esiintymistaajuutta tutkittavassa molekyylissa. Korjaustermit voidaan esittää yhden ainoan vakion C_m integraalikerrannaisina (niin sanottuna maagisena vakiona). Fragmenttivakiot f_i ja C_m on määritetty 1 054 kokeellista P_{ow}-arvoa (825 yhdistettä) sisältävän luettelon perusteella moninkertaista regressioanalyysiä (c), (h) käyttäen. Vuorovaikutustermin määritys tehdään lähdekirjallisuudessa kuvatun säännöstön mukaan (e), (h), (i).

Hansch-Leon menetelmä

Hanschin ja Leon mukaan (c) log P_{ow} lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan:

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

jossa f_i edustaa eri molekyylifragmenttivakioita, F_j korjaustermejä ja a_i, b_j vastaavia esiintymistaajuuksia. Yrityksen ja erehdyksen kautta on koottu kokeellisista P_{ow}-arvoista johdettujen atomien ja ryhmien fragmenttiarvojen luettelo sekä korjaustermien F_j (niin sanottujen kertoimien) luettelo. Korjaustermit on jaettu useaan eri luokkaan (a), (c). Kaikkien näiden sääntöjen ja korjaustermien huomioonottaminen on melko monimutkaista ja hidasta. Tehtävää helpottavat markkinoilla myytävät erikoisohjelmat (b).

Yhdistetty menetelmä

Monimutkaisten molekyylien P_{ow}-laskentaa voidaan helpottaa huomattavasti jakamalla molekyylit suurehkoihin alarakenteisiin, joille on saatavana luotettavia P_{ow} -arvoja joko taulukoista (b), (c) tai omista mittauksista. Tällaiset fragmentit (esimerkiksi heterosykliset renkaat, antrakinoni ja atsobentseeni) voidaan sen jälkeen yhdistää Hanschin Π-arvoihin tai Rekkerin tai Leon fragmenttivakioihin.

Huomautuksia

i) Laskentamenetelmiä voidaan soveltaa vain osittain tai kokonaan ionisoituihin yhdistelmiin, edellyttäen, että tarpeelliset korjauskertoimet voidaan ottaa huomioon.

ii) Jos voidaan olettaa, että molekyylin sisällä on vetysidoksia, on lisättävä vastaavat korjaustermit (noin + 0,6...+ 0,1 log P_{ow} -yksikköä). Indikaatiot vetysidosten olemassaolosta saadaan stereomalleista tai molekyylin spektroskooppisista tiedoista.

iii) Jos useat tautomeeriset muodot ovat mahdollisia, todennäköisintä muotoa käytetään laskennan perustana.

iv) Fragmenttivakioluetteloiden päivityksiä on seurattava huolella.

Raportti

Kun käytetään laskenta- tai arviointimenetelmiä, testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen kuvaus (seos, epäpuhtaudet jne.)

— indikaatiot mahdollisten vetysidosten olemassaolosta, dissosiaatiosta, latauksesta tai muista epätavallisista ilmiöistä (esimerkiksi tautomeria)

— laskentamenetelmän kuvaus

— tietokannan nimi tai lähde

— fragmenttivalinnan erikoispiirteitä

— yksityiskohtainen selvitys laskennasta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(a) W. J. Lyman, W. F. Reehl and D. H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A. J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(e) R. F. Rekker, H. M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. - Chim Ther., 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175

(g) R. F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.

(h) C. V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(i) R. A. Scherrer, ACS - American Chemical Society, Washington, D. C. 1984, Symposium Series 255, p. 225.

Liite 2

Suositeltavia vertailuaineita HPLC-menetelmää varten

Nro	Vertailuaine	log P_{ow}	pKa
1	2-butanoni	0,3	
2	4-asetyylipyridini	0,5	
3	Aniliini	0,9	
4	Asetanilidi	1,0	
5	Bentsyylialkoholi	1,1	
6	p-metoksifenoli	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoksietikkahappo	1,4	pKa = 3,12
8	Fenoli	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenoli	1,5	pKa = 3,96
10	Bentsonitriili	1,6	
11	Fenyyliasetonitriili	1,6	
12	4-metyylibentsyylialkoholi	1,6	
13	Asetofenoni	1,7	
14	2-nitrofenoli	1,8	pKa = 7,17
15	3-nitrobentsoehappo	1,8	pKa = 3,47
16	4-kloorianiliini	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobentseeni	1,9	
18	Kanelihappo	1,9	
19	Bentsoehappo	1,9	pKa = 4,19
20	p-kresoli	1,9	pKa = 10,17
21	Kanelihappo	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisoli	2,1	
23	Metyylibentsoaatti	2,1	
24	Bentseeni	2,1	
25	3-metyylibentsoehappo	2,4	pKa = 4,27
26	4-klorofenoli	2,4	pKa = 9,1
27	Trikloroetyleeni	2,4	
28	Atrasiini	2,6	
29	Etyylibentsoaatti	2,6	
30	2,6-diklorobentsonitriili	2,6	
31	3-klorobentsoehappo	2,7	pKa = 3,82
32	Tolueeni	2,7	
33	1-naftoli	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dikloroanilini	2,8	
35	Klorobentseeni	2,8	
36	Allyylifenyylieetteri	2,9	
37	Bromobentseeni	3,0	
38	Etyylibentseeni	3,2	
39	Bentsofenoni	3,2	
40	4-fenyylifenoli	3,2	pKa = 9,54
41	Tymoli	3,3	
42	1,4-diklorobentseeni	3,4	
43	Difenyyliamiini	3,4	pKa = 0,79
44	Naftaleeni	3,6	
45	Fenyylibentsoaatti	3,6	
46	Isopropyylibentseeni	3,7	
47	2,4,6-trikloorifenoli	3,7	pKa = 6
48	Bifenyyli	4,0	
49	Bentsyylibentsoaatti	4,0	
50	2,4-dinitro-6 sek. butyylifenol	4,1	
51	1,2,4-triklooribentseeni	4,2	
52	Dodekaanihappo	4,2	
53	Difenyylieetteri	4,2	
54	n-butyylibentseeni	4,5	
55	Fenantreeni	4,5	
56	Fluoranteeni	4,7	
57	Dibentsyyli	4,8	
58	2,6-difenyylipyridiini	4,9	
59	Trifenyyliamiini	5,7	
60	DDT	6,2	
	Muita vertailuaineita, joilla on pieni log P_{ow} -arvo		
1	Nikotiinihappo	-0,07	

A.9 LEIMAHDUSPISTE

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää tutkittavan aineen syttyvyys ennen testauksen aloittamista. Testimenetelmää voidaan soveltaa nestemäisiin aineisiin, joiden höyryt ovat sytytettävissä sytytyslähteen avulla. Tässä luetellut testimenetelmät ovat luotettavia vain menetelmien yhteydessä mainituilla leimahduspistealueilla.

Menetelmän valinnassa on otettava huomioon mahdolliset kemialliset reaktiot tutkittavan aineen ja näytteenpitimen välillä.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Leimahduspiste on alin lämpötila, korjattuna 101,325 kPa:n paineeseen, jossa neste testimenetelmässä kuvatuissa olosuhteissa muodostaa niin paljon höyryä, että testausastiassa muodostuu syttyvä höyryn ja ilman seos.

Yksiköt: °C

$t = T - 273{,}15$

(t annetaan Celsius-asteina ja T kelvineinä)

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Näyte pannaan testausastiaan ja se kuumennetaan tai jäähdytetään testilämpötilaan testimenetelmän ohjeiden mukaan. Tämän jälkeen selvitetään syttymiskokeiden avulla, leimahtaako näyte testilämpötilassa vai ei.

1.5 LAATUKRITEERIT

1.5.1 **Toistettavuus**

Toistettavuus vaihtelee leimahduspistealueen ja testimenetelmän mukaan. Maksimiarvo on 2 °C.

1.5.2 **Herkkyys**

Herkkyys vaihtelee testimenetelmän mukaan.

1.5.3 **Spesifisyys**

Joidenkin testimenetelmien spesifisyys rajoittuu määrättyyn leimahduspistealueeseen ja vaihtelee aineen ominaisuuksien (esimerkiksi viskositeetin) mukaan.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelutoimet**

Näyte asetetaan laitteeseen kohdan 1.6.3.1 tai 1.6.3.2. mukaan.

Turvallisuussyistä suositellaan, että voimakkaasti reagoivien tai myrkyllisten aineiden kohdalla valitaan menetelmä, jossa näyte on pieni, noin 2 cm^3.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Turvallisuusmääräysten mukaan laite on pidettävä paikassa, jossa ei ole vetoa.

1.6.3 **Työjärjestys**

1.6.3.1 *Tasapainomenetelmä*

Katso seuraavia standardeja: ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2 *Tasapainottomuusmenetelmä*

Abelin laite:

Katso seuraavia standardeja: BS 2000 osa 170, NF M07.011, NF T66-009.

Abel-Penskyn laite:

Katso seuraavia standardeja: EN 57, DIN 51755 osa 1 (lämpötila-alue 5 — 65 °C), DIN 51755 osa 2 (lämpötilat alle 5 °C), NF M07-036.

Tagin laite:

Katso standardia ASTM D 56.

Pensky-Martensin laite:

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

Huomautuksia:

Jos kohdan 1.6.3.2 mukaisen tasapainottomuusmenetelmän tuloksena saadaan leimahduspiste, joka on 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C tai 55 ± 2 °C, tulos on vahvistettava tasapainomenetelmän avulla samaa laitetta käyttäen.

Ilmoituskelpoisia ovat vain sellaiset menetelmät, joilla saadaan leimahduspisteen lämpötila.

Nesteiden, jotka sisältävät liuotinta ja joiden viskositeetti on suuri (esimerkiksi maalien ja kumien) leimahduspisteen määritykseen saa käyttää ainoastaan laitteita ja testimenetelmiä, jotka soveltuvat suuren viskositeetin omaavien nesteiden leimahduspisteen määritykseen.

Katso seuraavia standardeja: ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 osa 1.

2 **TIEDOT**

3 **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet)

— käytetty menetelmä ja mahdolliset poikkeamat

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4 **VIITTEET**

Viitteitä ei ole.

A.10 SYTTYVYYS (KIINTEÄT AINEET)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää tutkittavan aineen mahdolliset räjähtävät ominaisuudet ennen testiä.

Testimenetelmää tulee soveltaa vain jauhemaisiin, rakeisiin tai pastamaisiin aineisiin.

Koska ei ole käytännöllistä testata kaikkia syttyviä aineita, vaan vain sellaisia, jotka palavat nopeasti tai joiden palamisominaisuudet ovat joltakin osalta erityisen vaaralliset, herkästi syttyväksi aineeksi luokitellaan vain sellaiset, joiden palamisnopeus ylittää määrätyn raja-arvon.

Hehku, joka etenee metallijauheessa, voi olla erityisen vaarallinen palon sammutusvaikeuksien vuoksi. Metallijauheita on pidettävä herkästi syttyvinä, jos hehku etenee niissä massan läpi määrätyssä ajassa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Palamisaika sekunteina.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Aine muotoillaan yhteneväksi nauhaksi tai jauhelinjaksi, jonka pituus on noin 250 mm. Alustavan seulontatestin avulla määritetään, eteneekö kyteminen tai liekki, kun aine sytytetään kaasuliekillä. Jos liekki tai kyteminen etenee yli 200 mm annetun ajan kuluessa, aineen palamisnopeus määritetään kattavan testiohjelman avulla.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritetty.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Alustava seulontatesti**

Aine muotoillaan yhteneväksi nauhaksi tai jauhelinjaksi, jonka pituus on noin 250 mm, leveys 20 mm ja korkeus 10 mm, palamattomalle, ei-huokoiselle ja heikosti lämpöä johtavalle alustalle.

Kaasupolttimen kuumaa liekkiä (vähimmäishalkaisija 5 mm) pidetään jauhelinjan toisessa päässä, kunnes jauhe syttyy tai enintään 2 minuuttia (5 minuuttia metallien ja metalliseosten kohdalla). Seurataan, eteneekö palaminen 200 mm linjaa pitkin 4 minuutin testijakson aikana (40 minuuttia metallijauheiden kohdalla). Jos aine ei syty eikä liekki tai kyteminen etene 200 mm:ä 4 minuutin testijakson aikana (40 minuuttia metallijauheiden kohdalla), ainetta ei pidetä herkästi syttyvänä, eikä lisätestausta tarvita. Jos aineen palaminen etenee jauhelinjaa pitkin 200 mm alle 4 minuutissa (tai alle 40 minuutissa metallijauheiden kohdalla), testausta on jatkettava jäljempänä kuvatun menetelmän mukaan (jatka kohdasta 1.6.2).

1.6.2 **Palamisnopeuden testaus**

1.6.2.1 *Valmistelutoimet*

Jauhemaista tai rakeista ainetta pannaan kevyelti 250 mm pitkään muottiin, jonka kolmionmuotoisen läpileikkauksen sisäkorkeus on 10 mm ja leveys 20 mm. Muotin pituussuunnassa on molemmille sivuille kiinnitetty kaksi metallilevyä siten, että levyjen yläreuna on 2 mm muotin reunan yläpuolella (katso kuvaa). Muotti pudotetaan kolme kertaa 2 cm:n korkeudelta kiinteälle pinnalle. Tarvittaessa ainetta lisätään muottiin. Tämän jälkeen sivulevyt poistetaan ja ylimääräinen aines kaavitaan pois. Muotille asetetaan palamaton, ei-huokoisesta ja heikosti lämpöä johtavasta aineesta valmistettu aluslevy, laite käännetään ja muotti poistetaan.

Pastamaiset aineet levitetään nauhana, jonka pituus on 250 mm ja läpileikkaus noin 1 cm^2, palamattomalle, ei-huokoiselle ja lämpöä heikosti johtavalle alustalle.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Jos aine on herkkä kosteudelle, testi on tehtävä mahdollisimman pian aineen säilöstä ottamisen jälkeen.

1.6.2.3 *Työjärjestys*

Aseta näyte vetokaappiin.

Veto on säädettävä sellaiseksi, ettei laboratoriotiloihin pääse savua. Vedon voimakkuus ei saa vaihdella testin aikana. Laitteen ympärille pystytetään suojaseinä vetoa vastaan.

Näytenauha sytytetään toisesta päästä kaasupolttimen kuumalla liekillä, jonka halkaisija on vähintään 5 mm. Kun palaminen on edennyt 80 mm:n verran, mitataan palamisnopeus seuraavalla 100 mm:n osuudella. Testi tehdään kuusi kertaa käyttäen aina puhdasta ja kylmää alustaa, ellei positiivista tulosta saavuteta aiemmin.

2 **TIEDOT**

Arvioinnissa käytetään alustavasta seulontatestistä saatua palamisaikaa (1.6.1) ja enintään kuudesta testistä saatua lyhyintä palamisaikaa (1.6.2.3).

3 **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet)

— testattavan aineen kuvaus, sen fysikaalinen olomuoto ja kosteuspitoisuus

— tulokset alustavasta seulonta- ja palamisnopeustestistä, jos tällaiset on tehty

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Jauhemaisia, rakeisia tai pastamaisia aineita pidetään herkästi syttyvinä, jos niiden palamisaika minkä tahansa kohdassa 1.6.2 kuvatun testin tuloksena on lyhyempi kuin 45 sekuntia. Metalli- tai metalliseosjauheita pidetään herkästi syttyvinä, jos ne voidaan sytyttää ja liekin tai reaktioalueen leviäminen koko näytteeseen kestää enintään kymmenen minuuttia.

4 **VIITTEET**

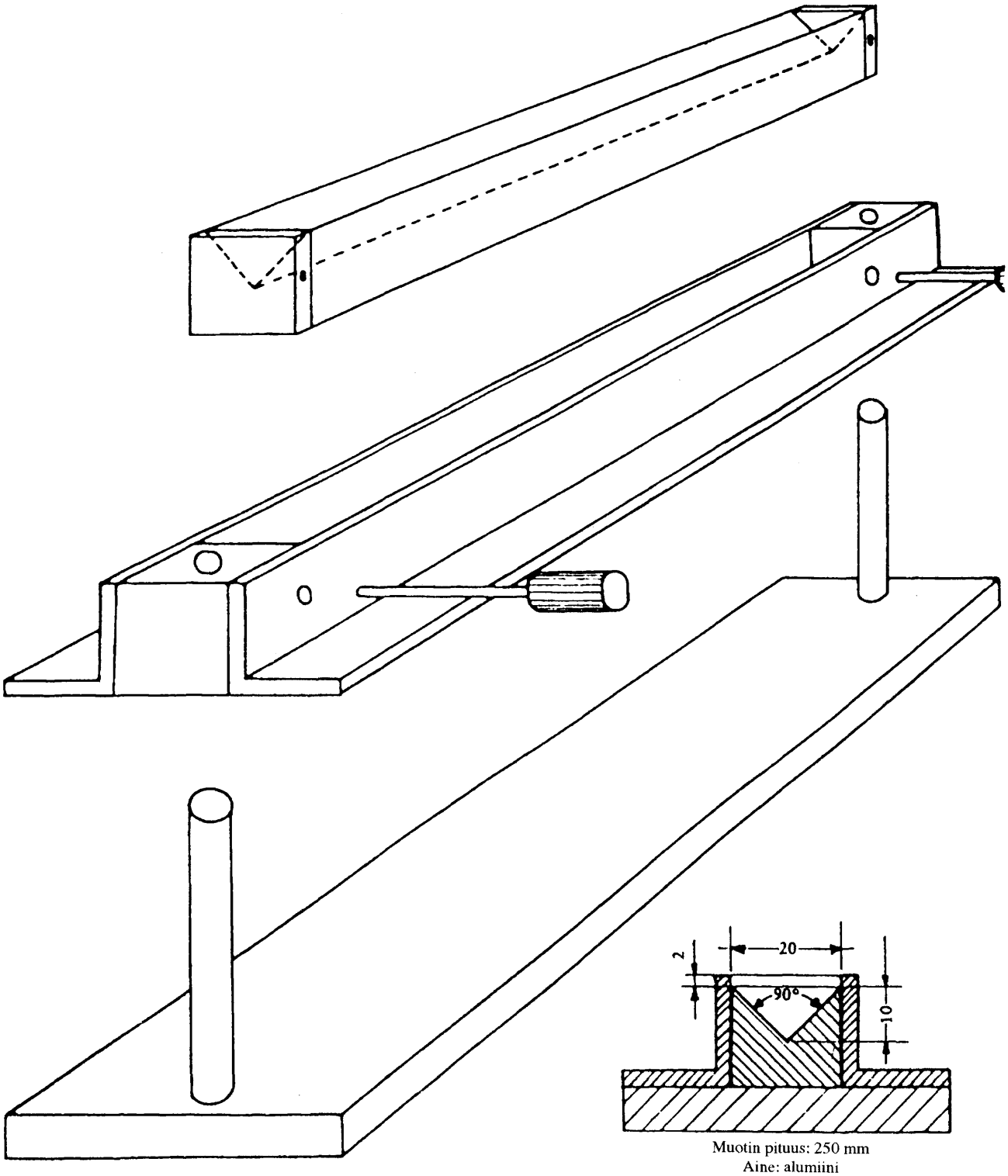
(1) NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

Liite

Kuva

Muotti ja tarvikkeet näytteen valmistelua varten

(Kaikki mitat ovat millimetreinä)



Muotin pituus: 250 mm
Aine: alumiini

A.11 SYTTYVYYS (KAASUT)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä voidaan määrittää pitoisuusalueet, joilla ilma-kaasuseos syttyy huoneenlämpötilassa (noin 20 °C:ssa) ja normaalissa ilmanpaineessa. Tutkittavan kaasun ja ilman seoksia altistetaan kaasupitoisuuksia suurentaen sähkökipinälle ja tarkkaillaan, syttyykö seos vai ei.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Syttyvyysalue on alimman ja ylimmän räjähdysrajan välinen pitoisuusalue. Alin ja ylin räjähdysraja ovat ne syttyvän kaasun ja ilman seoksen pitoisuudet, joissa ei synny leimahdusta.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Ilman kaasupitoisuutta suurennetaan asteittain ja jokaisen vaiheen pitoisuuden seos altistetaan sähkökipinälle.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritetty.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Laite**

Testausastia on pystysuora lasisylinteri, jonka sisähalkaisija on vähintään 50 mm ja korkeus vähintään 300 mm. Sytytyselektrodit sijaitsevat 3 — 5 mm:n etäisyydellä toisistaan ja 60 mm:n korkeudella sylinterin pohjasta. Sylinterissä on paineentasausaukko. Laitteen ympärillä on oltava suoja mahdollisten räjähdysvahinkojen estämiseksi.

Kipinälähteenä käytetään 0,5 sekunnin induktiokipinää, joka saadaan korkeajännitemuuntajasta, jonka lähtöjännite on 10 — 15 kV (tehontarve enintään 300 W). Esimerkki soveltuvasta laitteesta on viitteessä (2).

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Testi tehdään huoneenlämpötilassa (noin 20 °C:ssa).

1.6.3 **Työjärjestys**

Lasisylinteriin pumpataan annostuspumpulla kaasu-ilmaseosta, jonka pitoisuus tunnetaan. Seoksen läpi johdetaan kipinä ja liekin mahdollista irtaantumista kipinälähteestä sekä sen itsenäistä etenemistä tarkkaillaan. Kaasupitoisuutta muutetaan yhden tilavuusprosentin askelin, kunnes syttyminen tapahtuu edellä kuvatulla tavalla.

Jos kaasun kemiallisen rakenteen perusteella voidaan olettaa, että kaasu ei ole syttyvää, ja kaasun ja ilman seoksen stökiometrinen koostumus voidaan testata 1 %:n askelin, tarvitsee testata vain seokset, joiden pitoisuus on enintään 10 % suurempi tai pienempi kuin tämä koostumus.

2 TIEDOT

Määrityksen ainoa merkitsevä tieto on liekin eteneminen.

3 RAPORTOINTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet)

— käytetyn laitteen kuvaus mittatietoineen

— testilämpötila

— testatut pitoisuudet ja saadut tulokset

— testin tulos: syttyvä kaasu tai herkästi syttyvä kaasu

— jos kaasu todetaan syttymättömäksi, on ilmoitettava, millä pitoisuusalueella kaasua on testattu 1 %:n askelin

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4 VIITTEET

(1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. "Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen". Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 2, 126 — 127.

A.12 SYTTYVYYS (KOSKETUS VEDEN KANSSA)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä testimenetelmällä voidaan määrittää, kehittääkö testattava aine veden tai kostean ilman kanssa kosketuksiin joutuessaan vaarallisia määriä kaasua tai kaasuja, jotka voivat olla herkästi syttyviä.

Testimenetelmää voidaan soveltaa sekä kiinteisiin että nestemäisiin aineisiin. Menetelmää ei voi soveltaa aineisiin, jotka syttyvät itsestään joutuessaan kosketuksiin ilman kanssa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Herkästi syttyviä ovat aineet, jotka veden tai kostean ilman kanssa kosketuksiin joutuessaan muodostavat vaarallisia määriä herkästi syttyviä kaasuja miniminopeudella 1 l/kg/h.

1.3 MENETELMÄN PERIAATE

Ainetta testataan jäljempänä kuvatun vaiheittaisen sarjan mukaan. Jos syttymistä esiintyy, sarjaa ei tarvitse jatkaa. Jos tiedetään, että aine ei reagoi voimakkaasti veden kanssa, voidaan edetä vaiheeseen 4 (1.3.4).

1.3.1 **Vaihe 1**

Näyte pannaan kaukaloon, jossa on 20 °C:sta tislattua vettä. Todetaan, syttyykö muodostunut kaasu vai ei.

1.3.2 **Vaihe 2**

Näyte pannaan suodatinpaperille, joka kelluu 20-celsiusasteisen tislatun veden pinnalla sopivassa astiassa. Todetaan, syttyykö muodostunut kaasu vai ei. Suodatinpaperia tarvitaan vain pitämään näyte koossa mahdollisen syttymisen helpottamiseksi.

1.3.3 **Vaihe 3**

Näyte muotoillaan keoksi, jonka korkeus on noin 2 cm ja läpimitta noin 3 cm. Keolle kaadetaan muutama tippa vettä, ja todetaan, syttyykö muodostunut kaasu vai ei.

1.3.4 **Vaihe 4**

Näytettä sekoitetaan 20-celsiusasteiseen tislattuun veteen ja kaasun muodostumisnopeus mitataan tunnin välein seitsemän tunnin ajan. Jos muodostumisnopeus on epäsäännöllinen tai kasvava seitsemän tunnin jälkeen, mittausaika voidaan pidentää enintään viideksi päiväksi. Testi voidaan keskeyttää, jos nopeus missä tahansa vaiheessa ylittää arvon 1 l/kg/h.

1.4 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritetty.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

1.6.1 **Vaihe 1**

1.6.1.1 *Testiolosuhteet*

Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa).

1.6.1.2 *Työjärjestys*

Pieni määrä näytettä, jonka läpimitta on noin 2 mm, pannaan tislattua vettä sisältävään kaukaloon. Todetaan, (i) muodostuuko kaasua ja (ii) syttyykö kaasu. Jos kaasu syttyy, testiä ei tarvitse jatkaa, koska aine luokitellaan tällöin vaaralliseksi.

1.6.2 **Vaihe 2**

1.6.2.1 *Laite*

Sopivassa astiassa, esimerkiksi 100 ml:n haihdutusastiassa, pidetään 20-celsiusasteista tislattua vettä. Veden pinnalla kelluu suodatinpaperi.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa).

1.6.2.3 *Työjärjestys*

Pieni määrä näytettä (läpimitta noin 2 mm) asetetaan suodatinpaperin keskelle. Todetaan, (i) muodostuuko kaasua ja (ii) syttyykö kaasu. Jos kaasu syttyy, testausta ei tarvitse jatkaa, koska aine luokitellaan tällöin vaaralliseksi.

1.6.3 **Vaihe 3**

1.6.3.1 *Testiolosuhteet*

Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa).

1.6.3.2 *Työjärjestys*

Näyte muotoillaan keoksi, jonka korkeus on noin 2 cm ja läpimitta noin 3 cm. Keon huipulle tehdään kuoppa, johon kaadetaan muutama tippa vettä. Todetaan, (i) muodostuuko kaasua ja (ii) syttyykö kaasu. Jos kaasu syttyy, testausta ei tarvitse jatkaa, koska aine luokitellaan tällöin vaaralliseksi.

1.6.4 **Vaihe 4**

1.6.4.1 *Laite*

Laite rakennetaan kuvan mukaisesti.

1.6.4.2 *Testiolosuhteet*

Katsotaan, onko näytesäiliössä jauhetta (hiukkaskoko < 500 µm). Jos tällaisen jauheen paino-osuus ylittää 1 % tai jos näyte on murenevaa, koko näyte on jauhettava ennen testausta, jotta hiukkaskoko olisi pienempi varastoinnin ja käsittelyn aikana. Muuten näytettä testataan vastaanotetussa muodossa. Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa) ja yhden ilmakehän paineessa.

1.6.4.3 *Työjärjestys*

Laitteen tiputussuppiloon kaadetaan 10 — 20 ml vettä ja erlenmeyerpulloon pannaan 10 g näytettä. Muodostuneen kaasun tilavuus voidaan mitata millä tahansa sopivalla menetelmällä. Tiputussuppilon hana avataan ja samalla käynnistetään sekuntikello. Kaasunmuodostus mitataan kerran tunnissa seitsemän tunnin ajan. Jos muodostumisnopeus on epäsäännöllinen tai kasvava seitsemän tunnin jälkeen, mittausaikaa voidaan pidentää enintään viideksi päiväksi. Testi voidaan keskeyttää, jos nopeus ylittää arvon 1 l/kg/h missä tahansa vaiheessa. Testi tehdään kolme kertaa.

Jos kaasun kemiallista koostumusta ei tunneta, kaasu on analysoitava. Jos kaasu sisältää herkästi syttyviä osia eikä tiedetä, onko koko seos herkästi syttyvä, on valmistettava koostumukseltaan samanlainen seos, joka testataan menetelmän A.11 mukaisesti.

2 TIEDOT

Aine katsotaan vaaralliseksi, jos:

— se syttyy itsestään testin jossakin vaiheessa, tai

— jos syttyvää kaasua muodostuu nopeudella, joka ylittää arvon 1 l/kg/h.

3 RAPORTOINTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet)

— selvitys mahdollisista aineen valmistelutoimista

— testitulokset (vaiheet 1, 2, 3 ja 4)

— muodostuneen kaasun kemiallinen koostumus

— kaasun muodostumisnopeus, jos vaihe 4 suoritetaan (1.6.4)

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4 VIITTEET

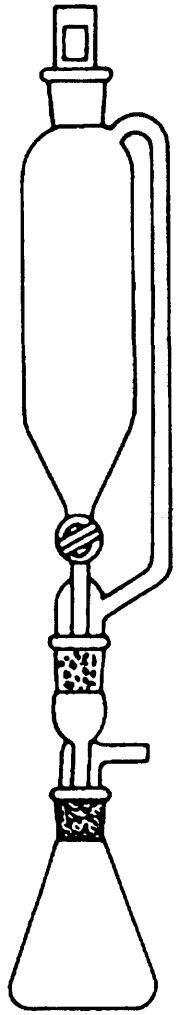
(1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

Liite

Kuva

Laite



A.13 KIINTEIDEN AINEIDEN JA NESTEIDEN ITSESYTTYVYYS

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Testimenetelmää voidaan soveltaa kiinteisiin ja nestemäisiin aineisiin, jotka pieninä määrinä syttyvät itsestään nopeasti jouduttuaan kosketuksiin huoneenlämpöisen (20 °C) ilman kanssa.

Testimenetelmä ei kata aineita, jotka syttyvät vain siinä tapauksessa, että niitä pidetään huoneenlämpöisessä ilmassa useita tunteja tai päiviä tai jos lämpötilaa korotetaan.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Aine luokitellaan itsestään syttyväksi, jos se syttyy tai aiheuttaa hiiltymistä kohdassa 1.6. kuvatuissa olosuhteissa.

Nesteiden itsesyttyvyyden testauksessa voidaan myös tarvita menetelmää A.15 Itsesyttymislämpötila (nesteet ja kaasut).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Näyte (kiinteä tai nestemäinen) pannaan inertille alustalle ja saatetaan kosketuksiin huoneenlämpöisen ilman kanssa viideksi minuutiksi. Jos neste ei syty tässä ajassa, se imeytetään suodatinpaperiin ja pannaan huoneenlämpöiseen (20 °C) ilmaan viideksi minuutiksi. Jos kiinteä aine tai neste syttyy tai jos neste sytyttää suodatinpaperin tai aiheuttaa sen hiiltymisen, aine luokitellaan itsestään syttyväksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Toistettavuus: koska itsesyttyvyysominaisuus on tärkeä turvallisuustekijä, yksi positiivinen tulos riittää aineen luokittelemiseksi itsestään syttyväksi.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

1.6.1 **Laite**

Posliinikuppiin, jonka läpimitta on noin 10 cm, pannaan noin 5 mm:n kerros huoneenlämpöistä (noin 20 °C) piimaata.

Huomautus:

Piimaa tai muu vastaava inertti, yleisesti saatavilla oleva aine katsotaan esimerkiksi aineesta, johon testattavaa ainetta voi kaataa vahingon sattuessa.

Kuivaa suodatinpaperia tarvitaan sellaisten nesteiden testaukseen, jotka inertillä alustalla pidettyinä eivät syty joutuessaan ilman kanssa kosketuksiin.

1.6.2 **Testin suorittaminen**

a) *Jauhemaiset kiinteät aineet*

1 — 2 cm^3 testattavaa jauhetta kaadetaan noin 1 m:n korkeudelta palamattomalle alustalle. Samalla tarkkaillaan, syttyykö aine palamaan pudotessaan tai viiden minuutin kuluessa alustalle asettumisesta.

Ellei syttymistä tapahdu, koe tehdään kuusi kertaa.

b) *Nesteet*

Noin 5 cm^3 testattavaa nestettä kaadetaan preparoituun posliinikuppiin. Samalla tarkkaillaan, syttyykö neste viiden minuutin kuluessa.

Ellei neste syty kuuden kokeen aikana, jatketaan seuraavilla kokeilla:

0,5 ml näytenestettä annostellaan ruiskusta suodatinpaperille. Samalla tarkkaillaan, syttyykö suodatinpaperi palamaan tai hiiltyykö se viiden minuutin kuluessa nesteen lisäyksen jälkeen. Ellei syttymistä tai hiiltymistä tapahdu, testi tehdään kolme kertaa.

2 **TIEDOT**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Testi voidaan keskeyttää heti kun mistä tahansa testin osasta saadaan myönteinen tulos.

2.2 ARVIOINTI

Jos aine syttyy viiden minuutin kuluessa siitä, kun sitä on pantu inertille alustalle ja saatettu kosketuksiin ilman kanssa, tai jos neste sytyttää suodatinpaperin tai aiheuttaa sen hiiltymisen viiden minuutin kuluessa, aine luokitellaan itsestään syttyväksi.

3 **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet)

— testitulokset

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4 **VIITTEET**

(1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and Criteria, 1990, United Nations, New York.

A.14 RÄJÄHTÄVYYS

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Menetelmä koostuu testiohjelmasta, jonka avulla voidaan määrittää, onko kiinteä tai pastamainen aine räjähdysaltis, kun se altistetaan liekille (lämpöherkkyys) tai iskulle tai kitkalle (mekaaninen herkkyys) ja onko neste räjähdysaltis, kun se altistetaan liekille tai iskulle.

Menetelmä on kolmiosainen:

a) lämpöherkkyyden testaus (1)

b) iskuherkkyyden testaus (1)

c) kitkaherkkyyden testaus (1).

Menetelmän avulla voidaan selvittää todennäköisyys sille, että aine räjähtää, kun se altistetaan määrätyille tavallisille ärsykkeille. Menetelmää ei ole tarkoitettu käytettäväksi sen selvittämiseen, voiko aine yleensä räjähtää.

Menetelmällä voidaan määrittää, liittyykö aineeseen lämpöherkkyydestä ja mekaanisesta herkkyydestä aiheutuvaa räjähdysvaaraa direktiivin kuvaamissa erikoisolosuhteissa. Menetelmä perustuu joukkoon laitetyyppejä, joita käytetään yleisesti monissa maissa (1) ja joilla yleensä saadaan selkeitä tuloksia. Todettakoon, että menetelmä ei ole lopullinen. Myös muita laitteita voidaan käyttää, edellyttäen, että ne ovat kansainvälisesti tunnustettuja ja että tulokset ovat riittävän hyvin korreloitavissa.

Testiä ei tarvitse suorittaa, jos käytettävissä olevien termodynaamisten tietojen (esimerkiksi muodostumis- tai hajoamislämmön) tai määrättyjen reaktiivisten ryhmien (2) rakennekaavasta puuttumisen perusteella avulla voidaan täysin varmasti osoittaa, että aine ei voi hajota nopeasti muodostaen kaasuja tai lämpöä, eikä siihen näin ollen liity minkäänlaista räjähdysvaaraa. Nesteiden kohdalla ei vaadita kitkaherkkyyden testausta.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Räjähtävä:

Aineet, jotka voivat räjähtää liekin vaikutuksesta tai jotka ovat herkkiä iskulle tai kitkalle spesifioidussa laitteessa (tai ovat mekaanisesti herkempiä kuin 1,3-dinitrobentseeni vaihtoehtoisessa laitteessa).

1.3 VERTAILUAINEET

1,3-dinitrobentseeni, tekninen kiteinen tuote, joka on läpäissyt 0,5 mm:n seulan, käytetään kitka- ja iskumenetelmissä.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triatsiini (RDX, heksogeeni, sykloniitti — CAS 121-82-4); uudelleenkiteytetty vesipitoisesta sykloheksanonista, märkäseulottu 250 mm:n tarkkuudella ja pidätetty 150 µm:n seulaan sekä kuivattu 130 ± 2 °C:ssa (4 tuntia) toista kitka- ja iskutestisarjaa varten.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

On tarpeen tehdä alustavat testit, joiden avulla voidaan määrittää turvalliset olosuhteet kolmelle herkyystestille.

1.4.1 **Käsittelyturvallisuustestit (3)**

Ennen varsinaisen testin aloittamista on turvallisuussyistä altistettava hyvin pieniä näytemääriä (noin 10 mg) kuumentamiselle avoimessa kaasuliekissä tai vasaran ja alasimen tai sopivan kitkakoneen avulla aikaansaatavalle kitkalle. Tarkoituksena on selvittää, onko aineen herkkyys ja räjähtävyys sellaista luokkaa, että kuvatut herkkyystestit, etenkin lämpöherkkyyden kohdalla, on henkilövahinkojen välttämiseksi suoritettava erityistä varovaisuutta noudattaen.

1.4.2 **Lämpöherkkyys**

Näytettä kuumennetaan teräsputkessa, joka on suljettu sopivalla reiällä varustetulla mittauslaipalla. Testin avulla selvitetään, onko aine räjähdysherkkä hyvin kuumissa olosuhteissa ja ahtaassa tilassa.

1.4.3 **Mekaaninen herkkyys (isku)**

Näyte altistetaan iskulle pudottamalla sen päälle määrätty massa määrätyltä korkeudelta.

1.4.4 **Mekaaninen herkkyys (kitka)**

Kiinteä tai pastamainen näyte altistetaan kitkalle vakiopintojen välillä käyttäen annettua kuormaa ja suhteellista liikkettä.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritelty.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Lämpöherkkyys (liekin vaikutus)**

1.6.1.1 *Laite*

Laitteessa on kuumennus- ja suojaosaan asennettu kertakäyttöinen teräsputki, jossa on uudelleen käytettävä suljinosa (kuva 1). Syvävedetystä teräslevystä (katso liitettä) valmistettujen putkien sisähalkaisija on 24 mm, pituus on 75 mm ja seinän paksuus 0,5 mm. Putken avoimessa päässä on laippaliitos mittauslaippaa varten. Paineenkestävä mittauslaippa kiinnitetään putkeen kaksiosaisella ruuviliitännällä (mutterilla ja kierrelaipalla). Mutteri ja kierrelaippa on valmistettu kromi-mangaaniteräksestä (katso liitettä), joka on kipinöimätöntä 800 °C:een asti. Lämmönkestävästä teräksestä valmistettujen, useilla eri reiänhalkaisijoilla varustettujen mittauslaippojen paksuus on 6 mm.

1.6.1.2 *Testiolosuhteet*

Yleensä aine testataan sellaisenaan. Joissakin tapauksissa (esimerkiksi jos aine on puristetussa, valetussa tai muulla tavoin tiivistetyssä muodossa) aine on murskattava ennen testiä.

Kiinteiden aineiden kussakin testauksessa käytettävä massa määritetään kaksivaiheisen kuiva-ajon avulla. Taarattuun putkeen pannaan 9 cm^3 ainetta, joka sullotaan putkeen tämän koko poikkileikkauspinta-alaan kohdistuvalla 80 N:n voimalla. Turvallisuussyistä ja tapauksissa, joissa näytteen fyysinen muoto voi muuttua puristuksen

vaikutuksesta, voidaan käyttää muuntyyppistä täyttömenetelmää (sullomista ei voi käyttää esimerkiksi hyvin kitkaherkkien aineiden kohdalla). Jos aine kestää puristamista, täyttöä ja sullomista jatketaan, kunnes aineen yläpinnan etäisyys putken reunasta on 55 mm. Määritetään kokonaismassa, joka on käytetty putken täyttämiseen 55 mm:iin asti, minkä jälkeen tehdään vielä kaksi lisäystä, kumpikin 80 N:n voimalla sulloen. Tämän jälkeen ainetta joko lisätään sulloen tai poistetaan niin paljon, että aineen yläpinta on 15 mm:n etäisyydellä putken reunasta. Tehdään toinen kuiva-ajo, joka aloitetaan sullotulla massalla, joka on kolmasosa ensimmäisen ajon kokonaismassasta. Kaksi tällaista määrää lisätään sulloen 80 N:n voimalla, ja aineen yläpinta säädetään ainetta lisäämällä tai poistamalla 15 mm:n tasolle putken yläpinnasta. Kussakin kokeessa käytetään toisessa ajossa määritettyä massaa; täyttö tehdään kolmella yhtä suurella määrällä, joista jokainen puristetaan 9 cm^3:iin tarpeellista voimaa käyttäen (apuna voidaan käyttää välirenkaita).

Nesteet ja geelit täytetään putkeen 60 mm:n korkeuteen. Täytössä on erityisesti varottava tyhjien kohtien muodostumista. Kierrelaippa ohjataan putkeen yläkautta, valittu mittauslaippa asetetaan paikoilleen, hieman molybdeeni-disulfidipohjaista voiteluainetta lisätään ja mutteri kiristetään. On tärkeää tarkistaa, että mitään aineista ei ole jäänyt laipan ja levyn väliin tai kierteisiin.

Kuumennus tehdään propaanilla, joka otetaan kaasupullosta. Sylinterissä on oltava paineensäädin (60 — 70 mbar). Kaasun on kuljettava mittarin ja jakotukin kautta tasaisesti (virtauksen tasaisuus voidaan todeta polttimien liekeistä) neljään polttimeen. Polttimien sijoitus testauskammion ympärille ilmenee kuvasta 1. Polttimet kuluttavat yhteensä noin 3,2 litraa propaania minuutissa. Myös muita polttokaasuja tai muita polttimia voidaan käyttää, mutta kuumennusnopeuden on tällöin oltava sama kuin kuvassa 3. Kaikkien laitteiden kuumennusnopeus on tarkistettava säännöllisesti kuvasta 3 ilmenevällä tavalla dibutyyliftalaatilla täytettyjen putkien avulla.

1.6.1.3 *Testin suorittaminen*

Jokaista testiä jatketaan, kunnes putki hajoaa tai kunnes sitä on kuumennettu viiden minuutin ajan. Jos testin tuloksena on putken hajoaminen vähintään kolmeen osaan, jotka joissakin tapauksissa voivat olla vielä kiinni toisisssaan kapeilla metallikaistaleilla (katso kuvaa 2), aineen katsotaan räjähtäneen. Jos hajoamisosien määrä on pienempi tai jos hajoamista ei tapahdu, katsotaan, että räjähdystä ei ole tapahtunut.

Ensin tehdään kolmen testin sarja, jossa mittauslaipan aukon halkaisija on 6,0 mm. Ellei räjähdystä tapahdu, tehdään toinen kolmen testin sarja, jossa mittauslaipan aukon halkaisija on 2,0 mm. Jos jommankumman sarjan tuloksena on räjähdys, testejä ei tarvitse jatkaa.

1.6.1.4 *Arviointi*

Testitulos katsotaan positiiviseksi, jos jommankumman edellä kuvatun testisarjan aikana tapahtuu räjähdys.

1.6.2 **Mekaaninen herkkyys (isku)**

1.6.2.1 *Laite (kuva 4)*

Tyypillisen vasaralaitteen tärkeimmät osat ovat teräsvalukappale alustoineen, alasin, pylväs, ohjaimet, pudotuspainot, irrotuslaite ja näytteenpidin. Teräsalasin (halkaisija 100 mm ja korkeus 70 mm) on kiinnitetty ruuveilla teräskappaleeseen (pituus 230 mm, leveys 250 mm ja korkeus 200 mm). Teräskappale on teräsvalualustalla (pituus 450 mm, leveys 450 mm ja korkeus 60 mm). Pylväs on tehty saumattomasta teräksestä vedetystä putkesta, ja se sijaitsee pitimessä, joka on kiinnitetty ruuveilla teräskappaleen taakse. Laite on ankkuroitu massiiviseen sementtikappaleeseen (60 × 60 × 60 cm) ruuveilla siten, että ohjainkiskot ovat ehdottomasti pystysuorassa ja pudotuspaino pääsee putoamaan vapaasti. Painot (5 kg ja 10 kg) on valmistettu umpiteräksestä. Kummankin painon pää on karkaistua terästä (HRC 60 — 63), iskuhalkaisijaltaan vähintään 25 mm.

Näyte suljetaan iskulaitteeseen, jossa on kaksi päällekkäistä, konsentrista, umpiteräksistä sylinteriä, jotka sijaitsevat ontossa, sylinterinmuotoisessa teräsrenkaassa. Umpiterässylintereiden on oltava halkaisijaltaan 10 (- 0,003, - 0,005) mm ja korkeudeltaan 10 mm ja niissä on oltava kiillotettu pinta sekä pyöristetyt reunat (kaarevuussäde 0,5 mm). Sylintereiden kovuusarvon on oltava HRC 58 — 65. Onton sylinterin ulkohalkaisijan on oltava 16 mm, sisähalkaisijan 10 (+ 0,005, + 0,10) mm (kiillotettu sisäpinta) ja korkeuden 13 mm. Iskulaite on asennettu teräksiseen välialasimeen (halkaisija 26 mm ja korkeus 26 mm), joka on keskitetty renkaan avulla. Renkaassa on reiät savunpoistoa varten.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Näytettä käytetään 40 mm³ tai muu, vaihtoehtoiselle laitteelle sopiva määrä. Kiinteät aineet testataan kuivina ja valmistellaan seuraavasti:

a) Jauhetut aineet seulotaan (seulakoko 0,5 mm). Kaikki seulan läpäissyt aines käytetään.

b) Puristetut tai muulla tavoin tiivistetyt aineet murskataan ja seulotaan. Testissä käytetään seulontafraktiota 0,5 — 1 mm, jonka on edustettava alkuperäistä ainetta.

Aineet, jotka toimitetaan yleensä pastamuodossa, on mahdollisuuksien mukaan testattava kuivina tai vasta mahdollisimman täydellisen laimennusaineen poiston jälkeen. Nestemäisten aineiden testauksessa ylemmän ja alemman terässylinterin väliin on jätettävä 1 mm:n aukko.

1.6.2.3 *Testin suorittaminen*

Tehdään kuuden testin sarja pudottamalla 10 kg:n massa 0,40 m:n korkeudelta (40 J). Jos näiden testien aikana syntyy räjähdys, tehdään toinen kuuden testin sarja pudottamalla 5 kg:n massa 0,15 m:n korkeudelta (7,5 J). Jos käytetään muuntyyppistä laitetta, näytettä verrataan valittuun vertailuaineeseen käyttämällä hyväksyttyä menetelmää (esimerkiksi ylös-alas-tekniikkaa).

1.6.2.4 *Arviointi*

Testitulos katsotaan positiiviseksi, jos räjähdys (liekkeihin leimahtaminen tai muu raportti katsotaan räjähdykseksi) tapahtuu vähintään kerran määritetyllä iskulaitteella suoritetussa testissä tai jos näyte on vaihtoehtoisessa iskutestissä herkempi kuin 1,3-dinitrobentseeni tai RDX.

1.6.3 **Mekaaninen herkkyys (kitka)**

1.6.3.1 *Laite (kuva 5)*

Kitkalaitteen muodostavat valettu teräslaatta ja sille asennettu kitkayksikkö. Kitkayksikkö koostuu kiinteästä posliinitapista ja liikkuvasta posliinilaatasta, joka on kiinnitetty kahdessa ohjaimessa liikkuvaan vaunuun. Vaunu on kytketty sähkömoottoriin kytkentäsauvan, epäkeskoakselin ja sopivan vaihteiston kautta siten, että posliinilaatta liikkuu kerran edestakaisin 10 mm:n matkan posliinitapin alla. Posliinitappia voidaan kuormittaa esimerkiksi 120 tai 360 Newtonin voimalla.

Litteät posliinilaatat on valmistettu valkoisesta teknisestä posliinista (karheus 9 — 32 µm). Laattojen mitat ovat 25 mm (pituus) × 25 mm (leveys) × 5 mm (korkeus). Myös sylinterinmuotoinen posliinitappi on valkoista teknistä posliinia, pituudeltaan 15 mm ja halkaisijaltaan 10 mm. Tapin pää on pyöreä ja karhennettu (kaarevuussäde 10 mm).

1.6.3.2 *Testiolosuhteet*

Näytettä käytetään 10 mm³ tai jokin muu vaihtoehtoiseen laitteeseen sopiva määrä.

Kiinteät aineet testataan kuivina ja valmistellaan seuraavasti:

a) Jauhetut aineet seulotaan (seulakoko 0,5 mm). Kaikki seulan läpäissyt aines käytetään.

b) Puristetut tai muulla tavalla tiivistetyt aineet murskataan ja seulotaan. Testissä äkäytetään alle 0,5 mm:n seulontafraktiota.

Aineet, jotka yleensä toimitetaan pastamuodossa, on mahdollisuuksien mukaan testattava kuivina. Jos ainetta ei voi valmistella kuivassa muodossaan, pasta (jolle tehdään ensin mahdollisimman täydellinen laimennusaineen poisto) muotoillaan kalvoksi, jonka paksuus on 0,5 mm, leveys 2 mm ja pituus 10 mm.

1.6.3.3 *Testin suorittaminen*

Posliinitappi asetetaan testattavan näytteen päälle ja kuormitus aktivoidaan. Testin aikana posliinilaatan karhennuksien on oltava poikittain liikkeen suuntaan nähden. On varmistettava, että tappi lepää näytteellä, että tarpeellinen määrä näyteainetta on tapin alla ja että laatta liikkuu oikealla tavoin tapin alla. Pastamaista ainetta pannaan laatalle käyttäen 2 × 10 mm:n uralla varustettua mittalevyä, jonka paksuus on 0,5 mm. Posliinilaatan on liikuttava posliinitapin alla 10 mm:n matka eteen ja taakse 0,44 sekunnissa. Laatan ja tapin pinnan osia saa käyttää vain kerran; kummankin tapin molempia päitä voidaan käyttää kahdessa testissä ja laatan kumpikin pinta pintaa kestää kolme testiä.

Tehdään kuuden testin sarja 360 N:n kuormalla. Jos näiden testien aikana saadaan positiivinen tulos, tehdään toinen kuuden testin sarja 120 N:n kuormalla. Jos käytetään muuntyyppistä laitetta, näytettä verrataan valittuun vertailuaineeseen hyväksyttyä menetelmää (esimerkiksi ylös-alas-tekniikkaa) käyttäen.

1.6.3.4 *Arviointi*

Testin tulos katsotaan positiiviseksi, jos räjähdys (kuuluva rätinä, muu raportti tai leimahdus katsotaan räjähdykseksi) tapahtuu vähintään kerran määritetyllä kitkalaitteella suoritetuissa testeissä tai täyttää tätä vastaavan kriteerin vaihtoehtoisessa kitkatestissä.

2 TIEDOT

Periaatteessa aine katsotaan räjähdysvaaralliseksi direktiivin tarkoittamassa mielessä, jos lämpöherkkyys, iskuherkkyys- tai kitkaherkkyystestistä saadaan positiivinen tulos.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— näyteaineen tunnistustiedot, koostumus, puhtaus, kosteuspitoisuus jne.

— aineen fyysinen muoto ja tiedot siitä, onko ainetta murskattu, rikottu tai seulottu

— havainnot lämpöherkkyystesteistä (esimerkiksi näytteen massa ja sirpaleiden määrä)

— havainnot mekaanisista herkkyystesteistä (esimerkiksi huomattavan savumäärän muodostuminen tai raportoimaton täydellinen hajoaminen, liekit, kipinät, muu raportti ja rätinä)

— jokaisen testityypin tulokset

— jos vaihtoehtoisia laitteita on käytetty, on esitettävä tieteellinen perustelu ja todisteet korrelaatiosta määritetyllä laitteella saatujen ja tätä vastaavalla laitteella saatujen tulosten välillä

— kaikki käyttökelpoiset kommentit, kuten tulosten tulkinnan kannalta varten tärkeät viitteet vastaavien tuotteiden testauksiin

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

3.2 TULOSTEN TULKINTA JA ARVIOINTI

Testiraportissa on mainittava kaikki tulokset, joita pidetään virheellisinä, epänormaaleina tai ei-edustavina. Jos jokin tulos hylätään, on annettava selitys ja esitettävä tulos vaihtoehtoisesta tai täydentävästä testistä. Ellei epänormaalia tulosta voida selittää, se on hyväksyttävä sellaisenaan ja sitä on käytettävä aineen luokitukseen tuloksen mukaan.

4 **VIITTEET**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and Criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Bretherick, L,. Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990

(3) Koenen, H., Ide, K. H. and Swart, K. H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6 — 13 and 30 — 42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

Liite

Esimerkki ainespesifikaatiosta lämpöherkkyystestiä varten (katso standardia DIN 1623)

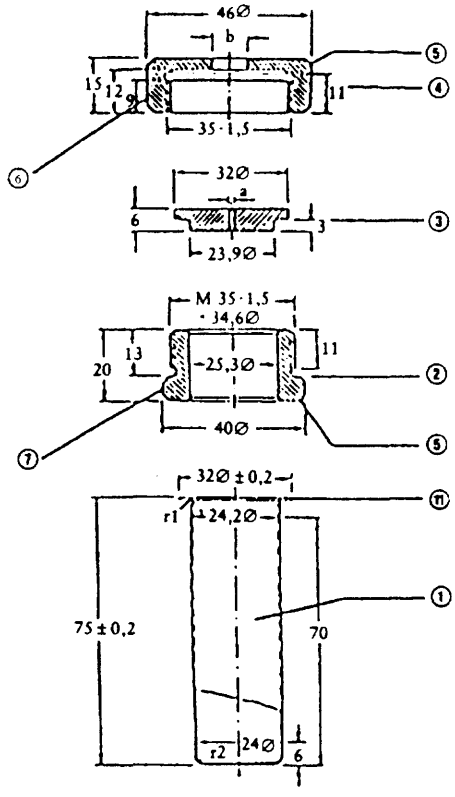
(1) Putki: ainespesifikaatio nro 1.0336.505 g

(2) Mittauslaippa: ainespesifikaatio nro 1.4873

(3) Kierrelaippa ja mutteri: ainespesifikaatio nro 1.3817

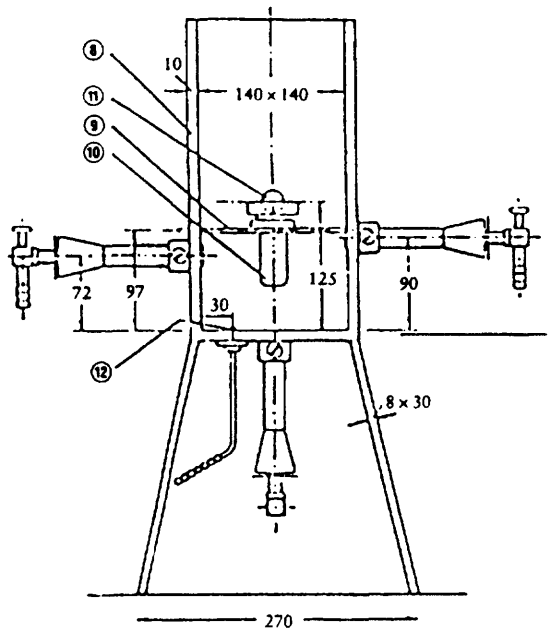
Kuva 1

Lämpöherkkyyden mittauslaite
(Kaikki mitat ovat millimetreinä.)



Kuva 1a Teräsputki varusteineen

1. putki
1a. ulkolaippa
2. kierrelaippa; matalakitkakierre
3. mittauslaippa = halkaisija 2,0 tai 6,0 mm
4. mutteri b = halkaisija 10 mm
5. viistetty pinta
6. 2 upporuuvia, avainkoko 41



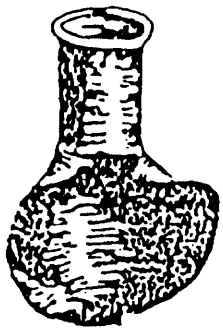
Kuva 1b Kuumennus- ja suojalaite

7. 2 upporuuvia, avainkoko 36
8. sirpaleenkestävä laatikko
9. putken 2 tukitankoa
10. asennettu putki
11. takapolttimen paikka; muut polttimet ovat näkyvissä
12. joutokäyntisuutin

Kuva 2

Lämpöherkkyystesti

Esimerkkejä sirpaleenmuodostuksesta



Ei räjähdystä



Ei räjähdystä



Räjähdys



Räjähdys



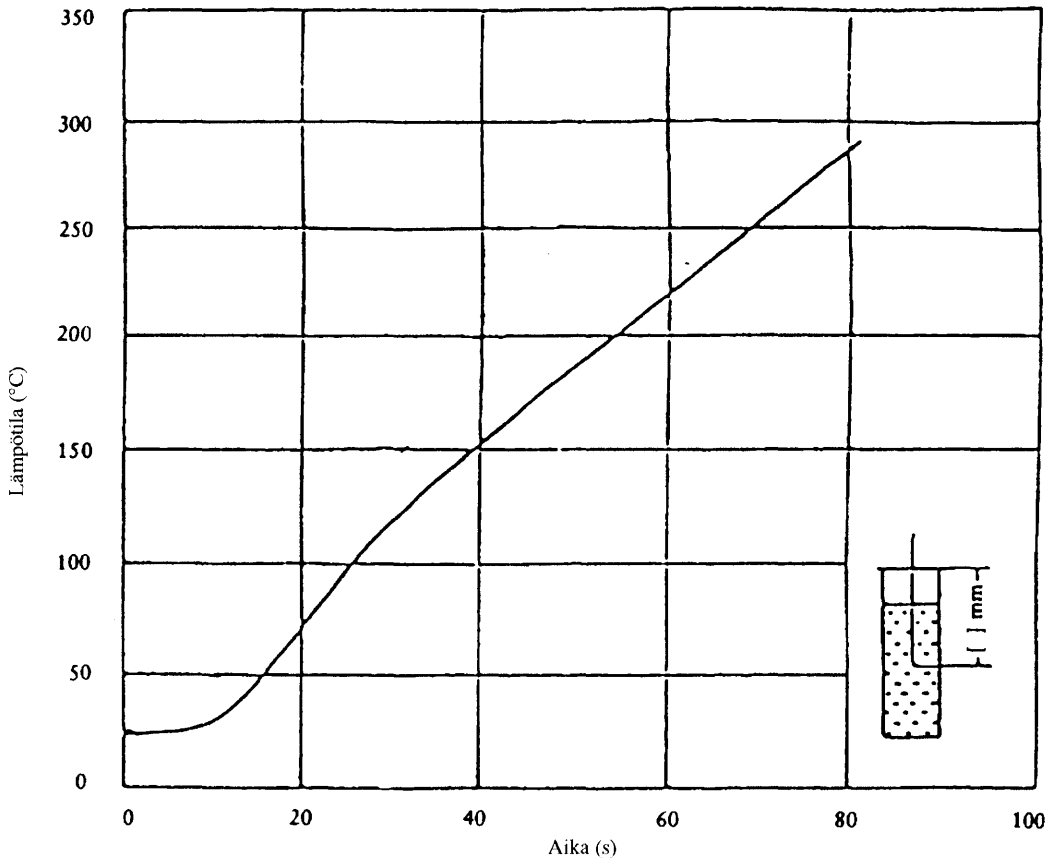
Räjähdys



Räjähdys

Kuva 3

Kuumennusnopeuden kalibrointi lämpöherkkyystestiä varten

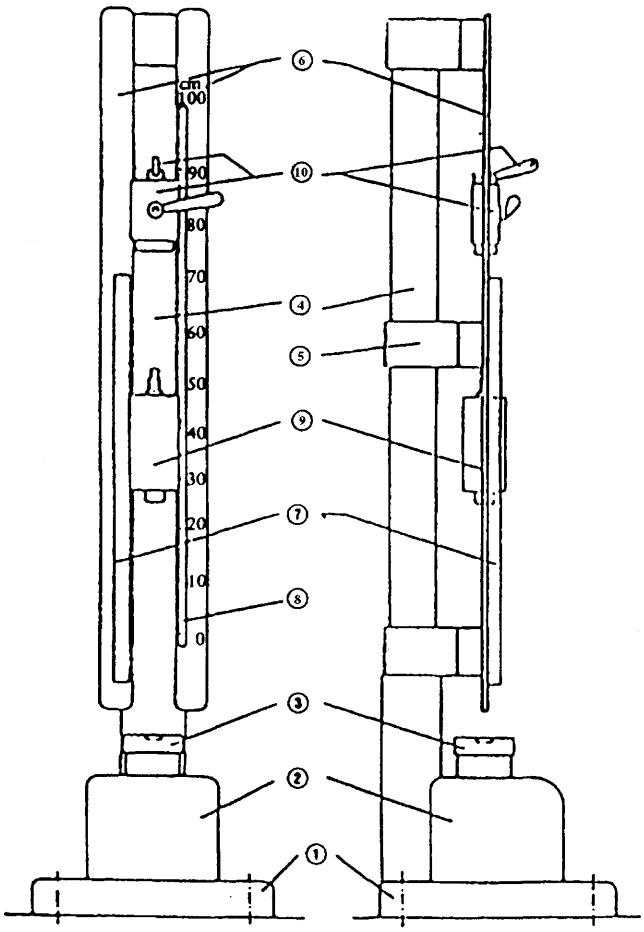


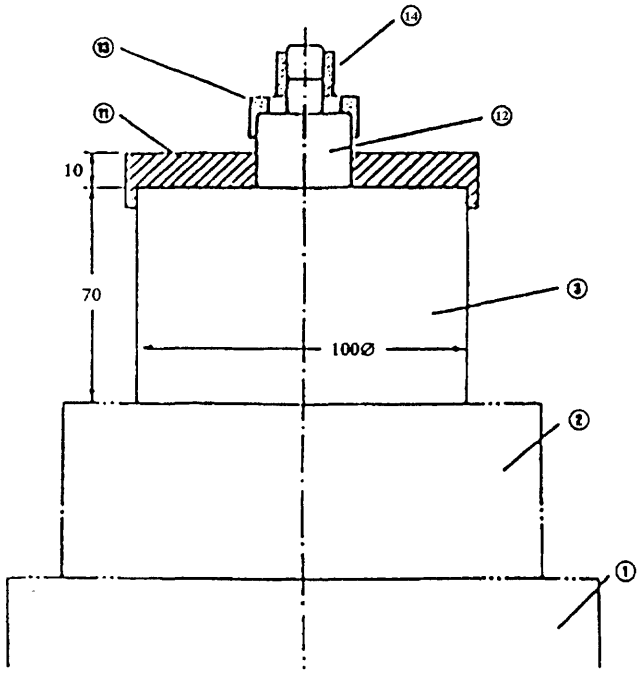
Lämpötila-aikakäyrä, joka on saatu kuumentamalla dibutyyliftalaattia (27 cm^3) suljetussa (1,5 mm:n mittauslaipalla varustetussa) putkessa käyttäen propaania ja virtausnopeutta 3,2 litraa minuutissa. Lämpötilan mittaukseen käytetään taipuisaa, ruostumattomasta teräksestä valmistettua kromi/alumiini-termoparia, jonka halkaisija on 1 mm ja joka on asetettu keskelle putkea 43 mm:n etäisyydelle sen suusta. Alueella 135 — 285 °C kuumennusnopeuden on oltava välillä 185 — 215 K/min.

Kuva 4

Iskutestilaite

(Kaikki mitat ovat millimetreinä.)





Kuva 4a Pudotusvasara sivulta ja edestä, yleisnäkymä

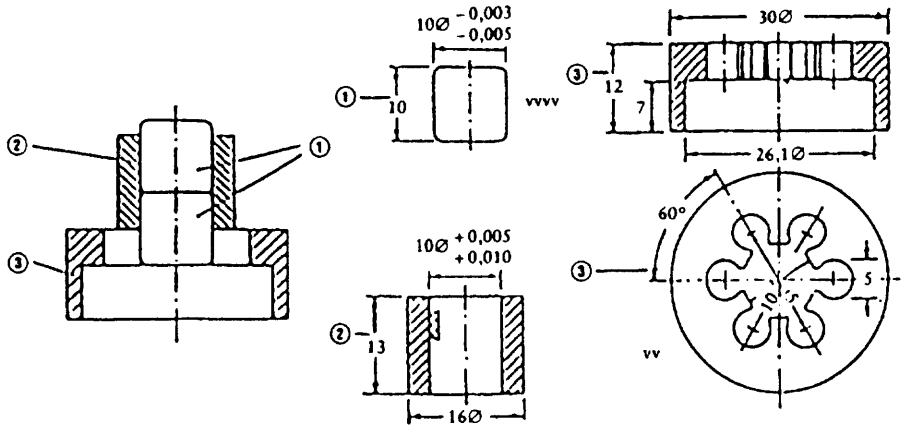
1. alusta 450 × 450 × 60
2. teräskappale, 230 × 250 × 200
3. alasin, 100 (halkaisija) × 70
4. pylväs
5. poikkikannatin
6. 2 ohjainta
7. hammastettu tanko

Kuva 4b Pudotusvasara, alaosa

8. mitta-asteikko
9. pudotusvasara (pudotusmassa)
10. pito- ja irrotusosa
11. kohdistuslaatta
12. välialasin (vaihdettava) 26 halkaisija × 26
13. aukoilla varustettu kohdistusrengas
14. iskulaite

Kuva 4

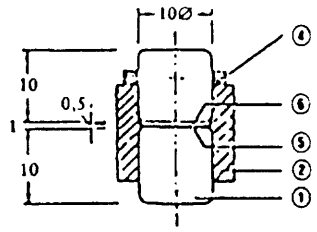
(Jatkuu)

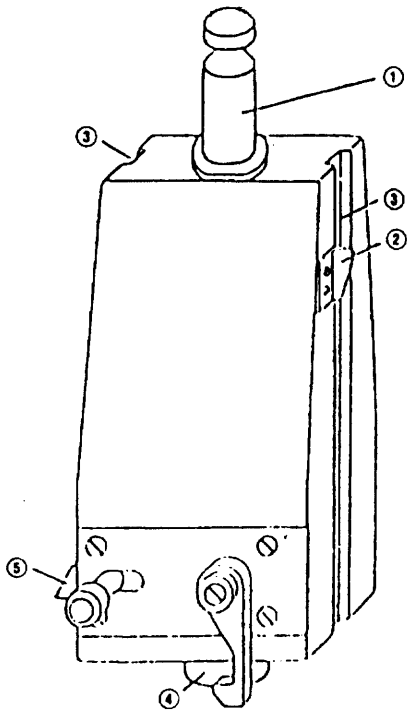


Kuva 4c Iskulaite jauhettuja tai pastamaisia aineita varten

1. terässylinterit
2. terässylintereiden ohjausrengas
3. aukoilla varustettu ohjausrengas
   (a) pystyleikkaus
   (b) pohjapiirros
4. kumirengas
5. nestemäinen aine (40 mm³)
6. nesteetön tila

Kuva 4d Iskulaite nestemäisiä aineita varten



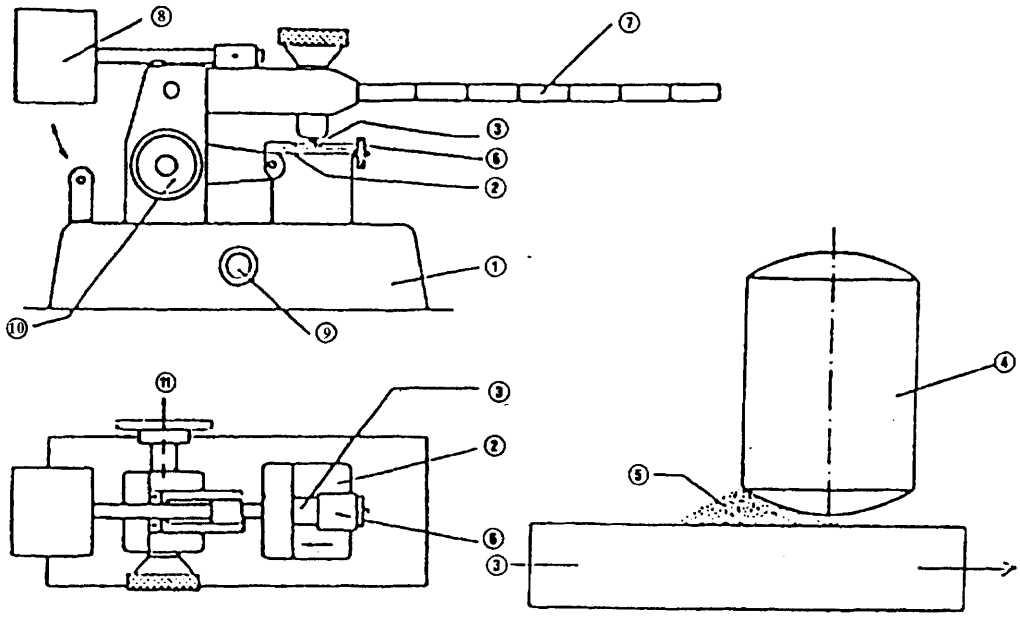


Kuva 4e Vasara (pudotusmassa: 5 kg)

1. jännitystappi
2. korkeusindikaattori
3. ohjausura
4. sylinterinmuotoinen iskupää
5. palautushaka

Kuva 5

Kitkaherkkyyslaite



Kuva 5a Kitkaherkkyyslaite, sivukuva ja pohjapiirros

1. teräasalusta
2. liikkuva vaunu
3. vaunulla oleva posliinilevy, 25 × 25 × 5 mm
4. kiinteä posliinitappi, 10 (halkaisija) × 15 mm
5. näyte, noin 10 mm³

Kuva 5b Tapin alkuasento

6. tapinpidin
7. kuormitusvarsi
8. vastapaino
9. kytkin
10. pyörä, jolla vaunu asetetaan alkuasentoon
11. sähkömoottorin suunta

A.15 ITSESYTTYMISLÄMPÖTILA (NESTEET JA KAASUT)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tätä testiä ei pidä käyttää räjähdysaineiden ja itsestään ilmassa tai huoneenlämmössä syttyvien aineiden kohdalla. Testiä voidaan soveltaa kaasuihin, nesteisiin ta höyryihin, jotka kosketuksissa ilmaan voivat syttyä kuuman pinnan vaikutuksesta.

Itsesyttymislämpötila laskee huomattavasti katalyyttisten epäpuhtauksien, pinta-aineen tai testausastian suuremman tilavuuden vaikutuksesta.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Itsesyttyvyysaste ilmaistaan itsesyttymislämpötilana. Itsesyttymislämpötila on alhaisin lämpötila, jossa näyte syttyy, kun se sekoitetaan ilmaan testimenetelmän määrittelemissä olosuhteissa.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineet mainitaan standardeissa (katso kohtaa 1.6.3) luetellaan vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Menetelmällä määritetään suljetun astian sisäseinän alhaisin lämpötila, jossa astiaan ruiskutettu kaasu, höyry tai neste syttyy palamaan.

1.5 LAATUKRITEERIT

Toistettavuus vaihtelee itsesyttymislämpötila-alueiden ja käytetyn testimenetelmän mukaan.

Herkkyys ja spesifisyys vaihtelevat käytetyn testimenetelmän mukaan.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Laite**

Laite kuvataan on kohdassa 1.6.3 mainituissa menetelmäkuvauksissa.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Näyte aineesta testataan kohdassa 1.6.3 mainitun menetelmäkuvauksen mukaan.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

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

2 TIEDOT

Pidetään kirjaa testilämpötilasta, ilmanpaineesta, käytetystä näytemäärästä ja syttymiseen kuluvasta ajasta.

3 **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— näyteaineen tarkat tiedot (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet)

— käytetty näytemäärä

— ilmanpaine

— käytetty laite

— testitulokset (testilämpötilat, syttymistulokset ja viiveet)

— kaikki lisätiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4 **VIITTEET**

Viitteitä ei ole.

A.16 KIINTEIDEN AINEIDEN SUHTEELLINEN ITSESYTTYMISLÄMPÖTILA

1 **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tätä testiä ei pidä käyttää räjähtävien aineiden ja itsestään ilmassa tai huoneenlämmössä syttyvien aineiden kohdalla.

Testin avulla saadaan alustavaa tietoa kiinteiden aineiden itsesyttyvyydestä korkeissa lämpötiloissa.

Jos lämmön vapautuminen ympäristöön aineen reagoidessa hapen kanssa tai sen hajotessa eksotermisesti ei tapahdu tarpeeksi nopeasti, aineen kuumentaminen johtaa itsesytyttymiseen. Näin ollen itsesyttyminen tapahtuu, kun lämmöntuotanto on nopeampaa kuin lämpöhäviö.

Testimenetelmä on käytännöllinen tapa saada alustavaa tietoa kiinteistä aineista. Koska kiinteiden aineiden syttyminen ja palaminen on monimutkainen tapahtuma, tällä menetelmällä määritettyjä itsesyttymislämpötiloja tulee käyttää vain vertailutarkoituksiin.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Tällä menetelmällä saatu itsesyttymislämpötila on alhaisin ympäristön lämpötila (°C), jossa tunnettu tilavuus näyteainetta syttyy tunnetuissa olosuhteissa.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Tunnettu määrä näyteainetta pannaan huoneenlämpöiseen uuniin. Uunin lämpötila nostetaan 0,5 °C:n minuuttinopeudella arvoon 400 °C (tai sulamispisteeseen, jos tämä on alhaisempi), ja näytteen keskustan lämpötila kirjataan ajan funktiona. Tämän testin itsesyttymislämpötilaksi katsotaan se uunin lämpötila, jossa näytteen lämpötila on itsestään kuumenemisen seurauksena saavuttanut arvon 400 °C.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Laite**

1.6.1.1 *Uuni*

Uuni on termostaatilla varustettu laboratoriouuni (tilavuus noin 2 litraa), jossa on luonnollinen ilmanvaihto ja räjähdysventtiili. Räjähdysvaaran välttämiseksi hajoamiskaasuja ei saa päästää kosketuksiin sähkölämmityselementtien kanssa.

1.6.1.2 *Lankaverkkokuutio*

Ruostumattomasta teräslangasta valmistetusta verkosta (0,045 mm aukko) leikataan kuvan 1 mukainen kuvio. Verkko taivutetaan ylhäältä avoimeksi kuutioksi ja kiinnitetään teräslangalla.

1.6.1.3 *Termoparit*

Käytetään sopivia termopareja.

1.6.1.4 *Rekisteröintilaite*

Mikä tahansa kaksikanavainen rekisteröintilaite, joka on kalibroitu 0 — 600 °C:lle tai vastaavalle jännitteelle.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Aineet testataan vastaanotetussa muodossa.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Verkkokuutioon pannaan näyteainetta, naputetaan kevyesti, ja lisätään ainetta, kunnes kuutio täyttyy. Tämän jälkeen kuutio ripustetaan huoneenlämpöisen uunin keskelle. Toinen termopari pannaan kuution keskustaan ja toinen kuution ja uunin seinän väliin mittaamaan uunin lämpötilaa.

Uunin lämpötila nostetaan 400 °C:een (tai sulamispisteeseen, jos tämä on alhaisempi) 0,5 °C:n minuuttinopeudella. Uunin ja näytteen lämpötilaa rekisteröidään koko kuumennuksen ajan.

Kun aine syttyy, näytteessä olevan termoparin lämpötila nousee erittäin jyrkästi yli uunin lämpötilan.

2 **TIEDOT**

Arviointia varten käytetään sitä uunin lämpötilaa, jossa näytteen lämpötila on noussut 400 °C:een itsesyttymisen vaikutuksesta (katso kuvaa 2).

3 **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— näyteaineen tiedot

— mittaustulokset lämpötila-aikakäyrineen

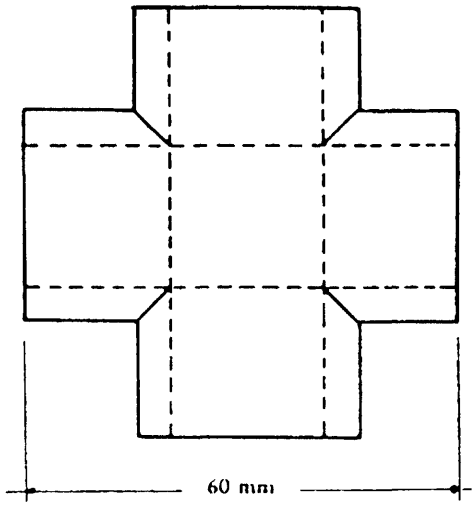
— kaikki lisätiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4 **VIITTEET**

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

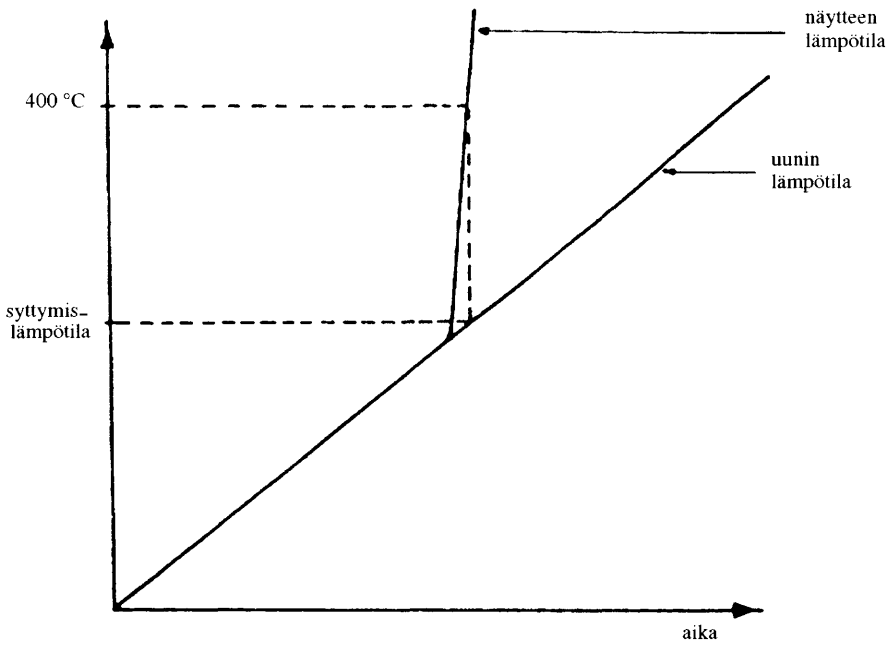
Kuva 1

20 mm:n näytekuution kaava



Kuva 2

Tyypillinen lämpötila-aikakäyrä



A.17 HAPETTAVAT OMINAISUUDET (KIINTEÄT AINEET

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Ennen testiä on suositeltavaa hankkia alustavia tietoja aineen mahdollisista räjähdysominaisuuksista.

Menetelmää ei voi käyttää nesteiden, kaasujen, räjähdysalttiiden tai herkästi syttyvien aineiden tai orgaanisten peroksidien testaukseen.

Testiä ei tarvitse suorittaa, jos aineen rakennekaavasta voidaan täysin varmasti päätellä, että aine ei voi reagoida eksotermisesti syttyvien aineiden kanssa.

Alustavan testin avulla selvitetään, onko varsinaisessa testissä noudatettava erityistä varovaisuutta.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Palamisaika sekunteina on se aika, jossa reaktiovyöhyke kulkee keon läpi, kun käytetään kohdassa 1.6 kuvattua menetelmää.

Palamisnopeus ilmaistaan millimetreinä sekunnissa.

Suurin palamisnopeus on se palamisnopeuden suurin arvo, joka saadaan kun ainetta sekoitetaan hapettimeen eri pitoisuuksina (10 — 90 painoprosenttia hapetinta).

1.3 VERTAILUAINEET

Analyyttisen puhdasta bariumnitraattia voidaan käyttää testin ja alustavan testin vertailuaineena.

Vertailuseoksena käytetään sitä kohdan 1.6 mukaan valmistettua bariumnitraatin ja jauhetun selluloosan seosta, jolla on suurin palamisnopeus (yleensä seos, jossa on 60 painoprosettia bariumnitraattia).

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Turvallisuussyistä tehdään alustava testi. Jos alustavasta testistä selvästi ilmenee, että aineella on hapettavia ominaisuuksia, testiä ei tarvitse jatkaa. Muussa tapauksessa aine testataan kattavan testiohjelman mukaan.

Kattavassa testissä testattavaa ainetta ja määritettyä syttyvää ainetta sekoitetaan eri suhteissa. Jokaisesta seoksesta valmistetaan pitkänomainen keko, joka sytytetään toisesta päästä. Suurinta palamisnopeutta verrataan vertailuseoksen suurimpaan palamisnopeuteen.

1.5 LAATUKRITEERIT

Tarvittaessa voidaan käyttää mitä tahansa jauhamis- ja sekoitusmenetelmää, edellyttäen, että kuudesta erillisestä testistä saadut suurimmat palamisnopeudet poikkeavat aritmeettisesta keskiarvosta enintään 10 %.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelutoimet**

1.6.1.1 *Näyte*

Näytteen hiukkaskoko pienennetään alle 0,125 mm:iin seuraavasti: näyte seulotaan, jäännös jauhetaan ja seulonta toistetaan. Tätä jatketaan, kunnes koko näytemäärä on läpäissyt seulan.

Jauhamiseen ja seulontaan voidaan käyttää mitä tahansa laatukriteerit täyttävää menetelmää.

Ennen seoksen valmistelua näytettä kuivataan 105 °C:ssa, kunnes paino vakiintuu. Jos testattavan aineen hajoamislämpötila on alle 105 °C, kuivaus on tehtävä sopivassa, alhaisemmassa lämpötilassa.

1.6.1.2 *Syttyvä aine*

Syttyvänä aineena käytetään jauhettua selluloosaa. Selluloosan on oltava ohutkerroskromatografiaan tai pylväskromatografiaan tarkoitettua tyyppiä. Selluloosatyyppi, jossa yli 85 % kuiduista on pituudeltaan 0,020 — 0,075 mm, on osoittautunut sopivaksi. Selluloosajauhe seulotaan 0,125 mm:n silmäkoon läpi. Testiin on käytettävä saman erän selluloosaa.

Jauhettua selluloosaa kuivataan ennen seoksen valmistelua 105 °C:ssa, kunnes paino vakiintuu.

Jos alustavaan testiin käytetään puujauhoa, valmistetaan havupuujauhe keräämällä talteen 1,6 mm:n seulan läpäissyt osa. Jauhe sekoitetaan huolellisesti ja sitä kuivataan 105 °C:ssa neljä tuntia enintään 25 mm:n paksuisena kerroksena. Kuivauksen jälkeen puujauhe jäähdytetään ja pannaan ilmatiiviiseen säiliöön, joka pakataan mahdollisimman täyteen. Jauhe tulisi käyttää 24 tunnin kuluessa kuivauksesta.

1.6.1.3 *Sytytyslähde*

Sytytyslähteenä käytetään kaasupolttimen kuumaa liekkiä (minimihalkaisija 5 mm). Jos käytetään toista sytytyslähdettä (esimerkiksi kun testi tapahtuu inertissä ilmakehässä), on annettava tilanteen kuvaus ja perustelu.

1.6.2 **Testin suorittaminen**

Huomautus:

Hapettimien ja selluloosan tai puujauheen seoksia on pidettävä räjähdysvaarallisina ja niitä käsiteltävä varoen.

1.6.2.1 *Alustava testi*

Kuivattua näytettä ja kuivattua selluloosaa tai puujauhetta sekoitetaan huolella suhteessa 2 paino-osaa näytettä ja 1 paino-osa selluloosaa tai puujauhetta. Seos muotoillaan pieneksi kartionmuotoiseksi keoksi, jonka pohjan halkaisija on 3,5 cm ja korkeus 2,5 cm. Keko tehdään täyttämällä (ilman tiivistämistä) kartionmuotoinen muotti (esimerkiksi lasisuppilo, jonka varsi on suljettu).

Keko asetetaan kylmälle, palamattomalle ja ei-huokoiselle aluslevylle, jonka lämmönjohtavuus on heikko. Testi on suoritettava vetokaapissa (katso 1.6.2.2).

Kartiota kosketetaan sytytyslähteellä. Sytytystä seuraavan reaktion voimakkuutta ja kestoa tarkkaillaan ja tulos kirjataan.

Jos reaktio on voimakas, ainetta pidetään hapettavana.

Jos tuloksen suhteen on epäilyjä, on tarpeen tehdä jäljempänä kuvattu kattava testi.

1.6.2.2 *Sarjatesti*

Valmistetaan hapettimen ja selluloosan seoksia, joissa hapettimen painoprosentti on 10 — 90 ja vaihteluväli 10 %. Rajatapauksissa on valmistettava seoksia, joilla on pienemmät vaihteluvälit, jotta suurin palamisnopeus voitaisiin määrittää mahdollisimman tarkasti.

Keko muotoillaan muotin avulla. Metallista valmistetun muotin pituus on 250 mm. Muotin kolmionmuotoisen läpileikkauksen sisäkorkeus on 10 mm ja leveys 20 mm. Muotin pituussuunnassa on molemmille sivuille kiinnitetty kaksi metallilevyä siten, että levyjen yläreuna on 2 mm muotin reunan yläpuolella (katso kuvaa). Lisätään seosta kevyelti hiukan muotin reunojen yli. Muotti pudotetaan kerran 2 cm korkeudelta kiinteälle pinnalle. Ylimääräinen aines kaavitaan pois, sivulevyt poistetaan ja muottiin jäävä aines tasoitetaan rullalla. Muotille asetetaan palamaton, ei-huokoisesta ja lämpöä heikosti johtavasta aineesta valmistettu aluslevy, laite käännetään ja muotti poistetaan.

Aseta näyte vetokaappiin.

Veto on säädettävä sellaiseksi, ettei savua pääse laboratoriotiloihin. Vedon voimakkuus ei saa vaihdella testin aikana. Laitteen ympärille pystytetään suojaseinä vetoa vastaan.

Koska selluloosa ja eräät testattavat aineet ovat hygroskooppisia, testi on suoritettava mahdollisimman nopeasti.

Keon toinen pää sytytetään koskettamalla sitä liekillä.

Kun reaktiovyöhyke on edennyt 30 mm, mitataan aika, joka kuluu seuraavan 200 mm:n etenemiseen.

Testi tehdään vertailuaineella ja vähintään kerran näyte-selluloosaseossarjan jokaisella osalla.

Jos todetaan, että näyteseoksen palamisnopeus on huomattavasti suurempi kuin vertailuseoksen palamisnopeus, testi voidaan keskeyttää. Muussa tapauksessa testi toistetaan viisi kertaa kolmelle nopeimmin palavalle seokselle.

Jos epäillään, että positiivinen tulos on virheellinen, testi toistetaan käyttäen selluloosan sijasta inerttiä ainetta, jolla on sama hiukkaskoko (esimerkiksi piimaata). Vaihtoehtoisesti nopeimmin palava näyte-selluloosaseos voidaan testata uudelleen inertissä ilmakehässä (< 2 tilavuusprosenttia happea).

2 **TIEDOT**

Turvallisuussyistä suurinta palamisnopeutta — ei keskiarvoa — pidetään näyteaineen tunnusomaisena hapettavana ominaisuutena.

Arviointiin varten käytetään kuuden kokeen sarjan suurinta palamisnopeutta.

Laaditaan käyrä, johon jokaista seosta kohden merkitään suurin palamisnopeus hapettimen pitoisuuden funktiona. Tältä käyrältä luetaan suurin palamisnopeus.

Testattaessa suurimman palamisnopeuden omaava seos, testisarjan kuusi palamisnopeuden arvoa saavat poiketa aritmeettisesta keskiarvosta enintään 10 %. Muussa tapauksessa jauhamis- ja sekoitusmenetelmiä on parannettava.

Suurinta saatua palamisnopeutta verrataan vertailuseoksen palamisnopeuteen (katso 1.3).

Jos testit tehdään inertissä ilmakehässä, suurinta saatua reaktionopeutta verrataan inertissä ilmakehässä testatun vertailuaineen tulokseen.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— näyteaineen tunnistetiedot, koostumus, puhtausaste, kosteuspitoisuus jne.

— näyteaineen mahdolliset käsittelyt (esimerkiksi jauhaminen ja kuivaus)

— testeissä käytetty sytytyslähde

— mittaustulokset

— havaitun reaktion luonne (esimerkiksi liekki näytteen pinnalla, palaminen koko massan läpi, tiedot palamistuotteista,...)

— kaikki lisätiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta mukaan lukien kuvaus reaktion voimakkuudesta (liekit, kipinät, savunmuodostus, kyteminen, jne.) ja likimääräinen kesto alustavan testin yhteydessä sekä näytteen että vertailuaineen osalta

— tulokset inertin aineen testauksesta, jos tuloksia on käytettävissä

— inertissä ilmakehässä tehtyjen testien tulokset, jos tuloksia on käytettävissä.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Aineen katsotaan olevan hapettava seuraavissa tapauksissa:

a) jos alustavassa testissä tapahtuu voimakas reaktio

b) jos seosten palamisnopeus kattavassa testissä on vähintään yhtä suuri kuin selluloosasta ja bariumnitraatista valmistetun vertailuseoksen suurin palamisnopeus.

Väärän positiivisen tuloksen välttämiseksi tulosten tulkinnassa on otettava huomioon myös tulokset, jotka on saatu testattaessa näytteen ja inertin aineen seosta tai suoritettaessa testiä inertissä ilmakehässä.

4 VIITTEET

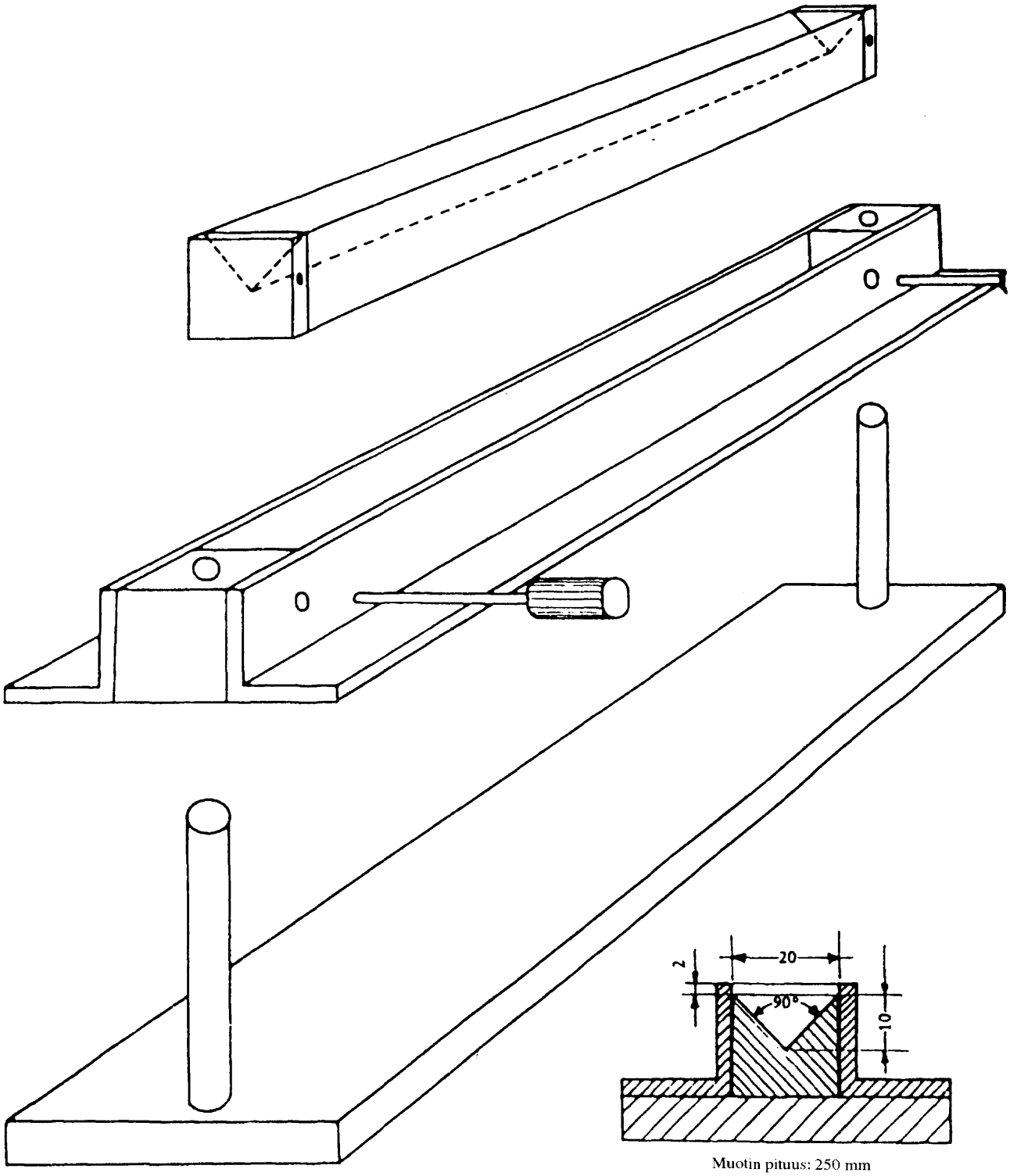
(1) NF T 20-035 (SEPT 85), Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Liite

Kuva

Muotti ja tarvikkeet näytteen valmistelua varten

(Kaikki mitat ovat millimetreinä)



Muotin pituus: 250 mm
Aine: alumiini

OSA B: MYRKYLLISYYDEN MÄÄRITTÄMISMENETELMÄT

YLEINEN JOHDANTO: OSA B

A. JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa.

B. MÄÄRITELMÄT

i) **Akuutilla myrkyllisyydellä** tarkoitetaan niitä haittavaikutuksia, jotka ilmenevät annetun ajan (yleensä 14 päivän) kuluessa aineen kerta-annokselle altistumisen jälkeen.

ii) **LD_{50}** (tappavan annoksen mediaani) on tilastollisesti johdettu aineen kerta-annos, joka aiheuttaa kuoleman puolelle altistetuista eläimistä. LD_{50}-arvo ilmaistaan aineen painona jaettuna koe-eläimen painolla (mg/kg).

iii) **LC_{50}** (tappavan pitoisuuden mediaani) on tilastollisesti johdettu aineen pitoisuus, joka aiheuttaa kuoleman altistumisen aikana tai määrätyn ajan kuluttua altistumisesta puolelle eläimistä, joita altistetaan aineelle määrätyn ajan. LC_{50}-arvo ilmaistaan aineen painona jaettuna vakiotilavuudella ilmaa (mg/l).

iv) **Ei myrkytysoireita -taso** on enimmäisannos tai altistustaso, joka ei aiheuta havaittavia myrkytysoireita.

v) **Subakuutilla tai subkroonisella myrkyllisyydellä** tarkoitetaan koe-eläimille aiheutuvia haittavaikutuksia kemikaalin annostuksen tai toistuvan päivittäisen altistumisen seurauksena lyhyenä jaksona eläinten odotetusta elinkaaresta.

vi) **Suurin siedetty annos** (MTD — Maximum Tolerated Dose) on suurin annos, josta aiheutuu eläimille myrkytysoireita ilman merkittäviä vaikutuksia eläinryhmän testinaikaiseen kuolleisuuteen.

vii) **Ihoärsytyksellä** tarkoitetaan ohimeneviä tulehduksen kaltaisia muutoksia ihossa aineelle altistumisen seurauksena.

viii) **Silmä-ärsytyksellä** tarkoitetaan ohimeneviä muutoksia silmässä, kun ainetta on levitetty silmän etupintaan.

ix) **Ihon herkistyminen** (allerginen kosketusihottuma) on testattavan aineen aiheuttama, immunologinen ihoreaktio.

Hengitettynä myrkyllinen -käsitteeseen liittyviä erityismääritelmiä

— **Aerosolilla** tarkoitetaan hiukkasia (kiinteitä tai nestemäisiä), jotka ovat yhtenäisesti dispergoituneita ilmaan.

— **Aerodynaaminen halkaisija** on hiukkasen kuviteltu halkaisija, joka on sama kuin pallolla, jonka tiheys on 1 g/cm^3 ja jolla on sama lopullinen laskeutumisnopeus kuin hiukkasella.

— **Massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani** (MMAD — Mass Median Aerodynamic Diameter) on se laskennallinen aerodynaaminen halkaisija, joka jakaa aerosolin kokojakauman puoleen massan mukaan mitattuna.

— **Geometrinen keskihajonta** (GSD — Geometric Standard Deviation) on arvioidun 84-prosenttipisteen ja arvioidun 50-prosenttipisteen suhde. Sillä ilmaistaan kumulatiivisen hiukkasjakaumakäyrän kaltevuus, olettaen että kokojaukauma on normaali.

Erityismääritelmät kiinteän annoksen menetelmää varten akuutin oraalisen myrkyllisyyden määrityksessä

— **Ilmeinen myrkyllisyys** viittaa niihin myrkytysoireisiin, joita voidaan havaita aineelle altistumisen jälkeen ja jotka ovat niin vakavia, että seuraava, suurempi annostaso voi aiheuttaa kuoleman.

— **Riskiannos** on suurin neljästä kiinteästä annostasosta, jotka voidaan antaa ilman kuolleisuusseurauksia (eläinten lopettamiset mukaan lukien).

C. MUTAGEENISYYS (alustavat karsinogeenisyystestit mukaan lukien)

Aineen mutageenisyyspotentiaalin alustavaa määritystä varten on tärkeää saada tietoja mutageenisyyden kahdesta äärimmäisestä ilmenemismuodosta: geenimutaatiosta ja kromosomimuutoksista.

Kyseiset kaksi päätepistettä määritetään seuraavien kokeiden avulla:

i) Tutkitaan geenimutaatioiden (pistemutaatioiden) syntymistä prokaryoottisissa eliöissä, kuten *Salmonella typhimuriumissa*. Myös *Escherichia colin* käyttö hyväksytään. Käytettävän eliön valinta voi määräytyä tutkittavan kemikaalin laadun mukaan.

ii) Tutkitaan kromosomimuutosten syntymistä *in vitro* -nisäkässoluviljelmissä. Voidaan myös käyttää *in vivo* -menetelmää (mikrotumatestiä tai luuydinsolujen metafaasianalyysia). Jos kontraindikaatioita ei ole, *in vitro* -menetelmät ovat hyvin suositeltavia.

D. ARVIOINTI JA TULKINTA

Eläinkokeiden ja *in vitro* -kokeiden tuloksia voidaan vain rajoitetusti ekstrapoloida suoraan ihmisiä koskeviksi. Tämä on otettava huomioon tulosten arvioinnissa ja tulkinnassa.

Jos on saatavissa todisteita kemiallisen aineen haittavaikutuksista ihmisiin, tällaisia todisteita voidaan käyttää määritettäessä aineen potentiaalisia vaikutuksia ihmispopulaatioon.

E. KIRJALLISUUSVIITTEET

Myrkkyoppi on kehittyvä kokeellinen tiedelaji, jonka eri aiheista on runsaasti kirjallisuutta. Soveltuvaa tietoa löytyy OECD:n testiohjeista (OECD Test Guidelines).

Lisähuomautukset

Eläinten hoito

Myrkyllisyystesteissä ympäristöolosuhteiden tehokas valvonta ja eläinten oikea hoito ovat oleellisia tekijöitä.

i) Sijoitus

Koe-eläimet on pidettävä eläinsalissa tai häkeissä eri lajeille sopivissa olosuhteissa. Rottien, hiirien ja marsujen tarvitsema lämpötila on 22 ± 3 °C, ja ilman suhteellisen kosteuden on oltava 30 — 70 prosenttia. Kaneja varten lämpötila on säädettävä arvoon 20 ± 3 °C ja suhteellinen kosteus arvoon 30 — 70 prosenttia.

Eräät koetekniikat ovat erityisen herkkiä lämpötilavaikutuksille. Tällaisissa tapauksissa menetelmäkuvaukseen on sisällytettävä selvitys sopivista olosuhteista. Kaikissa myrkytysoiretesteissä lämpötilaa ja kosteutta on valvottava ja tulokset on kirjattava sekä sisällytettävä loppuraporttiin.

Jos käytetään keinovalaistusta, valon ja pimeyden tulisi vaihdella yleensä 12 tunnin jaksoina. Valaistusuolosuhteiden yksityiskohdat on kirjattava ja sisällytettävä loppuraporttiin.

Eläinkokeissa on tärkeää ilmoittaa häkin tyyppi ja se, montako eläintä kussakin häkissä pidetään altistumisen ja mahdollisen tarkkailujakson aikana.

ii) Ruokinta

Ruokavalion tulee täyttää testattavan lajin kaikki ravitsemisvaatimukset. Jos testattavaa ainetta lisätään eläinten ruokaan, ruoan ravintoarvo saattaa laskea aineen ja jonkin ravintoaineen vuorovaikutuksesta.

Tällaisen reaktion vaikutus on otettava huomioon tulosten tulkinnassa.

Sellaisia ruoan epäpuhtauksia, joiden tiedetään vaikuttavan myrkyllisyyteen, ei saa esiintyä häiritsevinä pitoisuuksina.

Eläinten hyvinvointi

Koemenetelmien kehittämisessä eläinten hyvinvointiin on kiinnitetty tarpeellista huomiota. Jäljempänä on muutama esimerkki. Tarkat sanamuodot tai ehdot löytyvät menetelmäkuvauksista.

— Akuutin oraalisen myrkyllisyyden määrityksessä on otettu käyttöön vaihtoehtoinen kiinteän annoksen menetelmä, jossa testi ei välttämättä aiheuta kuolleisuuttta. Menetelmä edellyttää pienempää eläinmäärää ja aiheuttaa vähemmän kipua ja ahdistusta kuin perinteiset akuutin oraalisen myrkyllisyyden määritysmenetelmät.

— Eläinten määrä on pienennetty tieteellisesti hyväksyttävään minimiin. Menetelmissä B.1 ja B.3 testataan vain viisi samaa sukupuolta olevaa eläintä. Ihon herkistymismääritykseen marsun avulla (menetelmä B.6) tarvitaan vain kymmenen eläintä (negatiiviseen kontrolliryhmään riittää viisi eläintä). Myös *in vivo* -kokeiden avulla tehtävien mutageenisyysmääritysten positiivista kontrolliryhmää on pienennetty (menetelmät B.11 ja B.12).

— Eläimille aiheutuva kipu ja ahdistus on minimoitu. Eläimet, joilla on vakavia ja pitkittyneitä ahdistuneisuuden ja kivun oireita, voidaan tarvittaessa lopettaa, eikä tutkittavia aineita tarvitse antaa tavalla, jonka tiedetään aiheuttavan selvää kipua ja ahdistusta syövyttävien tai ärsyttävien ominaisuuksien vuoksi (menetelmät B.1, B.2 ja B.3).

— Rajatestien avulla rajoitetaan turhan suurien annosten käyttöä, ei pelkästään akuutin myrkyllisyyden testissä (menetelmät B.1, B.2 ja B.3), vaan myös mutageenisyyden *in vivo* -määrityksessä (menetelmät B.11 ja B.12).

— Ärsyttävyystestin strategian avulla voidaan, jos tarpeelliset tieteelliset todisteet ovat saatavissa, jättää testi tekemättä tai rajoittaa se yhteen eläinkokeeseen.

Tällaiset tieteelliset todisteet voivat perustua aineen fysikaalis-kemiallisiin ominaisuuksiin, aiemmin tehtyjen testien tuloksiin tai asianmukaisesti validoitujen *in vitro* -testien tuloksiin. Jos esimerkiksi aineen akuuttia myrkyllisyyttä ihon kautta annettuna on testattu rajatestimenetelmällä (menetelmä B.3), eikä ihoärsytystä ole havaittu, ihoärsytystestejä (menetelmä B.4) ei ehkä tarvitse jatkaa. Samoin aineita, jotka on ihoärsytystutkimuksen avulla (menetelmä B.4) selvästi todettu syövyttäviksi tai vakavaa ihoärsytystä aiheuttaviksi, ei enää tarvitse testata silmä-ärsytyksen osalta (menetelmä B.5).

B.1 AKUUTTI ORAALINEN MYRKYLLISYYS

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattavaa ainetta annetaan usealle koe-eläinryhmälle porrastettuina annoksina (yksi annos ryhmää kohti) suun kautta letkulla. Annoskoot voivat perustua alueenmääritystesteihin. Annostelun jälkeen eläimiä tarkkaillaan oireiden ja kuolemien suhteen. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu. Menetelmä on lähinnä tarkoitettu jyrsijöiden avulla tehtäviin kokeisiin.

Eläimet, joilla on vakavia ja pitkittyneitä ahdistuneisuuden ja kivun oireita, voidaan tarvittaessa lopettaa. Testattavia aineita ei tarvitse antaa tavalla, jonka tiedetään aiheuttavan selvää kipua ja ahdistusta syövyttävien tai ärsyttävien ominaisuuksien vuoksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Ennen testiä eläinten elinolosuhteet pidetään tietyntyyppisinä vähintään viiden päivän ajan testin suorittamista silmälläpitäen. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan käsittelyryhmiin. Tarvittaessa aine liuotetaan tai sekoitetaan sopivaan liuottimeen. Ensin tulisi harkita vesiliuoksen käyttöä, seuraavaksi kasviöljyliuoksen käyttöä ja tämän jälkeen mahdollista liuottamista johonkin muuhun apuaineeseen tai suspensioon. Vedettömien liuottimien merkitykselliset myrkyllisyysominaisuudet on selvitettävä ennen testiä tai sen aikana. Jyrsijöiden kohdalla liuoksen tilavuuden ei yleensä tulisi ylittää arvoa 10 ml/kg kehonpainoa, paitsi käytettäessä vesiliuoksia, jolloin yläraja on 20 ml/kg. Testiliuoksen tilavuuden vaihtelut tulee minimoida säätämällä pitoisuutta siten, että tilavuus voidaan pitää vakiona kaikilla annostasoilla.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Ellei kontraindikaatioita ole, rotan käyttöä suositellaan. Testiin käytetään yleisiä laboratoriokantoja. Testin alussa

kumpaakaan sukupuolta edustavien eläinten painonvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 20 % sukupuolen keskiarvosta.

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Jokaista annostasoa kohti tarvitaan vähintään viisi jyrsijää, joiden on oltava samaa sukupuolta. Jos käytetään naaraita, ne eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä. Jos on käytettävissä tietoja, joiden mukaan jompikumpi sukupuoli on selvästi toista herkempi, kokeessa on käytettävä tätä sukupuolta.

Huomautus: Jos akuutin myrkyllisyyden testissä käytetään jyrsijöitä kehittyneempiä eläimiä, on harkittava pienempää eläinmäärää.

Annokset valitaan huolella, ja kohtuullisen myrkyllisten annosten ylittämistä on vältettävä kaikin keinoin. Tällaisissa kokeissa on vältettävä tappavien annosten antamista.

1.6.2.3 *Annostasot*

Annostasoja on oltava tarpeellinen määrä, kuitenkin vähintään kolme. Annostasot jaetaan siten, että saadaan jakauma myrkytysoireiden ja kuolleisuuden suhteen. Tietojen perusteella tulisi voida piirtää annos/vaste-käyrä, ja LD_{50}-arvo tulisi määrittää aina kun se vain on mahdollista.

1.6.2.4 *Rajatesti*

Kun käytetään jyrsijöitä, voidaan tehdä yhden annostason rajatesti (vähintään 2 000 mg/kg) viiden koiraan ja viiden naaraan ryhmälle edellä kuvattujen menetelmien mukaan. Jos aineeseen liittyvää kuolleisuutta esiintyy, on harkittava kattavaa testiä.

1.6.2.5 *Tarkkailujakso*

Tarkkailujakson minimipituus on 14 päivää. Jakson pituus ei ole ehdottoman kiinteä, vaan sitä voidaan tarvittaessa säätää myrkytysoireiden, oireiden alkamisnopeuden ja toipumisjakson mukaan. Myrkytysoireiden ilmestymis- ja häviämisajankohta sekä kuoleman ajankohta ovat tärkeät, etenkin jos kuolemilla on taipumus "viivästyä".

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläinten on paastottava ennen aineen antamista. Rotat pidetään ilman ruokaa yön yli. Jos käytetään eläimiä, joilla on rottia nopeampi aineenvaihdunta, lyhyempikin paasto riittää. Vedensaantia ei rajoiteta. Seuraavana päivänä eläimet punnitaan ja testattavaa ainetta annetaan letkulla kerta-annoksena. Jos ei voida käyttää kerta-annosta, annos voidaan jakaa osiin, jotka annetaan 24 tunnin kuluessa. Annostelun jälkeen eläimiä voidaan pitää vielä kolme tai neljä tuntia ilman ruokaa. Jos annos on jaettu osiin ja annostelujakso on pitkä, eläimille on ehkä annettava vettä ja ruokaa annostelujakson aikana.

Annostelun jälkeen eläimiä tarkkaillaan säännöllisesti ja tulokset kirjataan. Jokaisesta eläimestä tulee olla oma kirjanpitonsa. Ensimmäisen päivän aikana havaintoja on tehtävä usein.

Vähintään kerran työpäivässä on tehtävä huolellinen kliininen tutkimus. Muut havainnot tehdään päivittäin ja eläinhukka minimoidaan soveltuvin toimenpitein (kuolleet eläimet jäädytetään tai niille tehdään ruumiinavaus ja heikot tai kuolevat eläimet eristetään tai lopetetaan). Tarkkaillaan ihon, turkin, silmien, limakalvojen, hengitysteiden, verenkierron, autonomisen hermoston, keskushermoston, somatomotorisen aktiviteetin ja käyttäytymismallin muutoksia. Erityisesti on tarkkailtava vapinaa, kouristuksia, syljeneritystä, ripulia, letargiaa, unta ja koomaa. Kuoleman ajankohta on kirjattava niin tarkoin kuin mahdollista.

Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu. Kaikki huomattavan suuret patologiset muutokset on kirjattava. Histopatologista tutkimusta varten otetaan kudosnäytteet voimassa olevan ohjeen mukaan.

Arviointi myrkyllisyydestä toisen sukupuolen kohdalla

Kun yhdelle sukupuolelle tehty koe on saatu päätökseen, ainetta annostellaan vähintään viidelle toisen sukupuolen edustajalle, jotta voitaisiin todeta, ovatko tämän sukupuolen edustajat aineelle huomattavasti herkempiä kuin toisen sukupuolen edustajat. Pienemmänkin eläinmäärän käyttöä voidaan perustella yksittäisissä tapauksissa. Jos on käytettävissä tietoja, joiden mukaan testatun sukupuolen eläimet ovat huomattavasti herkempiä, toista sukupuolta ei tarvitse testata.

2 TIEDOT

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa jokaisen ryhmän kohdalla on eläinten määrä kokeen alussa, yksittäisten eläinten kuolinajankohdat, niiden eläinten määrä, joilla on muita myrkyllisyydestä johtuvia oireita, myrkytysoireiden kuvaus ja ruumiinavauslöydökset. Yksittäisten eläinten painot on kirjattava välittömästi ennen aineen annostelua, sen jälkeen viikoittain sekä lopuksi kuoleman jälkeen. Painonmuutokset on laskettava ja kirjattava, kun eläin pysyy hengissä kauemmin kuin yhden vuorokauden. Eläimet, jotka on lopetettu aineen aiheuttaman ahdistuksen ja kipujen takia, luokitellaan aineen vaikutuksesta kuolleiksi. LD_{50} voidaan määrittää yleisesti tunnetun menetelmän mukaan. Tietojen arviointiin tulee sisältyä mahdolliset yhteydet eläimen aineelle altistamisen ja kaikkien poikkeavuuksien esiintymisen ja esiintymien vakavuuden välillä. Tällaisia poikkeavuuksia ovat esimerkiksi käyttäytymismuutokset, kliiniset muutokset, painonmuutokset, kuolleisuus ja muut toksikologiset vaikutukset.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio, jne.

— testiolosuhteet

— annostasot (annoksen suuruus apuaine mukaan lukien sekä mahdollinen testattavan aineen pitoisuus)

— altistettujen eläinten sukupuoli

— vastetietojen luokittelu sukupuolen ja annostason mukaan (kokeen aikana kuolleiden tai lopetettujen eläinten määrä, niiden eläinten määrä, joilla on myrkyllisyydestä johtuvia oireita, ja altistettujen eläinten määrä)

— annostelun jälkeisten kuolemien ajankohta, syyt ja kriteerit eläinten lopettamiseen

— kaikki muut havainnot

— LD_{50}-arvo sen sukupuolen kohdalla, jolle on tehty 14 päivän pituinen kattava koe (määritysmenetelmä on ilmoitettava)

— LD_{50}-arvon 95 prosentin luottamusväli (mahdollisuuksien mukaan)

— annos-kuolleisuuskäyrä ja sen kaltevuus (määritysmenetelmän sallimissa rajoissa)

— ruumiinavauslöydökset

— muut histopatologiset löydökset

— toisen sukupuolen testin tulokset (jos on tehty)

— tulosten pohdinta (erityistä huomiota on kiinnitettävä kokeen aikana tehtyjen koe-eläinten lopetettamisien LD_{50}-arvoon kohdistamaan vaikutukseen)

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.1 bis AKUUTTI ORAALINEN MYRKYLLISYYS — KIINTEÄN ANNOKSEN MENETELMÄ

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tämän kokeen avulla saadaan tietoa haittavaikutuksista, joita voi esiintyä lyhyen ajan kuluessa testattavan aineen kerta-annoksen nielemisen jälkeen.

Kiinteän annoksen menetelmä on kaksiosainen.

Alustavassa kokeessa yksittäisille samaa sukupuolta oleville eläimille annetaan vuorotellen suun kautta letkulla eri kokoisia annoksia, joiden vaikutuksia tarkkaillaan. Näin saadaan tietoa annoksen ja myrkyllisyyden välisestä suhteesta sekä arvio pienimmästä tappavasta annoksesta. Alustavaa koetta varten riittää yleensä viisi eläintä.

Pääkokeessa ainetta annetaan suun kautta letkulla viidelle naaraalle ja viidelle koiraalle. Annoskooksi (5, 50, 500 tai 2 000 mg/kg) valitaan se määrä, joka aiheuttaa alustavan kokeen perusteella todennäköisesti ilmeisiä myrkytysoireita (katso kohtaa 1.2 Määritelmät), mutta ei kuolemia.

Aineen antamisen jälkeen tarkkaillaan vaikutusten ilmenemistä.

Jos ensimmäinen käytetty annostaso aiheuttaa ilmeisiä myrkytysoireita, mutta ei aineeseen liittyvää kuolleisuutta, lisäkokeita ei tarvita.

Jos ilmeisiä myrkytysoireita ei ole nähtävissä ensimmäisen annoksen jälkeen, koe toistetaan ensimmäistä annosta lähinnä suuremmalla annoksella. Jos eläimiä kuolee tai jos esiintyy vakavia myrkytysoireita, jotka vaativat eläinten lopettamista, koe toistetaan ensimmäistä annosta lähinnä pienemmällä annoksella.

Tällä menetelmällä voidaan määrittää riskiannos (katso kohtaa 1.2 Määritelmät) eli suurin alustavasta kokeesta saaduista annoksista, joka voidaan antaa ilman kuolleisuuden esiintymistä (lopettamiset mukaan lukien).

Eläimet, joilla on vakavia ja pitkittyneitä ahdistuneisuuden ja kivun oireita, voidaan tarvittaessa lopettaa. Testattavia aineita ei tarvitse antaa tavalla, jonka tiedetään aiheuttavan selvää kipua ja ahdistusta syövyttävien tai ärsyttävien ominaisuuksien vuoksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

1.6.1.1 *Koe-eläimet*

Ellei kontraindikaatioita ole, rotan käyttöä suositellaan. Testiin käytetään yleisiä laboratoriokantoja. Testin alussa

kumpaakaan sukupuolta edustavien eläinten painonvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 20 % sukupuolen keskiarvosta.

Ennen testiä eläinten elinolosuhteet pidetään tietyntyyppisinä vähintään viiden päivän ajan testin suorittamista silmälläpitäen. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan alustavaa koetta ja pääkoetta varten. Käytännössä pääkoetta varten saatetaan tarvita vain yhtä ryhmää kumpaakin sukupuolta.

1.6.1.2 *Annoksen valmistelu ja antaminen*

Tarvittaessa aine liuotetaan tai sekoitetaan sopivaan liuottimeen. Suosituksen mukaan on ensin mahdollisuuksien mukaan harkittava vesiliuoksen käyttöä, seuraavaksi kasviöljyliuoksen käyttöä ja tämän jälkeen mahdollista liuottamista johonkin muuhun apuaineeseen tai suspensioon. Vedettömien liuottimien merkitykselliset myrkyllisyysominaisuudet on selvitettävä ennen testiä tai sen aikana. Jyrsijöiden kohdalla liuoksen tilavuuden ei yleensä tulisi ylittää arvoa 10 ml/kg, paitsi käytettäessä vesiliuoksia, jolloin yläraja on 20 ml/kg. Testiliuoksen tilavuuden vaihtelut tulee minimoida säätämällä pitoisuutta siten, että tilavuus voidaan pitää vakiona kaikilla annostasoilla.

Eläinten on paastottava ennen aineen antamista. Rotat pidetään ilman ruokaa yön yli. Jos käytetään eläimiä, joilla on rottia nopeampi aineenvaihdunta, lyhyempikin paasto riittää. Vedensaantia ei rajoiteta. Seuraavana päivänä eläimet punnitaan ja testattavaa ainetta annetaan letkulla kerta-annoksena. Jos ei voida käyttää kerta-annosta, annos voidaan jakaa osiin, jotka annetaan 24 tunnin kuluessa. Annostelun jälkeen eläimiä voidaan pitää vielä kolme tai neljä tuntia ilman ruokaa. Jos annos on jaettu osiin ja annostelujakso on pitkä, eläimille on ehkä annettava vettä ja ruokaa annostelujakson aikana.

1.6.2 **Menetelmä**

1.6.2.1 *Alustava koe*

Tutkitaan erikokoisten annosten vaikutusta yksittäisiin eläimiin. Yleensä käytetään naaraita, ellei ole tietoja, joiden mukaan koiras on herkempi sukupuoli. Annokset annetaan eläimille vuorotellen odottaen vähintään 24 tuntia eläinten välillä. Kaikkia eläimiä tarkkaillaan huolellisesti myrkytysoireiden suhteen vähintään seitsemän päivän ajan. Jos kohtuullisen myrkyllisyyden oireet jatkuvat enemmän kuin seitsemän päivää, eläimen tarkkailua jatketaan enintään seitsemän päivää. Alkuannoksiksi voidaan ottaa 5, 50, 500 ja 2 000 mg/kg. Jos ensin valittu annos ei aiheuta vakavia myrkytysoireita ja seuraava taso aiheuttaa kuoleman, on tarpeen kokeilla yhdellä tai useammalla välitasolla tilanteen mukaan. Näin pitäisi voida määrittää sekä myrkytysoireita aiheuttava(t) annostaso(t) että kuoleman aiheuttava minimiannos.

Mahdollisuuksien mukaan alkuannos valitaan samankaltaisista kemikaaleista saatujen tulosten perusteella. Jos tällaista tietoa ei ole, alkuannokseksi voidaan valita 500 mg/kg. Jos alkuannoksesta ei seuraa mitään myrkytysoireita, tutkitaan seuraavaksi korkeamman annostason vaikutusta. Ellei kuolleisuutta esiinny annoksen ollessa 2 000 mg/kg, alustavaa koetta ei jatketa, vaan jatketaan pääkokeella tätä annostasoa käyttäen. Jos alkuannoksesta (esimerkiksi annoksesta 500 mg/kg) seuraa vakavia vaikutuksia, jotka edellyttävät lopettamisia, toiselle eläimelle annetaan seuraavaksi pienempi annos. Jos tämä eläin ei kuole, uusille eläimille voidaan antaa annoksia, joiden taso on kiinteiden tasojen välillä. Yleensä viisi eläintä riittää tätä menetelmää varten.

1.6.2.2 *Pääkoe*

Jokaista annostasoa kohti tarvitaan vähintään kymmenen eläintä (viisi naarasta ja viisi urosta). Naarat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä.

Kiinteän annoksen menetelmän periaatteisiin kuuluu, että pääkokeessa käytetään vain kohtuullisen myrkyllisiä annoksia. Testattavan aineen antamista tappavina annoksina on vältettävä.

Kokeessa käytettäväksi annostasoksi valitaan yksi neljästä kiinteästä annostasosta (5, 50, 500 tai 2000 mg/kg). Alkuannostason tulisi olla sellainen, että se aiheuttaa todennäköisesti ilmeisiä myrkytysoireita, mutta ei aineeseen

liittyviä kuolemia (lopettamiset mukaan lukien; tapaturmaisia kuolemia ei lasketa, mutta ne kirjataan). Jos tämä taso aiheuttaa ilmeisiä myrkytysoireita, mutta ei aineeseen liittyvää kuolleisuutta, testiä ei tarvitse jatkaa.

Jos valittu annostaso ei aiheuta ilmeisiä myrkytysoireita, testi on toistettava seuraavaksi korkeinta annostasoa käyttäen. Eläimiä on kuitenkin tarkkailtava jakson loppuun asti. Jos esiintyy lopettamisia edellyttäviä vakavia myrkytysoireita tai aineeseen liittyvää kuolleisuutta, alemman annostason testi toistetaan. Myös tässä tapauksessa eloonjääneitä eläimiä tarkkaillaan huolellisesti jakson loppuun asti.

Annostelupäivän aikana huolellinen kliininen tutkimus on tehtävä vähintään kahdesti ja tämän jälkeen vähintään kerran päivässä. Selvästi kivusta kärsivät tai vakavasti ahdistuneet eläimet on lopetettava. Annostelun jälkeisten ensimmäisten päivien aikana on tehtävä lisähavaintoja, jos eläimillä on jatkuvia myrkytysoireita. Koe voidaan keskeyttää, jos on ilmeistä, että alkuannostaso on ollut liian korkea.

Tarkkaillaan ihon, turkin, silmien, limakalvojen, hengitysteiden, verenkierron, autonomisen hermoston, keskushermoston, somatomotorisen aktiviteetin ja käyttäytymismallin muutoksia. Erityisesti on tarkkailtava vapinaa, kouristuksia, syljeneritystä, ripulia, letargiaa, unta ja koomaa.

Yksittäisten eläinten painot on kirjattava välittömästi ennen aineen annostelua, seuraavan kolmen päivän ajan päivittäin ja sen jälkeen viikottain. Kokeen aikana kuolleet ja eläimet punnitaan ja niille tehdään ruumiinavaus. Myös kokeen päätyttyessä hengissä oleville eläimille tehdään ruumiinavaus, kun ne on ensin punnittu ja lopetettu. Kaikki huomattavat patologiset muutokset on kirjattava. Histopatologista tutkimusta varten otetaan kudosnäytteet voimassa olevan ohjeen mukaan.

Toisen (tai poikkeustapauksissa kolmannen) annostason tutkimus voi olla tarpeen. Tarve vaihtelee edellisestä annostasosta saatujen tulosten mukaan.

Jos aine aiheuttaa kuolleisuutta annostason ollessa 5 mg/kg (tai jos alustavan kokeen perusteella voidaan päätellä, että tällainen annostaso johtaa kuolleisuuteen), voi olla tarpeen jatkaa aineen akuutin myrkyllisyyden tutkimista.

2 TIEDOT

Yhteenveto alustavan kokeen ja pääkokeen tiedoista esitetään taulukkona, jossa jokaisen ryhmän kohdalla on eläinten määrä kokeen alussa, myrkytysoireita osoittavien eläinten määrä, kuolleiden tai lopetettujen eläinten määrä, myrkytysoireiden kuvaus sekä pääkokeen kohdalla aineeseen liittyvän kuolleisuuden esiintyminen, myrkytysoireiden esiintyminen ajan funktiona sekä ruumiinavauslöydökset. Painonmuutokset on laskettava ja kirjattava, kun eläin pysyy hengissä kauemmin kuin yhden vuorokauden.

Eläimet, jotka on lopetettu aineen aiheuttaman ahdistuksen ja kipujen takia, luokitellaan aineen vaikutuksesta kuolleiksi.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot sekä alustavan kokeen että pääkokeen osalta:

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio, jne.

— testiolosuhteet

— annostasot (annoksen suuruus apuaine mukaan lukien sekä mahdollinen testattavan aineen pitoisuus)

— kaikki tulokset kaikista tutkituista annostasoista

— vastetietojen luokittelu sukupuolen ja annostason mukaan (kokeen aikana kuolleiden tai lopetettujen eläinten määrä, niiden eläinten määrä, joilla on myrkyllisyydestä johtuvia oireita, altistettujen eläinten määrä)

— ajankohta, jolloin myrkytysoireet ensin näkyivät ja tieto oireiden mahdollisesta häviämisestä

— jos eläimiä on kuollut tai lopetettu, ilmoitetaan annostelun jälkeisten kuolemien ajankohta ja syyt sekä kriteerit eläinten lopettamiseen

— kaikki havainnot

— ruumiinavauslöydökset

— muut histopatologiset löydökset

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta mukaan lukien kokeiden avulla löydetyt ilmeiset myrkytysoireet ja riskiannostaso.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

ANNOS	TULOKSET	TULKINTA
5 mg/kg	Eloonjääneiden osuus alle 100 %	Yhdisteet ovat HYVIN MYRKYLLISIÄ.
	Eloonjääneitä 100 %, ilmeisiä myrkytysoireita	Yhdisteet ovat MYRKYLLISIÄ.
	Eloonjääneitä 100 %, ei ilmeisiä myrkytysoireita	Katso kohdan 50 mg/kg tuloksia.
50 mg/kg	Eloonjääneiden osuus alle 100 %	Yhdisteet voivat olla MYRKYLLISIÄ tai HYVIN MYRKYLLISIÄ; katso kohdan 50 mg/kg tuloksia.
	Eloonjääneitä 100 %, ilmeisiä myrkytysoireita	Yhdisteet ovat HAITALLISIA.
	Eloonjääneitä 100 %, ei ilmeisiä myrkytysoireita	Katso kohdan 500 mg/kg tuloksia.
500 mg/kg	Eloonjääneiden osuus alle 100 %	Yhdisteet voivat olla MYRKYLLISIÄ tai HAITALLISIA; katso kohdan 5 mg/kg tuloksia.
	Eloonjääneitä 100 %, ilmeisiä myrkytysoireita	Yhdisteiden ei katsota aiheuttavan merkittäviä akuutteja myrkytysoireita.
	Eloonjääneitä 100 %, ei ilmeisiä myrkytysoireita	Katso kohdan 2 000 mg/kg tuloksia.
2 000 mg/kg	Eloonjääneiden osuus alle 100 %	Katso kohdan 500 mg/kg tuloksia
	Eloonjääneitä 100 %, ilmeisiä myrkytysoireita tai ei ilmeisiä myrkytysoireita	Yhdisteet eivät aiheuta merkittäviä akuutteja myrkytysoireita

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 **VIITTEET**

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.2 AKUUTTI MYRKYLLISYYS (HENGITETTYNÄ)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää aineen hiukkaskokojakauma, höyrynpaine, sulamispiste, kiehumispiste, leimahduspiste ja mahdollinen räjähtävyys ennalta.

Katso myös yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Koe-eläimet jaetaan useaan ryhmään, jotka altistetaan testattavalle aineelle määrätyn ajan porrastettuja pitoisuuksia käyttäen (yksi pitoisuus ryhmää kohti). Tämän jälkeen eläimiä tarkkaillaan oireiden ja kuolemien suhteen. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu.

Eläimet, joilla on vakavia ja pitkittyneitä ahdistuneisuuden ja kivun oireita, voidaan tarvittaessa lopettaa. Testattavia aineita ei tarvitse antaa tavalla, jonka tiedetään aiheuttavan selvää kipua ja ahdistusta syövyttävien tai ärsyttävien ominaisuuksien vuoksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Ennen testiä eläinten elinolosuhteet pidetään tietyntyyppisinä vähintään viiden päivän ajan testin suorittamista silmälläpitäen. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan haluttuun määrään ryhmiä. Eläimille ei tarvitse antaa simuloitua altistusta, ellei käytettävän altistuslaitteen tyyppi tätä vaadi.

Jos testattava aine on kiinteässä muodossa, se on tarpeen mukaan mikronoitava sopivan hiukkaskoon saavuttamiseksi.

Tarvittaessa voidaan käyttää sopivaa liuotinta, jonka avulla saadaan helpommin ilmakehään sopiva pitoisuus ainetta. Tällöin on käytettävä liuotinkontrolliryhmää. Jos annostelua varten käytetään liuotinta tai muita lisäaineita, on varmistettava, että ne eivät aiheuta myrkytysoireita. Soveltuvissa tapauksissa voidaan käyttää aikaisempia tietoja.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Ellei kontraindikaatioita ole, rotan käyttöä suositellaan. Testiin käytetään yleisiä laboratoriokantoja. Testin alussa kumpaakaan sukupuolta edustavien eläinten painonvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 20 % sukupuolen keskiarvosta.

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Jokaista annostasoa kohti tarvitaan vähintään kymmenen jyrsijää (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä.

Huomautus: Käytettäessä rottaa kehittyneempiä eläimiä akuutin myrkyllisyyden testaukseen on harkittava pienempää eläinmäärää kuin rottien kohdalla. Annokset valitaan huolella, ja kohtuullisen myrkyllisten annosten ylittämistä on vältettävä kaikin keinoin. Tällaisissa kokeissa on vältettävä tappavien annosten antamista.

1.6.2.3 *Altistuspitoisuudet*

Pitoisuuksia on oltava tarpeellinen määrä, kuitenkin vähintään kolme. Ne jaetaan siten, että saadaan jakauma myrkytysoireiden ja kuolleisuuden suhteen. Tietojen perusteella tulisi voida piirtää pitoisuus/kuolleisuus-käyrä, ja LC_{50}-arvo tulisi määrittää aina kun se vain on mahdollista.

1.6.2.4 *Rajatesti*

Jos kymmentä koe-eläintä (viittä naarasta ja viittä urosta) altistetaan neljän tunnin ajan kaasulle tai neste- tai hiukkasaerosolille siten, että pitoisuus ilmassa on 5 mg/l (jos aineen fysikaaliset tai kemialliset ominaisuudet – esimerkiksi räjähtävyysominaisuudet – estävät tämän pitoisuuden käytön, valitaan suurin mahdollinen pitoisuus), eikä yhdisteeseen liittyvää kuolleisuutta voida havaita 14 vuorokaudessa, lisäkokeita ei ehkä tarvita.

1.6.2.5 *Altistusaika*

Altistusaika on neljä tuntia.

1.6.2.6 *Laitteet*

Eläimiä testataan hengityslaitteella, jonka dynaaminen ilmanvirtaus takaa, että koko ilmamäärä vaihtuu vähintään 12 kertaa tunnissa. Näin varmistetaan riittävä happipitoisuus ja altistusilmakehän tasainen jakaantuminen. Jos käytetään kammiota, sen rakenteen on oltava sellainen, että eläinten elintilan ja altistumistehokkuuden suhde on optimaalinen. Yleinen sääntö kammion ilmakehän stabiiliuden varmistamiseksi on, että eläinten kokonaistilavuus saa olla enintään 5 % kammion tilavuudesta. Eläinkohtaisissa kammioissa voidaan käyttää oronasaalista, vain päähän kohdistuvaa tai koko kehoon kohdistuvaa altistamista. Kahden ensimmäisen tavan avulla aineen imeytyminen muuta kautta voidaan minimoida.

1.6.2.7 *Tarkkailujakso*

Tarkkailujakson minimipituus on 14 päivää. Jakson pituus ei ole ehdottoman kiinteä, vaan sitä voidaan tarvittaessa säätää myrkytysoireiden, oireiden alkamisnopeuden ja toipumisjakson mukaan. Myrkytysoireiden ilmestymis- ja häviämisajankohta sekä kuoleman ajankohta ovat tärkeät, etenkin jos kuolemilla on taipumus "viivästyä".

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläimet punnitaan ja pannaan valittuun laitteeseen, jossa niitä altistetaan halutulle pitoisuudelle neljän tunnin ajan pitoisuustasapainon saavuttamisen jälkeen. Tasapainon saavuttamiseen kuluvan ajan tulee olla lyhyt. Testilämpötilana käytetään arvoa 22 ± 3 °C. Suhteellisen kosteuden tulisi olla 30 — 70 %, mutta joissakin tapauksissa (eräiden aerosolien testauksissa) tämä ei ehkä ole mahdollista. Pitämällä kammiossa alipainetta (≤ 5 mm H_2O) voidaan estää aineen vuotaminen ympäristöön. Altistuksen aikana eläimille ei anneta ruokaa eikä vettä. Testi-ilmakehän tuottamiseen ja ylläpitämiseen on käytettävä soveltuvia järjestelmiä, joiden avulla voidaan varmistaa se, että stabiilit altistusolosuhteet saavutetaan mahdollisimman nopeast. Kammion suunnittelussa ja sen käytössä on pyrittävä siihen, että testi-ilmakehä jakautuu kammioon mahdollisimman tasaisesti.

Seuraavia suureita on mitattava tai valvottava:

a) ilmanvirtaus (jatkuvasti)

b) testattavan aineen todellinen pitoisuus hengitysilmassa, vähintään kolme kertaa altistuksen aikana (eräät ilmakehät, esimerkiksi aerosolit, voivat suurina pitoisuuksina vaatia edellyttää tiheämpää valvontaa). Päivittäisen altistuksen aikana pitoisuusvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 15 % keskiarvosta. Eräiden aerosolien kohdalla tällaista säätötasoa ei ehkä voida saavuttaa, jolloin on hyväksyttävä laajempi alue. Aerosoleille on tehtävä hiukkaskokoanalyysi riittävän usein (vähintään kerran koeryhmää kohti).

c) lämpötila ja kosteus (jatkuvasti, jos mahdollista).

Altistuksen aikana ja sen jälkeen eläimiä tarkkaillaan systemaattisesti ja tulokset kirjataan. Jokaisesta yksittäisestä eläimestä tulee olla oma kirjanpitonsa. Ensimmäisen päivän aikana havaintoja on tehtävä usein. Vähintään kerran työpäivässä on tehtävä huolellinen kliininen tutkimus. Muut havainnot tehdään päivittäin ja eläinhukka minimoidaan soveltuvin toimenpitein (kuolleet eläimet jäädytetään tai niille tehdään ruumiinavaus ja heikot tai kuolevat eläimet eristetään tai lopetetaan).

Tarkkaillaan ihon, turkin, silmien, limakalvojen, hengitysteiden, verenkierron, autonomisen hermoston, keskushermoston, somatomotorisen aktiviteetin ja käyttäytymismallin muutoksia. Erityisesti on tarkkailtava vapinaa, kouristuksia, syljeneritystä, ripulia, letargiaa, unta ja koomaa. Kuoleman ajankohta on kirjattava niin tarkoin kuin mahdollista. Eläimet on punnittava yksitellen viikottain altistuksen jälkeen sekä kuoleman jälkeen.

Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu. Ruumiinavauksessa kiinnitetään erityistä huomiota ylä- ja alahengitysteiden muutoksiin. Kaikki huomattavan suuret patologiset muutokset on kirjattava. Histopatologista tutkimusta varten otetaan kudosnäytteet voimassa olevan ohjeen mukaan.

2 TIEDOT

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa jokaisen ryhmän kohdalla on eläinten määrä kokeen alussa, yksittäisten eläinten kuolinajankohdat, niiden eläinten määrä, joilla on muita myrkyllisyydestä johtuvia oireita, myrkytysoireiden kuvaus ja ruumiinavauslöydökset. Yksittäisten eläinten painot on kirjattava välittömästi ennen aineen annostelua, sen jälkeen viikoittain ja kuoleman jälkeen. Painonmuutokset on laskettava ja kirjattava, kun eläin pysyy hengissä kauemmin kuin yhden vuorokauden. Eläimet, jotka on lopetettu aineen aiheuttaman ahdistuksen ja kipujen takia, luokitellaan aineen vaikutuksesta kuolleiksi. LD_{50} voidaan määrittää yleisesti tunnetun menetelmän mukaan. Tietojen arviointiin tulee sisältyä mahdolliset yhteydet eläimen aineelle altistamisen ja kaikkien poikkeavuuksien esiintymisen ja vakavuuden välillä. Tällaisia poikkeavuuksia ovat esimerkiksi käyttäytymismuutokset, kliiniset muutokset, painonmuutokset, kuolleisuus ja muut myrkytysoireet.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio, jne.

— testiolosuhteet, altistuslaitteen kuvaus (rakenne, tyyppi, mitat, ilmalähde, aerosolin tuottamiseen käytetty järjestelmä, ilmastointijärjestelmä, mahdollisen testauskammion olosuhteet ja lämpötilan, kosteuden, aerosolin pitoisuuden sekä aerosolin hiukkaskokojakauman mittauslaitteiden tiedot).

Altistustiedot

Altistustiedot kootaan taulukkoon, josta ilmenevät myös keskiarvot ja vaihtelut (esimerkiksi keskihajonta). Mahdollisuuksien mukaan esitetään seuraavat tiedot:

a) ilmanvirtaus hengityslaitteen kautta

b) ilman lämpötila ja kosteus

c) nimelliset pitoisuudet (hengityslaitteeseen syötetty kokonaismäärä ainetta jaettuna ilman tilavuudella)

d) liuottimen laatu, jos liuotinta on käytetty

e) todelliset pitoisuudet hengitysilmassa

f) Massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (GDS)

g) aika, joka kului tasapainon saavuttamiseen

h) altistusaika.

— vastetietojen luokittelu sukupuolen ja annostason mukaan (kokeen aikana kuolleiden tai lopetettujen eläinten määrä, niiden eläinten määrä, joilla on myrkyllisyydestä johtuvia oireita, altistettujen eläinten määrä)

— annostelun jälkeisten kuolemien ajankohta, syyt ja kriteerit eläinten lopettamiseen

— kaikki havainnot

— kummankin sukupuolen LD_{50}-arvo tarkkailujakson lopussa (määritysmenetelmä on ilmoitettava)

— LD_{50}-arvon 95 prosentin luottamusväli (mahdollisuuksien mukaan)

— annos-kuolleisuukäyrä ja sen kaltevuus (määritysmenetelmän sallimissa rajoissa)

— ruumiinavauslöydökset

— muut histopatologiset löydökset

— tulosten pohdinta (erityistä huomiota on kiinnitettävä kokeen aikana tehtyjen koe-eläinten lopetettamisien LD_{50}-arvoon kohdistamaan vaikutukseen)

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.3 AKUUTTI MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Ainetta levitetään useaan ryhmään jaettujen eläinten iholle porrastettuina annoksina (yksi annos ryhmää kohti). Tämän jälkeen eläimiä tarkkaillaan oireiden ja kuolemien suhteen. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu.

Eläimet, joilla on vakavia ja pitkittyneitä ahdistuneisuuden ja kivun oireita, voidaan tarvittaessa lopettaa. Testattavia aineita ei tarvitse antaa tavalla, jonka tiedetään aiheuttavan selvää kipua ja ahdistusta syövyttävien tai ärsyttävien ominaisuuksien vuoksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Ennen testiä eläinten elinolosuhteet pidetään tietyntyyppisinä vähintään viiden päivän ajan testin suorittamista silmälläpitäen. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan käsittelyryhmiin. Noin 24 tuntia ennen testiä turkki leikataan tai ajetaan eläinten selkäalueelta varoen naarmuttamasta ihoa, koska naarmut saattaisivat muuttaa ihon läpäisevyyttä. Vähintään 10 % ihoa peittävästä karvasta on ajeltava tai leikattava. Kiinteät aineet voidaan tarvittaessa jauhaa, ja ne on kosteutettava riittävällä vesimäärällä tai tarvittaessa muulla liuottimella hyvän ihokontaktin varmistamiseksi. Jos käytetään liuotinta, on otettava huomioon liuottimen vaikutus aineen imeytymiseen iholta. Nestemäisiä aineita käytetään yleensä laimentamattomina.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Koe-eläiminä voidaan käyttää aikuisia rottia tai kaneja. Muiden lajien käyttö on perusteltava. Testiin käytetään yleisiä laboratoriokantoja. Testin alussa kumpaakaan sukupuolta edustavien eläinten painonvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 20 % sukupuolen keskiarvosta.

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Jokaista annostasoa kohti tarvitaan vähintään viisi eläintä, joiden on oltava samaa sukupuolta. Jos käytetään naaraita, ne eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä. Jos on käytettävissä tietoja, joiden mukaan jompikumpi sukupuoli on selvästi toista herkempi, kokeessa on käytettävä tätä sukupuolta.

Huomautus: Käytettäesä rottaa kehittyneempiä eläimiä akuutin myrkyllisyyden testauksia varten on harkittava pienempää eläinmäärää kuin rottien kohdalla. Annokset valitaan huolella, ja kohtuullisen myrkyllisten annosten ylittämistä on vältettävä kaikin keinoin. Tällaisissa kokeissa on vältettävä tappavien annosten antamista.

1.6.2.3 *Annostasot*

Annostasoja on oltava tarpeellinen määrä, kuitenkin vähintään kolme. Annostasot jaetaan siten, että saadaan jakauma myrkytysoireiden ja kuolleisuuden suhteen. Annostasojen valinnassa on otettava huomioon mahdolliset ärsyttävät tai syövyttävät ominaisuudet. Tietojen perusteella tulisi voida piirtää pitoisuus/kuolleisuus-käyrä, ja LC_{50}-arvo tulisi määrittää aina kun se vain on mahdollista.

1.6.2.4 *Rajatesti*

Voidaan tehdä yhden annostason rajatesti (vähintään 2 000 mg/kg) viiden koiraan ja viiden naaraan ryhmälle edellä kuvattujen menetelmien mukaisesti. Jos aineeseen liittyvää kuolleisuutta esiintyy, on harkittava kattavaa testiä.

1.6.2.5 *Tarkkailujakso*

Tarkkailujakson minimipituus on 14 päivää. Jakson pituus ei ole ehdottoman kiinteä, vaan sitä voidaan tarvittaessa säätää myrkytysoireiden, oireiden alkamisnopeuden ja toipumisjakson mukaan. Myrkytysoireiden ilmestymis- ja häviämisajankohta sekä kuoleman ajankohta ovat tärkeät, etenkin jos kuolemilla on taipumus "viivästyä".

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläimiä pidetään yksin häkeissä. Testattavaa ainetta levitetään tasaisesti alueelle, joka on noin 10 % kehon kokonaispinta-alasta. Erittäin myrkyllisten aineiden kohdalla voidaan käyttää pienempää pinta-alaa, mutta ainetta on levitettävä mahdollisimman ohuelti ja tasaisesti niin suurelle alueelle kuin mahdollista.

Testattava ihoalue peitetään harsositeellä ja ärsyttämättömällä laastarilla koko 24 tunnin altistusjakson ajaksi. Tämän lisäksi alue on peitettävä siten, että harsoside ja aine pysyvät paikallaan eikä eläin pääse syömään ainetta. Eläin voidaan sitoa osittain siten, että se ei pysty syömään ainetta. Täyttä liikkumattomuutta ei kuitenkaan suositella.

Altistusjakson jälkeen aineen jäännökset poistetaan vedellä tai muulla sopivalla ihonpuhdistusmenetelmällä.

Havainnot tehdään ja kirjataan systemaattisesti. Jokaisesta eläimestä tulee olla oma kirjanpitonsa. Ensimmäisen päivän aikana havaintoja on tehtävä usein. Vähintään kerran työpäivässä on tehtävä huolellinen kliininen tutkimus. Muut havainnot tehdään päivittäin ja eläinhukka minimoidaan soveltuvin toimenpitein (kuolleet eläimet jäädytetään tai niille tehdään ruumiinavaus ja heikot tai kuolevat eläimet eristetään tai lopetetaan).

Tarkkaillaan turkin, käsitellyn ihon, silmien, limakalvojen, hengitysteiden, verenkierron, autonomisen hermoston, keskushermoston, somatomotorisen aktiviteetin ja käyttäytymismallin muutoksia. Erityisesti on tarkkailtava vapinaa, kouristuksia, syljeneritystä, ripulia, letargiaa, unta ja koomaa. Kuoleman ajankohta on kirjattava niin tarkoin kuin mahdollista. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu. Kaikki huomattavan suuret patologiset muutokset on kirjattava. Histopatologista tutkimusta varten otetaan kudosnäytteet voimassa olevan ohjeen mukaan.

Arviointi myrkyllisyydestä toisen sukupuolen kohdalla

Kun toiselle sukupuolelle tehty koe on saatu päätökseen, ainetta annostellaan vähintään viiden toista sukupuolta olevan eläimen ryhmälle, jotta voitaisiin todeta, ovatko tämän sukupuolen eläimet aineelle huomattavasti herkempiä. Pienemmänkin eläinmäärän käyttöä voidaan perustella yksittäisissä tapauksissa. Jos on käytettävissä tietoja, joiden mukaan testatun sukupuolen eläimet ovat huomattavasti herkempiä, toista sukupuolta ei tarvitse testata.

2 TIEDOT

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa jokaisen ryhmän kohdalla on eläinten määrä kokeen alussa, yksittäisten eläinten kuolinajankohdat, niiden eläinten määrä, joilla on muita myrkyllisyydestä johtuvia oireita, myrkytysoireiden kuvaus ja ruumiinavauslöydökset. Yksittäisten eläinten painot on kirjattava välittömästi ennen aineen annostelua, sen jälkeen viikoittain ja lopuksi kuoleman jälkeen. Painonmuutokset on laskettava ja kirjattava, kun eläin pysyy hengissä kauemmin kuin yhden vuorokauden. Eläimet, jotka on lopetettu aineen aiheuttaman ahdistuksen ja kipujen takia, luokitellaan aineen vaikutuksesta kuolleiksi. LD_{50} voidaan määrittää yleisesti tunnetun menetelmän mukaan.

Tietojen arviointiin tulee sisältyä mahdolliset yhteydet eläimen aineelle altistamisen ja kaikkien poikkeavuuksien esiintymisen ja vakavuuden välillä. Tällaisia poikkeavuuksia ovat esimerkiksi käyttäytymismuutokset, kliiniset muutokset, painonmuutokset, kuolleisuus ja muut toksikologiset vaikutukset.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio, jne.

— testiolosuhteet (mukaan lukien ihonpuhdistusmenetelmä ja siteen tyyppi: okklusiivinen tai ei-okklusiivinen)

— annostasot (annoksen suuruus apuaine mukaan lukien sekä mahdollinen testattavan aineen pitoisuus)

— altistettujen eläinten sukupuoli

— vastetietojen luokittelu sukupuolen ja annostason mukaan (kokeen aikana kuolleiden tai lopetettujen eläinten määrä, niiden eläinten määrä, joilla on myrkyllisyydestä johtuvia oireita, altistettujen eläinten määrä)

— annostelun jälkeisten kuolemien ajankohta, syyt ja kriteerit eläinten lopettamiseen

— kaikki havainnot

— LD_{50}-arvo sukupuolelle, jolle on tehty 14 päivän pituinen kattava koe (määritysmenetelmä on ilmoitettava)

— LD_{50}-arvon 95 prosentin luottamusväli (mahdollisuuksien mukaan)

— annos-kuolleisuuskäyrä ja sen kaltevuus (määritysmenetelmän sallimissa rajoissa)

— ruumiinavauslöydökset

— muut histopatologiset löydökset

— toisen sukupuolen testauksen tulokset (jos on tehty)

— tulosten pohdinta (erityistä huomiota on kiinnitettävä kokeen aikana tehtyjen koe-eläinten lopetettamisien LD_{50}-arvoon kohdistamaan vaikutukseen)

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.4 AKUUTTI MYRKYLLISYYS (IHOÄRSYTYS)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Huomioon otettavaa

Kaikki aineesta saatavat tiedot on otettava tarkoin huomioon, jotta voitaisiin minimoida testit, jotka todennäköisesti aiheuttavat vakavia oireita. Seuraavien ohjeiden avulla voidaan päättää, tarvitaanko kattava testi, riittääkö yhden eläimen tutkimus vai voidaanko testistä luopua.

i) Fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ja kemiallinen reaktiivisuus. Vahvasti happamia tai emäksisiä aineita (joiden pH-arvo on esimerkiksi pienempi kuin 2 tai suurempi kuin 11,5) ei tarvitse testata primaarisen ihoärsytyksen osalta, jos tulos on ennustettavissa. Emäs- ja happoylimäärät on myös syytä ottaa huomioon.

ii) Jos käytettävissä on luotettavat todisteet vakavista vaikutuksista, jotka on saatu luotettavasti validoitujen *in vitro* -kokeiden avulla, kattavaa testiä ei ehkä tarvita.

iii) Akuutin myrkyllisyyden testauksen tulokset. Jos ainetta on testattu ihon kautta akuutin myrkyllisyyden osalta käyttäen raja-annostasoa (2 000 mg/kg kehonpainoa) eikä ihon ärsytystä ole havaittu, uusia ihoärsytystestejä ei ehkä tarvita. Myöskään aineita, jotka on todettu erittäin myrkyllisiksi iholta imeytyvinä, ei tarvitse testata.

Ainetta levitetään useiden koe-eläimien iholle samansuuruisena kerta-annoksena. Havainnot tehdään eläimittäin. Ärsytyksen voimakkuus kirjataan ja luokitellaan määrätyn ajan jälkeen sekä kuvataan lähemmin, jotta saataisiin täydellinen arvio vaikutuksista. Tarkkailun on jatkuttava tarpeeksi kauan, jotta voidaan muodostaa kattava arvio havaittujen vaikutusten palautuvuudesta.

Eläimet, joilla on vakavia ja pitkittyneitä ahdistuneisuuden ja kivun oireita, voidaan tarvittaessa lopettaa.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Noin 24 tuntia ennen testiä turkki leikataan tai ajetaan eläinten selkäalueelta.

Turkkia leikattaessa tai ajettaessa on varottava naarmuttamasta ihoa. Kokeessa käytetään vain eläimiä, joiden iho on terve ja ehjä.

Joillakin kanikannoilla on turkissa tiheitä karva-alueita, joiden paksuus vaihtelee vuodenajan mukaan. Testattavaa ainetta ei pidä levittää tällaisille alueille.

Kiinteät aineet voidaan tarvittaessa jauhaa. Ne on kosteutettava riittävällä vesimäärällä tai tarvittaessa muulla liuottimella hyvän ihokontaktin varmistamiseksi. Jos käytetään liuotinta, sen vaikutus aineen imeytymiseen iholta on otettava huomioon. Nestemäisiä aineita käytetään yleensä laimentamattomina.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Koe-eläiminä voidaan käyttää useita nisäkäslajeja. Suositeltavin laji on kuitenkin albiinokani.

1.6.2.2 *Lukumäärä*

Jos alustavat *in vitro* -kokeet tai muut näkökohdat antavat aiheen epäillä, että aine on syövyttävä, on harkittava testin rajoittamista yhteen eläimeen. Jos tällainen testi ei osoita syövyttäviä ominaisuuksia, sitä on täydennettävä vähintään kahdella uudella eläimellä suoritettavalla testillä.

Kattavaa testiä varten tarvitaan vähintään kolme aikuista, tervettä eläintä. Käsittelemätöntä kontrolliryhmää varten ei tarvita erillisiä eläimiä. Kyseenalaisten vasteiden selvittämisessä voidaan tarvita lisäeläimiä.

1.6.2.3 *Annostasot*

Kontraindikaatioiden puuttuessa levitetään 0,5 ml nestettä tai 0,5 g kiinteää tai pastamaista ainetta testattavalle alueelle. Viereisiä, käsittelemättömiä ihoalueita käytetään vertailualueina.

1.6.2.4 *Tarkkailujakso*

Tarkkailujakson pituutta ei voi määrittää kiinteästi. Tarkkailua on jatkettava, kunnes voidaan luotettavasti arvioida vaikutusten palautuvuus tai pysyvyys. Yleensä tarkkailujakson pituus on enintään 14 päivää aineen levittämisen jälkeen.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläimiä pidetään yksin häkeissä. Testattavaa ainetta levitetään noin 6 cm^2:n suuruiselle alueelle, joka peitetään harsositeellä ja ärsyttämättömällä laastarilla. Joissakin tapauksissa (nesteet ja eräät pastat) on tarpeen levittää ainetta harsositeelle, joka asetetaan iholle. Harsoside pidetään altistuksen aikana kevyessä kosketuksessa ihoon okklusiivisen tai puoliokklusiivisen siteen avulla. Eläimen mahdollisuudet koskettaa sidettä ja syödä tai hengittää testattavaa ainetta on estettävä.

Altistusjakson jälkeen aineen jäännökset poistetaan vedellä tai sopivalla liuottimella, varoen mahdollisen vasteen muuttamista ja ihon rikkomista.

Altistusjakson pituus on yleensä neljä tuntia.

Jos epäillään, että aine voi aiheuttaa ihonekroosia eli aine on syövyttävä, altistusjakso on lyhennettävä esimerkiksi yhdeksi tunniksi tai kolmeksi minuutiksi. Tällöin voidaan myös aloittaa yhdellä eläimellä, jolle pannaan kolme sidettä, ellei aineen akuutti myrkyllisyys ihon kautta estä tätä. Ensimmäinen side poistetaan kolmen minuutin kuluttua. Ellei vakavia ihoreaktioita ole havaittavissa, toinen side poistetaan tunnin kuluttua. Jos havainnot tässä vaiheessa osoittavat, että neljän tunnin altistus on tarpeen ja se voidaan tehdä tuottamatta eläimelle kärsimystä, kolmas side poistetaan neljän tunnin kuluttua ja vasteet luokitellaan. Tässä tapauksessa (esimerkiksi, kun neljän tunnin altistus on ollut mahdollinen), testiä on täydennettävä vähintään kahdella uudella eläimellä, ellei tätä voida pitää kärsimyksiä aiheuttavana (esimerkiksi, jos neljän tunnin altistuksen jälkeen on havaittu ihonekroosia).

Jos 3 minuutin tai 1 tunnin altistuksen jälkeen havaitaan vakavia ihoreaktioita (kuollutta ihoa), testi lopetetaan välittömästi.

Tietyissä olosuhteissa, esimerkiksi tietyt käyttö- ja altistumistavat ihmiskäytössä, voivat edellyttää pidempiä altistumisaikoja.

1.6.3.1 *Tarkkailut ja luokittelu*

Eläimiä tarkkaillaan punoituksen ja turvotuksen suhteen. Kirjataan vaste, joka saadaan 60 minuutin, 24, 48 ja 72 tunnin jälkeen siteen poistosta. Ihoärsytys luokitellaan ja kirjataan taulukon 1 mukaisesti. Ellei ärsytys ole parantunut täysin 72 tunnin kuluessa, tarvitaan ehkä lisähavaintoja. Ärsytysoireiden lisäksi on kuvattava kaikki vakavat vauriot, kuten syövytys (palautumattomasti tuhoutunut ihokudos) ja muut myrkytysoireet.

Epävarmat reaktiot tai vasteet, jotka peittyvät aineen aiheuttamasta värjäytymisestä, voidaan selvittää myös histopatologisten menetelmien, ihon paksuuden mittauksen tai muiden tekniikoiden avulla.

2 TIEDOT

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa jokaista eläintä kohti esitetään ärsytysluokittelut punoituksen ja turvotuksen suhteen tarkkailujakson aikana. Kirjataan myös kaikki vakavat vauriot, kuvaus ärsytyksen asteesta ja luonteesta, palautuvuudesta tai syöpymisestä sekä kaikista myrkytysoireista.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio, jne.

— testiolosuhteet (mukaan lukien kemikaalin merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, ihon valmistelu- ja puhdistustekniikat, siteen tyyppi: okklusiivinen tai puoliokklusiivinen)

— eläin- ja tarkkailujaksokohtainen taulukko ärsytysvastetiedoista (tiedot esimerkiksi 1, 24, 48 ja 72 tuntia siteen poiston jälkeen)

— kuvaus kaikista havaituista vakavista vaurioista, mukaan lukien syöpymiset

— kuvaus havaitun ärsytyksen asteesta ja luonteesta sekä kaikista histopatologisista löydöistä

— kuvaus kaikista myrkytysoireista (muista kuin ihoärsytyksestä)

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

Liite

TAULUKKO: IHOREAKTIOIDEN LUOKITTELU

Punoituksen ja ruven muodostus

Ei punoitusta	0
Hyvin kevyt (tuskin havaittava) punoitus	1
Selvä punoitus	2
Kohtalainen, ei kuitenkaan vaikea punoitus	3
Vaikea punoitus (tummanpunainen väri) tai ruven muodostus (syviä vauriota), joka estää punoituksen arvioinnin	4

Turvotus

Ei turvotusta	0
Hyvin lievä (tuskin havaittava) turvotus	1
Lievä turvotus (alueen reunat selvästi koholla)	2
Kohtalainen turvotus (reunat noin 1 mm koholla)	3
Vaikea turvotus (kohouma yli 1 mm, levinnyt altistusalueen ulkopuolelle)	4

B.5 AKUUTTI MYRKYLLISYYS (SILMIEN ÄRSYTYS)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Huomioon otettavaa

Kaikki aineesta saatavat tiedot on otettava tarkoin huomioon, jotta voitaisiin minimoida testit, jotka aiheuttavat todennäköisesti vakavia oireita. Seuraavia ohjeita voidaan käyttää apuna arvioinnissa:

i) Fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ja kemiallinen reaktiivisuus. Vahvasti happamia tai emäksisiä aineita (joiden pH-arvo on alle 2 tai yli 11,5, kun ainetta pannaan silmään) ei ehkä tarvitse testata, jos on odotettavissa vakavia vaurioita. Emäs- ja happoylijäämät on myös otettava huomioon.

ii) Luotettavasti validoitujen vaihtoehtoisten tutkimusten tulokset. Aineita, joiden on osoitettu omaavan potentiaalisia syövyttäviä tai vakavasti ärsyttäviä ominaisuuksia, ei pidä testata silmien ärsytyksen suhteen, koska voidaan olettaa, että niillä on vakavia vaikutuksia silmille tämän menetelmän mukaan käytettyinä.

iii) Ihoärsytystutkimusten tulokset. Aineita, joiden on ihoärsytystutkimuksissa osoitettu omaavan selvästi syövyttäviä tai vakavasti ihoa ärsyttäviä ominaisuuksia, ei pidä testata silmien ärsytyksen suhteen, koska voidaan olettaa, että niillä on vakavia vaikutuksia silmille tämän menetelmän mukaan käytettynä.

Testattavaa ainetta levitetään kerta-annoksena usean koe-eläimen toiseen silmään. Eläinten käsittelemättömän silmän avulla saadaan vertailutietoja. Ärsytysaste arvioidaan ja luokitellaan määrätyin välein sekä kuvataan yksityiskohtaisesti, jotta saataisiin täydellinen arvio vaikutuksista. Tarkkailun on jatkuttava tarpeeksi kauan, jotta voitaisiin arvioida vaikutusten pysyvyyttä tai häviävyyttä kattavasti.

Eläimet, joilla on vakavia ja pitkittyneitä ahdistuneisuuden ja kivun oireita, voidaan tarvittaessa lopettaa.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Koetta varten alustavasti valittujen eläinten molemmat silmät on tutkittava enintään 24 tuntia ennen koetta. Eläimiä, joiden silmät ovat ärtyneet tai joilla on silmävikoja tai aiempia sarveiskalvon vaurioita, ei pidä käyttää.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Koe-eläiminä voidaan käyttää useita nisäkäslajeja. Terveiden, aikuisten albiinokanien käyttöä suositellaan.

1.6.2.2 *Lukumäärä*

Jos voidaan odottaa ilmeisiä vaikutuksia, on harkittava yhden eläimen testiä. Jos yhden kanin testi osoittaa, että aine on tämän menetelmän mukaan käytettynä silmää vakavasti ärsyttävä (palautuva vaikutus) tai syövyttävä (palautumaton vaikutus), sen silmää ärsyttäviä ominaisuuksia ei ehkä tarvitse testata muilla eläimillä. Joissakin tapauksissa voi olla tarpeen testata ainetta muilla eläimillä erityisten näkökohtien tutkimiseksi.

Ellei käytetä yhden eläimen testiä, tarvitaan vähintään kolme eläintä. Kyseenalaisten vasteiden selvittämiseksi voidaan tarvita lisäeläimiä.

1.6.2.3 *Annostasot*

Nesteiden testauksessa käytetään 0,1 ml:n annosta. Kiinteiden aineiden, pastojen ja hiukkasmuotoisten aineiden testauksessa käytettävän määrän tilavuuden tulisi olla 0,1 ml, tai sen painon tulisi olla noin 0,1 g (paino on aina kirjattava). Jos testattava aine on kiinteässä muodossa tai rakeina, se on jauhettava hienoksi pölyksi. Pölyn tilavuus mitataan kevyen tiivistämisen jälkeen (esimerkiksi mittaussäiliötä koputtamalla).

Jos aine on pumppusuihku- tai painesuihkupullossa, 0,1 ml nestettä kerätään pullosta ja tiputetaan silmään nesteitä koskevan ohjeen mukaan.

1.6.2.4 *Tarkkailujakso*

Tarkkailujakson pituutta ei voi määrittää kiinteästi. Tarkkailua on jatkettava, kunnes vaikutusten palautuvuus tai pysyvyys voidaan arvioida luotettavasti. Yleensä tarkkailujakson pituus on enintään 21 päivää aineen antamisen jälkeen.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläimiä pidetään yksin häkeissä. Testattavaa ainetta pannaan jokaisen eläimen toisen silmän sidekalvopussiin (alaluomea vedetään ensin hieman alaspäin). Tämän jälkeen luomet pidetään kevyesti yhdessä noin sekunnin ajan ainehukan estämiseksi. Toinen silmä, jota ei käsitellä, toimii vertailukohteena.

Jos epäillään, että aine voi aiheuttaa kohtuutonta kipua, eläimelle voidaan antaa paikallispuudutus ennen aineen antamista. Paikallispuudutteen tyyppi, vahvuus ja vaikutuksen kesto on valittava huolella, jotta voitaisiin varmistaa, ettei puudutuksen käytöllä ole merkittävää vaikutusta aineesta aiheutuviin reaktioihin. Myös vertailusilmä on puudutettava.

Koe-eläinten silmiä ei saa pestä 24 tuntiin aineen antamisesta. 24 tunnin jälkeen aine voidaan tarvittaessa pestä pois.

Eräiden aineiden osalta, jotka on tämän testin avulla todettu ärsyttäviksi, voi olla tarpeen tehdä ohjeiden mukaan lisätestejä kaneilla, joiden silmät pestään pian aineen antamisen jälkeen. Tällöin on suositeltavaa käyttää vähintään kolmea kania. Puoli minuuttia aineen antamisen jälkeen kanien silmiä pestään puolen minuutin ajan käyttäen sellaista tilavuutta ja virtausnopeutta, että silmiin ei tule vaurioita.

1.6.3.1 *Tarkkailu ja luokittelu*

Silmät tutkitaan 1, 24, 48 ja 72 tunnin jälkeen. Jos silmävaurioita ei ole havaittavissa 72 tunnin jälkeen, tutkimus voidaan lopettaa.

Tarkkailun pidentäminen voi olla tarpeen, jos silmässä on pysyvä sarveiskalvon muutos tai muu silmä-ärsytys, jotta voitaisiin arvioida vaurioiden kehittyminen ja palautuvuus tai pysyvyys. Sarveiskalvon, iiriksen ja sidekalvon tarkkailun lisäksi muutkin havaitut vauriot on kirjattava ja raportoitava. Silmäreaktiot luokitellaan (katso taulukkoa) ja kirjataan jokaisen tutkimuksen yhteydessä. (Silmän vasteet voidaan tulkita monin tavoin. Tarkkailujen ja havaintojen tulkitsemisen apuna voidaan käyttää silmä-ärsytystä käsitteleviä kuvitettuja ohjeita.)

Reaktioiden tutkinnassa voidaan käyttää apuvälineinä luppia, silmälamppua, biomikroskooppia tai muuta sopivaa välinettä. Kun 24 tunnin jälkeiset havainnot on kirjattu, yhden kanin tai kaikkien kanien silmien tutkimista voidaan jatkaa fluoreseiinivärjäyksellä.

2 **TIEDOT**

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa jokaista eläintä kohti esitetään ärsytysluokittelut kunakin tarkkailuaikana. Raporttiin on myös liitettävä kuvaus ärsytyksen asteesta ja luonteesta, vakavista vaurioista sekä kaikista muista havaituista, muihin kehonosiin kuin silmiin liittyvistä vaikutuksista.

3 **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio, jne.

— testiolosuhteet (kemikaalin merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet mukaan lukien)

— eläin- ja tarkkailujaksokohtainen taulukko ärsytysvastetiedoista (tiedot esimerkiksi 1, 24, 48 ja 72 tuntia siteen poiston jälkeen)

— kuvaus kaikista havaituista vakavista vaurioista

— kuvaus sarveiskalvon ärsytyksen tai syöpymisen asteesta, laadusta ja laajuudesta sekä palautuvuudesta

— kuvaus menetelmästä, jota on käytetty ärsytyksen luokitteluun 1, 24, 48 ja 72 tunnin jälkeen (esimerkiksi silmälamppu, biomikroskooppi tai fluoreseiini)

— kuvaus kaikista muista kuin silmässä olevista pintavaikutuksista

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 **VIITTEET**

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

Liite

TAULUKKO: SILMÄVAURIOIDEN LUOKITTELU

Sarveiskalvo

Samentuma: tiheysaste (lukema otetaan tiheimmästä alueesta)

Ei haavautumaa tai samentumaa 0

Hajanaisia tai epämääräisiä samentuma-alueita (muuta kuin normaalin kiillon lievä himmeneminen), iiriksen yksityiskohdat selvästi näkyvissä 1

Helposti näkyvä läpikuultava alue, iiriksen yksityiskohdat hieman peitossa 2

Harmahtavan läpikuultava alue, iiriksen yksityiskohdat eivät näkyvissä, pupillin koko tuskin havaittava 3

Sarveiskalvo läpikuultamaton, iiris ei näkyvissä sameuden vuoksi 4

Iiris

Normaali 0

Selvästi syventyneet poimut, lisääntynyt verekkyys, turvotus, kohtalainen sarveiskalvoa ympäröivä punoitus (jokin näistä yksin tai minä tahansa yhdistelmänä), iiris reagoi vielä valoon (hidas reaktio on positiivinen) 1

Ei reagoi valolle, verenvuotoja, vakavaa tuhoa (jokin tai kaikki näistä) 2

Sidekalvo

Punoitus (tällä tarkoitetaan vertailusilmään verrattuna vakavinta lukemaa myös silmäluomiin ulottuvat sidekalvon alueet otetaan huomioon)

Verisuonet normaalit 0

Jotkut verisuonet selvästi laajentuneet 1

Epämääräinen, syvänpunainen väri, yksittäiset verisuonet eivät erotu helposti 2

Epämääräinen, lihanpunainen 3

Kemoosi: luomet tai vilkkukalvot

Ei turvotusta 0

Kaikki normaalista poikkeava turvotus (vilkkukalvot mukaan lukien) 1

Selvä turvotus, jossa luomet ovat osittain uloskääntyneet 2

Turvotus, jossa luomet suunnilleen puoliksi sulkeutuneet 3

Turvotus, jossa luomet enemmän kuin puoliksi sulkeutuneet 4

B.6 IHON HERKISTYMINEN

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Huomautukset:

Testien herkkyyttä ja kykyä löytää potentiaalisia ihmisihon herkistymistä aiheuttavia aineita pidetään tärkeinä tekijöinä järjestelmässä, jonka avulla luokitellaan kansanterveyden kannalta merkittävät myrkylliset aineet.

Ei ole yksittäistä luotettavaa testimenetelmää, jonka avulla voitaisiin löytää kaikki aineet, jotka voivat aiheuttaa ihmisihon herkistymistä, ja joka kattaisi kaikki aineet.

Testimenetelmän valinnassa on otettava huomioon erilaisia tekijöitä, kuten aineen fysikaaliset ominaisuudet, ihonläpäisykyky mukaan lukien.

Testimenetelmät, joissa käytetään marsuja, voidaan jakaa tehosteellisiin testeihin, joissa allerginen tila mahdollistetaan liuottamalla tai sekoittamalla testattavaa ainetta FCA:han (Freund's Complete Adjuvant -yhdisteeseen) ja tehosteettomiin testeihin.

Tehosteellisten testien avulla aineen todennäköisiä ihon herkistymistä aiheuttavia ominaisuuksia voidaan yleensä ennustaa tarkemmin kuin käytettäessä menetelmiä, joihin ei sisälly FCA:n käyttöä. Tämän vuoksi ensin mainitut testit ovat suositeltavia.

Laajaa kannatusta saanut tehosteellinen testi on marsujen avulla tehtävä GPMT (Guinea-Pig Maximization Test) -testi. Vaikka käytettävissä on useita muita menetelmiä aineen ihon herkistymistä mahdollisesti aiheuttavien ominaisuuksien löytämiseen, GPMT:tä pidetään suositeltavana tehosteellisena tekniikkana.

Useiden kemiallisten luokkien kohdalla tehosteettomia testejä (joista suositeltavin on Buehler-testi) pidetään vähemmän herkkinä kuin tehosteellisia testejä.

Joissakin tapauksissa voi olla perusteltua valita Buehler-testi, jossa testattavaa ainetta levitetään iholle sen sijaan, että aine annettaisiin ihonsisäisenä ruiskeena, kuten GPMT-testissä. Buehler-testin valinta on pystyttävä perustelemaan tieteellisesti.

Tässä menetelmässä kuvataan GPMT-testi ja Buehler-testi. Muita menetelmiä voidaan käyttää, edellyttäen että ne on luotettavasti validoitu ja että valinta voidaan perustella tieteellisesti.

Käytettiinpä mitä menetelmää tahansa, ihon herkistymistesteissä käytetyn marsukannan herkkyys on tarkistettava säännöllisin (kuuden kuukauden) väliajoin miedolla tai kohtalaisen miedolla herkistimellä, jolla saadaan tyydyttävä määrä positiivisia vasteita.

Katso myös yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineina on suositeltavaa käyttää seuraavassa lueteltavia aineita (aineet on laimennettava tarvittaessa) ja muita herkistäviä, kirjallisuudesta tunnettuja tai testattavien aineiden ryhmään kuuluvia aineita.

— p-fenyleenidiamiini	CAS-numero 106-50-3
— 2,4-dinitroklorobentseeni	CAS-numero 97-00-7
— kaliumdikromaatti	CAS-numero 7778-50-9
— neomysiinisulfaatti	CAS-numero 1405-10-3
— nikkelisulfaatti	CAS-numero 7786-81-4

1.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATE

Ensimmäisen aineelle altistumisen (induktiojakson) jälkeen eläimille tehdään provokaatioaltistus noin kaksi viikkoa viimeisen induktioaltistuksen jälkeen, jotta voidaan todeta, onko yliherkkyystila syntynyt vai ei. Herkistyminen määritetään tutkimalla ihon reagointia provokaatioaltistukseen.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **GPMT-testi**

1.6.1.1 *Valmistelut*

Otetaan terveiden nuorien albiinomarsujen joukosta satunnaisotos, joka jaetaan käsittely- ja kontrolliryhmiin. Ennen annostelua karvat poistetaan marsujen hartiaseudulta leikkaamalla tai ajamalla varoen vahingoittamasta ihoa.

1.6.1.2 *Testiolosuhteet*

1.6.1.2.1 Koe-eläimet

Käytetään tavallisia laboratoriokantaisia albiinomarsuja, joiden paino on alle 500 g.

1.6.1.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Sekä naaraita että uroksia voidaan käyttää. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä. Käsittelyryhmässä on oltava vähintään 10 ja kontrolliryhmässä vähintään 5 eläintä. Pienemmän eläinmäärän käyttö on perusteltava. Jos saadaan kyseenalaisia tuloksia, histopatologisen tutkimuksen avulla voidaan ratkaista, onko testi toistettava toista eläinkertaa käyttäen.

Ellei ole mahdollista päättää lopullisesti, onko testattava aine herkistävä vai ei, on suositeltavaa testata lisää eläimiä, niin että saadaan vähintään 20 koe-eläintä ja 10 vertailueläintä.

1.6.1.2.3 Annostasot

Testattavan aineen pitoisuus säädetään tasolle, joka aiheuttaa lievää ihon ärsytystä mutta jonka eläimet kuitenkin sietävät hyvin kussakin induktiovaiheessa.

Provokaatiopitoisuuden tulee olla se maksimipitoisuus, joka ei aiheuta herkistämättömissä eläimissä merkkejä ihon ärsyyntymisestä.

Pitoisuudet voidaan määritellä pienessä mittakaavassa alustavan kokeen avulla (testataan kaksi tai kolme eläintä).

1.6.1.2.4 Tarkkailujakso

Induktiojakson aikana eläimiä tarkkaillaan mahdollisten ärsytysvaikutusten havaitsemiseksi. Provokaatioaltistuksen jälkeen ihoreaktiot kirjataan 24 ja 48 tuntia sidoksien poiston jälkeen.

1.6.1.3 *Testin suorittaminen*

Eläimet punnitaan ennen testin alkua ja sen lopussa. Hartiaseudun karvat ajellaan tai leikataan. Menetelmään kuuluu kaksi vaihetta:

1.6.1.3.1 Induktio

Päivä 0 — käsittelyryhmä

Seuraavat ihonsisäiset ruiskeparit, kumpikin 0,1 ml, annetaan hartiaseudulle, molemmille puolelle keskilinjaa:

Ruiske 1:	0,1 ml FCA:ta sekoitettuna veteen tai fysiologiseen suolaliuokseen suhteessa 1:1
Ruiske 2:	0,1 ml testattavaa ainetta, tarvittaessa sopivaan liuottimeen sekoitettuna
Ruiske 3:	0,1 ml testattavaa ainetta FCA:han sekoitettuna.

Ruiskeessa 3 vesiliukoiset aineet liuotetaan 0,05 ml:aan vettä ja 0,05 ml:aan laimentamatonta CDA:ta. Jos testattava aine on rasvaliukoinen tai liukenematon, se sekoitetaan laimentamattomaan FCA:han.

Ruiskeessa 3 testattavan aineen lopullisen pitoisuuden on oltava sama kuin ruiskeessa 2.

Ruiskeet 1 ja 2 annetaan lähelle toisiaan ja lähimmäksi päätä ja ruiske 3 lähimmäksi häntää.

Päivä 0 — kontrolliryhmä

Seuraavat ruiskeparit annetaan ihonsisäisinä ja samoihin kohtiin kuin edellä:

Ruiske 1:	0,1 ml FCA:ta sekoitettuna veteen tai fysiologiseen suolaliuokseen suhteessa 1:1
Ruiske 2:	0,1 ml pelkkää liuotinta
Ruiske 3:	0,1 ml liuotinta FCA:han sekoitettuna.

Päivä 6 — molemmat ryhmät

Jos aine ei ole ihoa ärsyttävää, testattavalle alueelle sivellään karvojen leikkauksen tai ajon jälkeen 0,5 ml 10-prosenttista natriumlauryylisulfaattia vaseliiniin sekoitettuna paikallisen ärsytyksen aiheuttamiseksi.

Päivä 7 — käsittelyryhmä

Testattava alue ajellaan jälleen paljaaksi. Sopivaan liuottimeen liuotettua testattavaa ainetta levitetään 2 × 4 cm:n suuruiselle suodatinpaperille (liuottimen valinta on perusteltava; kiinteät aineet jauhetaan hienoksi ja sekoitetaan sopivaan liuottimeen; nesteet voidaan soveltuvissa tapauksissa käyttää sellaisenaan.) Suodatinpaperi pannaan testattavalle alueelle, ja sitä pidetään ihoa vasten okklusiivisen siteen alla 48 tunnin ajan.

Päivä 7 — kontrolliryhmä

Testattava alue ajellaan jälleen paljaaksi. Pelkkää liuotinta annostellaan testattavalle alueelle edellä kuvatulla tavalla, ja sitä pidetään ihoa vasten okklusiivisen siteen alla 48 tunnin ajan.

1.6.1.3.2 Provokaatio

Päivä 21

Käsittely- ja kontrolliryhmän eläinten kyljet ajellaan paljaiksi. Side tai kotelo, jossa on testattavaa ainetta, kiinnitetään käsittelyryhmän eläinten toiseen kylkeen ja pelkkää liuotinta sisältävä side tai kotelo kiinnitetään toiseen kylkeen.

Sidokset pidetään ihoa vasten okklusiivisen siteen alla 24 tunnin ajan.

Kontrolliryhmän eläimet altistetaan samalla tavoin.

Päivät 23 ja 24

— 21 tuntia sidoksen poiston jälkeen provokaatioalue puhdistetaan ja ajellaan paljaaksi tarvittaessa

— kolme tuntia myöhemmin (48 tuntia provokaatioaltistuksen alusta) ihoreaktiot tarkastetaan ja kirjataan

— 24 tuntia tämän tarkastuksen jälkeen (72 tuntia) tehdään toinen tarkastus ja kirjaus.

Ensimmäisen provokaation tulosten selventämiseksi voidaan harkita toista provokaatiota noin viikon kuluttua ensimmäisestä provokaatiosta, tarvittaessa uutta liuotinkontrolliryhmää käyttäen.

1.6.1.3.3 Tarkkailut ja luokittelu

Kaikki induktio- ja provokaatiomenetelmien aiheuttamat ihoreaktiot ja epätavalliset löydökset on kirjattava ja raportoitava.

Epävarmat reaktiot tai vasteet, jotka peittyvät testattavan aineen aiheuttaman värjäytymisen vuoksi, voidaan selvittää myös histopatologisten menetelmien, ihon paksuuden mittauksen tai muiden tekniikoiden avulla.

1.6.2 **Buehler-testi**

1.6.2.1 *Valmistelut*

Otetaan terveiden nuorien albiinomarsujen joukosta satunnaisotos, joka jaetaan käsittely- ja kontrolliryhmiin. Ennen annostelua karvat poistetaan toiselta kyljeltä hartiaseudulta leikkaamalla tai ajamalla. Ihon vahingoittumista on varottava.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

1.6.2.2.1 Koe-eläimet

Käytetään tavallisia laboratoriokantaisia albiinomarsuja, joiden paino on alle 500 g.

1.6.2.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Sekä naaraita että uroksia voidaan käyttää. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä. Käsittelyryhmässä on oltava vähintään 20 ja kontrolliryhmässä vähintään 10 eläintä. Pienemmän eläinmäärän käyttö on perusteltava. Jos saadaan kyseenalaisia tuloksia, histopatologisen tutkimuksen avulla voidaan ratkaista, onko testi toistettava toista eläinkertaa käyttäen.

1.6.2.2.3 Annostasot

Testattavan aineen pitoisuus säädetään jokaisessa induktiovaiheessa korkeimmalle tasolle, jonka eläimet sietävät hyvin ja joka aiheuttaa suurimmassa osassa koe-eläimiä kevyttä tai kohtalaista ärsytystä ärsyttävien aineiden osalta. Provokaatiopitoisuuden tulee olla se maksimitaso, joka ei aiheuta merkkejä ihon ärsyyntymisestä herkistämättömissä eläimissä. Annostasot voidaan määritellä pienessä mittakaavassa tehtävän kokeen avulla (testataan kaksi tai kolme eläintä).

1.6.2.2.4 Tarkkailujakso

Induktiojakson aikana eläimiä tarkkaillaan mahdollisten ärsytysvaikutusten havaitsemiseksi. Provokaatioaltistuksen jälkeen ihoreaktiot kirjataan 24 ja 48 tuntia sidoksen poiston jälkeen eli 30 ja 54 tuntia aineen antamisen jälkeen.

1.6.2.3 *Testin suorittaminen*

Eläimet punnitaan ennen testin alkua ja sen lopussa.

Menetelmään kuuluu kaksi vaihetta:

1.6.2.3.1 Induktio

Päivä 0 — käsittelyryhmä

Eläinten toinen kylki ajellaan paljaaksi. 0,5 ml sopivaan liuottimeen liuotettua testattavaa ainetta levitetään pumpulitupolle (liuottimen valinta on perusteltava; nesteet voidaan käyttää sellaisenaan.) Tuppo pannaan testattavalle alueelle, ja sitä pidetään ihoa vasten okklusiivisen sidoksen tai kotelon ja sopivan siteen avulla kuuden tunnin ajan.

Päivä 0 — kontrolliryhmä

Toinen kylki ajellaan paljaaksi. Pelkkää liuotinta annostellaan edellä kuvatulla tavalla, ja sitä pidetään ihoa vasten okklusiivisen sidoksen tai kotelon ja sopivan siteen avulla kuuden tunnin ajan.

Päivät 7 ja 14

Päivän 0 ohjelma toistetaan saman ihoalueen kohdalla (joka tarvittaessa ajellaan ensin paljaaksi).

1.6.2.3.2 Provokaatio

Päivä 28

Käsittely- ja vertailueläinten toinen kylki ajellaan paljaaksi. Okklusiivinen sidos tai kotelo, jossa on 0,5 ml testattavaa ainetta suurimpana ärsyttämättömänä pitoisuutena pannaan käsiteltyjen eläinten kyljen takaosaan. Kyljen etuosaan pannaan okklusiivinen sidos tai kotelo, jossa on pelkkää liuotinta.

Okklusiiviset sidokset pidetään kosketuksissa ihoon sopivan siteen alla kuuden tunnin ajan.

Kontrolliryhmä altistetaan samalla tavoin.

Päivät 29 ja 30

— 21 tuntia sidoksen poiston jälkeen provokaatioalue puhdistetaan ja ajellaan paljaaksi tarvittaessa

— kolme tuntia myöhemmin (30 tuntia provokaatioaltistuksen alusta) ihoreaktio tarkastetaan ja kirjataan

— 24 tuntia tämän tarkkailun jälkeen tehdään toinen tarkastus (54 tuntia) ja kirjaus.

1.6.2.3.3 Tarkastukset ja luokittelu

Kaikki ihoreaktiot ja epätavalliset löydökset on kirjattava ja raportoitava.

Epävarmat reaktiot tai vasteet, jotka peittyvät testattavan aineen aiheuttaman värjäyksen vuoksi, voidaan selvittää myös histopatologisten menetelmien, ihon paksuuden mittauksen tai muiden tekniikoiden avulla.

2 **TIEDOT (GPMT- ja Buehler-testi)**

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, josta kunkin eläimen ihoreaktiot ilmenevät tarkastusajankohdittain.

3 **RAPORTOINTI (GPMT- ja Buehler-testi)**

3.1 TESTIRAPORTTI (GPMT- ja Buehler-testi)

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty marsukanta

— testiolosuhteet, liuotin ja testattavan aineen pitoisuudet induktio- ja provokaatiotestissä

— eläinten määrä, ikä ja sukupuoli

— kunkin eläimen paino testin alussa ja lopussa

— kaikki havainnot eläimittäin ja luokittelujärjestelmä (jos sellaista on käytetty)

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA (GPMT- ja Buehler-testi)

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 **VIITTEET**

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.7 TOISTETUN ORAALISEN ANNOKSEN (28 PÄIVÄÄ) MYRKYLLISYYS

1 **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattavaa ainetta annetaan usealle koe-eläinryhmälle porrastettuina annoksina (yksi annos ryhmää kohti) suun kautta 28 päivän ajan. Annostelun jälkeen eläimiä tarkkaillaan myrkytysoireiden suhteen. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Ennen testiä eläimiä pidetään ja ruokitaan testinkaltaisissa olosuhteissa vähintään viiden päivän ajan. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan käsittelyryhmiin. Testattavaa ainetta voidaan antaa ruoan mukana, letkun avulla, kapseleina tai juomaveteen sekoitettuna. Annostelu tehdään kaikille eläimille saman

menetelmän mukaan koko testijakson aikana. Jos annostelun yhteydessä käytetään liuottimia tai muita lisäaineita, on selvitettävä luotettavasti, etteivät ne aiheuta myrkytysoireita. Aiempia tietoja voidaan käyttää soveltuvin osin.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Ellei kontraindikaatioita ole, rotan käyttöä suositellaan. Testiin käytetään yleisiä laboratoriokantoja. Rottien on oltava nuoria ja terveitä. Kun annostelu aloitetaan, rottien tulisi olla alle kuuden viikon ikäisiä. Missään tapauksessa ei saa käyttää rottia, joiden ikä ylittää kahdeksan viikkoa.

Testin alussa kumpaakaan sukupuolta edustavien eläinten painonvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 20 % sukupuolen keskiarvosta.

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Jokaista annostasoa kohti tarvitaan vähintään kymmenen eläintä (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä. Jos suunnitellaan testin kuluessa tapahtuvia lopettamisia, eläinten määrää on lisättävä vastaavasti. Tarvittaessa testiin voidaan ottaa kymmenen eläimen apuryhmä (viisi naarasta ja viisi urosta), jota altistetaan suurille annoksille 28 päivän ajan tarkkaillen myrkytysoireiden palautumista ja pysyvyyttä sekä sitä, esiintyykö käsittelyä seuraavan 14 päivän jakson aikana viivästyneitä myrkytysoireita. Tarvitaan myös kymmenen vertailueläimen (viiden naaran ja viiden uroksen) apuryhmä.

1.6.2.3 *Annostasot*

Tarvitaan vähintään kolme annostasoa ja yksi kontrolliryhmä. Testattavalla aineella käsittelyä lukuun ottamatta kontrolliryhmän ja käsittelyryhmien eläimiä on käsiteltävä samalla tavalla. Jos annostelun yhteydessä käytetään liuotinta, tämä annostellaan kontrolliryhmän eläimille samalla menetelmällä kuin käsittelyryhmien eläimille annoksena, joka on yhtä suuri kuin suurin käsittelyryhmille annettu annos. Testattavan aineen suurimman annostason on aiheutettava myrkytysoireita, mutta vain vähän tai ei lainkaan kuolleisuutta. Aineen alimman annostason ei tule aiheuttaa mitään merkkejä myrkyllisyydestä. Jos käytettävissä on soveltuva arvio ihmisaltistumisesta, alimman annostason on oltava tämä tason yläpuolella. Keskitason tulisi aiheuttaa mahdollisimman vähän myrkytysoireita. Jos käytetään useita välitasoja, ne on valittava siten, että myrkytysoireet porrastuvat. Alimman annostason ja välitason ryhmissä sekä kontrolliryhmissä kuolleisuuden on oltava pieni, jotta tuloksia voitaisiin arvioida merkityksellisellä tavalla.

Jos testattavaa ainetta annetaan eläimille ruoan mukana, käytettävät vakiomäärät voivat perustua joko aineen pitoisuuteen ruoassa (ppm tai mg/kg ruokaa) tai annostasoon, joka on suhteutettu eläimen kehonpainoon (käytetty vaihtoehto on mainittava raportissa). Jos ainetta annetaan letkun avulla, annos on annettava samaan aikaan päivästä ja annostasoja on säädettävä kerran viikossa tai kahden viikon välein, jotta annostaso pysyisi vakiona eläimen painoon nähden.

1.6.2.4 *Rajatesti*

Jos tehdään 28 päivän testi jäljempänä kuvattavan menetelmän mukaan käyttäen päiväannostasoa 1 000 mg/kg tai tätä korkeampaa tasoa, joka perustuu tunnettuun ihmisaltistukseen, eikä tällainen testi aiheuta myrkytysoireita, lisätestit voidaan katsoa tarpeettomiksi. Lievästi myrkyllisten aineiden osalta on tärkeää varmistaa, että ruoan mukana annetun aineen määrä ja muut ominaisuudet eivät häiritse normaalien ravitsevuusvaatimusten täyttymistä.

1.6.2.5 *Tarkkailujakso*

Kaikkia eläimiä on tarkkailtava päivittäin, ja myrkytysoireet (alkuajankohta, voimakkuus ja kesto) on kirjattava. Samoin on kirjattava kuolinaika ja myrkytysoireiden ilmestymis- sekä häviämisajankohta.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläimille annetaan ainetta mieluiten seitsemänä päivänä viikossa 28 päivän ajan. Seurantaa varten koottua apuryhmää tarkkaillaan annostelujakson jälkeen vielä 14 päivän ajan ilman käsittelyä, jotta voidaan havaita, ovatko myrkytysoireet häviäviä vai pysyviä.

Tarkkaillaan ihon, turkin, silmien, limakalvojen, hengitysteiden, verenkierron, autonomisen hermoston, keskushermoston, somatomotorisen aktiviteetin ja käyttäytymismallin muutoksia. Kerran viikossa ruoankulutus (ja vedenkulutus, jos ainetta on annettu juomaveteen sekoitettuna) mitataan ja eläimet punnitaan.

Eläimiä on tarkkailtava säännöllisesti, jotta voidaan varmistaa, että mahdollisimman vähän eläimiä menetetään kannibalismin, kudosten autolyysin tai sijoitusvirheiden takia. Testijakson jälkeen kaikki aineelle altistuneet eläimet lopetetaan. Kuolemaisillaan olevat eläimet tai eläimet, joilla on vakavia ahdistuneisuuden tai kivun oireita, on poistettava ryhmästä ja lopetettava, minkä jälkeen niille tehdään ruumiinavaus.

Testijakson päätyttyä kaikki eläimet, kontrolliryhmien eläimet mukaan lukien, tutkitaan seuraavilta osin:

1 hematologia – vähintään hematokriitti, hemoglobiinipitoisuus, punasolujen lukumäärä, valkosolujen kokonaismäärä ja erittelylaskenta sekä hyytymistekijät

2 kliininen veribiokemia – vähintään yksi parametri seuraavista maksan ja munuaisten toimintakokeista, alaniiniaminotransferaasi (ALAT), seeruminaspartaattiaminotransferaasi (ASAT), virtsa-aineen typpi, albumiini, veren kreatiniini, kokonaisbilirubiini ja seerumin kokonaisproteiini

Muita, riittävän toksikologisen arvion kannalta tärkeitä määrityksiä ovat kalsium, fosfori, kloridi, natrium, kalium, paastoverensokeri, lipidit, hormonit, happo-emästasapaino, methemoglobiini ja kolinesteraasiaktiivisuus.

Havaittujen oireiden tutkimista voidaan tarvittaessa laajentaa muita kliinisiä biokemianmäärityksiä käyttämällä.

1.6.3.1 *Kattava ruumiinavaus*

Kaikille kokeeseen osallistuneille eläimille on tehtävä kattava ruumiinavaus. Vähintään maksa, munuaiset, lisämunuaiset ja kivekset on punnittava märkinä mahdollisimman pian dissektion jälkeen. Elimet ja kudokset (maksa, munuaiset, perna, kivekset, lisämunuaiset, sydän ja muut elimet, joissa on oleellisia vaurioita tai kokomuutoksia) on säilytettävä sopivassa aineessa mahdollisia myöhemmin tehtäviä histopatologisia tutkimuksia varten.

1.6.3.2 *Histopatologinen tutkimus*

Suurannosryhmän ja kontrolliryhmän eläinten säilötyille elimille ja kudoksille on tehtävä histologinen tutkimus. Jos suurimman annoksen saaneen ryhmän eläinten elimissä ja kudoksissa on testattavasta aineesta johtuvia vaurioita, myös pienempien annoskokojen ryhmien eläinten vastaavat elimet on tutkittava. Kaikkien apuryhmien eläimet on tutkittava histologisesti kiinnittäen erityistä huomiota niihin elimiin ja kudoksiin, joissa on havaittu muutoksia käsiteltyjen ryhmien kohdalla.

2 **TIEDOT**

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa esitetään eläinten määrä kokeen alussa ja eläinten määrä kutakin vauriota kohti ryhmittäin.

Kaikki havaintotulokset on arvioitava soveltuvan tilastollisen menetelmän avulla. Tarkoitukseen voidaan käyttää kaikkia yleisiä menetelmiä.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio, jne.

— testiolosuhteet

— annostasot (annoksen suuruus apuaine mukaan lukien ja mahdollinen testattavan aineen pitoisuus)

— vastetietojen luokittelu sukupuolen ja annostason mukaan

— annostaso, joka ei ole aiheuttanut vaikutuksia (jos mahdollista)

— kuolinajankohdat kokeen aikana tai eläinten hengissäpysyminen kokeen loppuun

— myrkytysoireet ja muut vaikutukset

— ajankohdat, jolloin on havaittu poikkeavuuksia, ja poikkeavuuksien kehittyminen jatkossa

— tiedot ruoasta ja kehonpainosta

— käytetyt hematologiset testit tuloksineen

— käytetyt kliinis-biokemialliset testit tuloksineen

— ruumiinavauslöydökset

— histopatologisten löydösten yksityiskohtaiset kuvaukset

— tulosten tilastollinen käsittely soveltuvin osin

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.8 TOISTETUN ANNOKSEN (28 PÄIVÄÄ) MYRKYLLISYYS (HENGITETTYNÄ)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää aineen hiukkaskokojakauma, höyrynpaine, sulamispiste, kiehumispiste, leimahduspiste ja mahdollinen räjähtävyys ennalta.

Katso myös yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Useita koe-eläinryhmiä altistetaan aineelle päivittäin määrätyn ajan käyttäen porrastettuja pitoisuuksia siten, että kukin ryhmä altistuu eri pitoisuudelle. Testijakson pituus on 28 päivää. Jos aineen sopivan pitoisuuden saamiseksi ilmakehään on tarvittu liuotinta, on käytettävä liuotinkontrolliryhmää. Altistusjakson aikana eläimiä tarkkaillaan myrkytysoireiden suhteen. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Ennen testiä eläinten elinolosuhteet pidetään tietyntyyppisinä vähintään viiden päivän ajan testin suorittamista silmälläpitäen. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan käsittelyryhmiin. Tarvittaessa käytetään liuotinta, jotta ilmakehään saadaan sopiva pitoisuus ainetta. Jos annostelun apuna käytetään liuotinta tai muita lisäaineita, on varmistettava, että ne eivät aiheuta myrkytysoireita. Aiempia tietoja voidaan käyttää soveltuvin osin.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Ellei kontraindikaatioita ole, rotan käyttöä suositellaan. Testiin käytetään yleisiä laboratoriokantoja. Eläinten on oltava nuoria ja terveitä.

Testin alussa kumpaakaan sukupuolta edustavien eläinten painonvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 20 % sukupuolen keskiarvosta.

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Jokaista annostasoa kohti tarvitaan vähintään kymmenen eläintä (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä. Jos suunnitellaan testin kuluessa tapahtuvia lopettamisia, eläinten määrää on lisättävä vastaavasti. Tarvittaessa testiin voidaan ottaa kymmenen eläimen apuryhmä (viisi naarasta ja viisi urosta), jota altistetaan suurille annoksille 28 päivän ajan tarkkaillen myrkytysoireiden palautumista ja pysyvyyttä sekä sitä, esiintyykö käsittelyä seuraavan 14 päivän jakson aikana viivästyneitä myrkytysoireita. Tarvitaan myös kymmenen vertailueläimen (viiden naaran ja viiden uroksen) apuryhmä.

1.6.2.3 *Altistuspitoisuudet*

On käytettävä vähintään kolmea pitoisuutta ja yhtä kontrolliryhmää. Testattavalla aineella käsittelyä lukuun ottamatta kontrolliryhmän ja käsittelyryhmien eläimiä on käsiteltävä samalla tavalla. Jos annostelun yhteydessä käytetään liuotinta apuaineena, liuotinta annostellaan kontrolliryhmän eläimille samalla menetelmällä kuin käsittelyryhmän eläimille määränä, joka vastaa suurinta käsittelyannosta. Suurimman annostason on aiheutettava myrkytysoireita, mutta vain vähän tai ei lainkaan kuolleisuutta. Pienimmän annostason ei pidä aiheuttaa lainkaan myrkytysoireita. Jos käytettävissä on soveltuva arvio ihmisaltistumisesta, pienimmän annostason on ylitettävä tämä taso. Keskimmäisen annostason tulee aiheuttaa mahdollisimman vähän myrkytysoireita. Jos käytetään useita välitasoja, ne on valittava siten, että myrkytysoireet porrastuvat. Alimman annostason ja välitason ryhmissä sekä kontrolliryhmissä kuolleisuuden on oltava pieni, jotta tuloksia voidaan arvioida merkityksellisellä tavalla.

1.6.2.4 *Altistusaika*

Päivittäisen altistusajan on oltava kuusi tuntia. Erikoistapauksissa voidaan käyttää myös muunpituisia altistusaikoja.

1.6.2.5 *Laite*

Eläimiä testataan hengityslaitteella, jonka dynaaminen ilmanvirtaus on vähintään 12 ilmanvaihtoa tunnissa. Näin varmistetaan riittävä happipitoisuus ja altistusilmakehän tasainen jakaantuminen. Jos käytetään kammiota, sen rakenteen on oltava sellainen, että koe-eläimet eivät pääse muodostamaan tungosta, mutta altistuvat kuitenkin hengityksen kautta tehokkaasti. Yleinen sääntö kammion ilmakehän stabiiliuden varmistamiseksi on, että eläinten kokonaistilavuus saa olla enintään 5 % kammion tilavuudesta. Eläinkohtaisissa kammioissa voidaan käyttää oronasaalista, vain päähän kohdistuvaa tai koko kehoon kohdistuvaa altistamista. Kahden ensimmäisen tavan avulla aineen imeytyminen muuta kautta voidaan minimoida.

1.6.2.6 *Tarkkailujakso*

Kaikkia eläimiä on tarkkailtava päivittäin myrkytysoireiden suhteen koko altistusjakson ja toipumisjakson ajan. Myös kuolinajankohta ja myrkytysoireiden ilmestymis- sekä häviämisajankohta kirjataan.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläimiä altistetaan aineelle päivittäin 5 — 7 päivänä viikossa 28 päivän ajan. Seurantaa varten koottua apuryhmää tarkkaillaan altistusjakson jälkeen vielä 14 päivän ajan ilman käsittelyä, jotta voitaisiin todeta, ovatko myrkytysoireet häviäviä vai pysyviä. Testilämpötilana käytetään arvoa 22 ± 3 °C.

Suhteellisen kosteuden tulisi olla 30 — 70 %, mutta joissakin tapauksissa (eräiden aerosolien testauksissa) tämä ei ole ehkä mahdollista. Pitämällä kammiossa alipainetta (≤ 5 mm H_2O) voidaan estää aineen vuotaminen ympäristöön. Altistuksen aikana eläimille ei anneta ruokaa eikä vettä.

On käytettävä soveltuvalla analyyttisella pitoisuuden valvontajärjestelmällä varustettua dynaamista inhalaatiojärjestelmää. Sopivien altistuspitoisuuksien löytämiseksi on suositeltavaa tehdä koetesti. Ilmanvirtausta on säädettävä siten, että altistuskammion olosuhteet ovat kauttaaltaan homogeeniset. Järjestelmän avulla on voitava saavuttaa stabiilit altistusolosuhteet niin pian kuin mahdollista.

Seuraavat suureet edellyttävät mittausta ja valvontaa:

a) Ilmanvirtaus (jatkuvasti).

b) Testattavan aineen todellinen pitoisuus hengitysilmassa. Päivittäisen altistuksen aikana pitoisuusvaihtelut eivät saa ylittää ± 15 % keskiarvosta. Eräiden aerosolien kohdalla tällaista säätötasoa ei ehkä voida saavuttaa, jolloin on hyväksyttävä laajempi alue. Testijakson aikana pitoisuudet on pidettävä mahdollisimman muuttumattomina päivästä toiseen. Kerran viikossa aerosoleille on tehtävä hiukkaskokoanalyysi koeryhmittäin.

c) Lämpötila ja kosteus (jatkuvasti, jos mahdollista).

Altistuksen aikana ja sen jälkeen eläimiä tarkkaillaan systemaattisesti ja tulokset kirjataan. Jokaiselle yksittäiselle eläimelle tulee olla oma kirjanpitonsa. Kaikkia eläimiä on tarkkailtava päivittäin ja myrkytysoireet (alkamisajankohta, voimakkuus ja kesto) on kirjattava. Tarkkaillaan ihon, turkin, silmien, limakalvojen, hengitysteiden, verenkierron, autonomisen hermoston, keskushermoston, somatomotorisen aktiviteetin ja käyttäytymismallin muutoksia. Eläimet punnitaan kerran viikossa. Ravinnonkulutuksen mittaaminen viikoittain on suositeltavaa. Eläimiä on tarkkailtava säännöllisesti, jotta voidaan varmistaa, että mahdollisimman vähän eläimiä menetetään kannibalismin, kudosten autolyysin tai sijoitusvirheiden takia. Testijakson jälkeen kaikki aineelle altistuneet eläimet lopetetaan. Kuolemaisillaan olevat eläimet tai eläimet, joilla on vakavia ahdistuneisuuden tai kivun oireita, on poistettava ryhmästä ja lopetettava, minkä jälkeen niille tehdään ruumiinavaus.

Testijakson päätyttyä kaikki eläimet, kontrolliryhmien eläimet mukaan lukien, tutkitaan seuraavilta osin:

i) hematologia – vähintään hematokriitti, hemoglobiinipitoisuus, punasolujen lukumäärä, valkosolujen kokonaismäärä ja erittelylaskenta sekä hyytymistekijät

ii) kliininen veribiokemia – vähintään yksi parametri seuraavista maksan ja munuaisten toimintakokeista, alaniiniaminotransferaasi (ALAT), seeruminaspartaattiaminotransferaasi (ASAT), virtsa-aineen typpi, albumiini, veren kreatiniini, kokonaisbilirubiini ja seerumin kokonaisproteiini

Muita, riittävän toksikologisen arvion kannalta tärkeitä määrityksiä ovat kalsium, fosfori, kloridi, natrium, kalium, paastoverensokeri, lipidit, hormonit, happo-emästasapaino, methemoglobiini ja kolinesteraasiaktiivisuus.

Havaittujen oireiden tutkimista voidaan tarvittaessa laajentaa muita kliinisiä biokemianmäärityksiä käyttämällä.

1.6.3.1 *Kattava ruumiinavaus*

Kaikille kokeeseen osallistuneille eläimille on tehtävä kattava ruumiinavaus. Vähintään maksa, munuaiset, lisämunuaiset, keuhkot ja kivekset on punnittava märkinä mahdollisimman pian dissektion jälkeen. Elimet ja kudokset (hengityselimet, maksa, munuaiset, perna, kivekset, lisämunuaiset, sydän ja muut elimet, joissa on oleellisia vaurioita tai kokomuutoksia) on säilytettävä sopivassa aineessa mahdollisia myöhemmin tehtäviä histopatologisia tutkimuksia varten. Keuhkot on poistettava vahingoittumattomina, minkä jälkeen ne punnitaan ja käsitellään sopivalla kiinnitteellä keuhkojen rakenteen säilymisen varmistamiseksi.

1.6.3.2 *Histopatologinen tutkimus*

Suurannosryhmän ja kontrolliryhmän eläinten säilötyille elimille ja kudoksille on tehtävä histologinen tutkimus. Jos suurimman annoksen saaneen ryhmän eläinten elimissä ja kudoksissa on testattavasta aineesta johtuvia vaurioita, myös pienempien annoskokojen ryhmien eläinten vastaavat elimet on tutkittava. Kaikkien apuryhmien eläimet on tutkittava histologisesti kiinnittäen erityistä huomiota niihin elimiin ja kudoksiin, joissa on havaittu muutoksia käsiteltyjen ryhmien kohdalla.

2 **TIEDOT**

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa esitetään eläinten määrä kokeen alussa ja eläinten määrä kutakin vauriota kohti ryhmittäin.

Kaikki havaintotulokset on arvioitava soveltuvan tilastollisen menetelmän avulla. Tarkoitukseen voidaan käyttää kaikkia yleisiä menetelmiä.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio, jne.

— testiolosuhteet:

altistuslaitteen kuvaus (rakenne, tyyppi, mitat, ilmalähde, aerosolin tuottamiseen käytetty järjestelmä, ilmastointijärjestelmä, poistoilman käsittely, mahdollisen testauskammion olosuhteet ja lämpötilan, kosteuden, aerosolin pitoisuuden stabiiliuden sekä aerosolin hiukkaskokojakauman mittauslaitteiden tiedot).

Altistustiedot

Altistustiedot kootaan taulukkoon, josta ilmenevät myös keskiarvot ja vaihtelut (esimerkiksi keskihajonta). Mahdollisuuksien mukaan esitetään seuraavat tiedot:

a) ilmanvirtaus hengityslaitteen kautta

b) ilman lämpötila ja kosteus

c) nimelliset pitoisuudet (hengityslaitteeseen syötetty kokonaismäärä ainetta jaettuna ilman tilavuudella)

d) liuottimen laatu

e) todelliset pitoisuudet hengitysilmassa testivyöhykkeellä

f) Massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (GDS)

— vastetietojen luokittelu sukupuolen ja pitoisuuden mukaan

— kuolinajankohdat kokeen aikana tai eläinten hengissäpysyminen kokeen loppuun

— myrkytysoireet ja muut vaikutukset sekä oireita aiheuttamaton pitoisuustaso

— ajankohdat, jolloin on havaittu poikkeavuuksia, ja poikkeavuuksien kehittyminen jatkossa

— tiedot ruoasta ja kehonpainosta

— käytetyt hematologiset testit tuloksineen

— käytetyt kliinis-biokemialliset testit tuloksineen

— ruumiinavauslöydökset

— histopatologisten löydösten yksityiskohtaiset kuvaukset

— tulosten tilastollinen käsittely soveltuvin osin

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.9 TOISTETUN ANNOKSEN (28 PÄIVÄÄ) MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA NAUTITTAVAT AINEET)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattavaa ainetta levitetään useisiin ryhmiin jaettujen eläinten iholle porrastettuina annoksina (yksi annos ryhmää kohti) säännöllisesti 28 päivän koejakson aikana. Jakson aikana eläimiä tarkkaillaan myrkytysoireiden suhteen. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Ennen testiä eläinten elinolosuhteet pidetään tietyntyyppisinä vähintään viiden päivän ajan testin suorittamista silmälläpitäen. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan käsittely- ja vertailuyryhmiin. Noin 24 tuntia ennen testiä turkki leikataan tai ajetaan eläinten selkäalueelta varoen naarmuttamasta ihoa, koska naarmut saattavat muuttaa ihon läpäisevyyttä. Turkinpoisto on yleensä uusittava noin viikon välein. Vähintään 10 % kehon pinta-alaa peittävästä karvasta on ajeltava tai leikattava. Koe-eläimen paino on otettava huomioon suunniteltaessa paljastettavan alueen ja siteen suuruutta. Kiinteät aineet voidaan tarvittaessa jauhaa, ja ne on kosteutettava riittävällä vesimäärällä tai tarvittaessa muulla liuottimella hyvän ihokontaktin varmistamiseksi. Nestemäisiä aineita käytetään yleensä laimentamattomina. Käsittely toistetaan päivittäin 5 — 7 päivänä viikossa.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Koe-eläiminä voidaan käyttää aikuisia rottia, kaneja tai marsuja. Muiden lajien käyttö on perusteltava.

Testin alussa kumpaakaan sukupuolta edustavien eläinten painonvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 20 % sukupuolen keskiarvosta.

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Jokaista annostasoa kohti tarvitaan vähintään kymmenen eläintä (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä. Jos suunnitellaan testin kuluessa tapahtuvia lopettamisia, eläinten määrää on lisättävä vastaavasti. Tarvittaessa testiin voidaan ottaa kymmenen eläimen apuryhmä (viisi naarasta ja viisi urosta), jota altistetaan suurille annoksille 28 päivän ajan tarkkaillen myrkytysoireiden palautumista ja pysyvyyttä sekä sitä, esiintyykö käsittelyä seuraavan 14 päivän jakson aikana viivästyneitä myrkytysoireita. Tarvitaan myös kymmenen vertailueläimen (viiden naaran ja viiden uroksen) apuryhmä.

1.6.2.3 *Altistuspitoisuudet*

Tarvitaan vähintään kolme pitoisuustasoa ja yksi kontrolliryhmä. Jos testattava aine liuotetaan apuaineeseen, tätä varten tarvitaan erillinen kontrolliryhmä. Päivittäisen altistuksen on kestettävä vähintään kuusi tuntia. Ainetta levitetään samaan aikaan joka päivä, ja annosta säädetään 1 — 2 viikon välein siten, että pitoisuustasot pysyvät vakiona eläimen painoon nähden. Aineella käsittelyä lukuun ottamatta kontrolliryhmän ja käsittelyryhmien eläimiä on käsiteltävä samalla tavalla. Jos annostelun yhteydessä käytetään liuotinta apuaineena, liuotinta annostellaan kontrolliryhmän eläimille samalla menetelmällä kuin käsittelyryhmän eläimille määränä, joka vastaa suurinta käsittelyannosta. Suurimman annostason on aiheutettava myrkytysoireita, mutta vain vähän tai ei lainkaan kuolleisuutta. Pienimmän annostason ei pidä aiheuttaa lainkaan myrkytysoireita. Jos käytettävissä on soveltuva arvio ihmisaltistumisesta, pienimmän annostason on ylitettävä tämä taso. Keskimmäisen annostason tulee aiheuttaa mahdollisiman vähän myrkytysoireita. Jos käytetään useita välitasoja, ne on valittava siten, että myrkytysoireet porrastuvat. Alimman annostason ja välitason ryhmissä sekä kontrolliryhmissä kuolleisuuden on oltava pieni, jotta tuloksia voidaan arvioida merkityksellisellä tavalla.

Jos aine aiheuttaa vakavaa ihoärsytystä iholle levitettynä, pitoisuuksia on pienennettävä, mikä voi aiheuttaa suurannosryhmän eläimille muiden myrkytysoireiden vähenemistä tai oireiden häviämisen. Jos eläimen iho on pahoin vaurioitunut, voi olla tarpeen keskeyttää koe ja uusia se pienempiä pitoisuuksia käyttäen.

1.6.2.4 *Rajatesti*

Jos suoritetaan alustava koe käyttäen annostasoa 1 000 mg/kg tai tätä korkeampaa tasoa, joka perustuu tunnettuun ihmisaltistukseen, eikä tällainen testi aiheuta myrkytysoireita, lisätestit voidaan katsoa tarpeettomiksi.

1.6.2.5 *Tarkkailujakso*

Kaikkia eläimiä on tarkkailtava päivittäin myrkytysoireiden suhteen. Kuolinajankohta ja myrkytysoireiden ilmestymis- sekä häviämisajankohta kirjataan.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläimiä pidetään yksin häkeissä. Eläimiä käsitellään testattavalla aineella mieluiten seitsemänä päivänä viikossa 28 päivän ajan. Seurantaa varten koottuja apuryhmiä tarkkaillaan altistusjakson jälkeen vielä 14 päivän ajan ilman käsittelyä, jotta voidaan todeta, ovatko myrkytysoireet häviäviä vai pysyviä. Päivittäisen altistuksen on kestettävä vähintään kuusi tuntia.

Testattavaa ainetta levitetään tasaisesti alueelle, joka vastaa noin 10 %:a kehon kokonaispinta-alasta. Erittäin myrkyllisten aineiden kohdalla voidaan käyttää pienempää pinta-alaa, mutta ainetta on levitettävä mahdollisimman ohuelti ja tasaisesti niin suurelle alueelle kuin mahdollista.

Altistuksen aikana ihoalue peitetään harsositeellä ja ärsyttämättömällä laastarilla. Tämän lisäksi alue on peitettävä, niin että harsoside ja aine pysyvät paikallaan eikä eläin pääse syömään ainetta. Eläin voidaan sitoa osittain siten, ettei se pysty syömään ainetta. Täydellistä liikkumattomuutta ei kuitenkaan suositella. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää suojakaulusta.

Altistusjakson jälkeen aineen jäännökset poistetaan vedellä tai muulla sopivalla ihonpuhdistusmenetelmällä.

Eläimiä on tarkkailtava säännöllisesti, jotta voidaan varmistaa, että mahdollisimman vähän eläimiä menetetään kannibalismin, kudosten autolyysin tai sijoitusvirheiden takia. Testijakson jälkeen kaikki aineelle altistuneet eläimet lopetetaan. Kuolemaisillaan olevat eläimet tai eläimet, joilla on vakavia ahdistuneisuuden tai kivun oireita, on poistettava ryhmästä ja lopetettava, minkä jälkeen niille tehdään ruumiinavaus.

Testijakson päätyttyä kaikki eläimet, kontrolliryhmien eläimet mukaan lukien, tutkitaan seuraavilta osin:

1) hematologia – vähintään hematokriitti, hemoglobiinipitoisuus, punasolujen lukumäärä, valkosolujen kokonaismäärä ja erittelylaskenta sekä hyytymistekijät

2) kliininen veribiokemia – vähintään yksi parametri seuraavista maksan ja munuaisten toimintakokeista, alaniiniaminotransferaasi (ALAT), seeruminaspartaattiaminotransferaasi (ASAT), virtsa-aineen typpi, albumiini, veren kreatiniini, kokonaisbilirubiini ja seerumin kokonaisproteiini

Muita, riittävän toksikologisen arvion kannalta tärkeitä määrityksiä ovat kalsium, fosfori, kloridi, natrium, kalium, paastoverensokeri, lipidit, hormonit, happo-emästasapaino, methemoglobiini ja kolinesteraasiaktiivisuus.

Havaittujen oireiden tutkimista voidaan tarvittaessa laajentaa muita kliinisiä biokemianmäärityksiä käyttämällä.

1.6.4 **Kattava ruumiinavaus**

Kaikille kokeeseen osallistuneille eläimille on tehtävä kattava ruumiinavaus. Vähintään maksa, munuaiset, lisämunuaiset ja kivekset on punnittava märkinä mahdollisimman pian dissektion jälkeen. Elimet ja kudokset (maksa, munuaiset, perna, kivekset, lisämunuaiset, sydän ja muut elimet, joissa on oleellisia vaurioita tai kokomuutoksia) on säilytettävä sopivassa aineessa mahdollisia myöhemmin tehtäviä histopatologisia tutkimuksia varten.

1.6.5 **Histopatologinen tutkimus**

Suurannosryhmän ja kontrolliryhmän eläinten säilötyille elimille ja kudoksille on tehtävä histologinen tutkimus. Jos suurimman annoksen saaneen ryhmän eläinten elimissä ja kudoksissa on testattavasta aineesta johtuvia vaurioita, myös pienempien annoskokojen ryhmien eläinten vastaavat elimet on tutkittava. Kaikkien apuryhmien eläimet on tutkittava histologisesti kiinnittäen erityistä huomiota niihin elimiin ja kudoksiin, joissa on havaittu muutoksia käsiteltyjen ryhmien kohdalla.

2 **TIEDOT**

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa esitetään eläinten määrä kokeen alussa ja eläinten määrä kutakin vauriota kohti ryhmittäin.

Kaikki havaintotulokset on arvioitava soveltuvan tilastollisen menetelmän avulla. Tarkoitukseen voidaan käyttää kaikkia yleisiä menetelmiä.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio, jne.

— testiolosuhteet (mukaan lukien siteen tyyppi, okklusiivinen tai ei-okklusiivinen)

— annostasot (annoksen suuruus apuaine mukaan lukien ja mahdollinen testattavan aineen pitoisuus)

— oireita tuottamaton annostaso, mikäli mahdollista

— vastetietojen luokittelu sukupuolen ja annostason mukaan

— kuolinajankohdat kokeen aikana tai eläinten hengissäpysyminen kokeen loppuun

— myrkytysoireet ja muut vaikutukset

— ajankohdat, jolloin on havaittu poikkeavuuksia, ja poikkeavuuksien kehittyminen jatkossa

— tiedot ruoasta ja kehonpainosta

— käytetyt hematologiset testit tuloksineen

— käytetyt kliinis-biokemialliset testit tuloksineen

— ruumiinavauslöydökset

— histopatologisten löydösten yksityiskohtaiset kuvaukset

— tulosten tilastollinen käsittely soveltuvin osin

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.10 MUTAGEENISYYS (SYTOGENEETTINEN IN VITRO -KOE NISÄKKÄILLÄ)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (C).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Sytogeneettinen *in vitro* -koe on lyhytkestoinen mutageenisyyskoe, jonka avulla voidaan havaita viljeltyjen nisäkässolujen rakenteelliset kromosomimuutokset. Sekä vakiintuneita solulinjoja että primäärisia soluviljelmiä voidaan käyttää. Kun soluviljelmät on altistettu testattavalle kemikaalille (sopivaa metabolian aktivointijärjestelmää käyttäen ja ilman metabolian aktivointijärjestelmää), niitä käsitellään sukkulavaiheen inhibiittoreilla (esimerkiksi kolkisiinillä) solujen kokoamiseksi mitoosin metafaasin kaltaiseen vaiheeseen (c-metafaasiin). Soluja kerätään sopivin välein ja kromosomipreparaatit valmistetaan. Preparaatit värjätään ja metafaasisolut analysoidaan kromosomimuutosten suhteen.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

1.6.1.1 *Solut*

Voidaan käyttää vakiintuneita solulinjoja tai primaarisolujen viljelmiä, esimerkiksi hamsterin soluja tai ihmisen lymfosyyttejä. Testattavat kemikaalit sekoitetaan elatusaineeseen tai liuotetaan sopivaan apuaineeseen ennen solujen käsittelyä.

1.6.1.2 *Metabolian aktivointijärjestelmä*

Solut on altistettava testattavalle aineelle sekä metabolian aktivointijärjestelmää käyttäen että ilman metabolian aktivointijärjestelmää. Yleisimmin käytetty järjestelmä on kofaktori-välitteinen postmitokondriaalinen fraktio, joka on saatu entsyymi-induktoreilla käsiteltyjen jyrsijöiden maksoista.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Viljelmien lukumäärä

Kutakin koepistettä kohti on käytettävä vähintään kahta viljelmää.

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Negatiivisina kontrolleina käytetään liuotinta (edellyttäen, että liuotinta ei käytetä viljelmän elatusaineena eikä kyseessä ole vesi), maksaentsyymin aktivointiseosta, maksaentsyymin aktivointiseosta ja liuotinta sekä käsittelemättömiä viljelmiä.

Kuhunkin kokeeseen otetaan mukaan positiivinen kontrolli. Kun testattava kemikaali aktivoidaan maksaentsyymin aktivointiseoksen avulla, positiivisena kontrollina on käytettävä yhdistettä, jonka tiedetään edellyttävän metabolian aktivointia.

Annostaso

On käytettävä vähintään kolmea annostasoa vähintään yhden logaritmin kattavalla annosalueella. Suurimman annoksen on estettävä noin 50 % mitoottisesta toiminnasta tai tuotettava muuntyyppinen indikaatio solumyrkyllisyydestä. Jos aine ei ole myrkyllinen, sitä testataan liukoisuusrajaan asti tai enintään pitoisuuteen 5 mg/l asti.

Viljelyolosuhteet

Viljelmän elatusaine, inkubaatio-olosuhteet (esimerkiksi lämpötila, viljelyastiat, hiilidioksidipitoisuus ja kosteus) valitaan viljelmän mukaan.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

1.6.3.1 *Viljelmien valmistelu*

Vakiintuneet solulinjat: Kantaviljelmistä esimerkiksi trypsinisaatiolla tai ravistamalla saadut solut kylvetään viljelyastioihin sopivan tiheään ja viljelmiä inkuboidaan 37 °C:ssa.

Ihmislymfosyytit: Heparinisoitua kokoverta lisätään elatusaineeseen, jossa on kasviperäistä punasoluja saostavaa ainetta, vasikkasikiön seerumia ja antibiootteja, ja viljelmää inkuboidaan 37 °C:ssa.

1.6.3.2 *Viljelmien käsittely testattavalla yhdisteellä*

i) Käsittely ilman maksaentsyymin aktivointiseosta

Kaikkien käsittelyjen on mahdollisuuksien mukaan jatkuttava vähintään yhden kokonaisen solusyklin ajan. Fiksaatio-ohjelmilla varmistetaan syklin eri vaiheissa käsiteltyjen solujen ensimmäisen käsittelyn jälkeisten mitoosien analyysit.

Jos käsittely ei kata kokonaista solusykliä, fiksaatioajat valitaan siten, että saadaan soluja, jotka ovat käsittelyn aikana eri vaiheissa (G_1, S ja G_2).

Testattavaa kemikaalia lisätään vakiintuneen solulinjan soluihin, kun solut ovat kasvun eksponentiaalisessa vaiheessa. Ihmislymfosyyttiviljelmiä käsitellään niiden ollessa semisynkronisessa vaiheessa.

ii) Käsittely maksaentsyymin aktivointiseosta käyttäen

Käsittelyä varten testattavan yhdisteen ja aktivointijärjestelmän on oltava läsnä niin kauan kuin mahdollista, ilman että tämä aiheuttaa soluille myrkytysoireita. Jos käsittely ei myrkyllisyyssyistä kata kokonaista solusykliä, fiksaatioajat valitaan siten, että saadaan soluja, jotka ovat käsittelyn aikana eri vaiheissa (G_1, S ja G_2).

Solujen keräys

Soluviljelmiä käsitellään sukkulavaiheen inhibiittorilla sopivan ajanjakson ajan ennen keräystä. Kukin viljelmä kerätään ja käsitellään erikseen kromosomipreparaatteja varten.

Tarvitaan vähintään kaksi keräysaikaa. On suositeltavaa tehdä ensimmäinen keräys yhden solusyklin päätyttyä ja toinen myöhemmin. Näin varmistetaan kaikkien solusyklin vaiheiden saanti, myös siinä tapauksessa, että sykli on myöhässä.

1.6.3.3 *Kromosomipreparaatit*

Kromosomipreparaattien valmistusvaiheet ovat solujen hypotoninen käsittely, fiksaatio, levitys objektilasille ja värjäys.

Analyysi

Kutakin viljelmää kohti valitaan vähintään 100 metafaasia riittävää jakaumaa käyttäen, ja metafaasit analysoidaan kromosomimuutosten suhteen. Objektilasit koodataan ennen analyysiä. Ihmisen lymfosyyttien osalta analysoidaan ainoastaan 46 sentromeeriä sisältävät metafaasit.

Vakiintuneiden solulinjojen kohdalla analysoidaan ainoastaan metafaasit, jotka sisältävät 46 ± 2 sentromeeriä.

Lisäksi testin yhteydessä on määritettävä mitoottinen indeksi tai jokin muu solumyrkyllisyyden ilmaisin annostasoittain.

2 TIEDOT

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona. Kunkin käsitellyn viljelmän ja kontrolliviljelmän osalta ilmoitetaan kromatidityyppiset poikkeamat (tiedon puuttumiset, katkokset ja kromatidien sisältämän tiedon vaihtumiset), kromosomityyppiset poikkeamat (esimerkiksi tiedon puuttumiset, katkokset, pienoiskromosomit, rengasmaiset kromosomit, disentrisyys, polysentrisyys) ja poikkeavien (sekä sellaisten, joista puuttuu tietoa, että tältä osin normaalien) metafaasien lukumäärä.

Tiedot arvioidaan soveltuvan tilastollisen menetelmän avulla.

Tuloksia on verrattava samanaikaisiin negatiivisiin kontrolleihin.

Ellei yhden testin käyttöä voida perustella tieteellisesti, on tehtävä vähintään kaksi itsenäistä testiä. Toista testiä ei tarvitse suorittaa täysin samalla tavoin kuin ensimmäistä, vaan eräitä testiolosuhteita on suositeltavaa muuttaa, jotta saataisiin enemmän tietoja.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetyt solut

— testiolosuhteet: liuoksen kokoonpano, hiilidioksidipitoisuus, inkubointilämpötila, inkubointiaika, annostasot, käsittelyhetki, käsittelyn kesto sukkulavaiheen inhibiittoria käytettäessä, sukkulavaiheen inhibiittorin pitoisuus, käytetyn maksaentsyymin aktivointiseoksen tyyppi, positiiviset ja negatiiviset kontrollit

— soluviljelmien lukumäärä

— analysoitujen metafaasien lukumäärä (tiedot ilmoitetaan viljelmäkohtaisesti)

— mitoottinen indeksi tai muu solumyrkyllisyyden ilmaisin

— muutosten tyyppi ja lukumäärä kutakin käsittely- tai kontrolliviljelmää kohti, vakiintuneiden solulinjojen kromosomien normaali lukumäärä

— tilastollinen arviointi

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.11 MUTAGEENISYYS (SELKÄYDINSOLUJEN SYTOGENEETTINEN IN VIVO -KOE NISÄKKÄILLÄ, KROMOSOMIANALYYSI)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (C).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tämä sytogeneettinen *in vivo* -koe on lyhytkestoinen mutageenisyystesti, jonka avulla voidaan havaita rakenteelliset kromosomimuutokset. Kromosomimuutosten arviointiin käytetään yleensä ensimmäisiä käsittelyn jälkeisiä mitooseja. Kemiallisten mutageenien kohdalla suurin osa käsittelyn aiheuttamista poikkeavuuksista on kromatidityyppisiä.

Menetelmässä käytetään nisäkkäiden selkäydinsoluja. Kyseisiä nisäkkäitä on altistettu testattaville kemikaaleille soveltuvia menetelmiä käyttäen, ja eläimet lopetetaan tietyn ajan kuluttua. Ennen lopettamista eläimiä käsitellään myös sukkulavaiheen inhibiittorilla (esimerkiksi kolkisiinillä) solujen kokoamiseksi mitoosin metafaasin kaltaiseen vaiheeseen (c-metafaasiin). Soluista valmistetaan ilmakuivattuja kromosomipreparaatteja, jotka värjätään. Tämän jälkeen metafaasit analysoidaan mikroskoopin avulla kromosomimuutosten suhteen.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Testattavat kemikaalit liuotetaan tavalliseen suolaliuokseen. Jos kemikaali ei liukene veteen, se voidaan liuottaa johonkin muuhun apuaineeseen tai suspensioon.

Testissä käytetään tuoreita liuoksia. Jos annostelu tehdään liuottimen avulla, liuotin ei saa vaikuttaa testattavan yhdisteen ominaisuuksiin eikä aiheuttaa myrkytysoireita.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Testissä käytetään jyrsijöitä, esimerkiksi rottia, hiiriä tai hamstereita. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan käsittely- ja kontrolliryhmiin.

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Kussakin käsittely- ja kontrolliryhmässä on oltava viisi naarasta ja viisi koirasta. Jos testiohjelmaan kuuluu käsittelyn jälkeen useita testikertoja, kerralla on lopetettava 10 eläintä ryhmää kohti.

Positiiviselle kontrolliryhmälle riittää yksi näytteenottoaika.

1.6.2.3 *Annostelutapa*

Yleensä testattavaa ainetta annetaan vain kerran. Myrkyllisyystietoihin nojaten voidaan myös käyttää toistuvaa käsittelyä, edellyttäen että testattavalla aineella ei ole solumyrkyllisiä vaikutuksia luuytimeen. Tavallisimmin ainetta annetaan suun kautta tai ruiskeena vatsaonteloon. Tilanteen mukaan voidaan käyttää myös muita annostelutapoja.

1.6.2.4 *Negatiiviset ja positiiviset kontrollit*

Positiivisena kontrollina käytetään yhdistettä, jonka tiedetään aiheuttavan kromosomimuutoksia *in vivo* -kokeissa. Jokaisen kokeen yhteydessä käytetään myös negatiivista (liuotin-) kontrolliryhmää.

1.6.2.5 *Annostaso*

Perussarjan eläimille annetaan testattavaa ainetta yhtenä annoksena, joka on suurin siedetty annos tai annos, jonka antaminen saa aikaan lieviä merkkejä solumyrkyllisyydestä (esimerkiksi mitoosin osittaista estymistä).

Myrkyttömien aineiden enimmäisannos (raja-annos), joka on tutkittava kerta-annoksen antamisen jälkeen, on 2 000 mg/kg.

Jos käytetään testiohjelmaa, johon kuuluu toistuvia annostuksia, päivittäinen raja-annos on 1 000 mg/kg.

Tieteellisin perustein voidaan käyttää useampiakin annostasoja.

Jos koe tehdään vahvistustarkoituksessa, on käytettävä vähintään kahta lisäannostasoa.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Testi voidaan suorittaa seuraavilla tavoilla:

i) Eläimet altistetaan suurimmalle siedetylle annokselle vain kerran. Ensimmäiset näytteet otetaan 24 tuntia käsittelyn jälkeen. Jos tulokset ovat selvästi positiivisia, lisänäytteitä ei ehkä tarvitse ottaa. Jos tulokset ovat negatiivisia tai virheellisiä, käytetään yhtä aikaisempaa ja yhtä myöhempää näyteväliä, jotka jaetaan sopivasti 6 — 48 tunnin jaksoon. Näin eliminoidaan testattavan kemikaalin vaikutus solusyklin kinetiikkaan.

   Jos käytetään lisäannostasoja, näytteet on otettava erityisen herkkinä jaksoina tai, jos nämä eivät ole tiedossa, 24 tuntia käsittelyn jälkeen.

ii) Käytetään toistuvia annostuksia. Tämä edellyttää sitä, että farmakokineettisten ja metabolisten tietojen perusteella tarvitaan testiohjelma, joka sisältää toistuvia käsittelyjä. Tällöin näytteet on otettava 6 ja 24 tuntia viimeisen käsittelyn jälkeen.

Luuytimen valmistelu

Ennen lopettamista eläimille annetaan sopiva annos sukkulavaiheen inhibiittoria ruiskeena vatsaonteloon, jotta c-metafaasiin saataisiin riittävä lukumäärä soluja. Vastalopetettujen eläinten kummastakin reisiluusta otetaan luuydintä isotonisella liuoksella huuhtelemalla. Sopivan hypotonisen käsittelyn jälkeen tehdään solujen fiksaatio, ja solut levitetään objektilaseille. Ilmakuivauksen jälkeen solut värjätään.

Analyysi

Objektilasit koodataan ennen mikroskooppianalyysiä. Analysoidaan kromosomimuutoksia etsien eläimittäin riittävää hajontaa käyttäen vähintään 50:tä metafaasia, joissa on täysi lukumäärä sentromeereja. Myös eläinkohtaiset mitoottiset indeksit voidaan määrittää.

2 TIEDOT

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona. Kunkin käsittely- ja kontrolliryhmään kuuluvan eläimen osalta ilmoitetaan kromatidi- ja isokromatidityyppiset muutokset (tiedon puuttumiset, katkokset ja kromatidien sisältämän tiedon vaihtumiset). Kunkin käsittely- ja kontrolliryhmän osalta ilmoitetaan myös keskiarvot ja keskihajonnat. Tiedot arvioidaan soveltuvan tilastollisen menetelmän avulla.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— eläinten lajit, kannat ja ikä

— käsittely- ja kontrolliryhmien eläinlukumäärät sukupuolittain

— testiolosuhteet: käsittely- ja näytteenotto-ohjelman yksityiskohtainen kuvaus, annostasot, käsittelyn kesto, käsittelyn kesto sukkulavaiheen inhibiittoria käytettäessä ja sukkulavaiheen inhibiittorin pitoisuus

— analysoitujen metafaasien lukumäärä eläimittäin

— mitoottiset indeksit, jos ne on määritetty

— muutosten tyyppi ja lukumäärä kunkin käsittely- tai kontrolliryhmän eläimen osalta

— kokeenaikaiset myrkytysoireet

— tilastollinen arviointi

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.12 MUTAGEENISYYS (MIKROTUMAKOE)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (C).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tämä koe on lyhytkestoinen, nisäkkäille tehtävä *in vivo* -koe kemikaalien aiheuttamien kromosomivaurioiden tai mitoottisen järjestelmän vaurioiden havaitsemiseksi. Määritys perustuu käsittely- ja kontrolliryhmien eläinten polykromaattisten erytrosyyttien mikrotumien lukumäärän kasvuun.

Mikrotumat muodostuvat kromosomifragmenteista tai mitoosissa myöhästyneistä kromosomeista. Erytroblastien kehittyessä erytrosyyteiksi päätuma joutuu pois sytoplasmasta, mutta mikrotuma saattaa jäädä siihen. Kokeessa tarvittavat nuoret polykromaattiset erytrosyytit otetaan selkäytimestä laboratorionisäkkäiltä, jotka on sopivalla menetelmällä altistettu testattavalle aineelle. Selkäydintä kerätään ja siitä tehdään sivelyvalmisteita, jotka värjätään. Polykromaattiset erytrosyytit mikrotumien suhteen analysoidaan mikroskoopin avulla, ja polykromaattisten sekä normokromaattisten erytrosyyttien suhde määritetään.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Testattavat kemikaalit liuotetaan isotoniseen liuokseen. Jos kemikaali ei liukene tähän liuokseen, se voidaan liuottaa johonkin muuhun apuaineeseen tai suspensioon. Jos annostelu tehdään liuottimen avulla, liuotin ei saa vaikuttaa testattavan yhdisteen ominaisuuksiin eikä aiheuttaa myrkytysoireita. Testissä käytetään tuoreita liuoksia.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Hiirien käyttöä suositellaan, mutta myös muita nisäkkäitä voidaan käyttää. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan käsittely- ja kontrolliryhmiin.

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Kussakin käsittely- ja kontrolliryhmässä on oltava viisi naarasta ja viisi koirasta. Jos testiohjelmaan kuuluu käsittelyn jälkeen useita testikertoja, kerralla on lopetettava 10 eläintä ryhmää kohti. Positiiviselle kontrolliryhmälle riittää yksi näytteenottoaika.

1.6.2.3 *Annostelutapa*

Yleensä testattavaa ainetta annetaan vain kerran. Myrkyllisyystietoihin nojaten voidaan myös käyttää toistuvaa käsittelyä, edellyttäen että testattavalla aineella ei ole solumyrkyllisiä vaikutuksia luuytimeen. Tavallisimmin ainetta annetaan suun kautta tai ruiskeena vatsaonteloon. Tilanteen mukaan voidaan käyttää myös muita annostelutapoja.

1.6.2.4 *Negatiiviset ja positiiviset kontrollit*

Jokaisessa kokeessa käytetään positiivisten kontrollien ohella myös negatiivista (liuotin-) kontrolliryhmää.

1.6.2.5 *Annostaso*

Perussarjaa varten testattavaa ainetta annetaan yhtenä annoksena, joka on suurin siedetty annos tai annos, joka aiheuttaa lieviä merkkejä solumyrkyllisyydestä (esimerkiksi polykromaattisten ja normokromaattisten erytrosyyttien suhteen muutoksia).

Myrkyttömien aineiden kohdalla enimmäisannos (raja-annos), joka on tutkittava kerta-annoksen antamisen jälkeen, on 2 000 mg/kg.

Jos käytetään testiohjelmaa, johon kuuluu toistuvia annosteluja, päivittäinen raja-annos on 1 000 mg/kg.

Tieteellisin perustein voidaan käyttää useampiakin annostasoja.

Jos koe tehdään vahvistustarkoituksessa, on käytettävä vähintään kahta lisäannostasoa.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Testi voidaan suorittaa seuraavilla tavoilla:

i) Eläimille annetaan testattavaa yhdistettä vain kerran. Näytteenottoaikojen tulisi olla yhteneviä määrittelyn enimmäisvasteen kanssa, joka vaihtelee testattavan yhdisteen mukaan. Tästä syystä luuydinnäytteet otetaan vähintään kahdesti: ensimmäinen aikaisintaan 12 tuntia ja toinen viimeistään 48 tuntia käsittelyn jälkeen.

   Jos käytetään lisäannostasoja, näytteet on otettava erityisen herkkinä jaksoina tai, jos nämä eivät ole tiedossa, 24 tuntia käsittelyn jälkeen.

ii) Käytetään toistuvia annostuksia. Tämä edellyttää, että farmakokineettisten ja metabolisten tietojen perusteella tarvitaan testiohjelma, joka sisältää toistuvia käsittelyjä. Tällöin näytteet on otettava 6 ja 24 tuntia viimeisen käsittelyn jälkeen.

Luuytimen valmistelu

Luuydintä otetaan vastalopetettujen eläinten kummastakin reisiluusta vasikkasikiön seerumilla huuhtelemalla. Solut sedimentoidaan sentrifugilla ja supernatantti osa kaadetaan pois. Homogeenista solususpensiota tiputetaan objektilasille ja levitetään siten, että saadaan sivelyvalmiste. Ilmakuivauksen jälkeen objektilasit värjätään.

Analyysi

Objektilasit koodataan ennen mikroskooppianalyysiä. Eläimittäin analysoidaan vähintään 1 000 polykromaattista erytrosyyttiä mikrotumien suhteen.

Eläimittäin määritetään normokromaattisten ja polykromaattisten erytrosyyttien suhde laskemalla yhteensä 1 000 erytrosyyttiä.

2 TIEDOT

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona. Kunkin käsittely- ja kontrolliryhmään kuuluvan eläimen osalta ilmoitetaan löydettyjen polykromaattisten erytrosyyttien lukumäärä, mikrotumia sisältävien polykromaattisten erytrosyyttien lukumäärä, mikrotumia sisältävien solujen prosentuaalinen osuus ja normokromaattisten sekä polykromaattisten erytrosyyttien suhde. Kunkin käsittely- ja kontrolliryhmän osalta ilmoitetaan myös keskiarvot ja keskihajonnat. Tiedot arvioidaan soveltuvan tilastollisen menetelmän avulla.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— eläinten lajit, kannat ja ikä

— käsittely- ja kontrolliryhmien eläinlukumäärät sukupuolittain

— testiolosuhteet: käsittely- ja näytteenotto-ohjelman yksityiskohtainen kuvaus, annostasot, myrkyllisyystiedot, negatiiviset ja positiiviset kontrollit

— mikrotumien laskentakriteerit

— annoksen ja vaikutuksen suhde, jos mahdollista

— kokeenaikaiset merkit aineen myrkyllisyydestä

— tilastollinen arviointi

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.13 MUTAGEENISYYS (ESCHERICHIA COLI, REVERSIOMUTAATION MÄÄRITYS)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (C).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Escherichia coli -bakteerin tryptofaanin reversio (trp) on mikrobiologinen määritys, jolla mitataan $trp^- \rightarrow trp^+$ -reversiota käyttäen kemikaaleja, jotka aiheuttavat emäsmuutoksia eliön genomiin.

Bakteerit altistetaan testattavalle kemikaalille metabolian aktivointia käyttäen ja ilman metabolian aktivointia. Kun inkubaatio on jatkunut sopivan ajan minimimäärässä elatusainetta, revertoituneet bakteeripesäkkeet lasketaan ja tulosta verrataan käsittelemättömän kontrolliviljelmän ja apuaineessa olevan kontrolliviljelmän spontaanisti tapahtuneiden reversioiden lukumäärään.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

Määritys voidaan tehdä (1) esi-inkubaatiomenetelmällä, tai (2) suoralisäysmenetelmällä, jossa bakteereja ja testattavaa ainetta sekoitetaan pinta-agariin, minkä jälkeen seos kaadetaan selektiivisen agarlevyn pinnalle.

1.6.1 **Valmistelut**

1.6.1.1 *Bakteerit*

Bakteerit kasvatetaan 37 °C:ssa myöhäiseen eksponentiaaliseen tai aikaiseen vakiintuneeseen kasvuvaiheeseen asti. Solutiheyden on oltava noin 10^8 — 10^9 solua millilitrassa.

1.6.1.2 *Metabolian aktivointi*

Bakteerit on altistettava testattavalle aineelle sekä metabolian aktivointijärjestelmää käyttäen että ilman metabolian aktivointijärjestelmää. Yleisimmin käytetty järjestelmä on kofaktori-välitteinen postmitokondriaalinen fraktio, joka on saatu entsyymi-induktoreilla käsiteltyjen jyrsijöiden maksoista.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Kannat*

On käytettävä kolmea kantaa: WP2:ta, WP2 uvr A:ta ja WP2 uvr A pKM 101:tä. Kantaviljelmän valmistelussa ja säilytyksessä on käytettävä yleisiä menetelmiä. Kantojen kasvuvaatimukset ja geneettinen identtisyys, herkkyys UV-säteilylle tai mitomysiini C:lle sekä kannan WP2 uvr A pKM 101 ampisilliiniresistentti on tarkistettava. Kannan on myös tuotettava spontaaneja revertoitumisia odotetulla frekvenssialueella.

1.6.2.2 *Elatusaine*

Mutanttien syntymiseen ja valintaan käytetään sopivaa elatusainetta ja pinta-agaria.

1.6.2.3 *Negatiiviset ja positiiviset kontrollit*

On suoritettava samanaikaiset käsittely- ja kontrollikokeet. Myös positiivinen kontrolliryhmä tarvitaan

i) bakteerikannan herkkyyden varmistamiseksi

Positiivisena kontrollina voidaan käyttää metyylimetaanisulfonaattia, 4-nitrokinoliinioksidia tai (ilman metabolian aktivointia tehtävissä kokeissa) etyylinitrosureaa.

ii) testin kannalta oleellisten metabolisten järjestelmien toiminnan varmistamiseksi.

Kaikkien kantojen metabolian toiminnan positiivisena kontrollina voidaan käyttää 2-aminoantraseenia. Positiivisena kontrollina on käytettävä mahdollisuuksien mukaan kemikaalia, joka vastaa testattavaa kemikaalia kemialliselta luokitukseltaan.

1.6.2.4 *Annostaso*

Testataan vähintään viisi erisuuruista kemikaalilukumäärää, niin että levyjen välinen ero on puolen logaritmin luokkaa. Aineita testataan liukoisuus- tai myrkyllisyysrajaan asti. Myrkyllisyys ilmenee spontaanisti revertoituneiden bakteeripesäkkeiden lukumäärän pienenemisenä, taustaverhon häviämisenä tai käsiteltyjen viljelmien hengissäpysymisasteen heikkenemisenä. Myrkyttömiä kemikaaleja on testattava arvoon 5 mg/levy asti, ennen kuin ne voidaan todeta negatiivisiksi.

1.6.2.5 *Inkubaatiojakso*

Levyjä inkuboidaan 37 °C:ssa 48 — 72 tuntia.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Kun suoralisäysmenetelmää käytetään ilman entsyymiaktivointia, kemikaalia ja 0,1 ml tuoretta bakteeriviljelmää lisätään 2 ml:aan pinta-agaria. Kun käytetään metabolian aktivointia, pinta-agariin lisätään testattavan kemikaalin ja bakteerien lisäyksen jälkeen 0,5 ml maksaentsyymien aktivointiseosta, jossa on riittävä määrä postmitokondristaalista fraktiota. Putkien sisältö sekoitetaan, minkä jälkeen seos kaadetaan selektiivisen agarlevyn pinnalle. Pinta-agarin annetaan jähmettyä, ja levyjä inkuboidaan 37 °C:ssa 48 — 72 tunnin ajan. Inkubaatiojakson jälkeen revertoituneet bakteeripesäkkeet lasketaan levyittäin. Esi-inkubaatiomenetelmässä seosta, jossa on testattavaa kemikaalia, 0,1 ml tuoretta bakteeriviljelmää ja riittävä määrä maksaentsyymien aktivointiseosta tai sama määrä puskuria, esi-inkuboidaan, minkä jälkeen viljelmään lisätään 2 ml pinta-agaria. Muilta osin menetelmä on sama kuin suoralisäysmenetelmä.

Kaikki levyt tehdään molemmissa menetelmissä vähintään kolminkertaisina.

2 TIEDOT

Käsittely- ja kontrollisarjan revertoituneiden bakteeripesäkkeiden lukumäärät raportoidaan levyittäin.

Testattavan kemikaalin ja kontrollin kohdalla ilmoitetaan levykohtaiset lukumäärät ja levykohtaisten revertoituneiden bakteeripesäkkeiden keskiarvo sekä keskihajonta.

Tiedot arvioidaan soveltuvan tilastollisen menetelmän avulla.

On tehtävä vähintään kaksi itsenäistä testiä. Toista testiä ei tarvitse suorittaa täysin samalla tavoin kuin ensimmäistä, vaan eräitä testiolosuhteita on suositeltavaa muuttaa, jotta saataisiin enemmän tietoja.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetyt bakteerit ja kanta

— testiolosuhteet, annostasot, myrkyllisyys, elatusaineen kokoonpano, käsittelyt (esi-inkubaatio ja inkubaatio), metabolian aktivointijärjestelmä, vertailuaineet ja negatiiviset kontrollit

— bakteeripesäkkeiden kokonaislukumäärä levyittäin, levykohtaisten revertoituneiden bakteeripesäkkeiden keskiarvo, keskihajonta ja (mikäli mahdollista) annoksen ja vaikutuksen keskinäinen suhde

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

B.14 MUTAGEENISYYS (SALMONELLA TYPHIMURIUM, REVERSIOMUTAATION MÄÄRITYS)

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (C).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Salmonella typhimurium -bakteerin histidiinin reversio (his) on mikrobiologinen määritys. Sillä mitataan $his^- \rightarrow his^+$ -reversiota käyttäen kemikaaleja, jotka aiheuttavat emässubstituutioita ja lukukehyksen muuttumista eliön genomissa.

Bakteerit altistetaan testattavalle kemikaalille metabolian aktivointia käyttäen ja ilman metabolian aktivointia. Kun inkubaatio on jatkunut sopivan ajan minimimäärässä elatusainetta, revertoituneet bakteeripesäkkeet lasketaan ja tulosta verrataan käsittelemättömän kontrolliviljelmän ja apuaineessa olevan kontrolliviljelmän spontaanisti tapahtuneiden reversioiden lukumäärään.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

1.6.1.1 *Bakteerit*

Tuoreita bakteeriviljelmiä kasvatetaan 37 °C:ssa kasvun myöhäiseen eksponentiaaliseen tai aikaiseen stationaariseen vaiheeseen asti. Solutiheyden on oltava noin 10^8 — 10^9 solua millilitrassa.

1.6.1.2 *Metabolian aktivointi*

Bakteerit on altistettava testattavalle aineelle sekä metabolian aktivointijärjestelmää käyttäen että ilman metabolian aktivointijärjestelmää. Yleisimmin käytetty järjestelmä on kofaktori-välitteinen postmitokondriaalinen fraktio, joka on saatu entsyymi-induktoreilla käsiteltyjen jyrsijöiden maksoista.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Kannat*

On käytettävä vähintään neljää kantaa: TA 1535:ttä, TA 1537:ää tai TA 97:ää, TA 98:aa ja TA 100:aa. Lisäksi voidaan käyttää TA 1538:aa ja TA 102:ta. Kantaviljelmän valmistelussa ja säilytyksessä on käytettävä yleisiä menetelmiä. Kantojen kasvuvaatimukset, geneettinen identtisyys, herkkyys UV-säteilylle tai kristallivioletille sekä ampisilliiniresistenssi on tarkistettava. Kannan on myös tuotettava spontaaneja revertoitumisia odotetulla frekvenssialueella.

1.6.2.2 *Elatusaine*

Käytetään sopivaa elatusainetta ja pinta-agaria.

1.6.2.3 *Negatiiviset ja positiiviset kontrollit*

On suoritettava samanaikaiset käsittely- ja kontrollikokeet. Lisäksi on suoritettava positiiviset kontrollikokeet

i) bakteerikantojen herkkyyden varmistamiseksi

Seuraavia yhdisteitä voidaan käyttää, kun koe tehdään ilman metabolian aktivointia:

Kannat	Reversion aiheuttava aine
TA 1535, TA 100	Natriumatsidi
TA 1538, TA 98, TA 97	2-nitrofluoreeni
TA 1537	9-aminoakridiini
TA 102	kumeenihydroperoksidi

ii) testin kannalta oleellisen metabolisen järjestelmän toiminnan varmistamiseksi.

Kaikkien kantojen metabolian toiminnan positiivisena kontrollina voidaan käyttää 2-aminoantraseenia. Positiivisena kontrollina on käytettävä mahdollisuuksien mukaan kemikaalia, joka vastaa testattavaa kemikaalia kemialliselta luokitukseltaan.

1.6.2.4 *Annostaso*

Testataan vähintään viisi erisuuruista kemikaalimäärää, niin että levyjen välinen ero on puolen logaritmin luokkaa. Aineita testataan liukoisuus- tai myrkyllisyysrajaan asti. Myrkyllisyys ilmenee spontaanisti revertoituneiden bakteeripesäkkeiden lukumäärän pienenemisenä, taustaverhon häviämisenä tai käsiteltyjen viljelmien hengissäpysymisasteen heikkenemisenä. Myrkyttömiä kemikaaleja on testattava arvoon 5 mg/levy asti, ennen kuin ne voidaan todeta negatiivisiksi.

1.6.2.5 *Inkubaatiojakso*

Levyjä inkuboidaan 37 °C:ssa 48 — 72 tuntia.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Kun suoralisäysmenetelmää käytetään ilman entsyymiaktivointia, kemikaalia ja 0,1 ml tuoretta bakteeriviljelmää lisätään 2 ml:aan pinta-agaria. Kun käytetään metabolian aktivointia, pinta-agariin lisätään testattavan kemikaalin ja bakteerien lisäyksen jälkeen 0,5 ml maksaentsyymien aktivointiseosta, jossa on riittävä määrä postmitokondristaalista fraktiota. Putkien sisältö sekoitetaan ja seos kaadetaan selektiivisen agarlevyn pinnalle. Pinta-agarin annetaan jähmettyä, ja levyjä inkuboidaan 37 °C:ssa 48 — 72 tunnin ajan. Inkubaatiojakson jälkeen revertoituneet bakteeripesäkkeet lasketaan levyittäin. Esi-inkubaatiomenetelmässä seosta, jossa on testattavaa kemikaalia, 0,1 ml tuoretta bakteeriviljelmää ja riittävä määrä maksaentsyymien aktivointiseosta tai sama määrä puskuria, esi-inkuboidaan, minkä jälkeen viljelmään lisätään 2 ml pinta-agaria. Muilta osin menetelmä on sama kuin suoralisäysmenetelmä.

Kaikki levyt tehdään molemmissa menetelmissä vähintään kolminkertaisena.

2 **TIEDOT**

Käsittely- ja kontrollisarjan revertoituneiden bakteeripesäkkeiden lukumäärät raportoidaan levyittäin.

Testattavan kemikaalin ja kontrollin kohdalla ilmoitetaan bakteeripesäkkeiden kokonaislukumäärä levyittäin ja levykohtaisten revertoituneiden bakteeripesäkkeiden keskiarvo sekä keskihajonta.

Tiedot arvioidaan soveltuvan tilastollisen menetelmän avulla.

On tehtävä vähintään kaksi itsenäistä testiä. Toista testiä ei tarvitse suorittaa täysin samalla tavoin kuin ensimmäistä, vaan eräitä testiolosuhteita on suositeltavaa muuttaa, jotta saataisiin enemmän tietoja.

3 RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetyt bakteerit ja kanta

— testiolosuhteet, annostasot, myrkyllisyys, elatusaineen kokoonpano, käsittelyt (esi-inkubaatio ja inkubaatio), metabolian aktivointijärjestelmä, vertailuaineet ja negatiiviset kontrollit

— bakteeripesäkkeiden kokonaislukumäärä levyittäin, levykohtaisten revertoituneiden bakteeripesäkkeiden keskiarvo, keskihajonta ja (mikäli mahdollista) annoksen ja vaikutuksen keskinäinen suhde

— tulosten pohdinta

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4 VIITTEET

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

OSA C: EKOMYRKYLLISYYDEN MÄÄRITTÄMISMENETELMÄT

C.1 AKUUTTI MYRKYLLISYYS KALALLE

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä voidaan määrittää aineen akuutti tappava myrkyllisyys kalalle makeassa vedessä. Sopivimman testimenetelmän (staattinen, puolistaattinen tai läpivirtaus) löytämiseksi on suositeltavaa hankkia mahdollisuuksien mukaan tietoa aineen vesiliukoisuudesta, höyrynpaineesta, kemiallisesta stabiiliudesta, dissosiaatiovakiosta ja biohajoavuudesta. Näin voidaan varmistaa, että aineen pitoisuus pysyy lähes vakiona koejakson aikana.

Kokeen suunnittelussa ja tulosten tulkinnassa on otettava huomioon mahdolliset lisätiedot (esimerkiksi aineen rakennekaava, puhtausaste, merkittävien epäpuhtauksien laatu ja pitoisuus, lisäaineiden läsnäolo ja määrä sekä n-oktanoli/vesi-jakautumiskerroin).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Akuutti myrkyllisyys on selvästi havaittava haitta, joka aiheutuu eliölle lyhyen ajan kuluessa aineelle altistumisen jälkeen. Kuvattavassa kokeessa akuutti myrkyllisyys ilmaistaan tappavan pitoisuuden mediaanina (LC_{50}). Tappavaa pitoisuutta käytettäessä 50 % vedessä olevasta kalaerästä kuolee määritetyn altistusajan kuluessa.

Testattavan aineen kaikki pitoisuudet ilmaistaan painoyksikköinä tilavuutta kohti (mg/l). Pitoisuus voidaan ilmaista myös painoyksikköinä painoa kohti (mg/kg^{-1}).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuainetta testaamalla voidaan osoittaa, että laboratorio-olosuhteissa testattavien lajien vaste ei ole merkittävästi muuttunut.

Kuvattavaa koetta varten ei ole määritetty vertailuainetta.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Rajatestin (100 mg/l) avulla voidaan osoittaa, että LC_{50}-arvo on suurempi kuin rajatestipitoisuus.

Kaloja altistetaan veteen lisätylle aineelle eri pitoisuuksia käyttäen 96 tunnin ajan. Kuolleisuus kirjataan vähintään 24 tunnin väliajoin ja mahdollisuuksien mukaan lasketaan kunkin havaintohetken pitoisuus, joka on tappanut 50 % kaloista (LC_{50}).

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä on sovellettava sekä rajatestiin että kattavaan testiin.

Kontrolliryhmien kuolleisuus kokeen päätyttyä ei saa ylittää 10 %:a (tai yhtä kalaa, jos ryhmän koko on alle kymmenen kalaa).

Veteen liuenneen hapen pitoisuuden on ollut oltava yli 60 % testilämpötilan ilmakyllästymisarvosta.

Testattavan aineen pitoisuuden on koko testin ajan oltava vähintään 80 % alkupitoisuudesta.

Jos aine liukenee helposti veteen muodostaen stabiilin liuoksen (aine ei merkittävästi haihdu, pilkkoudu, hydrolysoidu tai adsorboidu), alkupitoisuutta voidaan pitää nimellisenä pitoisuutena. On esitettävä todisteet siitä, että pitoisuudet on pidetty vakiona testin ajan ja että laatukriteerit on täytetty.

Jos aine

i) on huonosti veteen liukenevaa,

ii) pystyy muodostamaan stabiileja emulsioita tai dispersioita,

iii) ei ole stabiilia vesiliuoksissa,

alkupitoisuutena pidetään liuoksesta mitattua pitoisuutta (jos tämä ei ole teknisesti mahdollista, pitoisuus mitataan vesipatsaasta) testin alussa. Pitoisuus määritetään tasapainon saavuttamisen jälkeen, mutta ennen testattavien kalojen lisäämistä.

Tällaisissa tapauksissa testin kuluessa on tehtävä lisämittauksia, joilla voidaan varmistaa todelliset altistuspitoisuudet ja laatukriteerien täyttyminen.

pH-arvo saa vaihdella enintään yhden yksikön verran.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

Käytettävissä on kolme erityyppistä menetelmää:

Staattinen koe

Tässä myrkyllisyyskokeessa vesiliuos ei virtaa (liuokset pysyvät muuttumattomina testin ajan).

Puolistaattinen koe

Tässä kokeessa vesiliuos ei virtaa, mutta se vaihdetaan säännöllisesti (esimerkiksi 24 tunnin väliajoin) eräkohtaisesti.

Läpivirtauskoe

Myrkyllisyyskoe, jossa testikammioiden vesi vaihtuu jatkuvasti. Testattava kemikaali kulkeutuu veden mukana.

1.6.1 **Reagenssit**

1.6.1.1 *Testattavien aineiden liuokset*

Valmistetaan halutun pitoisia kantaliuoksia liuottamalla ainetta ionisoimattomaan veteen tai kohdan 1.6.1.2 mukaiseen veteen.

Halutut testipitoisuudet valmistetaan kantaliuosta laimentamalla. Jos testataan suuria pitoisuuksia, aine voidaan liuottaa suoraan laimennusveteen.

Yleensä aineita ei pidä testata liukoisuusrajan ylittävinä pitoisuuksina. Joidenkin aineiden kohdalla – esimerkiksi sellaisten, jotka liukenevat huonosti veteen (suuri P_{ow}-arvo) ja sellaisten, jotka muodostavat dispersioita todellisen liuoksen sijasta – on hyväksyttävää käyttää liukoisuusrajan ylittävää testipitoisuutta, jotta voidaan varmistaa, että ainetta on liuennut mahdollisimman paljon ja että liuos on stabiili. On kuitenkin tärkeää, että tämä pitoisuus ei muutoin häiritse testijärjestelmää (esimerkiksi muodostamalla veden pinnalle kalvon, joka estää veden hapettumisen).

Jos aine liuekenee huonosti veteen, kantaliuoksen valmistamisessa tai aineen dispergoimisessa testiliuokseen voidaan käyttää apuna ultraäänidispersiota, orgaanisia liuottimia, emulsioliuottimia tai dispergoimisaineita. Jos tällaisia apuaineita käytetään, kaikkien testipitoisuuksien on sisällettävä sama määrä apuainetta ja erillinen kalojen

kontrolliryhmä on altistettava testisarjan apuainepitoisuudelle. Tällaisten apuaineiden pitoisuudet on pidettävä mahdollisimman matalina, eivätkä ne koskaan saa ylittää arvoa 100 mg/l testiliuosta.

Koe suoritetaan ilman pH-arvon säätöjä. Jos havaitaan merkkejä pH-arvon merkittävästä muutoksesta, on suositeltavaa tehdä toinen koe, jossa käytetään pH-säätöä, ja raportoida tulokset. Tässä tapauksessa kantaliuoksen pH-arvo säädetään samaksi kuin laimennusveden pH-arvo, ellei tätä vastaan ole erityistä syytä. Suositeltavat pH-säätöaineet ovat HCl ja NaOH; pH-säätö on tehtävä siten, ettei kantaliuoksen testiainepitoisuus muutu merkittävästi. Jos pH-säädön seurauksena tapahtuu jokin kemiallinen reaktio tai testiaine saostuu, ilmiö on raportoitava.

1.6.1.2 *Säilytys- ja laimennusvesi*

Voidaan käyttää juomavettä (jossa ei ole potentiaalisesti vaarallisia pitoisuuksia klooria, raskasmetalleja tai muita aineita), hyvänlaatuista luonnonvettä tai sekoitevettä (katso liitettä I). Suositeltavat kovuusarvot ovat 10 — 250 mg/l $CaCO_3$ ja suositeltavat pH-arvot 6,0 — 8,5.

1.6.2 **Laite**

Laitteiden on oltava kemiallisesti inerttiä materiaalia. Seuraavat laitteet tarvitaan:

— automaattinen laimennusjärjestelmä (läpivirtauskoetta varten)

— happimittari

— laite veden kovuuden määritykseen

— lämpötilan säätölaite

— pH-mittari.

1.6.3 **Testattavat kalat**

Kalojen on oltava terveitä, eikä niissä saa olla näkyviä epämuodostumia.

Lajit valitaan käytännöllisten seikkojen perusteella. Tällaisia perusteita ovat esimerkiksi ympärivuotinen saatavuus, ylläpidon helppous, soveltuvuus testaukseen, suhteellinen kemikaaliherkkyys ja muut taloudelliset, biologiset sekä ekologiset tekijät, joilla voi olla vaikutusta. Kalalajien valinnassa on otettava huomioon myös saatujen tietojen vertailukelpoisuus ja voimassa oleva kansainvälinen yhdenmukaistaminen (viite 1).

Luettelo tätä koetta varten suositeltavista kalalajeista on liitteessä 2. Suositeltavia lajeja ovat seeprakala ja kirjolohi.

1.6.3.1 *Säilytys*

Kalat on mieluiten otettava yhdestä ainoasta samanpituisesta ja -ikäisestä kannasta. Kaloja on säilytettävä vähintään 12 päivän ajan seuraavissa olosuhteissa:

Täyttötapa

Täyttötavan on oltava sopiva järjestelmää ja kalalajia ajatellen.

Vesi

Katso kohtaa 1.6.1.2.

Valo

Päivittäisen valojakson pituus on 12 — 16 tuntia.

Liuenneen hapen pitoisuus

Vähintään 80 % kyllästysarvosta.

Ruokinta

Kaloja ruokitaan kolme kertaa viikossa tai päivittäin. Ruokinta lopetetaan 24 tuntia ennen kokeen alkua.

1.6.3.2 *Kuolleisuus*

48 tunnin asettumisajan jälkeen kuolleisuus kirjataan seuraavia kriteerejä soveltaen:

— yli 10 % populaatiosta seitsemässä päivässä:

koko erä hylätään

— 5 — 10 % populaatiosta:

tarkkailujaksoa jatketaan seitsemällä päivällä. Ellei lisäkuolleisuutta esiinny, erä hyväksytään

— alle 5 % populaatiosta:

erä hyväksytään.

1.6.4 **Sopeutuminen**

Kaloja on altistettava kokeessa käytettävälle vedelle ja lämpötilalle vähintään seitsemän päivän ajan ennen kalojen käyttöä.

1.6.5 **Testin suorittaminen**

Ennen varsinaista testiä voidaan tehdä alueenmäärityskoe, jonka avulla saadaan tietoja varsinaisessa testissä käytettävistä pitoisuuksista.

Testiryhmän lisäksi käytetään kontrolliryhmää, jota ei altisteta aineelle. Jos aineen liuottamiseen on käytetty apuainetta, on käytettävä toista kontrolliryhmää, joka altistetaan apuaineelle.

Valitaan staattinen, puolistaattinen tai läpivirtaukseen perustuva menetelmä testattavan aineen fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien mukaan.

Kalat altistetaan aineelle seuraavasti:

— aika: 96 tuntia

— eläinten määrä: vähintään 7 kalaa pitoisuutta kohti

— säiliöt: tilavuus on mukautettava kuormitussuosituksen mukaan

— kuormitus: staattista ja puolistaattista koetta varten kuormituksen enimmäisarvoksi suositellaan 1 g/l (läpivirtausjärjestelmissä kuormitus voi olla suurempi)

— aineen pitoisuus: vähintään viisi pitoisuutta, jotka poikkeavat toisistaan kertoimella, jonka enimmäisarvo on 2,2, ja jotka kattavat kuolleisuusalueen 0 — 100 % mahdollisimman hyvin

— vesi: katso kohtaa 1.6.1.2

— valo: 12 — 16 tuntia valoa päivittäin

— lämpötila: lajille sopiva lämpötila (katso liitettä 2), joka saa vaihdella yksittäisen kokeen aikana enintään ± 1 °C

— veteen liuennut happi: vähintään 60 % valitun lämpötilan ilmakyllästymisarvosta

— ruokinta: kaloja ei ruokita.

Kalat tutkitaan ensimmäisen 2 — 4 tunnin aikana ja vähintään 24 tunnin väliajoin. Kalat katsotaan kuolleiksi, jos pyrstön koskettaminen ei tuota mitään reaktiota eikä hengitysliikkeitä voi havaita. Kuolleet kalat poistetaan ja kuolleisuudet kirjataan.

Näkyvistä poikkeavuuksista pidetään kirjaa. Näitä ovat esimerkiksi tasapainon menettäminen ja muutokset uintitavassa, hengitystoiminnoissa sekä pigmentaatiossa.

Liuoksen pH, liuennut happi ja lämpötila mitataan päivittäin.

Rajatesti

Tämän testimenetelmän avulla voidaan suorittaa rajatesti pitoisuudella 100 mg/l, millä osoitetaan, että LC_{50}-arvo on suurempi kuin rajapitoisuus.

Jos aineesta ei saada vesiliuosta, jonka pitoisuus on 100 mg/l, rajatesti tehdään pitoisuudella, joka vastaa aineen liukoisuutta (tai enimmäispitoisuutta, jolla saadaan stabiili dispersio) käytettävään veteen (katso myös kohtaa 1.6.1.1).

Rajatestiin tarvitaan 7 — 10 kalaa ja samankokoinen kontrolliryhmä (yksi tai kaksi kontrolliryhmää). (Binomiteorian mukaan LC_{50}-arvo on 99,9 prosentin varmuudella suurempi kuin rajatestissä käytetty pitoisuus, jos yhtään kalaa kymmenestä ei kuole. Jos käytetään 7, 8 tai 9 kalaa, nollakuolleisuus osoittaa vähintään 99 prosentin varmuudella, että LC_{50}-arvo on suurempi kuin käytetty pitoisuus.)

Jos kaloja kuolee, on tehtävä kattava testi. Jos havaitaan vaikutuksia, jotka eivät ole hengenvaarallisia, ne on kirjattava.

2 TIEDOT JA ARVIOINTI

Jokaista havaintohetkeä (24:ää, 48:aa, 72:ta ja 96:ta tuntia) kohden piirretään jokaisen suositellun altistusjakson kuolleisuusprosentti pitoisuuden funktiona logaritmitodennäköisyyspaperille.

LC_{50}-arvo ja luottamusvälit ($p = 0,05$) arvioidaan havaintohetkittäin mahdollisuuksien mukaan yleisiä menetelmiä käyttäen. Arvot pyöristetään yhteen tai enintään kahteen merkitsevään numeroon (esimerkki pyöristyksestä kahteen merkitsevään numeroon: 173,5 > 170; 0,127 > 0,13; 1,21 > 1,2).

Jos pitoisuus/vaste (%) -käyrä on liian jyrkkä LC_{50}-arvon laskemiseksi, arvon graafinen arvio on riittävän tarkka.

Jos kaksi peräkkäistä pitoisuutta (käyttäen kerrointa 2,2) antavat tulokseksi vain 0 %:n ja 100 %:n kuolleisuuden, nämä kaksi arvoa riittävät osoittamaan alueen, johon LC_{50} osuu.

Jos todetaan, että testattavan aineen stabiiliutta tai homogeenisuutta ei voida ylläpitää, tämä on raportoitava ja otettava huomioon tulosten tulkinnassa.

3 RAPORTOINTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— kalan tiedot kunkin pitoisuuden osalta (tieteellinen nimi, kanta, toimittaja, mahdolliset esikäsittelyt, koko ja määrä)

— laimennusveden lähde ja tärkeimmät kemialliset ominaisuudet (pH, kovuus, lämpötila)

— kantaliuoksen ja testiliuoksen valmistustapa, jos aine on huonosti veteen liukenevaa

— mahdollisten apuaineiden pitoisuudet

— luettelo käytetyistä pitoisuuksista ja käytettävissä olevat tiedot testattavan kemikaalin näiden pitoisuuksien stabiiliudesta käytetyssä testiliuoksessa

— käytetyt menetelmät ja saadut tulokset, jos on tehty kemiallisia analyysejä

— mahdollisen rajatestin tulokset

— käytetyn menetelmän valintaperusteet ja yksityiskohtaiset tiedot (staattinen, puolistaattinen, annostelunopeus, läpivirtausnopeus, onko käytetty ilmastusta, kalakuormitus jne.)

— laitteen kuvaus

— valo-olosuhteet

— testiliuoksen liuenneen hapen pitoisuus, pH-arvo ja lämpötila 24 tunnin väliajoin

— todisteet laatukriteereiden täyttämisestä

— taulukko, josta ilmenee kumulatiivinen kuolleisuus kussakin pitoisuudessa ja kontrolliryhmän (sekä tarvittaessa apuaineen kontrolliryhmän) tulokset kunakin suositeltuna tarkkailuajankohtana

— pitoisuus/vaste (%) -käyrä kokeen päätyttyä

— mahdollisuuksien mukaan LC_{50}-arvot kunakin suositeltuna tarkkailuajankohtana (95 prosentin luottamusrajoin)

— LC_{50}-arvon määrityksessä käytetyt tilastolliset menetelmät

— mahdollisen vertailuainetta avulla saadut tulokset

— suurin testiliuoksen pitoisuus, joka ei ole aiheuttanut kuolleisuutta kokeen aikana

— pienin testiliuoksen pitoisuus, joka on aiheuttanut 100 prosentin kuolleisuuden kokeen aikana.

4 VIITTEET

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1, /2 and /3 - Water Quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan - *Teleostei, Cyprinidae).* Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden - Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L(15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 - Water - Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. and Exp. Therap., 1949, vol 96, 99.

(16) Finney, D. J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U. K, 1978.

(17) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hasard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

Liite 1

Sekoitevesi

Kaikkien kemikaalien on oltava analyyttistä laatua.

Veden on oltava hyvänlaatuista tislattua tai ionisoimatonta vettä, jonka johtavuus on alle 5 $\mu S/cm^{-1}$.

Veden tislauslaite ei saa sisältää kuparista valmistettuja osia.

Kantaliuokset

$CaCl_2 \times 2\ H_2O$ (kalsiumkloridihydraatti): Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen	11,76 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$ (magnesiumsulfaattiheptahydraatti): Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen	4,93 g
$NaHCO_3$ (natriumvetykarbonaatti): Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen	2,59 g
KCl (kaliumkloridi): Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen	0,23 g

Sekoitettu laimennusvesi

25 ml kutakin kantaseosta sekoitetaan ja liuos laimennetaan litran tilavuuteen.

Liuosta ilmastetaan, kunnes liuenneen hapen pitoisuus saavuttaa ilmakyllästymisarvon.

pH-arvon on oltava 7,8 ± 0,2.

pH:ta säädetään tarvittaessa NaOH:lla (natriumhydroksidilla) tai HCl:llä (suolahapolla).

Näin valmistettu sekoitevesi pannaan syrjään noin 12 tunniksi, eikä sitä tarvitse enää ilmastaa.

Liuoksen Ca- ja Mg-ionien yhteenlaskettu pitoisuus on 2,5 millimoolia/l. Ca- ja Mg-ionien suhde on 4:1 ja Na- ja K-ionien suhde 10:1. Liuoksen kokonaisalkalisuus on 0,8 millimoolia/l.

Mahdolliset poikkeavuudet laimennusveden valmistuksessa eivät saa vaikuttaa veden koostumukseen tai sen ominaisuuksiin.

Liite 2

Suositeltavat kalalajit

Suositeltava laji	Suositeltava testilämpötila-alue (°C)	Koe-eläimen suositeltava kokonaispituus (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) seeprakala	20 — 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20 — 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) karppi	20 — 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck et Schlegel 1850) Red killifish	20 — 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) miljoonakala	20 — 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Bluegill	20 — 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) kirjolohi	12 — 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) säyne	20 — 24	6,0 ± 2,0

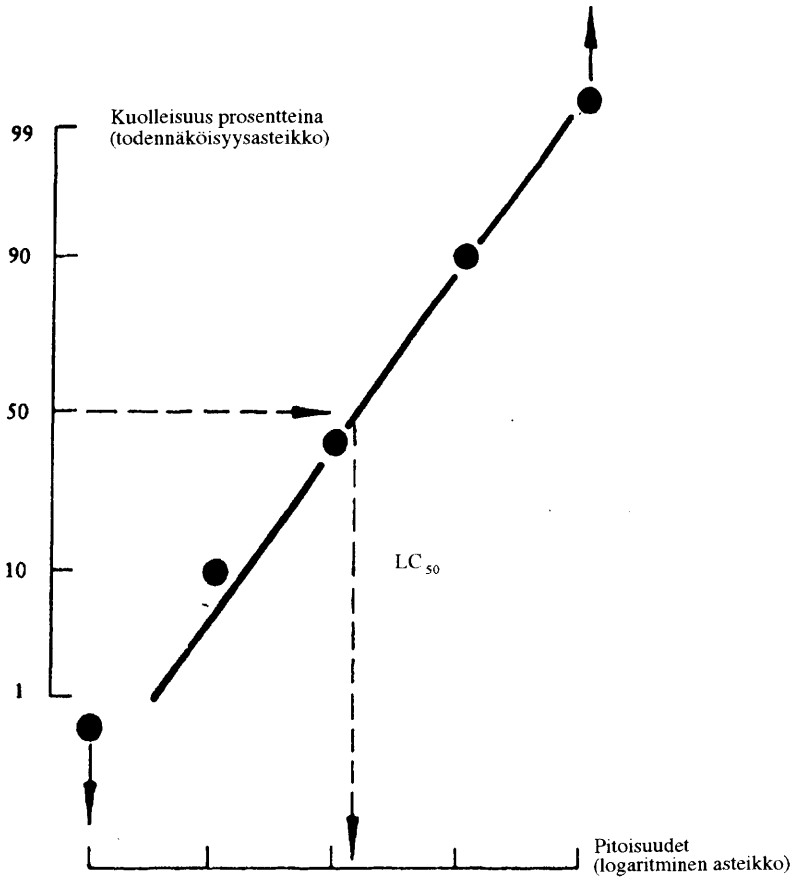
Saatavuus

Edellä luetellut kalalajit ovat helposti viljeltävissä tai yleisesti saatavissa läpi koko vuoden. Niitä voidaan viljellä kalaviljelylaitoksissa tai laboratorioissa, edellyttäen, että sairauden ja loisten esiintymistä valvotaan. Näin saadaan terveitä koe-eläimiä, joiden tausta on tiedossa. Näitä kalalajeja on saatavana suuressa osassa maailmaa.

Liite 3

Pitoisuusesimerkki: prosentuaalinen kuolleisuus

Esimerkki LC_{50}-määrityksestä logaritmitodennäköisyyspaperin avulla



C.2 AKUUTTI MYRKYLLISYYS VESIKIRPULLE

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä voidaan määrittää aineen liikuntakyvyttömyyttä aiheuttavan tehokkaan pitoisuuden mediaani (EC_{50}) vesikirpun osalta makeassa vedessä. Ennen testin aloittamista on suositeltavaa hankkia mahdollisuuksien mukaan tietoa aineen vesiliukoisuudesta, höyrynpaineesta, kemiallisesta stabiiliudesta, dissosiaatiovakiosta ja biohajoavuudesta.

Kokeen suunnittelussa ja tulosten tulkinnassa on otettava huomioon mahdolliset lisätiedot (esimerkiksi aineen rakennekaava, puhtausaste, merkittävien epäpuhtauksien laatu ja pitoisuus, lisäaineiden läsnäolo ja määrä sekä n-oktanoli/vesi-jakautumiskerroin).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Direktiivin mukaista LC_{50}-vaatimusta voidaan vesikirpun osalta pitää täyttyneenä, kun EC_{50} on määritetty tässä kuvattavan menetelmän mukaan.

Akuutti myrkyllisyys ilmaistaan tämän testin yhteydessä liikkumattomutta aiheuttavan tehokkaan pitoisuuden mediaanina (EC_{50}). Tämä on se pitoisuus (pitoisuuden alkuarvo), joka aiheuttaa liikuntakyvyttömyyden 50 prosentissa koeryhmän vesikirpuista määrätynpituisen, jatkuvan altistusjakson jälkeen. Jakson pituus on ilmoitettava.

Liikuntakyvyttömyys

Eläimet, jotka eivät pysty uimaan 15 sekunnin kuluessa testaussäiliön kevyestä ravistamisesta, katsotaan liikkumattomiksi.

Testattavan aineen kaikki pitoisuudet ilmaistaan painoyksikköinä tilavuutta kohti (mg/l). Pitoisuus voidaan ilmaista myös painoyksikköinä painoa kohti (mg/kg^{-1}).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuainetta testaamalla voidaan osoittaa, että testattavien lajien vaste ei ole merkittävästi muuttunut laboratorio-olosuhteissa.

Liitteessä 2 esitetään yhteenveto neljää eri ainetta käyttävän ETYn vertailukokeen tuloksista.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Rajatestin (100 mg/l) avulla voidaan osoittaa, että EC_{50}-arvo on suurempi kuin rajatestipitoisuus.

Vesikirppuja altistetaan veteen lisätylle aineelle 48 tunnin ajan eri pitoisuuksia käyttäen. Jos käytetään tätä lyhyempää testiä, testiraporttiin on sisällytettävä perustelut tähän.

Kun testiolosuhteet pidetään muutoin samoina, mutta aineen pitoisuuksia vaihdellaan, vesikirpun uintikyky muuttuu. Kokeen päättyessä uimaan kykenemättömien vesikirppujen prosentuaalinen osuus vaihtelee pitoisuuden mukaan. Nollavaikutuksen ja kaikkien vesikirppujen liikuntakyvyttömyyden aiheuttavat pitoisuudet saadaan suoraan testinaikaisista havainnoista. 48 tunnin EC_{50}-arvo määritetään mahdollisuuksien mukaan laskemalla.

Tässä menetelmässä käytetään staattista järjestelmää, jossa testiliuoksia ei vaihdeta altistusjakson aikana.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä on sovellettava sekä rajatestiin että kattavaan testiin.

Kokeen päätyttyä kontrolliryhmien liikuntakyvyttömyys ei saa ylittää 10 %:a.

Kontrolliryhmien vesikirput eivät saa jäädä "loukkuun" veden pintaan.

Veteen liuenneen hapen pitoisuuden testausastioissa on oltava yli 3 mg/l^{-1} koko testin ajan. Veteen liuenneen hapen pitoisuus ei saa missään tapauksessa alittaa arvoa 2 mg/l^{-1}.

Testattavan aineen pitoisuuden on koko testin ajan oltava vähintään 80 % alkupitoisuudesta.

Jos aine liukenee helposti veteen muodostaen stabiilin liuoksen (aine ei merkittävästi haihdu, pilkkoudu, hydrolysoidu tai adsorboidu), alkupitoisuutta voidaan pitää nimellisenä pitoisuutena. On esitettävä todisteet siitä, että pitoisuudet on pidetty vakiona testin ajan ja että laatukriteerit on täytetty.

Jos aine:

i) on huonosti veteen liukenevaa,

ii) pystyy muodostamaan stabiileja emulsioita tai dispersioita,

iii) ei ole stabiilia vesiliuoksissa,

alkupitoisuutena pidetään liuoksesta mitattua pitoisuutta (jos tämä ei ole teknisesti mahdollista, vesipatsaasta mitattua pitoisuutta) testin alussa. Pitoisuus määritetään tasapainon saavuttamisen jälkeen, mutta ennen testattavien eliöiden lisäämistä.

Tällaisissa tapauksissa testin kuluessa on tehtävä lisämittauksia, joilla voidaan varmistaa todelliset altistuspitoisuudet ja laatukriteerien täyttyminen.

pH-arvo saa vaihdella enintään yhden yksikön verran.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Reagenssit**

1.6.1.1 *Testattavien aineiden liuokset*

Valmistetaan kantaliuokset määrätyin pitoisuuksin liuottamalla ainetta ionisoimattomaan veteen tai kohdan 1.6.1.2 mukaiseen veteen.

Tarvittavat testipitoisuudet valmistetaan kantaliuosta laimentamalla. Jos testataan suuria pitoisuuksia, aine voidaan liuottaa suoraan laimennusveteen.

Yleensä aineita ei pidä testata liukoisuusrajan ylittävinä pitoisuuksina. Joidenkin aineiden kohdalla (esimerkiksi sellaisten, jotka liukenevat huonosti veteen (suuri P_{ow}-arvo) ja sellaisten, jotka muodostavat dispersioita todellisen liuoksen sijasta) on hyväksyttävää käyttää liukoisuusrajan ylittävää testipitoisuutta, jotta voitaisiin varmistaa, että ainetta on liuennut mahdollisimman paljon ja että liuos on stabiili. On kuitenkin tärkeää, että tämä pitoisuus ei muutoin häiritse testijärjestelmää (esimerkiksi muodostamalla veden pinnalle kalvon, joka estää veden hapettumisen).

Jos aine on huonosti veteen liukenevaa, kantaliuoksen valmistamisessa tai aineen dispergoimisessa testiliuokseen voidaan käyttää apuna ultraäänidispersiota, orgaanisia liuottimia, emulsioliuottimia tai dispergoimisaineita. Jos tällaisia apuaineita käytetään, kaikkien testipitoisuuksien on sisällettävä sama määrä apuainetta ja erillinen kontrolliryhmä on altistettava testisarjan apuainepitoisuudelle. Tällaisten apuaineiden pitoisuudet on pidettävä mahdollisimman pieninä, eivätkä ne koskaan saa ylittää arvoa 100 mg/l testiliuosta.

Koe suoritetaan ilman pH-arvon säätöjä. Jos havaitaan merkkejä pH-arvon merkittävästä muutoksesta, on suositeltavaa tehdä toinen koe, jossa käytetään pH-säätöä, ja raportoida tulokset. Tässä tapauksessa kantaliuoksen pH-arvo säädetään samaksi kuin laimennusveden pH-arvo, ellei tätä vastaan ole erityistä syytä. Suositeltavat pH-säätöaineet ovat HCl ja NaOH. pH-säätö on tehtävä siten, ettei kantaliuoksen testiainepitoisuus muutu merkittävästi. Jos pH-säädön seurauksena tapahtuu jokin kemiallinen reaktio tai testiaine saostuu, ilmiö on raportoitava.

1.6.1.2 *Testausvesi*

Tässä menetelmässä käytetään sekoitevettä (katso liitettä 1 ja viitettä (2): ISO 6341). Ennen testiä tarvittavaa sopeutumista voidaan välttää käyttämällä viljelyyn ja testiin samanlaatuista (pH, kovuus) vettä.

1.6.2 **Laite**

Käytetään tavallisia laboratoriolaitteita. On suositeltavaa, että kaikki laitteen osat, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuoksen kanssa, on valmistettu kokonaan lasista. Seuraavat laitteet tarvitaan:

— happimittari (varustettu mikroelektrodilla ta muulla sopivalla laitteella pientilavuusnäytteiden liuenneen happipitoisuuden mittaamiseksi)

— lämpötilan säätölaite

— pH-mittari

— laite veden kovuuden määritykseen.

1.6.3 **Testattavat eliöt**

Suositellaan *Daphnia magna* -vesikirpun käyttöä. Myös *Daphnia pulexia* voidaan käyttää. Eläinten on oltava enintään 24 tunnin ikäisiä testin alussa. Niiden on oltava laboratoriossa viljeltyjä, niissä ei saa olla näkyviä sairauksia ja niillä on oltava tunnettu tausta (esimerkiksi jalostuksen ja esikäsittelyjen osalta).

1.6.4 **Testin suorittaminen**

Ennen varsinaista testiä voidaan tehdä aluemäärityskoe, jonka avulla saadaan tietoja varsinaisessa testissä käytettävistä pitoisuuksista.

Testiryhmän lisäksi käytetään kontrolliryhmää, jota ei altisteta aineelle. Jos aineen liuottamiseen on käytetty apuainetta, on käytettävä toista kontrolliryhmää, joka altistetaan apuaineelle.

Vesikirput altistetaan aineelle seuraavasti:

— *aika*: suositus on 48 tuntia

— *eläinten määrä*: vähintään 20 vesikirppua pitoisuutta kohti, mielellään jaettuina neljään viiden eläimen erään tai kahteen kymmenen eläimen erään

— *kuormitus*: käytetään vähintään 2 ml testiliuosta eläintä kohti

— *aineen pitoisuus*: liuos valmistetaan välittömästi ennen vesikirppujen lisäystä. Muun liuottimen kuin veden käyttöä on vältettävä. Pitoisuudet valitaan geometrisesta sarjasta, jonka pitoisuuskerroin on enintään 2,2. Sekä testattava ryhmä että kontrolliryhmä altistetaan pitoisuuksille, jotka aiheuttavat 0- ja 100-prosenttisen liikuntakyvyttömyyden 48 tunnin jälkeen sekä näiden pitoisuuksien väliselle sarjalle, jonka perusteella voidaan laskea 48 tunnin EC_{50}-arvo.

— *vesi*: katso kohtaa 1.6.1.2

— *valo*: voidaan käyttää myös valo/pimeä-sykliä

— *lämpötila*: kokeen aikana lämpötilan on oltava 18 — 22 °C. Yksittäisen kokeen aikana lämpötila saa vaihdella enintään ± 1 °C

— *ilmastus*: kuplailmastusta ei saa käyttää

— *ruokinta*: vesikirppuja ei ruokita.

Kokeen päätyttyä on mitattava kontrolliliuoksen ja kaikkien eripitoisuuksisten testiliuosten pH ja happipitoisuus. Testiliuoksen pH:ta ei saa muuttaa.

Haihtuvien aineiden testauksessa on käytettävä täysin täytettyjä, suljettuja säiliöitä, jotka ovat niin suuria, että hapenpuutetta ei synny.

Vesikirput tarkastetaan vähintään 24 tuntia altistuksen jälkeen. Tarkastus toistetaan 48 tunnin jälkeen.

Rajatesti

Tämän testimenetelmän avulla voidaan suorittaa rajatesti pitoisuudella 100 mg/l sen osoittamiseksi, että EC_{50}-arvo on suurempi kuin rajapitoisuus.

Jos aineesta ei saada vesiliuosta, jonka pitoisuus on 100 mg/l, rajatesti tehdään pitoisuudella, joka vastaa aineen liukoisuutta (tai enimmäispitoisuutta, jolla saadaan stabiili dispersio) käytettävään veteen (katso myös kohtaa 1.6.1.1).

Rajatestiin tarvitaan 20 vesikirppua, jotka jaetaan kahteen tai neljään erään. Kontrolliryhmien ja testattavien ryhmien on oltava samankokoiset. Jos liikuntakyvyttömyyttä ilmenee, on suoritettava kattava testi.

2 TIEDOT JA ARVIOINTI

Jokaista havaintoajankohtaa (24:ää ja 48:aa tuntia) kohden piirretään kuolleisuusprosentti pitoisuuden funktiona logaritmitodennäköisyyspaperille.

Mahdollisuuksien mukaan jokaista havaintoajankohtaa kohden arvioidaan EC_{50}-arvo ja luottamusvälit ($p = 0,05$) yleisiä menetelmiä käyttäen. Arvot pyöristetään yhteen tai enintään kahteen merkitsevään numeroon (esimerkki pyöristyksestä kahteen merkitsevään numeroon: 173,5 > 170; 0,127 > 0,13; 1,21 > 1,2).

Jos pitoisuus/vaste (%) -käyrän kaltevuus on liian jyrkkä EC_{50}-arvon laskemiseksi, arvon graafinen arvio on riittävän tarkka.

Jos kaksi peräkkäistä pitoisuutta (käyttäen kerrointa 2,2) antavat tulokseksi vain 0 ja 100 prosentin kuolleisuuden, nämä kaksi arvoa riittävät osoittamaan alueen, johon EC_{50} osuu.

Jos todetaan, että testattavan aineen stabiiliutta tai homogeenisuutta ei voida ylläpitää, tämä on raportoitava ja otettava huomioon tulosten tulkinnassa.

3 RAPORTOINTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— eliön tiedot kunkin pitoisuuden osalta (tieteellinen nimi, kanta, toimittaja, mahdolliset esikäsittelyt, viljelymenetelmä lähde mukaan lukien, ravinnon laatu ja määrä sekä ruokintatiheys)

— laimennusveden lähde ja tärkeimmät kemialliset ominaisuudet (pH, lämpötila ja kovuus)

— jos aine on huonosti veteen liukenevaa, kantaliuoksen ja testiliuoksen valmistustapa

— mahdollisten apuaineiden pitoisuudet

— luettelo käytetyistä pitoisuuksista ja käytettävissä olevat tiedot testattavan kemikaalin näiden pitoisuuksien stabiiliudesta käytetyssä testiliuoksessa

— käytetyt menetelmät ja saadut tulokset, jos on tehty kemiallisia analyysejä

— mahdollisen rajatestin tulokset

— laitteen kuvaus

— valo-olosuhteet

— testiliuosten liuenneen hapen pitoisuus, pH-arvo ja lämpötila

— todisteet laatukriteereiden täyttämisestä

— taulukko, josta ilmenee kumulatiivinen kuolleisuus kussakin pitoisuudessa ja kontrolliryhmän (sekä tarvittaessa apuaineen kontrolliryhmän) tulokset kunakin suositeltuna tarkkailuajankohtana (24 ja 48 tuntia)

— pitoisuus/vaste (%) -käyrä kokeen päätyttyä

— mahdollisuuksien mukaan EC_{50}-arvot kunakin suositeltuna tarkkailuajankohtana (95 prosentin luottamusrajoin)

— EC_{50}-arvon määrityksessä käytetyt tilastolliset menetelmät

— mahdollisen vertailuaineen avulla saadut tulokset

— suurin testiliuoksen pitoisuus, joka ei ole aiheuttanut liikuntakyvyttömyyttä kokeen aikana

— pienin testiliuoksen pitoisuus, joka on aiheuttanut 100 prosentin liikuntakyvyttömyyden kokeen aikana.

4 VIITTEET

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 202, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) International Standard ISO, Water Quality - Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341-1989.

(3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera — crustacea) NFT 90 301 (January 1983).

(4) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen fur die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(5) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).

(6) Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

(7) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effects experiments, J. Pharmacol. and Exper. Ther., 1949, vol. 96, p. 99-113.

(8) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(9) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(10) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, p. 65-84, 1978.

(11) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

Liite 1

Sekoitevesi

Esimerkki soveltuvasta laimennusvedestä (standardin ISO 6341 mukaan)

Kaikkien kemikaalien on oltava analyyttistä laatua.

Veden on oltava hyvänlaatuista tislattua tai ionisoimatonta vettä, jonka johtavuus on alle 5 $\mu S\ cm^{-1}$.

Veden tislauslaite ei saa sisältää kuparista valmistettuja osia.

Kantaliuokset

$CaCl_2 \times 2\ H_2O$ (kalsiumkloridihydraatti): Liuotetaan veteen laimentaen liuos litran tilavuuteen	11,76 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$ (magnesiumsulfaattiheptahydraatti): Liuotetaan veteen laimentaen liuos litran tilavuuteen	4,93 g
$NaHCO_3$ (natriumvetykarbonaatti): Liuotetaan veteen laimentaen liuos litran tilavuuteen	2,59 g
KCl (kaliumkloridi): Liuotetaan veteen laimentaen liuos litran tilavuuteen	0,23 g

Sekoitettu laimennusvesi

Sekoitetaan 25 ml kutakin kantaseosta ja laimennetaan liuos litran tilavuuteen.

Ilmastetaan, kunnes liuenneen hapen pitoisuus saavuttaa ilmakyllästymisarvon.

pH-arvon on oltava 7,8 ± 0,2.

Säädetään pH:ta tarvittaessa NaOH:lla (natriumhydroksidilla) tai HCl:llä (suolahapolla).

Näin valmistettu sekoitevesi pannaan syrjään noin 12 tunniksi, eikä sitä tarvitse enää ilmastaa.

Liuoksen Ca- ja Mg-ionien yhteenlaskettu pitoisuus on 2,5 millimoolia/l. Ca- ja Mg-ionien suhde on 4:1 ja Na- ja K-ionien suhde 10:1. Liuoksen kokonaisalkalisuus on 0,8 millimoolia/l.

Mahdolliset poikkeavuudet laimennusveden valmistuksessa eivät saa vaikuttaa veden koostumukseen tai ominaisuuksiin.

Liite 2

Yhteenveto 1978 suoritetun ETYn vertailukokeen tuloksista (katso myös viitettä 2)

Huomautus: Tämän vertailukokeen tarkoitus oli *24 tunnin* EC_{50}-arvon määrittäminen.

Käytetyt aineet:

1) Kaliumdikromaatti

2) Tetrapropyylibentseenisulfonihappo

3) Tetrapropyylibentseenisulfonihappo, natriumsuola

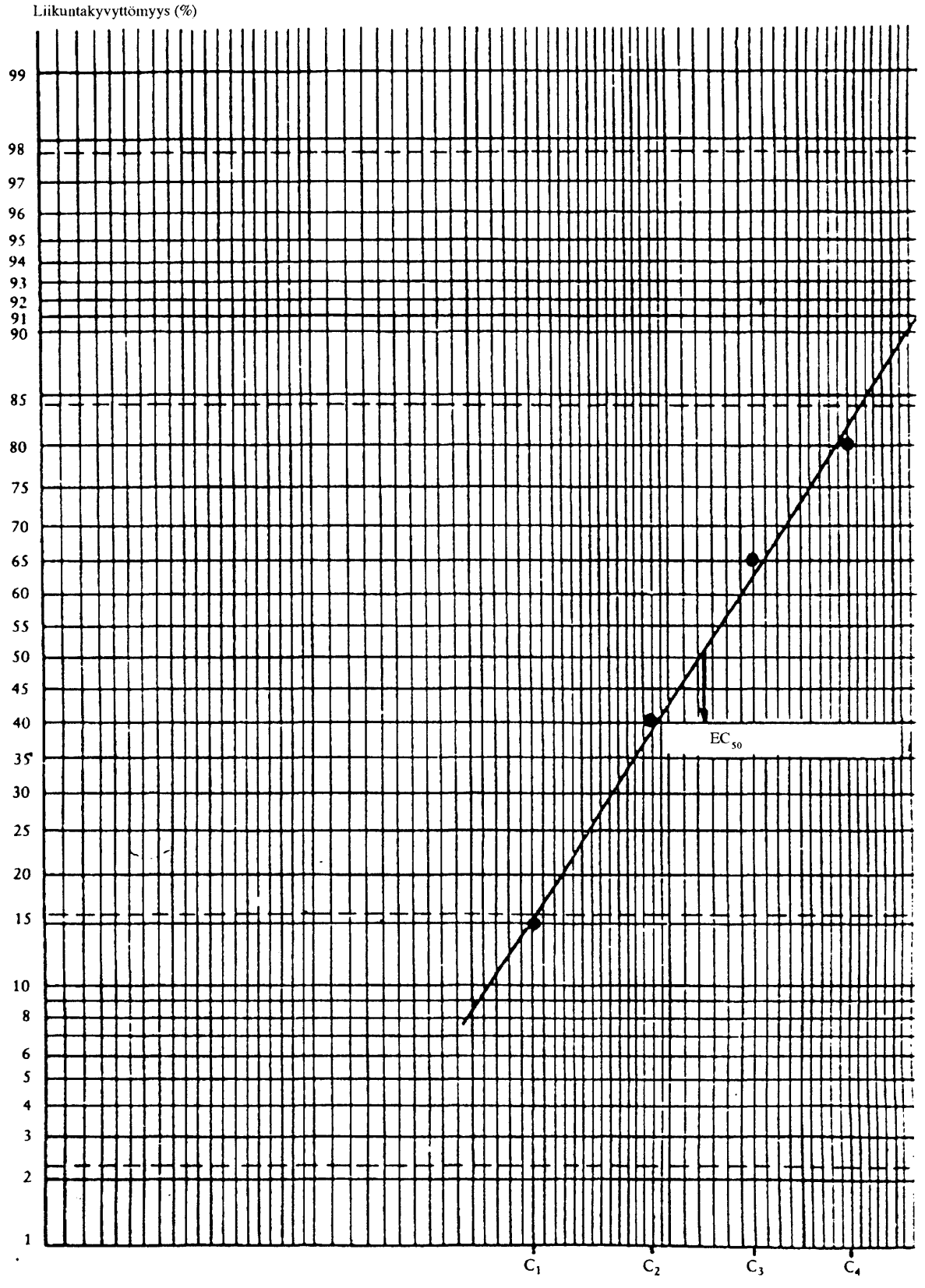
4) Trikloro-2,4,5-fenoksietikkahappo, kaliumsuola

Aine	Osallistuneiden laboratorioiden määrä	Laskentaan käytettyjen tulosten määrä	EC_{50}, 24 tunnin keskiarvo (mg/l)
1	46	129	1,5
2	36	108	27,0
3	31	84	27,0
4	32	72	770,0

Liite 3

Pitoisuusesimerkki: suhteellinen liikuntakyvyttömyys

Esimerkki EC_{50}-määrityksestä logaritmitodennäköisyyspaperin avulla



C.3 LEVÄN INHIBITIOKOE

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä kokeella voidaan määrittää testattavan aineen vaikutukset yksisoluisten viherlevälajien kasvuun. Suhteellisen lyhyellä (72 h) kokeella voidaan kattaa useita sukupolvia. Menetelmää voidaan käyttää useiden yksisoluisten viherlevien testaukseen. Testiraporttiin on tällöin sisällytettävä kuvaus käytetystä menetelmästä.

Menetelmää voidaan parhaiten soveltaa vesiliukoisiin aineisiin, jotka todennäköisesti eivät ole haihtuvia.

Menetelmää voidaan soveltaa aineisiin, jotka eivät suoraan häiritse leväkasvun mittausta.

Ennen testiä on suositeltavaa hankkia mahdollisuuksien mukaan tietoa aineen vesiliukoisuudesta, höyrynpaineesta, kemiallisesta stabiiliudesta, dissosiaatiovakiosta ja biohajoavuudesta.

Kokeen suunnittelussa ja tulosten tulkinnassa on otettava huomioon mahdolliset lisätiedot (esimerkiksi aineen rakennekaava, puhtausaste, merkittävien epäpuhtauksien laatu ja pitoisuus, lisäaineet ja niiden määrä sekä n-oktanoli/vesi-jakautumiskerroin).

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Solutiheys: solujen määrä millilitrassa

Kasvu: solutiheyden kasvu testijakson aikana

EC_{50}: tällä menetelmällä voidaan mitata joko kasvun (E_bC_{50}) tai kasvunopeuden (E_rC_{50}) 50-prosenttinen lasku kontrolliviljelmään verrattuna.

NOEC-pitoisuus (ei havaittua vaikutusta): tässä menetelmässä NOEC-pitoisuudella tarkoitetaan suurinta pitoisuutta, josta ei seuraa havaittavaa kasvun estymistä kontrolliviljelmään verrattuna.

Testattavan aineen kaikki pitoisuudet ilmaistaan painoyksikköinä tilavuutta kohti (mg/l). Pitoisuus voidaan ilmaista myös painoyksikköinä painoa kohti (mg/kg^{-1}).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuainetta testaamalla voidaan osoittaa, että testattavien lajien vaste ei ole merkittävästi muuttunut laboratorio-olosuhteissa.

Jos käytetään vertailuainetta, tulokset on sisällytettävä testiraporttiin. Voidaan käyttää kaliumdikromaattia, joskin sen väri voi vaikuttaa solujen käytettävissä olevan valon laatuun ja intensiteettiin sekä mahdollisiin spektrofotometrisiin määrityksiin. Kaliumdikromaattia on käytetty kansainvälisessä laboratorioiden välisessä testissä (katso viitettä (3) ja liitettä 2).

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Rajatestin (100 mg/l) avulla voidaan osoittaa, että EC_{50}-arvo on suurempi kuin rajatestipitoisuus.

Eksponentiaalisesti kasvavia viherleväviljelmiä altistetaan testattavan aineen eri pitoisuuksille määritetyissä olosuhteissa.

Testiliuoksia inkuboidaan 72 tunnin ajan. Tämän jakson aikana kunkin liuoksen tiheys mitataan vähintään 24 tunnin väliajoin. Määritetään kasvun inhibitio kontrolliviljelmään verrattuna.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä sovelletaan sekä rajatestiin että kattavaan testiin.

Kontrolliviljelmien solutiheyden on kasvettava vähintään kertoimella 16 kolmen päivän kuluessa.

Testattavan aineen pitoisuuden on koko testin ajan oltava vähintään 80 % alkupitoisuudesta.

Jos aine liukenee helposti veteen muodostaen stabiilin liuoksen (aine ei merkittävästi haihdu, pilkkoudu, hydrolysoidu tai adsorboidu), alkupitoisuutta voidaan pitää nimellisenä pitoisuutena. On esitettävä todisteet siitä, että pitoisuudet on pidetty vakiona testin ajan ja että laatukriteerit on täytetty.

Jos aine:

i) on huonosti veteen liukenevaa,

ii) pystyy muodostamaan stabiileja emulsioita tai dispersioita,

iii) ei ole stabiili vesiliuoksissa,

alkupitoisuutena pidetään kokeen alussa mitattua pitoisuutta. Pitoisuus määritetään tasapainon saavuttamisen jälkeen.

Tällaisissa tapauksissa testin aikana on tehtävä lisämittauksia, joilla voidaan vahvistaa todellinen altistuspitoisuus tai laatukriteereiden täyttyminen.

On todettu, että merkittäviä määriä testattavaa ainetta voi joutua leväbiomassaan testijakson aikana. Jotta voitaisiin osoittaa laatukriteereiden täyttyneen, on otettava huomioon sekä leväbiomassaan sisältyvä ainemäärä että liuoksessa oleva määrä (jos tämä ei ole teknisesti mahdollista, vesipatsaasta mitattu ainemäärä). Koska aineen määrittäminen biomassasta voi olla teknisesti vaikeata, laatukriteereiden täyttyminen voidaan osoittaa suorittamalla testi suurimmalla mahdollisella aineen pitoisuudella, mutta ilman levää ja mittaamalla liuoksen pitoisuus (jos tämä ei ole teknisesti mahdollista, vesipatsaasta mitattu pitoisuus) testijakson alussa ja lopussa.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Reagenssit**

1.6.1.1 *Testattavien aineiden liuokset*

Valmistetaan määrätynpitoiset kantaliuokset liuottamalla ainetta ionisoimattomaan veteen tai kohdan 1.6.1.2 mukaiseen veteen.

Tarvittavat testipitoisuudet valmistetaan lisäämällä levien esiviljelmiin sopivia alikvootteja (katso liitettä 1). Yleensä aineita ei pidä testata liukoisuusrajan ylittävinä pitoisuuksina. Joidenkin aineiden kohdalla (esimerkiksi sellaisten, jotka liukenevat huonosti veteen (suuri P_{ow}-arvo) ja sellaisten, jotka muodostavat dispersioita todellisen liuoksen sijasta) on hyväksyttävää käyttää liukoisuusrajan ylittävää testipitoisuutta, jotta voitaisiin varmistaa, että ainetta on liuennut mahdollisimman paljon ja että liuos on stabiili. On kuitenkin tärkeää, että tämä pitoisuus ei muutoin häiritse testijärjestelmää (esimerkiksi muodostamalla veden pinnalle kalvon, joka estää veden hapettumisen).

Jos aine on huonosti veteen liukenevaa, kantaliuoksen valmistamisessa tai aineen dispergoimisessa testiliuokseen voidaan käyttää apuna ultraäänidispersiota, orgaanisia liuottimia, emulsioliuottimia tai dispergoimisaineita. Jos tällaisia apuaineita käytetään, kaikkien testipitoisuuksien on sisällettävä sama määrä apuainetta ja erillinen kontrolliviljelmä on altistettava testisarjan apuainepitoisuudelle. Tällaisten apuaineiden pitoisuudet on pidettävä mahdollisimman pieninä, eivätkä ne koskaan saa ylittää arvoa 100 mg/l testiliuosta.

Koe suoritetaan ilman pH-arvon säätöjä. Jos havaitaan merkkejä pH-arvon merkittävästä muutoksesta, on suositeltavaa tehdä toinen koe, jossa käytetään pH-säätöä, ja raportoida tulokset. Tässä tapauksessa kantaliuoksen pH-arvo säädetään samaksi kuin laimennusveden pH-arvo, ellei tätä vastaan ole erityistä syytä. Suositeltavat pH-säätöaineet ovat HCl ja NaOH. pH-säätö on tehtävä siten, ettei kantaliuoksen testiainepitoisuus muutu merkittävästi. Jos pH-säädön seurauksena tapahtuu jokin kemiallinen reaktio tai testiaine saostuu, ilmiö on raportoitava.

1.6.1.2 *Testiliuos*

Veden on oltava hyvänlaatuista tislattua tai ionisoimatonta vettä, jonka johtavuus on alle 5 $\mu S/cm^{-1}$. Veden tislauslaite ei saa sisältää kuparista valmistettuja osia.

Seuraavia liuoksia suositellaan:

Valmistetaan neljä kantaliuosta jäljempänä olevan taulukon mukaan. Kantaliuokset steriloidaan kalvosuodatus- tai autoklaavikäsittelyllä ja niitä säilytetään pimeässä (4 °C:ssä). Kantaliuos numero 4 steriloidaan pelkällä kalvosuodatuskäsittelyllä. Testiliuosten lopullinen ravinnepitoisuus saadaan aikaan laimentamalla kantaliuoksia.

Ravinne	Pitoisuus kantaliuoksessa		Lopullinen pitoisuus testiliuoksessa	
Kantaliuos 1: makroravinteet				
NH_4Cl	1,5	g/l	15	mg/l
$MgCl_2.6H_2O$	1,2	g/l	12	mg/l
$CaCl_2.2H_2O$	1,8	g/l	18	mg/l
$MgSO_4.7H_2O$	1,5	g/l	15	mg/l
KH_2PO_4	0,16	g/l	1,6	mg/l
Kantaliuos 2: Fe-EDTA				
$FeCl_3.6H_2O$	80	mg/l	0,08	mg/l
$Na_2EDTA.2H_2O$	100	mg/l	0,1	mg/l
Kantaliuos 3: hivenaineet				
H_3BO_3	185	mg/l	0,185	mg/l
$MnCl_2.4H_2O$	415	mg/l	0,415	mg/l
$ZnCl_2$	3	mg/l	3×10^{-3}	mg/l
$CoCl_2.6H_2O$	1,5	mg/l	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l
$CuCl_2.2H_2O$	0,01	mg/l	10^{-5}	mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$	7	mg/l	7×10^{-3}	mg/l
Kantaliuos 4: $NaHCO_3$				
$NaHCO_3$	50	g/l	50	mg/l

Ilmalla tehtävän tasapainotuksen jälkeen liuoksen pH-arvo on noin 8.

1.6.2 **Laite**

— Normaalit laboratorion laitteet.

— Sopivan kokoisia pulloja (esimerkiksi 250 ml:n erlenmeyerpullo, kun liuoksen tilavuus on 100 ml), joiden on oltava samanmittaisia ja valmistettu samasta materiaalista.

— Viljelylaite: kaappi tai kammio, jossa lämpötilaväliä 21 — 25 °C voidaan pitää yllä tarkkuudella ± 2 °C ja jossa on tasainen valaistus spektrialueella 400 — 700 nm. Jos kontrolliviljelmien kasvunopeus on suositusten mukainen, voidaan olettaa, että viljelyolosuhteet, valo-olosuhteet mukaan lukien, ovat olleet sopivat.

Suositeltava valon intensiteetti testiliuoksen keskikorkeudella on 60 — 120 µE. m^{-2}. s^{-1} (35 — 70 x 10^{18} fotonia/m^{-2}. s^{-1}) mitattuna 400 — 700 nm:n alueelta sopivalla mittausanturilla. Jos valonmittauslaitteet on kalibroitu lux-yksikköä varten, vastaava alue on 6 000 — 10 000 lx.

Sopiva valon intensiteetti saadaan esimerkiksi sijoittamalla 4 — 7 tavallista valkoista 30 W:n loistevalaisinta (värilämpötila noin 4 300 K) 0,35 m:n etäisyydelle leväviljelmästä.

— Solutiheyden mittaukset on tehtävä laskemalla elävät solut suoraan, esimerkiksi laskulaitteella varustetun mikroskoopin avulla. Myös muita menetelmiä (esimerkiksi fotometriaa tai sameudenmittausta) voidaan käyttää, edellyttäen, että ne ovat tarpeeksi herkkiä ja riittävän hyvin korreloitavissa solutiheyden suhteen.

1.6.3 **Testattavat eliöt**

Suositeltava eliö on viherlevä, joka on nopeasti kasvava ja soveltuu viljelyyn sekä testaukseen. Suositukset ovat seuraavat:

— *Selenastrum capricornutum*, esimerkiksi ATCC 22662 tai CCAP 278/4

— *Scenedesmus subspicatus*, esimerkiksi 86.81 SAG.

Huomautus:

ATCC = American Type Culture Collection (USA)
CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (Englanti)
SAG = Collection of algal culture (Göttingen, Saksa)

Jos käytetään muita lajeja, kanta on ilmoitettava.

1.6.4 **Testin suorittaminen**

Testiin käytettävä pitoisuusalue määritetään alueenmäärityskokeella.

Kun käytetään kasvusuureita biomassa ja kasvunopeus, tulokseksi voidaan saada hyvinkin erilaisia kasvun inhibitioarvoja. Siksi alueenmäärityskokeessa on käytettävä molempia suureita, jotta voitaisiin varmistua siitä, että pitoisuuksien geometrinen porrastus suo mahdollisuuden sekä E_bC_{50}- että E_rC_{50}-arvon määritykseen.

Solutiheys kokeen alussa

Suosituksen mukaan viljelmien solutiheyden on oltava kokeen alussa noin 10^4 solua/ml *Selenastrum capricornutum*- ja *Scenedesmus subspicatus* -lajeja käytettäessä. Jos käytetään muita lajeja, biomassan on oltava vertailukelpoinen.

Testattavan aineen pitoisuudet

Koetta varten valmistetaan geometrisenä sarjana vähintään viisi pitoisuutta, joiden poikkeamiskerroin on enintään 2,2. Alin pitoisuus ei saa aiheuttaa havaittavia vaikutuksia levän kasvunopeuteen. Suurimman pitoisuuden on estettävä kasvu vähintään 50-prosenttisesti vertailunäytteeseen verrattuna tai mieluiten estettävä kasvu kokonaan.

Toistot ja kontrollit

Kokeeseen on kuuluttava kolme toistoa kutakin pitoisuutta kohti. Käytetään kolmea vertailunäytettä ilman testattavaa ainetta ja tarpeen mukaan kolmea vertailunäytettä, jotka sisältävät mahdollista apuainetta. Jos erityiset syyt sitä edellyttävät, pitoisuuksien määrää voidaan suurentaa ja toistojen määrää pitoisuutta kohti pienentää.

Testin suorittaminen

Valmistetaan testiviljelmät, joissa on testattavaa ainetta haluttuna pitoisuutena ja haluttu määrä siirroslevää lisäämällä testattavan aineen kantaliuoksen alikvootteja sopiviin määriin levän esiviljelmiä (katso liitettä 1).

Viljelypulloja ravistetaan ja ne asetetaan viljelylaitteeseen. Leväsolut pidetään suspendoituneina ravistamalla, hämmentämällä tai ilmakuplien avulla. Näin parannetaan kaasunvaihto ja pienennetään testiliuoksen pH-arvon vaihteluita. Viljelmien lämpötila pidetään alueella 21 — 25 °C ± 2 °C.

Kunkin pullon solutiheys määritetään vähintään 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua kokeen alusta lukien. Jos käytetään muita tiheyden määrittämismenetelmiä kuin suoraa laskentaa, tausta määritetään sopivan pitoisuuden testattavaa kemikaalia sisältävän suodatetun levän avulla.

pH-arvo määritetään kokeen alussa ja 72 tunnin kuluttua.

Yleensä vertailunäytteen pH-arvo saa kokeen aikana vaihdella enintään 1,5 yksikön verran.

Haihtuvien aineiden testaus

Haihtuvien aineiden testaamiseen ei ole yleisesti hyväksyttyä menetelmää. Jos aineen tiedetään olevan haihtuvaa, voidaan käyttää suljettuja pulloja, joissa on tavallista suurempi ylätila. Suljettujen pullojen ylätilan laskemisessa on otettava huomioon mahdollinen hiilidioksidin puute. Viitteessä 4 on maininta vaihtoehtoisista menetelmistä.

Liuokseen jäävän aineen määrä on yritettävä määrittää. On noudatettava äärimmäistä varovaisuutta tulkittaessa tuloksia kokeista, joissa on testattu haihtuvia kemikaaleja suljetuissa järjestelmissä.

Rajatesti

Rajatestin (100 mg/l) avulla voidaan, osoittaa että LC_{50}-arvo on suurempi kuin rajatestipitoisuus.

Jos aineesta ei saada vesiliuosta, jonka pitoisuus on 100 mg/l, rajatesti tehdään pitoisuudella, joka vastaa aineen liukoisuutta (tai enimmäispitoisuutta, jolla saadaan stabiili dispersio) käytettävään veteen (katso myös kohtaa 1.6.1.1).

Rajatesti on suoritettava vähintään kolmena toistona samaa vertailunäytteiden määrää käyttäen. Rajatestissä on käytettävä kahta kasvun suuretta (biomassaa ja kasvunopeutta).

Jos rajatestin tuloksena on biomassan tai kasvunopeuden pieneneminen keskimäärin vähintään 25 %, on suoritettava kattava testi.

2 TIEDOT JA ARVIOINTI

Testi- ja kontrolliviljelmien mitattu solutiheys esitetään taulukkona, josta ilmenevät testattavan aineen pitoisuudet ja mittausajankohdat. Kasvukäyrät saadaan piirtämällä solutiheyden muuttuminen ajan funktiona (0 — 72 tuntia) käsiteltyjen näytteiden ja kontrolliviljelmien osalta kutakin testattavaa ainepitoisuutta kohti.

Pitoisuuden ja vaikutuksen suhde määritetään kahden jäljempänä kuvatun menetelmän mukaan. Eräiden aineiden kohdalla kasvua voidaan simuloida matalien pitoisuuksien osalta. Kelpuutetaan vain pisteet, jotka osoittavat 0 — 100 prosentin inhibitiota.

2.1 KASVUKÄYRIEN ALAISTEN PINTA-ALOJEN VERTAILU

Kasvukäyrän ja vaakasuoran $N = N_0$ välinen pinta-ala voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \ldots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

jossa

A = pinta-ala
N_0 = solujen määrä millilitrassa hetkellä t_0 (kokeen alussa)
N_1 = mitattu solujen määrä millilitrassa hetkellä t_1
N_n = mitattu solujen määrä millilitrassa hetkellä t_n
t_1 = kokeen alusta mittaushetkeen 1 kulunut aika
t_n = kokeen alusta mittaushetkeen n kulunut aika.

Solukasvun suhteellinen estyminen (%) kutakin testattavan aineen pitoisuutta kohti (I_A) lasketaan seuraavan suureyhtälön avulla:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

jossa

A_c = vertailunäytteen kasvukäyrän ja vaakasuoran $N = N_0$ välinen pinta ala
A_t = pitoisuuden t kasvukäyrän ja vaakasuoran $N = N_0$ välinen pinta ala

I_A-arvot piirretään puolilogaritmipaperille tai puolilogaritmiselle probit-paperille kunkin pitoisuuden osalta. Jos arvot piirretään probit-paperille, pisteet sovitetaan (joko silmämääräisesti tai lasketun regression avulla) siten, että ne muodostavat suoran.

EC_{50}-arvo määritetään regressioviivasta lukemalla pitoisuus, joka vastaa 50 prosentin inhibitiota ($I_A = 50$ %). Jotta luettu arvo voitaisiin tunnistaa tähän laskentamenetelmään liittyväksi, ehdotetaan symbolin E_bC_{50} käyttöä. On tärkeää, että E_bC_{50}-arvon yhteydessä viitataan myös altistusjaksoon, esimerkiksi E_bC_{50} (0 — 72 h).

2.2 KASVUNOPEUKSIEN VERTAILU

Eksponentiaalisesti kasvavien viljelmien keskimääräinen spesifinen kasvunopeus (μ) voidaan ilmaista seuraavasti:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

jossa t_0 on kokeen alkuaika.

Vaihtoehtoisesti voidaan johtaa keskimääräinen spesifinen kasvunopeus regressiosuoran kaltevuudesta piirtämällä ln N ajan funktiona.

Spesifisen kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen kutakin testattavan aineen pitoisuutta kohti ($I_\mu t$) voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

jossa

μ_c = vertailunäytteen keskimääräinen spesifinen kasvunopeus
μ_t = testattavan aineen pitoisuuden t keskimääräinen spesifinen kasvunopeus

Piirretään kutakin testattavan aineen pitoisuutta kohti keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden pieneneminen vertailuarvoon verrattuna, pitoisuuden logaritmin funktiona. EC_{50}-arvo voidaan lukea tuloksena saatavasta käyrästä. Jotta luettu EC_{50}-arvo voitaisiin tunnistaa tähän menetelmään liittyväksi, ehdotetaan symbolin E_rC_{50} käyttöä. Myös mittausajat on ilmoitettava. Jos esimerkiksi arvo viittaa 0 ja 72 tunnin jälkeen tehtyihin mittauksiin, käytetään symbolia E_rC_{50} (0 — 72 h).

Huomautus: Spesifinen kasvunopeus on logaritminen suure, joten pienet kasvunopeuden muutokset voivat aiheuttaa suuria biomassan muutoksia. Siksi E_bC- ja E_rC-arvoja ei voi verrata numeerisesti.

2.3 NOEC-arvon laskenta

NOEC-arvo (No Observed Effect Concentration – pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta) määritetään soveltuvan tilastollisen, useiden näytteiden vertailumenetelmän mukaan (tehdään esimerkiksi varianssianalyysi ja Dunnetin testi) käyttäen yksittäisiä toistoarvoja kasvukäyrien A alaisesta pinta-alasta (katso kohtaa 2.1) tai spesifisiä kasvunopeuksia μ (katso kohtaa 2.2).

3 RAPORTOINTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— testattava aine: kemialliset tunnistetiedot

— testattavat eliöt: lähde, laboratorioviljelmä, kannan numero, viljelymenetelmä

— testiolosuhteet:

  — alku- ja loppupäivä sekä kokeen kesto

  — lämpötila

  — liuoksen koostumus

  — viljelylaite

  — liuosten pH-arvo kokeen alussa ja lopussa (mukaan on liitettävä selvitys, jos pH-arvo vaihtelee yli 1,5 yksikön verran)

  — liuotin ja menetelmä, jota on käytetty testattavan aineen liuottamiseen, sekä liuottimen pitoisuus testiliuoksessa

  — valon intensiteetti ja laatu

  — testatut pitoisuudet (mitatut tai nimelliset)

— tulokset:

  — kunkin pullon solutiheys kullakin mittaushetkellä ja solutiheyden mittausmenetelmä

  — solutiheyden keskiarvot

  — kasvukäyrät

  — pitoisuuden ja vaikutusten suhteen graafinen esitys

  — EC-arvot ja laskentamenetelmät

  — NOEC-arvo

  — muut havaitut vaikutukset.

4 VIITTEET

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag « Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus* », in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

(3) ISO 8692 Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.

(4) S. Galassi and M. Vighi - Chemosphere, 1981, vol. 10, 1123-1126.

Liite 1

Esimerkki levänviljelymenetelmästä

Yleisiä havaintoja

Tässä kuvattavan menetelmän avulla voidaan viljellä leviä myrkyllisyyskokeita varten.

Soveltuvien menetelmien avulla on varmistettava, että leväviljelmissä ei ole bakteeritartuntaa (ISO 4833). On aina varmistettava, että viljelmissä esiintyy vain yhtä levälajia. Tämä pätee myös akseenisia viljelmiä käytettäessä.

Bakteerien tai muiden levien pääsy viljelmään on estettävä tekemällä kaikki toimet steriileissä olosuhteissa. Kontaminoituneet viljelmät on hylättävä.

Leväviljelmien tuottaminen

Elatusaineen valmistelu:

Elatusaineet voidaan valmistaa laimentamalla väkevää kantaliuosta. Jos elatusaine on kiinteä, lisätään 0,8 % agaria. Elatusaineen on oltava steriili. Sterilointi autoklaavikäsittelyllä voi aiheuttaa ammoniakkihäviöitä.

Kantaviljelmä:

Kantaviljelmät ovat pieniä leväviljelmiä, jotka siirretään säännöllisesti tuoreeseen elatusaineeseen, jossa ne toimivat testin alkumateriaalina. Jos viljelmiä ei käytetä säännöllisesti, ne valutetaan kallistettuihin agarputkiin. Putket siirretään tuoreeseen elatusaineeseen vähintään kahden kuukauden väliajoin.

Kantaviljelmiä viljellään sopivaa elatusainetta sisältävissä erlenmeyerpulloissa (tilavuus noin 100 ml). Kun leviä inkuboidaan 20 °C:ssa jatkuvassa valaistuksessa, siirrot on tehtävä viikoittain.

Siirrossa "vanhan" viljelmän osa siiretään steriilin pipetin avulla tuoretta elatusainetta sisältävään pulloon. Jos laji on nopeasti kasvava, alkupitoisuuden on oltava noin sadasosa vanhan viljelmän pitoisuudesta.

Lajin kasvunopeus voidaan määrittää kasvukäyrän avulla. Näin on mahdollista arvioida, kuinka usein viljelmä on siirrettävä uuteen elatusaineeseen. Siirto on tehtävä, ennen kuin viljelmä kuolee.

Esiviljely

Esiviljelyn avulla saadaan levämäärä, joka on sopiva testiviljelmien siirrostukseen. Esiviljelmää inkuboidaan testiolosuhteissa, ja viljelmä käytetään sen ollessa vielä eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa, yleensä noin kolmen päivän pituisen inkubaation jälkeen. Leväviljelmät, jotka sisältävät epämuodostuneita tai poikkeavia soluja, on hylättävä.

Liite 2

Taulukossa on tulokset vedenlaatustandardin ISO 8692 mukaisesta makeavesilevien kasvunestotestistä, jossa on käytetty lajeja *Scenedesmus subspicatus* ja *Selenastrum capricornutum* (16 laboratoriota käsittävä laboratorioiden välinen kaliumdikromaatin testaus).

	Keskiarvo (mg/l)	Alue (mg/l)
E_rC_{50} (0 — 72 h)	0,84	0,60 — 1,03
E_bC_{50} (0 — 72 h)	0,53	0,20 — 0,75

C.4 BIOHAJOAVUUDEN MÄÄRITYS

OSA I YLEISTÄ

I.1 JOHDANTO

Jäljempänä kuvataan kuusi menetelmää, joiden avulla voidaan tutkia kemikaalin biohajoavuutta aerobisessa vesiliuoksessa. Menetelmät ovat seuraavat:

a) Liukoinen orgaaninen hiili (DOC — Dissolved Organic Carbon) Die-Away – menetelmä C.4-A

b) Muunneltu OECD-seulonta (DOC Die-Away) – menetelmä C.4-B

c) Hiilidioksidin (CO_2) muodostus (muunneltu Sturm-testi) – menetelmä C.4-C

d) Manometrinen respirometria – menetelmä C.4-D

e) Suljettu pullo – menetelmä C.4-E

f) MITI (Ministry of International Trade and Industry, Japani) – menetelmä C.4-F.

Menetelmäkuvausten osassa I on kunkin testin yleiskuvaus. Osissa II — VII on kuvattu menetelmän erityispiirteet. Liitteissä on määritelmiä, suureyhtälöitä ja ohjeita.

OECD-maiden laboratorioiden välinen, vuonna 1988 suoritettu testi osoitti, että menetelmillä saadut tulokset ovat yhtenäiset. Menetelmää valittaessa on kuitenkin otettava huomioon testattavan aineen fysikaaliset ominaisuudet.

I.2 MENETELMÄN VALINTA

Sopivimman menetelmän löytämiseksi on hankittava tietoja aineen kemiallisesta liukoisuudesta, höyrynpaineesta ja adsorptio-ominaisuuksista. Aineen kemiallinen rakenne tai kaava on selvitettävä teoreettisten arvojen laskentaa tai mitattujen parametrien — esimerkiksi ThOD:n, $ThCO_2$:n, DOC:n, TOC:n ja COD:n — tarkistamista varten (katso liitteitä I ja II).

Kemikaaleja, joiden vesiliukoisuus on vähintään 100 mg/l, voidaan tutkia kaikilla menetelmillä, edellyttäen, etteivät kemikaalit ole haihtuvia tai adsorboivia. Huonosti veteen liukenevia, haihtuvia tai adsorboivia kemikaaleja varten soveltuvat menetelmät luetellaan taulukossa 1. Esimerkkejä huonosti veteen liukenevien ja haihtuvien kemikaalien käsittelymahdollisuuksista kuvataan liitteessä III. Lievästi haihtuvia kemikaaleja voidaan testata DOC Die-Away — menetelmällä, edellyttäen että testausastiassa on riittävä kaasutila (astian on oltava suljettua tyyppiä). Tällöin on tehtävä abioottisia tarkistuksia mahdollista fysikaalista hukkaa ajatellen.

Taulukko 1: Testimenetelmien soveltuvuus

Testi	Analyyttinen menetelmä	Soveltuvuus		
		huonosti liukenevat aineet	haihtuvat aineet	adsorboivat aineet
DOC Die-Away	Liuennut orgaaninen hiili	—	—	+/-
Muunneltu OECD Die Away	Liuennut orgaaninen hiili	—	—	+/-
CO_2:n muodostus	Respirometria: CO_2:n muodostus	+	—	+
Manometrinen respirometria	Manometrinen respirometria: hapenkulutus	+	+/-	+
Suljettu pullo	Respirometria: liuennut happi	+/-	+	+
MITI	Respirometria: hapenkulutus	+	+/-	+

Tulosten tulkintaa varten tarvitaan tietoja testattavan aineen pääosien puhtaudesta tai niiden suhteellisista osuuksista, etenkin jos tuloksena saatavat arvot ovat pieniä tai marginaalisia.

Sopivan testauspitoisuuden löytämiseksi on suositeltavaa selvittää aineen myrkyllisyys bakteereille (liite IV). Näiden tietojen avulla voidaan usein varmistaa oikea tulkinta, jos tuloksena saatu biohajoavuus on heikko.

I.3 VERTAILUAINEET

Menetelmän tarkistamiseksi biohajoavuuskriteerin täyttäviä vertailukemikaaleja testataan rinnan testiajojen kanssa tarkoitukseen sopivassa pullossa.

Sopivia vertailukemikaaleja ovat (vastatislattu) aniliini, natriumasetaatti ja natriumbentsoaatti, jotka kaikki hajoavat näiden menetelmien mukaan käsiteltynä, myös ilman siirrosaineen lisäystä.

On ehdotettu sellaisen vertailukemikaalin etsimistä, jolla olisi hyvä biohajoavuus, mutta joka edellyttäisi siirrosaineen lisäystä. Tarkoitukseen on ehdotettu kaliumvetyftalaattia, josta on kuitenkin saatava lisätodisteita, ennen kuin se voidaan hyväksyä vertailuaineeksi.

Respirometrisissä testeissä typpeä sisältävät yhdisteet voivat häiritä hapenottoa nitrifikaation vuoksi (katso liitteitä II ja V).

I.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATE

Testattavaa ainetta, joka on liuotettu tai suspendoitu epäorgaaniseen aineeseen, siirrostetaan ja inkuboidaan aerobisissa olosuhteissa pimeässä tai heikossa valaistuksessa. Testiliuoksen siirrostuksesta saadun DOC-määrän on oltava mahdollisimman pieni testattavasta aineesta saatuun DOC-määrään verrattuna. Siirrosaineen endogeeninen aktiviteetti otetaan huomioon ajamalla rinnan taustakokeita käyttäen pelkää siirrosainetta ilman testattavaa ainetta, vaikka solujen endogeeninen aktiviteetti testattavan aineen vaikutusten vuoksi ei ole täysin sama kontrolliliuoksessa ja testiliuoksessa. Menetelmien tarkistamiseksi ajetaan rinnakkaiskoe vertailuainetta käyttäen.

Hajoamisvaiheen jälkeen seuraa yleensä parametrien (esimerkiksi DOC:n, CO_2-tuotannon ja hapenoton) määritys. Biohajoavuusvaiheen alku ja loppu voidaan todeta tekemällä mittauksia rittävän usein. Jos käytetään automaattisia respirometrejä, mittaaminen on jatkuvaa. DOC-arvo mitataan eräissä tapauksissa toisen parametrin mittauksen yhteydessä, mutta tavallisimmin DOC-mittaus tehdään kokeen alussa ja lopussa. Spesifisen kemiallisen analyysin avulla voidaan määrittää myös testattavan aineen primaarinen hajoaminen ja mahdollisesti muodostuvat välituotteet (pakollinen osa MITI-testiä).

Kokeen kesto on yleensä 28 päivää. Koe voidaan keskeyttää aiemmin, jos biohajoavuuskäyrässä on vähintään kolmen mittauksen pituinen tasanne. Koetta voidaan myös jatkaa 28. päivän jälkeen, jos biohajoavuuskäyrästä nähdään, että biohajoamisvaihe on alkanut, mutta ei vielä ole saavuttanut tasannetta 28. päivän kohdalla.

I.5 LAATUKRITEERIT

I.5.1 **Toistettavuus**

Biohajoavuuden ominaisuuksien ja siirrosaineksena käytettyjen yhdistettyjen bakteeriviljelmien ominaisuuksien vuoksi määritykset on tehtävä vähintään kaksi kertaa.

Käytäntö on osoittanut, että mitä suurempi on kokeen alussa testiliuokseen lisättyjen pieneliöiden pitoisuus, sitä vähäisempi on toistojen välinen vaihtelu. Rengastesteillä on voitu osoittaa, että eri laboratoriosta saadut tulokset voivat vaihdella merkittävästi. Niiden aineiden osalta, joiden biohajoavuus on hyvä, on kuitenkin yleensä saatu varsin yhteneviä tuloksia.

I.5.2 **Kokeen hyväksyminen**

Koe hyväksytään, jos kemikaalin hajoamisarvojen ero biohajoavuuskäyrän tasanteen kohdalla (testin alussa tai 10-päiväisen jakson lopussa) toistojen ääriarvojen osalta on enintään 20 % ja jos vertailuaineen prosentuaalinen hajoaminen on saavuttanut hyvän biohajoavuuden tason 14 päivän kuluessa. Jos jompikumpi näistä ehdoista ei täyty, koe on toistettava. Koska menetelmien valinnanvara on vähäinen, pienet arvot eivät vältämättä tarkoita sitä, ettei aineen biohajoavuus luonnonympäristössä voisi olla hyvä. Pienet arvot osoittavat kuitenkin, että aineen biohajoavuuden määrittämiseksi tarvitaan lisätutkimuksia.

Jos myrkyllisyystestissä, jossa käytetään sekä testattavaa ainetta että vertailukemikaalia, saadaan tulokseksi hajoaminen, joka 14 päivän kuluessa on DOC-pohjaisena enintään 35 % tai THOD- tai $ThCO_2$-pohjaisena enintään 25 %, voidaan olettaa, että testattavalla kemikaalilla on inhibitorisia ominaisuuksia (katso myös liitettä IV). Tällöin koesarja on toistettava, mahdollisesti pienempää kemikaalin pitoisuutta tai suurempaa siirrosaineen pitoisuutta käyttäen, ei kuitenkaan yli 30 mg:aa kuiva-ainetta litraa kohti.

I.6 YLEISIÄ MENETELMIÄ JA VALMISTELUJA

Taulukossa 2 on yhteenveto testiin sovellettavista yleisistä olosuhteista. Yksittäisten kokeiden laitteet ja olosuhteet kuvataan tarkemmin kokeiden omissa menetelmäkuvauksissa.

Taulukko 2: Testiolosuhteet

Koe	DOC Die-Away	CO_2-muodostus	Manometrinen respirometria	Muunneltu OECD-seulonta	Suljettu pullo	MITI (I)
Testattavan aineen pitoisuus mg/l			100		2 — 10	100
mg DOC/l	10 — 40	10 — 20		10 — 40		
mg ThOD/l			50 — 100		5 — 10	
Siirrosaineen pitoisuus (soluja/l, likiarvo)	≤ 30 mg/l SS tai ≤ 100 ml jätevettä/l (10^7 — 10^8)			0,5 ml sekundaarista jätevettä/l (10^5)	≤ 5 ml jätevettä/l (10^4 — 10^6)	30 mg/l SS (10^7 — 10^8)
Epäorgaanisen liuoksen koostumus (mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 — 0,1				0,05 — 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					suositus: 7,0
Lämpötila	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = Liuennut orgaaninen hiili ThOD = Teoreettinen hapentarve SS = Suspendoitunut kuiva-aine

I.6.1 **Laimennusvesi**

Laimennukseen käytetään ionivaihdettua tai tislattua vettä, jossa ei ole inhibitoorisia pitoisuuksia myrkyllisiä aineita (esimerkiksi Cu^{++}-ioneja). Vedessä saa olla enintään 10 % testattavasta materiaalista saatua orgaanista hiiltä. Erittäin puhtaan veden käyttö on oleellista suurten tausta-arvojen välttämiseksi. Veteen voi tulla saasteita luontaisista epäpuhtauksista, ioninvaihtohartseista tai bakteereista ja levistä liuenneista aineista. Koesarjoittain on käytettävä samaa vesierää, jolle on ensin tehtävä DOC-analyysi. Suljetun pullon koetta varten tätä tarkistusta ei tarvita, mutta veden hapenkulutuksen on oltava pieni.

I.6.2 **Epäorgaanisten ainesosien kantaliuos**

Testiliuokset valmistetaan epäorgaanisia aineita sisältävistä kantaliuoksista. Jäljempänä luetellut kantaliuokset soveltuvat (sopivasti laimennettuina) seuraaviin menetelmiin: DOC Die-Away, muunneltu OECD-seulonta, CO_2-muodostus, manometrinen respirometria, suljetun pullon koe.

Laimennuskertoimet ja MITI-kokeen epäorgaanisen liuoksen spesifinen valmistelutapa mainitaan kunkin kokeen otsikon alla.

Kantaliuokset:

Valmistetaan seuraavat kantaliuokset analyyttisen puhtaita reagensseja käyttäen:

a)	Kaliumdivetyortofosfaattia, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliummonovetyortofosfaattia, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriummonovetyortofosfaattidihydraattia, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	33,40 g
	Ammoniumkloridia, NH_4Cl	0,50 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen. Liuoksen pH-arvon on oltava 7,4.	
b)	Kalsiumkloridia, $CaCl_2$	27,50 g
	tai kalsiumkloridididihydraattia, $CaCl_2 \times 2H_2O$	36,40 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.	
c)	Magnesiumsulfaattiheptahydraattia, $MgSO_4 \times 7H_2O$	22,50 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.	
d)	Rauta(III)kloridi-heksahydraattia, $FeCl_3 \times 6H_2O$	0,25 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.	

Huomautus: Jotta liuosta ei tarvitsisi valmistaa välittömästi ennen käyttöä, siihen voidaan lisätä tippa väkevää suolahappoa tai 0,4 g EDTA:ta litraa kohti.

I.6.3 **Kemikaaleista valmistetut kantaliuokset**

Jos aineen liukoisuus on yli 1 g/l, 1 — 10 g testattavaa tai kontrollina käytettävää kemikaalia liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja liuos laimennetaan yhden litran tilavuuteen. Muussa tapauksessa kantaliuos voidaan valmistaa epäorgaaniseen liuokseen tai kemikaalia voidaan lisätä suoraan epäorgaaniseen liuokseen. Huonosti liukenevien kemikaalien käsittely kuvataan liitteessä III. MITI-kokeessa (menetelmä C.4-F) ei saa käyttää liuottimia tai emulgaattoreita.

I.6.4 **Siirrosaine**

Siirrosaine voi olla peräisin useasta lähteestä: aktivoidusta lietteestä, jätevedestä (ilman kloorikäsittelyä), pintavedestä, maa-aineksesta tai näiden seoksesta. Jos DOC Die-Away-, CO_2-muodostus- ja manometrinen respirometria -kokeissa käytetään aktiivilietettä, se on otettava käsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitoksesta, johon syötetään pääosin kotitalouksista tulevaa jätevettä. Muista lähteistä otetun siirrosaineen on todettu aiheuttavan varsin epäyhtenäisiä tuloksia. Muunneltua OECD-seulontamenetelmää ja suljetun pullon menetelmää varten

tarvitaan matalapitoista siirrosainetta ilman lieteflokkeja. Tällöin suositellaan talousveden esikäsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitoksesta saatua sekundaarista jätevettä. MITI-menetelmää varten tarvittava siirrosaine saadaan sekoittamalla eri lähteistä saatuja aineita (tarkempi kuvaus löytyy MITI-menetelmän otsikon alta).

I.6.4.1 *Siirrosaine aktiivilietteestä*

Aktiivilietenäyte otetaan sellaisenaan pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän vedenpuhdistamon tai laboratoriolaitoksen ilmastussäiliöstä. Tarvittaessa karkeat hiukkaset poistetaan suodattamalla hienon seulan läpi, minkä jälkeen liete pidetään aerobisena.

Lietteen annetaan asettua tai se sentrifugoidaan (esimerkiksi 1 100 g 10 minuutin ajan) karkeiden hiukkasten poiston jälkeen. Pintaliete hylätään. Lietettä voidaan pestä epäorgaanisessa liuoksessa. Väkevöity liete suspendoidaan epäorgaaniseen liuokseen (lopullinen pitoisuus 3 — 5 g kuiva-ainetta/l) ja säilötään ilmastettuna.

Lietteen on tultava tehokkaasti toimivasta, perinteisen tekniikan mukaisesta laitoksesta. Jos liete on otettava suurkuormituslaitoksesta tai jos epäillään lietteen sisältävän inhibiittoreita, liete on pestävä. Liete sekoitetaan hyvin, minkä jälkeen uudelleen suspendoitunut liete saa asettua tai se sentrifugoidaan. Pintaliete hylätään ja pesty liete suspendoidaan uudelleen uuteen epäorgaaniseen liuokseen. Menettelyä toistetaan, kunnes voidaan katsoa, ettei lietteessä ole enää ylimääräistä substraattia tai inhibiittoria.

Kun liete on täysin uudelleensuspendoitunut (tai jos lietettä käytetään sellaisenaan), näyte kerätään välittömästi ennen käyttöä. Suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus määritetään näytteestä.

Yksi vaihtoehto on lisäksi aktiivilietteen homogenointi (3 — 5 g suspendoitunutta kuiva-ainetta/l). Lietettä käsitellään mekaanisessa sekoittimessa keskinopeudella 2 minuutin ajan. Sekoitetun lietteen annetaan asettua 30 minuutin ajan (tai tarvittaessa kauemmin), ja neste dekantoidaan. Näin saatua nestettä käytetään siirrosaineena (pitoisuus: 10 ml/l epäorgaanista liuosta).

I.6.4.2 *Muita siirrosainelähteitä*

Siirrosainetta voidaan valmistaa myös pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän laitoksen tai laboratoriolaitoksen sekundaarisesta jätevedestä. Kerätään tuore näyte, joka pidetään aerobisena kuljetuksen ajan. Näytteen annetaan asettua tunnin ajan tai se suodatetaan karkean suodatinpaperin läpi. Näin saatua dekantoitua jätevettä tai suodosta säilytetään aerobisena, kunnes sitä tarvitaan. Tämäntyyppistä siirrosainetta voidaan käyttää enintään 100 ml liuoslitraa kohti.

Siirrosainetta voidaan ottaa myös pintavedestä. Esimerkiksi joen tai järven pintavedestä otetaan näyte, jota säilytetään aerobisena, kunnes sitä tarvitaan. Tarvittaessa siirrosaine voidaan väkevöidä suodattamalla tai sentrifugoimalla.

I.6.5 **Siirrosaineen esikäsittely**

Esikäsittelyn avulla siirrosaine voidaan sopeuttaa testiolosuhteisiin, mutta ei testattavaan kemikaaliin. Esikäsittelyssä aktiivilietettä ilmastetaan epäorgaanisessa liuoksessa tai sekundaarisessa jätevedessä 5 — 7 päivän ajan testilämpötilassa. Esikäsittelyn avulla on mahdollista saadaa tarkempia tuloksia, koska tausta-arvot jäävät pois. MITI-menetelmän avulla valmistettua siirrosainetta ei tarvitse esikäsitellä.

I.6.6 **Abioottiset tarkistukset**

Tarvittaessa testattavan aineen mahdollinen abioottinen hajoaminen on tarkistettava määrittämällä DOC:n poistuma, hapenotto tai hiilidioksidinmuodostus steriilistä vertailunäytteestä, jossa ei ole siirrosainetta. Sterilointi tehdään kalvosuodatuksella (0,2 — 0,45 µm) tai lisäämällä sopiva määrä soveltuvaa myrkyllistä ainetta. Jos käytetään kalvosuodatusta, näytteet on otettava aseptisesti steriiliyden varmistamiseksi. Ellei testattavan kemikaalin adsorptiomahdollisuutta ole voitu sulkea pois, testeihin, joissa mitataan biohajoamista DOC:n poistuman avulla (etenkin käytettäessä aktiivilietettä siirrosaineena), on sisällytettävä abioottinen (siirrostettu ja myrkytetty) vertailunäyte.

I.6.7 **Pullojen määrä**

Tyypillisessa kokeessa käytettävä pullomäärä mainitaan kunkin kokeen otsikon alla.

Seuraavia pullotyyppejä voidaan käyttää:

Testisuspensio: pullossa testattavaa ainetta ja siirrosainetta

Siirrosaineen taustanäyte: pullossa pelkkää siirrosainetta

Menetelmän vertailunäyte: pullossa vertailu- ja siirrosainetta

Steriili abioottinen vertailunäyte: steriili pullo, jossa on testattavaa ainetta

Adsorptiotarkistus: pullossa testattavaa ainetta, siirrosainetta ja steriloivaa ainetta

Myrkyllisyyskoe: pullossa testattavaa ainetta, vertailuainetta ja siirrosainetta.

Testisuspension ja siirrosaineen taustanäytteen määritykset on ehdottomasti tehtävä rinnan. On suositeltavaa tehdä myös muiden pullojen määritykset rinnan.

Tämä ei ehkä aina ole mahdollista. On tärkeää, että otetaan riittävä määrä näytteitä tai lukemia, jotta 10-päiväisen jakson aikana syntyvä prosentuaalinen poistuma voidaan määrittää.

I.7 TIEDOT JA ARVIOINTI

D_t-arvon laskennassa käytetään prosentuaalista hajoamista, parametrin kaksoismittausten keskiarvoja molempien testisäiliöiden osalta ja siirrosaineen taustanäytettä. Laskentaan käytettävät suureyhtälöt mainitaan jäljempänä kunkin kokeen yhteydessä. Hajoaminen esitetään graafisessa muodossa (10-päiväinen jakso merkitään). Lasketaan ja raportoidaan saavutettu prosentuaalinen poistuma 10-päiväisen jakson lopussa samoin kuin käyrän tasanteen arvo tai arvo kokeen päätyttyä (valitaan sopivampi arvo).

Respirometrisissä testeissä typpeä sisältävät yhdisteet voivat häiritä hapenottoa nitrifikaation vuoksi (katso liitteitä II ja V).

I.7.1 **DOC-määrityksen avulla mitattu hajoaminen**

Lasketaan jokaisen näytteenoton ajankohdan prosentuaalisen hajonnan arvo D_t kutakin testattavaa ainetta kohti DOC-kaksoismittausten keskiarvoja käyttäen (kaksoismittausten avulla voidaan vahvistaa kokeen hyväksyttävyys — katso kohtaa I.5.2). D_t-arvo lasketaan seuraavan suureyhtälön avulla:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

jossa

D_t = prosentuaalinen hajoaminen ajankohtana t

C_o = siirrostetun, testiainetta sisältävän viljelmän keskimääräinen DOC-pitoisuus kokeen alussa (mg DOC/l)

C_t = siirrostetun, testiainetta sisältävän viljelmän keskimääräinen DOC-pitoisuus hetkellä t (mg DOC/l)

C_{bo} = siirrostetun, taustanäytteenä käytettävän epäorgaanisen liuoksen keskimääräinen DOC-pitoisuus kokeen alussa (mg DOC/l)

C_{bt} = siirrostetun, taustanäytteenä käytettävän epäorgaanisen liuoksen keskimääräinen DOC-pitoisuus hetkellä t (mg DOC/l).

Kaikki pitoisuudet mitataan kokeellisesti.

I.7.2 **Spesifisen analyysin avulla mitattava hajoaminen**

Jos käytettävissä on spesifisiä analyyttisiä tietoja, primaarinen biohajoaminen voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

jossa

D_t = prosentuaalinen hajonta hetkellä t (yleensä 28 päivää)

S_a = testattavan aineen jäännösmäärä (mg) siirrostetussa liuoksessa kokeen lopussa

S_b = testattavan aineen jäännösmäärä (mg) taustanäytteessä (vettä/liuosta, johon on lisätty vain testattavaa ainetta)

I.7.3 **Abioottinen hajoaminen**

Jos käytetään abioottista, steriiliä vertailynäytettä, prosentuaalinen abioottinen hajoaminen voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$\text{prosentuaalinen abioottinen hajoaminen} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

jossa

$C_{s(0)}$ = steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus päivänä 0 (kokeen alussa)

$C_{s(t)}$ = steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus päivänä t

I.8 RAPORTOINTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— testattavat aineet ja vertailuaineet sekä niiden puhtausluokka

— testiolosuhteet

— siirrosaineen laatu ja ottopaikka (-paikat), pitoisuus ja mahdolliset esikäsittelyt

— jäteveden teollisuusjätteiden osuus ja laatu (jos tunnetaan)

— kokeen kesto ja lämpötila

— mahdollisten huonosti liukenevien käsittely

— käytetty testimenetelmä; kaikista muutoksista on annettava tieteelliset perustelut ja selvitykset

— tietolomake

— mahdollisesti havaitut inhibiitioilmiöt

— mahdollisesti havaittu abioottinen hajoaminen

— spesifiset kemialliset analyysitiedot (jos käytettävissä)

— välituotteiden analyyttiset tiedot (jos käytettävissä)

— käyrät, jotka esittävät testattavan aineen ja vertailuaineiden prosentuaalisen hajoamisen ajan funktiona; lepovaihe, hajoamisvaihe, 10-päiväinen jakso ja kaltevuus on merkittävä selvästi (liite I). Jos testi täyttää testikriteerit, käyrässä voidaan käyttää testattavan aineen prosentuaalisen hajoamisen keskiarvoa

— prosentuaalinen poistuma 10-päiväisen jakson jälkeen ja käyrän tasanteella tai kokeen lopussa.

OSA II. DOC DIE-AWAY-KOE (menetelmä C.4-A)

II.1 MENETELMÄN PERIAATE

Mitattu tilavuus siirrostettua epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa ainetta (10 — 40 mg DOC/l) ainoana nimellisenä hiililähteenä, ilmastetaan heikossa valossa tai pimeässä pitäen yllä lämpötilaa 22 ± 2 °C.

Hajoamista seurataan usein tehtävien DOC-analyysien avulla 28 päivän jakson aikana. Hajoamisaste lasketaan ilmaisemalla poistuneen DOC:n (siirrostetun taustanäytteen arvolla korjattuna) prosenttiosuus alkupitoisuudesta. Primaarisen biohajoamisen aste voidaan laskea myös inkubaation alussa ja lopussa tehdyn kemiallisen analyysin avulla.

II.2 MENETELMÄKUVAUS

II.2.1 Laite

a) erlenmeyerpulloja (tilavuudeltaan esimerkiksi 250 ml — 2 l) DOC-analyysin edellyttämän tilavuuden mukaan

b) ravistuskone pulloja varten (koneessa on oltava automaattinen lämpötilan säätö tai sitä on käytettävä lämpötilasäädetyssä huoneessa, ja sen on pystyttävä ylläpitämään aerobisia olosuhteita kaikissa pulloissa)

c) sopivin kalvoin varustettu suodatuslaite

d) DOC-analysaattori

e) liuenneen hapen määrityslaite

f) sentrifugi.

II.2.2 Epäorgaanisen liuoksen valmistus

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 800 ml:aan laimennusvettä, lisätään b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

II.2.3 Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely

Siirrosaineen lähteinä voidaan käyttää aktiivilietettä, jätevettä, pintavettä, maata tai näiden sekoitusta.

Katso kohtia I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

II.2.4 Pullojen valmistelu

Pannaan epäorgaanista liuosta 2 litran erlenmeyerpulloihin esimerkiksi 800 ml:n annoksina. Riittävä määrä testattavan aineen ja vertailuaineen kantaliuosta lisätään eri pulloihin siten, että saadaan kemikaalipitoisuus, joka vastaa pitoisuutta 10 — 40 ml DOC/l. Tarkistetaan pH ja säädetään se tarvittaessa arvoon 7,4. Pullot siirrostetaan aktiivilietteellä tai muulla siirrosaineella (katso kohtaa I.6.4) siten, että lopullinen pitoisuus on enintään 30 mg suspendoitunutta kuiva-ainetta/l. Valmistetaan myös siirrosaineen vertailunäytteet epäorgaaniseen liuokseen, mutta ilman testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa testattavan kemikaalin mahdolliset inhibitooriset ominaisuudet on tarkistettava siirrostamalla yhteen pulloista epäorgaanista liuosta, jossa on vertailukelpoiset pitoisuudet testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa valmistetaan myös erillinen steriili pullo, jonka avulla tarkistetaan testattavan kemikaalin abioottinen hajoaminen käyttäen kemikaalin liuosta, johon ei ole lisätty siirrosainetta (katso kohtaa I.6.6).

Jos epäillään, että testattava kemikaali adsorboituu merkittävissä määrin esimerkiksi lasiin tai lietteeseen, voidaan tehdä alustava kemikaalin adsorption todennäköisen laajuuden määritys, jonka perusteella voidaan arvioida testimenetelmän soveltuvuutta tälle kemikaalille (katso taulukkoa 1). Alustavaa määritystä varten pulloon lisätään testattavaa ainetta, siirrosainetta ja sterilointiainetta.

Kaikkien pullojen sisältö laimennetaan epäorgaanisella liuoksella yhden litran tilavuuteen. Sekoituksen jälkeen jokaisesta pullosta otetaan näyte alkuperäisen DOC-pitoisuuden määritystä varten (katso liitettä II.4). Pullojen suut peitetään esimerkiksi alumiinifoliolla siten, että ilma pääsee vapaasti vaihtumaan pullon ja ympäristön välillä. Tämän jälkeen pullot pannaan ravistuskoneeseen kokeen aloittamista varten.

II.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili abioottinen vertailunäyte

Pullo 7: Adsorption vertailunäyte

Pullo 8: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

II.2.6 **Testin suorittaminen**

Testin aikana kunkin pullon DOC-pitoisuus määritetään kahdesti tietyin välein. Määritykset on tehtävä riittävän usein, jotta voidaan määrittää 10-päiväisen jakson alku ja prosentuaalinen poistuma tämän jakson lopussa. Määrityksiä varten otetaan pienin mahdollinen määrä testisuspensiota.

Ennen näytteenottoa pulloista haihtunut vesimäärä on kompensoitava lisäämällä pulloihin tarpeellinen määrä laimennusvettä (I.6.1). Pullojen sisältö sekoitetaan huolellisesti varmistaen, että pullojen seinämiin kiinnittynyt aines liukenee tai suspendoituu ennen näytteenottoa. Näytteet kalvosuodatetaan tai sentrifugoidaan heti näytteenoton jälkeen (katso liitettä II.4). Ellei näytteitä analysoida samana päivänä, niitä voidaan säilyttää 2 — 4 °C:ssa enintään 48 tuntia tai alle -18 °C:ssa, jos ne joutuvat odottamaan tätä pitempään.

II.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

II.3.1 **Tulosten käsittely**

Annetun hetken t prosentuaalinen hajoaminen lasketaan kohdan I.7.1 mukaan (DOC-määritys) ja vaihtoehtoisesti kohdan I.7.2 mukaan (spesifinen analyysi).

Tulokset kirjataan jäljempänä kuvattavaan tietolomakkeeseen.

II.3.2 **Tulosten hyväksyttävyys**

Katso kohtaa I.5.2.

II.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

II.4 TIETOLOMAKE

Ohessa on esimerkki tietolomaakkeesta.

DOC DIE-AWAY — KOE

1 **LABORATORIO**

2 **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3 **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

Liuoksen alkupitoisuus, t_0: mg/l kemikaalina

4 **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittely (jos esikäsittely on tehty):

Reaktioseoksen pitoisuus suspendoitunutta kuiva-ainetta: mg/l

5 **HIILIMÄÄRITYKSET**

Hiilianalysaattori:

	Pullon numero		DOC-arvo n päivän jälkeen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testattavaa kemikaalia ja siirrosainetta	1	a_1					
		a_2					
		a:n keskiarvo $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b:n keskiarvo $C_{b(t)}$					
Siirrosaineen taustanäyte ilman testattavaa kemikaalia	3	c_1					
		c_2					
		c:n keskiarvo $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d:n keskiarvo $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6 LÄHDETIETOJEN ARVIOINTI

Pullon numero		Prosentuaalinen hajoaminen n päivän jälkeen				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Keskiarvo(*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Jos D_1- ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

7 ABIOOTTINEN TARKISTUS (valinnainen)

	Aika (päivää)	
	0	t
Steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus (mg/l)	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{Prosentuaalinen abioottinen hajoavuus} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8 SPESIFINEN KEMIALLINEN ANALYYSI (valinnainen)

	Testattavan kemikaalin jäännösmäärä kokeen lopussa (mg/l)	Prosentuaalinen primaarinen hajoaminen
Steriili vertailunäyte	S_b	
Siirrostettu testiliuos	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

OSA III MUUNNELTU OECD-SEULONTAKOE (menetelmä C.4-B)

III.1 MENETELMÄN PERIAATE

Mitattuun tilavuuteen epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa ainetta (10 — 40 mg DOC/l) ainoana nimellisenä hiililähteenä, siirrostetaan 0,5 ml jätevettä liuoslitraa kohti. Seos ilmastetaan heikossa valossa tai pimeässä pitäen yllä lämpötilaa 22 ± 2 °C.

Hajoamista seurataan usein tehtävien DOC-analyysien avulla 28 päivän jakson aikana. Hajoamisaste lasketaan ilmaisemalla poistuneen DOC:n (siirrostetun taustanäytteen arvolla korjattuna) prosenttiosuus alkupitoisuudesta. Primaarisen biohajoamisen aste voidaan laskea myös inkubaation alussa ja lopussa tehtävän kemiallisen analyysin avulla.

III.2 MENETELMÄKUVAUS

III.2.1 **Laite**

a) erlenmeyerpulloja (tilavuudeltaan esimerkiksi 250 ml — 2 l) DOC-analyysin edellyttämän tilavuuden mukaan

b) ravistuskone pulloja varten (koneessa on oltava automaattinen lämpötilan säätö tai sitä on käytettävä lämpötilasäädetyssä huoneessa, ja sen on pystyttävä ylläpitämään aerobisia olosuhteita kaikissa pulloissa)

c) sopivin kalvoin varustettu suodatuslaite

d) DOC-analysaattori

e) liuenneen hapen määrityslaite

f) sentrifugi.

III.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 80 ml:aan laimennusvettä, lisätään b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

Tässä menetelmässä siirrostukseen käytetään vain 0,5 ml jätevettä/l, joten liuosta on eräissä tapauksissa rikastettava hivenaineilla ja kasvutekijöillä. Tämä tehdään lisäämällä liuokseen jokaista lopullista liuoslitraa kohti 1 ml kutakin seuraavaa liuosta:

Hivenaineliuos:	
Mangaanisulfaattitetrahydraatti, $MnSO_4 \times 4H_2O$	39,9 mg
Boorihappoa, H_3BO_3	57,2 mg
Sinkkisulfaattiheptahydraatti, $ZnSO_4 \times 7H_2O$	42,8 mg
Ammoniumheptamolybdaatti $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Rautakelaatti ($FeCl_3$-etyleenidiamiinitetraetikkahappo)	100,0 mg
Liuotetaan laimennusveteen ja laimennetaan 1 000 ml:n tilavuuteen.	
Vitamiiniliuos:	
Hiivauute	15,0 mg

Hiivauute liuotetaan 100 ml:aan vettä. Liuos steriloidaan kalvolla, jonka huokoskoko on 0,2 mikronia, tai käytetään sellaisenaan.

III.2.3 **Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely**

Siirrosaineen lähteenä käytetään pääosin kotitalousjätevesiä puhdistavasta käsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitoksesta saatavaa sekundaarista jätevettä. (Katso kohtia I.6.4.2 ja I.6.5.)

Käytetään 0,5 ml siirrosainetta epäorgaanisen liuoksen litraa kohti.

III.2.4 **Pullojen valmistelu**

Epäorgaanista liuosta pannaan 2 litran erlenmeyerpulloihin esimerkiksi 800 ml:n annoksina. Riittävä määrä testattavan aineen ja vertailuaineen kantaliuosta lisätään eri pulloihin siten, että saadaan kemikaalipitoisuus, joka vastaa pitoisuutta 10 — 40 ml DOC/l. Tarkistetaan pH ja säädetään se tarvittaessa arvoon 7,4. Pullot siirrostetaan 0,5 ml:lla jätevettä pulloissa olevaa liuoslitraa kohti (katso kohtaa I.6.4.2). Valmistetaan myös siirrosaineen vertailunäytteet epäorgaaniseen liuokseen, mutta ilman testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa testattavan kemikaalin mahdollisten inhibitooriset ominaisuudet on tarkistettava siirrostamalla yhteen pulloista epäorgaanista liuosta, jossa on vertailukelpoiset pitoisuudet testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa valmistetaan myös erillinen steriili pullo, jonka avulla tarkistetaan testattavan kemikaalin abioottinen hajoaminen. Tällöin käytetään kemikaalin liuosta, johon ei ole lisätty siirrosainetta (katso kohtaa I.6.6).

Jos epäillään, että testattava kemikaali adsorboituu merkittävissä määrin esimerkiksi lasiin tai lietteeseen, voidaan tehdä alustava kemikaalin adsorption todennäköisen laajuuden määritys, jonka perusteella voidaan arvioida testimenetelmän soveltuvuutta tälle kemikaalille (katso taulukkoa 1). Alustavaa määritystä varten pulloon lisätään testattavaa ainetta, siirrosainetta ja sterilointiainetta.

Kaikkien pullojen sisältö laimennetaan epäorgaanisella liuoksella yhden litran tilavuuteen. Sekoituksen jälkeen jokaisesta pullosta otetaan näyte alkuperäisen DOC-pitoisuuden määritystä varten (katso liitettä II.4). Pullojen suut peitetään esimerkiksi alumiinifoliolla siten, että ilma pääsee vapaasti vaihtumaan pullon ja ympäristön välillä. Tämän jälkeen pullot pannaan ravistuskoneeseen kokeen aloittamista varten.

III.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili abioottinen vertailunäyte

Pullo 7: Adsorption vertailunäyte

Pullo 8: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

III.2.6 **Testin suorittaminen**

Testin aikana kunkin pullon DOC-pitoisuus määritetään kahdesti tietyin välein. Määritykset on tehtävä riittävän usein, jotta voidaan määrittää 10-päiväisen jakson alku ja prosentuaalinen poistuma tämän jakson lopussa. Määrityksiä varten otetaan pienin mahdollinen määrä testisuspensiota.

Ennen näytteenottoa pulloista haihtunut vesimäärä on kompensoitava lisäämällä pulloihin tarpeellinen määrä laimennusvettä (I.6.1). Pullojen sisältö sekoitetaan huolellisesti varmistaen, että pullojen seinämiin kiinnittynyt aines liukenee tai suspendoituu ennen näytteenottoa. Näytteet kalvosuodatetaan tai sentrifugoidaan heti näytteenoton jälkeen (katso liitettä II.4). Ellei näytteitä analysoida samana päivänä, niitä voidaan säilyttää 2 — 4 °C:ssa enintään 48 tuntia tai alle -18 °C:ssa, jos ne joutuvat odottamaan tätä pitempään.

III.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

III.3.1 **Tulosten käsittely**

Annetun ajankohdan t prosentuaalinen hajoaminen lasketaan kohdan I.7.1 mukaan (DOC-määritys) ja vaihtoehtoisesti kohdan I.7.2 mukaan (spesifinen analyysi).

Tulokset kirjataan jäljempänä kuvattavaan tietolomakkeeseen.

III.3.2 **Tulosten hyväksyttävyys**

Katso kohtaa I.5.2.

III.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

III.4 TIETOLOMAKE

Ohessa on esimerkki tietolomakkeesta.

MUUNNELTU OECD-SEULONTAKOE

1 LABORATORIO

2 KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ

3 TESTATTAVA AINE

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

Liuoksen alkupitoisuus, t_0: mg/l kemikaalina

4 SIIRROSAINE

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittely (jos esikäsittely on tehty):

Reaktioseoksen pitoisuus suspendoitunutta kuiva-ainetta: mg/l

5 HIILIMÄÄRITYKSET

Hiilianalysaattori:

	Pullon numero		DOC-arvo n päivän jälkeen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testattavaa kemikaalia ja siirrosainetta	1	a_1					
		a_2					
		a:n keskiarvo $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b:n keskiarvo $C_{b(t)}$					
Siirrosaineen taustanäyte ilman testattavaa kemikaalia	3	c_1					
		c_2					
		c:n keskiarvo $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d:n keskiarvo $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6 LÄHDETIETOJEN ARVIOINTI

Pullon numero		Prosentuaalinen hajoaminen n päivän jälkeen				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Keskiarvo(*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Jos D_1- ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyyvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

7 ABIOOTTINEN TARKISTUS (valinnainen)

	Aika (päivää)	
	0	t
Steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus (mg/l)	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{Prosentuaalinen abioottinen hajoavuus} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8 SPESIFINEN KEMIALLINEN ANALYYSI (valinnainen)

	Testattavan kemikaalin jäännösmäärä kokeen lopussa (mg/l)	Prosentuaalinen primaarinen hajoaminen
Steriili vertailunäyte	S_b	
Siirrostettu testiliuos	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

OSA IV. HIILIDIOKSIDIN MUODOSTUMISKOE (menetelmä C.4-C)

IV.1 MENETELMÄN PERIAATE

Mitattu tilavuus siirrostettua epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa ainetta (10 — 20 mg DOC tai TOC/l) ainoana nimellisenä hiililähteenä, ilmastetaan johtamalla liuoksen läpi hiilidioksiditonta ilmaa, jonka virtausta säädetään. Ilmastus tehdään heikossa valossa tai pimeässä. Hajoamista seurataan 28 päivän ajan määrittämällä muodostuvan hiilidioksidin määrä. Tätä varten hiilidioksidi kerätään barium- tai natriumhydroksidiin, ja hiilidioksidimäärä mitataan titraamalla jäännöshydroksidi tai mittaamalla epäorgaanisen hiilen määrä. Testattavasta kemikaalista muodostetun hiilidioksidin määrä (korjattuna siirrostetun taustanäytteen arvolla) ilmaistaan $ThCO_2$-prosenttiarvona. Biohajoamisaste voidaan laskea myös inkubaation alussa ja lopussa tehtävän DOC-analyysin avulla.

IV.2 MENETELMÄKUVAUS

IV.2.1 Laite

a) pulloja (tilavuudeltaan 2 — 5 litraa), jotka on varustettu lähes pullon pohjaan ulottuvalla ilmastusletkulla ja ulostulolla

b) magneettisia sekoittimia (kun tutkitaan huonosti liukenevia kemikaaleja)

c) kaasuabsorptiopulloja

d) ilmanvirtauksen säätö- ja mittauslaite

e) kaasunpesulaite, jonka avulla saadaan hiilidioksiditonta ilmaa (vaihtoehtoisesti voidaan käyttää painepulloista otetun hiilidioksidittoman hapen ja hiilidioksidittoman typen seosta suhteessa 20 % happea ja 80 % typpeä)

f) hiilidioksidin määrityslaite, jonka toiminta perustuu titraukseen tai epäorgaanisen hiilen analysointiin

g) kalvosuodatin (valinnainen)

h) DOC-analysaattori (valinnainen).

IV.2.2 Epäorgaanisen liuoksen valmistus

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 800 ml:aan laimennusvettä, lisätään b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

IV.2.3 Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely

Siirrosaineen lähteinä voidaan käyttää aktiivilietettä, jätevettä, pintavettä, maata tai näiden sekoitusta.

Katso kohtia I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

IV.2.4 Pullojen valmistelu

Seuraavassa kappaleessa kuvattavat tilavuudet ja painot koskevat 5 l:n pulloja, joissa on 3 l suspensiota. Myös tätä pienempiä tilavuuksia voidaan käyttää arvoja korjaamalla, edellyttäen, että muodostunut hiilidioksidi voidaan mitata riittävän tarkasti.

2 400 ml epäorgaanista liuosta johdetaan 5 l:n pulloihin. Pulloihin lisätään sopiva määrä valmistettua aktiivilietettä (katso kohtia I.6.4 ja I.6.5), niin että lopullisessa 3 l:n liuoksessa on enintään 30 mg suspendoitunutta kuiva-ainetta

litraa kohti. Vaihtoehtoisesti voidaan ensin laimentaa valmistettu liete suspensioksi (500 — 1 000 mg/l epäorgaanista liuosta) ja lisätä tämän jälkeen alikvootti 5 l:n pulloon siten, että lopullinen pitoisuus on 30 mg/l. Vaihtoehtoinen menetelmä on tarkempi. Myös muita siirroslähteitä voidaan käyttää (katso kohtaa I.6.4.2).

Siirrostetuista seoksista poistetaan hiilidioksidi ilmastamalla niitä yön yli hiilidioksidittomalla ilmalla.

Testattavaa ainetta ja vertailuainetta lisätään pulloihin erikseen kantaliuoksen tunnettuna tilavuutena (jokaista pitoisuutta kohti tarvitaan kaksi pulloa), niin että pullojen sisällön DOC- tai TOC-pitoisuus on 10 — 20 mg/l. Muutama pullo tarvitaan siirrosainekontrolleiksi, joten niihin ei lisätä kemikaaleja. Huonosti liukenevat aineet lisätään suoraan pulloihin tunnettuna painona tai tilavuutena (katso liitettä III).

Yhden pullon avulla voidaan tarvittaessa selvittää testattavan kemikaalin inhibitoorisia ominaisuuksia. Tähän pulloon lisätään testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia, niin että niiden pitoisuudet ovat samat kuin muissa pulloissa.

Tarvittaessa selvitetään steriilin pullon ja siirrostamattoman kemikaaliliuoksen avulla, onko testattava kemikaali abioottisesti hajoavaa (katso kohtaa I.6.6). Sterilointi tehdään lisäämällä liuokseen myrkyllistä ainetta sopivana pitoisuutena.

Kaikkien pullojen suspensioiden tilavuus säädetään 3 l:ksi lisäämällä pulloihin epäorgaanista liuosta, joka on ilmastettu hiilidioksidittomalla ilmalla. Vaihtoehtoisesti pulloista voidaan ottaa näytteet DOC-analyysiä (katso liitettä II.4) tai spesifistä analyysiä varten. Kunkin pullon ilmaventtiiliin liitetään absorptiopullo.

Jos käytetään bariumhydroksidia, jokaiseen 5 l:n testipulloon liitetään sarjaan kolme absorptiopulloa, joissa kaikissa on 100 ml 0,0125-molaarista bariumhydroksidia. Liuoksessa ei saa olla saostunutta sulfaattia tai karbonaattia, ja liuoksen väkevyys on määritettävä välittömästi ennen liuoksen käyttöä. Jos käytetään natriumhydroksidia, jokaiseen testipulloon liitetään kaksi loukkua. Toisen loukun avulla tarkistetaan, että kaikki hiilidioksidi on imeytynyt ensimmäiseen loukkuun. Imeytyspulloina käytetään pullotyyppiä, jossa on seerumipullon suljin. Jokaiseen pulloon lisätään 200 ml 0,05-molaarista natriumhydroksidia. Tämä määrä riittää absorboimaan kaiken hiilidioksidin, joka syntyy testattavan kemikaalin hajoamistuotteena. Natriumhydroksidiliuos sisältää aina – myös vastavalmistettuna – pienen määrän karbonaattia, joka kompensoidaan vähentämällä taustanäytteen karbonaatin määrää.

IV.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili abioottinen vertailunäyte

Pullo 7: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

IV.2.6 **Testin suorittaminen**

Testi aloitetaan johtamalla suspensioiden läpi hiilidioksidittomia ilmakuplia virtausnopeudella 30 — 100 ml/minuutti. Hiilidioksidiabsorbentista otetaan säännöllisin välein näytteitä suspensioiden hiilidioksidipitoisuuden analyysiä varten. Ensimmäisen kymmenen päivän jakson näytteenottoväliksi suositellaan kahta tai kolmea päivää. Tämän jälkeen näytteitä otetaan joka viides päivä 28:een päivään asti 10-päiväisen jakson löytämiseksi.

Päivänä 28 otetaan näytteet mahdollista DOC-analyysiä tai spesifistä analyysiä varten, mitataan suspensioiden pH ja lisätään jokaiseen pulloon 1 ml väkevää suolahappoa. Tämän jälkeen hiilidioksidi poistetaan testisuspensioista yön yli jatkuvalla pullojen ilmastuksella. Viimeinen hiilidioksidianalyysi tehdään 29. päivänä.

Hiilidioksidianalyysipäivinä pulloa lähinnä oleva bariumhydroksidi-imeytin irrotetaan pullosta ja hydroksidiliuos titrataan 0,05-molaarisella suolahapolla. Indikaattorina käytetään fenoliftaleiinia. Sarjan jäljellä olevat imeyttimet siirretään lähemmäksi testipulloa, ja sarjan loppuun lisätään uusi, 100 ml tuoretta 0,0125-molaarista bariumhydroksidia sisältävä imeytin. Titrauksia tehdään tarvittaessa (jos esimerkiksi ensimmäiseen loukkuun kertyy paljon sakkaa, titraus on tehtävä ennen kuin sakkaa alkaa kertyä toiseen loukkuun) – kuitenkin vähintään viikoittain. Jos absorbenttina käytetään natriumhydroksidia, ruiskuun imetään pieni määrä natriumhydroksidiliuosta (tarvittava määrä vaihtelee käytettävän hiilianalysaattorin mukaan) lähinnä testipulloa olevasta imeyttimestä. Jos muodostunut hiilidioksidi halutaan analysoida heti, näyte ruiskutetaan hiilianalysaattorin epäorgaaniseen hiileen.

Toisen loukun sisältö analysoidaan vain testin lopussa, jotta hiilidioksidin mahdollisen läpipääsyn aiheuttama virhe voitaisiin korjata.

IV.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

IV.3.1 Tulosten käsittely

Imeyttimeen jäänyt hiilidioksidimäärä lasketaan titrauksen jälkeen seuraavan suureyhtälön avulla:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

jossa

V = imeyttimen 100 ml:n sisällön titraukseen käytetty suolahappo (ml)

C_B = bariumhydroksidiliuoksen väkevyys (M)

C_A = suolahappoliuoksen väkevyys (M).

Jos C_B = 0,0125 M, C_A = 0,05 M ja 100 ml:n puhtaan bariumhydroksidiliuoksen titraustulokseksi saadaan 50 ml, hiilidioksidin paino voidaan laskea seuraavasti:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml titrattu HCl} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

Tässä tapauksessa titraukseen käytetty suolahappotilavuus voidaan muuntaa hiilidioksidin painoksi käyttämällä kerrointa 1,1.

Titrausarvojen avulla lasketaan pelkän siirrosaineen ja siirrosaineen ja testattavan kemikaalin seoksen muodostaman hiilidioksidin painot. Näiden painojen ero vastaa pelkän testattavan kemikaalin muodostaman hiilidioksidin painoa.

Jos esimerkiksi pelkän siirrosaineen titrauksesta saadaan tulokseksi 48 ml ja siirrosaineen sekä testattavan kemikaalin seoksen titrauksesta 45 ml, määrät ovat seuraavat:

Siirrosaineen CO_2 = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg.

Siirrosaineen ja testattavan kemikaalin seoksen CO_2 = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg.

Täten testattavan kemikaalin muodostama CO_2 = 3,3 mg.

Prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan seuraavan suureyhtälön avulla:

$$\text{hajoaminen (\%)} = \frac{\text{muodostunut } CO_2 \text{ (mg)} \times 100}{ThCO_2 \times \text{lisätty määrä testattavaa kemikaalia (mg)}}$$

tai

$$\text{hajoaminen (\%)} = \frac{\text{muodostunut } CO_2 \text{ (mg)} \times 100}{\text{lisätty TOC-määrä} \times 3{,}67}$$

jossa 3,67 on hiili-hiilidioksidimuunnoskerroin.

Minkä tahansa aikavälin jälkeinen prosentuaalinen hajoaminen saadaan kumuloimalla kunkin päivän laskettujen $ThCO_2$-arvojen prosenttiluvut mittaushetkeen asti.

Natriumhydroksidiabsorbenteille muodostetun hiilidioksidin määrä voidaan laskea milligrammoina epäorgaanista hiiltä (IC) kertomalla absorbentin IC-pitoisuus absorbentin tilavuudella.

Prosentuaalinen hajoaminen voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$ThCO_2\text{-}\% = \frac{\text{testipullon mg IC} - \text{vertailunäytten mg IC}}{\text{testattavan kemikaalin mukana lisätty mg TOC}} \times 100$$

DOC-poistumat voidaan haluttaessa laskea kohdan I.7 mukaan. Tulokset kirjataan tietolomakkeelle yhdessä muiden tulosten kanssa.

IV.3.2 **Tulosten hyväksyttävyys**

Testin alussa epäorgaanisessa liuoksessa olevan kemikaalisuspension IC-pitoisuus saa olla enintään 5 % TC-arvosta, ja testin lopussa siirrostuksen taustaliuoksen hiilidioksidin kokonaismuodostus saa yleensä olla enintään 40 mg/l. Jos tulokseksi saadaan 70 mg CO_2/l ylittäviä arvoja, tietoja ja koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti.

Katso myös kohtaa I.5.2.

IV.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

IV.4 TIETOLOMAKE

Ohessa on esimerkki tietolomakkeesta.

HIILIDIOKSIDIN MUODOSTUMISKOE

1 **LABORATORIO**

2 **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3 **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

Liuoksen alkupitoisuus, t_0: mg/l kemikaalina

Pulloon lisätty kokonaismäärä hiiltä (C): mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4 **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittely (jos esikäsittely on tehty):

Reaktioseoksen pitoisuus suspendoitunutta kuiva-ainetta: mg/l

5 HIILIDIOKSIDIN MUODOSTUS JA HAJOAVUUS

Menetelmä: $Ba(OH)_2$/NaOH/muu

Aika (päivä)	Testiliuoksen muodostunut CO_2 (mg)		Taustanäytteen muodostunut CO_2 (mg)		Kumulatiivinen muodostunut CO_2 (testiliuos vähennettynä taustaliuoksen keskiarvolla)		$ThCO_2$ $\frac{\text{kumulatiivinen } CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 2	keskiarvo	3 4	keskiarvo	1	2	1	2	keskiarvo
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

6 **HIILIANALYYSI** (valinnainen)

Hiilianalysaattori:

Aika (päivä)	Taustanäyte mg/l	Testattava kemikaali mg/l
0	$C_{b(0)}$	C_0
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t
(*) tai inkubaation lopussa		

$$\text{DOC-poistuma (\%)} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7 **ABIOOTTINEN HAJOAMINEN** (valinnainen)

$$\text{Abioottinen hajoaminen (\%)} = \frac{\text{Steriilin pullon } CO_2\text{-muodostus 28. päivän jälkeen (mg)}}{ThCO_2\text{ (mg)}} \times 100$$

OSA V MANOMETRINEN RESPIROMETRIAKOE (menetelmä C.4-D)

V.1 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Mitattua tilavuutta siirrostettua epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa kemikaalia (100 mg kemikaalia/l testattavaa ainetta — ThOD-pitoisuus vähintään 50 — 100 mg/l) ainoana nimellisenä orgaanisena hiililähteenä, ravistetaan suljetussa pullossa vakiolämpötilassa (vaihteluväli enintään ± 1 °C) enintään 28 päivän ajan. Hapenkulutus määritetään joko mittaamalla (elektrolyyttisesti muodostettu) happimäärä, joka tarvitaan pitämään respirometripullon kaasun tilavuus vakiona, tai mittaamalla laitteen tilavuuden tai paineen muutos (tai molempien yhdistelmä). Muodostunut hiilidioksidi imeytetään kaliumhydroksidiliuokseen tai muuhun sopivaan absorbenttiin. Testattavan kemikaalin hapenkulutus (korjattuna pelkän siirrosaineen hapenkulutuksella, joka mitataan rinnakkaisen taustanäytteen avulla) ilmaistaan ThOD- tai COD-prosenttiarvona. Haluttaessa voidaan laskea myös primaarinen biohajonta inkubaation alussa ja lopussa tehtävän spesifisen analyysin tuloksien avulla tai määrittää lopullinen biohajonta DOC-analyysin avulla.

V.2 MENETELMÄKUVAUS

V.2.1 Laite

a) tarkoitukseen sopiva respirometri

b) lämpötilan säätöjärjestelmä (enintään ± 1 °C:n vaihteluväli)

c) kalvosuodatin (valinnainen)

d) hiilisuodatin (valinnainen).

V.2.2 Epäorgaanisen liuoksen valmistus

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 800 ml:aan laimennusvettä, lisätään 1 ml b-, c- ja d-liuosta sekä laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

V.2.3 Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely

Siirrosaineen lähteinä voidaan käyttää aktiivilietettä, jätevettä, pintavettä, maata tai näiden sekoitusta.

Katso kohtia I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

V.2.4 Pullojen valmistelu

Valmistetaan erilliset erät testi- ja kontrolliliuosta liuottamalla testattavaa ainetta ja vertailuainetta epäorgaaniseen liuokseen (100 mg kemikaalia/l — vähintään 50 — 100 mg ThOD/l) kantaliuoksia käyttäen.

ThOD-arvo lasketaan käyttäen oletuksena ammoniumsuolojen muodostusta, ellei odotettavissa ole nitrifikaatiota, missä tapauksessa laskelmien on perustuttava nitraattien muodostukseen (katso liitettä II.2).

Määritetään pH-arvot ja säädetään ne tarvittaessa arvoon 7,4 ± 0,2.

Huonosti liukenevat aineet lisätään myöhemmin (katso jäljempänä).

Testattavan kemikaalin myrkyllisyysmäärityksissä epäorgaaniseen liuokseen on valmistettava erillinen liuos, jossa on testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia samoina pitoisuuksina kuin yksittäisissä liuoksissa.

Jos tarvitaan hapen fysikaalis-kemiallisen kulutuksen mittauksia, valmistetaan liuos, jossa on testattavaa kemikaalia pitoisuutena, joka vastaa arvoa 100 mg ThOD/l. Liuos steriloidaan lisäämällä siihen sopivaa myrkyllistä ainetta (katso kohtaa I.6.6).

Lisätään tarvittavat tilavuudet testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia vähintään kahteen pullosarjaan. Tarvittaessa lisätään erillisiin pulloihin pelkkää epäorgaanista liuosta (siirrostarkistusta varten), testattavan kemikaalin ja vertailukemikaalin seosliuosta sekä steriiliä liuosta.

Jos testattava kemikaali on huonosti liukenevaa, se voidaan lisätä tässä vaiheessa tunnettuna painomääränä tai sitä voidaan käsitellä liitteessä III kuvatulla tavalla. Hiilidioksidi-imeyttimiin lisätään kaliumhydroksidia, kalkkisoodapellettejä tai muuta absorbenttia.

V.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili vertailunäyte

Pullo 7: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

V.2.6 **Testin suorittaminen**

Kun pullojen lämpötila on oikea, niihin siirrostetaan valmistettua aktiivilietettä tai muuta siirrosainetta testiohjelman mukaan. Suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus saa olla enintään 30 mg/l. Pullot pannaan ravistuslaitteeseen, joka käynnistetään. Pullojen ilmatiiviyden tarkastuksen jälkeen aloitetaan hapenkulutuksen mittaukset. Ohjelmanmukaisten mittausten lisäksi ei yleensä tarvita muuta valvontaa kuin päivittäisiä lämpötilan ja ravistustoiminnon tarkastuksia.

Hapenkulutus lasketaan säännöllisten ja tiheiden mittausten tulosten perusteella laitevalmistajan ohjeiden mukaan. Inkubaation lopussa (yleensä 28 päivän kuluttua) mitataan pulloissa olevien liuosten pH-arvot, mikä on erityisen tärkeää, jos hapenkulutusarvot ovat pieniä tai suurempia kuin $ThOD_{NH4}$ (typpeä sisältävät yhdisteet).

Tarvittaessa kokeen alussa ja lopussa otetaan respirometripulloista näytteet DOC:n tai spesifisen kemikaalin analyysiä varten (katso liitettä II.4). Kokeen alussa tehtävän näytteenoton yhteydessä on varmistettava, että pulloon jäljelle jäävä testisuspension tilavuus on tunnettu. Kun happea kuluttava yhdiste sisältää typpeä, nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien suureneminen 28 päivän aikana määritetään nitrifikaation vaatima hapenkulutus huomioon ottaen (katso liitettä V).

V.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

V.3.1 **Tulosten käsittely**

Testattavan kemikaalin hapenkulutus (mg) tunnetun ajan kuluessa (korjattuna siirrostetun taustanäytteen hapenkulutuksella) jaetaan testattavan kemikaalin käytetyllä painolla. Tulokseksi saadaan BOD-arvo ilmaistuna hapen painona testattavan kemikaalin painoa kohti:

$$BOD = \frac{\text{testattavan kemikaalin } O_2\text{-kulutus (mg)} - \text{taustanäytten } O_2\text{-kulutus (mg)}}{\text{pullossa olevan testattavan kemikaalin määrä (mg)}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ mg:aa testattavaa kemikaalia kohti}$$

Prosentuaalinen biohajoavuus voidaan laskea näin:

$$\text{Prosentuaalinen biohajoavuus} = \%\ ThOD = \frac{BOD\ (\text{mg } O_2/\text{mg kemikaalia})}{ThOD\ (\text{mg } O_2/\text{mg kemikaalia})} \times 100$$

tai näin:

$$\%\ COD = \frac{BOD\ (\text{mg } O_2/\text{mg kemikaalia})}{COD\ (\text{mg } O_2/\text{mg kemikaalia})} \times 100$$

Huomautus: Molemmat menetelmät eivät välttämättä anna tulokseksi samaa arvoa. Jälkimmäisen menetelmän käyttöä suositellaan.

Kun testattava aine sisältää typpeä, käytetään joko NH_4:n tai NO_3:n perusteella laskettua ThOD-arvoa sen mukaan, mitä nitrifikaation esiintymisen suhteen on odotettavissa (katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

Jos tehdään myös orgaanisen hiilen tai spesifisen kemikaalin määritykset, prosentuaalinen hajoaminen lasketaan kohdassa I.7 kuvatun menetelmän mukaan.

Tulokset kirjataan oheisiin tietolomakkeisiin.

V.3.2 **Tulosten hyväksyminen**

Siirrostuksen taustanäytteen hapenkulutus on yleensä 20 — 30 mg O_2/l. Arvo saa olla 28 päivän kuluessa enintään 60 mg/l. Jos arvo on tätä suurempi, tietoja ja koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti. Jos pH-arvo on alueen 6 — 8,5 ulkopuolella ja testattavan kemikaalin hapenkulutus on alle 60 %, testattavan kemikaalin pitoisuutta on pienennettävä ja testi on toistettava.

Katso myös kohtaa I.5.2.

V.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

V.4 TIETOLOMAKE

Jäljempänä on esimerkki tietolomakkeesta.

MANOMETRINEN RESPIROMETRIAKOE

1 **LABORATORIO**

2 **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l

Liuoksen alkupitoisuus, C_0: mg/l

Testipullon tilavuus (V): ml

ThOD tai COD: mg O_2 / mg testattavaa ainetta (NH_4, NO_3)

4 **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittelyt:

Seoksen suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus: mg/l

5 HAPENKULUTUS: BIOHAJOAVUUS

		Aika (päivää)											
		0		7		14			21			28	
O_2-kulutus (mg), testattava kemikaali	1												
	2												
	a, keskiarvo												
O_2-kulutus (mg), taustanäyte	3												
	4												
	b, keskiarvo												
Korjattu BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD mg:aa testattavaa kemikaalia kohti	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												
Hajoaminen (%) $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Keskiarvo(*)												
V = testipullon sisällön tilavuus													

(*) Jos D_1- ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

6 NITRIFIKAATIOKORJAUS (katso liitettä V)

Päivä	0	28	Erotus
(i) Nitraattipitoisuus (mg N/litra)			(N)
(ii) Happiekvivalentti (4,57 × N × V (mg)	—	—	
(iii) Nitriittipitoisuus (mg N/litra)			(N)
(iv) Happiekvivalentti (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv) Kokonaishappiekvivalentti	—	—	

7 HIILIANALYYSI (valinnainen)

Hiilianalysaattori:

Aika (päivä)	Taustanäyte (mg/l)	Testattava kemikaali (mg/l)
0	(C_{blo})	(C_o)
28(*)	(C_{blt})	(C_t)
(*) tai inkubaation lopussa		

$$\text{Prosentuaalinen DOC-poistuma} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8 **SPESIFINEN KEMIKAALI** (valinnainen)

S_b = fysikaalis-kemiallisen (steriilin) vertailunäytteen pitoisuus 28 päivän kuluttua

S_a = siirrostettujen pullojen pitoisuus 28 päivän kuluttua

$$\text{Prosentuaalinen biohajoavuus} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9 **ABIOOTTINEN HAJOAVUUS** (valinnainen)

a = steriilien pullojen hapenkulutus (mg) 28 päivän kuluttua

$$\text{hapenkullutus mg:aa testattavaa kemikaalia kohti } 0 = \frac{a}{C_o V}$$

(Katso jaksoja 1 ja 3.)

$$\text{Prosentuaalinen abioottinen hajoavuus} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

OSA VI SULJETUN PULLON MENETELMÄ (menetelmä C.4-E)

VI.1 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattavan kemikaalin ja epäorgaanisen liuoksen seokseen (2 — 5 mg kemikaalia/l) siirrostetaan suhteellisen pieni määrä sekapopulaatiosta otettuja mikroeliöitä. Näin saatua seosta pidetään täysissä, suljetuissa pulloissa pimeässä ja vakiolämpötilassa. Hajoamista seurataan analysoimalla liuennutta happea 28 päivän ajan. Testattavan kemikaalin hapenkulutus vähennettynä siirrostetun taustanäytteen hapenkulutuksella ilmaistaan ThOD- tai COD-prosenttilukuna.

VI.2 MENETELMÄKUVAUS

VI.2.1 Laite

a) Lasitulpalla varustettuja BOD-pulloja (vetoisuudeltaan esimerkiksi 250 — 300 ml)

b) Vesihaude tai inkubaattori, jossa pulloja voidaan pitää vakiolämpötilassa (vaihteluväli enintään ± 1 °C) ja pimeässä

c) Suuria lasipulloja (2 — 5 l) epäorgaanisen liuoksen valmistusta ja BOD-pullojen täyttöä varten

d) Happielektrodi ja happimittari tai Winkler-titrauksen edellyttämät varusteet ja reagenssit.

VI.2.2 Epäorgaanisen liuoksen valmistus

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

Sekoitetaan a-, b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

VI.2.3 **Siirrosaineen valmistelu**

Siirrosaine saadaan yleensä pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän laitoksen tai laboratoriolaitoksen sekundaarisesta jätevedestä. Myös pintavettä voidaan käyttää. Yleensä käytetään 0,05 — 5 ml suodosta epäorgaanisen liuoksen litraa kohti. Tarvittaessa määrätystä päästövedestä saadun siirrosaineen optimaalinen testitilavuus on määritettävä kokeellisesti (katso kohtia I.6.4.2 ja I.6.5).

VI.2.4 **Pullojen valmistelu**

Epäorgaanista liuosta ilmastetaan voimakkaasti 20 minuutin ajan. Jokaiseen testisarjaan on käytettävä samasta erästä otettua epäorgaanista liuosta. Epäorgaaninen liuos on yleensä käyttövalmis, kun sitä on pidetty testilämpötilassa 20 tunnin ajan. Tarkistuksena määritetään liuenneen hapen pitoisuus, jonka arvo saa olla enintään 9 mg/l liuoksen lämpötilan ollessa 20 °C. Ilmalla kyllästetyn liuoksen kaikki siirrot ja täytöt on tehtävä kuplia välttäen, esimerkiksi sifonien avulla.

Valmistellaan rinnakkaiset ryhmät BOD-pulloja, joiden avulla voidaan toteuttaa rinnakkaisia koesarjoja testattavan kemikaalin ja vertailukemikaalin määritystä varten. BOD-pulloja on valmisteltava sellainen määrä (siirrosaineen taustanäytepullot mukaan lukien), että voidaan tehdä vähintään kaksinkertaiset hapenkulutuksen mittaukset halutuin välein (esimerkiksi 0, 7, 14, 21, ja 28 päivän kuluttua). Joissakin tapauksissa suurempi määrä pulloja on tarpeen 10-päiväisen jakson löytämiseksi.

Ilmalla kyllästettyä epäorgaanista liuosta kaadetaan suuriin pulloihin. Pullot täytetään kolmannekseen asti. Sitten eri pulloihin lisätään riittävä määrä testattavan kemikaalin ja vertailukemikaalin kantaliuosta, niin että kemikaalien lopullinen pitoisuus on enintään 10 mg/l. Erillisessä suuressa pullossa olevaan taustanäytteeseen ei lisätä kemikaaleja.

Siirrosaineen aktiviteetin varmistamiseksi BOD-pullojen liuenneen hapen pitoisuutta ei saa päästää alle arvon 0,5 mg/l, mikä rajoittaa testattavan kemikaalin pitoisuuden arvoon 2 mg/l. Jos yhdiste on huonosti liukenevaa tai jos sillä on pieni ThOD-arvo, voidaan käyttää pitoisuutta 5 — 10 mg/l. Joissakin tapauksissa on suositeltavaa ajaa rinnakkaisia testisarjoja kahta eri pitoisuutta (esimerkiksi arvoja 2 mg/l ja 5 mg/l) käyttäen. ThOD-arvo lasketaan yleensä ensisijaisesti ammoniumsuolojen muodostuksesta, ellei odotettavissa ole nitrifikaatiota, missä tapauksessa laskelmien on perustuttava nitraattien muodostukseen ($ThOD_{NO3}$, katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

Jos on tarpeen määrittää testattavan kemikaalin myrkyllisyys (jos esimerkiksi aiempien kokeiden tuloksena on saatu pieni biohajoavuusarvo), myrkyllisyysmääritystä varten on valmisteltava erillinen pullosarja.

Erilliseen suureen pulloon lisätään ilmastettua epäorgaanista liuosta (suunnilleen kolmannes pullon tilavuudesta), testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia, niin että lopulliset pitoisuudet ovat samat kuin muissa suurissa pulloissa.

Suurissa pulloissa olevat liuokset siirrostetaan sekundaarisella jätevedellä (0,5 — 5 ml/l) tai muulla siirrosaineella (esimerkiksi jokivedellä, katso kohtaa I.6.4.2). Lopuksi pullojen sisältö laimennetaan epäorgaanisella liuoksella täyteen tilavuuteen. Riittävä sekoittuminen varmistetaan käyttämällä pullon pohjaan asti ulottuvaa letkua.

VI.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Tyyppillisessä ajossa käytetään seuraavia pulloja:

— vähintään 10:tä pulloa, joissa on testattavaa kemikaalia ja siirrosainetta (testisuspensio)

— vähintään 10:tä pulloa, jossa on pelkkää siirrosainetta (siirrosaineen taustanäyte)

— vähintään 10:tä pulloa, jossa on vertailukemikaalia ja siirrosainetta (menetelmän tarkistusnäyte).

Tarvittaessa käytetään lisäksi 6:ta pulloa, joissa on testattavaa kemikaalia, vertailukemikaalia ja siirrosainetta (myrkyllisyystarkistus). 10-päiväisen jakson löytämisen varmistamiseksi tarvitaan kuitenkin kaksinkertainen pullomäärä.

VI.2.6 **Testin suorittaminen**

Kutakin valmisteltua liuosta annostellaan heti vastaaviin BOD-pulloryhmiin letkulla, joka ulottuu suuren pullon alimpaan neljännekseen (ei pohjaan). BOD-pullot täytetään kokonaan. Ilmakuplat poistetaan koputtamalla pulloja kevyesti. Nollahetkipullojen liuenneen hapen määritys tehdään heti Winkler- tai elektrodimenetelmällä. Pullojen sisältö voidaan säästää myöhemmin tehtävää Winkler-analyysia varten lisäämällä pulloihin mangaani(II)sulfaattia ja natriumhydroksidia (ensimmäistä Winkler-reagenssia). Huolella suljettuja pulloja, joissa happi on sidottuna ruskeaan mangaani(III)oksidihydraattiin, säilytetään pimeässä 10 — 20 °C:ssa enintään 24 tuntia ennen Winkler-menetelmän seuraavien vaiheiden aloittamista. Loput rinnakkaispullot suljetaan varmistaen, ettei pulloihin jää ilmakuplia, minkä jälkeen pulloja inkuboidaan pimeässä 20 °C:ssa. Jokaista pullosarjaa kohti on käytettävä kattavaa rinnakkaissarjaa, joka sisältää siirrostettua taustanäytettä. Jokaisesta sarjasta on poimittava koko 28 päivän inkubaatiojakson ajan säännöllisin välein (vähintään kerran viikossa) vähintään kaksi pulloa liuenneen hapen analyysiä varten.

Viikoittaisten näytteiden avulla pitäisi voida arvioida prosentuaalinen poistuma 14-päiväisen jakson aikana, ja 3 — 4 päivän välein tapahtuvan näytteenoton avulla pitäisi voida määrittää 10-päiväinen jakso, mikä edellyttää noin kaksinkertaisen pullomäärän käyttöä.

Jos testattava aine sisältää typpeä, nitrifikaation aiheuttama hapenkulutus on otettava huomioon. Korjaus tehdään määrittämällä ensin liuenneen hapen pitoisuus O_2-elektrodilla, minkä jälkeen BOD-pullosta otetaan näyte nitriitti- ja nitraattianalyysia varten. Hapenkulutus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuden kasvun perusteella (katso liitettä V).

VI.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

V.3.1 **Tulosten käsittely**

Ensin lasketaan kunkin jakson jälkeinen BOD-arvo vähentämällä siirrosaineen taustanäytteen hapenpoistuma (mg O_2/l) testattavan aineen hapenpoistumasta. Näin korjattu poistuma jaetaan testattavan kemikaalin pitoisuudella (mg/l), jolloin saadaan spesifinen BOD-arvo ilmaistuna hapen painona (mg) testattavan kemikaalin painoa (mg) kohti. Prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan jakamalla spesifinen BOD-arvo spesifisellä liitteen II.2 mukaan lasketulla ThOD-arvolla tai liitteessä II.3 esitettävän analyysin avulla määritetyllä COD-arvolla seuraavasti:

$$\text{BOD} = \frac{\text{testattavan kemikaalin } O_2\text{-kulutus (mg)} - \text{taustanäytteen } O_2\text{-kulutus (mg)}}{\text{pullossa olevan testattavan kemikaalin määrä (mg)}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ mg:aa testattavaa kemikaalia kohti}$$

$$\text{Prosentuaalinen hajoavuus} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg kemikaalia)}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg kemikaalia)}} \times 100$$

tai

$$\text{Prosentuaalinen hajoavuus} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg kemikaalia)}}{\text{COD (mg } O_2\text{/mg kemikaalia)}} \times 100$$

On otettava huomioon, että molemmat menetelmät eivät välttämättä anna tulokseksi samaa arvoa. Ensin mainitun menetelmän käyttöä suositellaan.

Jos testattava aine sisältää typpeä, on käytettävä NH_4:n tai NO_3:n perusteella laskettua ThOD-arvoa sen mukaan, mitä nitrifikaation suhteen on odotettavissa (katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

VI.3.2 **Tulosten hyväksyminen**

Kun 28 päivää on kulunut, siirrostuksen taustanäytteen hapenpoistuma ei saa ylittää arvoa 1,5 mg liuennutta happea litraa kohti. Jos arvo on suurempi, koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti. Testipullojen hapen

jäännöspitoisuus ei saa missään vaiheessa alittaa arvoa 0,5 mg/l. Näin pienet happipitoisuudet ovat hyväksyttäviä vain siinä tapauksessa, että liuenneen hapen määritysmenetelmä on riittävän tarkka mittaamaan tällaisia pitoisuuksia.

Katso myös kohtaa I.5.2.

VI.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

VI.4 TIETOLOMAKE

Jäljempänä on esimerkki tietolomakkeesta.

SULJETUN PULLON MENETELMÄ

1 **LABORATORIO**

2 **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3 **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l

Liuoksen alkupitoisuus: mg/l

ThOD tai COD: mg O_2 / mg testattavaa ainetta

4 **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittelyt:

Pitoisuus testiseoksessa: mg/l

5 **DO-MÄÄRITYS**

Menetelmä: Winkler/elektrodi

Pulloanalyysit

Inkubaatioaika (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Taustanäyte (ilman kemikaalia)	1	C_1				
	2	C_2				
Keskiarvo	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testattava kemikaali	1	a_1				
	2	a_2				
Keskiarvo	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

6 NITRIFIKAATIOKORJAUS (katso liitettä V)

Inkubaatioaika (d)	0	n_1	n_2	n_3
(i) Nitraattipitoisuus (mg N/l)				
(ii) Nitraattipitoisuuden muutos (mg N/l)	—			
(iii) Happiekvivalentti (mg/l)	—			
(iv) Nitriittipitoisuus (mg N/l)				
(v) Nitriittipitoisuuden muutos (mg N/l)	—			
(vi) Happiekvivalentti (mg/l)	—			
(iii + vi) Kokonaishappiekvivalentti (mg/l)	—			

7 DO-VÄHENNYS: PROSENTUAALINEN HAJOAMINEN

	Vähennys päivän n jälkeen (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
PULLO 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
PULLO 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
PULLO 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{testipitoisuus} \times \text{kemikaalin ThOD}}$				
PULLO 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{testipitoisuus} \times \text{kemikaalin ThOD}}$				
$\%\ D \text{ keskiarvo}(*) = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Jos D_1- ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää

m_{to} = testipullon arvo hetkellä 0

m_{tx} = testipullon arvo hetkellä x

m_{bo} = taustanäytteen keskiarvo hetkellä 0

m_{bx} = taustanäytteen keskiarvo hetkellä x

Käytetään myös osan 6, kohtien iii ja vi mukaista nitrifikaatiokorjausta.

8 TAUSTANÄYTTEEN DO-VÄHENNYKSET

Taustanäytteen hapenkulutus on (m_{bo} — m_{b28}) mg/l. Taustanäytteen hapenkulutus on tärkeä tekijä kokeen hyväksyttävyyden kannalta. Hapenkulutus ei saa ylittää arvoa 1,5 mg/l.

OSA VII MITI-KOE (menetelmä C.4-F)

VII.1 MENETELMÄN PERIAATE

Testattavaa kemikaalia lisätään epäorgaaniseen liuokseen, jota siirrostetaan erikoisviljelmästä otetuilla, adaptoimattomilla mikroeliöillä. Liuosta tai suspensiota hämmennetään ja sen hapenkulutusta mitataan automaattisella laitteella 28 päivän ajan pimennetyssä ja suljetussa respirometrissä lämpötilassa 25 ± 1 °C. Muodostunut hiilidioksidi imeytetään kalkkisoodaan. Biohajoavuus ilmaistaan prosentuaalisena hapenkulutuksena (taustanäytteen kulutuksella korjattuna) teoreettisesta hapenkulutuksesta (ThOD). Prosentuaalinen primaarinen biohajoavuus lasketaan spesifisen, inkubaation alussa ja lopussa tehtävän kemiallisen analyysin perusteella. Lisäksi voidaan tehdä DOC-analyysi.

VII.2 MENETELMÄKUVAUS

VII.2.1 Laite

a) Automaattinen elektrolyyttinen BOD-mittari tai respirometri, jossa on 6 kpl 300 ml:n pulloja ja kupit CO_2-absorbenttia varten

b) Huone, jossa on vakiolämpötila, tai vesihaude, jonka lämpötila voidaan pitää arvossa 25 °C (suurin sallittu vaihteluväli ± 1 °C)

c) Kalvosuodatinlaite (valinnainen)

d) Hiilianalysaattori (valinnainen)

VII.2.2 Epäorgaanisen liuoksen valmistus

Valmistetaan seuraavat kantaliuokset käyttäen analyyttisen puhtaita reagensseja ja vettä (I.6.1):

a) Monokaliumdivetyortofosfaattia, KH_2PO_4 8,50 g

Dikaliummonovetyortofosfaattia, K_2HPO_4 21,75 g

Dinatriummonovetyortofosfaattidodekahydraattia, $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ 44,60 g

Ammoniumkloridia, NH_4Cl 1,70 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.

Liuoksen pH-arvon on oltava 7,2.

b) Magnesiumsulfaattiheptahydraattia, $MgSO_4 . 7 H_2O$ 22,50 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.

c) Kalsiumkloridia, $CaCl_2$ 27,50 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.

d) Rauta(III)kloridiheksahydraattia, $FeCl_3 \times 6H_2O$ 0,25 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.

VII.2.3 Siirrosaineen valmistelu

Kerätään tuoreita näytteitä vähintään kymmenestä paikasta, pääosin alueilta, joilla käytetään ja päästetään useita eri kemikaaleja. Kerätään esimerkiksi kuntien ja teollisuuslaitosten jätevesilaitoksista, joista, järvistä ja muista sopivista paikoista 1 l:n näytteitä (esimerkiksi lietettä, pintamaata ja vettä), jotka sekoitetaan huolellisesti. Kelluva aines poistetaan. Kun seos on laskeutunut, pintalietteen pH säädetään natriumhydroksidilla tai fosforihapolla arvoon 7 ± 1.

Sopiva tilavuus suodatettua pintalietettä lisätään aktiivilieteastiaan ja nestettä ilmastetaan noin 23,5 tunnin ajan. Kolmekymmentä minuuttia ilmastuksen päättymisen jälkeen suunnilleen kolmasosa pintalietteestä kaadetaan pois ja laskeutuneeseen aineeseen lisätään poiskaadettua liuosta vastaava määrä liuosta, jonka pH-arvo on 7 ja joka sisältää 0,1 % glukoosia, 0,1 % peptonia ja 0,1 % monokaliumortofosfaattia. Tämän jälkeen ilmastus käynnistetään uudelleen. Menettely toistetaan kerran päivässä. Lietejärjestelmän käytössä on noudatettava huolellisuutta: päästövesien on oltava kirkkaita, lämpötila on pidettävä arvossa 25 ± 2 °C, pH-arvon on oltava 7 ± 1, lietteen on laskeuduttava hyvin, ilmastuksen on oltava riittävää liuoksen jatkuvan aerobisuuden varmistamiseksi, lietteessä on oltava yksisoluisia eliöitä ja lietteen aktiivisuutta on testattava vertailuaineeseen verrattuna vähintään joka kolmas kuukausi. Lietettä ei saa käyttää siirrosaineena, ennen kuin se on ollut järjestelmässä vähintään kuukauden. Neljä kuukautta vanhempaa lietettä ei saa käyttää. Tämän jälkeen näytteitä on otettava vähintään 10:stä paikasta säännöllisin väliajoin (kerran kolmessa kuukaudessa).

Jotta tuoreen ja vanhan lietteen aktiivisuus voitaisiin pitää samalla tasolla, käytössä olevan aktiivilietteen suodatettua pintalietettä sekoitetaan samaan tilavuuteen vastavalmistettua sekoitetta, jonka osat ovat peräisin 10:stä eri paikasta. Tämän jälkeen seosta viljellään edellä kuvatulla tavalla. Lietettä otetaan siirrosaineeksi 18 — 24 tuntia yksikön syötön jälkeen.

VII.2.4 **Pullojen valmistelu**

Valmistellaan seuraavat kuusi pulloa:

Pullo 1: testattavaa kemikaalia laimennusvedessä (100 mg/l)

Pullot 2, 3 ja 4: testattavaa kemikaalia epäorgaanisessa liuoksessa (100 mg/l)

Pullo 5: vertailukemikaalia (esimerkiksi aniliinia) epäorgaanisessa liuoksessa (100 mg/l)

Pullo 6: pelkkää epäorgaanista liuosta.

Huonosti liukenevia testattavia kemikaaleja lisätään suoraan painon tai tilavuuden mukaan, tai niitä käsitellään liitteessä II kuvattavalla tavalla (liuottimia tai emulgaattoreita ei kuitenkaan saa käyttää). Imeytinkuppeihin lisätään CO_2-absorbenttia. Pullojen 2, 3 ja 4 pH säädetään arvoon 7,0.

VII.2.5 **Testin suorittaminen**

Pulloihin 2, 3 ja 4 (testisuspensiot), 5 (aktiviteettikontrolli) ja 6 (siirrostuksen taustanäyte) lisätään pieni tilavuus siirrosainetta, niin että suspendoituneen kuiva-aineen lopullinen pitoisuus on 30 mg/l. Pulloon 1 ei lisätä siirrosainetta. Pullot asetetaan sekoituslaitteeseen, pullojen ilmatiiviys tarkistetaan, sekoittimet käynnistetään ja hapenkulutuksen mittaus aloitetaan pimeässä. Lämpötila, sekoituslaite ja hapenkulutuksen kulometrinen rekisteröintilaite on tarkistettava päivittäin. Pullojen sisällön mahdolliset värimuutokset on merkittävä muistiin. Kuuden pullon hapenkulutus luetaan suoraan esimerkiksi BOD-käyriä tuottavasta kuusikärkisestä piirturista. Kun inkubaatio on päättynyt (yleensä 28 päivän kuluttua), pullojen sisällön pH-arvot mitataan. Sitten määritetään jäljelle jääneen testattavan kemikaalin ja mahdollisen välituotteen pitoisuus sekä (jos kyseessä on vesiliukoinen aine) DOC-pitoisuus (katso liitettä II.4). Haihtuvien kemikaalien kohdalla on noudatettava erityistä huolellisuutta. Jos nitrifikaatiota on odotettavissa, nitriitti- ja nitraattipitoisuus määritetään mahdollisuuksien mukaan.

VII.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

VII.3.1 **Tulosten käsittely**

Testattavan kemikaalin hapenkulutus (mg) määrätyn ajan kuluttua, korjattuna siirrostuksen taustanäytteen kulutuksella, jaetaan testattavan kemikaalin painolla. Tuloksena saadaan BOD-arvo ilmaistu hapen painona kemikaalin painoa kohti (mg/mg), seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$BOD = \frac{\text{testattavan kemikaalin } O_2\text{-kulutus (mg)} - \text{taustanäytteen } O_2\text{-kulutus (mg)}}{\text{testattavan kemikaalin paino (mg)}}$$

$$= \text{mg } O_2/\text{mg testattavaa kemikaalia}$$

Prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$\text{Prosentuaalinen biohajoavuus} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg kemikaalia)}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg kemikaalia)}} \times 100$$

Seosten osalta ThOD lasketaan yksinkertaisten yhdisteiden tapaan alkuaineanalyysin perusteella. Käytettävä ThOD-arvo ($ThOD_{NH4}$ tai $ThOD_{NO3}$) valitaan sen mukaan, esiintyykö nitrifikaatiota vai ei (katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

Prosentuaalinen primaarinen biohajoavuus lasketaan spesifisen lähtökemikaalin poistuman perusteella (katso osaa I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Jos pullossa 1 on on havaittu testattavan kemikaalin häviötä fysikaalis-kemiallisen poistuman mittauksen yhteydessä, häviö on raportoitava. Tällöin prosentuaalisen biohajoavuuden laskennassa käytetään pullon 1 testattavan kemikaalin pitoisuutta (S_b) 28 päivän kuluttua.

Jos DOC-määrityksiä (valinnainen toimi) tehdään, lopullinen prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan (katso kohtaa I.7.1):

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

Jos pullossa 1 on havaittu DOC-häviötä fysikaalis-kemiallisen poistuman mittauksen yhteydessä, prosentuaalisen biohajoavuuden laskennassa käytetään tämän pullon DOC-pitoisuutta.

Tulokset kirjataan oheisiin tietolomakkeisiin.

VII.3.2 **Tulosten hyväksyminen**

Siirrostuksen taustanäytteen hapenkulutus on yleensä 20 — 30 mg O_2/l. Arvo saa olla 28 päivän kuluessa enintään 60 mg/l. Jos arvo on tätä suurempi, tietoja ja koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti. Jos pH-arvo on alueen 6 — 8,5 ulkopuolella ja testattavan kemikaalin hapenkulutus on alle 60 %, testattavan kemikaalin pitoisuutta on pienennettävä ja testi on toistettava.

Katso myös kohtaa I.5.2.

Jos aniliinin hapenkulutuksen perusteella laskettu prosentuaalinen hajoaminen ei ylitä 7 päivän kuluessa arvoa 40 % ja 14 päivän kuluessa arvoa 65 %, koe hylätään.

VII.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

VII.4 TIETOLOMAKE

Jäljempänä on esimerkki tietolomakkeesta.

MITI (I) -KOE

1 **LABORATORIO**

2 **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3 TESTATTAVA AINE

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

Liuoksen alkupitoisuus, C_0: mg/l kemikaalina

Seoksen tilavuus, V: ml

ThOD: mg O_2/l

4 SIIRROSAINE

Lietteen näytteenottopaikat:

1) ... 6) ...
2) ... 7) ...
3) ... 8) ...
4) ... 9) ...
5) ... 10) ...

Aktiivilietteen suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus, kun aktiivilietettä on akklimatisoitu synteettisellä jätevedellä = ... mg/l

Aktiivilietteen tilavuus lopullisen seoksen tilavuutta (litraa) kohti: = ... ml

Lietteen pitoisuus lopullisessa seoksessa = ... mg/l

5 HAPENKULUTUS: BIOHAJOAVUUS

Käytetyn respirometrin tyyppi:

			Aika (päivää)				
			0	7	14	21	28
O_2-kulutus (mg), testattava kemikaali	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2-kulutus (mg), taustanäyte	b						
Korjattu O_2-kulutus (mg)	(a_1-b) (a_2-b) (a_3-b)						
BOD testattavan kemikaalin painoa (mg) kohti	$\frac{(a-b)}{C_oV}$	Pullo 1					
		Pullo 2					
		Pullo 3					
Prosentuaalinen hajoavuus $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		keskiarvo *					

Huomautus: Vertailukemikaalien osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

* Jos toistoarvojen ero on suuri, toistoarvojen keskiarvoa ei pidä käyttää

6 **HIILIANALYYSI** (valinnainen)

Hiilianalysaattori:

Pullo	DOC				DOC-poistuma (%)	Keskiarvo
	Mitattu arvo		Korjattu arvo			
Vesi + testattava aine	a				—	—
Liete + testattava aine	b1		b1-c			
Liete + testattava aine	b2		b2-c			
Liete + testattava aine	b3		b3-c			
Taustanäyte	c		—		—	—

$$\text{Prosentuaalinen DOC-poistuma } \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7 **SPESIFISEN KEMIKAALIN ANALYYTTISET TIEDOT**

	Testattavan kemikaalin jäännösmäärä kokeen lopussa	Prosentuaalinen hajoaminen
Veteen sekoitettu taustanäyte	Sb	
Siirrostettu näyte	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\text{Prosentuaalinen hajoaminen} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Pullojen a1, a2 ja a3 prosentuaalinen hajoaminen lasketaan vastaavalla tavalla.

8 **HUOMAUTUKSET**

Jos käytettävissä on käyrä, johon on piirretty BOD-arvot ajan funktiona, se on liitettävä raporttiin.

LIITE I

LYHENTEITÄ JA MÄÄRITELMIÄ

DO: "Dissolved oxygen" (mg/l) – Vesinäytteeseen liuenneen hapen pitoisuus.

BOD: "Biochemical oxygen demand" (g) – Happimäärä, jonka pieneliöt kuluttavat testattavan yhdisteen metaboloinnin yhteydessä. BOD ilmaistaan myös hapenkulutuksena (g) testattavan aineen painoa (g) kohti (katso menetelmää C.5).

COD: "Chemical oxygen demand" (g) – Hapenkulutus, kun testattavaa yhdistettä hapetetaan kuumalla, happamalla dikromaatilla. Suure, joka ilmaisee hapetuskelpoisen aineksen määrän yhdisteessä. COD ilmaistaan myös hapenkulutuksena (g) testattavan aineen massaa (g) kohti (katso menetelmää C.6).

DOC: "Dissolved organic carbon" – Liuoksessa oleva orgaaninen hiili tai orgaaninen hiili, joka läpäisee 0,45 µm:n suodattimen tai jää pinnalle, kun liuosta on sentrifugoitu nopeudella 40 000 m. s^{-2} (± 4 000 g) 15 minuutin ajan.

ThOD: "Theoretical oxygen demand" (mg) – Happimäärä, joka tarvitaan kemikaalin täydelliseen hapettamiseen. Lasketaan molekyylikaavan avulla (katso liitettä II.2). ThOD ilmaistaan hapenkulutuksena (mg) testattavan aineen massaa kohti (mg).

$ThCO_2$: "Theoretical carbon dioxide" (mg) – Hiilidioksidimäärä, joka lasketaan saatavan testattavan aineen tunnetusta tai mitatusta, epäorgaaniseen muotoon muunnetusta hiilestä. $ThCO_2$ ilmaistaan myös muodostuneen hiilidioksidin painona (mg) testattavan aineen massaa (mg) kohti.

TOC: "Total organic carbon" – Näytteen orgaanisen hiilen summa liuoksesta ja supensiosta mitattuna.

IC: "Inorganic carbon" – Epäorgaaninen hiili.

TC: "Total carbon" – Näytteen orgaanisen ja epäorgaanisen hiilen summa.

Primaarinen biohajoaminen

Biologisen aktiviteetin aiheuttama aineen kemiallisen rakenteen muuttuminen, jonka seurauksena aine menettää spesifisen ominaisuutensa.

Lopullinen (aerobinen) biohajoaminen

Hajoamisen taso, joka saavutetaan, kun eliöt ovat hyödyntäneet testattavan aineen täysin. Tämän prosessin tuloksena syntyy hiilidioksidia, vettä, epäorgaanisia suoloja ja uutta mikrobista solukkoa (biomassaa).

Helposti biohajoava

Tietyt lopullisen biohajoamisen seulontatestit läpäisseiden kemikaalien yleisluokitus. Kyseiset testit ovat niin tiukkoja, että tällaisten aineiden voidaan katsoa olevan nopeasti ja täydellisesti biohajoavia vedessä ja aerobisissa olosuhteissa.

Itsestään biohajoava

Kemikaali, jonka tiedetään varmojen todisteiden perusteella olevan primaarisesti tai lopullisesti biohajoava kaikissa tunnetuissa biohajoavuustesteissä.

Käsiteltävyys

Yhdisteiden poistettavuus jätevedestä sen biologisen käsittelyn yhteydessä ilman käsittelyprosessien normaalille toiminnalle koituvia häiriöitä. Helposti biohajoavat yhdisteet ovat yleensä käsiteltäviä, mutta kaikki itsestään biohajoavat yhdisteet eivät. Myös abioottisia prosesseja tapahtuu.

Latenssiaika

Aika, joka kuluu vaimennuskokeessa/die-away — kokeessa siirroshetkestä vähintään 10 %:n hajoamistason saavuttamiseen. Latenssiaika on usein erittäin vaihteleva, ja sen toistettavuus on huono.

Hajoamisaika

Hajoamisaika on latenssiajan päättymistä seuraava, 90 %:n hajoamistason saavuttamiseen kuluva ajanjakso.

10-päiväinen jakso

10 %:n hajoamistason saavuttamista seuraavat 10 päivää.

LIITE II

SOPIVIEN YHTEENVETOPARAMETRIEN LASKENTA JA MÄÄRITYS

Joissakin menetelmissä tarvitaan määrättyjä yhteenvetoparametreja. Näiden arvojen laskeminen kuvataan jäljempänä. Parametrien käyttö kuvataan yksittäisten menetelmien yhteydessä.

1 **Hiilimäärä**

Hiilimäärä lasketaan tunnetusta alkuainekokoonpanosta tai määritetään testattavan aineen alkuaineanalyysin avulla.

2 **Teoreettinen hapenkulutus (ThOD)**

ThOD-arvo voidaan laskea alkuainekokoonpanosta tai määrittää alkuaineanalyysin avulla. Jos alkuainekokoonpano on esimerkiksi:

$$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$$

eikä nitrifikaatiota tapahdu, ThOD-arvo voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\,[2\,c + 1/2\,(h - cl - 3\,n) + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

Jos tapahtuu nitrifikaatiota, ThOD-arvo voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\,[2\,c + 1/2\,(h - cl) + 5/2\,n + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3 **Kemiallinen hapenkulutus (COD)**

Kemiallinen hapenkulutus (COD) määritetään menetelmän C.6 mukaan.

4 **Liuennut orgaaninen hiili (DOC)**

Määritelmän mukaan liuennut orgaaninen hiili (DOC) on kemikaalin tai seoksen veteen liuennut aines, joka läpäisee 0,45 µm:n suodattimen.

Testiastioista otetaan näytteet, jotka suodatetaan heti kalvosuodatinlaitteessa. Suodoksen ensimmäinen 20 ml:n osuus (jos käytetään pieniä suodattimia, määrä voi olla pienempi) hylätään. Hiilianalyysiä varten käytetään 10 — 20 ml (tai pienempi määrä, jos näyte annetaan ruiskulla; määrä vaihtelee hiilianalysaattorin mukaan). DOC-pitoisuus määritetään orgaanisella hiilianalysaattorilla, jonka tarkkuuden on oltava riittävä sellaisten pitoisuuksien mittaamiseen, jotka ovat enintään 10 % testin alussa vallinneesta DOC-pitoisuudesta.

Jos suodatettuja näytteitä ei pystytä analysoimaan samana päivänä, niitä voidaan säilyttää 2 — 4 °C:n lämpötilassa enintään 48 tuntia. Jos säilytysaika on tätä pitempi, näytteitä on säilytettävä -18 °C:ssa tai tätä alhaisemmassa lämpötilassa.

Huomautuksia:

Hydrofiilisyyden parantamiseksi kalvosuodattimet on usein kyllästetty pinta-aktiivisilla aineilla. Tämän vuoksi suodattimessa voi olla useita milligrammoja liukoista orgaanista hiiltä, mikä voi häiritä biohajoavuusmäärityksiä. Pinta-aktiiviset aineet ja muut liukoiset orgaaniset yhdisteet poistetaan keittämällä suodattimia ionisoimattomassa vedessä tunnin ajan. Käsittely toistetaan kolme kertaa. Keittämisen jälkeen suodattimia voidaan säilyttää vedessä viikon ajan. Jos käytetään kertakäyttösuodattimia, jokainen erä on tarkastettava liukenevan orgaanisen hiilen suhteen.

Joidenkin kalvosuodatintyyppien kohdalla testattavaa kemikaalia voi kiinnittyä suodattimeen adsorption kautta. Siksi on suositeltavaa varmistaa, että testattava kemikaali ei kiinnity käytettävään suodattimeen.

TOC:n ja DOC:n osuudet näytteessä voidaan määrittää *sentrifugoimalla* (4 000 g: 40 000 ms^{-2}, 15 minuuttia) suodatuksen asemesta. Sentrifugoinnin tuloksiin ei voi luottaa, jos alkuperäinen DOC-pitoisuus on pienempi kuin 10 mg/l, koska tällöin kaikki bakteerit eivät välttämättä poistu tai bakteeriplasman orgaaninen hiili liukenee uudelleen.

VIITTEET

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Publ. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.

— Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 - Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs - und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

LIITE III

HUONOSTI LIUKENEVIEN AINEIDEN BIOHAJOAVUUDEN ARVIOINTI

Huonosti liukenevien aineiden biohajoavuustesteissä on otettava huomioon eräitä erityisseikkoja, jotka kuvataan jäljempänä.

Homogeenisten nesteiden kohdalla ei yleensä ole näytteenotto-ongelmia. Kiinteät aineet sen sijaan on suositeltavaa homogenisoida sopivalla tavalla. Kun tarvitaan muutaman milligramman suuruinen, edustava näyte paljon epäpuhtauksia sisältävästä kemikaaliseoksesta tai aineesta, on noudatettava erityistä tarkkuutta.

Testin aikana voidaan käyttää erilaisia hämmennysmenetelmiä. Hämmennyksen on oltava riittävää pitämään kemikaali dispergoituneena, mutta ei niin voimakasta, että syntyy ylikuumenemista, vaahdonmuodostusta tai tarpeettoman suuria leikkaavia voimia.

Stabiili dispersio voidaan tuottaa myös emulgaattorin avulla. Testiolosuhteissa emulgaattori ei saa olla bakteereille myrkyllinen tai biohajoava, eikä se saa aiheuttaa vaahdonmuodostusta.

Liuottimia koskevat vaatimukset ovat samat kuin emulgaattoreiden kohdalla.

Kiinteitä kantoaineita ei ole suositeltavaa käyttää kiinteiden aineiden testauksessa. Ne voivat kuitenkin sopia oljymäisten aineiden testaukseen.

Kun käytetään apuaineita (emulgaattoreita, liuottimia tai kantoaineita), testiin on sisällytettävä apuainetta sisältävä taustanäyte.

Huonosti liukenevien aineiden biohajoavuusmäärityksissä voidaan käyttää mitä tahansa kolmesta edellä kuvatusta respirometriatestistä (CO_2-, BOD- tai MITI-menetelmää).

VIITTEET

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

LIITE IV

BIOHAJOAVUUDEN ARVIOINTI, KUN EPÄILLÄÄN, ETTÄ TESTATTAVA KEMIKAALI ON SIIRROSAINEELLE MYRKYLLINEN

Jos biohajoavuustesti osoittaa, että kemikaali ei ole biohajoava, jäljempänä kuvattavan menetelmän avulla voidaan tarvittaessa määrittää, johtuuko tämä inhibitiosta vai testattavan kemikaalin inerttiydestä (Reynolds et al., 1987).

Myrkyllisyys- ja biohajoavuustesteissä on käytettävä samaa tai samankaltaista siirrosainetta.

Kun kemikaalin biohajoavuutta testataan, kemikaalin myrkyllisyyttä voidaan arvioida käyttämällä aktiivilietteen hengityksenestotestiä (direktiivi 88/302/ETY), BOD-määritystä tai kasvunestomenetelmää yhdessä tai erikseen.

Jos testattavan aineen myrkyllisyyden aiheuttamaa inhibitiota on vältettävä, ehdotetaan, että testattavan aineen pitoisuus pidetään biohajoavuustesteissä enintään kymmenesosana myrkyllisyystestin tuloksena saadusta EC_{50}-arvosta (tai pienempänä kuin EC_{20}-arvo). Yhdisteet, joiden EC_{50}-arvo on suurempi kuin 300 mg/l, eivät todennäköisesti aiheuta myrkyllisyysongelmia hyvää biohajoavuutta testattaessa.

Jos aineen EC_{50}-arvo on pienempi kuin 20 mg/l, testissä on odotettavissa ongelmia. Tällöin testattavaa ainetta on käytettävä pieninä pitoisuuksina, joten suljetun pullon testimenetelmää tai ^{14}C-merkittyjä aineita suositellaan. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää siirrosaineen akklimatisointia, joka mahdollistaa testattavan aineen annostelun suurempina pitoisuuksina kuin edellä mainittuja menetelmiä käytettäessä (tällöin hyvää biohajoavuutta ei kuitenkaan voida määrittää).

VIITTEET

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

LIITE V

NITRIFIKAATION AIHEUTTAMAN HAPENKULUTUKSEN HÄIRIÖN KORJAUS

Kun typpeä sisältämättömän aineen biohajoavuutta arvioidaan hapenkulutuksen avulla, nitrifikaation aiheuttama virhe on marginaalinen (enintään 5 %) siitä huolimatta, että liuoksen ammoniakin typpi hapettuu epäsäännöllisesti testattavaa ainetta ja taustanäytettä sisältävissä astioissa. Jos testattava aine sisältää typpeä, nitrifikaation aiheuttamat virheet voivat olla suuria.

Jos nitrifikaatiota on tapahtunut, mutta vain osittain, reaktioseoksen havaittua hapenkulutusta voidaan korjata sen happimäärän osalta, joka tarvitaan ammoniakin hapettamiseen nitriitiksi ja nitraatiksi. Tämä edellyttää sitä, että inkubaation aikana syntyvät nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutokset määritetään seuraavien suureyhtälöiden avulla:

$$2NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Summayhtälö on seuraava:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Yhtälöstä 1 nähdään, että ammoniumkloridin (NH_4Cl:n) typpisisällön (28 g) hapettamiseen nitriitiksi tarvitaan 96 g happea, eli kerroin on 3,43 (96/28). Yhtälöstä 3 nähdään samoin, että 28 g:n typpimäärän hapettamiseen nitraatiksi tarvitaan 128 g happea, eli kerroin on 4,57 (128/28).

Koska reaktiot tapahtuvat *peräkkäin* ja erilaisten bakteerien vaikutuksesta, nitriittipitoisuus voi vaihdella. Jos se on pieni, nitraattipitoisuus on vastaavasti suurempi. Tällöin nitraatin muodostukseen kuluva happimäärä on 4,57 kerrottuna nitraattipitoisuuden kasvulla ja nitriitinmuodostukseen kuluva happimäärä on 3,43 kerrottuna nitriittipitoisuuden kasvulla. Jos nitriittipitoisuus on pienentynyt, hapenkulutus on – 3,43 kerrottuna pitoisuuden pienenemisellä.

Tästä seuraa, että

nitraatinmuodostuksen kuluttama happimäärä = 4,57 × nitriittipitoisuuden kasvu (4)

ja

nitriitinmuodostuksen kuluttama happimäärä = 3,43 × nitriittipitoisuuden kasvu (5)

ja

nitriittipitoisuuden pienenemisen myötä hävinnyt happimäärä = – 3,43 × nitraattipitoisuuden pieneneminen, (6)

joten

nitrifikaation aiheuttama hapenkulutus = ± 3,43 × nitriittipitoisuuden muutos + 4,57 × nitraattipitoisuuden kasvu, (7)

mistä seuraa, että

hiilen hapettumiseen kuluva happimäärä = havaittu yhteiskulutus — nitrifikaatioon kuluva happimäärä. (8)

Jos vain hapettuneen typen kokonaismäärä määritetään, voidaan olettaa, että nitrifikaation edellyttämä hapenkulutus on suunnilleen 4,57 × hapettuneen typen kasvu.

Tämän jälkeen hiilen hapettumisen edellyttämää, korjattua happimäärää verrataan ThOD NH_3 -arvoon (katso liitettä II).

C.5 HAJOAMINEN — BIOKEMIALLINEN HAPENKULUTUS

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä mitataan kiinteiden tai nestemäisten orgaanisten aineiden biokemiallista hapenkulutusta (BOD).

Testin tiedot koskevat vesiliukoisia aineita, mutta testillä voidaan – ainakin periaatteessa – testata myös haihtuvia ja huonosti veteen liukenevia aineita.

Menetelmää voidaan soveltaa vain sellaisiin orgaanisiin aineisiin, jotka eivät estä bakteerien toimintaa testipitoisuutta käytettäessä. Jos testattava aine ei liukene testipitoisuutta käytettäessä, aineen riittävä dispersio voidaan varmistaa erikoismenetelmien (esimerkiksi ultraäänidispersion) avulla.

Jos tulokseksi saadaan pieniä arvoja, tulosten tulkinnassa ja testipitoisuuksien valinnassa voidaan käyttää kemikaalien myrkyllisyystietoja.

1.2 YKSIKÖT JA MÄÄRITELMÄT

Määritelmän mukaan BOD on liuenneen hapen massa, joka tarvitaan testattavan aineen annetun liuostilavuuden biokemialliseen hapettamiseen annetuissa olosuhteissa.

Tulokset ilmaistaan BOD-massana (g) testattavan aineen massaa (g) kohti.

1.3 VERTAILUAINEET

Sopivan vertailuaineen käyttöä siirrosaineen aktiviteetin tarkistamiseksi suositellaan.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tunnettuun määrään ainetta, joka on liuotettu tai dispergoitu hyvin ilmastettuun, sopivaan liuokseen, siirrostetaan mikroeliöitä, ja siirrostettua liuosta inkuboidaan pimeässä ja vakiolämpötilassa.

BOD-arvo määritetään liuenneen hapen alku- ja loppupitoisuuden perusteella. Testin kesto on 5 — 28 päivää.

Rinnan testiliuoksen kanssa on käytettävä taustaliuosta, jossa ei ole testattavaa ainetta.

1.5 LAATUKRITEERIT

BOD-määritystä ei hyväksytä aineen biohajoavuuden määrityksenä. BOD-määritystä voidaan käyttää vain seulontatestinä.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

Aineesta valmistetaan alustava liuos tai dispersio, jonka BOD-pitoisuus on sopiva testimenetelmää varten. Liuoksen tai dispersion BOD-arvo määritetään sopivan kansallisen tai kansainvälisen standardisoidun menetelmän avulla.

2 TIEDOT JA ARVIOINTI

Alustavan liuoksen BOD-arvo lasketaan valitun menetelmän mukaan, ja tulos muunnetaan BOD-massaksi (g) testattavan aineen massaa (g) kohti.

3 RAPORTOINTI

Käytetty menetelmä ilmoitetaan.

Ilmoitettavan biokemiallisen hapenkulutuksen arvon on oltava vähintään kolmen hyväksyttävän mittauksen keskiarvo.

Kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, on ilmoitettava. Tämä koskee erityisesti epäpuhtauksia, aineen fysikaalista olomuotoa, myrkyllisyyttä ja muita aineen ominaisuuksia, jotka voivat vaikuttaa tuloksiin.

Jos apuainetta on käytetty biologisen nitrifikaation estämiseksi, tämä on raportoitava.

4 VIITTEET

Seuraavassa on esimerkkejä standardisoiduista menetelmistä:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6 HAJOAMINEN — KEMIALLINEN HAPENKULUTUS

1 MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Menetelmällä mitataan kiinteiden ja nestemäisten aineiden kemiallista hapenkulutusta (COD) valvotuissa laboratorio-olosuhteissa haluttua standardisoitua menettelyä noudattaen.

Testattavan aineen kemiallisen kaavan tunteminen (onko aine halogeenisuola, orgaanisen aineen ferrisuola, orgaaninen klooriyhdiste tms.) helpottaa testin suorittamista ja tulosten tulkintaa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Kemiallinen hapenkulutus on aineen hapetettavuuden mitta. Aineen kemiallinen hapenkulutus ilmaistaan hapetusaineen kulutusta vastaavana happimääränä, kun ainetta hapetetaan valvotuissa laboratorio-olosuhteissa.

Kemiallinen hapenkulutus ilmaistaan COD-massana (g) testattavan aineen massaa (g) kohti.

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tunnettua määrää veteen liuotettua tai dispergoitua ainetta hapetetaan kaliumdikromaatilla väkevässä rikkihapossa vastavirtaperiaatteen mukaan kahden tunnin ajan. Katalysaattorina käytetään hopeasulfaattia. Dikromaattijäännös määritetään standardisoidulla ferriammoniumsulfaatilla titraamalla.

Jos testattava aine sisältää klooria, liuokseen lisätään elohopeasulfaattia (*) kloridin aiheuttaman häiriön vähentämiseksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Koska COD-arvon määritysmenetelmä on tulkinnanvarainen, COD-arvo on "hapetettavuusindikaattori" ja sellaisenaan käytännöllinen tapa mitata orgaanista ainetta. Jotkin rengasyhdisteet ja monet haihtuvat aineet (esimerkiksi lyhytketjuiset rasvahapot) eivät hapetu tässä testissä täysin.

1.6 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Valmistetaan aineen alustava liuos tai dispersio siten, että tuloksena saatava COD-arvo on 250 — 600 mg/l.

Huomautuksia:

Jos aine on huonosti liukenevaa tai dispergoitumatonta, testilaitteeseen voidaan panna veteen sekoitettuna hienoksi jauhettua tai nestemäistä ainetta, joka vastaa määrältään noin 5 mg:aa COD:tä.

Kemiallinen hapenkulutus (COD) voidaan usein – etenkin huonosti liukenevien aineiden kohdalla – määrittää käyttäen menetelmän muunnosta, joka perustuu paineentasaajalla varustettuun suljettuun järjestelmään (H. Kelkenberg, 1975). Muunnoksen avulla voidaan usein tehdä menestyksekkäästi kvantitatiivinen määritys aineista (esimerkiksi etikkahaposta), joiden määrittäminen perinteisellä menetelmällä on vaikeaa. Menetelmää ei kuitenkaan voida soveltaa pyridiiniin. Kaliumdikromaattipitoisuuden (katso viitettä 1) nostaminen arvoon 0,25 N (0,0416 M) mahdollistaa testattavan aineen suorapunnituksen 5 — 10 mg:n annoksena, mikä on tärkeää huonosti veteen liukenevien aineiden COD-määrityksessä (katso viitettä 2).

Muussa tapauksessa COD-arvo määritetään sopivan kansallisen tai kansainvälisen standardisoidun menetelmän avulla.

2 **TIEDOT JA ARVIOINTI**

Testipullojen sisällön COD lasketaan valitun normalisoidun menetelmän mukaan ja muunnetaan COD-massaksi (g) testatun aineen massaa (g) kohti.

(*) Elohopeasuoloja sisältävät liuokset on käytön jälkeen käsiteltävä siten, ettei ympäristöön pääse elohopeaa

3 **RAPORTOINTI**

Raportissa on oltava maininta käytetystä vertailumenetelmästä.

Ilmoitetun kemiallisen hapenkulutuksen arvon on oltava vähintään kolmen mittauksen keskiarvo. Kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, on ilmoitettava. Tämä koskee erityisesti epäpuhtauksia, aineen fysikaalista olomuotoa, myrkyllisyyttä tai aineen muita tunnettuja ominaisuuksia, jotka voivat vaikuttaa tuloksiin.

Jos kloridin häiritsevä vaikutus on pyritty minimoimaan elohopeasulfaatilla, tämä on raportoitava.

4 **VIITTEET**

1) Kelkenberg, H.. Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Seuraavassa on esimerkkejä normalisoiduista menetelmistä.

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 per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

C.7 HAJOAMINEN — ABIOOTTINEN DEGRADAATIOHYDROLYYSI pH:N FUNKTIONA

1 **MENETELMÄ**

Menetelmä perustuu OECD:n testiohjeisiin (1).

1.1 JOHDANTO

Hydrolysoituminen on tärkeä abioottisen hajoamisen osareaktio, erityisesti heikon biohajoavuuden omaavien aineiden kohdalla, koska se voi vaikuttaa aineen pysyvyyteen luonnossa.

Useimmat hydrolysoitumisreaktiot ovat näennäisiä ensimmäisen asteen reaktioita, ja siksi puoliintumisajat eivät riipu pitoisuudesta. Tämän ansiosta laboratoriopitoisuuksien avulla saadut tulokset voidaan usein ekstrapoloida ympäristöolosuhteita vastaaviksi.

On monia esimerkkitapauksia (2), erityyppisten kemikaalien kohdalla tuloksissa on saavutettu hyväksyttävä yhtenäisyys puhdasta vettä ja luonnonvettä käyttäen.

On suositeltavaa selvittää tutkittavan aineen höyrynpaine ennen testin aloittamista.

Menetelmää voidaan soveltaa vain vesiliukoisiin aineisiin. Epäpuhtaudet voivat vaikuttaa tuloksiin.

Kemikaalien hydrolysoitumisominaisuudet on selvitettävä käyttäen pH-arvoja, jotka ovat tavallisia luonnossa (pH 4 — 9).

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Hydrolysoitumisella tarkoitetaan kemikaalin RX reaktiota veden kanssa. Reaktio voidaan kuvata X-ryhmän korvautumisena OH:lla seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \quad [1]$$

RX:n pitoisuus pienenee seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$\text{nopeus} = k\,[H_2O] \cdot [RX] \quad [2]$$

Koska vesiylimäärä kemikaaliin verrattuna on suuri, tämäntyyppistä reaktiota kutsutaan yleensä näennäiseksi ensimmäisen asteen reaktioksi, jossa havaittu nopeuskerroin saadaan seuraavan yhtälön perusteella:

$$k_{hav} = k \times [H_2O] \quad [3]$$

Seuraavan suureyhtälön avulla voidaan määrittää vakio yhtä pH-arvoa ja yhtä lämpötilaa (T) varten:

$$k_{hav} = \frac{2{,}303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

jossa

t = aika

C_0 = aineen pitoisuus hetkellä 0

C_t = aineen pitoisuus hetkellä t

2,303 = luonnollisen logaritmin ja kymmenkantaisen logaritmin välinen muunnoskerroin.

Pitoisuudet ilmaistaan grammoina litraa kohti tai mooleina litraa kohti.

Vakion k_{hav} dimensio on $(\text{aika})^{-1}$.

Puoliintumisaika $t_{½}$ on aika, jonka kuluessa testattavan aineen pitoisuus vähenee puoleen:

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

Yhtälöiden (4) ja (5) perusteella voidaan osoittaa, että:

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{hav} \quad [6]$$

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

Vertailuaineina on käytetty seuraavia aineita (1):

Asetyylisalisyylihappo (aspiriini)

0,0-dietyyli-0-2-isopropyyli-4-metyyli-6-pyrimidyyli-tiofosfaatti.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Ainetta liuotetaan veteen pienenä pitoisuutena. Tarkistetaan pH-arvo ja lämpötila.

Aineen pitoisuuden pieneneminen ajan funktiona mitataan sopivan analyyttisen menetelmän avulla.

Pitoisuuden logaritmiarvot piirretään ajan funktiona. Jos tuloksena on suora, ensimmäisen asteen nopeusvakio saadaan suoran kaltevuudesta (katso pistettä 2).

Jos nopeusvakion määrittäminen suoraan määrättyä lämpötilaa kohti on hankalaa, vakio voidaan yleensä arvioida käyttämällä Arrheniuksen yhtälöä, joka ilmaisee nopeusvakion lämpötilariippuvuuden. Kun määrätyn lämpötilan nopeusvakion logaritmisuora absoluuttisen lämpötilan (K:n) käänteisarvona on piirretty, suorasta voidaan ekstrapoloimalla lukea sellaisia nopeusvakion arvoja, joita ei saada suoraan.

1.5 LAATUKRITEERIT

Viitteen (2) mukaan hydrolysoitumisen nopeusvakion mittauksista on saatu erittäin tarkat tulokset 13:n orgaanisen rakenneluokan osalta.

Mittausten toistettavuus vaihtelee erityisesti pH:n ja lämpötilan säätöjen mukaan. Toistettavuuteen voivat vaikuttaa mikroeliöiden läsnäolo ja erityistapauksissa myös liuenneen hapen pitoisuus.

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Reagenssit**

1.6.1.1 *Puskuriliuokset*

Testi suoritetaan kolmella eri pH-arvolla: 4,0, 7,0 ja 9,0.

Tätä varten valmistetaan puskuriliuokset analyyttisen puhtaita reagensseja ja tislattua tai ionisoimatonta, steriiliä vettä käyttäen. Liitteessä mainitaan muutamia puskuriliuosesimerkkejä.

Jos on näytteitä siitä, että määrätty puskuriliuos voi vaikuttaa hydrolysoitumisnopeuteen, on valittava toinen puskurijärjestelmä. Viitteessä (2) suositellaan boraatti- tai asetaattipuskureiden käyttöä fosfaattipuskureiden asemesta.

Jos puskuriliuoksen pH-arvoa testilämpötilassa ei tunneta, arvo voidaan määrittää kalibroidulla pH-mittarilla ± 0,1 pH-yksikön tarkkuudella halutussa lämpötilassa.

1.6.1.2 *Testiliuokset*

Testattavaa ainetta liuotetaan haluttuun puskuriin siten, että aineen pitoisuus on enintään 0,01 M tai puolet kyllästyspitoisuudesta (käytetään näistä pienempää arvoa).

Suosituksen mukaan veteen sekoittuvia orgaanisia liuottimia tulee käyttää vain siinä tapauksessa, että testattava aine liukenee huonosti veteen.

Liuotinpitoisuuden tulee olla enintään 1 %, eikä liuotin saa häiritä hydrolysoitumisprosessia.

1.6.2 **Laite**

Käytetään tulpalla varustettuja lasipulloja. Rasvan joutumista lasihiokseen on varottava.

Jos kemikaali tai puskurijärjestelmä on haihtuvaa tai jos testi suoritetaan korkeassa lämpötilassa, on suositeltavaa käyttää suljettuja tai kalvolla varustettuja putkia, joissa on ylhäällä mahdollisimman vähän tyhjää tilaa.

1.6.3 **Analyyttinen menetelmä**

Menetelmän on oltava spesifinen, jotta testattavan aineen määrityksessä voitaisiin käyttää testiliuospitoisuuksia. Myös sopivien analyyttisten tekniikoiden yhdistelmää voidaan käyttää.

Käytettävä analyyttinen menetelmä valitaan aineen ominaisuuksien perusteella. Menetelmän on oltava niin tarkka ja herkkä, että sillä voidaan havaita alkupitoisuuden 10-prosenttinen pieneneminen.

1.6.4 **Testiolosuhteet**

Testeissä käytetään termostaatilla varustettua, suljettua säiliötä tai vakiolämpötilahaudetta, joka säädetään lämpötilaan ± 0,5 °C:n tarkkuudella. Lämpötilaa ylläpidetään ja mitataan ± 0,1 °C:n tarkkuudella. Elektrolyyttiset häiriöt on ehkäistävä sopivilla toimenpiteillä.

Jos testattava aine hapettuu herkästi, liuennut happi on poistettava liuoksesta ennen aineen lisäämistä (esimerkiksi ilmastamalla liuosta typellä tai argonilla viiden minuutin ajan).

1.6.5 **Testin suorittaminen**

1.6.5.1 *Alustava testi*

Kaikille testattaville aineille tehdään ensin alustava testi lämpötilassa 50 ± 0,5 °C kolmea eri pH-arvoa (4,0:aa, 7,0:aa ja 9,0:aa) käyttäen. Kutakin pH-arvoa kohti tehdään riittävä lukumäärä mittauksia, jotta voitaisiin arvioida, onko puoliintumisaika ($t_{½}$) alle 2,4 tuntia vai onko hydrolysoituminen viiden päivän kuluessa alle 10 %. (Voidaan olettaa, että lämpötilassa 25 °C näitä arvoja vastaava puoliintumisaika on lyhyempi kuin yksi vuorokausi tai pidempi kuin yksi vuosi.)

Jos alustavan testin tulos osoittaa, että kullakin pH-arvolla (4, 7 ja 9) ja 50 °C: n lämpötilassa vähintään 50 % testattavasta aineesta on hydrolysoitunut 2,4 tunnin kuluessa tai että alle 10 % aineesta on hydrolysoitunut viiden päivän kuluessa, testiä ei tarvitse jatkaa.

Muissa tapauksissa (ja sellaisten pH-arvojen kohdalla, joilla tämä ehto ei ole täyttynyt) suoritetaan testi numero 1.

1.6.5.2 *Testi 1*

Testi 1 suoritetaan niillä pH-arvoilla, jotka alustavan testin mukaan edellyttävät lisätestausta. Testissä käytetään yhtä lämpötilaa (suositus: 50 ± 0,5 °C) ja mahdollisuuksien mukaan steriilejä olosuhteita.

Näytteitä valitaan riittävä määrä (vähintään neljä näytettä), jotta hydrolysoitumisalue 20 — 70 % saataisiin katettua. Näytteiden avulla testataan aineen näennäisiä ensimmäisen asteen reaktioita määrätyillä pH-arvoilla.

Määritetään reaktion aste testin jokaisen pH-arvon osalta.

Nopeusvakion arviointi lämpötilan ollessa 25 °C

Testin jatkotoimet vaihtelevat sen mukaan, voidaanko testin 1 perusteella päätellä reaktion olevan näennäinen ensimmäisen asteen reaktio vai ei.

Ellei testin 1 perusteella voida varmasti päätellä reaktion olevan näennäinen ensimmäisen asteen reaktio, testausta on jatkettava testin 2 ohjeiden mukaan.

Jos testin 1 perusteella voidaan varmasti päätellä, että kyseessä on näennäinen ensimmäisen asteen reaktio, testausta jatketaan testin 3 ohjeiden mukaan. Erikoistapauksissa voidaan vaihtoehtoisesti laskea 25 °C:n lämpötilaa vastaavat nopeusvakiot lämpötilaa 50 °C vastaavilla arvoilla, jotka on saatu tulokseksi testistä 1 (katso kohtaa 3.2).

1.6.5.3 *Testi 2*

Testi 2 suoritetaan niillä pH-arvoilla, joiden kohdalla testausta on tarpeen jatkaa testin 1 perusteella. Testilämpötila valitaan seuraavasti:

— yksi lämpötila, joka on alle 40 °C tai

— kaksi lämpötilaa, jotka ovat yli 50 °C ja joiden keskinäinen ero on vähintään 10 °C.

Kutakin pH-arvoa ja lämpötilaa kohti valitaan vähintään kuusi riittävän alueen kattavaa mittauspistettä siten, että hydrolysointiasteet ovat alueella 20 — 70 %.

Kutakin pH-arvoa ja lämpötilaa kohti tehdään kaksoismääritys. Jos testi 2 tehdään kahdessa yli 50 °C:n lämpötilassa, kaksoismääritys on suositeltavaa tehdä alemmassa lämpötilassa.

Kutakin pH-arvoa ja lämpötilaa kohti näkyy arvioitu puoliintumisaika ($t_{½}$) mahdollisuuksien mukaan. Arviointi esitetään graafisessa muodossa.

1.6.5.4 *Testi 3*

Testi 3 suoritetaan niillä pH-arvoilla, joiden kohdalla testausta on tarpeen jatkaa testin 1 perusteella. Testilämpötila valitaan seuraavasti:

— yksi lämpötila, joka on alle 40 °C tai

— kaksi lämpötilaa, jotka ovat yli 50 °C ja joiden keskinäinen ero on vähintään 10 °C.

Kutakin pH-arvoa ja lämpötilaa kohti valitaan kolme mittauspistettä. Ensimmäinen mittaus tehdään hetkellä 0. Toinen ja kolmas mittaus tehdään, kun hydrolysoitumisaste on yli 30 %. Vakioiden k_{hav} ja $t_{½}$ arvot lasketaan.

2 TIEDOT

Vakion k_{hav} arvojen näennäinen ensimmäisen asteen käyttäytyminen kunkin pH-arvon kohdalla ja kussakin lämpötilassa saadaan piirtämällä ensin pitoisuuden logaritmi ajan funktiona, minkä jälkeen vakion arvo voidaan laskea suoran kaltevuuden ja seuraavan yhtälön avulla:

$$k_{hav} = - \text{kaltevuus} \times 2{,}303 \qquad [7]$$

Puoliintumisajan $t_{½}$ arvo voidaan laskea yhtälön [6] mukaan.

Arvo $k_{(25\ °C)}$ voidaan soveltuvissa tapauksissa arvioida Arrheniuksen yhtälön avulla.

Jos kyseessä ei ole näennäinen ensimmäisen asteen reaktio, lisäohjeita on katsottava kohdasta 3.1.

3 RAPORTTI

3.1 RAPORTOINTI

Testiraporttiin on mahdollisuuksien mukaan sisällytettävä seuraavat tiedot:

— aineen spesifikaatio

— mahdolliset vertailuaineella saadut tulokset

— analyyttisen menetelmän periaate ja yksityiskohdat

— kutakin testiä kohti: lämpötila, pH-arvo, puskurin kokoonpano ja taulukko, jossa on pitoisuus- ja aikatiedot

— jos kyseessä on näennäinen ensimmäisen asteen reaktio: vakioiden k_{hav} ja $t_{½}$ arvot sekä laskentamenetelmä

— jos kyseessä ei ole näennäinen ensimmäisen asteen reaktio: käyrä, johon on piirretty pitoisuuden logaritmi ajan funktiona

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Laskennan avulla voi olla mahdollista saada hyväksyttäviä nopeusvakion arvoja (25 °C), mikäli käytettävissä on testattavan aineen homologien kokeellisesti saatuja aktivointienergiatietoja ja mikäli voidaan olettaa, että testattavan aineen ja homologien aktivointienergiat ovat suunnilleen samansuuruiset.

4 VIITTEET

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) W. Mabey and T. Mill, "Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions", J. Phys. Chem. Ref., Data, 1978, vol. 7 (2), 383-415.

Liite

PUSKURISEOKSET

A CLARK JA LUBS

Seuraavista taulukoista ilmenevät pH-arvot on laskettu potentiaalimittausten ja Sörensenin standardiyhtälöiden avulla. Varsinainen pH-arvo on 0,04 yksikköä taulukon arvoa suurempi.

Kokoonpano	pH
0,1 M kaliumvetyftalaattia + 0,1 N HCl:ää (20 °C)	
2,63 ml 0,1 N HCl:ää + 50 ml ftalaattia, laimennettu 100 ml:aan	3,8
0,1 M kaliumhydroksidiftalaattia + 0,1 N NaOH:ta (20 °C)	
0,40 ml 0,1 N NaOH:ta + 50 ml ftalaattia, laimennettu 100 ml:aan	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH:ta + 50 ml ftalaattia, laimennettu 100 ml:aan	4,2
0,1 M monokaliumfosfaattia + 0,1 N NaOH:ta (20 °C)	
23,45 ml 0,1 N NaOH:ta + 50 ml ftalaattia, laimennettu 100 ml:aan	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH:ta + 50 ml ftalaattia, laimennettu 100 ml:aan	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH:ta + 50 ml ftalaattia, laimennettu 100 ml:aan	7,2

0,1 M H_3BO_3:a 0,1 M:ssa KCl:ssä + 0,1 N NaOH:ta (20 °C)

16,30 ml 0,1 N NaOH:ta + 50 ml boorihappoa, laimennettu 100 ml:aan	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH:ta + 50 ml boorihappoa, laimennettu 100 ml:aan	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH:ta + 50 ml boorihappoa, laimennettu 100 ml:aan	9,2

B **KOLTHOFF JA VLEESHOUWER**

Kokoonpano	pH
0,1 M monokaliumsitraattia ja 0,1 N NaOH:ta (18 °C) (lisätään pieni tymolikide estämään homeenmuodostusta)	
2,0 ml 0,1 N NaOH:ta + 50 ml sitraattia, laimennettu 100 ml:aan	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH:ta + 50 ml sitraattia, laimennettu 100 ml:aan	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH:ta + 50 ml sitraattia, laimennettu 100 ml:aan	4,2

C **SÖRENSEN**

0,05 M booraksia + 0,1 N HCl:ää

Kokoonpano		pH			
Booraksi (ml)	HCl (ml)	Sörensen (18 °C)	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M booraksia + 0,1 N NaOH:ta

Kokoonpano		pH			
Booraksi (ml)	NaOH (ml)	Sörensen (18 °C)	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12