392L0069

29.12.92 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* Nr L 383/113

KOMMISSIONENS DIREKTIV 92/69/EEG

av den 31 juli 1992

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

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 67/548/EEG av den 27 juni 1967 om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen(1), senast ändrat genom direktiv 92/32/EEG(2), särskilt artikel 28 och 29 i detta, och

med beaktande av följande:

Enligt artikel 3.1 i direktiv 67/548/EEG och artikel 3 i rådets direktiv 88/379/EEG av den 7 juni 1988 om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga preparat (beredningar)(3), senast ändrat genom kommissionens direktiv 90/492/EEG(4), skall ämnens och preparats fysikaliskt-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet bestämmas med de metoder som anges i bilaga 5 till direktiv 67/548/EEG.

Texten till bilaga 5 till direktiv 67/548/EEG offentliggörs för närvarande i två delar, den ena som bilaga till kommissionens direktiv 84/449/EEG(5) och den andra som bilaga till kommissionens direktiv 88/302/EEG(6).

Med hänsyn till den tekniska utvecklingen är det nödvändigt att ändra de testmetoder som anges i bilagan till kommissionens direktiv 84/449/EEG.

Den tekniska utvecklingen nödvändiggör dessutom en förändring av den metod som tillämpas för att testa tillväxthämning hos alger. Metoden, som för närvarande finns i bilagan till kommissionens direktiv 88/302/EEG, bör samtidigt överföras till bilagan till direktiv 84/449/EEG.

I enlighet med rådets direktiv 86/609/EEG om tillnärmning av medlemsstaternas lagar och andra författningar om skydd av djur som används för försök och andra vetenskapliga ändamål(7), är det lämpligt att minimera det antal djur som används för försök.

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

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Bilagan till direktiv 84/449/EEG skall ersättas med bilagan till detta direktiv.

Artikel 2

Den metod för att testa tillväxthämningen hos alger som anges i bilagan till direktiv 88/302/EEG skall utgå.

Artikel 3

Medlemsstaterna skall senast den 30 oktober 1993 sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv. De skall genast underrätta kommissionen om detta.

När en medlemsstat antar bestämmelserna skall de innehålla en hänvisning till detta direktiv eller åtföljas av en

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

sådan hänvisning när de offentliggörs. Närmare föreskrifter om hur hänvisningen skall göras skall varje medlemsstat själv utfärda.

Artikel 4

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 31 juli 1992.

På kommissionens vägnar

Karel VAN MIERT

Ledamot av kommissionen

BILAGA

Bilaga till kommissionens direktiv 92/69/EEG av den 31 juli 1992 om anpassning till tekniska framsteg för sjuttonde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen(1)

(1) EGT nr L 383, 29.12.1992, s. 113.

INNEHÅLL

DEL A:	METODER FÖR BESTÄMNING AV FYSIKALISK-KEMISKA EGENSKAPER	9
A.1	Smält-/fryspunkt	9
A.2	Kokpunkt	19
A.3	Relativ densitet	25
A.4	Ångtryck	30
A.5	Ytspänning	51
A.6	Vattenlöslighet	58
A.8	Fördelningskoefficient	67
A.9	Flampunkt	78
A.10	Antändlighet (fasta ämnen)	80
A.11	Antändlighet (gaser)	83
A.12	Antändlighet (kontakt med vatten)	85
A.13	Pyroforiska egenskaper hos fasta och flytande ämnen	89
A.14	Explosiva egenskaper	91
A.15	Självantändningstemperatur (vätskor och gaser)	102
A.16	Relativ självantändningstemperatur (fasta ämnen)	103
A.17	Oxiderande egenskaper (fasta ämnen)	106
DEL B:	METODER FÖR BESTÄMNING AV TOXICITET	111
Allmän inledning		111
B.1	Akut toxicitet (oralt)	114
B.1bis	Akut toxicitet (oralt) Fast dos-metod	117
B.2	Akut toxicitet (inandning)	121
B.3	Akut toxicitet (dermalt)	125
B.4	Akut toxicitet (hudirritation)	128
B.5	Akut toxicitet (ögonirritation)	131
B.6	Hudsensibilisering	135
B.7	Toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, oralt)	140
B.8	Toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, inandning)	144
B.9	Toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, dermalt)	148
B.10	Mutagenicitet (cytogenetiskt test på däggdjur *in vitro*)	152
B.11	Mutagenicitet (cytogenetiskt benmärgstest på däggdjur *in vivo*, kromosomanalys)	155
B.12	Mutagenicitet (mikronukleärt test)	158
B.13	Mutagenicitet (*Eschericia coli* — återmutationstest)	161
B.14	Mutagenicitet (*Salmonella typhimurium* — återmutationstest)	164

DEL C: METODER FÖR BESTÄMNING AV EKOTOXICITET 167

C.1 Akut toxicitet för fisk 167
C.2 Akut toxicitet för *Daphnia* 176
C.3 Test av tillväxthämning på alger 183
C.4 Bestämning av "lätt" bionedbrytbarhet 191
C.4-A DOC-eliminering (DOC Die-Away) 198
C.4-B Modifierat OECD-screeningtest 201
C.4-C CO_2-utvecklingstest 206
C.4-D Manometrisk respirometri 211
C.4-E Closed bottle-test 215
C.4-F MITI-test (Ministry of International Trade and Industri – Japan) 220
Bilagor 225
C.5 Nedbrytning – biokemisk syreförbrukning 230
C.6 Nedbrytning – kemisk syreförbrukning 231
C.7 Nedbrytning – abiotisk nedbrytning: hydrolys en funktion av pH-värde 233

INLEDNING

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

Om sådana metoder inte funnits tillgängliga har nationella standardmetoder eller vetenskapligt erkända metoder använts. I allmänhet skall testerna utföras med ämnet som det marknadsförs. Man bör vara uppmärksam på att orenheter kan påverka testresultaten.

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

Djurförsök och djurundersökningar skall utföras i enlighet med nationella bestämmelser, varvid hänsyn skall tas till humana principer och den internationella utvecklingen inom området för djurs välbefinnande.

Om testmetoderna är likvärdiga skall den metod användas som kräver minst antal försöksdjur.

DEL A: METODER FÖR BESTÄMNING AV FYSIKALISK-KEMISKA EGENSKAPER

A.1. SMÄLT-/FRYSPUNKT

1. METOD

De flesta av de beskrivna metoderna är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1). Grundprinciperna anges i hänvisningarna 2 och 3.

1.1. INLEDNING

De beskrivna metoderna och apparaterna kan användas för bestämning av ämnens smältpunkt, utan någon begränsning beträffande deras renhetsgrad.

Valet av metod beror på arten av det ämne som skall undersökas. Det är följaktligen avgörande om ämnet lätt, med svårighet eller inte alls kan pulvriseras.

För vissa ämnen är det mer ändamålsenligt att bestämma frys- eller stelningspunkten, och i denna metod inbegrips standarder för sådana bestämningar.

Om det till följd av ämnets särskilda egenskaper inte går att korrekt bestämma ovan nämnda parametrar kan det vara ändamålsenligt att bestämma den lägsta flytpunkten.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Smältpunkten definieras som den temperatur vid vilken fasövergången från fast till flytande tillstånd sker vid normalt atmosfäriskt tryck, och denna temperatur motsvarar idealt fryspunkten.

Eftersom fasövergången för många ämnen sker under ett punktintervall beskrivs den ofta som smältintervallet.

Omvandling av enheter (K till °C):

$t = T - 273{,}15$

t: temperaturen i grader Celsius (°C)

T: termodynamiska temperaturen Kelvin (K)

1.3. REFERENSÄMNEN

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

Vissa referensämnen anges i hänvisningarna (se hänvisning 4).

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Temperaturen (temperaturintervallet) för fasövergången från fast till flytande tillstånd eller från flytande till fast tillstånd bestäms. I praktiken bestäms temperaturen vid begynnande smältning/frysning och vid slutlig smältning/frysning under uppvärmning/avkylning av ett prov av testämnet vid atmosfäriskt tryck. Fem typer av metoder beskrivs, nämligen kapillärmetoder, värmebordsmetoder, fryspunkstbestämning, metoder för termisk analys och bestämning av lägsta flytpunkt (utvecklad för petroleumoljor).

I vissa fall kan det vara praktiskt att mäta fryspunkten i stället för smältpunkten.

1.4.1. **Kapillärmetoder**

1.4.1.1. *Smältpunktsanordningar med vätskebad*

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

1.4.1.2. *Smältpunktsanordningar med metallblock*

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

1.4.1.3. *Bestämning med fotocell*

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

1.4.2. **Värmebord**

1.4.2.1. *Koflers värmebänk*

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

1.4.2.2. *Smältmikroskop*

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

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

1.4.2.3. *Meniskmetoden*

Denna metod används endast för polyamider.

Den temperatur vid vilken en silikonoljemenisk, som är innesluten mellan ett värmebord och ett täckglas som vilar på polyamidprovämnet, förskjuts iakttas visuellt.

1.4.3. **Metod för bestämning av fryspunkt**

Provet placeras i ett särskilt provrör och sätts i en apparat för bestämning av fryspunkten. Provet avkyls under försiktig och oavbruten omrörning och temperaturen mäts med passande mellanrum. När temperaturen är konstant vid flera avläsningar registreras denna temperatur (korrigerad för termometerfel) som fryspunkten.

Underkylning skall undvikas genom att upprätta jämvikt mellan den fasta fasen och vätskefasen.

1.4.4. **Termisk analys**

1.4.4.1. *Differentiell termisk analys (DTA)*

Genom denna metod registrerar temperaturskillnaden mellan ämnet och ett referensämne som en funktion av temperaturen medan ämnet och referensämnet utsätts för samma kontrollerade temperaturprogram. En fasövergång i provet som åtföljs av en entalpiändring visar sig genom en endoterm (smältning) eller exoterm (frysning) avvikelse från den registrerade baslinjen.

1.4.4.2. *Differentiell scanningkalorimetri (DSC)*

Genom denna metod registreras skillnaden i den energimängd som tillförs ett ämne och ett referensmaterial som en funktion av temperaturen medan ämnet och referensämnet utsätts för samma kontrollerade temperaturprogram. Denna skillnad motsvarar den energi som är nödvändig för att upprätthålla en temperaturskillnad på noll mellan ämnet och referensmaterialet. En fasövergång i provet ledsagad av en entalpiändring visar sig genom en endoterm (smältning) eller exoterm (frysning) avvikelse från den registrerade baslinjen.

1.4.5. **Flytpunkt**

Denna metod har utvecklats för petroleumoljor och är lämplig för oljeaktiga ämnen med låg smältpunkt.

Efter att provet först har värmts upp kyls det ned med en bestämd hastighet, och dess flytegenskaper undersöks med 3K:s mellanrum. Den lägsta temperaturen vid vilken rörelse av ämnet kan iakttas registreras som flytpunkten.

1.5. KVALITETSKRITERIER

I följande tabell anges de olika metodernas lämplighet och noggrannhet vid bestämning av smältpunkt/smältpunktsintervall.

TABELL: METODERNAS LÄMPLIGHET

A. Kapillärmetoder

Mätmetod	Ämnen som kan pulvriseras	Ämnen som inte lätt pulvriseras	Temperatur-område	Uppskattad exakthet(1)	Befintlig standard
Smältpunkts-anordning med vätskebad	ja	några få	273 till 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Smältpunkts-anordning med metallblock	ja	några få	293 till > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Bestämning med fotocell	ja	flera med hjälp av särskild utrustning	253 till 573 K	± 0,5 K	

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

B. Värmebord och frysmetoder

Mätmetod	Ämnen som kan pulvriseras	Ämnen som inte lätt pulvriseras	Temperatur-område	Uppskattad exakthet(1)	Befintlig standard
Koflers värmebänk	ja	nej	283 till > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Smältmikros-kop	ja	några få	273 till > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniskmetod	nej	endast för polyamider	293 till > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Fryspunkt-metoder	ja	ja	223 till 573 K	± 0,5 K	t. ex. BS 4695
(1) Beroende på typ av instrument och ämnets renhetsgrad.					

C. Termisk analys

Mätmetod	Ämnen som kan pulvriseras	Ämnen som inte lätt pulvriseras	Temperatur-område	Uppskattad exakthet(1)	Befintlig standard
Differentiell termisk analys	ja	nej	173 till 1 273 K	upp till 600 K ± 0,5 K upp till 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differentiell scanning-kalorimetri	ja	ja	173 till 1 273 K	upp till 600 K ± 0,5 K upp till 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
(1) Beroende på typ av instrument och ämnets renhetsgrad.					

D. Flytpunkt

Mätmetod	Ämnen som kan pulvriseras	Ämnen som inte lätt pulvriseras	Temperatur-område	Uppskattad exakthet(1)	Befintlig standard
Flytpunkt	för petroleum-oljor och oljeaktiga ämnen	för petroleum-oljor och oljeaktiga ämnen	223 till 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66
(1) Beroende på typ av instrument och ämnets renhetsgrad.					

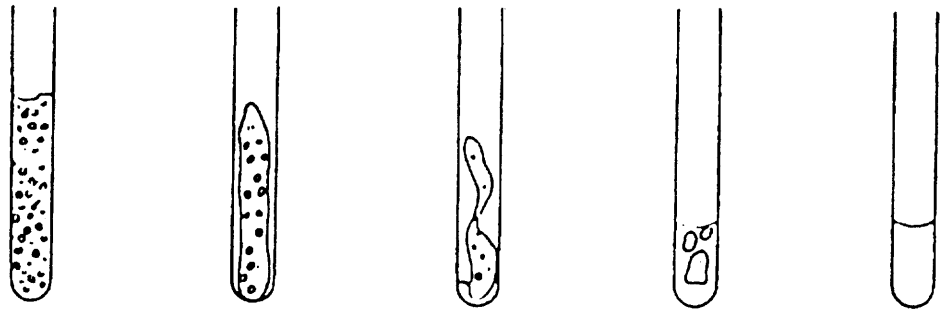
1.6. METODBESKRIVNING

Tillvägagångssättet för nästan alla testmetoderna beskrivs i internationella och nationella standarder (se tillägg 1).

1.6.1. **Kapillärrörsmetoder**

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

Figur 1



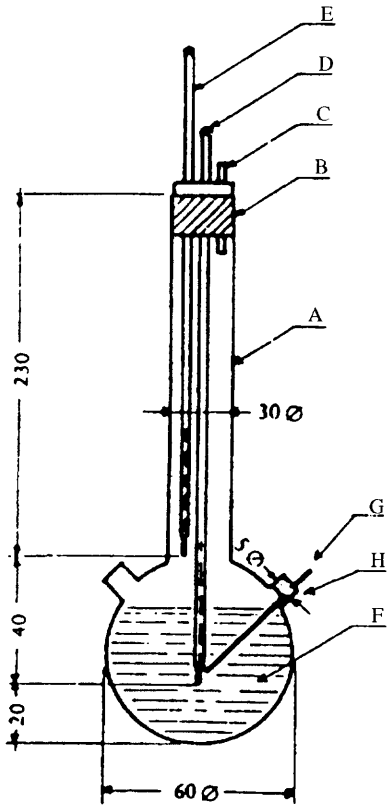
Steg A	(Begynnande smältning): Små droppar fördelar sig jämnt över kapillärrörets innervägg.
Steg B	Ett mellanrum uppstår mellan provet och innerväggen till följd av att provet krymper under smältningen.
Steg C	Det krympta provet börja sjunka mot botten och övergår i flytande form.
Steg D	En obruten menisk bildas vid ytan, men en väsentlig del av provet består fortfarande av fast ämne.
Steg E	(Slutlig smältning): Det finns inga fasta partiklar.

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

1.6.1.1. *Smältpunktsanordningar med vätskebad*

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

Figur 2



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

Badvätska:

En lämplig vätska väljs. Valet beror på den smältpunkt som skall bestämmas, t. ex. paraffinolja för smältpunkter upp till 473 K och silikonolja för smältpunkter upp till 573 K.

För smältpunkter över 523 K kan en blandning bestående av 3 delar svavelsyra och 2 delar kaliumsulfat (viktförhållande) användas. Vid användning av denna blandning skall lämpliga försiktighetsåtgärder vidtas.

Termometer:

Endast termometrar som uppfyller kraven i följande eller likvärdiga standarder bör användas:

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

Förfarande:

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

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

Badvätskan uppvärms med en temperaturstegring av ungefär 3 K/min under omrörning av vätskan. När temperaturen är ungefär 10 K under den förväntade smältpunkten ställs temperaturstegringen in till högst 1 K/min.

Beräkning:

Smältpunkten beräknas enligt följande:

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

där:

T = korrigerad smältpunkt i K

T_D = temperaturavläsning av termometer D i K

T_E = temperaturavläsning av termometer E i K

n = antal gradindelningar av den utstående delen av termometer D:s kvicksilverpelare.

1.6.1.2. *Smältpunktsanordning med metallblock*

Apparatur:

Denna består av

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

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

— ett uppvärmningssystem för metallblocket, t. ex. i form av ett elektriskt motstånd inneslutet i blocket,

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

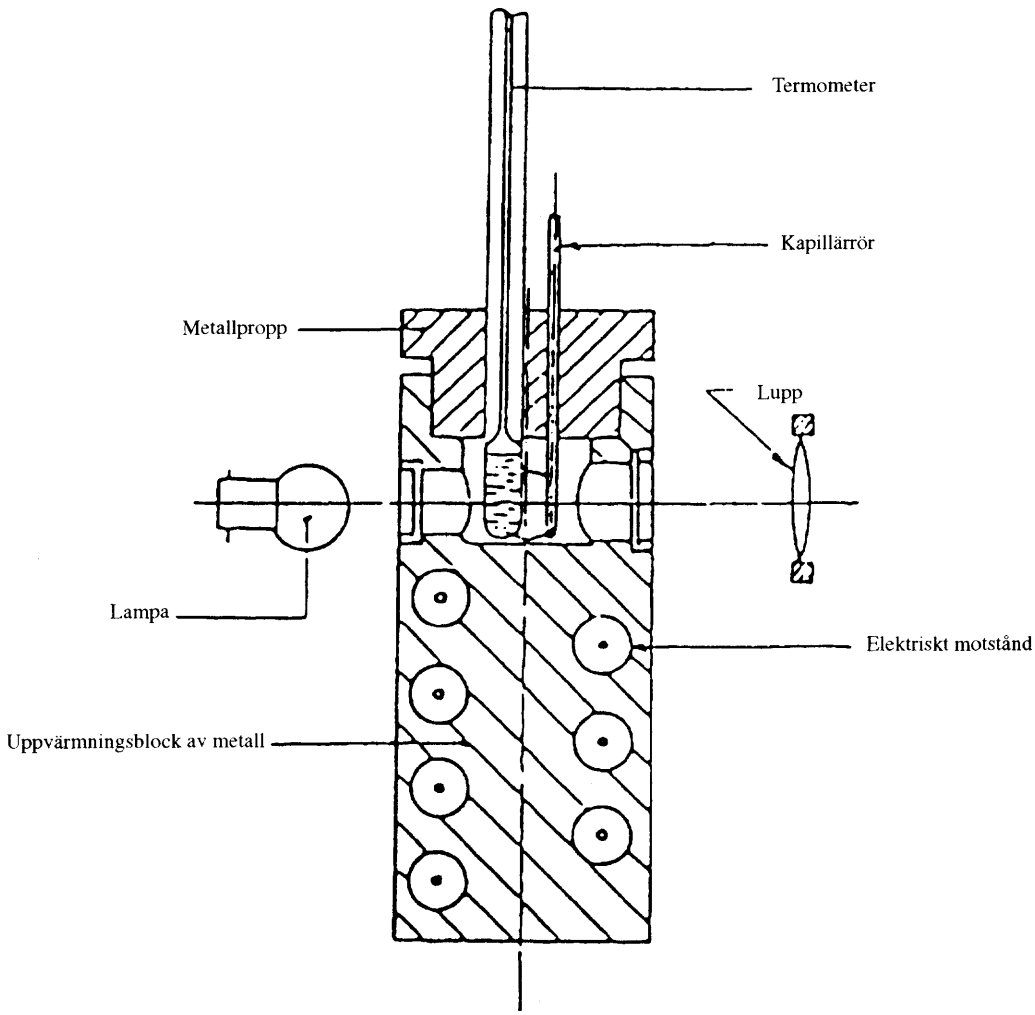
— fyra fönster av värmebeständigt glas på kammarens sidovägg, placerade diametralt och vinkelrätt mot varandra. Framför ett av dessa fönster finns en lupp monterad för iakttagelse av kapillärröret. De tre andra fönstren används för att belysa kammarens insida med hjälp av lampor,

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

Termometer:

Se standarderna i punkt 1.6.1.1. Även termoelektriska instrument med jämförbar noggrannhet kan användas.

Figur 3



1.6.1.3. *Bestämning med fotocell*

Apparatur och förfarande:

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

Flera linjära temperaturstegringar kan användas för att kalibrera apparaturen och lämplig temperaturstegring justeras elektriskt med en förvald konstant och linjär hastighet. Skrivare visar den faktiska ugnstemperaturen och temperaturen för ämnet i kapillärrören.

1.6.2. **Värmebord**

1.6.2.1 *Koflers värmebänk*

Se tillägg.

1.6.2.2. *Smältmikroskop*

Se tillägg.

1.6.2.3. *Meniskmetoden (polyamider)*

Se tillägg.

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

1.6.3. **Metoder för bestämning av fryspunkt**

Se tillägg.

1.6.4. **Termisk analys**

1.6.4.1. *Differentiell termisk analys*

Se tillägg.

1.6.4.2. *Differentiell scanningkalorimetri*

Se tillägg.

1.6.5. **Bestämning av flytpunkt**

Se tillägg.

2. **DATA**

I vissa fall är termometerkorrektion nödvändigt.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten skall, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Använd testmetod.

— Noggrann beskrivning av substansen (beteckning och orenheter) och eventuella inledande reningsåtgärder.

— Den uppskattade noggrannheten.

Som smältpunkt anges medelvärdet av minst två mätningar, som ligger inom gränserna för den uppskattade noggrannheten (se tabellerna).

Om skillnaden mellan temperaturen vid begynnande och slutlig smältning ligger inom gränsvärdena för metodens noggrannhet, anges temperaturen vid den slutliga smältningen som smältpunkten. I motsatt fall anges båda temperaturerna.

Om ämnet upplöses eller sublimeras innan smältpunkten nås anges den temperatur där detta fenomen iakttas.

Alla uppgifter och upplysningar av betydelse för tolkningen av resultaten måste anges, i synnerhet vad gäller orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, rådets beslut C(81)30 slutligt.

2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, s. 803–834.

3. R. Weissberg ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Del I, Kapitel VII.

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

Tillägg

Kompletterande tekniska upplysningar finns i följande standarder:

1. Kapillärmetoder

1.1. Smältpunktsanordningar med vätskebad

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 determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2. Smältpunktsanordningar med metallblock

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

2. Värmebord

2.1. Koflers värmebänk

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

2.2. Smältmikroskop

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Meniskmetoden (polyamider)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of "melting point"
ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du "point de fusion" Méthode du ménisque

3. **Metoder för bestämning av fryspunkt**

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. **Termisk analys**

4.1. Differentiell termisk analys

ASTM E 537-76	Standard method for asseying 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	Thermisches Analyse, Begriffe

4.2. Differentiell scanningkalorimetri

ASTM E 537-76	Standard method for asseying 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	Thermisches Analyse, Begriffe

5. **Bestämning av flytpunkt**

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. KOKPUNKT

1. METOD

De flesta av de beskrivna metoderna är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1). Grundprinciperna anges i hänvisningarna 2 och 3.

1.1. INLEDNING

De metoder och anordningar som beskrivs här kan användas för alla vätskor och ämnen med låg smältpunkt, förutsatt att det inte inträffar någon kemisk reaktion under kokpunkten (t. ex. autooxidation, omordning, nedbrytning). Metoderna kan användas för alla vätskor, oavsett renhetsgrad.

De metoder där man använder bestämning med fotocell och de som är baserade på termisk analys framhävs särskilt eftersom de kan användas för bestämning av både smält- och kokpunkter. Dessutom kan dessa mätningar utföras automatiskt.

Den "dynamiska metoden" har den fördelen att den också kan användas för bestämning av ångtryck, och det är inte nödvändigt att korrigera kokpunkten till standardtryck (101,325 kPa) eftersom standardtrycket kan ställas in med en manostat under mätningen.

Anmärkningar:

Orenheters inflytande på kokpunktsbestämningen beror i hög grad på arten av orenhet. Om provet innehåller flyktiga orenheter, som kan påverka resultaten, kan ämnet eventuellt renas.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Standardkokpunkten definieras som den temperatur vid vilken en vätskas ångtryck är 101,325 kPa..

Om kokpunkten inte mäts vid normalt atmosfäriskt tryck kan ångtryckets beroende av temperaturen beskrivas genom Clausius-Clapeyrons ekvation:

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

där:

p = ämnets ångtryck i pascal

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

R = den universella gaskonstanten = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = termodynamisk temperatur i K

Kokpunkten anges i förhållande till det aktuella trycket under mätningen.

Omvandling:

Tryck (enhet: kPa)

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

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

1 atm = standardatmosfär = 101 325 Pa
(enheten "atm" är inte tillåten).

Temperatur (enhet: K)

t = T – 273,15

t: temperatur i grader celsius (°C)

T: termodynamisk temperatur i kelvin (K)

1.3. REFERENSÄMNEN

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

I de metoder som anges i tillägget anges vissa referensämnen.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Det finns fem metoder för bestämning av kokpunkten (kokpunktsintervallet) som är baserade på mätning av den temperatur vid vilken proven kokar, och två metoder som är baserade på termisk analys.

1.4.1. **Bestämning med hjälp av ebulliometer**

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

1.4.2. **Dynamisk metod**

Genom denna metod mäts ångans förtätningstemperatur med hjälp av en lämplig termometer i återloppet vid kokning. Med denna metod kan trycket varieras.

1.4.3. **Destillationsmetod för bestämning av kokpunkt**

Genom denna metod destilleras vätskan, och ångans förtätningstemperatur och destillatmängden mäts.

1.4.4. **Siwoloboffs metod**

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

1.4.5. **Bestämning med fotocell**

Vid användning av Siwoloboffs princip sker automatisk fotoelektrisk mätning av uppstigande bubblor.

1.4.6. **Differentiell termisk analys**

Genom denna metod registrerar temperaturskillnaden mellan ämnet och ett referensämne som en funktion av temperaturen medan ämnet och referensämnet utsätts för samma kontrollerade temperaturprogram. En fasövergång i provet som åtföljs av en entalpiändring visar sig genom en endoterm (smältning) eller exoterm (frysning) avvikelse från den registrerade baslinjen.

1.4.7. **Differentiell scanningkalorimetri**

Genom denna metod registreras skillnaden i den energimängd som tillförs ett ämne och ett referensmaterial som en funktion av temperaturen medan ämnet och referensämnet utsätts för samma kontrollerade temperaturprogram. Denna skillnad motsvarar den energi som är nödvändig för att upprätthålla en temperaturskillnad på noll mellan ämnet och referensmaterialet. En fasövergång i provet som åtföljs av en entalpiändring visar sig genom en endoterm (smältning) eller exoterm (frysning) avvikelse från den registrerade baslinjen.

1.5. KVALITETSKRITERIER

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

TABELL 1: JÄMFÖRELSE AV METODERNA

Mätmetod	Uppskattad noggrannhet	Befintliga standarder
Ebulliometer	± 1,4 K (upp till 373 K)(1),(2) ± 2,5 K (upp till 600 K)(1),(2)	ASTM D 1120-72(1)
Dynamisk metod	± 0,5 K (upp till 600 K)(2)	
Destillationsprocess (kokpunktsintervall)	± 0,5 K (upp till 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboffs metod	± 2 K (upp till 600 K)(2)	
Bestämning med fotocell	± 0,3 K (vid 373 K)(2)	
Differentiell termisk kalorimetri	± 0,5 K (upp till 600 K) ± 2,0 K (upp till 1 273 K)	ASTM E 537-76
Differentiell scanningkalorimetri	± 0,5 K (upp till 600 K) ± 2,0 K (upp till 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Denna noggrannhet gäller endast för den enkla anordning som beskrivs i t. ex. ASTM D 1120-72; den kan förbättras med mer avancerade ebulliometeranordningar.
(2) Gäller endast för rena ämnen. Användning under andra omständigheter skall motiveras.

1.6. METODBESKRIVNING

Tillvägagångssättet för vissa metoder beskrivs i internationella och nationella standarder (se tillägg).

1.6.1. **Ebulliometer**

Se tillägg.

1.6.2. **Dynamisk metod**

Se testmetod A.4 för bestämning av ångtrycket.

Den kokpunkt, som iakttas vid ett tryck av 101,325 kPa, antecknas.

1.6.3. **Destillationsförlopp (kokpunktsintervall)**

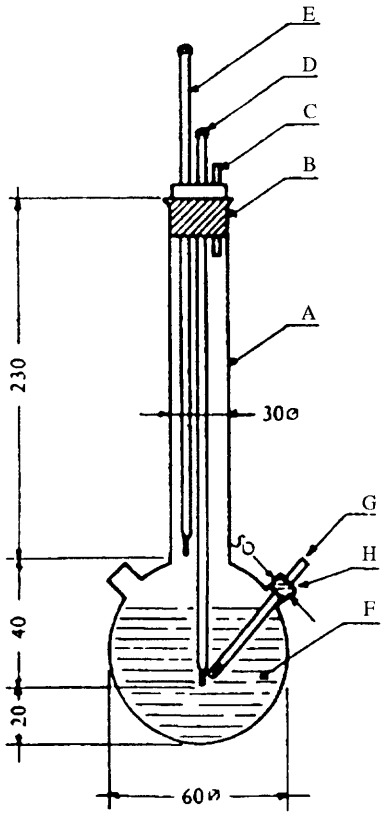
Se tillägg.

1.6.4. **Siwoloboffs metod**

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

Figur 1 visar en typ av en standardiserad smält- och kokpunktsapparat (JIS K 0064) (gjord av glas, alla mått i mm).

Figur 1



A: Mätkärl
B: Propp
C: Luftningshål
D: Termometer
E: Hjälptermometer
F: Badvätska
G: Provrör, högst 5 mm ytterdiameter, med ett ca 100 mm långt kapillärrör med en innerdiameter av ca 1 mm och en väggtjocklek av ca 0,2 - 0,3 mm.
H: Sidorör

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

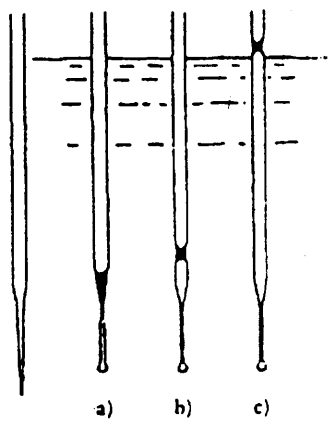
Figur 2

Siwoloboffs princip



Figur 3

Modifierad princip



Badvätskan väljs med hänsyn till kokpunkten. Vid temperaturer upp till 573 K kan silikonolja användas. Paraffinolja kan endast användas upp till 473 K. Uppvärmningen av badvätskan skall i början regleras till en temperaturstegring av 3 K/min. under omrörning. Vid ungefär 10 K under den förväntade kokpunkten sänks värmetillförseln så att temperaturstegringen blir mindre än 1 K/min. När temperaturen närmar sig kokpunkten börjar bubblor strömma ut från kapillärröret.

Kokpunkten är den temperatur då bubbelströmmen under en kortvarig temperaturminskning upphör och vätskan börjar stiga upp i kapillärröret. Termometeravläsningen visar ämnets kokpunkt.

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

1.6.5. **Bestämning med fotocell**

Provet uppvärms i ett kapillärrör i ett uppvärmt metallblock.

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

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

Denna metod är särskilt användbar eftersom den kan användas för bestämningar under rumstemperatur ned till 253,15 K (– 20 °C) utan ändringar av apparaturen. Instrumentet skall endast placeras i ett kylbad.

1.6.6. **Termisk analys**

1.6.6.1. *Differentiell termisk analys*

Se tillägg.

1.6.6.2. *Differentiell scanningkalorimetri*

Se tillägg.

2. **DATA**

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

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

där:

Δp = (101,325 - p) [observera förtecknet]

p = trycket mätt i kPa

f_T = kokpunktens ändring med trycket i K/kPa

T = uppmätt kokpunkt i K

T_n = kokpunkt korrigerad till normalt tryck i K

I ovannämnda internationella och nationella standarder finns temperaturkorrektionsfaktorer f_T för ett flertal ämnen och ekvationer för approximation av dem.

Exempelvis anges i DIN 53171 följande grova korrektioner för lösningsmedel som ingår i färger:

TABELL 2: TEMPERATURKORREKTIONSFAKTORER f_T

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

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Använd testmetod.

— Noggrann beskrivning av substansen (beteckning och orenheter) och eventuella inledande reningsåtgärder.

— Den uppskattade noggrannheten.

Som kokpunkt anges medelvärdet av minst två mätningar, som ligger inom gränserna för den uppskattade noggrannheten (se tabell 1).

De uppmätta kokpunkterna och medelvärdet av dessa skall anges, och det tryck vid vilket mätningarna gjordes skall anges i kPa. Trycket bör helst ligga i närheten av normalt atmosfäriskt tryck.

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

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, rådets beslut C(81)30 slutligt.

2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II.

3. R. Weissberg ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Del I, Kapitel VII.

Tillägg

Kompletterande tekniska uppgifter finns. i följande standarder:

1. **Ebulliometer**

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

2. **Destillationsprocess (kokpunktsintervall)**

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

3. **Differentiell termisk analys och differentiell scanningkalorimetri**

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	Thermisches Analyse, Begriffe

A. 3. RELATIV DENSITET

1. **METOD**

De flesta av de beskriva metoderna är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1). Grundprinciperna anges i hänvisning 2.

1.1. INLEDNING

De beskrivna metoderna för bestämning av relativ densitet kan användas för fasta ämnen och vätskor, oavsett renhetsgrad. De olika metoder som får användas anges i tabell 1.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

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

Ett ämnes densitet, ϱ, är kvoten av vikten, m, och dess volym, v.

Densiteten, ϱ, anges, i SI-enheter, i kg/m^3.

1.3. REFERENSÄMNEN (SE HÄNVISNING 1 OCH 3)

Referensämnen behöver inte användas varje gång ett nytt ämne skall undersökas. De skall först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Fyra metoder används.

1.4.1. **Flottörmetoder**

1.4.1.1. *Hydrometer* (för vätskor)

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

1.4.1.2. *Hydrostatisk balans* (för vätskor och fasta ämnen)

Skillnaden mellan provets vikt mätt i luft och i en lämplig vätska (t. ex. vatten) kan användas för att bestämma dess densitet.

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

1.4.1.3. *Metod med nedsänkt kula* (för vätskor) (se hänvisning 4)

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

1.4.2. **Pyknometermetoder**

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

1.4.3. **Luftjämförelsepyknometer** (för fasta ämnen)

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

1.4.4. **Oscillerande densitometer** (se hänvisning 5, 6 och 7)

En vätskas densitet kan bestämmas med en oscillerande densitometer. En mekanisk oscillator i form av ett U-rör sätts i vibration vid en viss frekvens som är beroende på oscillatorns vikt. När ett prov införs ändras oscillatorns resonansfrekvens. Apparaturen skall kalibreras med två vätskor med känd densitet. Dessa vätskor skall helst väljas så att deras densiteter spänner över hela det område som skall mätas.

1.5. KVALITETSKRITERIER

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

1.6. METODBESKRIVNING

Tillägget innehåller en lista över några standarder, från vilka ytterligare tekniska uppgifter kan inhämtas.

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

2. **DATA**

Se standarder.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten skall, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Använd testmetod.

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter) och eventuella inledande reningsåtgärder.

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

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

TABELL: METODERNAS LÄMPLIGHET

Mätmetod	Densitet		Maximal dynamisk viskositet	Befintliga standarder
	Fasta	Vätskor		
1.4.1.1. Hydrometer		ja	5 Pa s	ISO 387 ISO 649-2 NF T 20-050
1.4.1.2. Hydrostatisk balans				
a) fasta ämnen	ja			ISO 1183 (A)
b) vätskor		ja	5 Pa s	ISO 901 och 758
1.4.1.3. Metod med nedsänkt kula		ja	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pyknometer				ISO 3507
a) fasta ämnen	ja			ISO 1183 (B) NF T 20-053
b) vätskor		ja	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Luftjämförelsepyknometer	ja			DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
1.4.4. Oscillerande densitometer		ja	5 Pa s	

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, rådets beslut C(81) 30 slutligt.

2. R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., kapitel IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, del 1.

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

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

5. Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, s. 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, s. 717–726.

7. Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, s. 253–255.

Tillägg

Kompletterande tekniska uppgifter finns i följande standarder:

1. FLOTTÖRMETODER

1.1. Hydrometer

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

1.2. Hydrostatisk balans

För fasta ämnen

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

För vätskor

ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 och ASTM D 1481-62

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

1.3. Metod med nedsänkt kula

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

2. PYKNOMETERMETODER

2.1. För vätskor

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (för icke-flyktiga vätskor som inte är för viskösa)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (för vätskor med kinematisk viskositet under 100×10^{-6} m^2s^{-1} vid 15 °C)

DIN 12800	Sprengel pycnometer (för vätskor enligt DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (för vätskor med kinematisk viskositet under $100 \cdot 10^{-6}$ m^2s^{-1} vid 20 °C, särskilt lämplig även för kolväten och vattenlösningar samt för vätskor med högre ångtryck, cirka 1 bar vid 90 °C)
DIN 12806	Hubbard pycnometer (för alla typer av viskösa vätskor som inte har för högt ångtryck, särskilt även för färg, lacker och bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (för vätskor enligt DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (särskilt för etanol-vattenblandningar)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tubes (för vätskor som inte är för tjockflytande)
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 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. För fasta ämnen

ISO 1183	Metod B i Method for Determining the Density and Relative Density of Plastics excluding Cellular Plastics
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pycnometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **LUFTJÄMFÖRELSEPYKNOMETER**

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

A. 4. ÅNGTRYCK

1. METOD

De flesta av de beskrivna metoder som beskrivs är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1). Grundprinciperna anges i hänvisningarna 2 och 3.

1.1. INLEDNING

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

Det finns inte någon enskild metod som kan användas över hela ångtrycksområdet. Därför rekommenderas flera metoder för mätning av ångtryck från < 10^{-4} till 10^5 Pa.

Orenheter inverkar normalt på ångtrycket och graden av denna inverkan beror i hög grad på arten av orenhet.

Om provet innehåller flyktiga orenheter som kan inverka på resultatet kan ämnet renas. Det kan också vara lämpligt att ange ångtrycket för det tekniska materialet.

För vissa av de metoder som beskrivs här används apparater med metalldelar. Detta bör beaktas vid undersökning av frätande ämnen.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Ett ämnes ångtryck definieras som mättnadstrycket över ett fast ämne eller en vätska. Vid termodynamisk jämvikt är ett rent ämnes ångtryck endast en funktion av temperaturen.

Den SI-enhet för tryck som används är pascal (Pa).

Nedan följer några enheter som tidigare har använts, och deras omvandlingsfaktorer:

1 Torr (= 1 mm Hg)	= 1,333 x 10^2 Pa
1 atmosfär	= 1,013 x 10^5 Pa
1 bar	= 10^5 Pa

SI-enheten för temperatur är kelvin (K).

Den universella gaskonstanten R är 8,314 J mol^{-1} K^{-1}.

Temperaturens beroende av ångtrycket beskrivs genom Clausius-Clapeyrons ekvation:

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

där:

p	= ämnets ångtryck i pascal
ΔH_v	= ämnets förångningsvärme i J mol^{-1}
R	= den universella gaskonstanten i J mol^{-1} K^{-1}
T	= termodynamisk temperatur i K

1.3. REFERENSÄMNEN

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

1.4.1. **Dynamisk metod**

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

Rekommenderat område:

10^3 till 10^5 Pa.

Denna metod rekommenderas även för bestämning av normal kokpunkt och kan användas i detta syfte upp till 600 K.

1.4.2. **Statisk metod**

Med den statiska metoden bestäms ångtrycket i ett slutet system, som är i termodynamisk jämvikt vid en given temperatur. Denna metod lämpar sig för fasta ämnen och vätskor som består av en eller flera komponenter.

Rekommenderat område:

10 upp till 10^5 Pa.

Denna metod kan också användas i området 1 till 10 Pa, under förutsättning att försiktighet iakttas.

1.4.3. **Isoteniskop**

Denna standardiserade metod är också en statisk metod men den kan normalt inte användas för flerkomponentssystem. Ytterligare information finns i ASTM metod D-2879-86.

Rekommenderat område:

100 till 10^5 Pa.

1.4.4. **Effusionsmetod: Ångtrycksjämvikt**

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

Rekommenderat område:

10^{-3} till 1 Pa.

1.4.5. **Effusionsmetod: genom viktförlust eller med en kylfälla**

Denna metod är baserad på bestämning av den mängd testämne som under ultravakuum strömmar ut från en Knudsen-cell (se hänvisning 4) genom en mikroöppning per tidsenhet i gasform. Volymen av den utströmmade ångan kan konstateras antingen genom att bestämma cellens viktförlust eller genom att kondensera ångan vid låg temperatur och bestämma den förångade mängden ämne genom kromatografisk analys. Ångtrycket beräknas med användning av Hertz-Knudsen-relationen.

Rekommenderat område:

10^{-3} till 1 Pa.

1.4.6. **Gasmättnadsmetod**

En ström av inert bärargas leds över ämnet på ett sådant sätt att den mättas med ångan. Den mängd material som en känd bärargas transporterar kan antingen mätas genom insamling i en lämplig fälla eller genom in-line analys. Utifrån detta kan ångtrycket vid en given temperatur beräknas.

Rekommenderat område:

10^{-4} till 1 Pa.

Denna metod kan också användas i området 1 till 10 Pa, under förutsättning att försiktighet iakttas.

1.4.7. **Rotormetod**

Med denna metod är det egentliga mätinstrumentet en liten stålkula som svävar i ett magnetfält och roterar med hög hastighet. Gastrycket utleds av den tryckavhängiga bromsningen av stålkulan.

Rekommenderat område:

10^{-4} till 0,5 Pa.

1.5. KVALITETSKRITERIER

I följande tabell jämförs de olika metoderna för bestämning av ångtrycket med hänsyn till användning, repeterbarhet, reproducerbarhet, mätområde och befintlig standard.

TABELL: KVALITETSKRITERIER

Mätmetod	Ämnen		Uppskattad repeterbarhet(1)	Uppskattad reproducerbarhet(1)	Rekommenderat område	Befintlig standard
	Fasta	Vätskor				
1.4.1. Dynamisk metod	Låg smältning	ja	Upp till 25 %	Upp till 25 %	10^3 Pa till 2×10^3 Pa	—
			1 till 5 %	1 till 5 %	2×10^3 Pa till 10^5 Pa	—
1.4.2. Statisk metod	ja	ja	5 till 10 %	5 till 10 %	10 Pa till 10^5 Pa(2)	NFT 20-048 (5)
1.4.3. Isoteniskop	ja	ja	5 till 10 %	5 till 10 %	10^2 Pa till 10^5 Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4. Effusionsmetod Ångtrycksvåg	ja	ja	5 till 20 %	Upp till 50 %	10^{-3} Pa till 1 Pa	NFT 20-047 (6)
1.4.5. Effusionsmetod Viktförlust	ja	ja	10 till 30 %	—	10^{-3} Pa till 1 Pa	—
1.4.6. Gasmättnadsmetod	ja	ja	10 till 30 %	Upp till 50 %	10^{-4} Pa till 1 Pa(2)	—
1.4.7. Rotormetod	ja	ja	10 till 20 %	—	10^{-4} Pa till 0,5 Pa	—

(1) Beroende på renhetsgrad.
(2) Denna metod kan också användas i området 1 till 10 Pa, under förutsättning att försiktighet iakttas.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Dynamisk mätning**

1.6.1.1. *Apparatur*

Mätinstrumentet består typiskt av ett kokkärl med ansluten kylare av glas eller metall (se figur 1), utrustning för mätning av temperaturen och utrustning för reglering och mätning av trycket. En typisk mätutrustning, som den som visas på ritningen, är gjord av värmebeständigt glas och består av fem delar:

Ett stort, delvis dubbelväggigt rör som består av ett slipat förband, en kylare, ett kylkärl och ett inlopp.

En glascylinder med en Cottrell-pump är monterad på rörets koksektion och har en grov yta av krossat glas för att undvika "stötkokning".

Temperaturen mäts med en lämplig temperaturgivare (t. ex. motståndstermometer eller termoelement med mantel) som har förts in i instrumentet helt till mätpunkten (se figur 1, nr. 5) genom ett lämpligt inlopp (t. ex. slipat hanförband).

De nödvändiga anslutningarna görs till tryckreglerings- och mätutrustningen.

Kolven, som fungerar som en buffertvolym, är ansluten till mätapparaten med ett kapillärrör.

Kokkärlet värms upp med ett värmeelement (t. ex. värmepatron) som sätts in i glasapparaturen nedifrån. Önskad strömstyrka ställs in och mäts med ett termoelement.

Det vakuum på mellan 10^2 Pa och omkring 10^5 Pa som krävs ställs in med en vakuumpump.

En passande ventil används för att reglera trycket med luft eller kväve (mätområde ca 10^2 till 10^5 Pa) och för utluftning.

Trycket mäts med en manometer.

1.6.1.2. *Mätförfarande*

Ångtrycket mäts genom bestämning av provets kokpunkt vid olika angivna tryck mellan ungefär 10^3 och 10^5 Pa. En jämn temperatur under konstant tryck visar att kokpunkten är nådd. Skummande ämnens ångtryck kan inte mätas med denna metod.

Ämnet placeras i det rena torkade testkärlet. Det kan uppstå problem med fasta ämnen som inte är i pulverform, men detta kan ibland undvikas genom att värma upp kylmanteln. Sedan kärlet fyllts sammanflänsas apparaten och ämnet avgasas. Därefter ställs lägsta önskat tryck in och uppvärmningen sätts på. Samtidigt ansluts temperaturgivaren till en skrivare.

Jämvikt har nåtts när en konstant kokpunkt registreras vid konstant tryck. Man skall särskilt se till att stötkokning inte förekommer. Dessutom måste fullständig kondensation ske i kylaren. Vid bestämning av ångtrycket av fasta ämnen med låg smältpunkt skall man se till att kylaren inte täpps till.

Sedan jämviktspunkten har registrerats ställs ett högre tryck in. Processen fortsätter på samma sätt tills 10^5 Pa har uppnåtts (sammanlagt ungefär 5-10 mätpunkter). I kontrollsyfte skall jämviktspunkterna upprepas vid avtagande tryck.

1.6.2. **Statisk mätning**

1.6.2.1. *Apparatur*

Apparaten består av en provbehållare och ett uppvärmnings- och kylsystem för att reglera och mäta provets temperatur. Apparaten omfattar dessutom utrustning för inställning och mätning av trycket. Grundprinciperna framgår av figur 2a och 2b.

Provkammaren (se figur 2a) är på den ena sidan avgränsad av en lämplig högvakuumventil och på den andra sidan förbunden med ett U-rör som innehåller lämplig manometervätska. Den ena änden av U-röret är ansluten till vakuumpumpen, till kvävecylindern eller utluftningsventilen och en manometer.

En tryckmätare med en separat visare kan användas i stället för U-röret (se figur 2b).

Provets temperatur styrs genom att provkärlet, inklusive ventil och U-rör, placeras i ett bad som har en konstant temperatur av ± 0,2 K. Temperaturen mäts på provkärlets utsida eller i själva kärlet.

En vakuumpump med en kylfälla för evakuering av apparaten används.

I metod 2a mäts ämnets ångtryck indirekt med en nollindikator. Därvid beaktas att densiteten av vätskan i U-röret ändrar sig vid stora temperaturförändringar.

Följande vätskor är lämpliga som nollindikatorer i U-röret och väljs med hänsyn till tryckområdet och testämnets kemiska egenskaper: silikonvätskor och ftalater. Testämnet får inte kunna lösas väsentligt i eller reagera med vätskan i U-röret.

I manometern kan man använda kvicksilver i området från normalt lufttryck till 10^2 Pa, medan silikonvätskor och ftalater är lämpliga från 10^2 Pa ned till 10 Pa. Värmebeständiga membrankondensatormanometrar kan till och med användas under 10^{-1} Pa. Det finns även andra tryckmätare som kan användas under 10^2 Pa.

1.6.2.2. *Mätförfarande*

Före mätningen skall alla delar av apparaten i figur 2 rengöras och torkas noggrant.

Vid metod 2a fylls U-röret med önskad vätska, som avgasas vid förhöjd temperatur före avläsning.

Testämnet placeras i apparaten som sedan stängs varvid temperaturen sänks tillräckligt för avgasning. Temperaturen måste vara så pass låg att luften sugs ut, men i fråga om flerkomponentsystem får det inte ske någon ändring av materialets sammansättning. Vid behov kan jämvikt erhållas snabbare genom omrörning.

Provet kan underkylas med t. ex. flytande kväve (varvid försiktighet iakttas för att undvika kondensering av luft eller pumpvätska) eller en blandning av etanol och kolsyresnö. Vid mätning av låga temperaturer används ett temperaturreglerat bad som är anslutet till en ultrakryomat.

Med ventilen över provkammaren i öppet läge pumpas därefter den inneslutna luften ut ur apparaten i flera minuter. Därefter stängs ventilen och provet kyls till lägsta vald temperatur. Vid behov upprepas avgasningsproceduren.

När provet värms upp ökar ångtrycket. Detta ändrar jämvikten hos vätskan i U-röret. För att kompensera detta leds kväve eller luft in i apparaten via en ventil tills tryckindikatorvärskan åter är på noll. Det tryck som krävs för detta avläses på en precisionsmanometer vid rumstemperatur. Detta tryck motsvarar ämnets ångtryck vid den särskilda mättemperatur.

Metod 2b är en liknande metod, men ångtrycket avläses direkt.

Ångtryckets temperaturberoende bestäms med tillräckligt små temperaturintervall (omkring 5 till 10 mätpunkter totalt) upp till önskat maximum. Lågtemperaturmätningar måste upprepas i kontrollsyfte.

En eventuell avvikelse mellan de nya värdena och den kurva som erhållits vid stigande temperatur kan bero på att

1. provet fortfarande innehåller luft (t. ex. ämnen med hög viskositet) eller lågkokande ämnen, som frigjorts under uppvärmningen och kan avlägsnas genom ytterligare underkylning,

2. nedkylningstemperaturen inte är tillräckligt låg, varvid flytande kväve används som kylmedel;

om antingen 1 eller 2 är fallet måste mätningarna upprepas;

3. det sker en kemisk reaktion i ämnet det undersökta temperaturområdet (t. ex. dekomposition eller polymerisation).

1.6.3. Isoteniskop

En fullständig beskrivning av denna metod finns i hänvisning 7. Mätanordningens princip framgår av figur 3. I likhet med den statiska metoden, som beskrivits i 1.6.2., lämpar sig isoteniskopet för undersökning av fasta ämnen eller vätskor.

Vid mätning av vätskor fungerar själva ämnet som hjälpmanometervätska. Den mängd ämne som behövs för att fylla klotet och manometersektionens korta arm placeras i isoteniskopet. Isoteniskopets förbinds med ett vakuumsystem, evakueras och fylls med kväve. Evakueringen och rensningen av systemet upprepas två gånger så att alla kväverester avlägsnas. Det fyllda isoteniskopet placeras horisontellt så att provet fördelas i ett tunt lager i provkolven och manometersektionen (U-delen). Trycket i systemet minskas till 133 Pa och provet värms försiktigt upp tills det nästan kokar (avlägsnande av upplösta fixerade gaser). Isoteniskopet placeras sedan så att provet återgår till klotet och manometerns korta arm och båda är helt fyllda med vätska. Samma tryck som vid avgasning upprätthålls. Provkolvens utdragna topp värms försiktigt upp med en liten låga tills den ånga som bildas utvidgas tillräckligt för att pressa ut en del av provet från klotets översta del och manometerarm till isoteniskopets manometersektion, varvid ett ångfyllt, kvävefritt område skapas.

Isoteniskopet placeras sedan i ett bad med konstant temperatur och kvävetrycket ställs in tills det motsvarar provets tryck. Att tryckjämvikt föreligger framgår av isoteniskopets manometersektion. Vid jämvikt motsvarar kvävets ångtryck ämnets ångtryck.

När det gäller fasta ämnen används, beroende på tryck och temperaturområde, de manometervätskor som anges i 1.6.2. Den avgasade manometervätskan fylls in i utbuktningen på isoteniskopets långa arm. Därefter placeras det fasta testämnet i klotet och avgasas vid förhöjd temperatur. Sedan lutas isoteniskopet så att manometervätskan kan flyta in i U-röret. Mätningen av ångtrycket som en funktion av temperaturen utförs enligt 1.6.2.

1.6.4. Effusionsmetod: Ångtrycksvåg

1.6.4.1. *Apparatur*

I litteraturen (se hänvisning 1) beskrivs flera olika apparaturutformningar. Den apparat som beskrivs här illustrerar de principer som används (se figur 4). Figur 4 visar apparaturens huvudkomponenter: en högvakuumbehållare av rostfritt stål eller glas, utrustning för att producera och mäta vakuum och inbyggda komponenter för mätning av ångtrycket på en våg. Apparaturen innehåller följande inbyggda komponenter:

— En förångningsugn med fläns och roterande intag. Förångningsugnen är en cylindrisk behållare gjort av t. ex. koppar eller en kemiskt beständig legering med god värmeledningsförmåga. Man kan också använda en glasbehållare med kopparvägg. Ugnen har en diameter av ca 3 till 5 cm och en höjd av 2 till 5 cm. Det finns en till tre öppningar av olika storlek för ångströmmen. Ugnen värms upp antingen av en värmeplatta nedtill

eller av en värmeslinga runt utsidan. För att undvika avledning av värme till bottenplattan är värmeaggregatet fastgjort i denna med en metall med låg värmeledningsförmåga (nickel-silver eller kromnickelstål), t. ex. ett nickel-silverrör fastsatt i ett roterade intag, om man använder en ugn med flera öppningar. En sådan uppställning har den fördelen att det möjliggör införande av en kopparstång, vilket tillåter kylning från utsidan med ett vattenbad.

— Om ugnslocket, som är gjort av koppar, har tre öppningar med olika tvärsnitt, inbördes förskjutna 90 °C, kan olika ångtrycksområden inom den totala mätområdet täckas (öppningar med diametrar på ca 0,30 till 4,50 mm). Stora öppningar används för lågt ångtryck och vice versa. Genom att vrida ugnen kan önskad ugnsöppning eller ett mellanläge i ångströmmen (ugnsöppning – skärm – vågskål) ställas in och molekylstrålen riktas eller avledas genom ugnsöppningen mot vågskålen. För att kunna mäta ämnets temperatur monteras ett termoelement eller en motståndstermometer på lämpligt ställe.

— Ovanför skärmen finns en vågskål med en mycket känslig mikrovåg (se nedan). Vågskålen är omkring 30 mm i diameter. Guldpläterad aluminium är ett lämpligt material.

— Vågskålen omges av en cylindrisk kylbox av mässing eller koppar. Beroende på typ av våg är den försedd med öppningar för vågbalken och en skärmöppning för molekylströmmen och den skall garantera total kondensation av ångan på vågskålen. Värmen leds bort till utsidan av t. ex. en kopparstång ansluten till kylboxen. Stången leds genom bottenplattan och är värmeisolerad från denna med t. ex. ett rör av kromnickelstål. Stången sänks ned i ett dewarkärl med flytande kväve under bottenplattan, eller så leds flytande kväve genom stången. Temperaturen i kylboxen hålls på så sätt vid omkring –120 °C. Vågskålen kyls ned uteslutande genom strålning, vilket är lämpligt för det tryckområde som undersöks (nedkylning omkring 1 timme före mätning påbörjas).

— Vågen placeras ovanför kylboxen. Lämpliga vågar är t. ex. en högkänslig 2-armad elektronisk mikrovåg (se hänvisning 8) eller ett högkänsligt vridspoleinstrument (se OECD Test Guideline 104, Edition 12.05.81).

— På bottenplattan finns också elektriska anslutningar för termoelement (eller motståndstermometrar) och värmeslingor.

— Ett vakuum erhålls i kärlet med hjälp av en partiell vakuumpump eller en högvakuumpump (krävt vakuum omkring 1 till 2 . 10^{-3} Pa, erhållet efter 2 timmars pumpning). Trycket regleras med en lämplig joniseringsmanometer.

1.6.4.2. *Mätförfarande*

Kärlet fylls med testämnet och locket stängs. Skärmen och kylboxen skjuts på plats över ugnen. Apparaten stängs och vakuumpumparna sätts på. Sluttrycket innan mätningen påbörjas skall vara ungefär 10^{-4} Pa. Nedkylning av kylboxen sätts igång vid 10^{-2} Pa .

När tillräckligt vakuum har uppnåtts inleds kalibreringsserien vid den lägsta temperaturen. Den nödvändiga öppningen öppnas och ångstrålen passerar skärmen, som är direkt monterad över locket, och träffar sedan den nedkylda vågskålen. Vågskålen skall vara så stor att hela den ångstråle som leds genom skärmen träffar den. Ångstrålens impuls överför en kraft på vågskålen och molekylerna kondenseras på dess nedkylda yta.

Impulsen och den samtida kondensationen frambringar en signal på skrivaren. Utvärdering av denna signal ger två upplysningar:

1. Med den särskilda apparat som beskrivs här bestäms ångtrycket direkt från den impuls som överförs till vågskålen (molekylvikten behöver inte vara känd (se hänvisning 2)). Vid utvärdering av avläsningarna måste man ta hänsyn till geometriska faktorer, såsom ugnsöppning och molekylstrålens vinkel.

2. Samtidigt kan den kondenserade vikten mätas och avdunstningshastigheten beräknas utifrån detta. Ångtrycket kan även beräknas utifrån avdunstningshastigheten och molekylvikten med användning av Hertz ekvation (se hänvisning 2):

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

där:

G = avdunstningshastighet (kg s^{-1} m^{-2})
M = molekylvikt (g mol^{-1})
T = temperatur (K)
R = universell gaskonstant (J mol^{-1} K^{-1})
p = ångtryck (Pa)

När tillräckligt vakuum har uppnåtts börjar serien av mätningar vid den lägsta önskade mättemperaturen.

För ytterligare mätningar ökas temperaturen med små intervaller tills den högsta önskade temperaturen är uppnådd. Därefter kyls provet ned igen och en andra ångtryckskurva kan registreras. Om den andra testomgången inte bekräftar resultaten från den första omgången kan detta bero på att ämnet bryts ned i det undersökta temperaturområdet.

1.6.5. **Effusionsmetod: Viktförlust**

1.6.5.1. *Apparatur*

En effusionsapparat består av följande baskomponenter:

— En behållare som kan termostatregleras och evakueras och i vilken effusionscellerna placeras.

— En högvakuumpump (t. ex. diffusionspump eller turbomolekylärpump) med vakuummätare.

— En kylfälla med flytande kväve eller kolsyresnö.

En elektriskt uppvärmd vakuumbehållare av aluminium med 4 effusionsceller av rostfritt stål visas i figur 5 som ett exempel. Den rostfria folien som är omkring 0,3 mm tjock har en effusionsöppning med en diameter av 0,2 till 1,0 mm och är ansluten till effusionscellen med ett skruvlock.

1.6.5.2. *Mätförfarande*

Referens- och testämnet tillsätts i varje effusionscell, metallmembranet med öppningarna sätts fast med skruvlocket, och varje cell vägs till 0,1 mg noggrannhet. Cellen placeras i den termostatreglerade apparaten som sedan evakueras till mindre än en tiondedel av det förväntade trycket. Med i förväg fastställda intervaller på mellan 5 och 30 timmar tillförs luft i apparaten och viktförlusten i effusionscellerna bestäms genom vägning.

För att säkerställa att resultaten inte påverkas av flyktiga orenheter vägs cellerna vid fastställda tidsintervaller för att kontrollera att avdunstningshastigheten är konstant under minst två sådana tidsintervaller.

Ångtrycket p i effusionscellen beräknas genom

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

där:

p = ångtrycket (Pa)
m = massan av den mängd ämne som lämnar cellen under tiden t (kg)
t = tiden (s)
A = öppningens area (m^2)
K = korrektionsfaktor
R = universell gaskonstant (J mol^{-1} Kh^{-1})
T = temperaturen (K)
M = molekylvikten (kg mol^{-1})

Korrektionsfaktorn K beror på förhållandet mellan den cylindriska öppningens längd och radie:

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

Ovanstående ekvation kan också skrivas som

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

där $E = \frac{1}{KA}\sqrt{2\pi R}$ är effusionscellkonstanten.

Denna effusionscellkonstant E kan bestämmas med referensämnen (2.9) med användning av följande ekvation:

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

där:

p(r) = referensämnets ångtryck (Pa)

M(r) = referensämnets molekylvikt (kg mol^{-1})

1.6.6. **Gasmättnadsmetod**

1.6.6.1. *Apparatur*

En typisk apparat som används till detta test består av de komponenter som visas i figur 6a och beskrivs nedan (se hänvisning 1).

Inert gas:

Bärargasen får inte reagera kemiskt med testämnet. Normalt är det tillräckligt att använda kväve för detta syfte men ibland kan andra gaser krävas (se hänvisning 10). Den använda gasen skall vara torr (se figur 6a, position 4: Givare. Relativ fuktighet).

Flödesreglering:

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

Fällor för uppsamling av ånga:

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

Som alternativ till uppsamling av ånga och efterföljande analys kan in-line analystekniker, t. ex. kromatografi, användas för kvantitativ bestämning av den mängd material som en känd mängd bärargas för med sig. Dessutom kan provets förlust av massa mätas.

Värmeväxlare:

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

Mättnadskolonn:

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

För att minska masstransport genom diffusion kan ett kapillärrör placeras efter mättnadskolonnen (se figur 6b).

1.6.6.2. *Mätförfarande*

Förberedelse av mättnadskolonnen:

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

Mätning:

Fällorna eller in-line detektoren ansluts till kolonnens utlopp och tiden registreras. Flödeshastigheten kontrolleras i början och med jämna mellanrum under testet med en bubbelmätare (eller kontinuerligt med en massflödesmätare).

Trycket vid mättnadskolonnens utgångsöppning skall mätas. Detta kan göras

a) genom att en tryckmätare insätts mellan mättnadskolonnen och fällorna (vilket kan vara otillfredsställande eftersom det ökar dödvolymen och adsorptionsytan), eller

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

Den tid som krävs till uppsamling av den mängd provämne som behövs för de olika analysmetoderna, bestäms vid preliminära försök eller genom uppskattningar. Som ett alternativ till uppsamling av ämnet för senare analys kan kvantitativa in-line analystekniker användas (t. ex. kromatografi). För beräkning av ångtrycket vid en given temperatur utförs preliminära försök för att bestämma den maximala flödeshastigheten vid vilken bärargasen mättas fullständigt med ämnets ånga. Detta säkerställs om bärargasen leds genom mättnadskolonnen så pass sakta att en lägre hastighet inte ger ett större beräknat ångtryck.

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

Den mängd ämne som en känd volym bärargas transporterar bestäms.

1.6.6.3. *Beräkning av ångtryck*

Ångtrycket beräknas utifrån ångans densitet, W/V, genom ekvationen:

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

där:

p = ångtrycket (Pa)
W = vikten av adsorberat provämne (g)
V = volymen mättad gas (m^3)
R = universell gaskonstanten (J mol^{-1} K^{-1})
T = temperaturen (K)
M = testämnets molekylvikt (g mol^{-1}).

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

1.6.7. **Rotormetod (se hänvisning 8, 11, 13)**

1.6.7.1 *Apparatur*

Rotormetoden kan utföras med en viskocitetsmätare med en roterande kula enligt figur 8. En schematisk ritning av försöksuppställningen visas i figur 7.

Mätapparaten består typiskt av ett mäthuvud med roterande kula placerad i en termostatreglerad inhägnad (reglerad inom 0,1 °C). Provbehållaren placeras i en termostatreglerad inhägnad (reglerad inom 0,01 °C) och alla andra delar i utrustningen hålls vid en högre temperatur för att förhindra kondensation. En högvakuumpumpanordning ansluts till systemet genom högvakuumventiler.

Mäthuvudet består av en stålkula (4 till 5 mm i diameter) i ett rör. Kulan hålls stabilt svävande av ett magnetfält, normalt genom en kombination av permanentmagneter och styrspolar.

Kulan sätts i rörelse med hjälp av roterande fält som produceras av spolarna. Rotationshastigheten mäts med detektorspolar, som mäter den alltid närvarande svaga tvärmagnetiseringen av kulan.

1.6.7.2 *Mätförfarande*

När kulan har nått en bestämd rotationshastighet v(o) (normalt omkring 400 varv per sekund), avbryts energitillförseln, och gasfriktionen börjar retardera kulans rotation.

Minskningen av rotationshastighet mäts som en funktion av tiden. När den friktion som orsakats av den magnetiska suspensionen är försumbar i jämförelse med gasfriktionen, bestäms gastrycket p genom:

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

där:

$\bar{c}$ = gasmolekylernas medelhastighet
r = kulans radie
ρ = kulans massdensitet
σ = koefficient av tangentiell impulsöverföring (ε = 1 för en ideal sfärisk kulyta)
t = tid
v(t) = rotationshastighet efter tid t
v(o) = initial rotationshastighet

Denna ekvation kan även skrivas

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

där t_n, t_{n-1} är den tid som krävs för ett givet antal N varv. Dessa tidsintervaller t_n, t_{n-1} följer på varandra och $t_n > t_{n-1}$.

Gasmolekylens medelhastighet c bestäms genom

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

där:

T = temperaturen
R = universella gaskonstanten
M = molekylvikten

2. DATA

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

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Använd metod.

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter) och eventuella inledande reningsåtgärder.

— Minst två värden för ångtryck och temperatur, helst i området 0 — 50 °C.

— Alla rådata.

— En kurva över log p, som funktion av 1/T.

— En beräkning av ångtrycket vid 20–25 °C.

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

— Förändringens art.

— Temperatur vid vilken förändringen inträffar vid atmosfäriskt tryck.

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

Alla uppgifter och upplysningar av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras, särskild vad gäller orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 104, rådets beslut C(81) 30 slutlig.

2. Ambrose, D. i 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., kapitel IX, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, del 1.

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

5. NF T 20-048 AFNOR (Sept., 85). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-1} to 10^{5} Pa – Static method.

6. NF T 20-047 AFNOR (Sept., 85). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

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

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

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

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

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

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

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

Tillägg 1

Utvärderingsmetod

INLEDNING

Man kan använda beräknade värden av ångtrycket för att

— bestämma vilken försöksmetod som är lämplig,

— göra en bedömning eller fastställa ett gränsvärde om man av tekniska orsaker (inbegripet när ångtrycket är mycket lågt) inte kan använda försöksmetoder,

— konstatera i vilket fall det är berättigat att avstå från försöksmätningar till följd av att ångtrycket sannolikt kommer att vara < 10^{-5} Pa vid omgivningstemperatur.

BEDÖMNINGSMETOD

Vätskors och fasta ämnens ångtryck kan bedömas genom användning av den modifierade Watson-korrelationen (se hänvisning a). De enda testdata som är nödvändiga är den normala kokpunkten. Metoden kan användas vid ett tryckområde från 10^5 Pa till 10^{-5} Pa.

Närmare information om metoden finns i "Handbook of Chemical Property Estimation Methods" (se hänvisning b).

BERÄKNINGSFÖRFARANDE

I enlighet med hänvisning b beräknas ångtrycket enligt följande:

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

där:

T = Den gällande temperaturen

T_b = Normal kokpunkt

P_{vp} = Ångtryck vid temperatur T

ΔH_{vb} = Förångningsvärme

ΔZ_b = Kompressionsfaktor (beräknad till 0,97)

m = Empirisk faktor beroende av det fysiska tillståndet hos den gällande temperaturen

Dessutom:

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

där K_F är en empirisk faktor som beaktar ämnets polaritet. I hänvisning b finns det en förteckning med K_F-faktorer för flera typer av föreningar.

Det är ganska vanligt med data som anger kokpunkt vid sänkt tryck. I sådana fall kan man i enlighet med hänvisning b beräkna ångtrycket på följande sätt:

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

där T_1 är kokpunkten vid sänkt tryck P_1.

RAPPORT

När utvärderingsmetoden används skall rapporten inbegripa en omfattande dokumentation av beräkningen

LITTERATUR

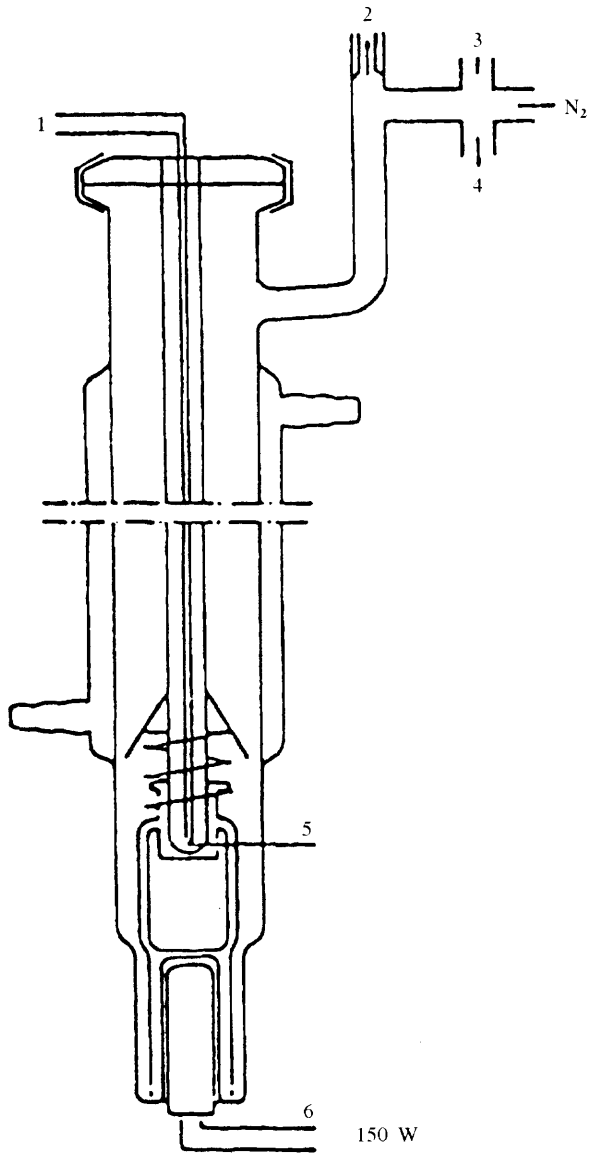
a. K. M. Watson, Ind. Eng. Chem; 1943, vol. 35, s. 398.

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

Tillägg 2

Figur 1

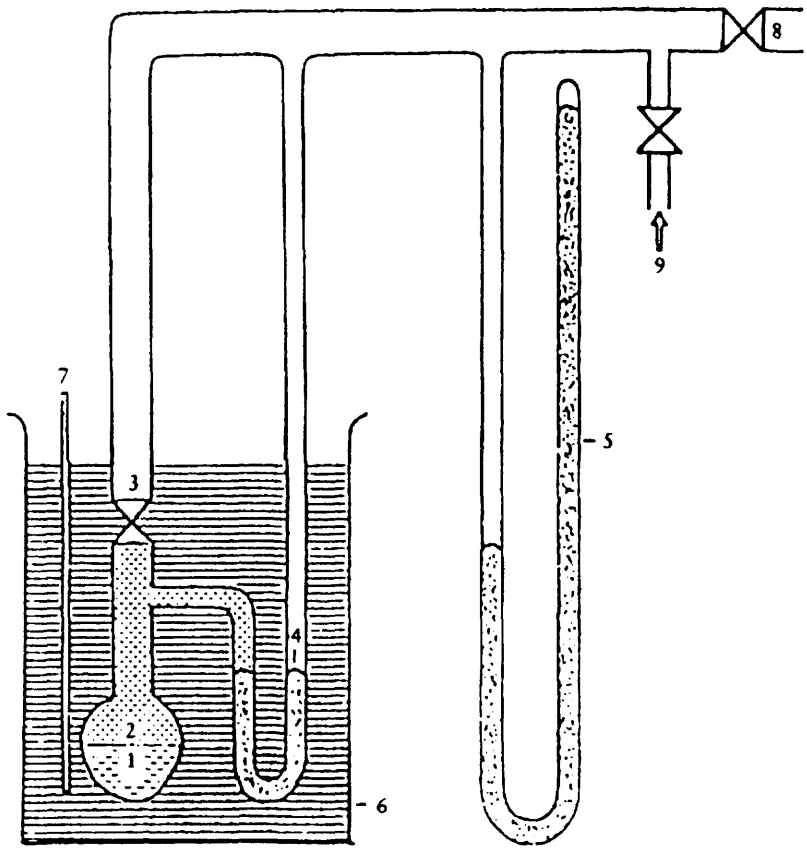
Apparat för bestämning av ångtryckskurvan enligt den dynamiska metoden



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

Figur 2a

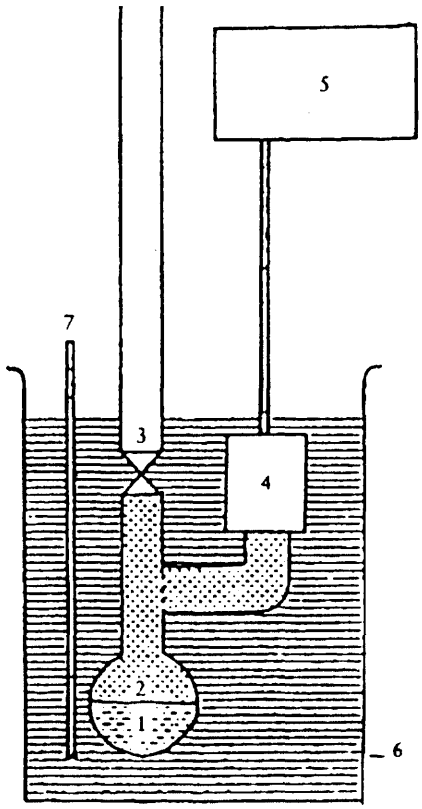
Apparat för bestämning av ångtryckskurvan enligt den statiska metoden (med U-rörsmanometer)



1. Testämne
2. Ångfas
3. Högvakuumventil
4. U-rör (hjälpmanometer)
5. Manometer
6. Temperaturbad
7. Temperaturmätningsanordning
8. Till vakuumpump
9. Ventilation

Figur 2b

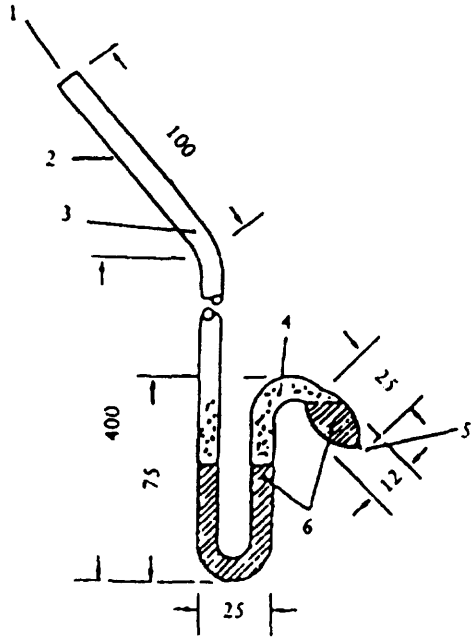
Apparat för bestämning av ångtryckskurvan enligt den statiska metoden (med tryckindikator)



1. Testämne
2. Ångfas
3. Högvakuumventil
4. Tryckmätare
5. Tryckindikator
6. Temperaturbad
7. Temperaturmätningsanordning

Figur 3

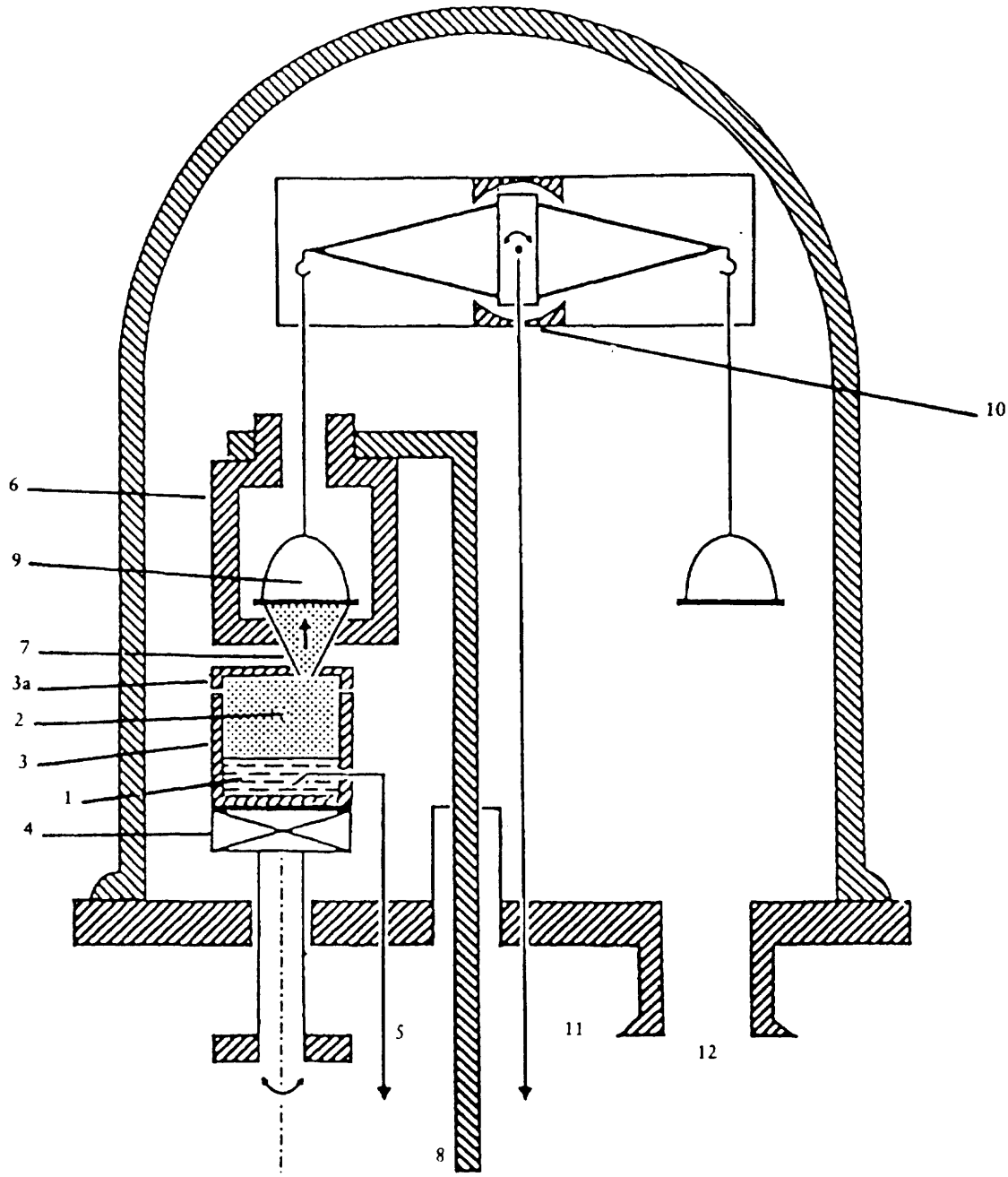
Isoteniskop (se hänvisning 7).



1. Till system för tryckreglering och tryckmätning
2. Rör med en ytterdiameter av 8 mm
3. Torrt kväve i trycksystemet
4. Ånga av provet
5. Liten spets
6. Flytande prov

Figur 4

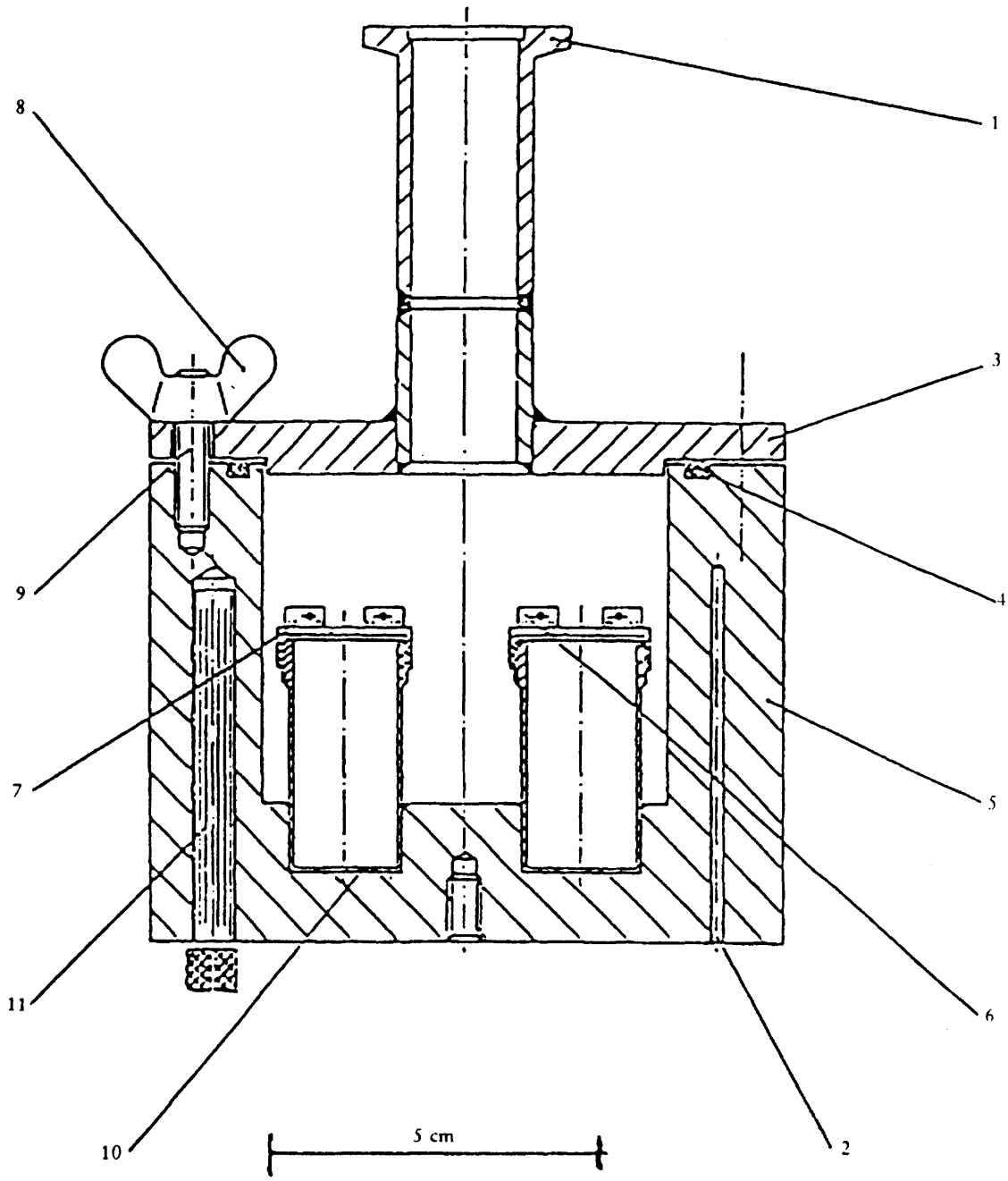
Apparat för bestämning av ångtryckskurvan enligt ångtrycksvågsmetoden



1. Testämne
2. Ångfas med ångstråle
3. Förångningsugn med roterande intag
3a. Ugnslock med öppning
4. Uppvärmning (kylning) av ugn
5. Mätning av provens temperatur
6. Kylbox
7. Skärm
8. Kylstång för kylbox
9. Vågskål
10. Mikrovåg
11. Till skrivare
12. Till högvakuumpump

Figur 5

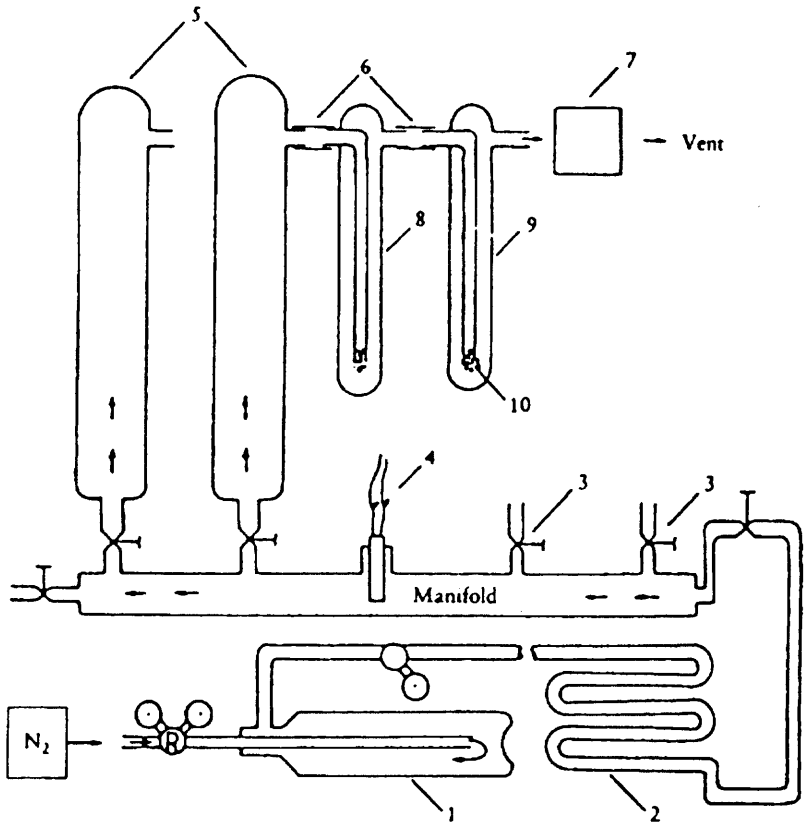
Exempel på en apparat för förångning vid lågt tryck genom effusionsmetoden, med en effusionscellvolym av 8 cm^3



1. Anslutning till vakuum
2. Öppningar för platinamotståndstermometer eller för mätning och kontroll av temperatur (2)
3. Lock till vakuumbehållare
4. O-ring
5. Vakuumbehållare av aluminium
6. Anordning för införing och borttagande av effusionsceller
7. Skruvlock
8. Vingmuttrar (6)
9. Bultar (6)
10. Effusionsceller av rostfritt stål
11. Värmepatroner

Figur 6a

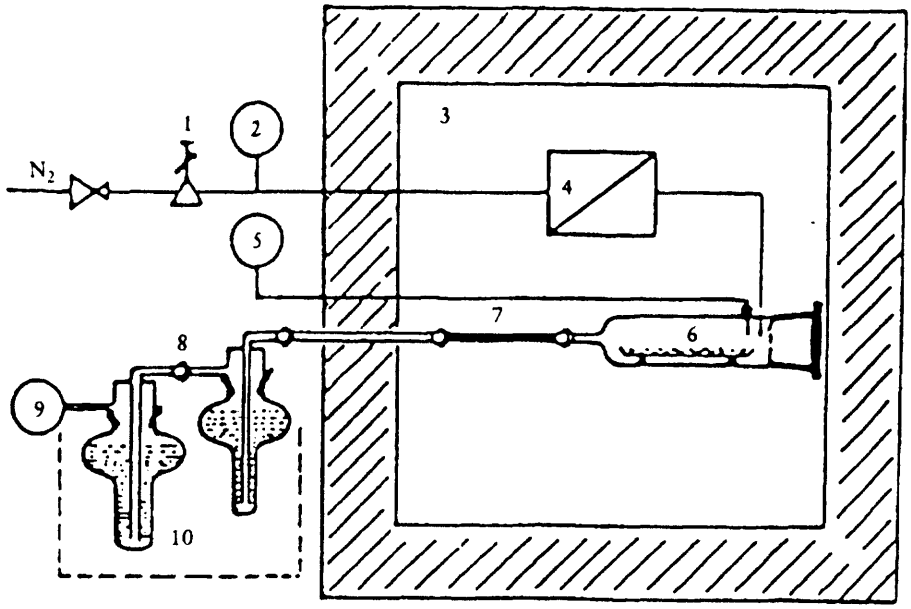
Exempel på ett flödessystem för bestämning av ångtryck genom gasmättnadsmetoden



1. Flödesregulator
2. Värmeväxlare
3. Nålventiler
4. Givare för relativ fuktighet
5. Mättnadskolonner
6. Teflon PTFE-tätning
7. Flödesmätare
8. Fälla (absorber)
9. Oljefälla
10. Bubbelrör av glasfritta

Figur 6b

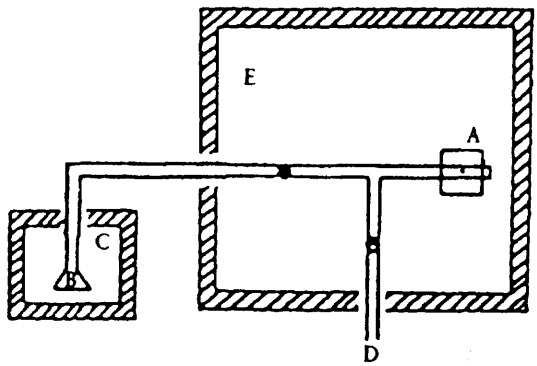
Exempel på ett system för bestämning av ångtryck genom gasmättnadsmetoden med kapillärrör placerat efter gasmättnadskammaren



1. Termisk massflödesmätare
2. Manometer
3. Temperaturkontrollerad kammare
4. Termostatspolar för bärargas
5. Termometer (Pt 100)
6. Gasmättnadskammare
7. Kapillärrör
8. Absorptionskärl
9. Gasmätare
10. Kylfälla

Figur 7

Exempel på försöksanordning för rotormetoden

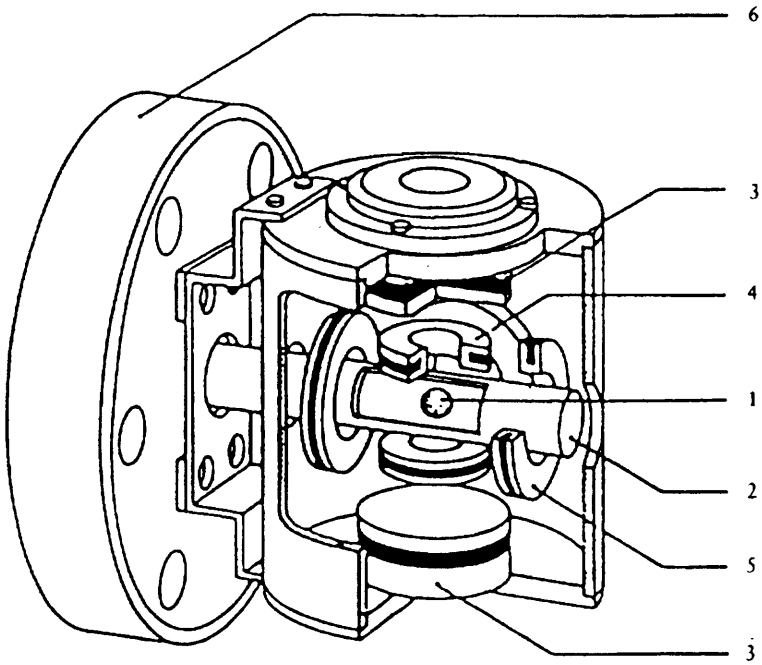


Ångtrycksapparat

A. Mäthuvud med roterande kula
B. Provcell
C. Termostat
D. Vakuumrör (turbopump)
E. Lufttermostat

Figur 8

Exempel på mäthuvud med roterande kula



1. Kula
2. Evakuerad rörformad förlängning av 6
3. Permanentmagneter (2)
4. Spolar (2) för vertikal stabilisering
5. Drivspolar (4)
6. Anslutningsfläns

A. 5. YTSPÄNNING

1. METOD

De beskrivna metoderna är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1). Grundprinciperna anges i hänvisning 2.

1.1. INLEDNING

De beskrivna metoderna används för mätning av ytspänningen hos vattniga lösningar.

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

Följande metoder kan tillämpas på de flesta kemiska ämnen, oavsett renhetsgrad.

Mätning av ytspänning med ringtensiometermetoden är begränsad till vattniga lösningar med en dynamisk viskositet på mindre än 200 m Pa s.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Den fria entalpinytan per ytareaenhet betecknas som ytspänning.

Ytspänningen anges som:

N/m (SI-enhet) eller

mN/m (SI-underenhet).

1 N/m = 10^3 dyn/cm

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

1.3. REFERENSÄMNEN

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

I hänvisningarna 1 och 3 anges referensämnen som täcker ett stort antal ytspänningar.

1.4. TESTMETODSPRINCIPER

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

Ämnen vars löslighet i vatten är minst 1 mg/liter testas i en vattnig lösning vid en enda koncentration.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Dessa metoder kan ge större noggrannhet än vad som kan förväntas krävas vid miljöbetingade undersökningar.

1.6. METODBESKRIVNING

En lösning av ämnet framställs i destillerat vatten. Koncentrationen av denna lösning skall vara 90 % av ämnets mättnadskoncentration i vatten. Om denna koncentration är större än 1g/l används en koncentration av 1 g/l för testet. Ämnen med en löslighet i vatten på mindre än 1 mg/l behöver inte testas.

1.6.1. **Plattmetoden**

Se ISO-304 och NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Bygelmetoden**

Se ISO 304 och NF T 73-060 (Surface active agents - determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Ringmetoden**

Se ISO 304 och NF T 73-060 (Surface active agents - determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **OECD-harmoniserad ringmetod**

1.6.4.1. *Apparatur*

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

— flyttbart provbord,

— kraftmätningssystem,

— mätkropp (ring),

— mätkärl.

1.6.4.1.1. Flyttbart provbord

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

1.6.4.1.2. Kraftmätningssystem

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

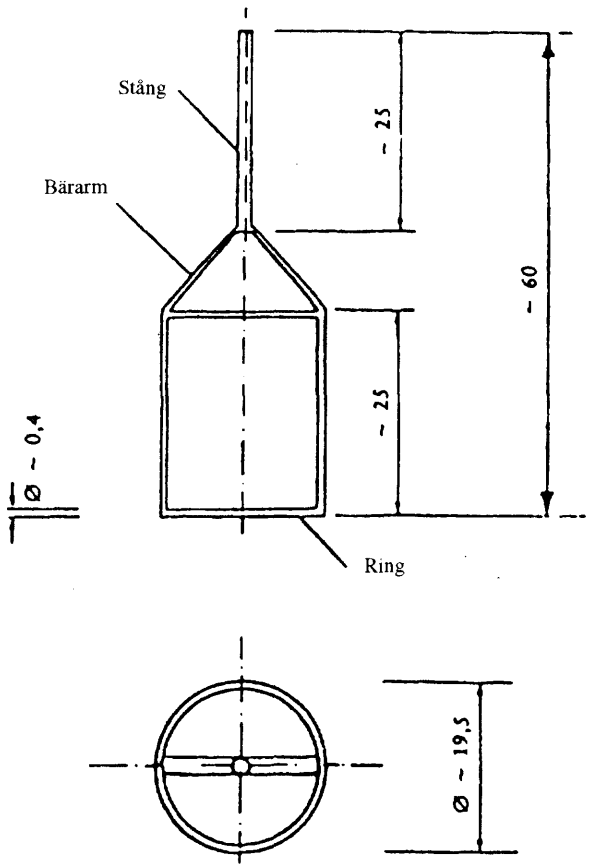
1.6.4.1.3. Mätkropp (ring)

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

Figur

Mätkropp

(Alla mått är angivna i mm)



1.6.4.1.4. Mätkärl

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

1.6.4.2. *Iordningställande av apparaturen*

1.6.4.2.1. Rengöring

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

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

Anmärkning:

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

1.6.4.2.2. Kalibrering av apparaten

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

Montering:

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

Nollpunktsjustering:

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

Kalibreringar:

Själva provkalibreringen kan utföras genom en av följande två metoder:

a) Användning av en vikt: detta är ett förfarande där ryttare av känd vikt mellan 0,1 och 1,0 g placeras på ringen. Kalibreringsfaktorn Φ_a med vilken alla instrumentavläsningar skall multipliceras, bestäms enligt följande ekvation (se hänvisning 1):

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

där:

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

m = ryttarens vikt (g)

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

b = ringens medelomkrets (cm)

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

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

Kalibreringsfaktorn Φ_b, med vilken alla instrumentavläsningar skall multipliceras, bestäms enligt följande ekvation (2):

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

där:

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

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

båda vid samma temperatur.

1.6.4.3. *Iordningställande av prov*

Vattniga lösningar framställs med passande koncentrationer av de ämnen som skall undersökas. Lösningarna får inte innehålla några olösta ämnen.

Lösningarna skall hållas vid en konstant temperatur (± 0,5 °C). Eftersom en lösnings ytspänning i mätkärlet ändras med tiden skall flera mätningar göras vid olika tidpunkter och en kurva ritas över ytspänning som en funktion av tiden. När ytspänningen inte längre ändras har ett jämviktstillstånd uppnåtts.

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

1.6.5. **Testbetingelser**

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

1.6.6. **Testförfarande**

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

2. **DATA**

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

Harkins och Jordan (se hänvisning 4) har empiriskt bestämt korrektionsfaktorer för ytspänningsvärden som är bestämda med ringmetoden. Dessa faktorer är beroende av ringens mått, vätskans densitet och dess ytspänning.

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

TABELL: KORREKTION AV DEN MÄTTA YTSPÄNNINGEN

Endast för vattniga lösningar, $\varrho \approx 1$ g/cm³

R = 9,55 mm (genomsnittlig ringradie)

r = 0,185 mm (ringtrådens radie)

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

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

Alternativt kan ytspänningen utan föregående kalibrering beräknas enligt följande formel:

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

där:

F = kraften mätt på dynamometern när hinnan bryts

R = ringens radie

f = korrektionsfaktorn (se hänvisning 1)

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använd metod.

— Använd typ av vatten eller lösning.

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

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

— Lösningens koncentration.

— Testtemperaturen.

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

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

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

3.2. TOLKNING AV RESULTAT

Med tanke på att destillerat vatten har en ytspänning av 72,75 mN/m vid 20 °C anses ämnen med en ytspänning på mindre än 60 mN/m bestämd genom denna metod vara ytspänningsaktiva ämnen.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, rådets beslut C(81) 30 slutligt.

2. R. Weissberg ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, del I, kapitel XIV.

3. Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, s. 511.

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

A. 6. VATTENLÖSLIGHET

1. METOD

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

1.1. INLEDNING

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

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

De två testmetoderna som beskrivs nedan täcker hela löslighetsområdet men kan inte tillämpas på flyktiga ämnen:

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

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

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

1.2. DEFINITION OCH ENHETER

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

1.3. REFERENSÄMNEN

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

1.4.1. **Kolonnelueringsmetoden**

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

1.4.2. **Kolvmetoden**

Med denna metod löses ämnet (fasta ämnen pulvriseras) i vatten vid en temperatur något över testtemperaturen. När mättnad har uppnåtts avkyls blandningen och hålls under omrörning vid testtemperaturen så länge som krävs för att uppnå jämvikt (se hänvisning 2). Alternativt kan mätningen utföras direkt vid testtemperaturen, om man genom lämplig provtagning ser till att mättnadsjämvikt uppnås. Därefter bestäms ämnets viktkoncentration i vattenlösningen, som inte får innehålla olösta partiklar, med lämplig analysmetod.

1.5. KVALITETSKRITERIER

1.5.1. **Repeterbarhet**

För kolonnelueringsmetoden är det möjligt att uppnå < 30 %, och för kolvmetoden bör den vara < 15 %.

1.5.2. **Sensitivitet**

Sensitiviteten är beroende av analysmetoden, men det är möjligt att bestämma så låga viktkoncentrationer som 10^{-6} gram per liter.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Testbetingelser**

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

1.6.2. **Förberedande test**

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

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

Efter varje tillsättning av angiven mängd vatten skakas blandningen kraftigt i 10 minuter och kontrolleras visuellt så att det inte finns några olösta delar av provet. Om provet eller delar av det efter tillsättning av 10 ml vatten fortfarande inte är löst, skall experimentet upprepas i ett 100 ml mätglas med en större mängd vatten. Vid lägre löslighet kan det ta avsevärt längre tid att lösa upp ett ämne (24 timmar bör medges). Den ungefärliga lösligheten anges i tabellen under den volym av tillsatt vatten i vilken fullständig lösning av provet inträffar. Om ämnet fortfarande inte verkar vara löst skall 24 timmar tillåtas (högst 96 timmar) eller ytterligare utspädning göras för att säkerställa att kolonneluerings- eller kolvmetoden kan användas.

1.6.3. **Kolonnelueringsmetoden**

1.6.3.1. *Bärarmaterial, lösningsmedel och elueringsmedel*

Till kolonnelueringsmetoden skall ett inert bärarmaterial användas, t. ex. glaspärlor och sand. Ett lämpligt flyktigt lösningsmedel av analytisk reagenskvalitet skall användas till att överföra provämnet till bärarmaterialet. Som eluerings- eller lösningsmedel används vatten som omdestillerats i glas- eller kvartsapparaten.

Anmärkning:

Vatten direkt från en organisk jonbytare får inte användas.

1.6.3.2. *Laddning av bärarmaterial*

Ungefär 600 mg bärarmaterial vägs upp och överförs till en 50 ml rundbottnad kolv.

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

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

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

Testförfarande:

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

— Med cirkulationspump (se figur 1).

— Med nivåkärl (se figur 4).

1.6.3.3. *Kolonnelueringsmetoden med recirkulationspump*

Apparatur

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

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

Mätförfarande

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

1.6.3.4. *Kolonnelueringsmetod med nivåkärl*

Apparatur (se figur 4 och 3)

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

Mätförfarande

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

I båda fallen (användning av recirkulationspump eller nivåkärl) utförs ännu ett försök med hälften så hög flödeshastighet som vid det första försöket. Om resultaten från de två försöken överensstämmer är testet tillfredsställande. Om lösligheten är större vid testet med lägre flödeshastighet, skall man fortsätta att halvera flödeshastigheten tills två på varandra följande test ger samma löslighet.

I båda fallen (användning av recirkulationspump eller nivåkärl) skall fraktionernas innehåll av kollodialt material kontrolleras med hjälp av Tyndall-effekten (ljusspridning). Förekomst av sådana partiklar innebär att resultaten är ogiltiga och testet måste upprepas efter förbättringar av kolonnens filtreringsfunktion.

Varje provs pH-värde skall registreras. Ytterligare ett försök utförs vid samma temperatur.

1.6.4. **Kolvmetoden**

1.6.4.1. *Apparatur*

Till kolvmetoden behövs följande material:

— vanliga laboratorieglas och -instrument,

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

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

— utrustning för analytisk bestämning.

1.6.4.2. *Mätförfarande*

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

Mätförfarandet kan också utföras utan föregående inkubation vid 30 °C. För att kunna bedöma graden av mättnadsjämvikt tas prover tills omrörningstiden inte längre påverkar testämnets koncentration.

Varje provs pH-värde skall registreras.

1.6.5. **Analys**

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

2. DATA

2.1. KOLONNELUERINGSMETODEN

Medelvärdet och standardavvikelsen skall beräknas för minst fem på varandra följande prov, tagna vid mättnadsplatån. Resultaten skall anges i viktenheter per volymenhet lösning.

Genomsnittet från två tester med olika flödeshastigheter jämförs och repeterbarheten skall ligga under 30 %.

2.2. KOLVMETODEN

De enskilda resultaten skall anges för var och en av de tre kolvarna, och för de resultat, som bedöms vara konstanta (repeterbarhet mindre än 15 %), skall medelvärdet beräknas och anges i viktenheter per volymenhet lösning. Om lösligheten är mycket hög (> 100 gram per liter) kan det vara nödvändigt att omvandla viktenhet till volymenhet med hjälp av densiteten.

3. RAPPORTERING

3.1. KOLONNELUERINGSMETODEN

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Resultaten av det förberedande testet.

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Koncentration, flödeshastighet och pH-värde för varje prov.

— Medelvärde och standardavvikelse för minst fem prov från mättnadsplatån från varje försök.

— Genomsnittet av de två successiva, acceptabla försöken.

— Vattentemperaturen under mättnadsprocessen.

— Använd analysmetod.

— Arten av det använda bärarmaterialet.

— Laddning av bärarmaterialet.

— Använt lösningsmedel.

— Tecken på eventuell kemisk instabilitet hos ämnena under testet och den använda metoden.

— Alla upplysningar av betydelse för tolkningen av resultaten, särskilt i fråga om orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

3.2. KOLVMETODEN

Rapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Resultaten av det förberedande testet.

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

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

— Varje provs pH-värde.

— Genomsnittet av värdet för de olika kolvar som överensstämde.

— Testtemperaturen.

— Använd analysmetod.

— Tecken på eventuell kemisk instabilitet hos ämnena under testet och den använda metoden.

— Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten, särskilt i fråga om orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105, rådets beslut C(81) 30 slutligt.

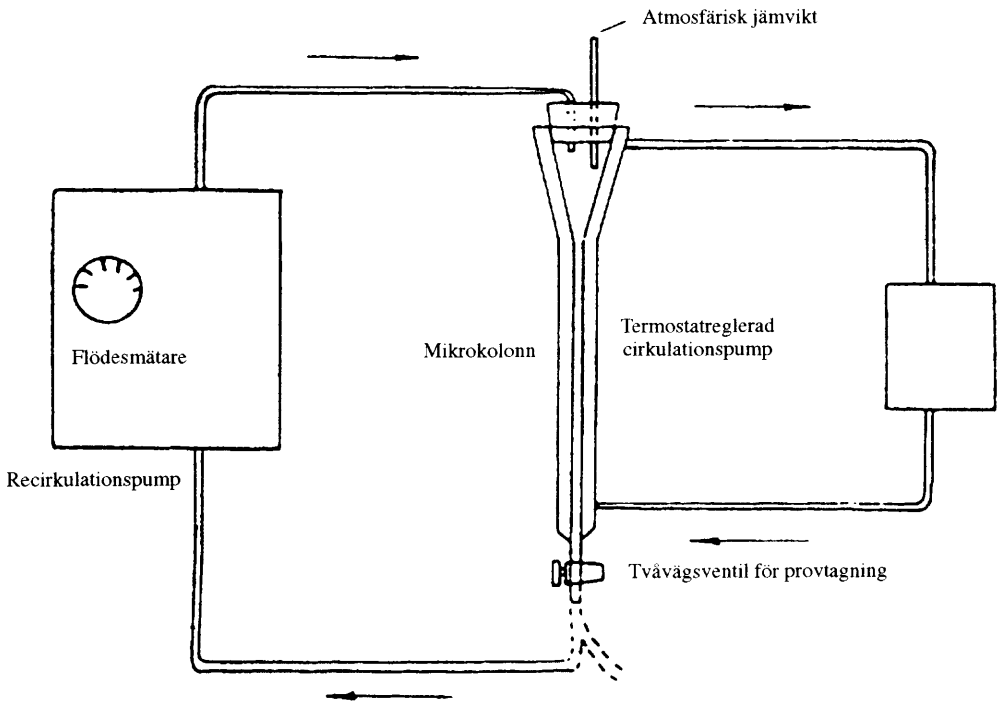
2. NF T 20-045 AFNOR (Sept., 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.

3. NF T 20-045 AFNOR (Sept., 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

Tillägg

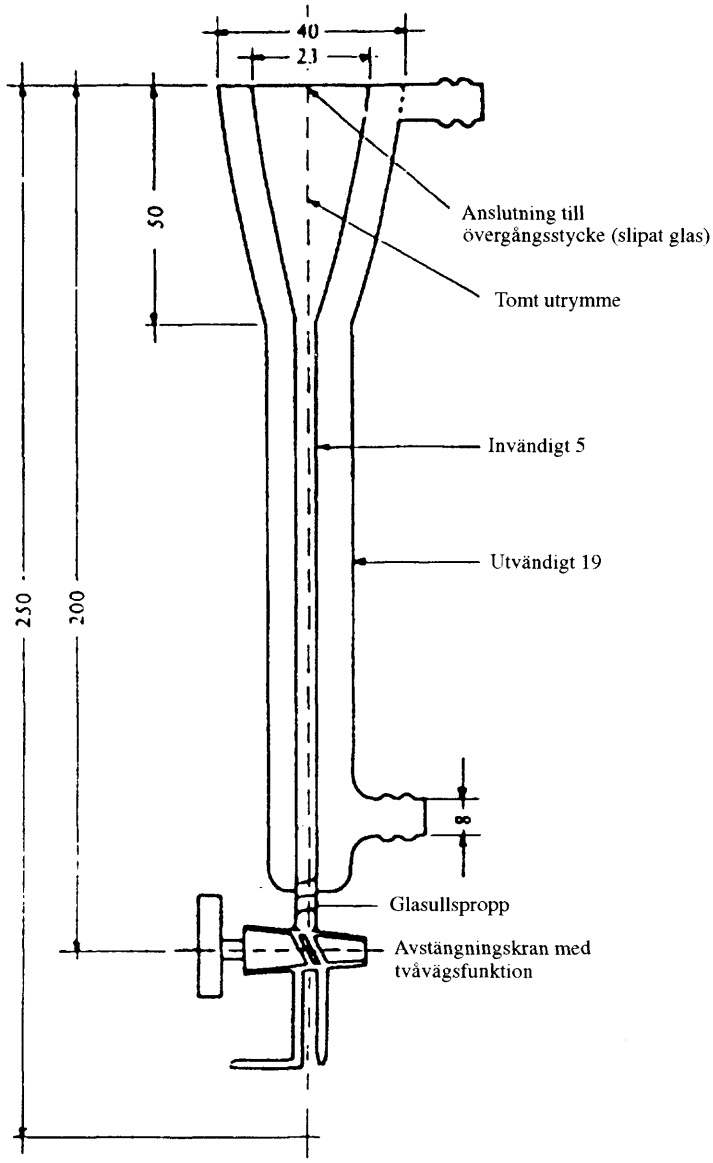
Figur 1

Kolonnelueringsmetod med recirkulationspump



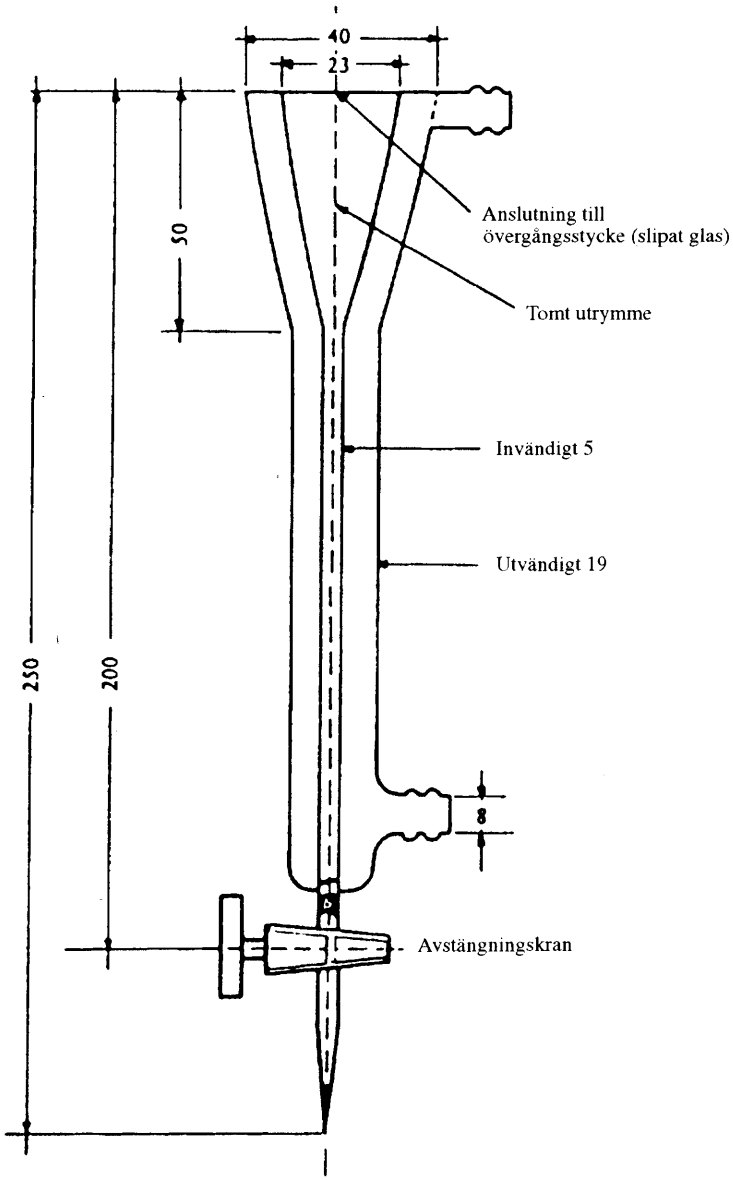
Figur 2

En typisk mikrokolonn
(Alla mått anges i mm)



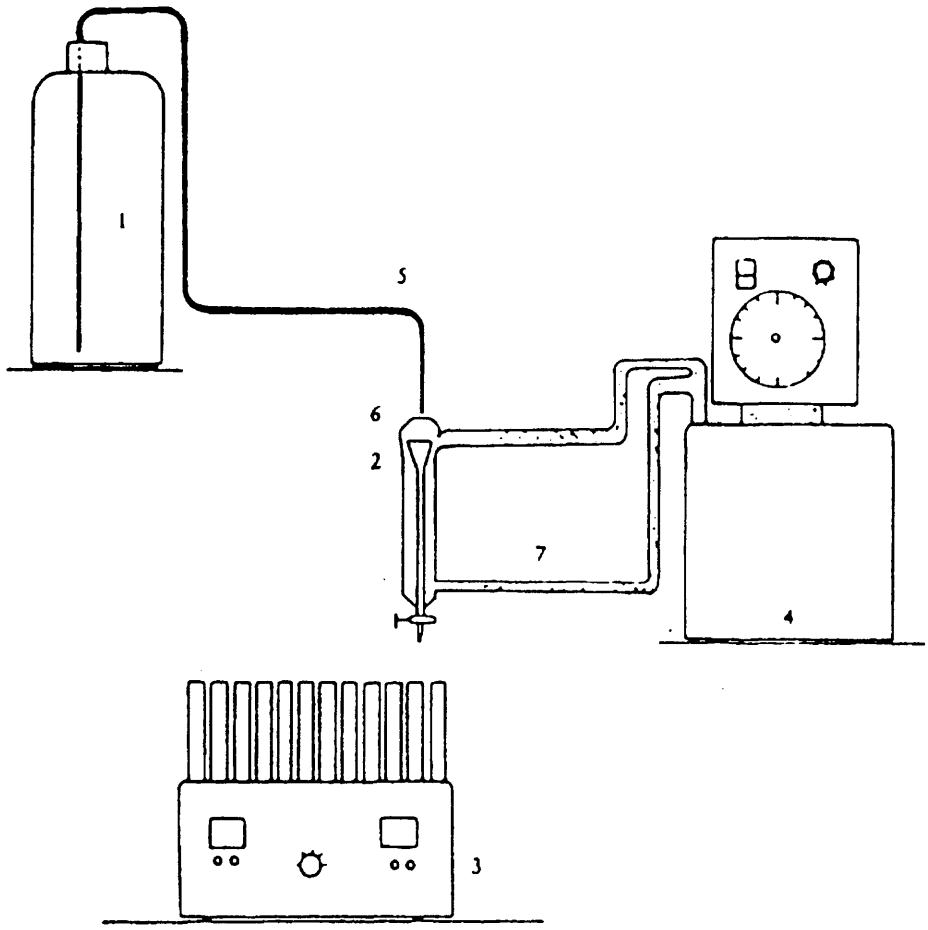
Figur 3

En typisk mikrokolonn
(Alla mått anges i mm)



Figur 4

Kolonnelueringsmetod med nivåkärl



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

A. 8. FÖRDELNINGSKOEFFICIENT

1. METOD

Den beskrivna "skakkolvmetoden" är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1. INLEDNING

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets strukturformel, dissociationskonstant, hydrolys, löslighet i n-oktansyra och ytspänning.

Mätningar på joniserbara ämnen utförs på den icke-joniserade formen (fri syra eller fri bas), dvs. genom användning av en passande buffert med ett pH-värde av minst 1 enhet under (fri syra) eller över (fri bas) ämnets pK-värde.

Testmetoden omfattar två särskilda förfaranden: skakkolvmetoden och högpresterande vätskekromatografi (HPLC). Den första metoden är användbar när värden av log P_{ow} (se definitionerna nedan) ligger mellan -2 och 4, och den andra metoden i området mellan 0 och 6. Innan endera försöksmetoden inleds skall en preliminär uppskattning av fördelningskoefficienten erhållas.

Skakkolvmetoden kan endast användas för väsentligen rena ämnen som är lösliga i vatten och n-oktan. Den kan inte användas för ytaktiva ämnen (för vilka ett beräknat värde eller en uppskattning grundad på lösligheten i vatten respektive n-oktan bör finnas).

HPLC-metoden kan inte användas för starka syror och baser, metallkomplexer, ytaktiva ämnen och ämnen som reagerar med elueringsmedlet. För sådana material används ett beräknat eller uppskattat värde på grundval av lösligheten i n-oktan respektive vatten.

HPLC-metoden är mindre känslig än skakkolvmetoden för närvaron av orenheter i ämnet. Trots detta kan orenheter i vissa tillfällen göra det svårt att tolka resultaten eftersom toppvärden blir osäkra. För blandningar med ett oupplöst band anges en övre och nedre gräns för log P.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

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

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

Fördelningskoefficienten (P) är således ett förhållande mellan två koncentrationer och uttrycks vanligtvis i form av dess logaritm för basen 10 (log P).

1.3. REFERENSÄMNEN

Skakkolvmetoden

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

HPLC-metoden

För att kunna korrelera uppmätta HPLC-data för ett ämne med dess P-värde måste en kalibreringskurva för log P mot kromatografiska data fastställas med användning av minst 6 referenspunkter. Det är upp till användaren att välja lämpliga referensämnen. När så är möjligt skall minst ett referensämne ha ett P_{ow}-värde som ligger över testämnets, och minst ett med ett P_{ow}-värde under testämnets. För värden av log P under 4 kan

kalibreringen baseras på data som erhållits genom skakkolvmetoden. För värden av log P över 4 kan kalibreringen baseras på validerade hänvisningsvärden om dessa motsvarar beräknade värden. För bättre noggrannhet är det att föredra att välja referensämnen som strukturmässigt liknar testämnet.

Det finns omfattande listor av värden av log P_{ow} för många grupper av kemikalier (se hänvisningar 2 och 3). Om det inte finns data om fördelningskoefficienter för strukturmässigt besläktade ämnen kan en mer allmän kalibrering, upprättad med andra referensföreningar, användas.

I tillägg 2 finns en lista med rekommenderade referensämnen och deras P_{ow}-värden.

1.4. TESTMETODSPRINCIPER

1.4.1. Skakkolvmetoden

För att kunna bestämma fördelningskoefficienten måste jämvikt uppnås mellan alla samverkande komponenter i systemet, och koncentrationerna av de ämnen som lösts i de två faserna måste bestämmas. En genomgång av litteraturen i detta ämne visar att man kan använda flera olika tekniker för att lösa detta problem, dvs. noggrann blandning av två faserna för bestämning av det undersökta ämnets jämviktskoncentration efter separation av faserna.

1.4.2. HPLC-metoden

HPLC utförs på analytiska kolonner packade med en kommersiellt tillgänglig fast fas innehållande långa kedjor av kolväte (t. ex. C_8, C_{18}) kemiskt bundna till kisel. Om kemikalier insprutas på en sådan kolonn kommer de att vandra genom den med olika hastigheter, eftersom deras fördelning mellan den mobila och den stationära fasen inte är densamma. Kemikalieblandningar elueras i ordningsföljd efter hydrofobicitet, varvid de vattenlösliga kemikalierna elueras först och de oljeupplösliga sist, i proportion till deras kolväte-/vattenfördelningskoefficient. Därefter kan sammanhanget mellan retentionstiden på en sådan kolonn (med omvänd fas) och n-oktan/vattenfördelningskoefficienten fastställas. Fördelningskoefficienten utleds av kapacitetsfaktorn k, som fås genom

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

där t_R är testämnets retentionstid och t_o den genomsnittliga tid det tar för en lösningsmedelsmolekyl att komma igenom kolonnen (kolonnens dödtid).

Det krävs inga kvantitativa analysmetoder och det är endast nödvändigt att bestämma retentionstiden.

1.5. KVALITETSKRITERIER

1.5.1. Repeterbarhet

Skakkolvmetoden

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

HPCL-metoden

För att öka tilltron till mätningen görs dubbla bestämningar. Värdena av log P beräknade på grundval av de individuella mätningarna skall ligga inom ett intervall av ± 0,1.

1.5.2. **Sensitivitet**

Skakkolvmetoden

Metodens mätområde bestäms av analysförfarandets detektionsgräns. Denna bör vara tillräcklig för att medge bestämning av värden för log P_{ow} i området -2 till 4 (under vissa omständigheter kan detta område ökas till log P_{ow} upp till 5) när koncentrationen av det lösta ämnet i endera fasen inte är större än 0,01 mol per liter.

HPLC-metoden

Med HPLC-metoden kan man uppskatta fördelningskoefficienter i log P_{ow}-området från 0 till 6.

Normalt kan en förenings fördelningskoefficient uppskattas med en avvikelse av mindre än ± 1 från det värde som uppnås med skakkolvmetoden. Typiska korrelationer framgår i hänvisningarna (4, 5, 6, 7 och 8). Man uppnår normalt större noggrannhet om man använder korrelationskurvor baserade på strukturmässigt besläktade referensämnen (se hänvisning 9).

1.5.3. **Specificitet**

Skakkolvmetoden

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

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

På grund av de många inblandade jämvikterna skall denna metod inte användas på joniserbara föreningar utan korrektion. För sådana föreningar kan man överväga att använda buffertlösningar i stället för vatten. I så fall skall buffertlösningens pH-värde ligga minst 1 enhet från ämnets pKa och detta pH-värdes inverkan på miljön skall beaktas.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Preliminär uppskattning av fördelningskoefficienten**

Fördelningskoefficientens värde kan företrädesvis uppskattas genom en enkel beräkning (se tillägg 1) eller, vid behov, på grundval av testämnenas löslighet i de rena lösningsmedlen (se hänvisning 10).

1.6.2. **Skakkolvmetoden**

1.6.2.1. *Förberedelser*

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

Vatten: Destillerat eller omdestillerat vatten från glas- eller kvartsapparat skall användas. För joniserbara föreningar används buffertlösningar istället för vatten, om detta är motiverat.

Anmärkning:

Vatten som hämtats direkt från en jonbytare får inte användas.

1.6.2.1.1. Förmättnad av lösningsmedlen

Innan en fördelningskoefficient bestäms mättas var och en av de faser som ingår i lösningsmedelssystemet ömsesidigt genom omskakning vid testtemperatur. För detta är det praktiskt att använda en mekanisk skakapparat, och låta den i 24 timmar skaka två stora stamkolvar med n-oktansyra med mycket hög analytisk renhetsgrad eller vatten, vardera innehållande tillräcklig mängd av det andra lösningsmedlet, varefter flaskorna får stå tillräckligt länge för att medge separation av faserna och för att uppnå ett mättnadstillstånd.

1.6.2.1.2. Testförberedelse

Testkärlet skall vara nästan helt fyllt av tvåfassystemet. Detta förhindrar materialförlust till följd av avdunstning. Förhållandet mellan volym och mängder ämne fastställs på grundval av följande:

— Den preliminära uppskattningen av fördelningskoefficienten (se ovan).

— Den minsta mängden testämne som behövs för analysförfarandet.

— Begränsningen av en högsta koncentration i endera fasen på 0,01 mol per liter.

Tre test skall göras. I det första tillsätts det beräknade volymförhållandet av n-oktansyra till vatten; i det andra tillsätts dubbla volymen n-oktansyra; och i det tredje tillsätts halva volymen n-oktansyra (dvs. 1:1, 1:2, 2:1.).

1.6.2.1.3. Testämne

En stamlösning framställs i n-oktansyra förmättad med vatten. Innan stamlösningen används för bestämning av fördelningskoefficienten skall dess faktiska koncentration bestämmas exakt. Denna lösning skall förvaras under stabila betingelser.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

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

1.6.2.3. *Mätförfarande*

1.6.2.3.1. Uppnående av fördelningsjämvikt

För varje testbetingelse används två testkärl som vart och ett innehåller erforderliga, exakt mätta mängder av de två lösningsmedlen och den erforderliga mängden stamlösning.

Delarna n-oktansyra skall mätas per volym. Testkärlen skall antingen placeras i en lämplig skakapparat eller skakas för hand. När ett centrifugeringsglas används rekommenderas att snabbt vrida centrifugglaset 180° kring dess tväraxel så att all instängd luft stiger upp genom de två faserna. Erfarenheten visar att 50 sådana vridningar normalt är tillräckligt för att erhålla fördelningsjämvikt. För att vara säker på detta rekommenderas 100 vridningar under fem minuter.

1.6.2.3.2. Fasseparation

Vid behov kan blandningen centrifugeras för att separera faserna. Detta görs i en laboratoriecentrifug som hålls vid rumstemperatur, eller, om en centrifug utan temperaturreglering används, skall centrifugglasen minst en timme före analysen bringas i jämvikt med testtemperaturen.

1.6.2.4. *Analys*

För bestämningen av fördelningskoefficienten är det nödvändigt att bestämma koncentrationerna av testämnet i båda faserna. Detta kan man göra genom att för varje testbetingelse ta ett delprov av varje fas från varje glas och analysera dessa enligt det valda förfarandet. Den totala mängden ämne i båda faserna beräknas och jämförs med den mängd ämne som ursprungligen tillsattes.

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

— fotometriska metoder,

— gaskromatografi,

— högpresterande vätskekromatografi (HPLC).

1.6.3. **HPLC-metoden**

1.6.3.1. *Förberedelser*

Apparatur

Det krävs en vätskekromatograf med pulsfri pump och passande detektionssystem. Användning av insprutningsventil med insprutningsspole rekommenderas. Närvaro av polära grupper i den stationära fasen kan väsentligt nedsätta HPLC-kolonnernas prestation. Till följd av detta måste de stationära faserna ha lägsta möjliga procentuella innehåll av polära grupper (se hänvisning 11). Ett kommersiellt mikroniserat fyllningsmaterial med omvänd fas eller färdigfyllda kolonner kan användas. Eventuellt kan en förkolonn placeras mellan insprutningssystemet och den analyskolonnen.

Mobil fas

Metanol och vatten av HPLC-kvalitet används för att framställa elueringsvätskan, vilken avgasas innan användning. Isokratisk eluering används. Den använda metanol/vattenblandningen skall innehålla minst 25 % vatten. För eluering av föreningar med ett log P av 6 på en timme med en flödeshastighet av 1 ml/m räcker det vanligtvis med en blandning av metanol och vatten i förhållandet 3:1 (v/v). För föreningar med ett högt log P-värde kan det vara nödvändigt att minska elueringstiden (även för referensämnena) genom att utnyttja en mindre polär mobil fas eller en kortare kolonn.

Ämnen med mycket låg löslighet i n-oktan har en tendens att ge onormalt låga värden för log P_{ow} med HPLC-metoden. Ibland följer sådana föreningars toppar lösningsmedelsfronten. Detta beror sannolikt på att fördelningsprocessen är för långsam för att jämvikt skall kunna uppnås inom tiden för en HPLC-separation. I detta fall kan en minskning av flödeshastigheten och/eller en minskning av metanol/vattenförhållandet vara effektivt för att erhålla ett pålitligt värde.

Både testämnet och referensämnen skall vara lösliga i den mobila fasen i en så hög koncentration att detta kan påvisas. Endast i undantagsfall får tillsättningsämnen användas till metanol/vattenblandningen, eftersom tillsättningsämnen kommer att ändra kolonnens egenskaper. För kromatografer med tillsättningsämnen skall man alltid använda en separat kolonn av samma slag. Om metanol/vatten inte är lämpligt kan man använda andra blandningar av vatten och organiska lösningsmedel, t. ex. etanol/vatten eller acetonitril/vatten.

För joniserbara ämnen är elueringsvätskans pH-värde kritiskt. Det skall ligga innanför kolonnens driftsområde, vilket normalt är från 2 till 8. Användning av buffert rekommenderas. Det är viktigt att undvika saltutfällning och försämring av kolonnen, vilket kan förekomma med vissa blandningar av organisk fas och buffert. HPLC-mätningar med kiselbaserade faser med pH över 8 rekommenderas inte eftersom alkalisk mobil fas kan leda till att kolonnens prestation hastigt försämras.

Lösningar

Referensämnen skall vara av renast möjliga kvalitet. För testning och kalibrering skall ämnena om möjligt lösas i den mobila fasen.

Försöksbetingelser

Temperaturen under mätningarna bör inte variera med mer än ± 2 K.

1.6.3.2. *Mätningar*

Beräkning av dödtiden t_0

Dödtiden t_0 kan bestämmas antingen med en homolog serie (t. ex. n-alkylmetylketoner) eller med organiska ämnen som inte hålls kvar (t. ex. thiourea eller formamid). För att beräkna dödtiden t_0 på grundval av en homolog serie insprutas minst sju element av en homolog serie, och retentionstiderna bestäms. Bruttoretentionstiderna $t_{r(n_c + 1)}$ avbildas mot $t_{r(n_c)}$, och i regressionsekvationen

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

bestäms avskärningen a och hållningskoefficienten b (n_c = antalet kolatomer). Dödtiden ges då genom

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

Kalibreringskurva

Nästa steg består i att konstruera en korrelationskurva av log k mot log P för passande referensämnen. I praktiken insprutas det samtidigt mellan fem och tio standardreferensämnen, om log P ligger i det förväntade området, och retentionstiderna bestäms, helst med en integrationsskrivare som är kopplad till detektionssystemet. Motsvarande logaritmer för kapacitetsfaktorerna, log k, beräknas och avsätts mot den log P som är bestämd genom skakkolvmetoden. Kalibreringen företas regelbundet, minst en gång om dagen, för att ta hänsyn till för eventuella ändringar i kolonnens prestation.

Bestämning av testämnets kapacitetsfaktor

Testämnet sprutas in som en så liten mängd mobil fas som möjligt. Retentionstiden bestäms (dubbla bestämningar), varefter kapacitetsfaktorn k kan beräknas. På grundval av korrelationskurvan över referensämnena kan testämnets fördelningskoefficient interpoleras. Vid mycket låga och mycket höga fördelningskoefficienter är det nödvändigt att extrapolera. I sådana fall måste man vara särskilt uppmärksam på regressionslinjens konfidensgränser.

2. DATA

Skakkolvmetoden

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

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Om metoderna inte kan användas (t. ex. ytaktiva material), ett beräknat värde eller en uppskattning på grundval av individuella n-oktan och vattenlöslighet.

— Alla uppgifter och upplysningar av betydelse för tolkningen av resultaten, särskild i fråga om orenheter i ämnet och ämnets fysiska tillstånd

För skakkolvmetoden:

— Resultatet från en eventuell preliminär uppskattning.

— Temperatur vid bestämningen.

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

— Eventuell centrifugeringstid och -hastighet.

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

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

— De beräknade värdena för fördelningskoefficienten (P) och medelvärdet för varje uppsättning testbetingelser, liksom medelvärdet för alla bestämningar. Eventuella tecken på att fördelningskoefficienten är koncentrationsberoende skall anges i rapporten.

— De enskilda P-värdenas standardavvikelse från genomsnittet.

— Genomsnittsvärdet för P från alla bestämningar anges också som dess logaritm (bas 10).

— Det beräknade teoretiska värdet av P_{ow}, när detta värde är bestämt eller när det mätta värdet är > 10^4.

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

— Motivering för användning av buffertlösningar i stället för vatten, deras sammansättning, koncentration och pH-värde samt vattenfasens pH-värde före och efter testet.

För HPLC-metoden:

— Resultatet av en eventuell preliminär uppskattning.

— Test- och referensämnen, och deras renhetsgrad.

— Temperaturområde vid bestämningen.

— Det pH-värde vid vilket bestämningarna gjorts.

— Detaljerade uppgifter om analys- och förkolonn, rörlig fas och detektionssystem.

— Retentionsdata och hänvisningsvärden för log P för referensämnen som använts vid kalibrering.

— Detaljerade uppgifter om anpassning av retentionslinjen (log k mot log P).

— Genomsnittliga retentionsdata och interpolerat log P-värde för testämnet.

— Beskrivning av utrustning och driftsbetingelser.

— Elueringsprofiler.

— Den mängd test- och referensämne som tillförts kolonnen.

— Dödtiden och hur den är uppmätt.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Rådets beslut C(81) 30 slutligt.

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

3. Log P and Parameter Database, A took for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hasch, chairman, A. J. Leo, dir.) – Tillgänglig från Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

4. L. Renberg, G. Sundström och K. Sundh-Nygård, Chemosphere, 1980, vol. 80, s. 683.

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

6. B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, s. 73.

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

8. J. E. Haky och A. M. Youg, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, s. 675.

9. S. Fujisawa och E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, s. 787.

10. O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (editerad av E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, band I/1, s. 223–339.

11. R. F. Rekker och H. M. de Kort, Euro. J. Med. Chem,. 1979, vol. 14., s. 479.

12. A. Leo, C. Hansch och D. Elkins, artition coefficients and their uses. Chem. Rev. 1971, vol. 71, s. 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 shake method.

15. C. V. Eadsforth och P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, s. 1459.

16. A. Leo, C. Hansch och D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, s. 525.

17. C. Hansch, A. Leo, S. H. Unger, K. H. Dim, D. Nikaitani och E. J. Lien, J. Med. Chem, 1973, vol. 16., s. 1207.

18. W. B. Neely, D. R. Branson och G. E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8., s. 1113.

19. D. S. Brown och E. W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, s. 382.

20. J. K. Seydel och K. J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemiw, Weinheim, Hew 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, s. 615.

Tillägg 1

Metoder för beräkning/uppskattning

INLEDNING

I *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* finns en allmän introduktion till beräkningsmetoder, data och exempel (se hänvisning a).

Beräknade värden av P_{ow} kan användas

— för att bestämma vilken testmetod som är lämplig (skakkolvområde: log P_{ow}: 2 till 4, HPLC-område: log P_{ow}: 0 till 6),

— för val av lämpliga testbetingelser (t. ex. referensämnen för HPLC-förfaranden, volymratio n-oktanol/vatten för skakkolvmetoden),

— som en intern laboratoriekontroll vid eventuella försöksfel,

— för att få en uppskattning av P_{ow} i fall där testmetoderna inte kan tillämpas av tekniska skäl.

UPPSKATTNINGSMETOD

Preliminär uppskattning av fördelningskoefficient

Fördelningskoefficientens värde kan uppskattas med hjälp av testsubstansens löslighet i rena lösningsmedel.

För detta används:

$$P_{\text{uppskattning}} = \frac{\text{mättnad } c_{\text{n-oktanol}}}{\text{mättnad } c_{\text{vatten}}}$$

BERÄKNINGSMETODER

Principen för beräkningsmetoderna

Alla beräkningsmetoder är baserade på formell fragmentering av molekylen i lämpliga understrukturer för vilka man har pålitlig kännedom om log P_{ow}-inkrementer. Log P_{ow} för hela molekylen beräknas sedan som summan av dess motsvarande fragmentvärden plus summan av korrektionsuttrycken för intramolekylär växelverkan.

En lista med fragmentkonstanter och korrektionsuttryck finns i hänvisningarna b, c, d och e. Vissa av dem uppdateras regelbundet (hänvisning b).

Kvalitetskriteria

Normalt avtar beräkningsmetodens pålitlighet i takt med komplexiteten hos den testade föreningen. För enkla molekyler med låg molekylvikt och en eller två funktionsgrupper kan en avvikelse av 0,1 till 0,3 förväntas mellan resultatet av olika fragmenteringsmetoder och det mätta värdet för log P_{ow}. Felmarginalen kan vara ännu större för mer komplexa molekyler. Detta beror på pålitligheten och förekomsten av fragmentkonstanter, liksom möjligheten att känna igen intramolekylära växelverkningar (t. ex. väteförbindelser) och om korrektionstermen används korrekt (detta är inte ett lika stort problem med programvaran CLOGP-3). I fråga om joniserbara föreningar är det av stor betydelse att laddningen eller joniseringsgraden bedöms korrekt.

Beräkningsmetoder

Hansch Π-metoden

Den ursprungliga konstanten för hydrofoba substituenter, π, som införts av Fujita m. fl. (se hänvisning f) definieras genom

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

där P_{ow} (PhX) är fördelningskoefficienten av ett aromatiskt derivat och P_{ow} (PhH) är moderföreningens fördelningskoefficient

$$(\text{t.ex. } \pi_{Cl} = \log P_{ow}(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}(C_6H_6)$$

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

I enlighet med dess definition är -metoden lämplig för aromatisk substitution. Det finns tabeller med -värden för ett stort antal substitutioner (se hänvisningar b, c och d). De används för beräkning av log P_{ow} för aromatiska molekyler och understrukturer.

Rekkers metod

I enlighet med Rekker (se hänvisning g) beräknas värdet av log P_{ow} på följande sätt:

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

där f_i representerar olika molekylfragmenkonstanter och a_1 är den frekvens med vilken de förekommer i den molekyl som testas. Korrektionstermerna kan uttryckas som en integral multipel av en enda konstant C_m (den s. k. "magiska konstanten"). Fragmentkonstanterna f_i ch C_m bestäms på grundval av en tabell med 1 054 experimentellt bestämda värden av P_{ow} (825 föreningar) med användning av flerdimensionell regressionsanalys (se hänvisningar c och h). Växelverkningsuttrycken bestäms efter fastställda regler som beskrivs i hänvisningslitteraturen (se hänvisningar e, h och i).

Hansch-Leos metod

I enlighet med Hansch och Leo (se hänvisning c) beräknas värden av log P_{ow} på följande sätt:

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

där f_i representerar de olika molekylfragmenkonstanterna, F_j är korrektionsuttrycken och a_i och b_j är de motsvarande uppträdandefrekvenserna. På grundval av experimentellt bestämda värden av P_{ow} har man genom att prova sig fram kunnat ställa upp en lista över atom- och gruppfragmentvärden och en lista över korrektionsuttryck F_j (s. k. "faktorer") Korrektionsuttrycken har delats in i olika klasser (se hänvisningar a och c). Det är relativt komplicerat och tidsödande att ta hänsyn till alla regler och korrektionsuttryck. Programvarupaket har utvecklats för detta (se hänvisning b).

Kombinerad metod

Beräkningen av log P_{ow} för komplexa molekyler kan förbättras betydligt om molekylen delas upp i större delstrukturer för vilka pålitliga log P_{ow}-värden finns tillgängliga, antingen från tabeller (se hänvisningar b och c) eller från egna mätningar. Sådana fragment (t. ex. heterocykler, anthraquinon, azobensen) kan sedan kombineras med Hanschs Π-värden eller med Rekkers eller Leos fragmentkonstanter.

Anmärkningar

i) Beräkningsmetoderna kan endast användas på helt eller delvis joniserade föreningar om det är möjligt att beakta de nödvändiga korrektionsfaktorerna.

ii) Om intramolekylära väteförbindelser kan antas förekomma måste motsvarande korrektionstermer (ca + 0,6 till + 1,0 log P_{ow}-enheter) läggas till (se hänvisning a). Indikationer av närvaron av sådana förbindelser kan erhållas från stereomodeller eller spektroskopiska data av molekylen.

iii) Om flera tautomeriska former är möjliga används den mest sannolika formen som bas för beräkningen.

iv) Revisioner av listor med fragmentkonstanter skall följas noggrant.

Rapportering

Vid användning av beräknings-/uppskattningsmetoder skall testrapporten om möjligt innehålla följande information:

— Beskrivning av ämnet (blandning, orenheter, etc.).

— Indikation av eventuella intramolekylära väteförbindelser, dissociation, laddning och andra eventuella särskilda förhållanden (t. ex. tautomeri).

— Beskrivning av beräkningsmetoden.

— Identifiering eller tillhandahållande av databas.

— Särskilda val av fragment.

— Fullständig dokumentation av beräkningen.

HÄNVISNINGAR

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

b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 92711, USA, Log P Database och Med. Chem. Software (Program CLOGP -3).

c) C. Hansch och 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, s. 525.

e) R. F. Rekker och H. M. de Kort, Euro. J. Med. Chem,. 1979, vol. 14., s. 479.

f) T. Fujita, J. Iwasa och C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, s. 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, s. 1459.

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

Tillägg 2

Rekommenderade referensämnen för HPLC-metoden

Nr.	Referensämne	Log P_{ow}	pKa
1	2-butanon	0,3	
2	4-acetylpyridin	0,5	
3	Anilin	0,9	
4	Acetanilid	1,0	
5	Bensylalkohol	1,1	
6	p-metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoxyättiksyra	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Bensonitril	1,6	
11	Fenylättiknitril	1,6	
12	4-metylbensenalkohol	1,6	
13	Acetonfenon	1,7	
14	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-nitrobensoesyra	1,8	pKa = 3,47
16	4-kloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobensen	1,9	
18	Kanelalkohol	1,9	
19	Bensoesyra	1,9	pKa = 4,19
20	p-kresol	1,9	pKa = 10,17
21	Kanelsyra	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisol	2,1	
23	Metylbensoat	2,1	
24	Bensen	2,1	
25	3-metylbensoesyra	2,4	pKa = 4,27
26	4-klorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	Trikloretylen	2,4	
28	Atrazin	2,6	
29	Etylbensoat	2,6	
30	2,6-diklorbensonitril	2,6	
31	3-klorbensoesyra	2,7	pKa = 3,82
32	Toluen	2,7	
33	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dikloranilin	2,8	
35	Monoklorbensen	2,8	
36	Allyl-fenyleter	2,9	
37	Bromobensen	3,0	
38	Etylbensen	3,2	
39	Bensofenon	3,2	
40	4-fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Tymol	3,3	
42	1,4-diklorbensen	3,4	
43	Difenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	Naftalen	3,6	
45	Fenylbensoat	3,6	
46	Isopropylbensen	3,7	
47	2,4,6-triklorfenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenyl	4,0	
49	Bensylbensoat	4,0	
50	2,4-dinitro-6 sec. butylfenol	4,1	
51	1,2,4-triklorbensen	4,2	
52	Dodekansyra	4,2	
53	Difenyleter	4,2	
54	n-butylbensen	4,5	
55	Fenantren	4,5	
56	Fluoranten	4,7	
57	Dibensyl	4,8	
58	2,6-difenylpyridin	4,9	
59	Trifenylamin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Andra referensämnen med låg log P_{ow}		
1	Nikotinsyra	– 0,07	

A. 9. FLAMPUNKT

1. METOD

1.1. INLEDNING

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

Vid val av försöksmetod skall man ta hänsyn till en eventuell kemisk reaktion mellan ämnet och provbehållaren.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

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

Enheter: °C

$t = T - 273{,}15$

(t i °C och T i K)

1.3. REFERENSÄMNEN

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne skall undersökas. Referensämnen skall först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

1.4. TESTMETODSPRINCIPER

Ämnet placeras i ett testkärl och värms upp eller kyls ned till testtemperaturen i enlighet med det beskrivna förfarandet för de individuella testmetoderna. Antändningsförsök utförs för att fastställa om provet antänds vid testtemperaturen.

1.5. KVALITETSKRITERIER

1.5.1. **Repeterbarhet**

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

1.5.2. **Sensitivitet**

Sensitiviteten är beroende av använd testmetod.

1.5.3. **Specificitet**

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

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

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

Av säkerhetsskäl rekommenderas att man för energiska eller toxiska ämnen endast använder en metod med en liten provstorlek, ca 2 cm^3.

1.6.2. **Testbetingelser**

Apparaten skall, såvida detta är förenligt med säkerhetskraven, placeras fritt från drag.

1.6.3. **Testförfarande**

1.6.3.1. *Jämviktsmetoden*

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

1.6.3.2. *Icke-jämviktsmetoden*

Abel-apparat:

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

Abel-Pensky-apparat:

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

Tag-apparat:

Se ASTM D 56.

Pensky-Martens-apparat:

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

Anmärkningar:

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

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

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

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

2. **DATA**

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten skall, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Den använda metoden skall anges liksom eventuella avvikelser.

— Resultaten och kompletterande uppgifter av betydelse för tolkningen av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

Inga.

A. 10. ANTÄNDLIGHET (FASTA ÄMNEN)

1. METOD

1.1. INLEDNING

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

Testet utförs endast på pulverformiga, granulära och pastaaktiga ämnen.

För att inte ta med alla ämnen som kan antändas, utan endast de som brinner snabbt eller de som på ett eller annat sätt har särskilt farliga egenskaper vid förbränning, anses endast de ämnen vars förbränningshastighet överstiger ett visst gränsvärde vara lättantändliga.

Det kan vara särskilt farligt om glödningen fortsätter genom metallpulver eftersom en brand är mycket svår att släcka. Metallpulver anses lättantändliga om glödningen kan breda ut sig i provet inom en viss tid.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Förbränningstiden uttrycks i sekunder.

1.3. REFERENSÄMNEN

Inte angivna.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Ämnet formas till ett 250 mm långt obrutet band och det företas ett preliminärt screeningtest för att bestämma om det, efter antändning med en gaslåga, sker en förbränning som breder ut sig med öppen låga eller genom glödning. Om glödningen breder ut sig mer än 200 mm av bandet inom en bestämd tid skall ett fullständigt testprogram utföras för bestämning av förbränningshastigheten.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Preliminärt screeningtest**

Ämnet formas till ett obrutet band som är omkring 250 mm långt, 20 mm brett och 10 mm högt på en icke-brännbar, icke-porös dåligt värmeledande plats.

En gaslåga (minsta diameter 5 mm) hålls vid den ena änden av pulverbandet tills pulvret fattar eld, dock högst 2 minuter (5 minuter för metallpulver och metallegeringar). Man noterar om förbränningen breder ut sig 200 mm över bandet under testperiodens 4 minuter (40 minuter för metallpulver). Om ämnet inte fattar eld eller förbränning med öppen låga eller genom glödning inte breder ut sig 200 mm över bandet under testperiodens 4 minuter (40 minuter) anses ämnet inte vara lättantändligt och ytterligare försök är inte nödvändiga. Om förbränningen i ämnet breder ut sig 200 mm över bandet på mindre än 4 minuter eller mindre än 40 minuter för metallpulver utförs nedanstående test (1.6.2).

1.6.2. **Test för förbränningshastighet**

1.6.2.1. *Förberedelse*

Pulverformiga eller granulära ämnen fylls löst packat i en form som har en längd av 250 mm och en triangelformad tvärsnittssektion med en invändig höjd av 10 mm och en invändig bredd av 20 mm. På ömse sidor om formen monteras i längdriktningen en sidoavgränsande metallplatta, som skjuter ut 2 mm ovanför den triangelformade tvärsnittssektionen (se figuren). Därefter låter man formen falla tre gånger från 2 cm höjd på ett fast underlag. Om så behövs fylls formen på igen. Därefter tas de sidoavgränsande metallplattorna bort och överskottsämne skrapas bort. En icke-brännbar, icke-porös dåligt värmeledande platta läggs över formen, apparaten vänds upp och ned och formen avlägsnas.

Pastaaktiga ämnen breds ut på en icke-brännbar, icke-porös dåligt värmeledande platta som en 250 mm lång korv med ett tvärsnitt av ungefär 1 cm^2.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

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

1.6.2.3. *Testförfarande*

Anordna testhögen längs draget i ett dragskåp.

Luftdraget skall vara tillräckligt för att förhindra rök från att ta sig in i laboratoriet och skall inte ändras under testet. Ett dragskydd bör ställas upp runt apparaten.

En het flamma från en gasbrännare (minsta diameter 5 mm) används för att antända ena änden av högen. När 80 mm av högen har bränts skall förbränningshastigheten över de nästa 100 mm mätas. Testet skall utföras sex gånger, varje gång på ett rent kallt underlag, såvida inte ett positivt resultat erhållits tidigare.

2. **DATA**

Bränntiden från det preliminära screeningtestet (1.6.1) och den kortaste förbränningstiden som bestämts i upp till sex test (1.6.2.3) är nödvändiga för utvärderingen.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (identifiering och orenheter).

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

— Resultat från det preliminära screeningtestet och från test av brännhastighet om sådant utförts.

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

3.2. TOLKNING AV RESULTATEN

Pulverformiga, granulära eller pastaaktiga ämnen skall anses vara mycket brandfarliga om bränntiden vid ett av testerna, som utförts enligt det i 1.6. beskrivna testförfarandet, är kortare än 45 sekunder. Metallpulver eller metallegeringar anses mycket lättantändliga om de kan antändas och lågan eller reaktionszonen breder ut sig över hela provet inom 10 minuter.

4. **HÄNVISNINGAR**

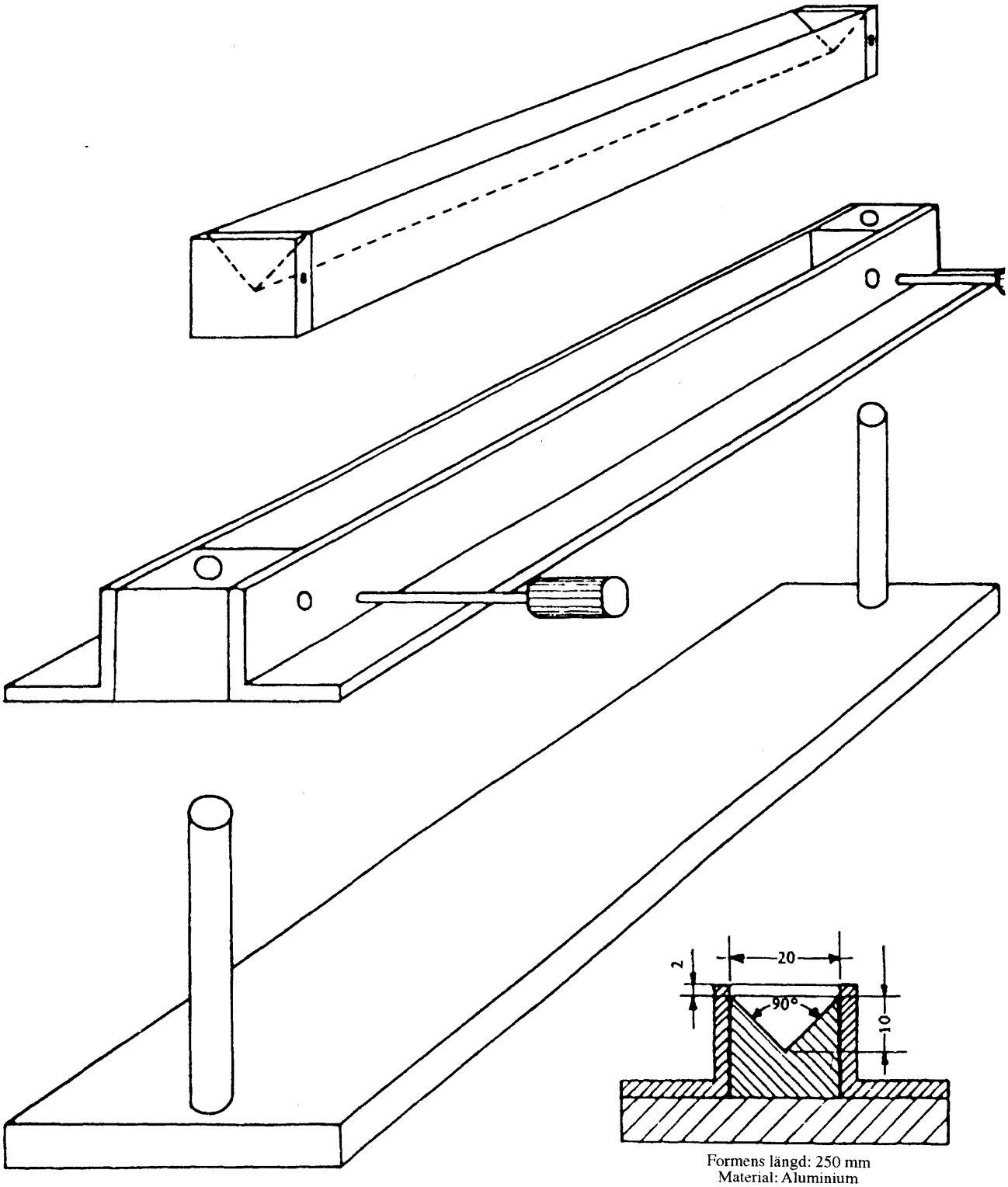
1. NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

Tillägg

Figur

Form och tillbehör för anordning av testhögen

(Alla mått i mm)



Formens längd: 250 mm
Material: Aluminium

A. 11. ANTÄNDLIGHET (GASER)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Denna metod gör det möjligt att bestämma om en gas blandad med luft vid rumstemperatur (cirka 20 °C) och atmosfäriskt tryck kan antändas och i så fall i vilket koncentrationsområde. Blandningar med ökande koncentrationer av testgasen i luft utsätts för en elektrisk gnista varvid iakttas om antändning sker.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

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

1.3. REFERENSÄMNEN

Inte angivet.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Apparatur**

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

Som antändningskälla används en stående induktionsgnista med en varaktighet på 0,5 sek. Denna gnista genereras av en högspänningstransformator med en utgångsspänning på 10 - 15 kV (högsta ingångseffekt 300 W). I hänvisning 2 visas ett exempel på en lämplig apparat.

1.6.2. **Testbetingelser**

Detta test skall utföras vid rumstemperatur (cirka 20 °C).

1.6.3. **Testförfarande**

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

Om man utifrån kännedom om gasens kemiska struktur kan förmoda att gasen inte kan antändas och att sammansättningen av den stökiometriska blandningen med luft kan beräknas, behöver man endast testa blandningar från 10 % under till 10 % över det stökiometriska blandningsförhållandet.

2. DATA

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

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— En beskrivning av den använda apparaturen med måttangivelser.

— Temperaturen vid vilken testet gjordes.

— Undersökta koncentrationer och erhållna resultat.

— Testresultaten: inte antändlig gas eller lättantändlig gas.

— Om slutsatsen blir "inte antändlig", skall man ange det koncentrationsområde inom vilket provning med 1 % intervaller har skett.

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

4. HÄNVISNINGAR

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

2. W. Berthold, D. Conrad, T. Grewser, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker och H. Schake. "Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen". Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol 56, 2, s. 126-127.

A. 12. ANTÄNDLIGHET (KONTAKT MED VATTEN)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Denna testmetod kan användas till att bestämma om ett ämne vid reaktion med vatten eller fuktig luft utvecklar farliga mängder gas som eventuellt är lättantändliga.

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

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Lättantändliga: Ämnen som vid kontakt med vatten eller fuktig luft utvecklar lättantändliga gaser i farliga mängder med en lägsta hastighet på 1 liter/kg per timme.

1.3. TESTMETODSPRINCIP

Ämnet testas enligt det stegförfarande som beskrivs nedan. Testet kan avbrytas vid antändning. Om man vet att ämnet inte reagerar våldsamt med vatten kan man börja med steg 4 (1.3.4).

1.3.1. **Steg 1**

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

1.3.2. **Steg 2**

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

1.3.3. **Steg 3**

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

1.3.4. **Steg 4**

Testämnet blandas med destillerat vatten vid 20 °C och gasutvecklingshastigheten mäts varje timme under sju timmar. Om utvecklingshastigheten efter 7 timmar är oregelbunden eller ökande skall mättiden förlängas till högst fem dagar. Testet kan avbrytas om hastigheten vid något tillfälle överstiger 1 liter/kg per timme.

1.4. REFERENSÄMNE

Inte angivet.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Steg 1**

1.6.1.1. *Testbetingelser*

Testet utförs vid rumstemperatur (ca 20 °C).

1.6.1.2. *Testförfarande*

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

1.6.2. **Steg 2**

1.6.2.1. *Apparatur*

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

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Testet utförs vid rumstemperatur (ca 20 °C).

1.6.2.3. *Testförfarande*

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

1.6.3. **Steg 3**

1.6.3.1. *Testbetingelser*

Testet utförs vid rumstemperatur.

1.6.3.2. *Testförfarande*

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

1.6.4. **Steg 4**

1.6.4.1. *Apparatur*

Apparaturen monteras enligt figuren.

1.6.4.2. *Testbetingelser*

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

1.6.4.3. *Testförfarande*

10 till 20 ml vatten tillsätts i apparatens dropptratt, och 10 g av ämnet placeras i den koniska kolven. Den gasvolym som utvecklas kan mätas med lämplig metod. Kranen på dropptratten öppnas för att släppa in vattnet i den koniska kolven och ett stoppur startas. Gasutvecklingen mäts varje timme under en sjutimmarsperiod. Om gasutvecklingen är oregelbunden under denna period, eller om hastigheten för gasutvecklingen ökar vid slutet av denna period, fortsätter mätningarna i upp till fem dagar. Om gasutvecklingen vid någon tidpunkt överstiger 1 liter/timme kan testet avbrytas. Detta test skall utföras tre gånger.

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

2. **DATA**

Ämnet anses farligt om

— spontan antändning sker under testförfarandet,

eller

— brandfarlig gas utvecklas i högre mängd än 1 liter/kg substans per timme.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Uppgifter om eventuell inledande behandling av testämnet.

— Testresultaten (steg 1, 2, 3 och 4).

— Den utvecklade gasens kemiska sammansättning.

— Gasens utvecklingshastighet och steg 4 (1.6.4.) utfördes.

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

4. **HÄNVISNINGAR**

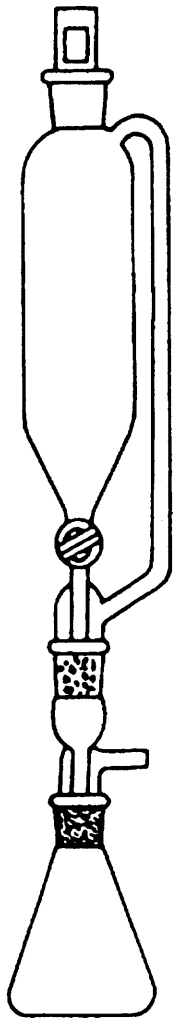
1. Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

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.

Tillägg

Figur

Apparatur



A. 13. PYROFORISKA EGENSKAPER HOS FASTA OCH FLYTANDE ÄMNEN

1. METOD

1.1. INLEDNING

Testförfarandet kan tillämpas på fasta och flytande ämnen som i små mängder antänds spontant kort tid efter det att de har kommit kontakt med luft vid rumstemperatur (cirka 20 °C).

Ämnen som kräver timmar eller dagar vid rumstemperatur eller förhöjd temperatur innan de självantänds omfattas inte av denna testmetod.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Ämnen anses vara mycket brandfarliga om de antänds eller förkolnar under de betingelser som beskrivs i 1.6.

Det kan även vara nödvändigt att undersöka vätskors självantändlighet med metod A. 15: Självantändlighetstemperatur (vätskor och gaser).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inte angivna.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Ämnet, fast eller flytande, blandas med en inaktiv bärare och får under fem minuter vara i kontakt med luften vid rumstemperatur. Flytande ämnen som inte fattar eld absorberas sedan de på filterpapper och utsätts under fem minuter för luftens påverkan vid rumstemperatur (cirka 20 °C). Fasta och flytande ämnen som fattar eld och vätskor som fattar eld eller får filterpappret att förkolna anses vara självantändliga.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarhet: Av säkerhetsskäl räcker det med ett positivt resultat för att ämnet skall bedömas vara självantändligt.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Apparatur**

En porslinskopp, diameter ca 10 cm, fylls med kiselgur upp till ungefär 5 mm höjd vid rumstemperatur (ca 20 °C).

Anmärkning:

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

Det behövs ett torrt filterpapper för att testa vätskor som inte fattar eld vid kontakt med luften när de blandas med en inaktiv bärare.

1.6.2. **Testförfarande**

a) *Pulverformiga fasta ämnen*

1—2 cm³ av det pulverformiga testämnet hälls från cirka 1 m höjd på en icke brännbar yta, varvid iakttas om ämnet antänds under fallet eller innan det har gått fem minuter efter det att det har lagt sig.

Testet utförs sex gånger såvida inte antändning sker.

b) *Vätskor*

Cirka 5 cm³ av testvätskan hälls i den förberedda porslinskoppen, varvid iakttas om ämnet antänds inom fem minuter.

Om inte antändning sker i något av de sex testerna utförs följande test:

Med en injektionsspruta sprutas 0,5 ml av provet på ett böjt filterpapper och det observeras om antändning eller förkolning av filterpappret sker inom fem minuter. Testet utförs tre gånger såvida inte antändning eller förkolning sker.

2. DATA

2.1. TOLKNING AV RESULTAT

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

2.2. UTVÄRDERING

Om ämnet fattar eld inom fem minuter efter det har tillsatts till en inaktiv bärare och exponeras för luft, eller en vätska får en bit filterpapper att förkolna eller fatta eld inom fem minuter efter det att ämnet tillsatts och utsatts för luftens påverkan anses ämnet självantändligt.

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Testresultaten.

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

4. HÄNVISNINGAR

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. EXPLOSIVA EGENSKAPER

1. METOD

1.1. INLEDNING

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

Metoden består av tre delar:

a) test av värmesensitiviteten (se hänvisning 1),

b) test av mekanisk sensitivitet avseende slagpåverkan (se hänvisning 1),

c) test av mekanisk sensitivitet avseende friktionspåverkan (se hänvisning 1).

Metoden ger data för att utvärdera sannolikheten att det vid vissa ovanliga påverkningar framkallas en explosion. Metoden är inte avsedd att säkerställa om ett ämne överhuvudtaget kan explodera.

Metoden är lämplig för att bestämma om ett ämne innebär en explosionsfara (värme- och mekanisk känslighet) under de särskilda betingelser som anges i direktivet. Metoden grundas på ett antal apparater som är allmänt använda internationellt (se hänvisning 1) och som vanligtvis ger användbara resultat. Det erkänns att metoden inte är definitiv. Alternativ apparatur kan användas förutsatt att den är internationellt erkänd och att de erhållna resultaten kan korreleras med de resultat som erhållits med den angivna apparaturen.

Testen behöver inte utföras om det enligt föreliggande termodynamiska uppgifter (t. ex. bildningsvärme, nedbrytningsvärme) och/eller frånvaro av vissa reaktiva grupper (se hänvisning 2) i strukturformeln är ställt utom rimligt tvivel att ämnet inte kan brytas ned, bilda gaser och frigöra värme mycket snabbt (dvs. materialet utgör inte någon explosionsrisk). Ett test av mekanisk sensitivitet avseende friktion krävs inte för flytande ämnen.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Explosiva:

Ämnen som kan explodera när de utsätts för en öppen låga eller som är känsliga för slag och friktion i den angivna apparaturen (eller är mer mekaniskt känsliga än 1,3-dinitrobensen i alternativ apparatur).

1.3. REFERENSÄMNE

1,3-dinitrobensen, teknisk kristallinprodukt som siktats genom 0,5 mm, för friktions- och slagpåverkanmetoden.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RXD, hexogen, cyclonit — CAS 121-82-4), omkristalliserad från vattnigt cyclohexanon, våtsiktad genom en 250 µm och bibehållen i en 150 µm sil, torkad vid 103 ± 2 °C (i 4 timmar) för den andra serien av friktions- och slagtester.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Förberedande tester är nödvändigt för att fastställa säkra betingelser för utförandet av de tre sensitivitetstestet:

1.4.1. **Test för säkerhet vid hantering (se hänvisning 3)**

Av säkerhetsskäl skall, innan huvudtestet inleds, mycket små prov (cirka 10 mg) av ämnet utsättas för upphettning, utan att vara inneslutna, med en gaslåga, för slagpåverkan i lämplig typ av apparatur och friktionspåverkan genom användning av en hammare mot ett städ eller någon typ av friktionsmaskin. Syftet är att fastställa om ämnet är så sensitivt och explosivt att de föreskrivna sensitivitetstestet, särskilt test av värmekänsligheten, skall utföras med särskilda försiktighetsåtgärder för att undvika att den som utför testen skadas.

1.4.2. **Värmekänslighet**

Metoden innebär att ämnet värms upp i ett stålrör som stängs med en strypfläns med olika håldiametrar. På detta sätt kan man bestämma om ämnet är benäget att explodera under intensiv värmepåverkan vid väl definierad inneslutning.

1.4.3. **Mekanisk känslighet (slagpåverkan)**

Metoden innebär att ämnet utsätts för slagpåverkan från en bestämd massa från en bestämd höjd.

1.4.4. **Mekanisk känslighet (friktion)**

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

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Värmekänslighet (effekt av öppen låga)**

1.6.1.1 *Apparatur*

Apparaturen består av ett engångsstålrör med en återanvändbar stängningsanordning (se figur 1) som placeras i en uppvärmnings- och skyddsanordning. Röret är tillverkat av djupdragen stålplåt (se tillägg) och har en innerdiameter av 24 mm, en längd av 75 mm och en väggtjocklek av 0,5 mm. I den öppna änden är röret flänsat så att det kan slutas med strypflänsanordningen (figur 1). Detta består av en tryckmotståndskraftig skyddsfläns med ett hål i mitten, som är stadigt förankrad till ett rör genom ett tvådelat skruvförband (mutter och gängad krage). Muttern och den gängade kragen är tillverkade av krom-manganstål (se tillägg) vilket är gnistfritt upp till 800 °C. Det finns strypflänsar med en rad olika håldiametrar, som är gjorda av 6 mm tjockt värmebeständigt stål (se tillägg).

1.6.1.2. *Testbetingelser*

Normalt testas ämnet i den form det är mottaget, men i vissa fall, t. ex. om det är pressat, gjutet eller på annat sätt sammanpressat, kan det vara nödvändigt att testa ämnet efter sönderdelning.

För fasta ämnen bestäms den mängd material som skall användas för varje test genom ett förfarande i två steg. I det första steget fylls ett tarterat rör med 9 cm^3 av ämnet som sammanpressas med en kraft av 80 N fördelat över hela rörtvärsnittet. Av säkerhetsskäl, eller om ämnet kan ändra fysisk form vid kompression, kan andra

påfyllningsförfaranden användas. Sammanpressning är t. ex. inte lämpligt om ämnet är mycket friktionskänsligt. Om materialet kan komprimeras tillsätts och sammanpressas mera tills röret är fyllt till en höjd av 55 mm från överkanten. Den totala mängd som har använts för att fylla röret till denna höjd bestäms och ytterligare 2 portioner som sammanpressas med en kraft av 80 N tillsätts. Därefter tillsätts material genom sammanpressning eller så avlägsnas material tills röret är fyllt till 15 mm från överkanten. Det andra steget består i att en tredjedel av den samlade mängd som användes i det första steget tillsätts och sammanpressas. Därefter tillsätts ytterligare 2 portioner som sammanpressas med en kraft av 80 N och materialets höjd i röret justeras till 15 mm från överkanten genom tillsättning eller avlägsnande av material. Vid varje försök används den mängd fast ämne som har fastställts i detta andra steg. Påfyllningen sker i tre lika stora portioner som var och en komprimeras till 9 cm^3 med den kraft som krävs. (Detta är lättast att göra genom användning av avståndsringar).

Vätskor och geléaktiga ämnen fylls i röret till en höjd av 60 mm varvid försiktighet iakttas med geléaktiga ämnen för att undvika luftbubblor under påfyllning. Den gängade kragen förs upp på röret underifrån, den valda strypflänsen sätts in och muttern åtstramas efter smörjning med ett molybdensulfidbaserat smörjmedel. Det är viktigt att kontrollera att inget ämne har fastnat mellan flänsen och plattan eller i gängorna.

Uppvärmningen sker med propan, som från en industriell cylinder med tryckreglator (60-70 mbar) leds genom en mätare och fördelas jämnt till fyra brännare genom en anslutning (vilket kontrolleras genom visuell inspektion av brännarnas lågor).

1.6.1.3. *Testförfarande*

Varje test pågår tills röret antingen sönderdelas eller har varit uppvärmt i 5 minuter. Ett test vid vilket röret sönderdelas i tre eller flera fragment, som eventuellt hänger ihop med smala metallstrimlor enligt figur 2, betraktas som en explosion. Ett test som leder till färre fragment eller ingen fragmentering betraktas inte som en explosion.

Först utförs tre tester med en strypfläns med ett 6 mm hål, och om ingen explosion sker utförs ytterligare tre test med en strypfläns med ett 2 mm hål. Om explosion sker under ett av dessa tester är ytterligare testning inte nödvändig.

1.6.1.4. *Utvärdering*

Testresultatet anses positivt om en explosion inträffar i en av ovan nämnda testserier.

1.6.2. **Mekanisk sensitivitet (slagpåverkan)**

1.6.2.1. *Apparatur (figur 4)*

En typisk fallhammarapparatur består i huvudsak av ett gjutstålsblock med fot, städ, pelare, gejder, fallvikter, utlösningsmekanism och provhållare. Stålstädet, 100 mm (diameter) × 70 mm (höjd) är fastskruvat ovanpå ett stålblock, 230 mm (längd) × 250 mm (bredd) × 200 mm (höjd) med gjuten fot, 450 mm (längd) × 450 mm (bredd) × 60 mm (höjd). En pelare bestående av ett heldraget stålrör är fastsatt i en hållare som är fastskruvad bak på stålblocket. Apparaten är förankrad i ett massivt betongblock, 60 × 60 × 60 cm med fyra skruvar, så att gejderna är fullständigt lodräta och fallvikterna kan falla fritt. Det finns fallvikter på 5 och 10 kg framställda i massivt stål. Slagvikternas slagyta är av härdat stål, HRC 60 — 63, och har en diameter av minst 25 mm.

Provet placeras i en slaganordning som består av två massiva stålcylindrar som är placerade koaxialt ovanför varandra i en ihålig cylindrisk styrring av stål. Stålcylindrarna skall ha en diameter av 10 (-0,003, - 0,005) mm och en höjd av 10 mm och ha polerade ytor, rundade kanter (kurvradie 0,5 mm) och en hårdhet av HRC 58 - 65. Den ihåliga cylindern skall ha en utvändig diameter av 16 mm, en polerad urborrning av 10 (+ 0,005, + 0,010) mm och en höjd av 13 mm. Slaganordningen samlas på ett mellanstäd (diameter 26 mm, höjd 26 mm) av stål och centreras med en ring i vilken det finns perforeringar för att leda bort rökgaser.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Provet skall ha en volym på 40 mm³ eller en volym som passar till en alternativ apparatur. Fasta ämnen testats i torrt tillstånd och förbereds enligt följande:

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

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

Ämnen som normalt förekommer i pastaform bör om möjligt testas i torrt tillstånd och under alla omständigheter efter borttagning av så mycket upplösningsmedel som möjligt Vätskor testas med ett avstånd av 1 mm mellan den översta och den nedersta stålcylindern.

1.6.2.3. *Testförfarande*

En serie av sex tester utförs i vilka den 10 kg tunga massan får falla från 0,40 m (40 J). Om en explosion erhålls under de sex testerna vid 40 J måste en andra serie bestående av sex tester utföras i vilka en 5 kg tung massa får falla från 0,15 m (7,5 J). I andra apparaturer jämförs provet med det valda referensämnet med användning av ett fastställt förfarande (tvåslagsteknik osv.).

1.6.2.4. *Utvärdering*

Testresultatet anses positivt om en explosion (eldutveckling och knall är likvärdiga med explosion) inträffar minst en gång i ett av testerna med den beskrivna slagapparaturen eller provet är mer sensitivt än 1,3-dinitrobensen eller RXD i ett alternativt slagpåverkantest.

1.6.3. **Mekanisk sensitivitet (friktion)**

1.6.3.1. *Apparatur (figur 5)*

Friktionsapparaturen består av en bottenplatta av gjuten stål på vilken själva friktionsanordningen är monterad. Denna består av en fast porslinspinne och rörliga porslinsplåtar. Porslinsplåten är fäst i en glidbar vagga som rör sig mellan två skenor. Vaggan drivs via en drivstång, en excentrisk trissa och en överföringsväxel av en elektrisk motor på sådant sätt att porslinsplåten rörs under porslinspinnen med en bakåt- och framåtgående rörelse på 10 mm. Porslinspinnen skall belastas med t. ex. 120 eller 360 newton.

Porslinsplattorna är tillverkade av vitt tekniskt porslin (uppruggningsdjup 9–32 µm) och har dimensionerna 25 mm (längd) × 25 mm (bredd) × 5 mm (höjd). Även den cylindriska porslinspinnen är tillverkad av vitt tekniskt porslin, är 15 mm lång, har en innerdiameter på 10 mm och uppruggade sfäriska ändytor med en rundningsradie på 10 mm.

1.6.3.2. *Testbetingelser*

Provet skall ha en volym av 10 mm³ eller en volym som passar till en alternativ apparatur.

Fasta ämnen testas i torrt tillstånd och förbereds enligt följande:

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

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

Ämnen som normalt förekommer i pastaform bör om möjligt testas i torrt tillstånd. Om ämnet inte kan testas i torrt tillstånd skall pastan (efter borttagning av så mycket upplösningsmedel som möjligt) testas som en 0,5 mm tjock, 2 mm bred och 10 mm lång film, som framställs med en speciell form.

1.6.3.3. *Testförfarande*

Porslinspinnen anbringas på testprovet och vikten hängs på. När testet utförs skall slipmärkena på porslinsplattan ligga tvärs emot rörelseriktningen. Kontrollera noggrant att pinnen vilar på provet, att tillräckligt med testämne ligger under pinnen och att plattan rör sig korrekt under pinnen. För pastaaktiga ämnen används en 0,5 mm tjock form med ett hål av 2 × 10 för att anbringa ämnet på plattan. Porslinsplattan skall flytta sig 10 mm fram och tillbaka under porslinspinnen under 0,44 sekunder. Varje del av porslinsplattan och porslinspinnen får endast användas en gång. Varje pinnes två ändar räcker till två försök och de två ytorna på en platta räcker vardera för tre försök.

Sex försök med en belastning av 360 N utförs. Om en explosion förekommer i ett av dessa sex försök utförs en ny serie med sex försök med en belastning av 120 N. I andra apparater jämförs proven med det valda referensämnet med hjälp av ett fastställt förfarande (t. ex. up- and down-teknik).

1.6.3.4. *Utvärdering*

Testresultatet anses positivt om en explosion (krepitation, eldutveckling och knall är likvärdiga med explosion) inträffar minst en gång i ett av testerna med den beskrivna friktionsapparaturen eller de motsvarande kriterierna i ett alternativ friktionstest är uppfyllda.

2. DATA

Ett ämne anses i princip vara explosionsfarligt i direktivets bemärkelse om ett positivt erhålls i testet av värmesensitivitet, slagpåverkantest eller friktionspåverkantest.

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Testämnets beteckning, sammansättning, renhet, fukthalt osv.

— Provets fysiska form och om det har krossats, brutits eller siktats.

— Iakttagelser under värmesensitivitetstestet (t. ex. provmassa, antal fragment, etc.)

— Iakttagelser under testet av mekanisk känslighet (t. ex. avsevärd rökutveckling eller fullständig nedbrytning utan knall, lågor, gnistor, sprakning, etc.)

— Resultat för varje test.

— Vetenskapliga grunder för eventuell användning av alternativ apparatur, samt tecken på korrelation mellan resultat som erhållits med beskriven apparatur och de som erhållits med likvärdig apparatur.

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

— Alla ytterligare kommentarer som är relevanta för tolkning av resultaten.

3.2. TOLKNING OCH UTVÄRDERING AV RESULTAT

I testrapporten skall alla resultat som anses vara falska, avvikande eller icke representativa anges. Om något resultat skall bortses från skall en förklaring ges och resultaten av ett alternativt eller kompletterande test anges. Om ett avvikande resultat inte kan förklaras på detta sätt skall det godtas för vad det är och i enlighet därmed användas vid klassificering av ämnet.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Test and criteria, 1990, Förenta nationerna, 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. och Swart, K. H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, s. 6-13 och 30-42.

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

Tillägg

Exempel på materialspecifikation för värmesensitivitetstestet (se DIN 1623)

1. Rör: Materialspecifikation nr. 1,0336.505 g
2. Strypfläns: materialspecifikation nr. 1.4873
3. Gängad krage och mutter: materialspecifikation nr. 1.3817

Figur 1

Apparatur för värmesensitivitetstest
(Alla mått i mm)

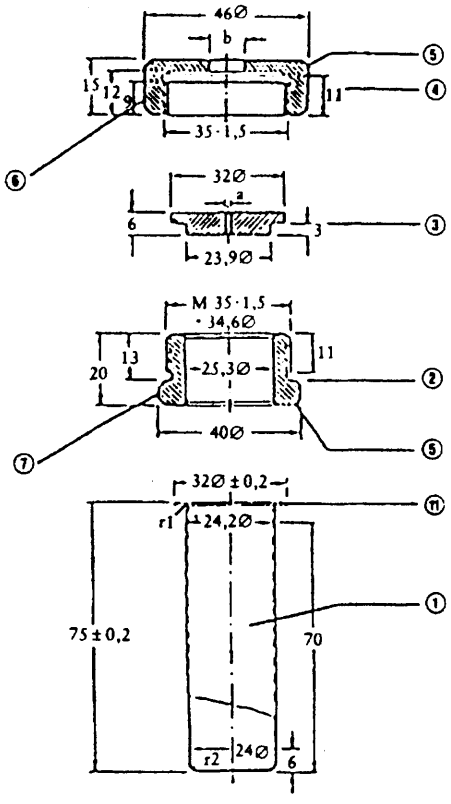


Fig. 1a Stålrör och tillbehör

1. rör
1a. utvändig fläns
2. gängad krage, lågfriktionsgänga
3. strypfläns a = 2,0 eller 6,0 mm i diameter
4. mutter b = 10 mm i diameter
5. fasad yta
6. 2 tag för nyckelvidd 41

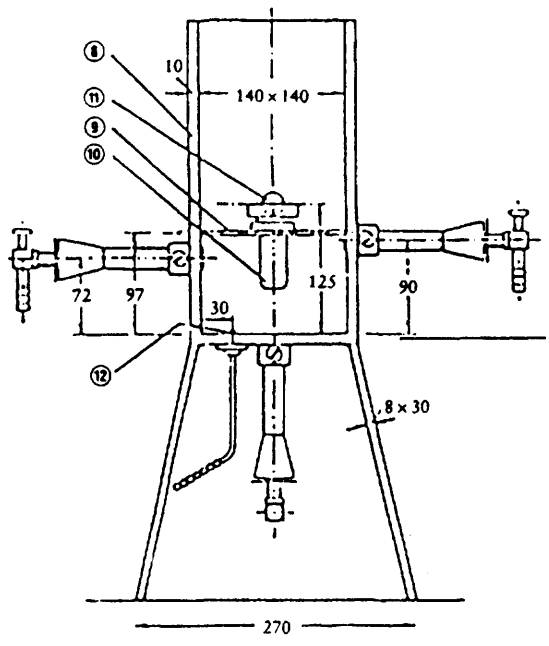


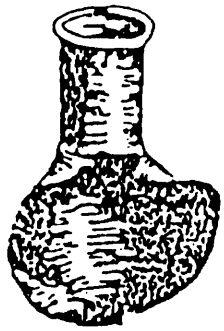
Fig.1 b Värme- och skyddsanordning

7. 2 tag för nyckelvidd 36
8. splitterfri låda
9. 2 stödpinnar för rör
10. provrör
11. position för bakre brännare, de andra brännarna är synliga
12. pilotjet

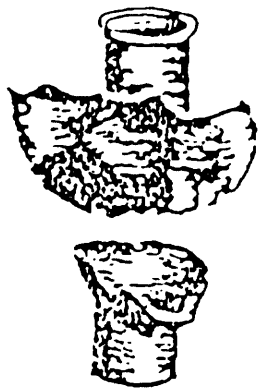
Figur 2

Värmesensitivitetstest

Exempel på fragmentering



Ingen explosion



Ingen explosion



Explosion



Explosion



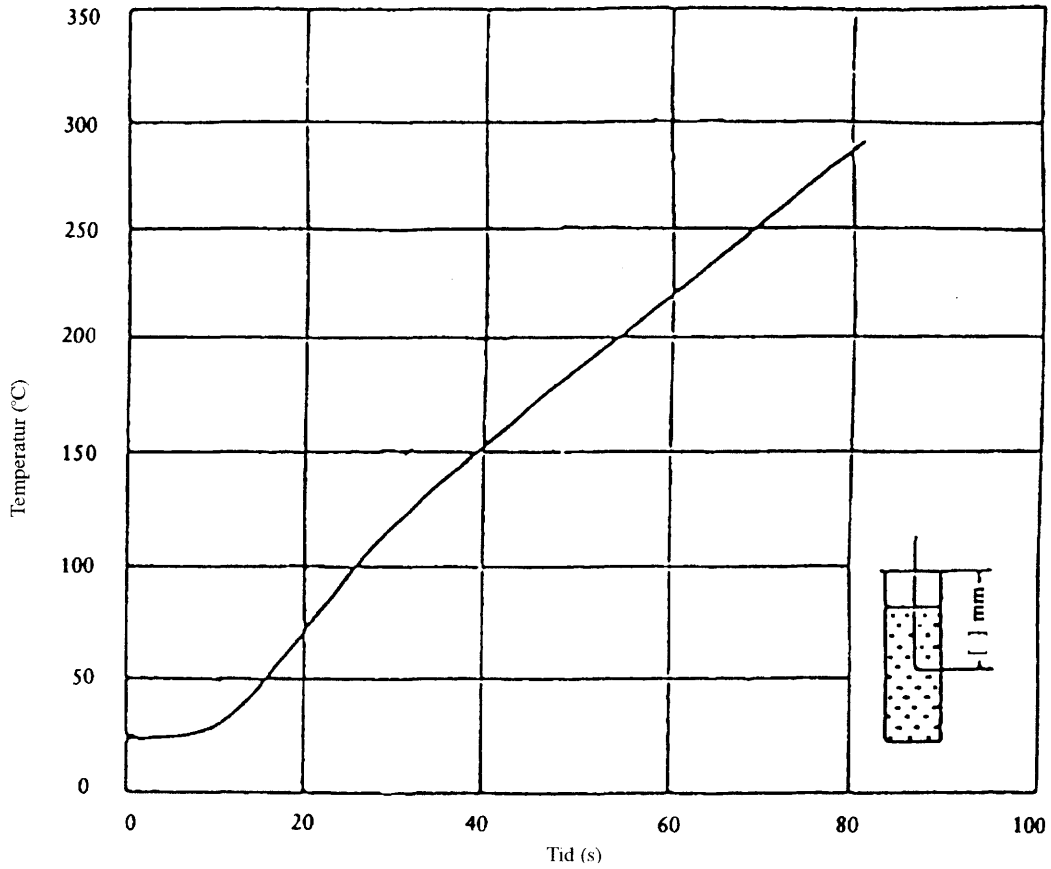
Explosion



Explosion

Figur 3a

Kalibrering av uppvärmningshastigheten vid test av värmesensitivitet



Kurvan över temperaturförloppet mot tiden vid uppvärmning av dibutylftalat (27 cm^3) i ett stängt rör (strypfläns med 1,5 mm hål) med ett propanflöde av 3,2 liter/minut. Temperaturen är mätt med kromel/alumel-termoelement med 1 mm inkapsling i rostfritt stål, placerat centralt 43 mm under rörens överkant. Mellan 135 °C och 285 °C skall uppvärmningshastigheten vara 185-215 K/minut.

Figur 4

Slagpåverkanapparatur

(Alla mått i mm)

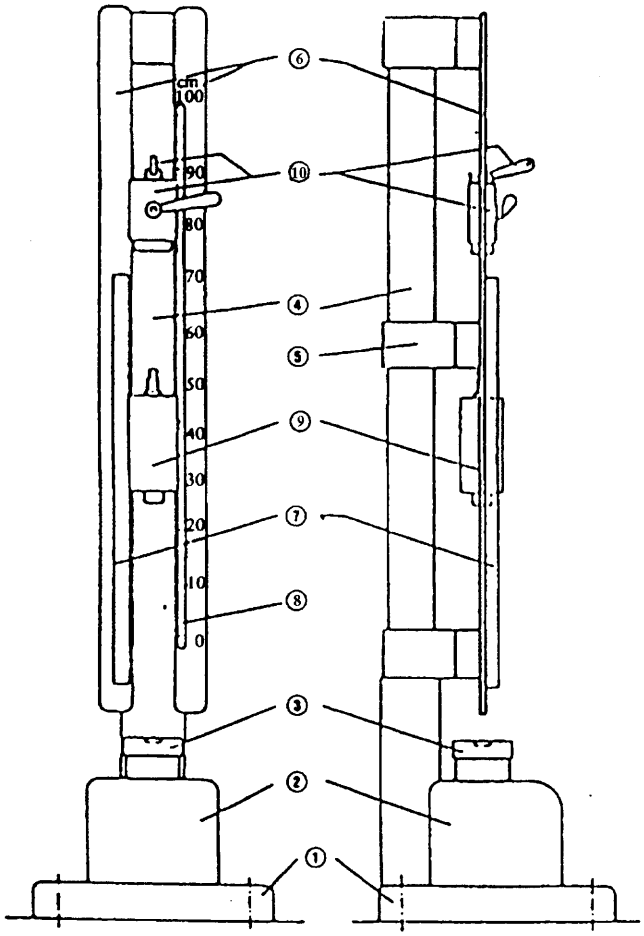


Fig. 4a Fallhammare, framifrån och från sidan, allmän överblick

1. fot, 450 × 450 × 60
2. stålblock. 230 × 250 × 200
3. städ, 100 mm i diameter × 70
4. pelare
5. mellantravers
6. 2 gejder
7. kuggstång

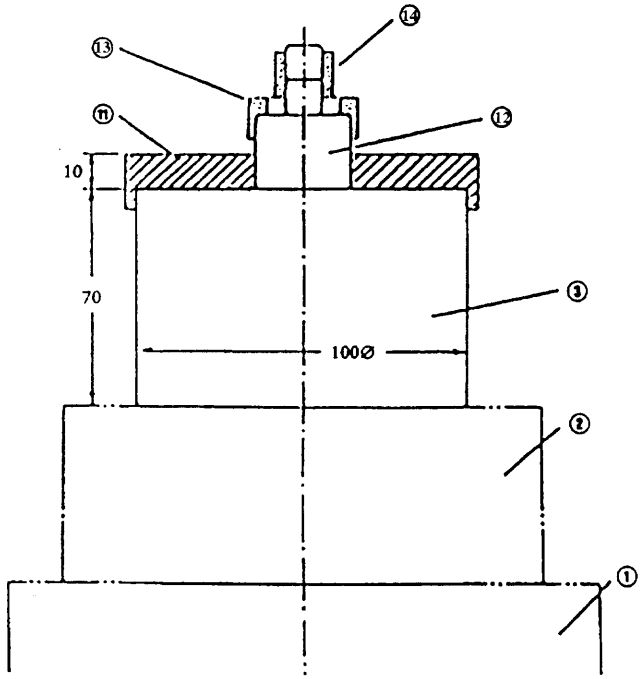


Fig. 4b Fallhammare, lägre del

8. graderad skala
9. fallhammare (fallvikt)
10. fasthållnings- och utlösningsanordning
11. styrplatta
12. mellanstäd (utbytbart), 26 diameter × 26
13. styrring med hål
14. slaganordning

Figur 4

Fortsättning

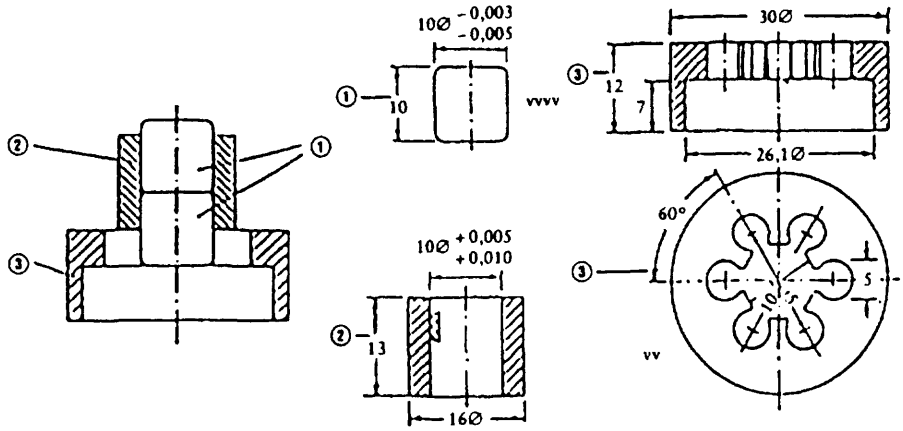
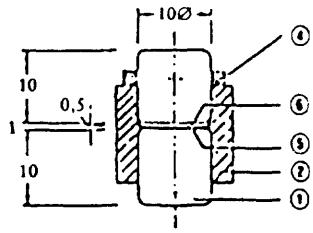


Fig. 4c Slagpåverkananordning för ämnen i pulver- eller pastaform

1. stålcylindrar
2. ring för stålcylindrar
3. centrerring med hål
   a. lodrät genomskärning
   b. plan
4. gummiring
5. vätska (40 mm³)
6. vätskefritt område

Fig. 4d Slaganordning för vätskor



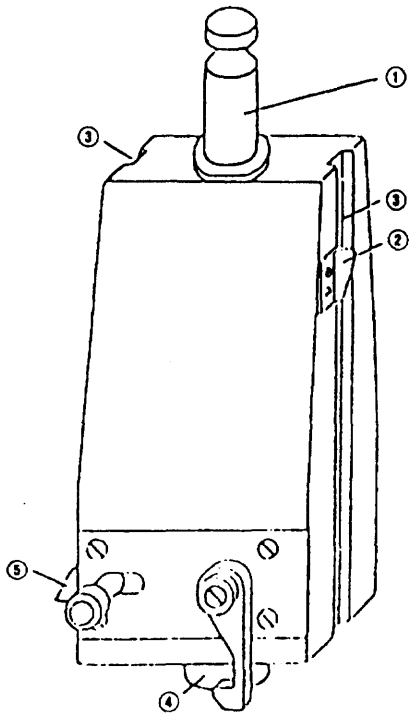


Fig. 4e Hammare (fallvikt 5 kg)

1. upphängningstapp
2. höjdmärke
3. styrfals
4. cylindriskt slaghuvud
5. bakslagshake

Figur 5

Apparatur för friktionssensitivitet

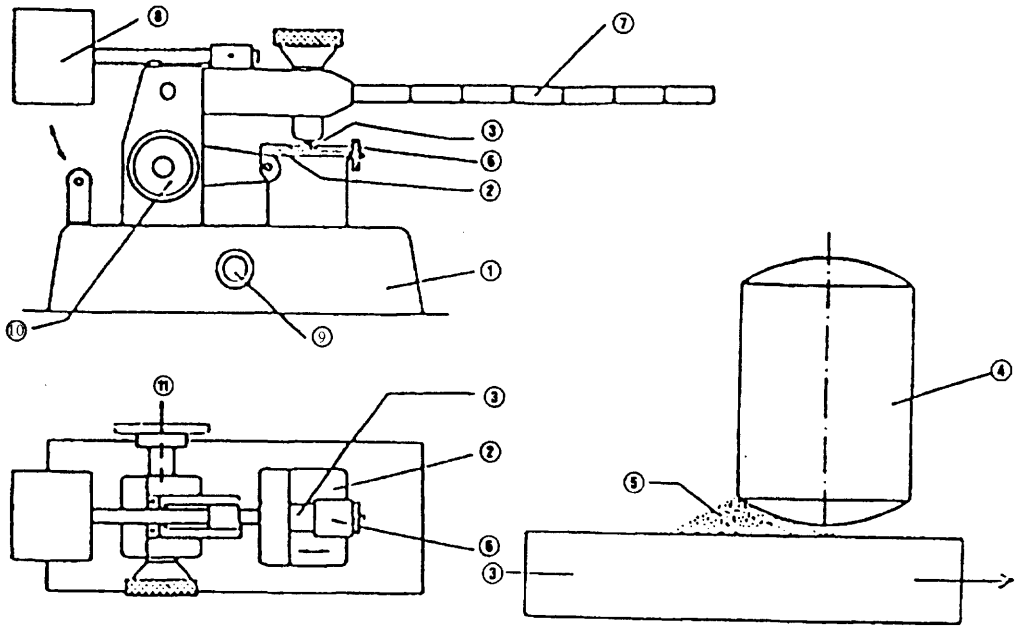


Fig. 5a Friktionsapparatur: vertikalprojektion och grundritning

1. bottenplatta av stål
2. glidbar vagga
3. porslinsplatta, 25 × 25 × 5 mm, fäst på vagga
4. fast porslinspinne
5. testprov, cirka 10 mm^3

Fig. 5b Startposition för pinne på prov

6. pinnhållare
7. lastarm
8. motvikt
9. omkopplare
10. ratt för inställning av vagga vid startposition
11. riktning mot elektrisk drivmotor

A. 15. SJÄLVANTÄNDNINGSTEMPERATUR (VÄTSKOR OCH GASER)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Explosiva ämnen och ämnen som antänds spontant vid kontakt med luft vid omgivningstemperatur, skall inte användas vid detta test. Testförfarandet får tillämpas på gaser, vätskor och ångor som i närvaro av luft kan antändas av en varm yta.

Självantändningstemperaturen kan sänkas avsevärt vid förekomst av katalytiska orenheter, av ytmaterialet eller av en större volym på testkärlet.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

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

1.3. REFERENSÄMNEN

Referensämnen återges i standarderna (1.6.3). De skall först och främst användas till att emellanåt kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten från andra metoder.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Med denna metod bestäms den lägsta temperaturen hos den invändiga ytan i ett slutet rum, vid vilken en gas, ånga eller vätska som sprutas in i rummet, fattar eld.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheten varierar beroende på självantändlighetens temperaturområde och den använda testmetoden.

Sensitiviteten och specificiteten beror på den använda testmetoden.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Apparatur**

Apparaturen finns beskriven i den metod som avses i 1.6.3.

1.6.2. **Testbetingelser**

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

1.6.3. **Testförfarande**

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

2. DATA

Testtemperaturen, atmosfäriskt tryck, mängden använt prov och tidsintervall registreras innan antändning sker.

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specifikation av ämnet (beteckning och orenheter).

— Mängden använt prov, atmosfäriskt tryck.

— Använd apparatur.

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

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

4. HÄNVISNINGAR

Inga.

A. 16. RELATIV SJÄLVANTÄNDNINGSTEMPERATUR (FASTA ÄMNEN)

1. METOD

1.1. INLEDNING

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

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

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

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

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

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

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Apparatur**

1.6.1.1. *Ugn*

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

1.6.1.2. *Kub av ståltrådsnät*

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

1.6.1.3. *Termoelement*

Passande termoelement.

1.6.1.4. *Skrivare*

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

1.6.2. **Testbetingelser**

Ämnen testas i sin kommersiella form.

1.6.3. **Testförfarande**

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

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

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

2. **DATA**

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

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— En beskrivning testämnet.

— Mätresultaten inklusive temperatur/tidskurvor.

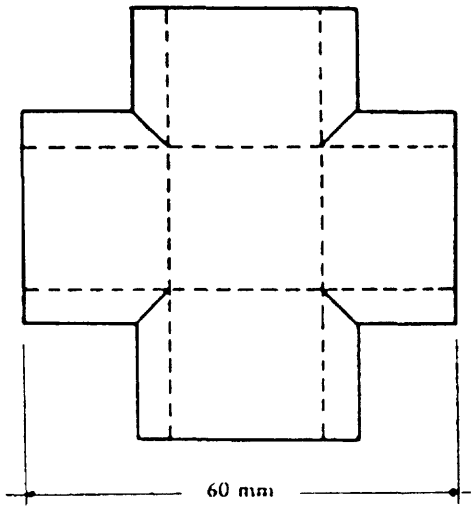
— Alla ytterligare upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

4. HÄNVISNINGAR

1. NF T 20-036 (September 1985). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

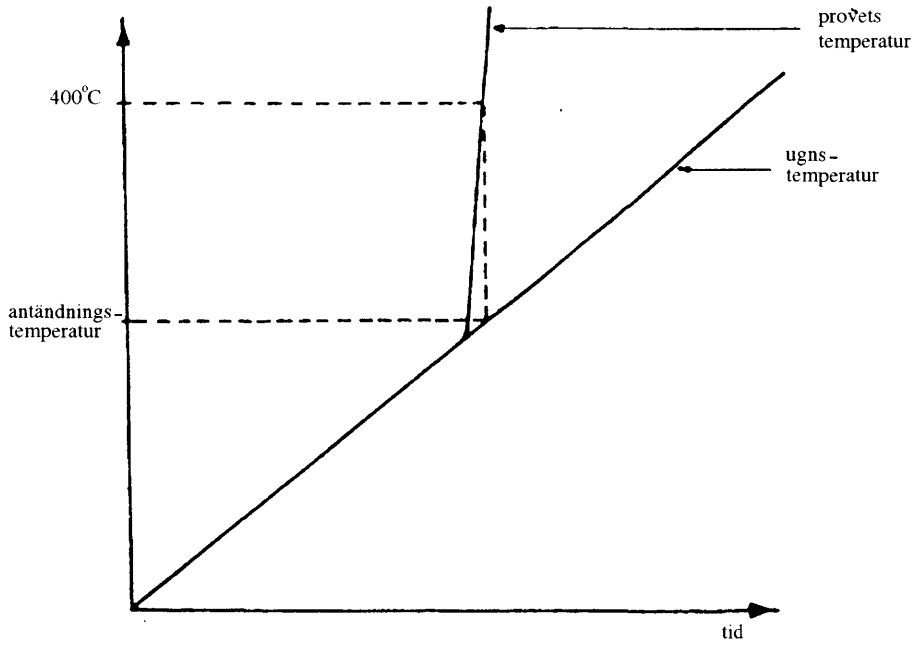
Figur 1

Mall till 20 mm testkub



Figur 2

Typisk temperatur/tidskurva



A. 17. OXIDERANDE EGENSKAPER (FASTA ÄMNEN)

1. METOD

1.1. INLEDNING

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

Testet får inte tillämpas på vätskor och gaser, explosiva eller mycket brandfarliga ämnen eller organiska peroxider.

Detta test behöver inte utföras om en undersökning av strukturformeln fastslår utom rimligt tvivel att ämnet inte kan reagera exotermt med ett brännbart material.

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

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Bränntid: Den reaktionstid, i sekunder, som krävs för att reaktionszonen breder ut sig längs en hög, enligt det förfarande som beskrivs i 1.6.

Brännhastighet: Uttrycks i mm per sekund.

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

1.3. REFERENSÄMNE

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

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

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

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

1.5. KVALITETSKRITERIER

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

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

1.6.1.1. *Testämne*

Testprovet reduceras till en partikelstorlek < 0,125 mm enligt följande förfarande: Sikta testämnet; mal återstående fraktion, upprepa förfarandet tills hela testfraktionen har passerat sikten.

Valfri malnings- och siktningsmetod som uppfyller kvalitetskriterierna får användas.

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

1.6.1.2. *Brännbart ämne*

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

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

Om trämjöl används i det förberedande testet skall ett barrvedsmjöl tillredas genom att den del som passerar en sikt med maskstorleken 1,6 mm insamlas, blandas noggrant och sedan torkas vid 105 °C i fyra timmar i ett högst 25 mm tjockt lager. Efter avkylning skall det förvaras i en lufttät behållare, fylld till brädden, tills det skall användas, helst inom 24 timmar efter torkning.

1.6.1.3. *Antändningskälla*

Som antändningskälla används lågan från en gasbrännare (minsta diameter 5 mm). Om en annan antändningskälla används (t. ex. vid testning i en inert atmosfär) skall en beskrivning och en motivering bifogas.

1.6.2. **Testförfarande**

Anmärkning:

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

1.6.2.1. *Förberedande test*

Det torkade ämnet blandas med det torkade cellulosapulvret eller trämjöl i proportionerna 2 viktdelar av testämnet till 1 viktdel cellulosa eller trämjöl och blandningen formas till en liten konformad hög med måtten 3,5 cm (basens diameter) × 2,5 cm (höjd) genom att en konliknande form (t. ex. ett laboratorieglastratt vars pip är tillsluten) fylls, utan att packas.

Högen placeras på en kall, icke ledande, ogenomtränglig basplatta. Testet skall utföras i ett dragskåp som i 1.6.2.2.

Antändningskällan sätts i kontakt med konen. Kraften och varaktigheten av den påföljande reaktionen iakttas och registreras.

Ämnet anses vara oxiderande om reaktionen är kraftfull.

Om resultaten på något sätt är tvetydiga skall det nedan beskrivna fullständiga testförfarandet utföras.

1.6.2.2. *Fullständigt test*

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

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

Högen placeras i dragskåpet tvärs över luftdragets riktning.

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

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

Ena änden av högen tänds på genom beröring av lågan.

När reaktionszonen har förflyttat sig de första 30 mm mäts reaktionstiden över följande 200 mm.

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

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

Om man misstänker att resultatet är felaktigt positivt upprepas testet med ett inert ämne med motsvarande partikelstorlek, t. ex. kiselgur, i stället för cellulosa. Alternativt kan den blandning av testämne och cellulosa som har den snabbaste reaktionshastigheten testas i inert atmosfär (< 2 % v/v syreinnehåll).

2. **DATA**

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

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

Rita en kurva över det högsta värdet för brännhastighet för varje blandning som en funktion av dess innehåll av oxiderande medel. Bestäm den maximala brännhastigheten utifrån kurvan.

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

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

Om testen utförs i en inert atmosfär jämförs den maximala brännhastigheten med den från referensblandningen i en inert atmosfär.

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Testämnets beteckning, sammansättning, renhet, fukthalt osv.

— Eventuell behandling av testprovet (t. ex. malning eller torkning)

— Använd antändningskälla.

— Mätresultaten.

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

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

— Resultat av eventuella tester med ett inert ämne.

— Resultat av eventuella tester i inert atmosfär.

3.2. TOLKNING AV RESULTATEN

Ett ämne skall anses vara ett oxiderande ämne om

a) en kraftig reaktion inträffar under det inledande screeningtestet

b) den maximala brännhastighet av de blandningar som undersökt vid fullständig testning är högre än eller lika med den maximala brännhastigheten för referensblandningen av cellulosa och bariumnitrat.

För att undvika falska positiva resultat skall de resultat som erhålls vid test av ämnet med ett inert material och vid test i inert atmosfär också beaktas vid tolkning av resultaten.

4. HÄNVISNINGAR

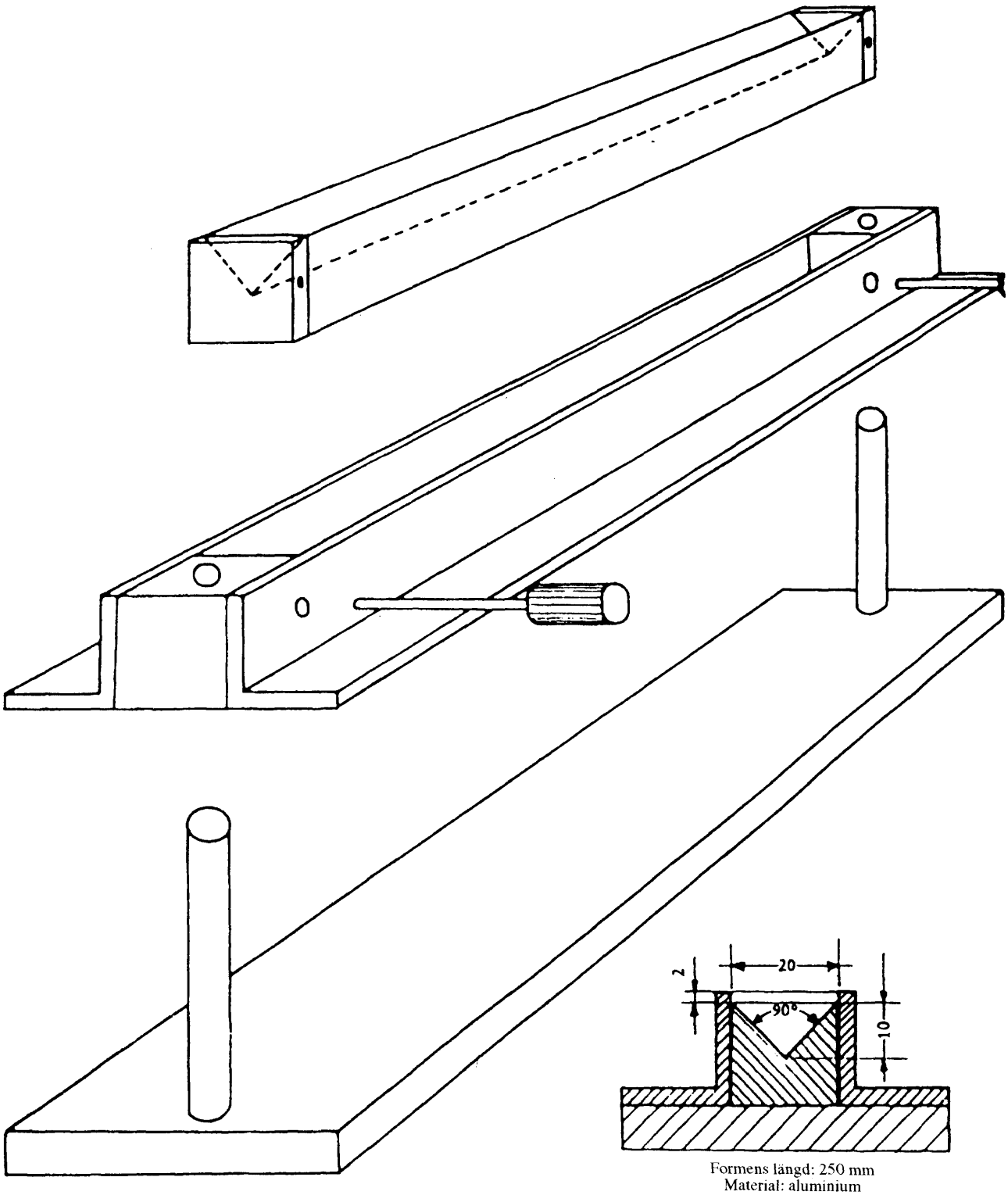
1. NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Tillägg

Figur

Form och tillbehör för iordningställande av högen

(Alla mått i mm)



Formens längd: 250 mm
Material: aluminium

DEL B: METODER FÖR BESTÄMNING AV TOXICITET

ALLMÄN INLEDNING: DEL B

A. INLEDNING

Se Allmän inledning

B. DEFINITIONER

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

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

c) **LC_{50}** (median letal koncentration) är den statistiskt fastställda koncentration av ett ämne som kan förväntas leda till döden för 50 % av försöksdjuren antingen under exponering eller inom en bestämd tid efter exponering. LC_{50}-värdet uttrycks som vikt testämne per standardvolym luft (mg/l).

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

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

f) **Maximal tolererad dos (MTD)** är den högsta dosnivå som framkallar tecken på toxicitet utan att i någon högre grad påverka överlevnaden i det försök i vilket den används.

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

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

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

Särskilda definitioner för inahalationstoxicitet

— **Aerosoler** är partiklar (fasta och/eller flytande) som är homogent fördelade i luften.

— **Aerodynamisk diameter** är diametern av ett klot med en täthet av 1 g/cm³, som har samma stationära sjunkhastighet som den berörda partikeln.

— **Massmedianen av den aerodynamiska diametern** (MMAD) är den beräknade aerodynamiska diameter som delar aerosolens partikelstorleksfördelning i två lika stora massdelar.

— **Geometrisk standardavvikelse** (GSD) är förhållandet mellan den uppskattade 84-percentilen och 50-percentilen, och den anger den kumulativa partikelstorleksfördelningskurvan, förutsatt att partikelstorleken är logaritmiskt normalfördelad.

Särskilda definitioner för det fasta dosförfarandet vid bestämning av akut oral toxicitet

— **Tydliga tecken på toxicitet** är de toxiska verkningar som observeras efter tillförsel av testämnet, och som är så pass allvarliga att tillförsel av närmast högre dos skulle kunna leda till dödsfall.

— **Den kritiska dosen** är den högsta av de fyra fastställda dosnivåer som kan tillföras utan att det medför ämnesrelaterade dödsfall (inbegripet human avlivning).

C. MUTAGENICITET (inbegripet pre-screeningtest för karcinogenicitet)

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

Dessa två slutpunkter utvärderas med följande försök:

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

ii) Test av produktionen av kromosomförändringar hos däggdjursceller som odlas *in vitro*; även ett *in vivo*-förfarande (mikronukleärt test eller analys av metafasen för benmärgsceller) kan användas. Vid avsaknad av kontraindikatorer är dock *in vitro*-metoder starkt att föredra.

D. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Det finns gränser för hur långt resultat av djurförsök och undersökningar *in vitro* kan extrapoleras direkt till människan, vilket skall beaktas vid utvärdering och tolkning av försök.

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

E. LITTERATURHÄNVISNINGAR

Toxikologi är en experimentell vetenskap under utveckling och det finns omfattande litteratur om varje ämne. Uppgifter av betydelse kan hittas i OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier.

Kompletterande anmärkningar

Djurvård

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

i) Djurhållning

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

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

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

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

ii) Utfodring

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

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

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

Djurs välbefinnande

Vid utarbetandet av testmetoderna har särskild hänsyn tagits till djurens välbefinnande. Här nedan följer några få exempel, men listan är inte uttömmande. Det exakta ordalydelsen och villkoren framgår av de enskilda metoderna.

— För bestämning av akut oral toxicitet införs en ny metod, nämligen "fastdos-metoden". Denna metod har inte dödsfall som särskild slutpunkt. Det används färre försöksdjur och metoden resulterar i mindre smärta och lidande än den klassiska metoden för bestämning av akut oral toxicitet.

— Antalet försöksdjur minskas till ett vetenskapligt accepterat minimum, varvid 5 djur av samma kön testas för varje dosnivå i fråga om metoderna B.1 och B.3. Endast 10 djur (och endast 5 till den negativa kontrollgruppen) används för bestämning av hudkänslighet genom användning av maximeringstest på marsvin (guinea pig maximization test) (metod B.6). Antalet försöksdjur för den positiva kontrollen i fråga om *in vivo*-tester av mutagenicitet minskas också (metoderna B.11 och B.12).

— Djurens smärta och lidanden under försöken minskas i det att djur som uppvisar allvarliga och ihållande tecken på smärta och lidande avlivas humant. Dosering av testämnet på ett sätt som man vet orsakar smärta och lidande på grund av ämnets frätande eller irriterande egenskaper skall inte utföras (metoderna B.11 och B.12).

— Försök med alltför höga doser undviks genom införande av testgränser, inte endast vid test av akut toxicitet (metoderna B.1, B.2 och B.3) utan även för *in vivo*-tester av mutagenicitet (metoderna B.11 och B.12)

— En strategi för testning av irriterande egenskaper gör det möjligt att undvika försök, eller att reducera försöket till en undersökning av ett enskilt djur, när det föreligger tillräckliga vetenskapliga bevis.

Sådana vetenskaplig bevis kan grundas på ämnets fysikaliska-kemikaliska egenskaper, resultaten av andra tidigare utförda tester eller resultaten av väl validerade *in vitro*-tester. Om det t. ex. har genomförts en undersökning av akut dermal toxicitet med gränstestdoser av ämnet (metod B.3) vid vilken det inte har observerats någon hudirritation, kan ytterligare test av hudirritation (metod B.4) anses onödigt. Material som har utvisat klart frätande eller allvarligt hudirriterande egenskaper i en undersökning av hudirritation (metod B.4) bör inte undersökas för ögonirritation (metod B.5).

B. 1. AKUT TOXICITET (ORALT)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

Det kan vara nödvändigt att på ett humant sätt avliva djur som uppvisar ihållande tecken på stark smärta och lidande. Undersökningar av ämnen på ett sätt som grund av deras frätande eller irriterade egenskaper vållar avsevärd smärta och lidande behöver inte utföras.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

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

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Försöksdjur*

Om det inte finns kontraindikationer är råttan förstahandsvalet.

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

1.6.2.2. *Antal och kön*

Minst fem gnagare används på varje dosnivå. De bör alla vara av samma kön. Om hondjur används får de inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Om det finns information om att ett kön är väsentligt mer känsligt skall djur av detta kön användas.

Anmärkning: Vid användning av djur som är högre upp i näringskedjan än gnagare i tester av akut toxicitet skall man överväga användning av ett mindre antal djur.

Doserna skall fastställas med omsorg och man skall anstränga sig för att inte utnyttja högre doser än moderat toxiska doser. Vid sådana undersökningar bör tillförsel av dödliga doser av testämnet undvikas.

1.6.2.3. *Dosnivåer*

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

1.6.2.4. *Gränstest*

Vid användning av gnagare kan man utföra ett gränstest med en dosnivå av minst 2 000 mg/kg kroppsvikt med en grupp på fem djur av varje kön enligt ovan beskrivna förfaranden. Om ämnesrelaterade dödsfall inträffar bör en fullständig undersökning övervägas.

1.6.2.5. *Observationstid*

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

1.6.3. **Förfarande**

Djuren skall fasta innan ämnet tillförs. Råttor skall inte utfodras natten före tillförsel av ämnet; för djur med högre ämnesomsättning är det lämpligt med en kortare fasteperiod. Djuren skall ha obegränsad tillgång till vatten. Påföljande dag skall djuren vägas och testämnet tillföras gruppvis i en enda dos med magsond. Om det inte är möjligt att ge hela dosen på en gång kan den tillföras i mindre fraktioner över högst 24 timmar. Sedan ämnet tillförts kan foder undanhållas djuren i ytterligare tre till fyra timmar. Om en dos tillförs i fraktioner över en period kan det, beroende på periodens längd, bli nödvändigt att ge djuren foder och vatten.

Efter tillförsel observeras djuren och iakttagelserna registreras systematiskt för varje enskilt djur. Den första dagen skall täta observationer göras.

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

De djur som dör under försöket och de djur som överlever försöket skall obduceras. Alla makroskopiska patologiska förändringar registreras. När det är indicerat skall vävnadsprov tas för histopatologisk undersökning.

Bedömning av toxicitet hos det motsatta könet

Sedan en undersökning av det ena könet avslutats skall minst en grupp med fem djur av det motsatta könet testas för att fastställa om djur av detta kön är avsevärt mer känsliga för testämnet. I vissa fall kan användning av färre djur vara motiverat. Om det finns tillräckligt med information om att djur av det kön som har testats är avsevärt mer känsliga, behöver djur av det motsatta könet inte testas.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp skall anges antal djur i början av försöket, tidpunkten för enskilda djurs dödsfall, antal djur som visar andra tecken på toxicitet, beskrivning av toxiska effekter och obduktionsfynd. De enskilda försöksdjurens vikt skall bestämmas och registreras omedelbart innan testämnet tillförs, varje vecka därefter och vid dödsfall. Viktförändringar skall registreras om överlevnaden är längre än en dag efter tillförseln. Avlivning av djur på ett humant sätt till följd av ämnesrelaterat lidande och smärta skall registreras som ämnesrelaterade dödsfall. LD_{50} skall bestämmas enligt en vedertagen metod. Utvärderingen av data skall omfatta eventuellt samband mellan djurens exponering för testämnet och incidensen och svårighetsgraden av alla abnormiteter, inklusive beteendemässiga och kliniska abnormiteter, makroskopiska lesioner, ändringar av kroppsvikt, dödlighet och eventuella andra toxikologiska effekter.

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

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

— Testbetingelser.

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

— De doserade djurens kön.

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

— Dödstidpunkt efter dosering, motivering och använda kriterier för human avlivning av djur.

— Alla observationer.

— LD_{50}-värde för det kön som har varit föremål för en fullständig undersökning, bestämt efter 14 dagar (med angivande av bestämningsmetod).

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

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

— Obduktionsfynd.

— Eventuella histopatologiska fynd.

— Resultat av eventuella försök med det andra könet.

— Diskussion av resultaten (med särskild uppmärksamhet på om human avlivning av djur under försöket kan ha inverkat på det beräknade LD_{50}-värdet).

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

B.1 bis. AKUT TOXICITET (ORALT) – FAST DOS-METOD

1. METOD

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2. DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B (B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Ett test avseende akut oral toxicitet ger information om de skadliga verkningar som kan visa sig inom en kort tid efter tillförsel av en enda dos av testämnet.

Fast dos-metoden utförs i två steg.

I ett förtest avsett för iakttagelse görs en sekvensiell undersökning av verkningarna av olika doser som tillförs oralt via sond till enskilda djur av ett kön. Detta förtest ger information om förhållandet mellan dosen och toxiciteten, inbegripet en uppskattning av minsta dödliga dosnivå. Normalt används högst fem djur för detta förtest.

I huvudtestet administreras ämnet oralt via sond till grupper av fem handjur och fem hondjur vid en av de förbestämda dosnivåerna (5, 50, 500 eller 2 000 mg/kg). Den använda dosen beräknas på grundval av förtestet och är den dos som mest sannolikt kommer att medföra "tydliga tecken på toxicitet" (se punkt 1.2. Definitioner) men inga dödsfall.

Efter tillförsel observeras verkningarna på försöksdjuren.

Om den först valda dosnivån framkallar tydliga tecken på toxicitet men inga ämnesrelaterade dödsfall, är ytterligare testning onödigt.

När tydliga tecken på toxicitet inte konstateras vid den valda dosnivån bör ämnet testas igen vid nästa högre dosnivå. Om djur dör eller uppvisar en kraftig toxisk reaktion som kräver human avlivning av djuren skall ämnet testas igen vid nästa lägre dosnivå.

Detta förfarande gör det möjligt att identifiera den "kritiska dosen" (se 1.2 Definitioner) vilken är den högsta av de förbestämda dosnivåerna som kan administreras utan att orsaka dödsfall (inbegripet human avlivning).

Det kan vara nödvändigt att på ett humant sätt avliva djur som uppvisar ihållande tecken på stark smärta och lidande. Undersökningar av ämnen på ett sätt som grund av deras frätande eller irriterade egenskaper vållar avsevärd smärta och lidande behöver inte utföras.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

1.6.1.1 *Försöksdjur*

Om det inte finns kontraindikationer är råttan förstahandsvalet.

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

I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas unga friska djur slumpmässigt i grupper för för- respektive huvudtestet. I praktiken räcker det med en grupp av varje kön för huvudtestet.

1.6.1.2. *Dosförberedelse och tillförsel*

Om det är nödvändigt upplöses eller uppslammas testämnet i passande vehikel. Användning av en vattnig lösning rekommenderas och om detta inte är möjligt en lösning i vegetabilisk olja, en lösning i andra vehiklar eller eventuellt en suspension. Vid icke-vattniga vehikel bör vehikelns relevanta egenskaper vara kända eller, om de inte är kända, bestämmas på förhand eller i samband med försöket. Hos gnagare bör volymen normalt inte överstiga 10 ml/kg kroppsvikt, förutom vid användning av vattniga lösningar, där upp till 20 ml/kg kroppsvikt kan användas. Skillnader av testvolymen skall minimeras genom att justera koncentrationen och således säkerställa att volymen är konstant vid alla doser.

Djuren skall fasta innan testämnet tillförs. Råttor får inte utfodras natten innan tillförsel av testämnet. Djuren skall ha fri tillgång till dricksvatten. Följande dag vägs djuren och testämnet tillförs i mindre portioner under en tidsperiod som inte får överstiga 24 timmar. När testämnet har tillförts kan man undvika att utfodra djuren i ytterligare tre till fyra timmar. Om en dos tillförs i mindre portioner under en tidsperiod kan det vara nödvändigt att utfodra och vattna djuren beroende på hur lång period det är frågan om.

1.6.2. **Förfarande**

1.6.2.1. *Förtest*

Verkningarna av olika doser undersöks hos varje djur. Normalt används hondjur, om det inte finns information om att handjur är mer känsliga. Doseringen är sekvensiell, och det skall gå minst 24 timmar innan en dos ges till nästa djur. Alla djur observeras noggrant för tecken på toxicitet i minst sju dagar. Om det fortfarande finns tecken på toxicitet efter sju dagar skall djuren observeras i ytterligare sju dagar. Följande fasta dosnivåer är fastställda: 5, 50, 500 och 2 000 mg/kg. Om den fasta dosnivå som har valts inte framkallar allvarlig toxicitet och nästa högre dosnivå medför dödlighet är det nödvändigt att undersöka en eller flera mellanliggande dosnivåer. På detta sätt bör det vara möjligt att få upplysningar om den dosnivå som framkallar tecken på toxicitet, och den minsta dosnivå som framkallar dödlighet.

Man bör försöka att välja den fasta dosnivån på grundval av resultat i samband med liknande kemikalier. Om det inte finns sådan information föreslås att man i den första omgången använder en dos på 500 mg/kg. Om det inte förekommer några tecken på toxicitet vid den fasta dosnivån undersöks nästa högre dosnivå. Om det inte förekommer någon dödlighet vid 2 000 mg/kg är förtestet klart, och huvudtestet bör genomföras vid denna dosnivå. Om allvarliga verkningar som nödvändiggör human avlivning visar sig vid den fasta dosnivån (t. ex. 500 mg/kg) ges den omedelbart lägre dosen (t. ex. 50 mg/kg) till ett annat djur. Om detta djur överlever kan andra djur ges passande doser mellan de fasta dosnivåerna. Normalt bör inte fler än fem djur användas i detta test.

1.6.2.2. *Huvudtest*

Minst 10 djur (fem hondjur och fem handjur) skall användas på varje dosnivå. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga.

Som en princip för den fasta dosmetoden skall endast moderat toxiska doser användas. Tillförsel av dödliga doser av testämnet skall undvikas.

Den dosnivå som används vid försöket skall väljas från en av de fyra bestämda dosnivåerna, nämligen 5, 50, 500 eller 2 000 mg/kg kroppsvikt. Den nivå som väljs först skall vara den nivå som med störst sannolikhet framkallar

tydliga tecken på toxicitet men inga ämnesrelaterade dödsfall (inbegripet human avlivning. Dödsfall till följd av olyckor inbegrips inte men skall anges). När en dosnivå framkallar tydliga tecken på toxicitet men inga ämnesrelaterade dödsfall, är ytterligare försök onödiga.

Om det inte framkommer några tydliga tecken på toxicitet efter tillförsel av den valda dosen skall ämnet testas igen vid nästa högre dosnivå. Djuren skall dock fortsatt hållas under observation tills observationsperioden är slut. Om en kraftig toxisk reaktion gör human avlivning av djuren nödvändig eller om det förekommer ämnesrelaterade dödsfall skall ämnet testas igen vid nästa lägre dosnivå. Även här skall djur som det inte varit nödvändigt att avliva hållas under observation tills observationsperioden är slut.

Efter tillförsel görs systematiska observationer som registreras individuellt för varje enskilt djur.

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

En grundlig klinisk undersökning skall göras minst två gånger på dagen för doseringen och därefter minst en gång varje dag. Djur som uppvisar tydlig smärta eller som uppvisar allvarliga tecken på lidande skall avlivas humant. Andra observationer är nödvändiga de första dagarna efter dosering om djuren fortsatt visar tecken på toxicitet. Testet kan avbrytas om det blir uppenbart att den valda initiala dosnivån var för hög.

Observation skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon, slemhinnor, respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Särskild uppmärksamhet skall ägnas åt observation av skälvningar, kramper, salivavsöndring, diarré, letargi, sömn och koma.

De enskilda djurens vikt skall bestämmas kort efter administration av testämnet och därefter dagligen de följande tre dagarna och därefter varje vecka. Djur som dör under försöket skall vägas och obduceras och i slutet av försöket skall överlevande djur vägas och obduceras. Alla makroskopiska patologiska förändringar skall registreras. När det är indicerat skall vävnadsprov tas för histopatologisk undersökning.

Ett test av en andra eller, i undantagsfall, tredje dosnivå kan krävas beroende på resultaten från den föregående dosnivån.

Om en substans framkallar dödlighet vid 5 mg/kg kroppsvikt (eller om förtestet tyder på att dödlighet kommer att inträffa vid den dosnivån) kan det vara nödvändigt att ytterligare testa substansen för akut toxicitet.

2. DATA

Data från både förtestet och huvudtestet skall ställas upp i tabellform och för varje dosnivå som testats skall anges antal djur i början av försöket, antal djur som visar tecken på toxicitet, antal djur som dött under testet eller som avlivats av humana skäl, beskrivning av toxiska effekter och, i fråga om huvudtestet, om ämnesrelaterade tydliga tecken på toxicitet observerades, tidsförloppet för eventuella toxiska verkningar och obduktionsfynd. Viktförändringar skall beräknas och registreras när överlevnad överstiger en dag.

Djur som avlivas av humana orsaker till följd av ämnesrelaterat lidande och smärta registreras som ämnesrelaterade dödsfall.

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

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

— Testbetingelser.

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

— Samtliga resultat av alla undersökta dosnivåer.

— Tabelluppställning över reaktioner efter kön och dosnivå (dvs. antal doserade djur, förändringar av kroppsvikt, antal döda djur eller antal djur som avlivades under försöket, om så har skett, antal djur som har visat tecken på toxicitet; art, svårighetsgrad och varaktighet av verkningarna.

— Tidpunkt för uppträdande av symptom på toxicitet och angivelse om dessa symptom försvinner igen.

— Dödstidpunkt efter dosering, när djur är döda eller avlivas samt orsaker till och kriterier för human avlivning av djur.

— Obduktionsfynd.

— Eventuella histopatologiska fynd.

— Tolkning av resultaten, inbegripet tydliga tecken på toxicitet och den kritiska dosnivå som påvisats under försöket.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

DOS	RESULTAT	TOLKNING
5 mg/kg kroppsvikt	Mindre än 100 % överlevnad	Ämnen som är MYCKET GIFTIGA
	100 % överlevnad, men tydliga tecken på toxicitet	Ämnen som är GIFTIGA
	100 % överlevnad, inga tydliga tecken på toxicitet	Se resultat vid 50 mg/kg
50 mg/kg kroppsvikt	Mindre än 100 % överlevnad	Ämnen som kan vara GIFTIGA eller MYCKET GIFTIGA
	100 % överlevnad, men tydliga tecken på toxicitet	Ämnen som är SKADLIGA
	100 % överlevnad, inga tydliga tecken på toxicitet	Se resultat vid 500 mg/kg
500 mg/kg kroppsvikt	Mindre än 100 % överlevnad	Ämnen som kan vara GIFTIGA eller MYCKET GIFTIGA
	100 % överlevnad, men tydliga tecken på toxicitet	Ämnen som inte anses ha någon akut toxicitet
	100 % överlevnad, inga tydliga tecken på toxicitet	Se resultat vid 2 000 mg/kg
2 000 mg/kg kroppsvikt	Mindre än 100 % överlevnad	Se resultat vid 500 mg/kg
	100 % överlevnad, med eller utan tydliga tecken på toxicitet	Ämnen som inte har någon betydande akut toxicitet

Se även allmän inledning till del B (D).

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B (E).

B. 2. AKUT TOXICITET (INANDNING)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Det är användbart att ha förhandsupplysningar om ämnets partikelstorleksfördelning, ångtryck, smältpunkt, kokpunkt, flampunkt och eventuellt explosiva egenskaper.

Se allmän inledning till del B (A).

1.2. DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B (B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

Det kan vara nödvändigt att på ett humant sätt avliva djur som uppvisar ihållande tecken på stark smärta och lidande. Undersökningar av ämnen på ett sätt som på grund av deras frätande eller irriterade egenskaper vållar avsevärd smärta och lidande behöver inte utföras.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

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

Det kan vara nödvändigt att mikronisera fasta testämnen för att erhålla lämplig partikelstorlek.

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

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Försöksdjur*

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

1.6.2.2. *Antal och kön*

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

Anmärkning: Vid användning av djur som är högre upp i näringskedjan än gnagare vid tester av akut toxicitet skall man överväga användning av ett mindre antal djur.

Doserna skall fastställas med omsorg och man skall anstränga sig för att inte utnyttja högre doser än moderat toxiska doser. Vid sådana undersökningar bör tillförsel av dödliga doser av testämnet undvikas.

1.6.2.3. *Exponeringskoncentrationer*

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

1.6.2.4. *Gränstest*

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

1.6.2.5. *Exponeringstid*

Exponeringstiden är fyra timmar.

1.6.2.6. *Utrustning*

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

1.6.2.7. *Observationstid*

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

1.6.3. **Förfarande**

Omedelbart före exponering skall djuren vägas varefter de exponeras för testkoncentrationen i den aktuella apparaturen i minst fyra timmar, efter det att jämvikt har uppnåtts för koncentrationen i kammaren. Jämvikt skall uppnås på kort tid. Temperaturen under försöket skall hållas vid 22 ± 3 °C. Under ideala betingelser skall den relativa luftfuktigheten hållas mellan 30 % och 70 %, men i vissa fall (t. ex. test med aerosoler) kan detta vara praktiskt ogenomförbart. Ett svagt undertryck i kammaren (≤ 5 mm vatten) förhindrar att testämnet läcker ut i det omgivande rummet. Under exponeringen skall djuren undanhållas foder och vatten. Ett dynamiskt respirationssystem med ett lämpligt analytiskt kontrollsystem skall användas. Ett försökstest rekommenderas för att fastställa lämpliga exponeringskoncentrationer. Systemet skall vara sådant att det så snabbt som möjligt går att säkerställa stabila exponeringsbetingelser. Lufthastigheten skall justeras för att säkerställa att betingelserna är homogena i hela exponeringskammaren.

Mätning eller kontroll skall göras av:

a) Lufthastighet (fortlöpande).

b) Den faktiska koncentrationen av testämnet mätt i respirationszonen minst tre gånger under exponeringen (vissa atmosfärer, t. ex. aerosoler med höga koncentrationer, kan behöva kontrolleras oftare). Under exponeringsperioden skall koncentrationen inte avvika mer än ± 15 % från den genomsnittliga koncentrationen. En sådan kontrollnivå kan emellertid var omöjlig att uppnå vid test med stoft och vissa aerosoler, och i sådana fall kan större avvikelser accepteras. För aerosoler skall analys av partikelstorleken göras så ofta som möjligt (minst en gång per försöksgrupp).

c) Temperatur och luftfuktighet, fortlöpande om möjligt.

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

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

Djur som dör under försöket skall obduceras och i slutet av försöket skall överlevande djur obduceras, särskilt med avseende på eventuella förändringar av övre och nedre andningsvägarna. Alla makroskopiska patologiska förändringar skall registreras. Vid sådana indikationer skall vävnadsprover tas för histopatologisk undersökning.

2. DATA

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

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

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

— Testbetingelser; beskrivning av exponeringsapparaturen

inklusive utformning, typ, dimensioner, luftkälla, system för framställning av finfördelade ämnen och aerosoler, metod att konditionera luften och sätt att hålla djuren i en försökskammare när sådan används. Utrustning för mätning av temperatur, luftfuktighet och finfördelade aerosolers koncentration och storlek skall beskrivas.

Exponeringsdata

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

a) lufthastighet genom inhalationsutrustningen,

b) luftens temperatur och fuktighet,

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

d) typ av vehikel, om sådan används,

e) faktiska koncentrationer i försökets respirationszon,

f) massmedianen av den aerodynamiska diametern (MMAD) och den geometriska standardavvikelsen (GSD),

g) jämviktsperiod,

h) exponeringstid

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

— Dödstidpunkt under eller efter exponering, motivering och använda kriterier för human avlivning av djur.

— Alla observationer.

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

— 95 % tillförlitlighetsintervall för LC_{50} (om detta är möjligt).

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

— Obduktionsfynd.

— Eventuella histopatologiska fynd.

— Diskussion av resultaten (med särskild uppmärksamhet på om human avlivning av djur under försöket kan ha inverkat på det beräknade LD_{50}-värdet).

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B (E).

B. 3. AKUT TOXICITET (DERMALT)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2. DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B (B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

Det kan vara nödvändigt att på ett humant sätt avliva djur som uppvisar ihållande tecken på stark smärta och lidande. Undersökningar av ämnen på ett sätt som på grund av deras frätande eller irriterade egenskaper vållar avsevärd smärta och lidande behöver inte utföras.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

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

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Försöksdjur*

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

1.6.2.2. *Antal och kön*

Minst 5 djur skall användas på varje dosnivå. De skall alla vara av samma kön. Om hondjur används får de inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Om det finns information som visar att ett kön är väsentligt mer känsligt skall djur av detta kön användas.

Anmärkning: Vid användning av djur som är högre upp i näringskedjan än gnagare vid tester av akut toxicitet skall man överväga användning av ett mindre antal djur. Doserna skall fastställas med omsorg och man skall anstränga sig för att inte utnyttja högre doser än moderat toxiska doser. Vid sådana undersökningar bör tillförsel av dödliga doser av testämnet undvikas.

1.6.2.3. *Dosnivåer*

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

1.6.2.4. *Gränstest*

Ett gränstest med en dosnivå av minst 2 000 mg/kg kroppsvikt kan utföras med en grupp av fem djur av varje kön enligt ovan beskrivna förfarande. Om ämnesrelaterade dödsfall inträffar bör en fullständig undersökning övervägas.

1.6.2.5. *Observationsperiod*

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

1.6.3. **Förfarande**

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

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

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

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

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

Bedömning av toxicitet hos det motsatta könet

Sedan en undersökning av det ena könet avslutats skall minst en grupp med fem djur av det motsatta könet testas för att fastställa om djur av detta kön är avsevärt mer känsliga för testämnet. I vissa fall kan användning av färre djur vara motiverat. Om det finns tillräckligt med information om att djur av det kön som har testats är avsevärt mer känsliga, behöver djur av det motsatta könet inte testas.

2. DATA

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

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

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

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

— Testbetingelser (inklusive metod för hudrengöring och slag av bandage: med eller utan ocklusion).

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

— Försöksdjurens kön.

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

— Dödstidpunkt efter dosering, motivering och kriterier för human avlivning av djur.

— Alla observationer.

— LD_{50}-värde för det kön som har varit föremål för en fullständig undersökning bestämt efter 14 dagar med angivande av bestämningsmetod.

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

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

— Obduktionsfynd.

— Eventuella histopatologiska fynd.

— Resultat av försök med motsatt kön.

— Diskussion av resultaten (med särskild uppmärksamhet på om human avlivning av djur under försöket kan ha inverkat på det beräknade LD_{50}-värdet).

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

B. 4. AKUT TOXICITET (HUDIRRITATION)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. DEFINITION

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Inledande kommentarer

Alla tillgängliga uppgifter om testämnet skall noggrant beaktas i syfte att behöva utföra så få försök som möjligt med ämnen under villkor som kan förmodas ge en våldsam reaktion. Följande upplysningar kan vara till nytta när man skall avgöra om man skall utföra en fullständig undersökning, en undersökning på ett enskilt djur eller ingen undersökning alls:

i) Fysiska-kemiska egenskaper och kemisk reaktivitet. Starkt sura och starkt basiska ämnen (t. ex. pH-värde under eller lika med 2 eller över eller lika med 11,5) behöver inte undersökas primärt för hudirritation, om deras frätande egenskaper är förutsägbara. Man skall dessutom ta hänsyn till ämnets syra-/bas-kapacitet.

ii) Om det finns resultat av väl validerade *in vitro*-tester som tydligt pekar på allvarliga verkningar är en fullständig undersökning inte alltid nödvändig.

iii) Resultaten av undersökningar av akut toxicitet. Om det har gjorts en undersökning av akut toxicitet vid upptag genom huden med dos av ämnet på gränstestnivå (2 000 mg/kg kroppsvikt) och ingen hudirritation har iakttagits kan ytterligare test av hudirritation vara överflödigt. Test av ämnen som har visat sig vara mycket giftiga vid upptag genom huden är också onödiga.

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

Det kan vara nödvändigt att av humana skäl avliva djur som visar ihållande symptom på stark smärta eller lidande.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

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

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

Vissa kaninstammar har plättar av tät päls som är mer framträdande vid vissa tidpunkter av året. Testämnen skall inte påföras på dessa områden med tät pälsväxt.

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

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Försöksdjur*

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

1.6.2.2. *Antal djur*

Om ämnet på grundval av *in vitro*-förtester eller av andra orsaker misstänks framkalla nekros (dvs. att vara frätande) kan en undersökning av ett enskilt djur komma på tal. Om en sådan undersökning inte tyder på frätning, kompletteras den med en undersökning av ytterligare minst två djur.

Till en fullständig undersökning används minst tre friska könsmogna djur. Det är inte nödvändigt att använda en särskild kontrollgrupp av obehandlade djur. Det kan vara nödvändigt att använda fler djur för att klarlägga tvetydiga reaktioner.

1.6.2.3. *Dosnivå*

Om inga kontraindikationer finns appliceras 0,5 ml flytande eller 0,5 ml halvfast testämne på hudområdet. Intilliggande, obehandlade hudområden på varje djur fungerar som kontroll.

1.6.2.4. *Observationsperiod*

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

1.6.3. **Förfarande**

Djuren skall hållas i var sin bur. Testämnet skall appliceras på ett litet hudområde (ungefär 6 cm^2) som täcks med en liten kompress som hålls på plats med icke hudirriterande tejp. När flytande testämnen och vissa pastor används kan det vara nödvändigt att applicera testämnet på kompressen som därefter placeras på huden. Under exponeringsperioden skall kompressen hållas i lös kontakt med huden med ett lämpligt ocklusiv- eller semiocklusivförband. Djuren skall vara förhindrade att komma åt kompressen så att de kan svälja eller inandas testämnet.

I slutet av exponeringstiden skall kvarblivande testämne avlägsnas, i lämpliga fall med vatten eller med lämpligt lösningsmedel, utan att den aktuella responsen eller överhuden påverkas.

Exponeringstiden är normalt fyra timmar.

Om man misstänker att ämnet kan framkalla nekros (dvs. verka frätande) skall exponeringstiden minskas (t. ex. till en timme eller tre minuter). Vid en sådan undersökning kan man börja med att använda ett enskilt djur. Om den dermala toxiciteten av testämnet inte utesluter det kan man samtidigt använda tre kompresser på detta försöksdjur. Den första kompressen avlägsnas efter tre minuter. Om inga allvarliga hudreaktioner observeras avlägsnas den andra kompressen efter en timme. Om observationer vid den här tidpunkten antyder att en fyra timmar lång exponering är nödvändig och kan utföras humant avlägsnas den tredje kompressen efter fyra timmar och reaktionerna avläses.

I detta fall (dvs. när fyra timmars exponering är möjligt) kompletteras testet genom användning av ytterligare minst två djur, bortsett från de fall när detta inte är humant (t. ex. om man observerar nekroser efter fyra timmars exponering).

Om en allvarlig hudreaktion (t. ex. nekros) observeras efter antingen tre minuter eller en timme skall testet omedelbart avbrytas.

Längre exponeringar kan vara indikerade under vissa betingelser, t. ex. om detta motiveras av människans förväntade användning och exponering.

1.6.3.1. *Observation och klassificering*

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

Sådana tekniker som t. ex. histopatologisk undersökning eller mätning av hudveckstjockleken kan användas för att klargöra tveksamma reaktioner och reaktioner som delvis döljs av testämnets färgning av huden.

2. DATA

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

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

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

— Testbetingelser (inklusive det aktuella kemiska ämnets fysisk-kemiska egenskaper och metoden att förbereda och rengöra huden och slag av bandage: ocklusiv- eller semiocklusiv).

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

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

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

— Beskrivning av alla toxiska effekter utöver hudirritation.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

Tillägg

TABELL: GRADERING AV HUDREAKTION

Hudrodnad och sårskorpebildning

	Värde
Ingen hudrodnad	0
Mycket liten hudrodnad (knappt diagnosticerbar)	1
Väldefinierad hudrodnad	2
Medelsvår till allvarlig hudrodnad	3
Allvarlig hudrodnad (rödbetsröd) eller sårskorpebildning (djupgående skador) som förhindrar mätning av hudrodnad	4

Ödembildning

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

B. 5. AKUT TOXICITET (ÖGONIRRITATION)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2. DEFINITION

Se allmän inledning till del B (B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Inledande kommentarer

Alla tillgängliga uppgifter om testämnet skall noggrant beaktas i syfte att behöva utföra så få försök som möjligt med ämnen under villkor som kan förmodas ge en våldsam reaktion. Följande upplysningar kan vara till nytta i detta syfte:

i) Fysiska-kemiska egenskaper och kemisk reaktivitet. Starkt sura och starkt basiska ämnen som t. ex. förväntas medföra ett pH-värde i ögat på under eller lika med 2 eller över eller lika med 11,5 behöver möjligtvis inte testas om svåra lesioner kan förväntas. Man skall dessutom ta hänsyn till ämnets syra-/bas-kapacitet.

ii) Resultat av väl validerade alternativa undersökningar som har visat sig ha potentiellt frätande eller starkt irriterande egenskaper undersöks inte ytterligare för ögonirritation eftersom man kan anta att sådana ämnen kommer att påverkat ögat avsevärt.

iii) Resultaten av undersökningar av hudirritation. Material som i en undersökning av hudirritation har visat sig ha tydliga frätande eller irriterande egenskaper undersöks inte ytterligare för ögonirritation eftersom man kan anta att sådana ämnen kommer att påverkat ögat avsevärt.

Hela testämnet påförs i det ena ögat hos ett antal försöksdjur. Det obehandlade ögat används som kontroll. Graden av irritation värderas och klassificeras med bestämda intervaller och beskriv utförligt för att fullständigt kunna utvärdera verkningarna. Observationer bör göras under en så pass lång tid att det blir möjligt att göra en fullständigt utvärdering om de observerade verkningarna är reversibla eller irreversibla.

Det kan vara nödvändigt att av humana skäl avliva djur som visar ihållande symptom på stark smärta eller lidande.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

Inom 24 timmar innan testet inleds skall en noggrann undersökning göras av båda ögonen på varje uttaget försöksdjur. Djur som företer ögonirritation, ögondefekter eller tidigare hornhinneskador skall inte användas.

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Försöksdjur*

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

1.6.2.2. *Antal djur*

Om tydliga verkningar förväntas kan ett försök av ett enskilt djur övervägas. Om resultaten av detta försök med en kanin visar att ämnet är starkt ögonirriterande (reversibel verkan) eller frätande (irreversibel verkan) vid det beskrivna förfarandet är det inte alltid nödvändigt att fortsätta undersökningen av ögonirritation med flera djur. I vissa fall kan det vara lämpligt att undersöka specifika aspekter genom försök med flera djur.

I alla andra fall än försök med ett enskilt djur skall minst tre djur används. Det kan vara nödvändigt att använda flera djur för att klarlägga tvetydiga reaktioner.

1.6.2.3. *Dosnivå*

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

Om ämnet finns i en sprayflaska eller en aerosoltryckbehållare samlas 0,1 ml av den utsprutade vätskan upp och droppas i ögat på samma sätt som är beskrivet för vätskor.

1.6.2.4. *Observationsperiod*

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

1.6.3. **Förfarande**

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

Om det anses att testämnet kan förorsaka orimlig smärta kan en lokalbedövning användas när ämnet droppas i ögat. Bedövningsmedlets sort, koncentration och användningstillfälle väljs med omsorg så att användningen inte medför signifikativt olika reaktioner för testämnet. Kontrollögat bedövas på samma sätt.

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

För vissa av de ämnen som i detta test har visat sig förorsaka ögonirritation kan det finnas indikationer på ytterligare försök, varvid kaninernas ögon sköljs straxt efter idroppning av ämnet. I detta fall rekommenderas användning av tre kaniner. 30 sekunder efter instillation av testämnet sköljs ögonen på kaninerna i 30 sekunder med en vätskevolym och ett vätskeflöde som inte skadar ögat.

1.6.3.1. *Observation och gradering*

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

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

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

2. **DATA**

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

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

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

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

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

— Beskrivning av alla allvarliga skador som observerats.

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

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

— Beskrivning av eventuellt registrerade lokala effekter utanför ögat.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

Tillägg

TABELL: GRADERING AV ÖGONSKADOR

Hornhinnan (Cornea)

Opacitet: grad av grumlighet (bedömningen baseras på det grumligaste området)

Ingen sårbildning eller grumling 0

Spridda eller diffusa grumliga områden (annat än en lätt avmattning av normal glans), regnbågshinnan klar och synlig 1

Omedelbart skönjbart genomskinligt område, lätt fördunkling av regnbågshinnans detaljer 2

Pärlemorskimrande område, detaljerna i regnbågshinnan inte synliga, pupillstorleken knappt skönjbar 3

Grumlig hornhinna, regnbågshinnan inte skönjbar genom grumligheten 4

Iris

Normal 0

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

Ingen reaktion på ljus, blödning, makroskopisk förstörelse (ett eller flera av dessa symptom) 2

Bindhinnan (Conjunctiva)

Rodnad (bedömningen baseras på den allvarligaste klassificeringen av ögonlockets och ögonglobens bindhinna, jämfört med kontrollögat)

Normala blodkärl 0

Vissa blodkärl tydligt hyperemiska (injicerade) 1

Diffus, högröd färg, enskilda kärl inte klart skönjbara 2

Diffus blodröd färg 3

Kemos: ögonlock och/eller blinkhinnor

Ingen svullnad 0

Onormal svullnad (inklusive blinkhinnor) 1

Tydlig svullnad med partiell utåtvridning av ögonlocken 2

Svullnad med halvt slutna ögonlock 3

Svullnad med ögonlocken mer än halvt slutna 4

B. 6. HUDSENSIBILISERING

1. METOD

1.1. INLEDNING

Kommentarer:

I ett klassificeringssystem för toxicitet som avser folkhälsan är det betydelsefullt att ha noggranna tester som kan spåra ämnen som kan verka hudsensibiliserande hos människan.

Det finns ingen enstaka testmetod som på ett lämpligt sätt kan identifiera samtliga de ämnen som kan vara sensibiliserande och som är relevant för alla ämnen.

Sådana faktorer som ett ämnes fysikaliska egenskaper, inbegripet dess förmåga att penetrera huden, skall beaktas vid valet av testet.

Tester på marsvin kan delas in i två grupper: Adjuvanstest i vilket man åstadkommer ett allergiskt tillstånd genom att lösa upp eller suspendera testämnet i Freunds Complete Adjuvant (FCA), och test av icke-adjuvanstyp.

Adjuvanstester är sannolikt mer precisa vad gäller att förutsäga ämnets eventuella förmåga att orsaka hudsensibilisering hos människan än metoder där inte Freunds Complete Adjuvant används, och de är därför att föredra.

Maximeringstest på marsvin (Guinea Pig Maximization Test = GPMT) används ofta som adjuvanstest. Trots att flera andra metoder kan användas för att upptäcka ett ämnes potentiella förmåga att orsaka hudsensibilisering anses maximeringsförsöket på marsvin vara den bästa metoden.

För flera kemiska klasser anses icke-adjuvanstester (av vilka Buehler-testet föredras) mindre känsliga.

I vissa fall kan det finnas goda skäl att välja Buehler-testet, som innebär lokal applicering i stället för intradermala injektion vilket används i GPMT). Användning av Buehler-testet måste vara vetenskapligt motiverat.

I denna metod beskrivs GPMT och Buehler-testet. Andra metoder får användas, förutsatt att de är väl dokumenterade och vetenskapligt motiverade.

Oavsett vilka metoder som används skall sensibiliteten hos den marsvinsstam som används för hudsensibiliseringstest kontrolleras med jämna mellanrum (var sjätte månad) med ett känt milt till moderat sensibiliserande ämne, med vilket det skall erhållas ett tillfredsställande antal positiva reaktioner.

Se också allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. DEFINITION

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Följande ämnen, vid behov utspädda, rekommenderas, liksom varje annat sensibiliserande ämne som är känt antingen från litteraturen eller som tillhör den grupp av ämne som testas.

— p-fenylendiamine	CAS nr 106-50-3
— 2,4-dinitroklorbensen	CAS nr 97-00-7
— kaliumdikromat	CAS nr 7778-50-9
— neomycinsulfat	CAS nr 1405-10-3
— nickelsulfat	CAS nr 7786-81-4

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Maximeringstest på marsvin (Guinea Pig Maximization Test – GPMT)**

1.6.1.1 *Förberedelser*

Unga friska albinomarsvin fördelas slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. Före testet rakas eller klipps pälsen bort från skulderområdet. Försiktighet skall iakttas för att inte skada huden.

1.6.1.2. *Testbetingelser*

1.6.1.2.1. Försöksdjur

Vanligen använda laboratoriestammar av albinomarsvin som väger mindre än 500 g används.

1.6.1.2.2. Antal och kön

Han- och/eller hondjur kan användas. Om honor används får de inte ha fött ungar och de får inte vara dräktiga. Minst 10 djur används i behandlingsgruppen och minst 5 i kontrollgruppen. Om färre djur används skall detta motiveras. Om resultaten inte är entydiga kan en histopatologiska undersökning vara till hjälp vid ett eventuellt beslut om att upprepa försöket med en ny grupp försöksdjur.

När det inte är möjligt att helt klart sluta sig till att testämnet är eller inte är sensibiliserande rekommenderas undersökning av ytterligare djur så att det totala antalet blir 20 test- och 10 kontrolldjur.

1.6.1.2.3. Dosnivåer

Koncentrationen av testämnet anpassas till en nivå som framkallar vissa tecken på hudirritation hos icke-sensibiliserade djur, men som djuren har tolererat väl i varje induktionsstadium.

Provokationskoncentrationen skall vara den högsta nivå som inte framkallar några tecken på hudirritation hos icke-sensibiliserade djur.

Dessa koncentrationer kan bestämmas i en mindre pilotstudie (t. ex. med två eller tre djur).

1.6.1.2.4. Observationsperiod

Under induktionsperioden skall huden observeras för möjliga irritationseffekter. Efter provokationsexponeringen registreras hudreaktionerna 24 och 48 timmar efter det att kompressen avlägsnats.

1.6.1.3. *Förfarande*

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

1.6.1.3.1 Induktion

Dag 0 — behandlingsgrupp

Följande intradermala injektioner, vardera på 0,1 ml, ges parvis i skulderområdet varvid varje injektionspar placeras på vardera sidan om mittlinjen.

Injektion 1.	0,1 ml Freunds Complete Adjuvant (FCA) blandat med vatten eller fysiologisk koksaltlösning 1:1.
Injektion 2.	0,1 ml testämne, i lämpliga fall i vehikel.
Injektion 3.	0,1 ml testämne i FCA.

Till injektion 3 löses vattenlösliga ämnen i 0,05 ml vatten och 0,05 ml outspätt FCA. Fettlösliga eller olösliga ämnen testas blandas med outspätt FCA.

Testämnets slutkoncentration i injektion 3 skall vara detsamma som i injektion 2.

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

Dag 0 — kontrollgrupp

Följande intradermala injektioner ges parvis på samma ställen som ovannämnda.

Injektion 1.	0,1 ml FCA blandat med vatten eller fysiologisk koksaltlösning 1:1.
Injektion 2.	0,1 ml vehikel.
Injektion 3.	0,1 ml vehikel i FCA.

Dag 6 — behandlingsgrupp

Om ämnet inte är hudirriterande framkallas en lokal irritation genom att testområdet penslas med 0,5 ml 10-procentig natriumlaurylsulfat i vaselin, efter klippning eller rakning.

Dag 7 — behandlingsgrupp

Pälsen avlägsnas åter från testområdet. Testämnet i lämplig vehikel (valet av vehikel skall motiveras; fasta ämnen pulvriseras och blandas i lämplig vehikel; vätskor kan eventuellt användas direkt) fördelas över ett filtrerpapper som placeras på testområdet. Filtrerpapperet hålls på plats och i kontakt med huden med lämpligt ocklusivförband i 48 timmar.

Dag 7 — kontrollgrupp

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

1.6.1.3.2. Provokation

Dag 21

Pälsen avlägsnas från flanken på djuren i behandlings- och kontrollgruppen. På försöksdjurens ena flank anbringas en kompress eller kammare innehållande testämnet och på den andra flanken anbringas en kompress eller kammare med enbart vehikeln.

Kompressen hålls i kontakt med huden genom lämpliga ocklusivförband i 24 timmar.

Kontrollgruppen exponeras på samma sätt.

Dag 23 och 24

— 21 timmar efter det att kompressen avlägsnats rengörs det provocerade området och vid behov avlägsnas pälsen.

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

— 24 timmar efter föregående observation görs en andra observation (72 timmar) och som också registreras.

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

1.6.1.3.3. Observation och gradering

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

Histopatologisk undersökning, mätning av hudveckstjockleken och liknande tekniker kan användas för att klargöra tvetydiga reaktioner och reaktioner som delvis döljs av testämnets färgning av huden.

1.6.2 **Buehlertest**

1.6.2.1 *Förberedelser*

Unga friska albinomarsvin fördelas slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. Före testet rakas eller klipps pälsen bort från skulderområdet. Försiktighet skall iakttas för att inte skada huden.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

1.6.2.2.1. Försöksdjur

Vanligen använda laboratoriestammar av albinomarsvin som väger mindre än 500 g används.

1.6.2.2.2. Antal och kön

Han- och/eller hondjur kan användas. Om honor används får de inte ha fött ungar och de får inte vara dräktiga. Försöksgruppen skall bestå av minst 20 djur och kontrollgruppen av minst 10 djur. Om färre djur används skall detta motiveras. Om resultaten är tvetydiga kan en histopatologisk undersökning vara till hjälp vid ett eventuellt beslut om att upprepa försöket med en ny grupp försöksdjur.

1.6.2.2.3. Dosnivåer

För varje induktionsfas väljs en så hög koncentrationen av testämnet att det för irriterande ämnen framkallas mild till moderat hudirritation hos merparten av försöksdjuren, dock på så sätt att det inte är någon systematisk toxisk verkan. Provokationskoncentrationen skall vara den högsta nivå som inte framkallar några tecken på hudirritation hos icke-sensibiliserade djur. Dessa koncentrationer kan bestämmas i en mindre pilotstudie (t. ex. med två eller tre djur).

1.6.2.2.4. Observationsperiod

Under induktionsperioden skall huden observeras för möjliga irritationseffekter. Efter provokationsexponeringen registreras hudreaktionerna 24 och 48 timmar efter det att kompressen avlägsnat,. dvs. 30 och 54 timmar efter inledningen av appliceringen.

1.6.2.3. *Förfarande*

Djuren vägs innan testet inleds och när det har avslutats.

Förfarandet består av två stadier:

1.6.2.3.1 Induktion

Dag 0 — behandlingsgrupp

Djuren klipps eller rakas på den ena flanken. 0,5 ml av testämnet i lämplig vehikel (valet av vehikel skall motiveras; vätskor kan eventuellt användas direkt) fördelas över en gasbinda. Gasbindan placeras på testområdet och hålls i kontakt med huden med en ocklusiv kompress eller kammare och lämpligt förband i 6 timmar.

Dag 0 — kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas från en flank. Enbart vehikeln appliceras på samma sätt på testområdet. Det hålls i kontakt med huden med en ocklusivt kompress eller kammare och lämpligt förband i 6 timmar.

Dag 7 och 14

Samma applicering som på dag 0 utförs på samma testområde (vid behov efter avlägsnande av päls) på samma flank dag 7 och dag 14.

1.6.2.3.2 Provokation

Dag 28

Djuren i både i behandlings- och kontrollgruppen klipps eller rakas på den andra flanken. Längst bak på flanken placeras en ocklusiv kompress eller kammare med 0,5 ml av testämnet i den högsta möjliga koncentration som inte framkallar irritation. Dessutom placeras en ocklusiv kompress eller kammare med enbart vehikeln längst fram på den andra flanken.

De ocklusiva kompresserna hålls i kontakt med huden genom lämpliga förband i 6 timmar.

Kontrollgruppen exponeras på samma sätt.

Dag 29 och 30

— 21 timmar efter borttagande av kompressen rengörs provokationsområdet och rensas från hår vid behov.

— Tre timmar därefter (30 timmar från provokationsexponeringens början) observeras och registreras hudens reaktion.

— 24 timmar efter denna observation görs en andra observation (54 timmar) som också registreras.

1.6.2.3.3. Observation och gradering

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

Histopatologisk undersökning, mätning av hudveckstjockleken och liknande tekniker kan användas för att klargöra tvetydiga reaktioner och reaktioner som delvis döljs av testämnets färgning av huden.

2. **DATA (GPMT och Buehler test)**

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

3. **RAPPORTERING (GPMT och Buehler test)**

3.1. TESTRAPPORT (GPMT och Buehler test)

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Använd marsvinsstam.

— Testbetingelser samt vehikel och testämneskoncentrationer för induktion och provokation.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Varje djurs vikt vid testets början och slut.

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

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING (GPMT och Buehler test)

Se allmän inledning till del B (D).

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B (E).

B. 7. TOXICITET VID UPPREPAD DOSERING (28 DAGAR, ORALT)

1. **METOD**

1.1. INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2. DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B (B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

I minst fem dagar före testet skall djuren hållas under testbetingelserna vad beträffar miljö och utfodring. Före testet fördelas friska könsmogna djur slumpmässigt i behandlingsgrupper. Testämnena kan tillföras via fodret, med magsond, i kapslar eller i dricksvattnet. Administrationssättet skall vara detsamma för alla djur under hela

behandlingsperioden. Om vehikel eller annan tillsats används för att underlätta doseringen skall det vara fastställt att den inte framkallar några toxiska effekter. I lämpliga fall kan tidigare insamlade data användas.

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Försöksdjur*

Om det inte finns kontraindikationer är råttan förstahandsvalet. De vanligen nyttjade laboratoriestammarna med unga friska djur skall användas. Helst skall doseringen påbörjas innan råttorna är sex veckor gamla, men under alla omständigheter innan de är åtta veckor gamla.

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

1.6.2.2. *Antal och kön*

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

1.6.2.3. *Dosnivåer*

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

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

1.6.2.4. *Gränstest*

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

1.6.2.5. *Observationstid*

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

1.6.3. **Förfarande**

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

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

Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för att säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testet avlivas och obduceras alla överlevande djur utom djuren i satellitgruppen. Döende djur och djur som visar tecken på svår smärta eller lidande skall avlägsnas och obduceras så snart som de upptäcks.

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

1. Hematologi omfattande minst hematokrit, hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total och differential räkning av leukocyter samt mätning av koaguleringsförmågan.

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

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

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

1.6.3.1. *Makroskopisk undersökning*

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

1.6.3.2. *Histopatologisk undersökning*

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

2. **DATA**

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

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

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

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

— Testbetingelser.

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

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos.

— Icke toxisk dos, om sådan har fastställts.

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

— Toxiska och andra effekter.

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

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Hematologiska undersökningar och alla resultat.

— Kliniska biokemiska analyser och alla resultat.

— Obduktionsfynd.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Statistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

B. 8. TOXICITET VID UPPREPAD DOSERING (28 DAGAR, INANDNING)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Det är fördelaktigt att ha förhandsupplysningar om ämnets partikelstorleksfördelning, ångtryck, smältpunkt, kokpunkt, flampunkt och eventuellt explosiva egenskaper.

Se också allmän inledning till del B (A).

1.2. DEFINITION

Se allmän inledning till del B (B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

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

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Försöksdjur*

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

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

1.6.2.2. *Antal och kön*

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

1.6.2.3. *Exponeringskoncentration*

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

1.6.2.4. *Exponeringstid*

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

1.6.2.5. *Utrustning*

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

1.6.2.6. *Observationstid*

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

1.6.3. **Förfarande**

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

Under ideala betingelser skall den relativa luftfuktigheten hållas mellan 30 och 70 %, men i vissa fall (t. ex. test av aerosoler) kan detta vara praktiskt ogenomförbart. Ett svagt undertryck i kammaren (≤ 5 mm vatten) förhindrar att testämnet läcker ut i det omgivande rummet. Foder och vatten skall undanhållas djuren under exponeringen.

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

Mätning eller kontroll skall göras av:

a) Lufthastigheten (fortlöpande).

b) Den faktiska koncentrationen av testämnet mätt i respirationszonen. Under den dagliga exponeringsperioden skall koncentrationen inte avvika mer än ± 15 % från den genomsnittliga koncentrationen. En sådan kontrollnivå kan emellertid var omöjlig att uppnå vid test med vissa aerosoler, och i sådana fall kan större avvikelser accepteras. Under hela testet skall de dagliga koncentrationerna hållas så konstanta som möjligt. För aerosoler analyseras partikelstorleken minst en gång i veckan per försöksgrupp.

c) Temperatur och luftfuktighet, helst fortlöpande.

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

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

i) Hematologi omfattande minst hematokrit, hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total och differential räkning av leukocyter samt mätning av koaguleringsförmågan.

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

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

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

1.6.3.1. *Makroskopisk undersökning*

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

1.6.3.2. *Histopatologisk undersökning*

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

2. **DATA**

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

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

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

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

— Testbetingelser:

Beskrivning av exponeringsapparaturen, inklusive utformning, typ, mått, luftkälla, system för att generera partiklar och aerosoler, metod för konditionering av luften, behandling av utpumpad luft och metoden att hålla djuren i en exponeringskammare, om sådan används. Utrustningen för att mäta temperatur, luftfuktighet och i förekommande fall aerosolkoncentrationers eller partikelstorlekars stabilitet, skall beskrivas.

Exponeringsdata:

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

a) lufthastighet genom inhalationsutrustningen,

b) luftens temperatur och fuktighet,

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

d) typ av vehikel, om sådan använts,

e) faktiska koncentrationer i testets andningszon,

f) massmedianen av den aerodynamiska diametern (MMAD) och den geometriska standardavvikelsen (GSD).

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och koncentration.

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

— Beskrivning av toxiska och andra effekter.

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

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Gjorda hematologiska undersökningar och alla resultat.

— Gjorda kliniska biokemiska analyser och alla resultat.

— Obduktionsfynd.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Statistisk behandling av resultaten när detta är möjligt.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

B. 9. TOXICITET VID UPPREPAD DOSERING (28 DAGAR, DERMALT)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2. DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B (B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

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

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

I minst fem dagar före testet skall djuren hållas under testbetingelser med hänsyn till miljö och utfodring. Före testet fördelas friska unga djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. Omedelbart innan testet inleds skall päls klippas bort från försöksdjurens rygg. Om pälsen rakas bort skall detta göras ungefär 24 timmar före testet. Klippning eller rakning behöver vanligtvis upprepas ungefär en gång i veckan. När pälsen klipps eller rakas bort skall försiktighet iakttas så att huden inte skadas. Minst 10 % av kroppsytan skall göras klar för applicering av testämnet. Vid fastställande av vilket och hur stort område som skall förberedas skall hänsyn tas till djurets kroppsvikt. Vid test av fasta ämnen, som får pulvriseras om det är lämpligt, skall testämnet fuktas tillräckligt med vatten eller, vid behov med lämplig vehikel, för att säkerställa god kontakt med huden. Flytande testämnen används vanligen outspädda. Testämnet appliceras dagligen fem till sju dagar i veckan.

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Försöksdjur*

Könsmogna råttor, kaniner eller marsvin får användas. Andra arter kan användas men i så fall skall detta motiveras.

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

1.6.2.2. *Antal och kön*

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

1.6.2.3. *Dosnivåer*

Till testet skall användas minst tre dosnivåer samt en kontrollgrupp eller en vehikelkontroll, om vehikel används. Testämnet skall appliceras vid samma tid varje dag och dosnivåerna skall justeras med jämna mellanrum (varje eller varannan vecka) så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Djuren i kontrollgruppen skall behandlas på samma sätt som djuren i behandlingsgruppen, bortsett från att de inte skall tillföras testämnet. Om vehikel används för att underlätta dosering skall kontrollgruppen tillföras vehikeln på samma sätt som behandlingsgrupperna. Vidare skall vehikeln tillföras kontrollgruppen i samma mängd som till de försöksdjur i gruppen som ges den högsta dosnivån. Den högsta dosnivån skall ge toxiska effekter men inga eller få dödsfall. Den lägsta dosnivån skall inte ge några tecken på toxicitet. Om det finns en användbar uppskattning av människans exponering för ämnet skall den lägsta nivån vara högre än denna. Helst skall medeldosen ge minsta möjliga observerbara toxiska effekter. Om fler än en medeldos används skall dosnivåerna väljas på ett sådant sätt att en gradering av de toxiska effekterna erhålls. I grupperna som utsätts för låg- och medeldoser och i kontrollgruppen skall antalet dödsfall hållas på en låg nivå för att utvärderingen av resultaten skall vara meningsfylld.

Om appliceringen av testämnet ger allvarlig hudirritation skall koncentrationerna sänkas, vilket kan medföra att andra toxiska effekter minskar eller uteblir på högsta dosnivån. Om huden har skadats allvarligt kan det bli nödvändigt att avsluta det pågående testet och påbörja en ny med lägre koncentrationer.

1.6.2.4. *Gränstest*

Om det vid ett förberedande test fastställs att en dosnivå på 1 000 mg/kg, eller en högre dosnivå om detta motiveras av kunskap om människans möjliga exponering, inte ger några toxiska effekter kan ytterligare test anses vara överflödiga.

1.6.2.5. *Observationsperiod*

Försöksdjuren skall observeras dagligen för tecken på toxicitet. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten då tecken på toxicitet uppträder skall registreras.

1.6.3. **Förfarande**

Djuren skall hållas i var sin bur. Den ideala doseringen är att djuren utsätts för testämnet sju dagar i veckan i 28 dagar. Djur i en eventuell satellitgrupp som planerats för uppföljning skall observeras i ytterligare 14 dagar utan tillförsel av testämnet så att det kan fastställas om de toxiska effekterna försvinner eller om de håller i sig. Exponeringstiden skall vara minst sex timmar per dag.

Testämnet skall appliceras jämnt över ett område som motsvarar ungefär 10 % av den totala kroppsytan. Med starkt toxiska ämnen kan testområdet vara mindre men så stor del av området som möjligt skall täckas med ett så tunt och jämnt fördelat lager som möjligt.

Under exponeringen skall testämnet hållas i kontakt med huden med en porös kompress och icke hudirriterande tejp. Testområdet skall vidare täckas på lämpligt sätt så att gaskompressen och testämnet hålls på plats och djuren inte kan inta testämnet. För att förhindra intag av testämnet kan rörelsehindrande anordningar användas men total immobilisering rekommenderas inte. Alternativt kan en "skyddskrage" användas.

I slutet av exponeringsperioden skall kvarvarande testämne avlägsnas, om så är lämpligt med användning av vatten eller någon annan passande metod att rengöra huden.

Alla djuren skall observeras dagligen och tecken på toxicitet skall registreras tillsammans med tidpunkten då de uppträdde samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Observationer skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon och slemhinnor och även respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Djurens skall vägas varje vecka och vidare rekommenderas att foderförbrukningen mäts per vecka. Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för att säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testet avlivas och obduceras alla överlevande djur utom djuren i satellitgruppen. Djur som dör under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas och obduceras de överlevande djuren.

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

1. Hematologi omfattande minst hematokrit, hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total och differential räkning av leukocyter samt mätning av koaguleringsförmågan.

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

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

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

1.6.4. Makroskopisk undersökning

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

1.6.5. Histopatologisk undersökning

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

2. DATA

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

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

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

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

— Testbetingelser (inklusive slag av bandage: med eller utan ocklusion).

— Dosnivåer (inklusive vehikel, om sådan använts) och koncentrationer.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos.

— Icke toxisk dos, om sådan har fastställts.

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

— Toxiska och andra effekter.

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

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Hematologiska undersökningar och alla resultat.

— Kliniska biokemiska analyser och alla resultat.

— Obduktionsfynd.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Statistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

B. 10. MUTAGENICITET (CYTOGENETISKT TEST PÅ DÄGGDJUR *IN VITRO*)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2. DEFINITION

Se allmän inledning till del B (B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Det cytogenetiska testet *in vitro* är ett korttids mutagenicitetstest för upptäckt av strukturella kromosomförändringar i odlade däggdjursceller. Kulturer från etablerade cellstammar kan användas såväl som primära cellkulturer. Cellkulturerna exponeras för testämnet med och utan ett lämpligt metaboliskt aktiveringssystem och behandlas därefter med spindelfiberinhibitorer, t. ex. kolchicin, för att celler skall ackumuleras i ett metafasliknande mitosstadium (c-metafas). Cellerna skördas vid lämpliga tidpunkter och prepareras för kromosomanalys. Preparaten färgas och celler i metafasen analyseras för kromosomförändringar.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

1.6.1.1. *Celler*

Etablerade cellstammar eller primära cellkulturer används, t. ex. celler från kinesisk hamster och lymfocyter från människa. Testämnen tillsätts i ett odlingsmedium eller upplöses i lämpliga vehiklar innan cellerna exponeras.

1.6.1.2. *Metabolisk aktivering*

Celler utsätts för testämnet både med och utan tillsättning av ett lämpligt metaboliskt aktiveringssystem. Det vanligast använda systemet består av den mikrosomhaltiga supernatanten från leverhomogenat framställt av lever från gnagare som har varit behandlade med enzyminducerande medel, tillsatt co-faktor.

1.6.2. **Testbetingelser**

Antal kulturer:

Minst två kulturer används för varje försöksmoment.

Negativ och positiv kontrollkultur:

Som negativ kontrollkultur används lösningsmedel (om lösningsmedlet inte är kulturmediet eller vatten), leverenzymaktiveringsblandning och lösningsmedel samt helt obehandlade kulturer.

I varje försök ingår en positiv kontrollkultur: om leverenzymaktiveringsblandning används för att aktivera testämnet skall den positiva kontrollkulturen utgöras av en förening som man vet kräver metabolisk aktivering.

Dosnivå:

Minst tre dosnivåer av testämnet skall användas över minst ett logaritmiskt dosintervall, varvid den högsta dosen skall hämma den miotiska aktiviteten med ungefär 50 % eller ge någon annan indikation på cytotoxicitet. Om ämnet inte är toxiskt skall det testas upp till den högsta koncentration som lösningen medger, dock högst 5 mg/ml.

Odlingsbetingelser:

Lämpligt kulturmedium och lämpliga inkubationsbetingelser (t. ex. temperatur, odlingskärl, CO_2-koncentrationer och fuktighet) skall användas.

1.6.3. **Testförfarande**

1.6.3.1. *Beredning av kulturer*

Etablerade cellstammar: Celler tas från stamceller (t. ex. genom att de trypsinbehandlas eller skakas av) varefter de sås med passande täthet i odlingskärl och inkuberas vid 37 °C.

Humana lymfocyter: Heparinerat helblod tillsätts till ett kulturmedium innehållande fytohemagglutinin, fetalt kalvserum och antibiotika. Blandningen inkuberas vid 37 °C.

1.6.3.2. *Behandling av kulturerna med testämnet*

i) Behandling utan leverenzymaktiveringsblandning

Varje behandling skall minst pågå i en hel cellcykel och fixeringsintervall skall fastställas för att säkerställa att celler som har behandlats på olika stadier i cykeln analyseras under den första mitosen efter behandlingen.

Om behandlingen pågår kortare tid än en hel cellcykel skall en serie fixeringstidpunkter fastställas för att säkerställa att celler som befinner sig i olika stadier tas ut, dvs, G_1, S och G_2, under behandlingen.

Testämnet tillsätts till kulturer av etablerade cellstammar medan de befinner sig i den exponentiella tillväxtfasen. Humana lymfocytkulturer behandlas medan de är i ett semisynkront tillstånd.

ii) Behandling med leverenzymaktiveringsblandning

Vid behandlingen skall testämnet plus aktiveringssystemet vara tillstädes så länge som möjligt utan att utöva någon toxisk effekt på cellerna. Om denna behandling av toxiska skäl inte pågår under en hel cellcykel skall en serie fixeringstidpunkter fastställas för att säkerställa att celler som befinner sig i olika stadier tas ut, dvs, G_1, S och G_2, under behandlingen.

Skörd av celler:

Cellkulturerna behandlas med spindelfiberinhibitorer under en passande tid innan de skördas. Varje kultur skördas och kromosomprepareras separat.

1.6.3.3. *Kromosompreparering*

Kromosompreparering omfattar hypotonisk behandling av cellerna, fixering, utstrykning på objektglas och färgning.

Analys:

Minst 100 väl fördelade metafaser per odling analyseras för kromosomförändringar. Objektglasen kodas före analys. Vid humana lymfocyter analyseras endast metafaser innehållande 46 centromerer.

Vid etablerade cellstammar analyseras endast metafaser innehållande ± 2 centromerer i förhållande till modaltalet.

Dessutom värderas i vissa fall mitosindexet eller en annan indikator på cytotoxicitet för varje dosnivå.

2. DATA

Data ställs upp i tabellform. Kromosomförändringar (gap, brott, translokationer), kromosom typ (gap, brott, brottdelar, ringar, dicentromerer, polycentromerer) och antalet avvikande metafaser (inklusive och exklusive hål) registreras separat för alla behandlade kulturer och kontrollkulturer.

Data utvärderas genom lämpliga statistiska metoder.

Testresultaten skall jämföras med motsvarande negativa kontrollkulturer.

Minst två oberoende test skall genomföras. Om det är vetenskapligt motiverat kan det dock räcka med ett enda försök. Det är inte nödvändigt att utföra det andra försöket på samma sätt som det första. Tvärtom kan det vara till fördel att ändra vissa testbetingelser för att erhålla mer användbara data.

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Använda celler.

— Testbetingelser: sammansättning av mediet, CO_2, koncentration, inkubationstemperatur, inkubationstid, dosnivåer, behandlingstid, varaktigheten av behandlingen med och koncentrationen av använd spindelinhibitor, typ av leverenzymaktiveringsblandning som använts, positiva och negativa kontroller.

— Antal analyserade metafaser (data anges separat för varje kultur).

— Mitosindex eller annan indikation på cytotoxicitet.

— Typ av och antal avvikelser anges separat för varje behandlad kultur och kontrollkultur, och de använda etablerade cellstammarnas modaltal.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

B. 11. MUTAGENICITET (CYTOGENETISKT BENMÄRGSTEST PÅ DÄGGDJUR *IN VIVO*, KROMOSOMANALYS)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2. DEFINITION

Se allmän inledning till del B (C).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Detta cytogenetiska test *in vivo* är ett korttids mutagenicitetstest för upptäckt av strukturella kromosomförändringar. Kromosomförändringar utvärderas vanligtvis i samband med den första mitosen efter exponering. Merparten av de avvikelser som framkallas av kemiska mutagener är av kromatid typ.

I metoden används benmärgsceller från däggdjur som exponeras för testämnen på ändamålsenligt sätt och sedan avlivas med följdriktiga intervaller. Före avlivning behandlas djuren vidare med en spindelfiberinhibitor, t. ex. kolchicin för att celler skall ackumuleras i ett metafasliknande stadium av mitosen (c-metafas). Lufttorkade kromosompreparat från cellerna bereds och färgas, och metafaserna analyseras mikroskopiskt för kromosomförändringar.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

Testämnen upplöses i vanlig saltlösning. Ämnen som inte är lösliga i saltlösning skall lösas eller uppslammas i lämplig vehikel.

Nyligen framställda lösningar av testämnet skall användas. Vehikel som används för att underlätta dosering får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska effekter.

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Försöksdjur*

Gnagararter används, t. ex. råttor, möss eller kinesiska hamstrar. Unga, friska och könsmogna djur fördelas slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

1.6.2.2. *Antal och kön*

Minst fem hon- och fem handjur skall ingå i varje behandlingsgrupp och i varje kontrollgrupp. Följaktligen skall 10 djur avlivas per tidsperiod och grupp, om testet omfattar flera testtillfällen efter behandlingen.

För den positiva kontrollgruppen räcker det med en enda provtid.

1.6.2.3. *Administrationssätt*

Testämnen skall vanligen administreras endast en gång. På grundval av toxikologisk information kan ett schema fastställas med upprepad behandling. Upprepad behandling kan emellertid inte användas om testämnet inte har cytotoxisk effekt på benmärg. Vanligtvis administreras testämnet oralt eller genom intraperitoneal injicering. Även andra administrationssätt kan användas.

1.6.2.4. *Användning av negativa och positiva kontroller*

Som positiv kontroll används en förening som har påvisats framkalla kromosomförändringar *in vivo* och i varje test ingår även en negativ (lösningsmedelskontrollgrupp).

1.6.2.5. *Dosnivå*

I basförsöksomgången används endast en dos av testämnet, nämligen den maximalt tolererade dosen som ger en viss cytotoxicitet (t. ex. partiell hämning av mitosen).

För "icke-toxiska" ämnen är den högsta (gräns) dos som måste undersökas genom tillförsel av en enda dos 2 000 mg/kg kroppsvikt

Vid upprepad dosering ligger den övre gränsen på 1 000 mg/kg kroppsvikt och dag.

Ytterligare dosnivåer kan användas om detta motiveras av vetenskapliga skäl.

Om testet utförs i verifieringssyfte kan minst två ytterligare dosnivåer användas.

1.6.3. **Testförfarande**

Testet kan utföras på två sätt:

i) Försöksdjuren behandlas en gång med den maximalt tolererade dosen. Prov tas tre gånger efter behandling. Den viktigaste provtagningen görs efter 24 timmar, men eftersom testämnet kan påverka cellcykelkinetiken skall provtagning göras en gång före och en gång efter 24 timmar vid lämpliga intervaller mellan 6 — 48 timmar.

   Om ytterligare dosnivåer används skall prov tas vid de särskilt känsliga intervallerna, eller om dessa inte är kända, 24 timmar efter behandling.

ii) Om farmakokinetiska och metaboliska uppgifter pekar på att ett schema med upprepad behandling bör användas, kan exponeringen ske i upprepade doser varvid prov skall tas 6 och 24 timmar efter den sista behandlingen.

Benmärgspreparering:

Före avlivning skall försöksdjuren ges en intraperitoneal injektion med lämplig dos av spindelfiberinhibitor för att ett tillräckligt antal celler i c-metafasen skall erhållas. Benmärg hämtas från båda lårbenen på nyligen avlivade djur genom sköljning med en isoton lösning. Efter lämplig hypoton behandling fixeras cellerna och stryks ut på objektglas. Efter lufttorkning färgas objektglasen.

Analys:

Objektglas kodas före mikroskopisk analys. Minst 50 väl fördelade metafaser med komplett antal centromerer analyseras per djur för strukturella kromosomförändringar. Vidare kan mitosindex fastställas för varje djur.

2. DATA

Data presenteras i tabellform. Avvikelser av kromatid och isokromatid typ (gap, brott, translokationer) och mitosindex, där sådana fastställts, anges separat för alla försöks- och kontrolldjur. Dessutom skall medelvärden och standardavvikelser anges för varje behandlad grupp och för varje kontrollgrupp. Data utvärderas med lämpliga statistiska metoder.

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam och djurens ålder.

— Antal djur av vardera könet i behandlings- och kontrollgrupper.

— Testbetingelser: detaljerad beskrivning av provtagningsschema, dosnivåer, behandlingens varaktighet och koncentration av använd spindelinhibitor.

— Antal analyserade metafaser per djur.

— Miosindex, där sådana fastställts.

— Typer av och antal avvikelser angivna separat för varje behandlat djur och varje kontrolldjur.

— Toxicitetssymptom som iakttagits under försöket.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

B. 12. MUTAGENICITET (MIKRONUKLEÄRT TEST)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Se allmän inledning till del B (punkt A).

1.2. DEFINITION

Se allmän inledning till del B (punkt B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Det mikronukleära testet är ett korttidstest på däggdjur *in vivo* för upptäckt av kromosomskada eller skada av den miotiska apparaten förorsakad av kemikalier. Utgångspunkten för detta test är en ökning av antalet mikronuclei i de polykromatiska erytrocyterna hos behandlade djur jämfört med kontrolldjuren.

Mikronuclei bildas av kromosomfragment eller hela kromosomer som släpar efter i mitosen. Om erytroblaster utvecklas till erytrocyter stöts cellkärnan ut medan mikronucleus kan bibehållas i cytoplasman. I detta test används unga polykromatiska erytrocyter från benmärgen hos försöksdjur som på lämpligt sätt exponeras för testämnet. Benmärgen extraheras till utstrykspreparat som färgas. Polykromatiska erytrocyter räknas för micronuclei och förhållandet mellan polykromatiska och normokromatiska erytrocyter fastställs.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

Testämnen upplöses i isoton lösning. Ämnen som inte är lösliga i isotona lösningar skall lösas eller uppslammas i lämplig vehikel. Vehikel som används för att underlätta dosering får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska effekter. Normalt skall nyligen framställda lösningar av testämnet användas.

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Försöksdjur*

Möss rekommenderas men även andra däggdjur kan användas. Unga, friska och könsmogna djur fördelas slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

1.6.2.2. *Antal och kön*

Minst fem hon- och fem handjur skall ingå i varje behandlingsgrupp och i varje kontrollgrupp. Följaktligen skall 10 djur avlivas per tidsperiod och grupp om testet omfattar flera testtillfällen efter behandlingen. För den positiva kontrollgruppen räcker det med en enda provtid.

1.6.2.3. *Administrationssätt*

Testämnen skall vanligen administreras endast en gång. På basis av toxikologisk information kan ett schema fastställas med upprepad behandling. Upprepad behandling kan emellertid inte användas om testämnet inte har cytotoxisk effekt på benmärg. Vanligtvis administreras testämnet oralt eller genom intraperitoneal injicering. Även andra administrationssätt kan användas.

1.6.2.4. *Användning av negativa och positiva kontroller*

Både positiva och negativa (lösningsmedelskontroller) skall användas i varje test.

1.6.2.5. *Dosnivå*

I basförsöksomgången används endast en dos av testämnet, nämligen den maximalt tolererade dosen som ger en viss cytotoxicitet, t. ex. genom att förhållandet mellan polykromatiska och normokromatiska erytrocyter ändras.

För "icke-toxiska" ämnen är den högsta (gräns) dos som måste undersökas genom tillförsel av en enda dos 2 000 mg/kg kroppsvikt

Vid upprepad dosering ligger den övre gränsen på 1 000 mg/kg kroppsvikt och dag.

Ytterligare dosnivåer kan användas om detta motiveras av vetenskapliga skäl.

Om testet utförs i verifieringssyfte kan minst två ytterligare dosnivåer användas.

1.6.3. **Testförfarande**

Testet kan utföras på två sätt:

i) Försöksdjuren behandlas en gång med den maximalt tolererade dosen. Provtagning skall ske vid de tidpunkter då en maximal respons förväntas, vilket varierar beroende på testämne. Om maximal dos används skall benmärgsprover tas två gånger, första gången tidigast 12 timmar efter behandling och därefter med lämpliga intervaller, dock inte senare än 48 timmar efter behandlingen.

   Om ytterligare dosnivåer används skall prov tas vid den maximalt känsliga perioden eller, om den inte är känd, 24 timmar efter behandling.

ii) Om farmakokinetiska och metaboliska uppgifter pekar på att ett schema med upprepad behandling bör användas, kan doseringen upprepas och prov tas minst tre gånger, första gången tidigast 12 timmar efter den sista behandlingen.

Benmärgspreparering:

Benmärg tas från båda lårbenen på nyligen avlivade djur genom sköljning med fetalt kalvserum. Cellerna sedimenteras genom centrifugering och supernatanten kasseras. Droppar av den homogena cellsuspensionen placeras på objektglas och breds ut som ett utstrykspreparat. Efter lufttorkning färgas objektglasen.

Analys:

Objektglas kodas före mikroskopisk analys. Minst 1 000 polykromatiska erytrocyter per djur undersöks för förekomst av mikronuclei.

Förhållandet mellan normokromatiska och polykromatiska erytrocyter bestäms för varje djur genom att totalt 1 000 erytrocyter räknas.

2. DATA

Data presenteras i tabellform. Antalet räknade erytrocyter, antalet polykromatiska erytrocyter med mikronuclei och procenttalet celler med mikronuclei anges separat för varje försöks- och kontrolldjur tillsammans med förhållandet mellan normokromatiska och polykromatiska erytrocyter. Medelvärden och standardavvikelser skall också anges för varje behandlings- och kontrollgrupp. Data utvärderas på grundval av lämpliga statistiska metoder.

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam och djurens ålder.

— Antal djur av vardera könet i behandlings- och kontrollgrupper.

— Testbetingelser: detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsschema, dosnivåer, uppgifter om toxicitet och negativa och positiva kontroller.

— Kriterier för räkning av micronuclei.

— Förhållandet mellan dos och effekt, när detta är möjligt.

— Toxicitetssymptom som iakttagits under försöket.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

B. 13. MUTAGENICITET (ESCHERICHIA COLI — ÅTERMUTATIONSTEST)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2. DEFINITION

Se allmän inledning till del B (C).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Reversionssystemet *Escherichia coli*-tryptofan (trp) är ett mikrobialt test som mäter reversionen $trp^- \rightarrow trp^+$ genom kemikalier som orsakar basförändringar i organismens genom.

Bakterier exponeras för testämnen med och utan metabolisk aktivering. Efter en lämplig inkubationsperiod i minimalt medium räknas de revertanta kolonierna och jämförs med antalet spontana revertanter i en obehandlad kontrollkultur och/eller en kontrollkultur med lösningsmedel.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

Följande metoder kan användas vid utförande av testet: 1) förinkubationsperioden; och 2) direkt inkorporering, varvid bakterier och testämne blandas med toppagar och hälls ut över en selektiv agarplatta.

1.6.1. **Förberedelser**

1.6.1.1. *Bakterier*

Bakterier odlas vid 37 °C till den sena exponentiella eller den tidiga stationära tillväxtfasen. Celltätheten skall vara ungefär 10^8—10^9 celler per milliliter.

1.6.1.2. *Metabolisk aktivering*

Bakterier exponeras för testämnet både med och utan ett lämpligt metaboliskt aktiveringssystem. Det vanligast använda systemet består av den mikrosomhaltiga supernatanten från leverhomogenat framställt av lever från gnagare som har varit behandlade med enzyminducerande medel, tillsatt co-faktor.

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Teststammar*

Tre stammar, WP2, WP2 uvr A och WP2 uvr A pKM 101 skall användas. Vedertagna metoder att odla och bevara stamkulturer skall användas. Stammarnas tillväxtkrav och genetiska identitet, deras känslighet för UV-strålning eller mitomycin C och motståndskraften mot ampicillin i stam WP2 uvr A pKM 101 skall kontrolleras. Stammarna skall även ge spontana revertanter inom förväntade frekvensområden.

1.6.2.2. *Medium*

Ett lämpligt medium för utveckling och selektion av mutanter används med en lämplig toppagar.

1.6.2.3. *Användning av negativa och positiva kontroller*

Obehandlade kontroller och kontroller med lösningsmedel skall användas jämsides. Positiva kontroller skall göras i två syften:

i) För att bekräfta bakteriestammarnas känslighet.

Metyl-metan-sulfonat, 4-nitrokinolinoxid eller etylnitrosurea kan användas som positiva kontroller för test utan metabolisk aktivering.

ii) För att säkerställa aktiviteten hos det använda metaboliska systemet.

En positiv kontroll för aktiviteten hos ett metaboliskt system för alla stammar är 2-aminoantracen. Om det finns en positiv kontroll av samma kemiska klass som testämnet skall denna användas.

1.6.2.4. *Mängd testämne per platta*

Minst fem olika mängder av testämnet skall undersökas, med semilogaritmiska intervaller mellan plattorna. Ämnen testas upp till gränsen för löslighet eller toxicitet. Toxicitet påvisas av en reduktion av antalet spontana revertanter, av plattans djupgenomskinlighet eller av graden av överlevnad hos behandlade kulturer. Icke-toxiska kemikalier skall testas upp till 5 mg per platta innan testämnet kan betraktas som negativt.

1.6.2.5. *Inkubationsbetingelser*

Plattorna inkuberas i 48—72 timmar vid 37 °C.

1.6.3. **Testförfarande**

För metoden med inkorporering av plattan utan enzymaktivering blandas ämnet och 0,1 ml färsk bakteriekultur med 2,0 ml toppagar. För test med metabolisk aktivering blandas 0,5 ml leverenzymaktiveringsblanding innehållande lämplig mängd post-mitokondrial fraktion med toppagaren efter tillsättning av testämnet och bakterierna. Innehållet i varje rör blandas och fördelas på medieytan i en platta med selektiv agar. Toppagaren får stelna och plattorna inkuberas vid 37 °C i 48—72 timmar. I slutet av inkubationsperioden räknas antalet revertanta kolonier per platta.

Vid förinkubationsmetoden förinkuberas en blandning av testämnet, 0,1 ml färsk bakteriekultur och lämplig mängd leverenzymaktiveringsblandning eller samma mängd buffert innan 2,0 ml toppagar tillsätts. Alla andra förfaranden är desamma som för inkorporeringsmetoden.

Vid båda metoderna skall all uthällning göras på minst tre plattor.

2. DATA

Antalet revertanta kolonier per platta rapporteras för både kontroll- och behandlingsserier. Räkning av enskilda plattor, medelantalet revertanta kolonier per platta och standardavvikelser skall anges för det testade ämnet och kontrollerna. Alla resultat skall bekräftas genom ett oberoende test.

Data skall utvärderas genom lämpliga statistiska metoder.

Minst två oberoende test skall genomföras. Det är inte nödvändigt att utföra det andra försöket på samma sätt som det första. Tvärtom kan det vara till fördel att ändra vissa testbetingelser för att erhålla mer användbara data.

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använda bakteriestammar.

— Testbetingelser: dosnivåer, toxicitet, sammansättning av media, behandlingsförfaranden (förinkubation, inkubation), leverenzymaktiveringsblandning, referensämnen, negativa kontroller.

— Räkning av enskilda plattor, medelantalet revertanta kolonier per platta, standardavvikelse, dos-responssamband när detta är möjligt.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

B. 14. MUTAGENICITET (SALMONELLA TYPHIMURIUM — ÅTERMUTATIONSTEST)

1. METOD

1.1. INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2. DEFINITION

Se allmän inledning till del B (B).

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Reversionssystemet *Salmonella typhimuriumi* histidin (his) är ett mikrobialt test som mäter reversionen $his^- \rightarrow his^+$ genom kemikalier som orsakar bassubstitutioner eller frameshift-mutationer i bakterigenomet.

Bakterier exponeras för testämnen med och utan metabolisk aktivering och placeras på plattor med minimalt medium. Efter en lämplig inkubationsperiod räknas de revertanta kolonierna och jämförs med antalet spontana revertanter i en obehandlad kontrollkultur och/eller en kontrollkultur med lösningsmedel.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Förberedelser**

1.6.1.1. *Bakterier*

Färska bakteriekulturer odlas vid 37 °C till den sena exponentiella eller den tidiga stationära tillväxtfasen. Celltätheten skall vara ungefär 10^8 - 10^9 celler per milliliter.

1.6.1.2. *Metabolisk aktivering*

Bakterier exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av ett lämpligt metaboliskt aktiveringssystem. Det vanligast använda systemet består av den mikrosomhaltiga supernatanten från leverhomogenat framställt av lever från gnagare som har varit behandlade med enzyminducerande medel, tillsatt co-faktor.

1.6.2. **Testbetingelser**

1.6.2.1. *Teststammar*

Minst fyra stammar, TA 1535, TA 1537 eller TA 97, TA 98 och TA 100 skall användas. Andra stammar, såsom TA 1538 och TA 102 kan användas därutöver. Vedertagna metoder att bereda och bevara stamkulturer skall användas. Stammarnas tillväxtkrav och genetiska identitet, deras känslighet för UV-strålning och kristallviolett och motståndskraften mot ampicillin skall kontrolleras. Stammarna skall även ge spontana revertanter inom förväntade frekvensområden.

1.6.2.2. *Medium*

Ett lämpligt selektivt medium används med en lämplig toppagar.

1.6.2.3. *Användning av negativa och positiva kontroller*

Obehandlade kontroller och kontroller med lösningsmedel skall användas jämsides. Positiva kontroller skall göras i två syften:

i) För att bekräfta bakteriestammarnas känslighet.

Följande föreningar kan användas för test utan metabolisk aktivering:

Stammar	Reverterar med
TA 1535, TA 100	Natriumazid
TA 1538, TA 98, TA 97	2-nitrofluoren
TA 1537	9-aminoakridin
TA 102	cumenhydroperoxid

ii) För att säkerställa aktiviteten hos det använda metaboliska systemet.

En positiv kontroll för aktiviteten hos ett metaboliskt system för alla stammar är 2-aminoantracen. Om det finns en positiv kontroll av samma kemiska klass som testämnet skall denna användas.

1.6.2.4. *Mängd testämne per platta*

Minst fem olika mängder av testämnet skall undersökas, med semilogaritmiska intervaller mellan plattorna. Ämnen testas upp till gränsen för löslighet eller toxicitet. Toxicitet påvisas av en reduktion av antalet spontana revertanter, av plattans djupgenomskinlighet eller av graden av överlevnad hos behandlade kulturer. Icke-toxiska kemikalier skall testas upp till 5 mg per platta innan testämnet kan betraktas som negativt.

1.6.2.5. *Inkubationsbetingelser*

Plattorna inkuberas i 48 — 72 timmar vid 37 °C.

1.6.3. **Testförfarande**

Vid användning av metoden med direkt inkorporering av plattan utan enzymaktivering skall testämnet och 0,1 ml färsk bakteriekultur tillsättas till 2,0 ml toppagar. Vid test med metabolisk aktivering tillsätts 0,5 ml leverenzymaktiveringsblanding innehållande lämplig mängd post-mitokondrial fraktion till toppagaren efter tillsättning av testämnet och bakterier. Innehållet i varje provrör blandas och hälls ut på över en platta med selektiv agar. Toppagaren får stelna och plattorna inkuberas vid 37 °C i 48 — 72 timmar. I slutet av inkubationsperioden räknas de revertanta kolonierna per platta. Vid användning av förinkubationsmetoden förinkuberas en blandning av testämnet, 0,1 ml färsk bakteriekultur och lämplig mängd leverenzymaktiveringsblandning eller samma mängd buffert innan 2,0 ml toppagar tillsätts. Alla andra förfaranden är desamma som för inkorporeringsmetoden.

Vid båda metoderna skall all uthällning göras på minst tre plattor.

2. **DATA**

Antalet revertanta kolonier per platta rapporteras för både kontroll- och behandlingsserier.

Räkning av enskilda plattor, medelantalet revertanta kolonier per platta och standardavvikelser skall anges för det testade ämnet och kontrollerna.

Data skall utvärderas genom lämpliga statistiska metoder.

Minst två oberoende test skall genomföras. Det är inte nödvändigt att utföra det andra försöket på samma sätt som det första. Tvärtom kan det vara till fördel att ändra vissa testbetingelser för att erhålla mer användbara data.

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använda bakteriestammar.

— Testbetingelser: dosnivåer, toxicitet, sammansättning av media, behandlingsförfaranden (förinkubation, inkubation), leverenzymaktiveringsblandning, referensämnen, negativa kontroller.

— Räkning av enskilda plattor, medelantalet revertanta kolonier per platta, standardavvikelse, dos-responssamband när detta är möjligt.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B (E).

DEL C: METODER FÖR BESTÄMNING AV EKOTOXICITET

C. 1. AKUT TOXICITET FÖR FISK

1. METOD

1.1. INLEDNING

Syftet med detta test är att bestämma ett ämnets akuta dödliga toxicitet för sötvattenfisk. Det är värdefullt att känna till ämnets löslighet i vatten, ångtryck, kemiska stabilitet, dissociationskonstanter och bionedbrytbarhet när man skall välja den mest lämpliga testmetoden (statisk, semistatisk eller genomströmning) för att säkerställa tillfredsställande konstanta koncentrationer av testämnet under hela testperioden.

Vid planeringen av testet och tolkningen av testresultaten bör man ta hänsyn till andra uppgifter (t. ex. strukturformel, renhetsgrad, art och procentdel av signifikanta orenheter, förekomst och mängd av tillsatser, samt n-oktanol/vattendelningskoefficienten).

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Akut toxicitet är de märkbara skadliga verkningar som på kort tid (dagar) framkallas hos en organism som exponeras för ett ämne. I detta test uttrycks akut toxicitet som median letal koncentration (LC_{50}), dvs. den koncentration i vatten som medför att 50 % av fiskarna i en försöksgrupp dör under kontinuerlig exponering i en viss tid. Exponeringstiden skall anges.

Alla koncentrationer av testämnet anges i vikt per volymenhet (milligram per liter). De kan också uttryckas som vikt per vikt (mg/kg^{-1}).

1.3. REFERENSÄMNEN

Ett referensämne kan användas för att visa att försöksdjurens respons inte har ändrats signifikant under testbetingelserna i laboratoriet.

Inga referensämnen finns angivna för detta test.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Ett gränstest kan utföras med 100 mg per liter för att konstatera om LC_{50} är större än denna koncentration.

Fisken exponeras för testämnet som i en rad koncentrationer tillsätts vattnet under 96 timmar. Dödligheten registreras med högst 24 timmars mellanrum och om så är möjligt beräknas de koncentrationer som vid varje observationstillfälle har medfört att 50 % av fisken (LC_{50}) har dött.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Kvalitetskriterierna gäller för såväl gränstestet som den fullständiga testmetoden.

Dödligheten i kontrollgruppen får inte överstiga 10 % (eller 1 fisk om mindre än 10 fiskar används) i slutet av testet.

Under hela testet skall koncentrationen av upplöst syre vara högre än 60 % av luftmättnadsvärdet.

Koncentrationer av testämnet skall ligga över 80 % av startkoncentrationen under hela testperioden.

För ämnen som är lättlösliga i testmediet och ger stabila lösningar, dvs. ämnen som inte i hög grad förångas, bryts ned, hydrolyseras eller adsorberas, kan startkoncentrationen antas vara lika med den nominella koncentrationen. Man skall kunna bevisa att koncentrationen har bibehållits under hela testet och att kvalitetskriterierna är uppfyllda.

För ämnen som är

i) svårlösliga i testmediet, eller

ii) kan skapa stabila emulsioner eller dispersioner, eller

iii) är ostabila i vattniga lösningar

skall man som värde för startkoncentrationen använda den koncentration som är uppmätt i lösningen (eller om detta inte är tekniskt möjligt, mätt i vattenkolonnen) vid testets inledning. Koncentrationen bestäms sedan jämvikt uppnåtts, men innan fisken släpps i.

I alla dessa fall skall ytterligare mätningar göras under testets gång för att säkerställa att koncentrationen har bibehållits och att kvalitetskriterierna har varit uppfyllda.

pH-värdet får inte variera med mer än 1 enhet.

1.6. METODBESKRIVNING

Tre typer av förfaranden kan användas:

Statiskt test:

Toxicitetstest utan något genomflöde av testlösningen. (Lösningarna förblir oförändrade under hela testet.)

Semi-statiskt test:

Test utan genomflöde av testlösningen men där hela testlösningar regelbundet byts ut helt efter längre perioder (t. ex. 24 timmar).

Genomströmningstest:

Toxicitetstest där vattnet i testkamrarna förnyas hela tiden och där testämnet transporteras med det vatten som används till att förnya testmediet.

1.6.1. **Reagenser**

1.6.1.1. *Lösningar av testämnen*

Stamlösningar av erforderlig styrka framställs genom att testämnet upplöses i avjoniserat vatten eller vatten enligt 1.6.1.2

De valda testkoncentrationerna framställs genom utspädning av stamlösningen. Om höga koncentrationer testas kan ämnet lösas direkt i utspädningsvattnet.

Ämnen testas normalt endast upp till gränsen för löslighet. För vissa ämnen (t. ex. ämnen som är svårlösliga i vatten, som har ett högt P_{ow}-värde, eller som bildar en stabil dipersion och inte en riktig lösning i vatten) accepteras att man har använt en testkoncentration som är större än lösligheten för att säkerställa att den högsta upplösta/stabila koncentration har nåtts. Det är dock viktigt att denna koncentration inte på annat sätt förstör testmetoden (t. ex. bildar en hinna av ämnet på vattenytan som förhindrar syrsättning av vattnet, etc.)

Ultraljud, organiska lösningsmedel, emulgeringsmedel eller dispergeringsmedel kan användas för att framställa stamlösningar av ämnen som är svårlösliga i vatten och för att dispergera sådan ämnen i testmediet. Om tillsatsämnen används skall alla testkoncentrationer innehålla samma mängd tillsatsämnet och en extra kontrollgrupp

skall användas som utsätts för samma koncentration av tillsatsämnet som den som används i testserien. Sådana tillsatsämnen används i lägsta möjliga koncentration och får aldrig vara större än 100 mg per liter i testmediet.

Testet utförs utan justering av pH-värdet. Om det finns tecken på en markant förändring av pH-värdet rekommenderas att testet upprepas med pH-justering och att dessa resultat rapporteras. I detta fall skall pH-värdet i stamlösningen justeras efter pH-värdet i utspädningsvattnet, om det inte finns särskilda skäl som talar mot detta. HCl och NaOH är förstahandsvalen för justering av pH-värdet. Denna pH-justering skall göras på ett sådant sätt att testämnets koncentration i stamlösningen inte ändras i någon signifikant grad. Om justeringen medför någon kemisk reaktion eller fysisk utfällning av testämnet skall detta rapporteras.

1.6.1.2. *Vatten till förvaring och utspädning*

Dricksvatten (som inte är förorenat av skadliga koncentrationer av klor, tungmetaller eller andra ämnen), råvatten av god kvalitet eller rekonstituerat vatten (se tillägg 1) kan användas. Vatten med en total hårdhet på mellan 10 och 250 mg per liter (som $CaCO_3$) och med ett pH-värde av 6,0 — 8,5 är att föredra.

1.6.2. **Apparatur**

All apparatur skall vara tillverkad av kemiskt inert material:

— Automatiskt utspädningssystem (till genomströmningstestet).

— Syremätare.

— Utrustning för bestämning av vattnets hårdhet.

— Lämplig apparatur för temperaturkontroll.

— pH-mätare.

1.6.3. **Testfisk**

Fiskarna skall vara friska och utan synliga missbildningar.

De arter som ska användas bör väljas på grundval av praktiska kriterier, t. ex. att de är lätt tillgängliga under hela året, enkla att hålla, lämpliga för testet, har en relativ känslighet, samt på grundval av ekonomiska, biologiska och ekologiska faktorer av betydelse. Nödvändigheten att kunna jämföra de data som erhålls och redan genomförd internationell harmonisering (hänvisning 1) bör också beaktas vid val av fiskart.

I tillägg 2 förtecknas de fiskarter som rekommenderas för detta test. Sebrafisk och regnbåge är att föredra.

1.6.3.1. *Förvaring*

Testfisk skall helst komma från ett enda bestånd och vara av ungefär samma längd och ålder. Fisken skall förvaras i minst 12 dagar under följande betingelser:

Belastning:

Anpassad efter systemet (cirkulation eller genomströmning) och fiskarterna.

Vatten:

Se punkt 1.6.1.2

Ljus:

12 — 16 timmars ljus per dag.

Koncentration av upplöst syre:

Minst 80 % av luftmättnadsvärdet.

Utfodring:

Dagligen eller tre gånger per vecka, sista gången 24 timmar innan testet inleds.

1.6.3.2. *Dödlighet*

Efter 48 timmars acklimatisering registreras dödligheten och följande kriterier tillämpas:

— Högre än 10 % av populationen på 7 dagar:

hela partiet kasseras.

— Mellan 5 och 10 % av populationen:

observationsperioden förlängs med ytterligare 7 dagar. Om inga fler dödsfall inträffar kan partiet accepteras, i annat fall kasseras det.

— Lägre än 5 % av populationen:

partiet kan accepteras.

1.6.4. **Tillvänjning**

All fisk skall i minst 7 dagar före testet exponeras för vatten av den kvalitet och temperatur som skall användas i testet.

1.6.5. **Testförfarande**

Före det slutliga testet kan ett inledande test göras för att fastställa vilka koncentrationer som skall användas i huvudtestet.

Förutom testserien inbegrips en kontrollgrupp som inte tillförs testämnet och, i vissa fall, en kontrollgrupp som tillförs tillsatsämnet

Beroende på testämnets fysiska och kemiska egenskaper skall ett statiskt test, ett semi-statiskt test eller ett genomströmningstest väljas så att kvalitetskriteriet uppfylls.

Fisken exponeras för testämnet enligt följande:

— Varaktighet: 96 timmar.

— Antal djur: Minst 7 per koncentration.

— Kar: Av passande storlek i förhållande till den rekommenderade belastningen.

— Belastning: För statisk och semistatiska test rekommenderas 1,0 g per liter som maximal belastning. För genomströmningssystem kan större belastning accepteras.

— Testkoncentrationer: Minst 5 koncentrationer med ett konstant inbördes förhållande av högst 2,2 som så långt det för täcker intervallet 0 — 100 % dödlighet.

— Vatten: Se 1.6.1.2

— Ljus: 12 — 16 timmar ljus per dag.

— Temperatur: Lämplig för arten (tillägg 2) men inom ± 1 °C i ett enskilt test.

— Koncentration av upplöst syre: Inte mindre än 60 % av luftmättnadsvärdet vid den valda temperaturen.

— Utfodring: Ingen.

Fisken besiktas efter de första 2–4 timmarna och minst var 24 timme. Fisk anses vara död om beröring av stjärtfenan inte framkallar någon reaktion och inga andningsrörelser kan iakttas. Död fisk avlägsnas när den upptäcks och dödsfall registreras.

Register förs över synliga abnormiteter (t. ex. förlust av jämvikten, ändrat simbeteende, andningsfunktion, pigmentering osv.).

Mätningar av pH, upplöst syre och temperatur skall göras dagligen.

Gränstest

Genom användning av förfarandena som beskrivs i denna testmetod kan ett gränstest utföras med 100 mg per liter för att konstatera om LC_{50} är större än denna koncentration.

Om ämnet är av sådan art att man inte kan erhålla en koncentration av 100 ml per liter i testvattnet utförs gränstestet vid ämnets mättnadskoncentration (eller den högsta koncentrationen vid vilken det bildas en stabil dispersion) i det använda mediet (se även 1.6.1.1).

Gränstestet utförs med 7-10 fiskar och en eller två kontrollgrupper av samma storlek. (Enligt binomialteorin är det vid användning av 10 fiskar 99,9 % säkerhet för att LC_{50} är större än den använda koncentrationen, om dödligheten är noll. Med 7, 8 eller 9 fiskar ger en dödlighet av noll 99 % säkerhet för att LC_{50} är större än den använda koncentrationen).

Om dödsfall sker måste en fullständig undersökning utföras. Eventuella subletala verkningar registreras.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

För var och en av de tidsperiod då observationer företas (efter 24, 48, 72 och 96 timmar) avbildas den procentuella dödligheten mot koncentrationen på logaritmisk sannolikhetspapper.

När så är möjligt och för varje observationstid skall LC_{50} och dess konfidensgränser (p = 0,05) uppskattas genom standardförfaranden. Dessa värden skall avrundas till en (eller högst två) signifikanta siffror (exempel på avrundning till två siffror: 170 för 173,5, 0,13 för 0,127, 1,2 för 1,21).

I de fall där koncentrations-procentresponskurvans lutning är för brant för att medge en beräkning av LC_{50} räcker det med en grafisk uppskattning av detta värde.

Om två på varandra följande koncentrationer med ett förhållande på 2,2 endast ger 0 och 100 % dödlighet, räcker dessa två värden för att ange inom vilket område LC_{50} ligger.

Om det framgår att det inte går att hålla testämnet stabilt eller homogent skall detta rapporteras och försiktighet skall iakttas vid tolkningen av resultaten.

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall om möjligt innehålla:

— Uppgifter om testfisken (vetenskapligt namn, stam, leverantör, eventuell förbehandling, storlek och antal som använts för varje koncentration).

— Källan till utspädningsvattnet och viktiga kemiska egenskaper (Ph, hårdhet, temperatur).

— För ämnen med låg vattenlöslighet anges metod att framställa stam- och testlösning.

— Koncentrationen av eventuella tillsatsämnen.

— En lista över de koncentrationer som använts och alla tillgängliga uppgifter om testämnets stabilitet vid koncentrationerna i testlösningen.

— Om kemiska analyser görs skall metoder och resultat rapporteras.

— Resultat från gränstest om sådant utförts.

— Skälen till valet av och detaljer om använt testförfarande (t. ex. statisk, semi-statisk, doseringstakt, genomströmningstakt, eventuell syrsättning, antal fiskar osv.).

— Beskrivning av testutrustningen.

— Ljusbetingelser.

— Testlösningens koncentration av upplöst syre, pH-värden och temperatur var 24 timme.

— Bevis på att kvalitetskriterierna har uppfyllts.

— Kumulativ dödlighet för varje koncentration och kontrollprov (eller kontroll med tillsatsämne om sådant behövs) vid de rekommenderade observationstiderna.

— Grafisk framställning av denna responskurva över koncentration/procent i slutet av testet.

— Om möjligt, LC_{50}-värden för varje rekommenderad observationstid (med 95 % konfidensgränser).

— Statistiska förfaranden som använts vid bestämning av LC_{50}-värdena.

— Om referensämne har använts skall erhållna resultat anges.

— Högsta testade koncentration som inte medför dödsfall inom testperioden.

— Lägsta testade koncentrationen som medför 100 % dödlighet inom testperioden.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, rådets beslut C(81) 30 slutligt och uppdaterat.

2. AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 juni 1985.

3. AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow Through methods – NFT 90-305 juni 1985.

4. ISO 7346/1, /2 och /3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of a substance to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – *Teleostei, Cyprinidae*). Del 1: Static method. Del 2: Semi-static method. Del 3: Flow-through method.

5. Eidgenössiches Departament des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmetoden - Del II 1974.

6. DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) och L (15).

7. JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

8. NEN 6506 – Water – Bepailing 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, del IV, 16 mars 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 Umweltsbundesamt zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. och Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

15. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., vol. 96, 1949, s. 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. II Bioassay methods for acute toxicity. Water Res. 1969, vol. 3, s. 793-821.

18. Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, s. 3-32.

19. Stephan, C. E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer och J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, s. 65-84.

20 Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. och Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

Tillägg 1

Rekonstituterat vatten

Exempel på lämpligt utspädningsvatten

Alla kemikalier skall vara av analytisk renhetsgrad.

Vattnet skall vara destillerat vatten av god kvalitet eller avjoniserat vatten med en ledningsförmåga på mindre än $5 \mu S cm^{-1}$.

Apparatur för destillering av vatten får inte innehålla några delar gjorda av koppar.

Stamlösningar

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (kalciumklorid dihydrat) Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	11,76 g
$MgSO_4.7H_2O$ (magnesiumsulfat heptahydrat): Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	4,93 g
$NaHCO_3$ (natriumvätekarbonat): Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	2,59 g
KCl (kaliumklorid): Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	0,23 g

Rekonstituerat utspädningsvatten

Blanda 25 ml av de fyra stamlösningarna med vatten så att 1 liter erhålls.

Syrsätt tills koncentrationen av upplöst syre är lika med luftmättnadsvärdet.

pH skall vara 7,8 ± 0,2.

Justera vid behov pH-värdet med NaOH (natriumhydroxid) eller HCl (saltsyra).

Det således framställda utspädningsvattnet sätts åt sidan i 12 timmar och skall inte syrsättas ytterligare.

Summan av Ca- och Mg-jonerna i denna lösning är 2,5 mmol per liter. Förhållandet mellan Ca- och Mg-jonerna är 4:1 och mellan Na- och K-jonerna 10:1. Den totala alkaliniteten hos denna lösning är 0,8 mmol per liter.

Avvikelser vid framställningen av utspädningsvattnet får inte ändra vattnets sammansättning eller egenskaper.

Tillägg 2

Fiskarter som rekommenderas till test

Rekommenderade arter	Rekommenderad temperaturintervall (°C)	Rekommenderad total längd på testdjur (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Sebrafisk	20—24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20—24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linné 1758) Karp	20—24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck och Schlegel 1850) Red killifish	20—24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20—24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Bluegill	20—24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Regnbågsforell	12—17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linné 1758) Guldfisk	20—24	6,0 ± 2,0

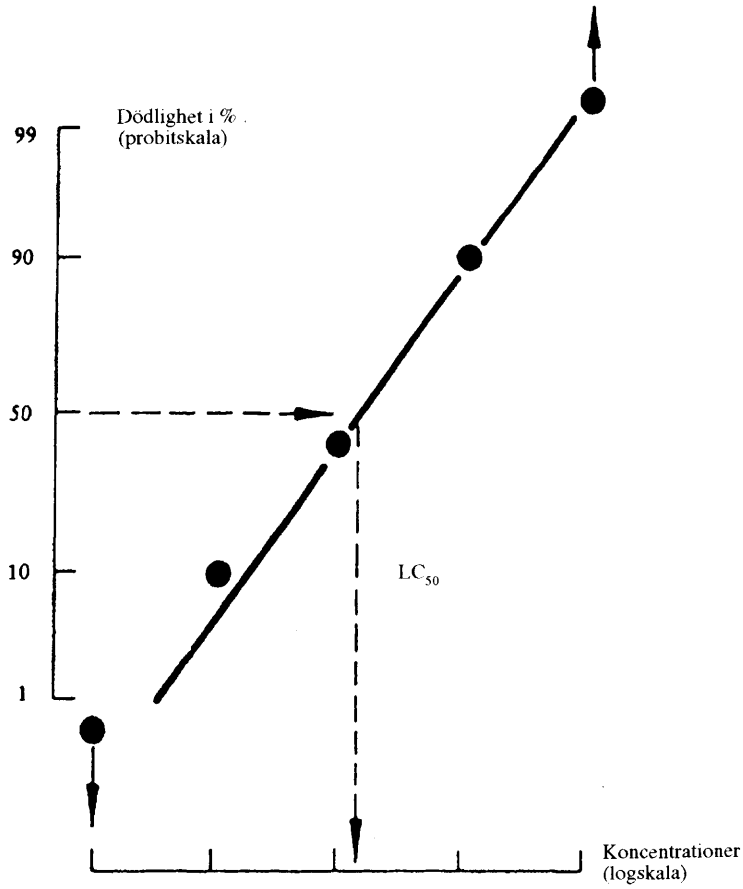
Odlingsbetingelser

Ovan angivna fiskar är lätta att odla och/eller är lätt tillgängliga året runt. De kan förädlas och odlas i fiskdammar eller i laboratorier under sjukdoms- och parasitkontrollerade betingelser så att testdjuren är friska och av känd härstamning. Dessa fiskar finns i många delar av världen.

Tillägg 3

Exempel på kurva över koncentration mot dödlighet

Exempel på bestämning av LC_{50} på log-probit-papper



C. 2. AKUT TOXICITET FÖR DAPHNIA

1. METOD

1.1. INLEDNING

Syftet med detta test är att bestämma ett ämnes effektiva genomsnittskoncentration (EC_{50}) för immobilisering av *Daphnia* i sötvatten Det värdefullt att känna till testämnets löslighet i vatten, ångtryck, kemiska stabilitet, dissociationskonstanter och bionedbrytbarhet innan testet påbörjas.

Vid planeringen och tolkningen av testresultaten skall hänsyn tas till andra uppgifter, t. ex. strukturformel, renhetsgrad, arten av och procenttalet signifikanta orenheter, förekomst och mängder av tillsatser och n-oktanol/vattendelningskoefficienten.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

De krav som ställ i direktivet på LC_{50} för *Daphnia* skall anses vara uppfyllda genom att EC_{50} bestäms enligt denna testmetod.

I detta test uttrycks akut toxicitet som den genomsnittliga effektiva koncentrationen (EC_{50}) för immobilisering. Det är den koncentration (uttryckt genom initiala värden) som medför att 50 % av *Daphnia* i en försöksgrupp dör inom loppet av en oavbruten exponeringsperiod som måste anges.

Immobilisering:

Djur som inte kan simma inom 15 sekunder efter en försiktig omrörning i testkärlet anses vara immobila.

Alla koncentrationer av testämnet anges i vikt per volym (milligram per liter). De kan också uttryckas som vikt per vikt (mg. kg^{-1}).

1.3. REFERENSÄMNEN

Ett referensämne kan användas för att visa att försöksarternas känslighet inte har ändrats signifikant under testbetingelserna i laboratoriet.

Resultaten från ett EEG-ringtest med fyra olika ämnen sammanfattas i tillägg 2.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Ett gränstest kan utföras med 100 mg per liter för att konstatera om EC_{50} är större än denna koncentration.

Daphnia utsätts för testämnet i vatten i en rad koncentrationer i 48 timmar. Om kortare testperiod används bör detta motiveras i försöksrapporten.

Under annars identiska testbetingelser i ett lämpligt koncentrationsintervall påverkas *Daphnias*$_{50}$ genomsnittliga simförmåga i olika grad av olika koncentrationer av ett testämne. Olika koncentrationer resulterar i olika procentandelar *Daphnia* som i slutet av testet inte längre kan simma. De koncentrationer som leder till 0 eller 100 % immobilisering avläses direkt vid observationerna under testet medan 48-timmars EC_{50} om möjligt bestäms genom beräkning.

Ett statiskt system används för denna metod vilket innebär att testlösningarna inte förnyas under exponeringsperioden.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Kvalitetskriterierna gäller för såväl gränstestet som den fullständiga testmetoden.

Immobiliseringen i kontrollgruppen får inte överstiga 10 % i slutet av testet.

Daphnia som ingår i testet i kontrollgrupperna får inte fångas upp av vattenytan.

Koncentrationen av upplöst syre i testbehållarna skall helst vara över 3 mg/l^{-1} under hela testet. Den får dock under inga omständigheter understiga 2 mg/l^{-1}.

Koncentrationer av testämnet skall ligga över 80 % av den initiala koncentrationen under hela testperioden.

För ämnen som är lättlösliga i testmediet och ger stabila lösningar, dvs. ämnen som inte i hög grad förångas, bryts ned, hydrolyseras eller adsorberas, kan startkoncentrationen antas vara lika med den nominella koncentrationen. Det skall bevisas att koncentrationen bibehållits under hela testet och att kvalitetskriterierna är uppfyllda.

För ämnen som är

i) svårlösliga i testmediet eller

ii) kan skapa stabila emulsioner eller dispersioner eller

iii) är ostabila i vattniga lösningar

skall det som värde för startkoncentrationen användas den koncentration som är uppmätt i lösningen (eller om detta inte är tekniskt möjligt, mätt i vattenkolonnen) vid testets inledning. Koncentrationen bestäms sedan jämvikt uppnåtts, men innan testorganismerna släpps i.

I alla dessa fall skall ytterligare mätningar göras under testets gång för att säkerställa att koncentrationen har bibehållits och att kvalitetskriterierna har varit uppfyllda.

pH-värdet får inte variera med mer än 1 enhet.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1 **Reagenser**

1.6.1.1. *Lösningar av testämnen*

Stamlösningar av erforderlig styrka framställs genom att testämnet upplöses i avjoniserat vatten eller vatten enligt 1.6.1.2

De valda testkoncentrationerna framställs genom utspädning av stamlösningen. Om höga koncentrationer testas kan ämnet lösas direkt i utspädningsvattnet.

Ämnen testas normalt endast upp till gränsen för löslighet. För vissa ämnen (t. ex. ämnen som är svårlösliga i vatten, som har ett högt P_{ow}-värde, eller som bildar en stabil dispersion och inte en riktig lösning i vatten) accepteras att det används en testkoncentration som är större än lösligheten för att säkerställa att den högsta upplösta/stabila koncentration har nåtts. Det är dock viktigt att denna koncentration inte på annat sätt förstör testmetoden (t. ex. bildandet av en hinna av ämnet på vattenytan som förhindrar syrsättning av vattnet, etc.).

Ultraljud, organiska lösningsmedel, emulgeringsmedel eller dispergeringsmedel kan användas för att framställa stamlösningar av ämnen som är svårlösliga i vatten och för att dispergera sådan ämnen i testmediet. Om tillsatsämnen används skall alla testkoncentrationer innehålla samma mängd tillsatsämnet och en extra kontrollgrupp skall användas som utsätts för samma koncentration av tillsatsämnet som används i testserien. Sådana tillsatsämnen används i lägsta möjliga koncentration och får aldrig vara större än 100 mg per liter i testmediet.

Testet skall göras utan justering av pH-värdet. Om det finns tecken på en markant förändring av pH-värdet rekommenderas att testet upprepas med pH-justering och att resultaten rapporteras. I detta fall skall pH-värdet i stamlösningen justeras efter pH-värdet i utspädningsvattnet, om det inte finns särskilda skäl som talar mot detta. HCl och NaOH är förstahandsvalen för detta ändamål. Denna pH-justering skall göras på ett sådant sätt att testämnets koncentration i stamlösningen inte ändras i någon signifikant grad. Om justeringen medför någon kemisk reaktion eller fysisk utfällning av testämnet skall detta rapporteras.

1.6.1.2. *Testvatten*

Rekonstituerat vatten används i detta test (se tillägg 1 och hänvisning 2: ISO 6341). För att undgå den nödvändiga acklimatiseringen före testet rekommenderas att odlingsvattnet håller samma kvalitet (pH-värde, hårdhet) som det vatten som används i testet.

1.6.2. **Apparatur**

Normal laboratorieapparatur och -utrustning skall användas. Utrustning som kommer i kontakt med testlösningarna skall helst vara helt tillverkad av glas:

— Syremätare (med mikroelektrod eller annan lämplig utrustning för mätning av upplöst syre i prover med låg volym).

— Lämplig apparatur för temperaturkontroll.

— pH-mätare.

— Utrustning för bestämning av vattnets hårdhet.

1.6.3. **Testorganism**

Helst skall *Daphnia magna* användas men även *Daphnia pulex* är tillåten. Testdjuren skall vara mindre än 24 timmar gamla i början av testet, odlade i laboratoriet, fria från uppenbara sjukdomar och med en känd historia (t. ex. odling — alla förbehandlingar osv.).

1.6.4. **Testförfarande**

Innan det slutliga testet görs kan ett inledande test göras för att fastställa vilka koncentrationer som skall användas i huvudtestet.

Utöver testserien inbegrips en kontrollgrupp som inte tillförs testämnet och, om det är lämpligt, en kontrollgrupp som tillförs tillsatsämnet

Daphnia exponeras för testämnet enligt beskrivningen nedan:

— *Varaktighet*: Minst 48 timmar.

— *Antal djur*: Minst 20 för varje koncentration, helst uppdelade i fyra partier om fem djur vardera eller två partier om 10.

— *Belastning*: För varje djur skall minst 2 ml testlösning tillhandahållas.

— *Testkoncentrationer*: Testlösningen skall framställas omedelbart innan *Daphnia* tillsätts, helst utan något annat lösningsmedel än vatten. Koncentrationerna framställs i en geometrisk serie med ett koncentrationsförhållande på 2,2. Tillräckligt många koncentrationer skall användas för att uppnå 0 och 100 % immobilisering efter 48 timmar och ett passande antal mellangrader av immobilisering skall testas tillsammans med kontrollgrupp för att möjliggöra en beräkning av 48-timmars EC_{50}.

— *Vatten*: Se 1.6.1.2

— *Ljus*: En cykel med ljus och mörker är valfritt.

— *Temperatur*: Testtemperaturen skall ligga mellan 18 och 22 °C och skall för var enskilt test hållas konstant inom ± 1,0 °C.

— *Syrsättning*: Testlösningarna skall inte syrsättas med luftgenombubbling.

— *Utfodring*: Ingen.

I slutet av testet mäts pH-värdet och syrekoncentrationen i kontrollgruppen och vid alla testkoncentrationer. pH-värdet i testlösningen skall inte ändras.

Flyktiga föreningar skall testas i helt fyllda och slutna behållare som är tillräckligt stora för att förhindra syrebrist.

Daphnia besiktas efter minst 24 timmars exponering och åter efter 48 timmar.

Gränstest

Genom användning av förfarandena som beskrivs i denna testmetod kan ett gränstest utföras med 100 mg per liter för att konstatera om EC_{50} är större än denna koncentration.

Om ämnet är av sådan art att man inte kan erhålla en koncentration av 100 mg per liter i testvattnet utförs gränstestet vid ämnets mättnadskoncentration (eller den högsta koncentrationen vid vilken det bildas en stabil dispersion) i det använda mediet (se även 1.6.1.1).

Gränstestet utförs med 20 *Daphnia* uppdelade i två eller fyra grupper, samt kontrollgrupper av samma storlek. Om immobilisering sker måste en fullständig undersökning utföras.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

För var och en av de tidsperioder då observationer företas (efter 24 och 48 timmar) avbildas den procentuella dödligheten mot koncentrationen på logaritmiskt sannolikhetspapper.

När så är möjligt och för varje observationstid skall EC_{50} och dess konfidensgränser (p = 0,05) uppskattas genom standardförfaranden. Dessa värden skall avrundas till en (eller högst två) signifikanta siffror (exempel på avrundning till två siffror: 170 för 173,5, 0,13 för 0,127, 1,2 för 1,21).

I de fall där koncentrations-procentresponskurvans lutning är för brant för att medge en beräkning av EC_{50} räcker det med en grafisk uppskattning av detta värde.

Om två på varandra följande koncentrationer med ett förhållande på 2,2 endast ger 0 och 100 % immobilisering, räcker dessa två värden för att ange inom vilket område EC_{50} ligger.

Om det framgår att det inte går att hålla testämnet stabilt eller homogent skall detta rapporteras och försiktighet skall iakttas vid tolkningen av resultaten.

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall om möjligt innehålla:

— Uppgifter om testorganismen (vetenskapligt namn, stam, leverantör, eventuell förbehandling, storlek och antal som använts för varje koncentration).

— Källan till utspädningsvattnet och viktiga kemiska egenskaper (pH, hårdhet, temperatur).

— För ämnen med låg vattenlöslighet anges metod att framställa stam- och testlösning.

— Koncentrationen av eventuella tillsatsämnen.

— En lista över de koncentrationer som använts och alla tillgängliga uppgifter om testämnets stabilitet vid koncentrationerna i testlösningen.

— Om kemiska analyser görs skall metoder och resultat rapporteras.

— Resultat från gränstest om sådant utförts.

— Beskrivning av testutrustningen.

— Ljusbetingelser.

— Testlösningens koncentration av upplöst syre, pH-värden och temperatur i testlösningarna.

— Bevis på att kvalitetskriterierna har uppfyllts.

— En tabell över kumulativ dödlighet för varje koncentration och kontrollprov (eller kontroll med tillsatsämne om sådant behövs) vid de rekommenderade observationstiderna (24 och 48 timmar).

— Grafisk framställning av denna responskurva över koncentration/procent i slutet av testet.

— Om möjligt, EC_{50}-värden för varje rekommenderad observationstid (med 95 % konfidensgränser).

— Statistiska förfaranden som använts vid bestämning av EC_{50}-värdena.

— Om referensämne har använts skall erhållna resultat anges.

— Högsta testade koncentration som inte medför dödsfall inom testperioden.

— Lägsta testade koncentrationen som medför 100 % dödlighet inom testperioden.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, rådets beslut C(81) 30 slutligt och uppdaterat.

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 (januari 1983).

4. Verfahrensvorschlag des Umweltsbundesamt zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. och Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

5. DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) och L (11).

6. Finney, D. J. Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, U. K., 1978.

7. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharmacol, and Exper. Therap., 1949, vol. 96, s. 99-113.

8. Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res. 1969, vol. 3, s. 793-821.

9. Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, s. 3-32.

10. Stephan, C. E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer och J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM, 1977, STP 634, s. 65-84.

11. Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. och Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

Tillägg

Rekonstituerat vatten

Exempel på lämpligt utspädningsvatten (enligt ISO 6341)

Alla kemikalier skall vara av analytisk renhetsgrad.

Vattnet skall vara destillerat vatten av god kvalitet eller avjoniserat vatten med en ledningsförmåga på mindre än $5\mu Scm^{-1}$.

Vattendestillationsapparaten får inte innehålla delar av koppar.

Stamlösningar

$CaCl_2.2\ H_2O$ (kalciumklorid-dihydrat) Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	11,76 g
$MgSO_4.7\ H_2O$ (magnesiumsulfat-heptahydrat): Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	4,93 g
$NaHCO_3$ (natriumhydrogenkarbonat): Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	2,59 g
KCl (kaliumklorid): Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	0,23 g

Rekonstituerat utspädningsvatten

Blanda 25 ml av de fyra stamlösningarna med vatten så att 1 liter erhålls.

Syrsätt tills koncentrationen av upplöst syre är lika med luftmättnadsvärdet.

pH-värdet skall vara 7,8 ± 0,2.

Justera vid behov pH-värdet med NaOH (natriumhydroxid) eller HCl (saltsyra).

Det således framställda utspädningsvattnet sätts åt sidan i ungefär 12 timmar och skall inte syrsättas ytterligare.

Summan av Ca- och Mg-jonerna i denna lösning är 2,5 mmol per liter. Förhållandet mellan Ca- och Mg-jonerna är 4:1 och mellan Na- och K-jonerna 10:1. Den totala alkaliniteten hos denna lösning är 0,8 mmol per liter.

Avvikelser vid framställningen av utspädningsvattnet får inte ändra vattnets sammansättning eller egenskaper.

Tillägg 2

Sammanfattning av resultaten av en EEG-ringtest utförd 1978 (även angivet i hänvisning 2).

Anmärkning: syftet med detta ringtest var att bestämma *24 timmars* EC_{50}.

Använda ämnen:

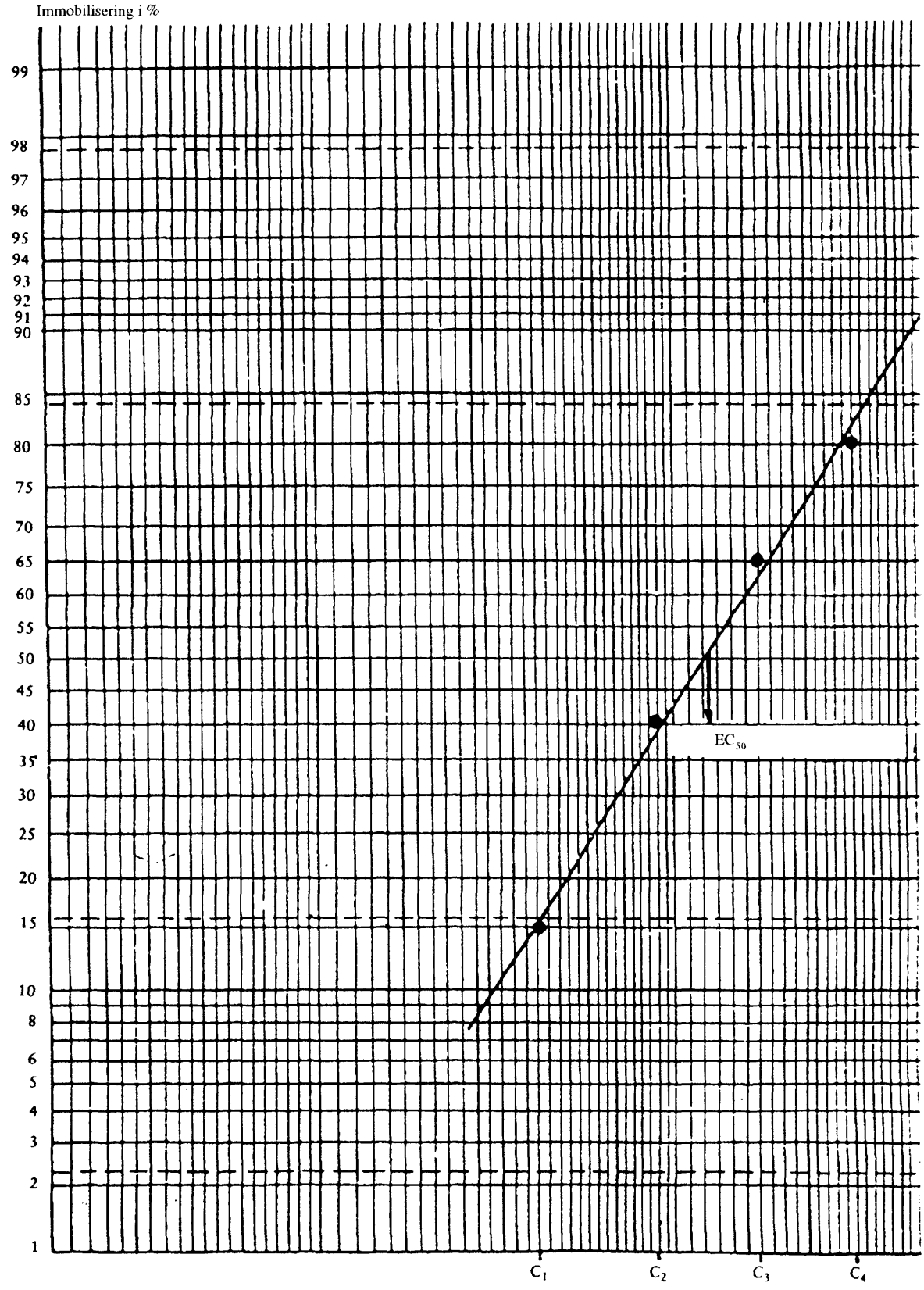
1. Kaliumdikromat
2. Tetrapropylbensensulfonat
3. Natriumtetrapropylbensensulfonat
4. Kaliumtriklor-2,4,5-fenoxyacetat

Ämne	Antal deltagande laboratorier	Antal resultat för beräkning	EC_{50}-24-timmar mg/l medel
1	46	129	1,5
2	36	108	27,0
3	31	84	27,0
4	32	72	770,0

Tillägg 3

Exempel på kurva över koncentration mot immobiliseringsprocent

Exempel på bestämning av EC_{50} på log-probit-papper



C.3. TEST AV TILLVÄXTHÄMNING PÅ ALGER

1. METOD

1.1. INLEDNING

Syftet med denna test är att bestämma ett ämnes verkningar på encelliga grönalgarters tillväxt. Vid relativt kortvariga (72 timmar) tester kan verkningarna över flera generationer utvärderas. Denna metod kan justeras så att den kan användas i samband med flera encelliga algarter varvid en beskrivning av den använda metoden måste anges tillsammans med testrapporten.

Denna metod är enklast att använda för vattenlösliga ämnen som under testbetingelserna sannolikt kommer att förbli i vattnet.

Metoden kan användas för ämnen som inte har direkt inverkan på mätningen av algtillväxt.

Det är önskvärt att innan testet inleds ha så mycket information som möjligt om ämnets löslighet i vatten, ångtryck, kemiska stabilitet, dissociationskonstanter och nedbrytbarhet.

Övrig information (t. ex. strukturformel, renhetsgrad, art och procent av betydande orenheter, närvaro och mängd av tillsatsämnen samt n-oktanol/vatten-fördelningskoefficient) bör beaktas både vid planeringen av testet och vid tolkning av resultaten.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Cellkoncentration: antalet celler per milliliter.

Tillväxt: förökningen av cellkoncentrationen under testperioden.

Tillväxttakt: förökningen av cellkoncentrationen per tidsenhet.

I denna metod avses med EC_{50} den testämneskoncentration som medför en 50-procentig reduktion av antingen tillväxten (E_bC_{50}) eller tillväxttakten (E_rC_{50}) i förhållande till kontrollproven.

I denna metod avses med NOEC (no observed effect concentration) den högsta testkoncentration där de uppmätta koncentrationerna inte visar någon betydande tillväxthämning i förhållande till kontrollvärdet.

Alla koncentrationer av testämnet anges i vikt per volym (milligram per liter). De kan också uttryckas som vikt per vikt (mg. kg^{-1}).

1.3. REFERENSÄMNEN

En referensämne kan användas för att påvisa att testartens känslighet inte har ändrats väsentligt under försöksbetingelserna i laboratoriet.

Om en referensämne används bör resultaten anges i testrapporten. Kaliumdikromat kan användas som referensämne, men dess färg kan påverka den ljuskvalitet och intensitet som är tillgängligt för cellerna och även spektrofotomeriska bestämningar om sådana används. Kaliumdikromat har använts i en internationell interlaboratorietest (se hänvisning 3 och tillägg 2).

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Ett gränstest kan utföras med 100 mg per liter för att konstatera att EC_{50} är större än denna koncentration.

Kulturer av utvalda grönalger med expotentiell tillväxt exponeras för olika koncentrationer av testämnet över flera generationer under väl definierade testbetingelser.

Testlösningarna inkuberas i 72 timmar och under denna period mäts celltätheten minst var 24:e timme Tillväxthämningen i förhållande till en kontrollkultur bestäms.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Kvalitetskriterierna gäller för såväl gränstestet som den fullständiga testmetoden.

Cellkoncentrationen i kontrollkulturerna skall ha ökats med en faktor på minst 16 inom tre dagar.

Koncentrationer av testämnet skall ligga över 80 % av startkoncentrationen under hela testperioden.

För ämnen som är lättlösliga i testmediet och ger stabila lösningar, dvs. ämnen som inte i hög grad förångas, bryts ned, hydrolyseras eller adsorberas, kan startkoncentrationen antas vara lika med den nominella koncentrationen. Det skall bevisas att koncentrationen bibehållits under hela testet och att kvalitetskriterierna är uppfyllda.

För ämnen som är

i) svårlösliga i testmediet eller

ii) kan skapa stabila emulsioner eller dispersioner eller

iii) är ostabila i vattniga lösningar

skall det som värde för startkoncentrationen användas den koncentration som är uppmätt vid testets inledning. Koncentrationen bestäms sedan jämvikt uppnåtts.

I alla dessa fall skall ytterligare mätningar göras under testets gång för att säkerställa att koncentrationen har bibehållits och att kvalitetskriterierna har varit uppfyllda.

Det erkänns att en väsentlig mängd testämne kommer att finnas i algbiomassan vid testets avslutning. För att bevisa överensstämmelse med ovan nämnda kvalitetskriterier bör både den del av testämnet som finns i biomassan, och den del som finns i lösningen (eller om det inte är tekniskt möjligt, mätt i vattenkolonnen) beaktas. Eftersom det kan vålla betydliga tekniska problem att bestämma testämneskoncentrationen i algbiomassan kan överensstämmelse med kvalitetskriterierna uppfyllas genom att använda en testbehållare med den högsta möjliga ämneskoncentrationen men utan alger, i vilken koncentrationen i lösningen (eller om det inte är tekniskt möjligt, i vattenkolonnen) mäts vid testperiodens början och slut.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Reagenser**

1.6.1.1. *Losningar av testämnen*

Stamlösningar av erforderlig styrka framställs genom att testämnet upplöses i avjoniserat vatten eller vatten enligt 1.6.1.2.

De valda testkoncentrationerna framställs genom tillsättning av en passande mängd testämne till algförkulturer (se tillägg 1). Ämnen testas normalt endast upp till gränsen för löslighet. För vissa ämnen (t. ex. ämnen som är svårlösliga i vatten, som har ett högt P_{ow}-värde, eller som bildar en stabil dispersion och inte en riktig upplösning) accepteras att det används en testkoncentration som är större än lösligheten för att säkerställa att den högsta upplösta/stabila koncentration har nåtts. Det är dock viktigt att denna koncentration inte på annat sätt förstör testmetoden (t. ex. bildandet av en hinna av ämnet på vattenytan som förhindrar syrsättning av vattnet, etc.).

Ultraljud, organiska lösningsmedel, emulgeringsmedel eller dispergeringsmedel kan användas för att framställa stamlösningar av ämnen som är svårlösliga i vatten och för att dispergera sådana ämnen i testmediet. Om tillsatsämnen används skall alla testkoncentrationer innehålla samma mängd av tillsatsämnet och en extra kontrollgrupp skall användas som utsätts för samma koncentration av tillsatsämnet som används i testserien. Sådana tillsatsämnen används i lägsta möjliga koncentration och får aldrig vara större än 100 mg per liter i testmediet.

Testet skall göras utan justering av pH-värdet. Om det finns tecken på en markant förändring av pH-värdet rekommenderas att testet upprepas med pH-justering och att resultaten rapporteras. I detta fall skall pH-värdet i stamlösningen justeras efter pH-värdet i utspädningsvattnet, om det inte finns särskilda skäl som talar mot detta. HCl och NaOH är förstahandsvalen för detta ändamål. Denna pH-justering skall göras på ett sådant sätt att testämnets koncentration i stamlösningen inte ändras i någon signifikant grad. Om justeringen medför någon kemisk reaktion eller fysisk utfällning av testämnet skall detta rapporteras.

1.6.1.2. *Testmedium*

Vattnet skall vara destillerat vatten av god kvalitet och avjoniserat vatten med en ledningsförmåga på mindre än 5 μScm^{-1}. Vattendestillationsapparatur får inte innehålla delar av koppar.

Följande medium rekommenderas:

Fyra stamlösningar framställs i enlighet med nedanstående tabell. Stamlösningarna steriliseras genom autoklavering eller membranfiltrering, varefter de förvaras vid 4 °C skyddade mot ljus. Stamlösning nummer 4 skall steriliseras genom membranfiltrering. Testlösningarnas slutliga näringsämneskoncentration uppnås genom förtunning av stamlösningarna.

Näringsämne	Koncentration i stamlösningen		Slutkoncentration i stamlösningen	
Stamlösning 1: makronäringsämnen				
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
Stamlösning 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
Stamlösning 3: spårämnen				
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
Stamlösning 4: $NaHCO_3$				
$NaHCO_3$	50	g/l	50	mg/l

Efter ekvilibrering med luft är detta mediums pH ca 8.

1.6.2. **Apparatur**

— Normal laboratorieutrustning.

— Testkolvar av passande volym (250 ml koniska flaskor är t. ex. lämpligt när testämnets volym är 100 ml). Alla testkolvar skall vara identiska, både vad beträffar material och dimensioner.

— Odlingsapparatur: ett skåp eller en kammare med en temperatur av 21–25 °C med en tolerans av ± 2 °C och med oavbruten enhetlig belysning i spektralområdet 400–700 nm. Växtbetingelserna, inbegripet ljusstyrkan, anses tillfredsställande om kontrollkulturer uppnår den rekommenderade tillväxttakten.

En ljusintensitet i området 60–120 $\mu E/m^{-2} \cdot s^{-1}$ (35 till 70 x 10^{18} fotonerm.$^{-2}$. s^{-1}) rekommenderas när den mäts i området 400–700 nm med en lämplig mottagare. För ljusmätningsinstrument kalibrerade i lux är den motsvarande lämpliga nivån 6 000–10 000 lux.

Denna ljusintensitet kan uppnås med hjälp av 4-7 universella fluorescerande vita lampor (ljustemperatur på ca 4 300 K) placerade på ett avstånd av 0,35 m från algkulturen.

— Mätningar av cellkoncentrationen skall göras genom direkt räkning av levande celler, t. ex. med hjälp av ett mikroskop med räkningskammare. Andra metoder (fotometri, turbidimetri, m. fl.) kan dock användas om de är tillräckligt känsliga och visar sig väl korrelerade med cellkoncentrationen.

1.6.3. **Testorganismer**

Det föreslås att de grönalger som används är av en snabbväxande art som är lämplig för odling och test. Följande arter anses lämpliga:

— *Selenastrum capricornutum*, t. ex. ATCC 22662 eller CCAP 278/4,

— *Scenedesmus subspicatus*, t. ex. 86.81 SAG

Anmärkning:

ATCC = American Type Culture Collection (USA).
CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (UK)
SAG = Collection of algal culture (Göttingen, Tyskland)

Om andra arter används måste stammen anges.

1.6.4. **Testets utformning**

Genom inledande tester bestäms det koncentrationsområde där verkningar kan förväntas inträda.

De två mätningarna av växten (biomassa och tillväxttakt) kan leda till vitt skilda resultat för tillväxthämning. Båda skall användas i de inledande testerna så att det säkerställs att både E_bC_{50} och E_rC_{50} kan värderas utifrån den geometriska serie som väljs för koncentrationerna.

Cellkoncentrationen vid försökets inledning

Det rekommenderas att den initiala cellkoncentrationen i testkulturerna är ca 10^4 celler/ml för *Selenastrum capricornutum* och *Scenedesmus subspicatus*. Om andra arter används skall biomassan vara jämförbar.

Testämnekoncentrationer

För testet används minst fem koncentrationer som bildar en geometrisk serie med en koncentration av högst 2,2 väljas ut. Den lägsta koncentrationen bör inte ha några synbara verkningar på algens tillväxt. Den högsta koncentration som testas bör hämma tillväxten med minst 50 % i förhållande till kontrollkulturen och helst stoppa tillväxten helt.

Replikater och kontrollkoncentrationer

Testets utformning bör inbegripa tre replikater vid varje testkoncentrationsnivå. Tre kontrollkulturer utan testämne skall användas och vid behov, skall även tre kontrollkulturer som innehåller tillsatsämnet användas. Om det finns rimliga skäl kan testets utformning ändras så att antalet koncentrationer ökas och antalet replikater per koncentration minskas.

Testförfarande

Testkulturer framställs med den önskade testämneskoncentrationen och den önskade mängd alginokulat genom tillsättning av stamlösning av testämnet till en passande mängd algförkultur (se tillägg 1).

Testkolvarna skakas och placeras i odlingsapparaturen. Algcellerna hålls i suspension genom skakning, omrörning eller genombubbling med luft så att det blir bättre luftväxling och mindre pH-variationer i testlösningarna. Kulturerna förvara si en temperatur mellan 21 och 25 °C som hålls konstant inom ± 2 °C.

Cellkoncentrationen i varje kolv bestäms minst tre gånger nämligen 24, 48 och 72 timmar efter inledning av försöket. När cellkoncentrationen mäts på annat sätt än genom direkt räkning används filtrerat algmedium med den ifrågavarande testämneskoncentrationen för bestämning av bakgrundsvärden.

pH mäts vid försökets inledning och efter 72 timmar.

Kontrollkulturernas pH får normalt inte avvika med mer än 1,5 under försöket.

Test av flyktiga ämnen

Det finns ännu ingen allmänt erkänd metod för test av flyktiga ämnen. Om man vet att ett ämne har en tendens att förångas kan man använda slutna testkolvar med ökat luftutrymme ovanför vätskan. Möjligheten av brist på CO_2 bör beaktas vid beräkning detta extra luftutrymme. Förslag på variationer av denna metod har lagts fram (se hänvisning 4).

Man bör försöka att bestämma den mängd ämne som återstår i lösningar, varvid yttersta försiktighet bör iakttas vid tolkning av resultaten av tester med flyktiga kemikalier i ett slutet system.

Gränstest

Genom användning av förfarandena som beskrivs i denna testmetod kan ett gränstest utföras med 100 mg per liter för att konstatera om LC_{50} är större än denna koncentration.

Om ämnet är av sådan art att man inte kan erhålla en koncentration av 100 ml per liter i testvattnet utförs gränstestet vid ämnets mättnadskoncentration (eller den högsta koncentrationen vid vilken det bildas en stabil dispersion) i det använda mediet (se även 1.6.1.1).

Gränstestet utförs minst som en tredubbelbestämning och med kontrollkulturer av samma storlek. Både mätning av växten (biomassa och tillväxttakt) används i gränstestet.

Om biomassan eller tillväxttakten är minst 25 % lägre i gränstestet än i kontrollkulturen skall en fullständig undersökning utföras.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

De uppmätta cellkoncentrationerna i testkulturerna och kontrollkulturerna skall ställas upp i tabellform tillsammans med koncentrationerna av testämnena och tidpunkterna för mätningarna. Medelvärdet av cellkoncentrationen för varje testämneskoncentration och för kontrollkulturerna ritas in mot tiden (0–72 timmar) så att växtkurvor erhålls.

För bestämning av förhållandet mellan koncentration och verkan bör följande två metoder användas. Vissa ämnen kan stimulera tillväxt vid låga koncentrationer. Endast datapunkter som anger att hämningen är mellan 0 och 100 % skall beaktas.

2.1. JÄMFÖRELSE AV AREALER UNDER VÄXTKURVORNA

Arealen mellan växtkurvorna och den horisontella linjen $N = N_0$ kan beräknas efter denna formel:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \ldots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

där:

A = areal

N_0 = nominellt antal celler per ml vid tidpunkten t_0 (inledningen av testet)

N_1 = uppmätt antal celler vid tidpunkten t_1

N_n = uppmätt antal celler vid tidpunkten t_n

t_1 = tidpunkt för första mätning efter testets inledning

t_n = tidpunkt för n^{de} mätning efter testets inledning

n = antal mätningar gjorda efter inledning av testet.

Den procentuella hämning av celltillväxten för varje testkoncentration (I_A) beräknas efter följande formel:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

där

A_c = arealen mellan växtkurvan för kontrollkulturen och den horisontella linjen $N = N_0$.

A_t = arealen mellan växtkurvan vid koncentrationen t och den horisontella linjen $N = N_0$.

I_A-värdena avbildas på semilogaritmiskt papper eller semilogaritmiskt probitpapper mot motsvarande koncentrationer. Om probitpapper används dras den bästa räta linjen, antingen med ögonmått eller genom regressionsberäkning.

EC_{50}-värde beräknas från regressionslinjen genom att läsa av koncentrationen som motsvarar 50 % hämning (I_A = 50 %). Som en entydig beteckning för detta värde föreslås att man i samband med denna beräkningsmetod använder symbolen E_bC_{50}. Det är viktigt att E_bC_{50} anges med lämplig exponeringsperiod, t. ex. E_bC_{50} (0 – 72 h).

2.2. JÄMFÖRELSE AV TILLVÄXTTAKT

Den genomsnittliga specifika tillväxttakten (μ) för kulturer med exponentiell tillväxt kan beräknas som:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

där t_0 är tiden vid testets inledning.

Alternativt kan den genomsnittliga specifika tillväxttakten för varje tillväxttakt härledas av regressionslinjens lutning i en avbildning av ln N mot tiden.

Den procentuella reduktionen av den genomsnittliga tillväxttakten för varje testämnekoncentration ($I\mu t$) beräknas efter följande formel:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

där

μ_c = genomsnittliga tillväxttakten för kontrollkulturen.

μ_t = specifika genomsnittliga tillväxttakten för testkoncentration

Den procentuella reduktionen av den genomsnittliga tillväxttakten för varje testämnekoncentration jämfört med kontrollvärdena avbildas mot logaritmen till koncentrationen. Deras EC_{50} kan avläsas av den därvid framkomna grafen. Som en entydig beteckning för det EC_{50}-värde som beräknas med denna metod föreslås att man använder symbolen E_rC_{50}. Tidpunkterna för mätningarna skall anges. Om t. ex. värdet gäller observationstidpunkterna 0 och 72 timmar blir symbolen E_rC_{50} (0–72 h).

Obs.: Tillväxttakten är en logaritmisk term, och små ändringar i tillväxttakten kan medföra stora ändringar i biomassan. E_bC och E_rC är därför inte numeriskt jämförbara värden.

2.3. BERÄKNING AV NOEC-VÄRDEN

Den koncentration där man inte kan iaktta någon verkan (NOEC-värden) bestäms genom en lämplig statistisk metod för jämförelse av flera prover (t. ex. variationsanalys eller Dunnetts test), som används på de enskilda värdena av arealerna under växtkurvorna A (se 2.1) eller av de specifika tillväxttakterna μ (se 2.2).

3. RAPPORTERING

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Testämne: Data för kemisk identifiering.

— Testorganismer: Härkomst, laboratoriekultur, stamnummer, odlingsmetod.

— Testbetingelser:

  — Datum för inledning och avslutning av testet samt testets varaktighet.

  — Temperatur.

  — Mediets sammansättning.

  — Odlingsapparatur.

  — pH-värde av lösningar vid början och slutet av testet (om pH-värdet avviker med mer än 1,5 enheter måste orsaken till detta anges).

  — Använd vehikel och metod för lösning av testämnet samt vehikelns koncentration i testlösningen.

  — Ljusintensitet och kvalitet.

  — Testade koncentrationer (uppmätta eller nominella).

— Resultat:

  — Cellkoncentration för varje kolv vid varje mättidpunkt och metod för mätning av cellkoncentration.

  — Genomsnittligt värde av cellkoncentrationer.

  — Tillväxtkurvor.

  — Grafisk framställning av förhållandet mellan koncentration och verkan.

  — EC-värde och beräkningsmetod.

  — NOEC.

  — Andra observerade verkningar.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guidelines 201*, rådets beslut C(81) 30 slutlig.

2. Umweltsbundesamt, Berling, 1984, Verfahrensvorschalg "Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*", i: 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.

Tillägg 1

Exempel på en metod för odling av alger

Allmänna kommentarer

Syftet med odling på grundval av nedanstående metoder är att framställa algkulturer för toxicitetstest.

Lämpliga metoder används för att säkerställa att algkulturerna inte infekteras med bakterier (ISO 4833). Axeniska kulturer kan under vissa omständigheter vara önskvärda men det är väsentligt att kulturerna uteslutande består av alger.

Alla operationer skall företas under sterila förhållanden för att undvika förorening med bakterier eller med andra alger. Kontaminerade kulturer kasseras.

Metoder för framställning av algkulturer

Framställning av näringslösningar (medier)

Substratet kan framställas genom förtunning av koncentrerade näringsämneslösningar. För fasta substrater tillsätts 0,8 % agar. Endast sterila substrat används. Autoklavering kan leda till förlust av NH_3.

Stamkultur

Stamkulturerna är små algkulturer som regelbundet överförs till ett friskt medium och som används som utgångstestmaterial. Om kulturerna inte används regelbundet stryks de ut på böjda agarrör. De överförs till ett färskt medium minst var annan månad.

Stamkulturerna odlas i koniska kolvar med det lämpliga mediet (volymen ca 100 ml). När algerna inkuberas vid 20 °C i konstant ljus krävs veckovis överföring.

Under överföringen avsätts en viss mängd "gammal" kultur med sterila pipetter i en kolv med färskt medium så att initialkoncentrationen i fråga om de snabbväxande arterna är ca 100 gånger mindre än i den gamla kulturen.

En arts tillväxttakt kan bestämmas utifrån tillväxtkurvan. Om denna är känd är det möjligt att se vid vilken täthet kulturen skall överföras till det nya mediet. Detta måste göras innan kulturen når dödfasen.

Förkultur

Avsikten med förkulturen är att få en mängd alger som är lämpliga för inokulering av testkulturer. Förkulturen inkuberas under testbetingelser och används medan den fortfarande växer exponentiellt, normalt efter en inkubationsperiod på omkring tre dagar. Om algkulturerna innehåller missbildade eller abnorma celler skall de slängas.

Tillägg 2

ISO 8692 – Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum* rapporterar följande resultat för ett test av kaliumdikromat med 16 deltagande laboratorier:

	Medel (mg/l)	Område (mg/l)
E_rC_{50} (0–72 h)	0,84	0,60 till 1,03
E_bC_{50} (0–72 h)	0,53	0,20 till 0,75

C. 4. BESTÄMNING AV "LÄTT" BIONEDBRYTBARHET

DEL I. ALLMÄNNA PRINCIPER

I.1. INLEDNING

Sex metoder för screening av kemikalier för lätt bionedbrytning i ett aerobt vattenmedium beskrivs:

a) Eliminering av upplöst organiskt kol (DOC) (Metod C.4-A).

b) Modifierat OECD-screeningtest – eliminering av DOC (Metod C.4-B).

c) Koldioxid (CO_2) utvärdering (Modifierat Sturmtest) (Metod C.4-C).

d) Manometrisk respiration (Metod C.4-D)

e) Closed Bottle Test (Metod C.4-E).

f) MITI (Ministry of International Trade and Industry – Japan) (Metod C.4-F).

Del 1 innehåller allmänna och generella kommentarer till alla sex tester. I del II-VII finns det som är specifikt för de enskilda testerna. Tilläggen innehåller definitioner, formler och vägledande upplysningar.

1988 genomförde OECD ett ringtest som visade att metoderna ger inbördes överensstämmande resultat. En bestämd metod kan dock föredras allt efter det undersökta ämnets fysiska egenskaper.

I.2. VAL AV METOD

För att kunna välja den lämpligaste metoden är det viktigt att känna till kemikaliens löslighet, ångtryck och adsorptionsegenskaper. Den kemiska strukturen eller formeln bör vara känd för att kunna beräkna teoretiska värden och kontrollera uppmätta värden av parametrar, t. ex. ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC och COD (se bilagorna 1 och 2).

Testkemikalier som är lösliga i vatten med 100 mg/liter kan utvärderas genom samtliga metoder, under förutsättning att de är icke-flyktiga och icke adsorberande. Av tabell 1 framgår vilka metoder som är lämpliga för kemikalier som är svårlösliga i vatten, flyktiga eller adsorberande. I bilaga I beskrivs hur man skall göra med kemikalier som är svårupplösliga i vatten och flyktiga kemikalier. Moderat flyktiga kemiska ämnen kan testas genom DOC elimineringsmetoden om det finns tillräckligt med luftrum i testkärlet (som skall stängas på lämpligt sätt). I detta fall måste en abiotisk kontroll användas som tillåter eventuell fysisk förlust.

Tabell 1: Tillämpning av testmetoder

Test	Analytisk metod	Lämplighet för ämnen som är		
		svårlösliga	flyktiga	adsorberande
DOC-eliminering	Upplöst organiskt kol	—	—	+/-
Mod. OECD DOC-elim.	Upplöst organiskt kol	—	—	+/-
CO_2 utvärdering	Respirometri: CO_2 bedömning	+	—	+
Manometrisk respirometri	Manometrisk respirometri: syreförbrukning	+	+/-	+
Closed bottle	Respirometri: upplöst syre	+/-	+	+
MITI	Respirometri: syreförbrukning	+	+/-	+

Uppgifter om de relativa proportionerna av testmaterialets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de erhållna resultaten, särskilt om resultaten är låga eller marginella.

Uppgifter om testkemikaliens toxicitet för bakterier (bilaga IV) kan vara till nytta vid valet av lämpliga testkoncentrationer och vara avgörande vid tolkningen av låga bionedbrytbarhetsvärden.

I.3. REFERENSÄMNEN

För att kontrollera förfarandet används referensämnen som uppfyller kriterierna för lätt bionedbrytbarhet och som testas i en separat kolv parallellt med de övriga proverna.

Anilin (färskt destillerat), natriumacetat och natriumbensoat är lämpliga kemikalier. Alla dessa referenskemikalier bryts ned vid dessa metoder även när inget inokulat tillsätts.

Det har föreslagits att man borde söka efter en referenskemikalie som är lätt nedbrytbar men som kräver tillsättning av inokulat. Kaliumhydrogenftalat har föreslagits men det behövs mer bevis innan detta ämne kan godtas som ett referensämne.

I metoder som baseras på respirometri kan kvävehaltiga föreningar påverka syreupptagningen på grund av nitrifikation. (se bilagor II och V).

I.4. TESTMETODSPRINCIP

Testämnet upplöses eller uppslammas i ett oorganiskt testmedium, inokuleras och inkuberas under aeroba förhållanden i mörker eller diffust ljus. Den del av DOC i lösningen som stammar från inokulat skall vara så lågt som möjligt i jämförelse med den del som stammar från testämnet. Man skall ta hänsyn till inokulatets endogena aktiviteter genom att köra parallella blindprov med inokulat men utan testämne i lösningen, även om cellernas endogena aktivitet under närvaro av ämnet inte exakt motsvara denna i den endogena kontrollen. Ett referensämne används parallellt för att kontrollera hur förfarandena fungerar.

I allmänhet följs nedbrytning genom bestämning av parametrar, såsom DOC, CO_2-produktion och syreupptagning, och mätningar görs tillräckligt ofta för att möjliggöra identifiering av början och slutet av bionedbrytningen. Mätningarna görs kontinuerligt med automatiska respirometrer. Under tiden mäts både DOC och en annan parameter, men detta sker normalt endast i början och slutet av testet. Specifika kemiska analyser kan också användas för att bedöma primär nedbrytning av testämnet, och för bestämning av koncentrationen av eventuella mellanprodukter (obligatoriskt i MITI-testet).

Testet vara normalt i 28 dagar. När bionedbrytningskurvan har nått en platå vid minst 3 mätningar kan dock testet avbrytas. Om kurvan visar att bionedbrytning har börjat men ännu inte nått en platå inom 28 dagar kan testet förlängas utöver denna period.

I.5. KVALITETSKRITERIER

I.5.1. **Repeterbarhet**

Till följd av bionedbrytningens natur och den blandade bakteriepopulationen i inokulat, bör minst dubbla bestämningar göras.

Det är en allmän erfarenhet att variationen mellan replikat blir mindre ju större startkoncentrationer av mikroorganismer i testmediet är. Ringtester har dessutom visat att det kan finnas stora variationer mellan resultat som erhållits av olika laboratorier, men generellt uppnås god överensstämmelse med lätt bionedbrytbara föreningar.

I.5.2. **Testets giltighet**

Ett test anses giltigt om skillnaden mellan de två yttersta värdena för testämnets försvinnande vid en multibestämning i platåfasen, vid avslutning av testet eller vid avslutningen av 10-dagarsfönstret är mindre än 20 % och om den procentuella nedbrytbarheten av referensämnet har nått nivån för lätt bionedbrytbarhet inom 14 dagar. Om inte båda villkoren uppfylls upprepas testet. På grund av stringensen i detta test behöver ett lågt resultat inte nödvändigtvis betyda att testämnet inte är bionedbrytbart under miljöbetingelser utan det pekar på att det krävs mer arbete för att fastställa detta.

Om nedbrytningen i ett toxicitetstest med både testämne och referenskemikalie är mindre än 35 % (baserad på DOC) eller 25 % (baserad på ThOD eller $ThCO_2$) inom 14 dagar måste man anta att testämnet är hämmande (se även bilaga 4). Testserien upprepas, om möjligt med lägre testämneskoncentrationer och högre inokulatkoncentration, dock högst 30 mg/fast ämne/liter.

I.6. ALLMÄNNA FÖRFARANDEN OCH FÖRBEREDELSER

Allmänna villkor som gäller för testerna sammanfattas i tabell 2. Apparatur och andra försöksbetingelser som gäller specifikt för ett individuellt test beskrivs senare under rubriken för det testet.

Tabell 2: Testbetingelser

Test	DOC-eliminering	CO_2-utveckling	Manometrisk respirometri	Modifierad OECD screening	Closed bottle	MITI(I)
Koncentration av testämnet som mg/l			100		2–10	100
mg/DOC/l	10–40	10–20		10–40		
mg/ThOD/l			50–100		5–10	
Koncentration av inokulat (i celler/l, cirka)	≤ 30 mg/l SS eller ≤ 100 ml utflöde/l (10^7 – 10^8)			0,5 ml sekundärt utflöde/l (10^5)	≤ 5 ml av utflöde/l (10^4– 10^6)	30 mg/l SS (10^7– 10^8)
Koncentration av element i mineralmedium (i 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-värde	7,4 ± 0,2					helst 7,0
Temperatur	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C
DOC = Upplöst organiskt kol		ThOD = Teoretiskt syrebehov			SS = Suspenderat fast ämne	

I.6.1. **Utspädningsvatten**

Avjoniserat eller destillerat vatten utan innehåll av toxiska substanser (t. ex. Cu^{++} joner) används. Det får inte innehålla mer än 10 % av det organiska kol som tillförs med testämnet. Denna höga renhet är nödvändig för att undvika höga blindvärden. Föroreningar kan stamma från naturliga orenheter och från jonbyteshartser och material från bakterier och alger. Till en testserie får endast vatten från samma behållare användas och detta vatten skall kontrolleras i förväg genom DOC-analys. En sådan kontroll är inte nödvändigt för Closed Bottle test, men syreförbrukningen från vattnet skall vara lågt

I.6.2. **Stamlösningar av oorganiska medier**

Stamlösningar framställs av oorganiska medier med passande koncentrationer av salt för användning vid framställning av testlösningarna. Följande stamlösningar kan (med olika förtunningsförhållanden) användas för DOC-eliminering, modifierad OECD-screening, CO_2-utveckling, manometrisk respirometri och Closed Bottle test.

Stamlösningar:

a)	Monokaliumdiväteortofosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliumväteortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriumväteortofosfat-dihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,40 g
	Ammoniumklorid, NH_4Cl	0,50 g
	Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls. pH-värdet skall vara 7,4.	
b)	Kalciumklorid $CaCl_2$	27,50 g
	eller kalciumklorid, dihydrat, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	36,40 g
	Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls	
c)	Magnesiumsulfat-heptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls	
d)	Järn(III)klorid-hexahydrat $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls (1.6.1.1).	

Kommentar: För att undvika att behöva framställa denna lösning omedelbart före användning tillsätts 1 droppe koncentrerat HCl eller 0,40 g etylendiaminotetraättiksyra (EDTA) per liter.

I.6.3. **Stamlösningar av kemikalier**

Om lösligheten är större än 1 g/l upplöses t. ex. 1-10 g av test- eller referenskemikalien i avjoniserat vatten, och det förtunnas till 1 liter. I motsatt fall framställs stamlösningen i det oorganiska mediet, eller kemikalier tillsätts direkt till det oorganiska mediet. Jämför tillägg III för hantering av mindre lösliga kemikalier. I MITI-testet (metod C.4-F) får dock varken lösningsmedel eller emulgatorer användas

I.6.4. **Inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor, t. ex. aktivt slam, spillvattensavlopp (ej klorerat), ytvvatten och ytjord eller en blandning av dessa. Aktivt slam för DOC-eliminering, CO_2-utveckling och manometrisk respirometri skall tas från ett reningsverk eller ett laboratorium, som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. Inokulat från andra källor har visat sig leda till större spridning av resultaten. För modifierad OECD-screening och Closed Bottle- testet krävs ett mer utspätt inokulat utan slampartiklar, och som källa föredras

sekundärt avloppsvatten från ett reningsverk som behandlar avloppsvatten från hushåll eller en anläggning i laboratorieskala. För MITI-testet framställs inokulat från en blandning av källor, vilket beskrivs under detta specifika test.

I.6.4.1. *Inokulat från aktiverat slam*

Ett färskt prov av aktiverat slam tas från en luftningsbassäng vid ett reningsverk eller en laboratorieanläggning som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. Vid behov avlägsnas grova partiklar genom filtrering genom en finmaskig sikt och slammet hålls därefter aerobt.

Alternativt utfälls eller centrifugeras slammet (t. ex. vid 1 100 g i 10 minuter) sedan grova partiklar tagits bort. Supernatanten avlägsnas. Slammet kan tvättas i oorganiskt medium. Det koncentrerade slammet uppslammas till en koncentration av 3-5 g uppslammat torrämne per liter, varefter det luftas fram till användning.

Slammet skall tas från en ordentligt fungerande normal anläggning. Om det är nödvändigt att ta slammet från ett starkt belastat reningsverk, eller om man anser att det innehåller hämmande ämnen, måste det tvättas. Utfäll eller centrifugera det omsuspenderade slammet efter noggrann blandning, avlägsna supernatanten och slamma återigen upp det tvättade slammet i en ytterligare mängd oorganiskt medium.

Strax före användning tas ett prov av det fullständigt uppslammade slammet eller av det obehandlade slammet, för bestämning av mängden uppslammat torrämne.

Ett annat alternativ är att homogenisera aktiverat slam (3-5 g uppslammat torrämne per liter). Slammet behandlas i en mekanisk blandare i 2 minuter vid medelhastighet. Det homogeniserade slammet för utfälla i 30 minuter eller vid behov längre, och vätskan dekanteras för användning som inokulat i en mängd av 10 ml per liter oorganiskt medium.

I.6.4.2. *Andra inokulatkällor*

Det kan framställas av sekundärt avloppsvatten från ett reningsverk eller en laboratorieanläggning som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. Ett färskt prov tas och förvaras under aerobiska förhållanden under transporten. Detta får utfälla i 1 timma eller filtreras genom ett grovt filterpapper och denna vätska förvaras under aeroba förhållanden fram till användning. Upp till 100 ml av detta slags inokulat kan användas per liter medium.

Ytvatten är en ytterligare inokulatkälla. I detta fall tas ett prov av lämpligt ytvatten, t. ex. flod- eller sötvatten, som förvaras under aeroba förhållanden fram till användning. Vid behov kan inokulat koncentreras genom filtrering eller centrifugering.

I.6.5. **Förbehandling av inokulat**

Det framställda inokulatet kan förbehandlas till försöksbetingelserna, men får inte tillvänjas till testkemikalien. Förbehandlingen består i luftning av aktivt slam i oorganiskt medium eller av sekundärt avloppsvatten i 5-7 dagar vid rumstemperatur. Förbehandling för MITI-test anses onödigt.

I.6.6. **Abiotisk kontroll**

Vid behov kontrolleras eventuell abiotisk nedbrytning av testämnet genom bestämning av DOC-förlust, syreupptagning och koldioxidutveckling i sterila kontrollprover som inte innehåller okulat. Sterilisering sker genom membranfiltrering (0,2-0,45μm) eller genom tillsättning av ett passande toxiskt ämne i passande koncentration. Om membranfiltrering används skall proverna tas aseptiskt för att upprätthålla steriliteten. Såvida inte adsorption av testämnet har uteslutits på förhand skall test som mäter bionedbrytning som DOC-förlust inkludera en abiotisk kontroll som inokuleras och förgiftas. Detta gäller särskilt för inokulat med aktiverat slam.

I.6.7. **Antal kolvar**

För varje test beskrivs antalet kolvar i en typisk försöksserie under rubriken för varje test.

Följande kolvtyper kan användas:

Testuppslamning: innehåller testämne och inokulat.

Inokulatblind: innehåller endast inokulat.

Förfarandekontroll: innehåller referensämne och inokulat.

Abiotisk steril kontroll: sterilt, innehåller testämne (1.6.6).

Adsorptionskontroll: innehåller testämne, inokulat och steriliserat ämne.

Toxicitetskontroll: innehåller testämne, referensämne och inokulat.

Bestämningar i testuppslamningen och inokulatblind skall obligatoriskt göras parallellt. Dessutom rekommenderas parallella bestämningar i den andra kolven.

Detta är dock inte alltid möjligt. Man måste se till att tillräckligt många prover tas eller att tillräckligt många avläsningar görs för att kunna värdera den procentuella elimineringen i 10-dagarsfönstret.

I.7. DATA OCH UTVÄRDERING

Vid beräkning av den procentuella nedbrytningen D_t används genomsnittsvärdena av de dubbla bestämningarna av parametern i testuppslamningen och inokulatblindproven. Formlerna ges i avsnitten om de enskilda testmetoderna. Nedbrytningens förlopp visas grafiskt med angivelse av 10-dagarsfönstret. Den procentuella elimineringen vid avslutningen av 10-dagarsfönstret och vid platån eller testets avslutning beräknas och rapporteras.

I metoder som baseras på respirometri kan kvävehaltiga föreningar påverka syreupptagningen på grund av nitrifikation. (se bilagor II och V).

I.7.1. **Nedbrytning mätt genom DOC-bestämning**

Den procentuella nedbrytningen (D_t) vid varje provtagningstillfälle skall beräknas särskilt för kolvarna som innehåller testämne varvid genomsnittsvärdena av de dubbla bestämningarna av DOC används för att kunna bedöma testets pålitlighet (se 1.5.2). Den beräknas genom användning av följande formel:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

där:

D_t = % nedbrytning vid tidpunkten t.

C_o = genomsnittlig startkoncentration av DOC i kulturmediet med testämne och inokulat (mg DOC/l)

C_t = genomsnittskoncentrationen av DOC i kulturmediet med oorganiskt medium och inokulat mg DOC/l)

C_{bo} = genomsnittlig startkoncentration av DOC i blindprov med oorganiskt medium och inokulat (mg DOC/l)

C_{bt} = genomsnittskoncentration av DOC i blindprov med oorganiskt medium och inokulat vid tidpunkten t (mg DOC/l).

Alla koncentrationer bestäms experimentellt.

I.7.2. **Nedbrytning mätt genom specifik analys**

Om specifika analysdata föreligger beräknas den primära bionedbrytningen genom formeln

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

där:

D_t = % nedbrytning vid tidpunkten t, normalt 28 dagar
S_a = restmängd testämne i medium med inokulat vid testets avslutning (mg)
S_b = restmängd testämne i blindprov endast med vatten/medium och testämne (mg).

I.7.3. **Abiotisk nedbrytning**

När abiotisk nedbrytning används beräknas den procentuella abiotiska nedbrytningen med användning av

$$\% \text{ abiotisk nedbrytning} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

där:

$C_{s(o)}$ = DOC-koncentration, sterilkontrollen på dag 0
$C_{s(t)}$ = DOC-koncentration, sterilkontrollen på dag t.

I.8. RAPPORTERING

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande:

— Test- och referenskemikalie och deras renhet.

— Testbetingelser.

— Inokulat: art och provtagningsställe, koncentration och eventuell förbehandling.

— Art och andel av industriavloppsvatten i avloppsvattnet, om känt.

— Testets varaktighet och temperatur.

— I fråga om svårlösliga testkemikalier: genomförd behandling.

— Använd testmetod; ändringar av förfarandet skall vara vetenskapligt motiverat.

— Försöksresultaten uppställda i tabellform

— Eventuellt observerade hämningsfenomen.

— Eventuellt observerad abiotisk nedbrytning.

— Eventuella data från specifika kemiska analyser.

— Om möjligt analytiska data om nedbrytningsprodukter.

— Avbildning av den procentuella nedbrytningen mot tiden för både test- och referensämnen med tydlig angivelse av "lag"-fas, nedbrytningstid, 10-dagarsfönster och lutning (se bilaga I). Om man i testet använder pålitlighetskriterier kan genomsnittet av nedbrytningsprocenten i kolvarna innehållande testämnet användas för framställning av grafen.

— Procentuell eliminering efter 10-dagarsfönstret och vid platån eller testets avslutning.

DEL II. DOC-ELIMINERING (DOC DIE-AWAY) (Metod C.4-A)

II.1. TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (10-40 mg/l), luftas i mörker eller diffust ljus vid 22 ± 2 °C.

Nedbrytningen följs genom regelbunden DOC-analys i 28 dagar. Bionedbrytningen beräknas genom att uttrycka koncentrationen av avlägsnat DOC (korrigerat för koncentration i inokulatblindprovet) i procent av startkoncentrationen av DOC. Den primära bionedbrytningen kan också beräknas utifrån kompletterande kemisk analys vid inkubationsperiodens början och slut.

II.2. METODBESKRIVNING

II.2.1. Apparatur

a) Koniska kolvar, t. ex. från 250 ml till 2 liter, beroende på den volym som krävs för DOC-analysen.

b) Skakapparatur för de koniska kolvarna, antingen med automatisk temperaturkontroll eller placerad i en lokal med konstant temperatur, och tillräckligt kraftig för att hålla förhållandena aeroba i alla kolvarna.

c) Filtreringsapparatur med passande membran.

d) DOC-analysator.

e) Apparatur för bestämning av upplöst syre.

f) Centrifug.

II.2.2. Framställning av oorganiskt medium

Se 1.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen (a) blanda med 800 ml utspädningsvatten, och av lösning (b), (c) och (d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med förtunningsvatten.

II.2.3. Framställning och förbehandling av inokulat

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa.

Se 1.6.4, 1.6.4.1, 1.6.4.2 och 1.6.5.

II.2.4. Förberedelse av kolvarna

Som ett exempel kan 800 ml portioner av oorganiskt medium överföras till koniska 2-literskolvar, varefter det tillsätts så mycket av stamlösningarna av test- och referensämne till de olika kolvarna att kemikaliekoncentrationen blir 10-40 mg DOC per liter. Kontrollera pH-värden och justera om nödvändigt till 7,4. Inokulat från aktiverat slam eller en annan källa tillsätts (se I.6.4) till en slutkoncentration av högst 30 mg uppslammat torrämne per liter. Inokulatprover förbereds också i oorganiskt medium utan test- och referenskemikalier.

Vid behov inkluderas även en kolv för kontroll av om testkemikalien har en hämmande verkan, genom tillsättning av jämförbart lika stora mängder test- och referenskemikalie till oorganiskt medium innehållande inokulat.

Man kan också vid behov inkludera en steril kolv, dvs. en kolv utan inokulat för att undersöka om testkemikalien bryts ned abiotiskt (se 1.6.6).

Om man misstänker att testkemikalien i väsentlig grad kan adsorberas till gas, slampartiklar eller liknande, företas dessutom en preliminär värdering av denna adsorption och därmed av testens lämplighet för den berörda testkemikalien (se tabell 1). Använd en kolv innehållande testämnet, inokulat och det steriliserande ämnet.

Alla kolvar fylls upp till 1 liter med oorganiskt medium, och efter blandning uttas ett prov från varje kolv för bestämning av startkoncentrationen av DOC (se bilaga II, punkt 4). Kolvarnas öppning sluts, t. ex. med aluminiumfolie, på ett sådant sätt att luften fritt kan passera in och ut ur kolvarna. Därefter inleds testet genom att kolvarna placeras i skakapparaturen.

II.2.5. **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslamning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7

II.2.6. **Utförande av testet**

Under testet görs dubbla bestämningar av DOC-koncentrationerna i alla kolvarna med bestämda tidsintervaller och så ofta att både 10-dagarsfönstret och den procentuella förlusten vid 10-dagarsfönstrets avslutning kan konstateras. Endast så mycket av testuppslamningen tas som är nödvändigt för analysen.

Före provtagningen kompenseras för eventuell förångningsförlust från kolvarna genom tillsättning av vatten (I.6.1). Innan proven tas blandas kulturmediet noggrant och det säkerställs att materialet på kolvens sidor löses upp eller uppslammas före provtagning. Omedelbart efter provtagningen membran-filtreras eller centrifugeras provet (se tillägg 4). Det filtrerade eller centrifugerade provet analyseras samma dag. Det kan förvaras i högst 48 timmar vid 2-4 °C eller längre vid högst -18 °C.

II.3. DATA OCH RAPPORTERING

II.3.1. **Behandling av resultaten**

Den procentuella nedbrytningen vid tidpunkt t beräknas enligt 1.7.1 (DOC-bestämning) och eventuellt enligt 1.7.2 (specifik analys).

Alla resultat antecknas på tillhörande scheman.

II.3.2. **Resultatens giltighet**

Se. I.5.2

II.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

II.4 FORMULÄR

Nedanför visas ett exempel på ett resultatschema.

DOC-ELIMINERING

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i mediet: t_0: .... mg/l ämne

4. **INOKULAT**

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration av uppslammat torrämne i reaktionsblandningen: ... mg/l:

5. **KOLBESTÄMNINGAR**

Kolanalyser:

	Kolv nr.		DOC efter n dagar (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testkemikalien med inokulat	1	a_1					
		a_2					
		a, medel $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, medel $C_{b(t)}$					
Inokulatblindprovet utan testkemikalie	3	c_1					
		c_2					
		c, medel $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medel $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. UTVÄRDERING AV RÅDATA

Kolv nr.		% nedbrytning efter n dagar				
		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				
medel(*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Genomsnittet av D_1 och D_2 skall inte tas om det är en betydande skillnad.

Anmärkning: Motsvarande formler kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproverna.

7. ABIOTISK KONTROLL (valfritt)

	Tid (dagar)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontroll	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotisk nedbrytning} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. SPECIFIK KEMISK ANALYS (valfritt)

	restmängd av testämne vid avslutning av test (mg/l)	% primär nedbrytning
Sterilkontroll	S_b	
Inokulerat testmedium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL III. MODIFIERAT OECD-SCREEENINGTEST (metod C.4-B)

III.1 TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (10-40 mg/l), luftas i mörker eller diffust ljus vid 22 ± 2 °C.

Nedbrytningen följs genom regelbunden DOC-analys i 28 dagar. Bionedbrytningen beräknas genom att uttrycka koncentrationen av avlägsnat DOC (korrigerat för koncentration i inokulatblindprovet) i procent av startkoncentrationen av DOC. Den primära bionedbrytningen kan också beräknas utifrån kompletterande kemisk analys vid inkubationsperiodens början och slut.

III.2 METODBESKRIVNING

III.2.1 **Apparatur**

a) Koniska kolvar, t. ex. från 250 ml till 2 liter, beroende på den volym som krävs för DOC-analysen.

b) Skakapparatur för de koniska kolvarna, antingen med automatisk temperaturkontroll eller placerad i en lokal med konstant temperatur, och tillräckligt kraftig för att hålla förhållandena aeroba i alla kolvarna.

c) Filtreringsapparatur med passande membran.

d) DOC-analysator.

e) Apparatur för bestämning av upplöst syre.

f) Centrifug.

III.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Se I.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen (a) blandas med 80 ml utspädningsvatten, och av lösning (b), (c) och (d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med förtunningsvatten.

I denna metod används endast 0,5 liter spillvatten per liter som inokulat, och därför kan det vara nödvändigt att tillsätta ytterligare spårämnen och växtfaktorer till mediet. Detta görs genom tillsättning av 1 ml av var och en av följande lösningar per liter medium (slutvolymen):

Lösningar av spårämnen:	
Mangansulfat tetrahydrat, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Borsyra, H_3BO_3	57,2 mg
Zinksulfat heptahydrat, $ZnSO_4 .7H_2O$	42,8 mg
Ammoniumheptamolybdat $(NH_4)_6M0_7O_{24}$	34,7 mg
Järn-chelat ($FeCl_3$ etylendiamintetraättiksyra)	100,0 mg
löses i vatten och förtunnas till 1 000 ml.	
Vitaminlösning:	
Jästextrakt	15,0 mg

löses i 100 ml vatten. Det steriliseras genom filtrering genom 0,2 µm membranfilter om lösningen framställs färsk varje gång.

III.2.3 **Framställning och förbehandling av inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa. Se 1.6.4, 1.6.4.1, 1.6.4.2 och 1.6.5.

0,5 ml per liter oorganisk lösning används.

III.2.4 **Förberedelse av kolvarna**

Som ett exempel kan 800 ml portioner av oorganiskt medium överföras till koniska 2-literskolvar, varefter det tillsätts så mycket av stamlösningarna av test- och referensämne till de olika kolvarna att kemikaliekoncentrationen blir 10-40 mg DOC per liter. Kontrollera pH-värden och justera till 7,4 om nödvändigt. 0,5 ml spillvatten tillsätts per liter (se I.6.4.2) till kolvarna som inokulat. Inokulatprover förbereds också i oorganiskt medium utan test- och referenskemikalier.

Vid behov inkluderas även en kolv för kontroll av om testkemikalien har en hämmande verkan, genom tillsättning av jämförbart lika stora mängder test- och referenskemikalie till oorganiskt medium innehållande inokulat.

Man kan också vid behov inkludera en steril kolv, dvs. en kolv utan inokulat för att undersöka om testkemikalien bryts ned abiotiskt (se 1.6.6).

Om man misstänker att testkemikalien i väsentlig grad kan adsorberas till gas, slampartiklar eller liknande, företas dessutom en preliminär värdering av denna adsorption och därmed av testens lämplighet för den berörda testkemikalien (se tabell 1). Använd en kolv innehållande testämnet, inokulat och det steriliserande ämnet.

Alla kolvar fylls upp till 1 liter med oorganiskt medium, och efter blandning uttas ett prov från varje kolv för bestämning av startkoncentrationen av DOC (se bilaga II, punkt 4). Kolvarnas öppning sluts, t. ex. med aluminiumfolie, på ett sådant sätt att luften fritt kan passera in och ut ur kolvarna. Därefter inleds testet genom att kolvarna placeras i skakapparaturen.

III.2.5. **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslamning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7

III.2.6. **Utförande av testet**

Under testet görs dubbla bestämningar av DOC-koncentrationerna i alla kolvarna med bestämda tidsintervaller och så ofta att både 10-dagarsfönstret och den procentuella förlusten vid 10-dagarsfönstrets avslutning kan konstateras. Endast så mycket av testuppslamningen tas som är nödvändigt för analysen.

Före provtagningen kompenseras för eventuell förångningsförlust från kolvarna genom tillsättning av förtunningsvatten (I.6.1). Innan proven tas blandas kulturmediet noggrant och det säkerställs att materialet på kolvens sidor löses upp eller uppslammas innan provtagning. Omedelbart efter provtagningen membranfiltreras eller centrifugeras provet (se tillägg 4). Det filtrerade eller centrifugerade provet analyseras samma dag. Det kan förvaras i högst 48 timmar vid 2-4 °C eller längre vid högst -18 °C.

III.3. DATA OCH RAPPORTERING

III.3.1. **Behandling av resultaten**

Den procentuella nedbrytningen vid tidpunkt t beräknas enligt 1.7.1 (DOC-bestämning) och eventuellt enligt 1.7.2 (specifik analys).

Alla resultat antecknas på tillhörande scheman.

III.3.2. **Resultatens giltighet**

Se. I.5.2

III.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

III.4. **FORMULÄR**

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

MODIFIERAT OECD-SCREENINGTEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i mediet: t_0: .... mg/l ämne

4. **INOKULAT**

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration av uppslammat torrämnen i reaktionsblandningen: ... mg/l:

5. **KOLBESTÄMNINGAR**

Kolanalyser:

	Kolv nr.		DOC efter n dagar (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testkemikalie med inokulat	1	a_1					
		a_2					
		a, medel $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, medel $C_{b(t)}$					
Inokulatblindprov utan testkemikalie	3	c_1					
		c_2					
		c, medel $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medel $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. UTVÄRDERING AV RÅDATA

Kolv nr.		% nedbrytning efter n dagar				
		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				
medel(*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) *Genomsnittet av D_1 och D_2 skall inte tas om det är en betydande skillnad.*

Anmärkning: Motsvarande formler kan användas för referenskemikalie och toxicitetskontrollproverna.

7. ABIOTISK KONTROLL (valfritt)

	Tid (dagar)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontroll	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotisk nedbrytning} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. SPECIFIK KEMISK ANALYS (valfritt)

	restmängd av testämne vid avslutning av test (mg/l)	% primär nedbrytning
Sterilkontroll	S_b	
Inokulerat testmedium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL IV. CO_2-UTVECKLING (metod C.4-C)

IV.1. TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (10-40 mg DOC eller TOC/l), luftas genom genomledning av koldioxidfri luft med kontrollerad hastighet i mörker eller diffust ljus. Nedbrytningen följs i 28 dagar genom bestämning av den bildade mängden kodioxid i det att det samlas upp i barium- eller natriumhydroxid och mäts antingen genom titrering av resterade hydroxid eller som oorganiskt kol. Den mängd koldioxid som utvecklats av testkemikalien (korrigerat för inokulatblindvärden) uttrycks i procent av startkoncentrationen av $ThCO_2$. Graden av bionedbrytning kan också beräknas utifrån kompletterande DOC-analyser vid inkubationsperiodens början och slut.

IV.2. METODBESKRIVNING

IV.2.1. Apparatur

a) Kolvar 2-5 liter, alla försedda med luftningsrör, som nästan når ned till botten av behållaren, och avgångsöppning.

b) Magnetomrörare, när svårlösliga kemikalier testas.

c) Gasabsorptionskolvar.

d) Utrustning för kontroll och mätning av luftgenomströmningen.

e) Apparatur för tvättning av koldioxid, för framställning av koldioxidfri luft. Alternativt kan CO_2-fri syre och CO_2-fritt kväve användas i stålkolvar i det riktiga blandningsförhållandet (20 % O_2 och 80 % N_2).

f) Utrustning för bestämning av koldioxid, antingen trimetriskt eller genom en annan form av analys för oorganiskt kol.

g) Membranfiltreringsapparatur (valfritt).

h) DOC-analysator (valfritt).

IV.2.2. Framställning av oorganiskt medium

Se 1.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen (a) blandas med 800 ml utspädningsvatten, och av lösning (b), (c) och (d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med förtunningsvatten.

IV.2.3. Framställning och förbehandling av inokulat

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa.

Se I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 och I.6.5.

IV.2.4. Förberedelse av kolvarna

Följande volym- och viktangivelser gäller som exempel för 5-literskolvar med 3 l uppslamning. Om mindre volymer används anpassas värdena, dock skall den bildade mängden koldioxid kunna bestämmas korrekt.

2 400 ml oorganiskt medium överförs till varje 5-literskolv. Man tillsätter så mycket förberett aktiverat slam (se I.6.4.1 och I.6.5) att koncentrationen av uppslammat torrämne blir högst 30 mg/l i 3 liter slutblandning.

Alternativt kan det förberedda slammet först förtunnas med oorganiskt medium till en uppslamning innehållande 500-1 000 mg/l, varefter en det av detta tillsätts till 5-literkolvens innehåll till en koncentration av 30 mg/l. Detta ger större precision. Andra inokulatkällor kan användas (se I.6.4.2).

Dessa blandningar luftas över natten med CO_2-fri luft så all koldioxid drivs ut ur systemet.

Test- och referensämne tillsätts var för sig som kända mängder av stamlösningar till replikatkolvarna så att man uppnår en koncentration av 10-20 mg DOC eller TOC per liter. Till vissa av kolvarna tillsätts inga kemikalier och dessa fungerar som inokulatkontrollprover. Svårlösliga testämnen tillsätts direkt till kolvarna på vikt- eller volymbasis, eller hanteras i enlighet med bilaga III.

Om det är nödvändigt används en kolv för att kontrollera om testkemikalien verkar hämmande. Detta görs genom att tillsätta både test- och referenskemikalie av samma koncentration som i de andra kolvarna.

Det kan vara nödvändigt att inkludera en steril kolv, dvs. en kolv utan inokulat för att undersöka om testkemikalien bryts ned abiotiskt (se 1.6.6). Sterilisera genom tillsättning av ett giftigt ämne i passande koncentration.

Alla kolvarna fylls upp till en uppslamningsvolym av 3 liter genom tillsättning av oorganiskt medium, som i förväg har genomluftats med CO_2-fri luft. Eventuellt kan man ta prover för DOC-analys (se bilaga II.4) och specifik analys. Absorptionskolvarna förbinds till kolvarnas avgångsöppning.

Om bariumhydroxid används ansluts de 3 absorptionskolvarna, var och en innehållande 100 ml 0,0125 M bariumhydroxidlösning, i en serie till varje 5-literskolv. Lösningen skall vara fri från fällt sulfat och karbonat och dess styrka skall bestämmas omedelbart före användning. Om natriumhydroxid används ansluts 2 kolvar varvid den sista fungerar som kontroll av att koldioxiden är absorberad i den första. Absorptionskolvar med serumkolvstängning är lämpliga. 200 ml 0,05 natriumhydroxid placeras i varje kolv, vilket är tillräckligt för att absorbera hela den mängd koldioxid som utvecklas när testkemikalien bryts ned fullständigt. Natriumhydroxidlösning kommer, även om färskt framställd, dock att innehålla spår av karbonat. Detta korrigeras genom subtraktion av blindprovens karbonatinnehåll.

IV.2.5. **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslamning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7

IV.2.6. **Utförande av testet**

Testet inleds genom genombubbling av uppslamningarna med 30-100 ml CO_2-fri luft per minut. Prover tas regelbundet av kodioxidabsorbenten för analys av CO_2-innehåll. Det rekommenderas att man under de första 10 dagarna gör analyser varannan eller var tredje dag och därefter var femte dag fram till dag 28, så att 10-dagarsfönstret kan identifieras.

Den 28:e dagen tas (eventuellt) prover för DOC-analys och specifik analys, uppslamningarnas pH mäts och 1 ml koncentrerad saltsyra tillsätts till varje kolv. Kolvarna luftas över natten så att all koldioxid drivs ut av tesuppslamningarna. Dag 29 företas den sista analysen av utvecklad koldioxid.

De dagar då CO_2 bestäms avlägsnas den bariumhydroxidabsorbtionskolv som är närmast kolven och innehåller titreras med 0,05 M HCl med fenoftalein som indikator. De övriga absorbtionskolvarna flyttas fram en plats närmare kolven och en ny kolv innehållande 100 ml färskt framställt 0,0125 M bariumhydroxid placeras längst bak i serien. Titreringarna görs enligt behov, t. ex. när betydande fällning syns i den första kolven men inget syns i den andra, dock minst en gång i månaden. Om NaOH används om absorbtionsmedel tas med en injektionsspruta ett litet prov (beroende på den använda kolämnesanalysatorn) av natriumhydroxidlösningen i den kolv som är närmast kolven. Provet sprutas in i IC-delen av kolämnesanalysatorn för direkt analys av den utvecklade koldioxiden.

Innehållet i den andra absorbtionskolven analyseras först vid testets avslutning så att man kan korrigera för eventuell överföring av koldioxid

IV.3. DATA OCH RAPPORTERING

IV.3.1. Behandling av resultaten

Den absorberade CO_2-mängden är efter titrering given genom

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

där:

V = den mängd HCl som förbrukas vid titrering av de 100 ml absorptionsmedel (ml)

C_B = bariumhydroxidlösningens koncentration (M)

C_A = saltsyreupplösningens koncentration (M)

Om C_B = 0,0125 M och C_A = 0,05 M skall man använda 50 ml för titrering av 100 ml bariumhydroxid, och CO_2-mängden är given genom:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl till titrering} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

I detta fall skall man alltså använda en faktor på 1,1 vid omräkning av den volym HCl som går åt vid titrering, till det antal mg Cl_2 som utvecklats.

Den viktmängd CO_2 som bildas av bara inokulat och av inokulat med testkemikalie, beräknas utifrån de gällande titreringsvärdena, och skillnaden är den viktmängd CO_2 som endast testkemikalien utvecklar.

Om t. ex. enbart inokulat kräver 48 ml för titrering och inokulat plus testkemikalie kräver 45 ml fås

CO_2 från inokulat = 1,1 × (50.48) = 2,2 mg

CO_2 från inokulat plus testkemikalie = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg,

och den viktmängd CO_2 som testkemikalien har utvecklat blir alltså 3,3 mg.

Den procentuella bionedbrytningen beräknas genom

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{mg utvecklat } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg tillsatt testkemikalie}}$$

eller

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{mg utvecklat } CO_2 \times 100}{\text{mg tillsatt TOC i testet} \times 3,67}$$

varvid 3,67 är omräkningsfaktorn (44/12) från kol till koldioxid.

Den procentuella nedbrytningen efter en viss tid beräknas genom att lägga ihop de enskilda procentdelarna av $ThCO_2$ som är uppmätta fram till den gällande tidpunkten.

Om natriumhydroxid används som absorptionsmedel beräknas den utvecklade CO_2-mängden, uttryckt som IC (mg), genom att multiplicera absorbtionsmedlets IC-koncentration med dess volym.

Den procentuella nedbrytningen beräknas genom

$$\% \, ThCO_2 = \frac{\text{mg IC i testkolv} - \text{mg IC i blindprov}}{\text{mg TOC tillsatt som testkemikalie}} \times 100$$

IV.3.2. **Resultatens giltighet**

IC-innehållet i testkemikalieuppslamningen i oorganiskt medium vid testets inledning skall vara mindre än 5 % av TC, och den utvecklade CO_2-mängden i inokulatblindprovet får vid testets avslutning inte överstiga 40 mg per liter medium. Om det finns värden på över 70 mg CO_2 per liter granskas data och försökstekniker noggrant.

Se också I.5.2

IV.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

IV.4. FORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

KOLDIOXIDUTVECKLING

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

   Namn:

   Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

   Startkoncentration i mediet: .... mg/l ämne

   Total C tillsatt till kolven: .... mg C

   $ThCO_2$: ... mg CO_2

4. **INOKULAT**

   Källa:

   Behandling:

   Eventuell förbehandling:

   Koncentration av uppslammat torrämne i reaktionsblandningen: ... mg/l:

5. **KOLDIOXIDUTVECKLING OCH NEDBRYTBARHET**

Metod: $Ba(OH)_2$ /NaOH/annat

Tid (dagar)	utvecklat CO_2 test (mg)		utvecklat CO_2 blind (mg)		utvecklat CO_2 kumulerat (mg) (test minus blind-prov)		% $ThCO_2$ $\frac{\text{kumulerat } CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 2	medel	3 4	medel	1	2	1	2	medel
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Anmärkning: Motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalie och toxicitetskontrollproverna.

6. **KOLANALYS** (valfritt)

Kolanalysator:

Tid (dagar)	Blindprov mg/l	Testkemikalie mg/l
0	$C_{b(0)}$	C_0
28(*)	$C_{b(t)}$	C_t
(*) Eller vid inkuberingens avslutning		

$$\% \text{ DOC avlägsnat} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTISK NEDBRYTNING** (valfritt)

$$\% \text{ abiotisk nedbrytning} = \frac{CO_2\text{-utveckling i steril kolv efter 28 dagar}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

DEL V. MANOMETRISK RESPIROMETRITEST (metod C.4-D)

V.1. TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (100 mg testämne per liter motsvarande minst 50-100 mg ThOD per liter) rörs om i en stängd kolv vid konstant temperatur (± 1 °C eller mindre) i upp till 20 dagar. Syreförbrukningen bestäms antingen genom mätning av den mängd syre (elektrolytiskt framställt) som krävs för att upprätthålla konstant gasvolym i respirometerkolven, eller utifrån volym- eller tryckändringen (eller en kombination av dessa) i apparaten. Utvecklat koldioxid absorberas i en kaliumhydroxidlösning eller annat lämpligt absorptionsmedel. Den syremängd som testkemikalien har tagit upp (korrigerat mot den parallella inokulatblindprovets upptagning) uttrycks i procent av ThOD eller COD. Frivilligt kan primär bionedbrytning också beräknas genom kompletterande specifik analys vid inkubationsperiodens början och slut, och fullständig bionedbrytning genom DOC-analys.

V.2. TESTMETODSBESKRIVNING

V.2.1. Apparatur

a) Lämplig respirator.

b) Temperaturreglering inom ± 1 °C eller mindre.

c) Membranfiltreringsapparatur (valfritt).

d) Kolanalysator (valfritt).

V.2.2. Framställning av oorganiskt medium

Se I.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen a) blandas med 800 ml utspädningsvatten, och av lösning b), c) och d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med utspädningsvatten.

V.2.3. Framställning och förbehandling av inokulat

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa.

Se I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 och I.6.5.

V.2.4. Förberedelse av kolvarna

Utifrån stamlösningarna framställs det särskilda lösningar av test- och referensämne i oorganiskt medium med en kemikaliekoncentration av normalt 100 mg/l (motsvarande minst 50-100 mg ThOD per liter).

ThOD beräknas på grundval av ammoniumsalt, såvida inte nitrifikation förväntas, i vilket fall beräkningen baseras på nitratbildning (se bilaga II.2).

pH justeras vid behov till 7,4 ± 0,2.

Svårlösliga ämnen tillsätts vid en senare tidpunkt.

Om testämnets toxicitet skall bestämmas framställs ytterligare en lösning i oorganiskt medium, som innehåller både test- och referensämne i samma koncentration som i de individuella lösningarna.

Om det är nödvändigt att bestämma den fysiska-kemiska syreupptagningen framställs en lösning av testämne i en koncentration av normalt 100 mg ThOD per liter som steriliseras vid tillsättningen av ett passande giftigt ämne (se I.6.6).

Den nödvändiga mängden av test- respektive referensämneslösningarna överförs till minst två kolvar (dubbel bestämning). Ytterligare kolvar med enbart oorganiskt medium förbereds (inokulatblindprover) och om det är nödvändigt med den blandade test- och referensämneslösningen och med den sterila lösningen.

Om testämnet är svårlösligt tillsätts det direkt vid denna tidpunkt, antingen på grundval av vikt eller volym eller genom hanteringen enligt bilaga III. Dessutom tillsätts kaliumhydroxid, natriumhydroxidpärlor eller ett annat absorptionsmedel till CO_2-kamrarna.

V.2.5. **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslammning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas, och vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7

V.2.6. **Utförande av testet**

Låt behållarna stå tills de har nått den önskade temperaturen och tillsätt förberett aktiverat slam eller ett annat inokulat till de ifrågavarande behållarna så att en koncentration av uppslammat torrämne på högst 30 mg/l erhålls. Montera apparaturen, starta omrörningen, kontrollera lufttätheten och börja mäta syreupptagningen. Normalt krävs det ingen annan passning än de nödvändiga avläsningarna och daglig kontroll av att temperaturen är korrekt och omrörningen tillräcklig.

Syreupptagningen beräknas på grundval av ofta förekommande regelbundna avläsningar som görs enligt apparaturtillverkarens anvisningar. Vid inkubationstidens avslutning, normalt 28 dagar, mäts pH-värdet i kolvarna, särskilt om syreupptagningen har varit mycket låg eller större än $ThOD_{NH4}$ (för kvävehaltiga föreningar).

Om det är nödvändigt tas prover från respirometerkolvarna före och efter inkuberingen för DOC-analys eller specifik kemisk analys (se bilaga II.4). Man skall se till att volymen av den testuppslamning som kvarstår i kolven efter den första provtagningen är känd. Om testämnet är N-haltigt bestäms koncentrationsökningen av nitrit och nitrat under 28 dagar, och korrektionen för syreförbrukningen genom nitrifikation beräknas (bilaga V).

V.3. DATA OCH RAPPORTERING

V.3.1. **Behandling av resultaten**

Testkemikaliens syreupptagning (mg) efter en viss tid (korrigerad för inokulatblindprovens syreupptagning under samma tid) divideras med vikten av använd mängd testämne. Av detta framkommer BOD uttryckt i mg syre per mg testämne, dvs.

$$BOD = \frac{\text{mg } O_2 \text{ upptaget av testämne} - \text{mg } O_2 \text{ upptaget av blindproven}}{\text{mg testämne i kolven}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ per mg testämne}$$

Den procentuella bionedbrytningen beräknas antingen genom

$$\% \text{ bionedbrytning} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kemikalie)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg kemikalie)}} \times 100$$

eller

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kemikalie)}}{\text{COD (mg } O_2/\text{mg kemikalie)}} \times 100$$

Det bör noteras att de två metoderna inte nödvändigtvis ger samma resultat. Den förstnämnda metoden föredras.

För testämnen som innehåller kväve används passande ThOD (NH_4 eller NO_3) i enlighet med vad som är känt eller förväntas om förekomst av nitrifikation (bilaga II.2). Om ofullständig nitrifikation sker beräknas korrektionen för syreförbrukning till nitrifikation på grundval av ändringarna i nitrit- och nitratkoncentrationen (bilaga V).

Om man beslutar sig för att göra bestämningar av organiskt kol och en specifik kemikalie beräknas den procentuella nedbrytningen i enlighet med punkt I.7.

Alla resultat noteras på tillhörande formulär.

V.3.2. **Resultatens giltighet**

Inokulatblindprovens syreupptagning är normalt 20-30 mg O_2/l på 28 dagar och bör inte vara större än 60 mg/l. Om det finns värden över 60 mg/l måste data och försökstekniker granskas noggrant. Om pH ligger utanför intervallet 6-8,5 och testämnets syreupptagning är mindre än 60 % upprepas testet med lägre testämneskoncentrationer.

Se. också I.5.2

V.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

V.4. FORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

MANOMETRISK RESPIROMETRI

1. LABORATORIUM

2. DATUM VID INLEDNING AV TEST

3. TESTÄMNE

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i mediet: C_o: .... mg/l ämne

Volymen i testkolv (V): .... ml

ThOD eller COD: ... mg O_2/mg testämne (NH_4, NO_3).

4. INOKULAT

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration av uppslammat torrämne i reaktionsblandningen: ... mg/l:

5. SYREUPPTAGNING: BIONEDBRYTNING

		Tid (dagar)											
		0		7		14			21			28	
O_2 uppt. (mg) testämne	1												
	2												
	a, medel												
O_2 uppt. (mg) blindprov	3												
	4												
	b, medel												
Korrigerat BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD per mg testämne	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												
% nedbrytning $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	medel(*)												
V = volymen av medium i testkolven													

(*) Genomsnittet av D_1 och D_2 skall inte tas om det föreligger en väsentlig skillnad.

Anmärkning: En motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproven.

6. KORREKTION FÖR NITRIFIKATION (se bilaga V)

Dag	0	28	skillnad
i) Nitratkoncentration (mg N/l)			(N)
ii) Syreekvivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii) Nitritkoncentration (mg N/l)			(N)
iv) Syreekvivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii + iv) Total syreekvivalent	—	—	

7. KOLBESTÄMNING (valfritt)

Kolanalysator:

Tid (dagar)	Blindprov mg/l	Testkemikalie mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28(*)	(C_{blt})	(C_t)
(*) Eller vid inkuberingens slut		

$$\% \text{ DOC avlägsnat} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMIKALIEBESTÄMNING** (valfritt)

S_b = koncentrationen av testkemikalien i steril kontrollkolv efter 28 dagar

S_a = koncentrationen av testkemikalien i kolv med inokulat efter 28 dagar

$$\% \text{ bionedbrytning} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTISK NEDBRYTNING** (valfritt)

a = syreförbrukningen i sterila kolvar efter 28 dagar (mg)

$$\text{Syreförbrukning pr mg testämne} = \frac{a}{C_o V}$$

(se avsnitt 1 och 3)

$$\% \text{ abiotisk nedbrytning} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

DEL VI. CLOSED BOTTLE-TEST (metod C.4-E)

VI.1. TESTMETODSPRINCIP

Till en normal 2-5 mg/l lösning av testämnet i oorganiskt medium tillsätts inokulat bestående av ett förhållandevis litet antal mikroorganismer från en blandad population, och lösningen förvaras i mörker vid konstant temperatur i helt fyllda slutna kolvar. Nedbrytningen följs under 28 dagar genom analys av upplöst syre. Den syremängd som testämnet har förbrukat korrigeras för den syremängd som har förbrukats i det parallella inokulatblindprovet, och uttrycks i procent av ThOD eller COD.

VI.2. TESTMETODSBESKRIVNING

VI.2.1. Apparatur

a) BOD-kolvar med glaspropp, t. ex. 250-300 ml.

b) Vattenbad eller inkuberingsapparat, som kan hålla kolvarna vid konstant temperatur (± 1 °C eller mindre) i mörker.

c) Stora glasflaskor (2-5 l) för framställning av medium och uppfyllning av BOD-kolvarna.

d) Syreelektrod och syremätare eller utrustning och reagenser för Winkler-titrering.

VI.2.2. Framställning av oorganiskt medium

Se I.6.2 om framställning av stamlösning.

1 ml lösning a), b), c) och d) förtunnas till 1 liter med vatten.

VI.2.3. **Framställning av inokulat**

Inokulat tas normalt från sekundärt avloppsvatten från ett reningsverk eller en laboratorieanläggning som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. En alternativ inokulatkälla är ytvatten. Normalt används från en droppe (0,5 ml) till 5 ml filtrat per liter medium. Avprovningar kan vara nödvändiga för att klarlägga den optimala volymen för ett visst avloppsvatten (se I.6.4.2 och I.6.5).

VI.2.4. **Förberedelse av kolvar**

Det oorganiska mediet luftas kraftigt i minst 20 minuter. En given försöksserie utförs med oorganiskt medium från samma sats. Normalt är mediet färdigt för användning efter att ha stått i 20 minuter vid testtemperaturen. Som kontroll bestäms koncentrationen av upplöst syre. Värdena skall ligga omkring 9 mg/l vid 20 °C. All överföring och uppfyllning med det luftmättade mediet utförs utan att det bildas bubblor, t. ex. genom användning av hävert.

Parallella grupper av BOD-kolvar förbereds för samtidiga försök med test- och referensämne. Minst så många BOD-kolvar, inbegripet inokulatblindprover, samlas så att minst dubbla bestämningar kan företas av syreförbrukningen med önskade regelbundenhet, t. ex. efter 0, 7, 14, 21 och 28 dagar. Det kan vara nödvändigt att använda flera kolvar om man säkert skall kunna identifiera 10-dagarsfönstret.

De stora kolvarna fylls upp till en tredjedel med fullt luftat oorganiskt medium. Därefter tillsätts så mycket stamlösning av test- och referensämne till olika kolvar att deras slutkoncentration normalt inte blir större än 10 ml/l. Till en särskild kolv med kontrollmedium tillsätts inga kemikalier.

För att vara säker på att inokulataktiviteten inte begränsas får koncentrationen av upplöst syre inte understiga 0,5 mg/l i BOD-kolvarna, vilket begränsar testkemikaliens koncentration till ca 2 mg/l. Av svårt nedbrytbara ämnen och ämnen med lågt ThOD kan det dock användas 5-10 mg/l. I vissa fall rekommenderas parallella serier med testämne i två olika koncentrationer, t. ex. 2 och 5 mg/l. Normalt beräknas ThOD på grundval av bildandet av ammoniumsalt, men om nitrifikation förväntas beräknas värdena på grundval av nitratbildning ($ThOD_{NO3}$; se bilaga II.2). Om ofullständig nitrifikation sker korrigeras det för ändringar i nitrit- och nitratkoncentrationen, som är bestämd genom analys (se bilaga V).

Ytterligare en serie kolvar krävs om testämnets toxicitet skall undersökas (t. ex. om ett lågt bionedbrytbarhetsvärde tidigare påvisats).

För detta förbereds ytterligare en stor kolv med luftat oorganiskt medium (ca en tredjedel full) plus testämne och referensämne normalt i samma slutkoncentration som i de andra kolvarna.

Inokulat tillsätts till kolvarna i form av sekundärt avloppsvatten (från 1 droppet (0,5 ml) till 5 ml per liter) eller t. ex. flodvatten (se I.6.4.2). Slutligen fylls det upp med luftat oorganiskt medium med användning av en slang som når ända ner till botten, så att tillräcklig omrörning säkerställs.

VI.2.5. **Antal kolvar i en typisk testserie**

I en typisk testserie används följande antal kolvar:

minst 10 med testämne och inokulat (testuppslamning),

minst 10 med inokulat (inokulatblindprov),

minst 10 med referensämne och inokulat (procedurkontroll)

och i vissa fall 6 kolvar med testämne, referensämne och inokulat (toxicitetskontroll). För att säkert kunna identifiera 10-dagarsfönstet krävs dock dubbelt antal kolvar.

VI.2.6. **Genomförande av testet**

De framställda lösningarna fördelas omedelbart i de berörda grupperna av BOD-kolvar, i det att de sugs upp från den nedersta fjärdedelen (inte botten) av den passande stora kolven med en slang, och således att alla BOD-kolvarna fylls helt. Eventuella luftbubblor avlägsnas genom lätta slag på kolvens sida. Starttidskolvarna analyseras omedelbart för upplöst syre antingen genom Winkler-metoden eller med elektrod. Innehållet i kolvarna kan förvaras för senare analys med Winkler-metoden om man omedelbart tillsätter mangan(II)sulfat och natriumhydroxid (den första Winkler-reagensen). De väl tillproppade kolvarna, där syret är fixerat som brunt hydratiserat mangan(III)oxid kan förvaras i mörker vid 10-20 °C i högst 24 timmar innan Winkler-testet avslutas. Resterande kolvar tillproppas och man ser till att inga luftbubblor innesluts, och de inkuberas vid 20 °C i mörker. Parallellt med varje serie skall det göras en fullständig serie för bestämning av inokulatblindvärden. Under de 28 dagarnas inkubering uttas med bestämda intervaller (minst en gång i veckan) minst 2 kolvar av varje serie för analys av upplöst syre.

Med veckovis provtagning skulle det procentuella avlägsnandet kunna bedömas i ett 14-dagarfönster, medan det vid provtagning var 3-4 dag, vilket skulle kräva ca dubbelt så många kolvar, blir möjligt att identifiera 10-dagarfönstret.

För N-haltiga ämnen måste det korrigeras för syreförbrukning vid eventuell nitrifikation. För detta används en O_2-elektrod för bestämning av koncentrationen av upplöst syre, varefter det tas ett prov från BOD-kolven för analys av nitrit och nitrat. Den förbrukade syremängden beräknas på grundval av ökningen av nitrit- och nitratkoncentrationen (se bilaga V).

VI.3. DATA OCH RAPPORTERING

VI.3.1. **Behandling av resultat**

Först beräknas BOD efter varje tidsintervall genom att dra ifrån syreförlusten (mg O_2 per liter) i inokulatblindproven från syreförlusten i kolven med testämne. Denna korrigerade syreförlust divideras med testämnets koncentration (mg/l), varefter den specifika BOD framkommer i mg syre per mg testämne. Den procentuella bionedbrytbarheten beräknas genom att dividera den specifika BOD med den specifika ThOD (beräknad i enlighet med bilaga II.2) eller COD (bestämt genom analys, se bilaga II.3), dvs.

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg } O_2 \text{ upptaget av testämne} - \text{mg } O_2 \text{ upptaget av blindproven}}{\text{mg testämne i kolven}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ per mg testämne}$$

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg testämne)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg testämne)}} \times 100$$

eller

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg testämne)}}{\text{COD (mg } O_2/\text{mg testämne)}} \times 100$$

Observera att dessa två metoder inte nödvändigtvis ger samma resultat. Den först nämnda metoden rekommenderas.

Den ThOD (NH_4 eller NO_3) som motsvarar det föreliggande kännedomen om nitrifikation (bilaga II.2) används. Om ofullständig nitrifikation sker beräknas korrektionen för syreförbrukningen till nitrifikationen ut i från ändringarna i nitrit- och nitratkoncentrationen (bilaga V).

VI.3.2. **Resultatens giltighet**

Inokulatblindprovens syreförlust bör inte vara större än 1,5 mg upplöst syre per liter efter 28 dagar. Om det finns högre värden måste försöksteknikerna granskas kritiskt. Restkoncentrationen av syre i testkolvarna får inte

understiga 0,5 mg/l vid något tillfälle. Mätningar av så lågt syreinnehåll är endast giltiga om den använda mätmetoden för upplöst syre tillåter noggrann mätning av så lågt innehåll.

Se också I.5.2.

VI.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

VI.4. FORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

CLOSED BOTTLE TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l

Startkoncentration i kolven: .... mg/l

ThOD eller COD: ... mg O_2/mg testämne

4. **INOKULAT**

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration i reaktionsblandningen: ... mg/l:

5. **DOC-BESTÄMNING**

Metod: Winkler/elektrod

Kolvanalys

Inkuberingstid (dagar)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Blindprov (utan testämne)	1	C_1				
	2	C_2				
Genomsnitt	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testämne	1	a_1				
	2	a_2				
Genomsnitt	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Anmärkning: En motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproverna.

6. **KORREKTION FÖR NITRIFIKATION** (se bilaga V)

Inkuberingstid (dagar)	0	n_1	n_2	n_3
i) Nitratkoncentration (mg N/l)				
ii) Ändring i nitratkoncentration (mg N/l)	—			
iii) Syreekvivalent (mg/l)	—			
iv) Nitritkoncentration (mg N/l)				
v) Ändring i nitritkoncentration (mg N/l)	—			
vi) Syreekvivalent (mg/l)	—			
iii + vi) Total syreekvivalent (mg/l)	—			

7. **FÖRLUST AV DO: % NEDBRYTNING**

	Förlust efter n dagar (mg(l)			
	n_1	n_2	n_3	
KOLV 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
KOLV 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
KOLV 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. av test} \times \text{ThOD för ämne}}$				
KOLV 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. av test} \times \text{ThOD för ämne}}$				
$\%\ D \text{ genomsn.}(*) = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Ta inte genomsnittet om det föreligger väsentlig skillnad med replikaterna.

m_{to} = värde i testkolven vid tid 0

m_{tx} = värde i testkolven vid tid x

m_{bo} = genomsnittsblindvärde vid tid 0

m_{bx} = genomsnittsblindvärde vid tid x

Dessutom företas korrektion för nitrifikation i enlighet med punkt 6.

8. **BLINDPROVER FÖR FÖRLUST AV DO**

Syreförbrukningen i blindprov: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Denna förbrukning är av betydelse för testets giltighet och får högst vara 1,5 mg/l.

DEL VII. MITI TEST (metod C.4-F)

VII.1. TESTMETODSPRINCIP

Syreupptagningen i en omrörd lösning eller uppslamning av testämnet i oorganiskt medium, som är tillsatt inokulat i form av särskild odlade ej tillvanda mikroorganismer, mäts automatiskt under 28 dagar i en mörklagd sluten respirometer vid 25 ± 1 °C. Den utvecklade koldioxiden absorberas i natriumhydroxid. Bionedbrytbarheten uttrycks som den upptagna syremängden (korrigerat för blindprovens upptagning) i procent av den teoretiska syreupptagningen (ThOD). Även den procentuella primära bionedbrytbarheten beräknas, på grundval av kompletterande specifika kemiska analyser vid inkuberingens början och slut och eventuellt genom DOC-analys.

VII.2. TESTMETODSBESKRIVNING

VII.2.1. Apparatur

a) Automatisk elektrolytisk BOD-mätare eller respirometer, normalt med 6 kolvar på vardera 300 ml och med skålar för CO_2-absorbtionsmedel.

b) Lokal med konstant temperatur och vattenbad på 25 ± 1 °C eller mindre.

c) Membranfiltreringsutrustning (valfritt).

d) Kolanalysator (valfritt).

VII.2.2. Framställning av oorganiskt medium

Följande stamlösningar framställs av reagenser av analyskvalitet och vatten (I.6.1):

a) monokaliumdihydrogenorthofosfat, KH_2PO_4 8,50 g
dikaliummonohydrogenorthofosfat, K_2HPO_4 21,75 g
dinatriummonohydrogenorthofosfat dodecahydrat, $Na_2HPO_2 . 12 H_2O$ 44,60 g
ammoniumklorid, NH_4Cl 1,70 g
Upplöses i vatten och förtunnas till 1 liter.
Upplösningens pH skall vara 7,2.

b) magnesiumsulfat heptahydrat, $MgSO_4 . 7 H_2O$ 22,50 g
Upplöses i vatten och förtunnas till 1 liter.

c) Kalciumklorid, vattenfritt, $CaCl_2$ 27,50 g
Upplöses i vatten och förtunnas till 1 liter.

d) Järn(III)klorid hexahydrat, $FeCl_3 . 6 H_2O$ 0,25 g
Upplöses i vatten och förtunnas till 1 liter.

3 ml tas av lösning a, b, c och d och förtunnas till 1 liter.

VII.2.3. Framställning av inokulat

Friska prover samlas in från minst 10 platser, huvudsakligen områden där det används och utleds olika kemikalier. Från sådana platser som reningsverk, floder, sjöar och havsområden insamlas 1-liters prover av slam, ytjord, vatten, etc. och allt blandas ordentligt. Material som flyter ovanpå avlägsnas och efter ett tag anpassas supernatanten till pH 7 ± 1 med natriumhydroxid och fosforsyra.

En passande mängd filtrat används för att fylla en "fill-and-draw" aktiv slambehållare, och vätskan luftas i ca 23 ½ timme. 30 minuter efter det att luftningen avslutats hälls omkring en tredjedel av den samlade supernatantvolymen bort och det tillsätts en lika stor mängd av en lösning (med pH 7) som innehåller 0,1 % glukos, 0,1 % pepton och 0,1 % monokaliumorthoforfat, och luftningen påbörjas. Detta sker varje dag. Slamenheten drivs efter god praxis: avloppsvattnet skall vara klart, temperaturen skall hållas vid 25 ± 2 °C, pH skall vara 7 ± 1, slam skall bottenfällas bra, tillräcklig luftning skall upprätthållas för att hålla blandningen konstant aerob, protozoer skall finns till hands och slamaktiviteten skall testas mot referensämnet minst var tredje månad. Slammet får tidigast användas som inokulat efter en månads drift och inte senare än efter fyra månaders drift. Därefter uttas regelbundet prover från minst 10 platser var tredje månad.

För att hålla det friska och det gamla slammet på samma aktivitet blandas den filtrerade supernatanten från aktivt slam genom användning av lika mycket filtrerat supernatant från en färskt insamlat blandning från 10 källor, och denna vätska odlas i enlighet med ovan. 18-24 timmar efter det att enheten fyllts upp kan det tas slam för användning som inokulat.

VII.2.4. **Förberedelse av kolvar**

Sex kolvar förbereds enligt följande:

Nr 1: testämne i förtunningsvatten, 100 mg/l

Nr 2, 3 och 4: testämne förtunnat med oorganiskt medium till 100 mg/l

Nr 5: referensämne (t. ex. anilin) förtunnat med oorganiskt medium till 100 mg/l

Nr 6: rent oorganiskt medium.

Svårlösliga testämnen tillsätts direkt på vikt- eller volymbasis eller hanteras i enlighet med bilaga III, bortsett från att varken lösningsmedel eller emulgatorer får användas. CO_2-absorptionsmedel placeras i alla kolvar i den särskilda skålen. pH i kolv nr 2, 3 och 4 justeras till 7,0.

VII.2.5. **Genomförandet av testet**

En liten mängd inokulat tillsätts till kolv nr 2, 3 och 4 (testuppslamningar), nr 5 (aktivitetskontroll) och nr 6 (inokulatblinprov) så att koncentrationen av uppslammat torrämne blir 30 mg/l. Inokulat tillsätts inte till kolv nr 1 som tjänar som abiotisk kontroll. Utrustningen samlas ihop, lufttätheten kontrolleras, omrörarna startas och syreupptagningsmätningen startas i mörker. Temperaturen, omrörningen och den coulometeriska syreupptagningsskrivaren kontrolleras dagligen och eventuella färgändringar i kolvarna noteras. Syreupptagningen i de 6 kolvarna avläses direkt med hjälp av en passande metod, t. ex. på sexkanalsskrivaren, som ger en BOD-kurva. Vid inkuberingens slut, normalt efter 28 dagar, mäts pH i kolvarna, och koncentrationen av resterande testämne och av eventuella biprodukter och, när det gäller vattenlösliga ämnen, eventuellt DOC-koncentrationen bestäms (bilaga II.4). Särskild försiktighet måste iakttas om det är tal om flyktiga kemikalier. Om nitrifikation förväntas bestäms om möjligt nitrat- och nitritkoncentrationen.

VII.3. DATA OCH RAPPORTERING

VII.3.1. **Behandling av resultat**

Testämnets syreförbrukning (mg) efter en viss tid, korrigerat för syreupptagningen i inokulatblinproven efter samma tid, divideras med den använda viktmängden testämne. Av detta framkommer BOD uttryck som mg syre per mg testämne, dvs.

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg } O_2 \text{ upptaget av testämnet} - \text{mg } O_2 \text{ upptaget av blindproven}}{\text{mg testämne i kolven}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ per mg testämne}$$

Den procentuella bionedbrytningen framkommer av:

$$\% \text{ bionedbrytning} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2 \text{ per mg kemikalie)}}{\text{ThOD (mg } O_2 \text{ per mg kemikalie)}} \times 100$$

För blandningar beräknas ThOD på samma sätt som för enskilda ämnen, nämligen på grundval av grundämnesanalysen. Det ThOD som används ($ThOD_{NH4}$ eller $ThOD_{NO3}$) beror på om nitrikfikationen är frånvarande eller fullständig (bilaga II.2). Om ofullständig nitrifikation sker beräknas korrektionen för syreförbrukningen till nitrifikationen ut i från ändringarna i nitrit- och nitratkoncentrationen (bilaga V).

Den procentuella primära bionedbrytningen beräknas på grundval av den mängd av den specifika (ursprungliga) kemikalie som försvinner (se I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Om förlust av testämne har skett i kolv nr 1, som mäter fysisk och kemisk nedbrytning, antecknas detta och testämnets koncentration (S_b) i denna kolv efter 28 dagar används för att beräkna den procentuella bionedbrytningen.

Om (valfria) bestämningar görs av DOC beräknas den procentuella fullständiga bionedbrytningen genom:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

i enlighet med punkt I.7.1. Om testämne (DOC) har försvunnit från kolv nr 1, som mäter fysisk och kemisk nedbrytning, används DOC-koncentrationen i denna kolv för att beräkna den procentuella bionedbrytningen.

Alla resultat noteras på de tillhörande formulären.

VII.3.2. **Resultatens giltighet**

Inokulatblinprovens syreförbrukning är normalt 20-30 mg O_2/l efter 28 dagar och bör inte vara större än 60 mg/l. Om det finns värden över 60 mg/l måste data och försöksteknikerna granskas kritiskt. Om pH ligger utanför intervallet 6-8,5 och testämnets syreförbrukning är mindre än 60 % upprepas testet med lägre testämneskoncentrationer.

Se även I.5.2.

Om den procentuella nedbrytningen av anilin, beräknat utifrån syreförbrukningen, inte är större än 40 % efter 7 dagar och 65 % efter 14 dagar anses testet vara ogiltigt.

VII.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

VII.4. RESULTATFORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

MITI (I) TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i kolven, C_o: .... mg/l ämne

Reaktionsblandningens volym, V: .... ml

ThOD: ... mg O_2/l

4. **INOKULAT**

Platser för provtagningen:

1) .... 6) ....
2) .... 7) ....
3) .... 8) ....
4) .... 9) ....
5) .... 10) ....

Koncentrationen av uppslammat torrämne i det aktiva slammet efter acklimatisering med syntetiskt avloppsvatten: .... mg/l.

Volym av aktivt slam per liter slutmedium: ... ml.

Slamkoncentration i slutmedium: mg/l

5. **SYREUPPTAGNING: BIONEDBRYTBARHET**

Respirometertyp:

			Tid (dagar)				
			0	7	14	21	28
O_2 upptag. (mg) testämne	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 upptag. (mg) blindprov	b						
Korrigerat O_2 upptag. (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $a_3 - b)$						
BOD per mg testämne	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Kolv 1					
		Kolv 2					
		Kolv 3					
% nedbrytning $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		genomsn.*					

Anmärkning: En motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproven.

* Ta inte genomsnittet om det föreligger en väsentlig skillnad mellan replikaterna.

6. **KOLANALYS** (valfritt)

Kolanalysator:

Kolv	DOC				% DOC avlägsnat	Genomsnitt
	Mätt		Korrigerat			
Vatten + testämne	a				—	—
Slam + testämne	b1		b1 - c			
Slam + testämne	b2		b2 - c			
Slam + testämne	b3		b3 - c			
Kontrollblind	c		—		—	—

$$\% \text{ avlägsnat DOC: } \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATA FRÅN SPECIFIK KEMISK ANALYS**

	Restmängd av testämne vid testets avslutning	% nedbrytning
Blindprov med vatten	Sb	
Medium med inokulat	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

% nedbrytning beräknas för kolv a_1, a_2 och a_3.

8. **ANMÄRKNINGAR**

En kurva över BOD mot tiden skall bifogas, om sådan föreligger.

BILAGA I

FÖRKORTNINGAR OCH DEFINITIONER

DO: Upplöst syre (mg/l) definieras som koncentrationen av upplöst syre i ett vattnigt prov.

BOD: Biokemisk syreförbrukning (g) definieras som den mängd syre som mikroorganismer förbrukar vid metabolism av testämnet. Resultatet uttrycks också som gram upptaget syre per gram testat ämne (se metod C.5).

COD: Kemisk syreförbrukning (g) definieras som den mängd syre som förbrukas vid oxidering av testämnet med varm dikromat i sur vätska. Det är ett mått på den motsvarande mängden oxiderbart ämne; uttrycks också i g förbrukat syre per g testämne (se metod C.6).

DOC: Upplöst organiskt kol definieras som den mängd organiskt kol som finns i lösningen, passerar genom ett 0,45 µm filter eller förblir i centrifugatet efter centrifugering vid 40 000 $m \cdot s^{-2}$ (± 4 000 g) i 15 minuter.

ThOD: Teoretisk syreförbrukning (mg) definieras som den samlade mängden syre som krävs för fullständig oxidering av ett kemiskt ämne. Det beräknas på grundval av bruttoformeln (se bilaga II, punkt 2) och uttrycks också i mg syre per mg testämne.

$ThCO_2$: Teoretiskt koldioxid (mg) definieras som den mängd koldioxid som enligt beräkningar på grundval av testämnets kända eller mätta kolinnehåll skulle bildas vid fullständig nedbrytning av testämnet. Det uttrycks också i mg utvecklad koldioxid per mg testämne.

TOC: Ett provs totala innehåll av organiskt kol definieras som summan av organiskt kol i lösning och uppslamning.

IC: Oorganiskt kol.

TC: Ett provs totala kolinnehåll definieras som summan av organiskt och oorganiskt kol.

Primär bionedbrytning

definieras som en ändring av ett ämnes kemiska struktur, framkallad på biologisk väg, som resulterar i att ämnet mister sina specifika egenskaper.

Fullständig bionedbrytning (aerob)

definieras som den nedbrytningsgrad som har nåtts när mikroorganismer har förbrukat ett testämne fullständigt samtidigt som koldioxid, vatten, oorganiska salter och nya celldelar bildas (biomassa).

Lätt bionedbrytning

kännetecknar en godtycklig klass kemikalier som har klarat vissa specifika screeningtester för fullständig bionedbrytning. Dessa tester är så krävande att sådana ämnen snabbt kommer att fullständigt brytas ned i vattnig miljö under aeroba förhållanden.

Inherent (potentiell) bionedbrytbarhet

karakteriserar en klass kemikalier för vilka det finns klara bevis på bionedbrytning (primär eller fullständig) vid varje erkänt test av bionedbrytbarhet.

Behandlingsmöjlighet

definieras som möjligheten av avlägsna ett ämne genom biologisk avloppsvattenrening utan att avloppsvattenreningsprocessernas normala förlopp påverkas. Generellt är alla lätt bionedbrytbara ämnen behandlingsbara, men inte alla inherent bionedbrytbara ämnen. Abiotiska processer kan också inverka på detta.

Lag-period

definieras som den tid som går vid ett elimineringstest från inokuleringen tills dess att nedbrytningsprocenten är minst 10 %. Lag-perioden varierar ofta stort och är svår att reproducera.

Nedbrytningstid

definieras som tiden mellan lagperiodens slut och den tid då nedbrytningen har nått 90 % av sitt maximala värde.

10-dagarsfönstret

definieras som den period på 10 dagar som börjar när nedbrytningen har nått upp till 10 %.

BILAGA II

BERÄKNING OCH BESTÄMNING AV LÄMPLIGA HUVUDPARAMETRAR

Beroende på den metod som väljs kan olika huvudparametrar behövas. I detta avsnitt beskrivs hur dessa värden utleds. Parametrarnas användning beskrivs i de individuella metoderna.

1. Kolhalt

Kolhalten kan antingen beräknas på grundval av testämnets grundämnessammansättning eller bestämmas genom elementäranalys.

2. Teoretisk syreförbrukning (ThOD)

Den teoretiska syreförbrukningen (ThOD) kan beräknas, om grundämnessammansättningen är känd, och annars bestämmas genom elementäranalys. För föreningen

$$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$$

är det utan nitrifikation

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\,[2\,c + 1/2\,(h - cl - 3\,n) + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

och med nitrifikation

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\,[2\,c + 1/2\,(h - cl) + 5/2\,n + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. Kemisk syreförbrukning (COD)

Den kemiska syreförbrukningen (COD) bestäms enligt metod C.6.

4. Upplöst organiskt kol (DOC)

Upplöst organiskt kol (DOC) definieras som den organiska mängd kol i en kemikalie eller en kemikalieblandning som i vattnig lösning kan passera genom ett 0,45 µm filter.

Prover tas från testbehållarna och filtreras omedelbart genom filtreringsutrustningen som är försedd med ett passande membranfilter. De första 20 ml av filtratet kasseras (vid små filter kan denna mängd minskas). 10-20 ml samlas upp för kolanalys (vid insprutning mindre, beroende på den använda kolanalysatorn). DOC-koncentrationen bestäms med hjälp av en organisk kolämnesanalysator som gör det möjligt att noggrant bestämma en kolkoncentration på mindre än 10 % av startkoncentrationen av DOC i testet.

Om filtrerade prover inte kan analyseras samma arbetsdag kan de förvaras i högst 48 timmar i kylskåp vid 2–4 °C eller längre tid vid -18 °C.

Anmärkningar:

Membranfilter är ofta behandlade med ytaktiva ämnen för att göra dem mer hydrofila. De kan därför innehålla upp till flera mg upplösligt organiskt kol som kommer att påverka bionedbrytbarhetsbestämningen. De ytaktiva ämnena och andra upplösliga organiska ämnen avlägsnas från filtren genom kokning i avjoniserat vatten i tre gånger 1 timme. Om engångsfilter används måste varje parti kontrolleras för att bekräfta att de inte avger upplösligt organiskt kol.

På vissa typer av membranfilter kan adsorption av testämnet inträffa. Kontroll av att testämnet inte hålls kvar på filtret rekommenderas därför.

Centrifugering vid 40 000 ms^{-2} (4 000 g) i 15 minuter kan användas i stället för filtrering när man skall skilja mellan TOC och DOC. Metoden är inte pålitlig vid en startkoncentration av < 10 mg DOC per liter, då antingen inte alla bakterier avlägsnas eller något av kolet i bakteriernas cytoplasma återupplöses.

REFERENSLITTERATUR

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed., Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, s. 65.

— Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol.46, s. 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 412 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarisches Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschüß Wasserwesen (NAW) in DINN Deutsche Institut für Normung e. V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1948, Vol. 13 (a=, s. 169.

BILAGA III

BEDÖMNING AV SVÅRLÖSLIGA ÄMNENS BIONEDBRYTBARHET

Vid test av svårlösliga ämnens bionedbrytbarhet bör särskild uppmärksamhet ges åt nedanstående.

Trots att homogena vätskor sällan kommer att vålla problem vid provtagningen rekommenderas att homogenisera fasta material på lämpligt sätt, så att fel till följd av inhomogenitet undviks. Särskild omsorg skall ske vid uttagning av ett representativt prov på några få mg av blandningar av kemikalier och av ämnen som innehåller stora mängder orenheter.

Under testet kan man använda olika metoder för omrörning. Omrörningen skall dock vara så kraftig att kemikalien hålls dispergerad, och att överhettning, stark skumning och våldsam förskjutning undviks.

En emulgator kan användas för att framställa en stabil dispersion av kemikalien. Emulgatoren får inte vara toxisk för bakterier och får varken kunna brytas ned biologiskt eller vara skumbildande under testförhållandena.

Samma kriterier som för emulgatorer gäller för lösningsmedel.

Användning av fasta bärarmaterial till fasta testämnen rekommenderas inte, däremot kan de vara lämpliga till oljeaktiga ämnen.

När tillsatsämnen såsom emulgatorer, lösningsmedel och bärarmaterial används utförs ett blindprov med tillsatsämnen.

Alla tre respirometertesterna, CO_2, BOD och MITI kan användas för att undersöka svårlösliga ämnens bionedbrytbarhet.

REFERENSLITTERATUR

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, s. 833.

— Gerike, P. The Biodegradation of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, s. 169.

BILAGA IV

BEDÖMNING AV BIONEDBRYTBARHETEN HOS KEMISKA ÄMNEN SOM MISSTÄNKS VARA TOXISKA FÖR INOKULAT

Om ett kemiskt ämne som underkastas ett test för lätt bionedbrytbarhet inte verkar vara bionedbrytbart rekommenderas följande förfarande om man vill skilja mellan hämning av bristande bionedbrytbarhet (Reynolds et al., 1987).

Samma eller motsvarande inokulat används för toxicitetstest som för bionedbrytbarhetstest.

För att kunna bedöma toxiciteten hos kemikalier som undersöks i test av lätt bionedbrytbarhet kan man använda en eller en kombination av följande metoder: Hämning av slammets respirationshastighet (aktiverat slam – respirationshämningstest – direktiv 88/302/EEG); BOD och tillväxthämningstest.

Om hämning till följd av toxicitet skall undvikas rekommenderas användning av testämneskoncentrationer i test av lätt bionedbrytbarhet, som högst är 1/10 av de EC_{50}-värden (eller högst de EC_{20}-värden) som erhållits vid toxicitetstest. Ämnen vars EC_{50} är större än 300 mg/l kommer troligtvis inte att ha toxiska verkningar i test för lätt bionedbrytbarhet.

Ett EC_{50} på mindre än 20 gl/l kommer troligtvis att skapa betydande svårigheter vid den efterföljande testningen. Testkoncentrationerna skall vara låga, vilket kräver användning av det strikta och känsliga Closed Bottle-testet eller av ^{14}C-markerat material. Alternativt kan det vid tillvänjning av inokulat bli möjligt att använda högre testämneskoncentrationer. I det sistnämnda fallet mister testet för lätt bionedbrytbarhet dock sin specifika karaktär.

REFERENSLITTERATUR

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, s. 2259.

BILAGA V

KORREKTION AV NITRIFIKATIONENS INTERFERENS PÅ SYREUPPTAGNINGEN

Fel till följd av att inte ta hänsyn til nitrifikation vid bedömning av bionedbrytbarheten hos testämnen, som inte innehåller N, är minimal (högst 5 %) även om oxidationen av mediets innehåll av ammonium-N sker sporadiskt från testprovet till blindprovet. För testämnen som innehåller N kan dock väsentliga fel uppstå.

Om ofullständig nitrifikation sker kan reaktionsblandningens iakttagna syreupptagning korrigeras för den syremängd som har förbrukats för oxidation av ammonium till nitrit och nitrat om ändringarna i nitrit- och nitratkoncentrationen under inkuberingen bestäms med hänsyn tagen till följande reaktionsutjämningar:

$$2NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

brutto:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Från ekvation (1) blir syreupptagningen vid oxidation av 28 g kväve i form av ammoniumklorid (NH_4Cl) till nitrit 96 g, dvs. en faktor av 3,43 (96/28). På motsvarande sätt blir syreupptagningen vid oxidation av 28 g kväve till nitrat (3) 128 g, dvs. en faktor av 4,57 (128/28).

Eftersom reaktionerna är *sekvensiella*, då de sker p. g. a. deras individuella bakteriearter, kan nitratkoncentrationen öka eller minska. I det sistnämnda fallet kommer en ekvivalent mängd nitrat att bildas. Till följd av detta blir syreförbrukningen vid nitratbildning 4,57 gånger ökningen i nitratkoncentrationen, men den syremängd som är involverad i nitritbildningen blir dock 3,43 gånger ökningen av nitritkoncentrationen, eller vid en minskning av nitritkoncentrationen, en syreförlust av – 3,43 gånger koncentrationsminskningen.

Dvs.

O_2-förbrukningen vid nitratbildning = 4,57 × N-nitratkoncentrationsökningen (4)

och

O_2-förbrukningen vid nitritbildning = 3,43 × N-nitritkoncentrationsökningen (5)

och

O_2-förlusten vid nitritförsvinnande = – 3,43 × N-nitritkoncentrationsminskningen (6)

och därför blir

O_2-förbrukningen till nitrifikation = ± 3,43 × N-nitritkoncentrationsändringen
+ 4,57 × N-nitratkoncentrationsökningen (7)

och därmed

O_2-förbrukningen till C-oxidation = total iakttagen förbrukning — förbrukning till nitrifikation (8)

Alternativt kan syreupptagningen till följd av nitrifikation som en första uppskattning sättas till 4,57 × tillväxten av oxiderat N, om endast totalt oxiderat N bestäms.

Det korrigerade värdet för syreförbrukningen till C-oxidation jämförs sedan med $ThODNH_3$ beräknat enligt bilaga II.

C.5. NEDBRYTNING – BIOKEMISK SYREFÖRBRUKNING

1. METOD

1.1. INLEDNING

Syftet med denna metod är att mäta den biokemiska syreförbrukningen (BOD) för fasta eller flytande organiska ämnen.

Data som erhålls vid detta test avser vattenlösliga föreningar. Dock kan, åtminstone principiellt, även flyktiga föreningar undersökas.

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid de koncentrationer som används i testet inte inverkar hämmande på bakterier. Om testämnet inte är lösligt vid testkoncentrationen kan det vara nödvändigt att vidta särskilda åtgärder, t. ex. att använda ultraljudsdispersion, för att uppnå en god dispersion av testämnet.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

BOD definieras som den mängd upplöst syre som krävs för den biokemiska oxideringsprocessen för en angiven mängd lösning av testämnet under testbetingelser.

Resultaten uttrycks som gram BOD per gram testat ämne.

1.3. REFERENSÄMNEN

Det är önskvärt att lämpligt kontrollämne används för att kontrollera inokulatets aktivitet.

1.4. TESTMETODSPRINCIP

En förbestämd mängd av ämnet, upplöst eller dispergerat i ett väl syrsatt medium, inokuleras med mikroorganismer och inkuberas i mörker vid en konstant, definierad passande temperatur.

BOD bestäms genom skillnaden mellan mängden upplöst syre i början och i slutet av testet. Testet skall pågå i minst fem dagar och högst 28 dagar.

Parallellt med testet skall utföras ett blindprov utan innehåll av testämnet.

1.5. KVALITETSKRITERIER

BOD-bestämningen kan inte anses vara en giltig bestämning av ett ämnes bionedbrytbarhet. Detta test kan endast betraktas som ett screening-test.

1.6. METODBESKRIVNING

En preliminär lösning eller dispersion av ämnet förbereds för att uppnå en BOD-koncentration som är förenlig med den använda metoden. BOD bestäms därefter enligt lämplig nationell eller internationell standardmetod.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

BOD-innehållet i lösningen beräknas enligt den valda standardmetoden och omvandlas till gram BOD per gram testat ämne.

3. RAPPORTERING

Den använda metoden skall anges.

Den biokemiska syreförbrukningen skall vara ett medeltal av minst tre giltiga mätningar.

Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras, särskilt avseende ämnets sammansättning, orenheter, fysiskt tillstånd och toxiska effekter som kan påverka resultaten.

Eventuella tillsatser som använts för att hämma biologisk nitrifikation skall rapporteras.

4. HÄNVISNINGAR

Lista över standardiserade metoder, t. ex.:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C. 6. NEDBRYTNING – KEMISK SYREFÖRBRUKNING

1. METOD

1.1. INLEDNING

Syftet med denna metod är att mäta den kemiska syreförbrukningen (COD) för fasta eller flytande organiska ämnen på ett godtyckligt standardsätt under givna laboratoriebetingelser.

Uppgifter om ämnets formel är till nytta vid utförandet av testet och tolkningen av resultaten (t. ex. halogensalter, ferrosalter av organiska föreningar, organiska klorföreningar).

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Den kemiska syreförbrukningen är ett mått på ett ämnes förmåga att oxideras, uttryckt som den ekvivalenta mängden syre i en oxiderande reagens som förbrukas av ämnet under givna laboratoriebetingelser.

Resultatet uttrycks i gram COD per gram testat ämne.

1.3. REFERENSÄMNEN

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

1.4. TESTMETODSPRINCIP

En förbestämd mängd av ämnet, upplöst eller dispergerat i vatten, oxideras av kaliumbikromat i ett starkt svavelsyremedium med silversulfat som katalysator under återflöde i två timmar. Restmängden bikromat bestäms genom titrering med standard järnammoniumsulfat.

Vid klorhaltiga ämnen tillsätts kvicksilversulfat(*) för att reducera inverkan av klor.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Till följd av det godtyckliga sättet att bestämma COD skall resultatet mera betraktas som en "indikator på oxideringsförmågan" än som ett mått på mängden organiskt ämne.

Klorid kan inverka på detta test. Oorganiska reducerande eller oxiderande ämnen kan också inverka på BOD-bestämningen.

Vissa cykliska föreningar oxideras inte till fullo vid detta test.

1.6. METODBESKRIVNING

En inledande lösning eller dispersion av ämnet bereds så att ett COD mellan 250 och 600 mg per liter erhålls.

Anmärkningar:

Vid svårlösliga ämnen och ämnen som inte dispergerar kan finpulvriserat eller flytande ämne motsvarande ungefär 5 mg COD överföras till försöksapparaten tillsammans med vatten.

Den kemiska syreförbrukningen (COD) bestäms ofta, och särskilt för svårlösliga ämnen, i förväg med en variant av metoden, nämligen ett slutet system med tryckutjämning (H. Kelkenberg, 1975). Med denna modifikation kan det ofta med framgång företas kvantitativ bestämning av föreningar som endast med svårighet kan bestämmas genom konventionella metoder, t. ex. ättiksyra. Metoden duger dock inte för pyridin. Ökning av kaliumdikromatkoncentrationen till 0,25 N (0,0416 M) i enlighet med hänvisning 1 kan underlätta den direkta invägningen av 5-10 mg ämne, vilket är ett villkor för COD-bestämning på ämnen som är svårlösliga i vatten (hänvisning 2).

För övrig bestäms COD därefter med hjälp av en lämplig nationell eller internationell standardmetod.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

COD-innehållet i testkolven beräknas enligt den valda standardmetoden och omvandlas till gram COD per gram testat ämne.

* Efter användning skall lösningar som innehåller kvicksilversalt behandlas för att undvika spridning av kvicksilver i miljön.

3. **RAPPORTERING**

Den använda referensmetoden skall anges.

Den kemiska syreförbrukningen skall vara ett medeltal av minst tre mätningar. Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten skall rapporteras, särskilt avseende orenheter, ämnets fysiska tillstånd och egenskaper (om de är kända) som kan påverka resultaten.

Om kvicksilversulfat har använts för att minimera inverkan av klor skall detta rapporteras.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Kelkenberg, H. Z., von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8., s. 146.

2. Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, s. 169.

Lista över standardiserade metoder, t. ex.:

NBN T 91-201:Determination of the oxygen demand.

ISBN O 11 7512494:Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NTF 90-101:Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis:Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41Determination 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. NEDBRYTNING – ABIOTISK NEDBRYTNING: HYDROLYS SOM EN FUNKTION AV pH-VÄRDE

1. **METOD**

Denna metod är baserad på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1. INLEDNING

Hydrolys är en viktig reaktion som styr den abiotiska nedbrytningen. Denna reaktion är av särskild betydelse för ämnen med låg bionedbrytbarhet och den kan påverka ett ämnes beständighet i miljön.

De flesta hydrolysreaktioner är av *pseudo*-första ordningen och halveringstiden är därför oberoende av koncentration. Detta innebär att resultat som erhålls vid laboratoriekoncentrationer normalt kan extrapoleras till betingelserna i miljön.

För flera typer av kemikalier har dessutom rapporterats ett antal exempel (se hänvisning 2) på tillfredsställande överensstämmelse mellan resultat i rent och i naturligt förekommande vatten.

Förhandsuppgifter om ämnets ångtryck är till nytta vid utförandet av detta test.

Denna metod kan endast tillämpas på vattenlösliga ämnen. Orenheter påverkar resultaten.

Kemikaliers hydrolysegenskaper skall undersökas vid pH-värden som normalt finns i miljön (pH-värde 4 — 9).

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Hydrolys anger en reaktion mellan ett ämne RX med vatten. Denna reaktion kan uttryckas genom nettoutbytet mellan gruppen X och OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \quad [1]$$

Den hastighet varmed koncentrationen av RX minskar erhålls genom:

$$\text{hastighet} = k\,[H_2O] \cdot [RX] \quad [2]$$

Eftersom vatten förekommer i stort överskott jämfört med ämnet beskrivs denna typ av reaktion vanligen som en *pseudo*-första ordningens reaktion i vilken den observerade hastighetskonstanten erhålls genom relationen:

$$k_{obs} = k \times [H_2O] \quad [3]$$

Denna konstant kan bestämmas för ett pH-värde och en temperatur, T, med uttrycket:

$$k_{obs} \frac{2{,}303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

där:

t = tiden,
C_0 = ämnets koncentration vid tiden 0,
C_t = ämnets koncentration vid tiden t, och
2,303 = omvandlingsfaktorn mellan naturliga logaritmer och tiologaritmer.

Koncentrationerna uttrycks i gram per liter eller mol per liter.

Konstanten k_{obs} har dimensionen $(\text{tid})^{-1}$.

Halveringstiden, $t_{1/2}$, definieras som den tid det tar att minska testämnets koncentration med 50 %, dvs.:

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

Med uttrycken (4) och (5) kan visas att:

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{obs} \quad [6]$$

1.3. REFERENSÄMNEN

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

Följande ämnen har använts som referensämnen:

Acetylsalicylsyra (aspirin)

Fosfortionatsyra 0,0-dietyl 0-(6-metyl-2-(1metyletyl)4-pyrimidinylester (dimpylat, diazinon).

1.4. TESTMETODSPRINCIP

Ämnet upplöses i vatten vid en låg koncentration och pH-värdet och temperaturen kontrolleras.

Minskningen i ämnets koncentration med tiden följs enligt lämpligt analysförfarande.

Logaritmen av koncentrationen avbildas som en funktion av tiden och om det blir en rät linje kan första ordningens hastighetskonstant erhållas av linjens lutning (se punkt 2).

När det inte går att direkt bestämma en hastighetskonstant för en viss temperatur kan man oftast uppskatta konstanten genom att använda Arrhenius ekvation, som ger hastighetskonstantens beroende av temperaturen. Utifrån den linjära avbildningen av logaritmen av hastighetskonstanten, bestämd vid lämplig temperatur som en funktion av den reciproka absoluta temperaturen, K, kan man extrapolera värdet för hastighetskonstanten, vilken inte gick att bestämma direkt.

1.5. KVALITETSKRITERIER

I hänvisning 2 rapporteras att mätningar av hastighetskonstanter för hydrolys av 13 klasser av organiska strukturer kan vara mycket noggranna.

Repeterbarheten är särskilt beroende av kontrollen av pH-värdet och koncentrationen av det upplösta syret och den kan påverkas av förekomsten av mikroorganismer.

1.6. METODBESKRIVNING

1.6.1. **Reagenser**

1.6.1.1. *Buffertlösningar*

Testet utförs med tre pH-värden: 4,0, 7,0 och 9,0.

I detta syfte kan buffertlösningar beredas med användning av kemikalier av reagenskvalitet och destillerat eller avjoniserat sterilt vatten. Några exempel på buffertsystem presenteras i tillägget.

Hydrolyshastigheten kan påverkas av det buffertsystemet som används. Om det finns tecken på detta skall ett alternativt buffertsystem användas. I hänvisning (2) rekommenderas användning av borat- eller acetatbuffertar i stället för fosfatbuffert.

Om buffertlösningarnas pH-värde vid testtemperaturen inte är känt kan det bestämmas med en kalibrerad pH-mätare vid den valda temperaturen med en noggrannhet på ± 0,1 pH-enheter.

1.6.1.2. *Testlösningar*

Testämnet skall upplösas i den valda bufferten och koncentrationen får inte överstiga 0,01 M eller halva mättnadskoncentrationen. Det lägsta av dessa värden skall användas.

Användning av organiska lösningsmedel som är blandbara med vatten rekommenderas endast för ämnen med låg vattenlöslighet.

Mängden lösningsmedel skall vara högst 1 % och lösningsmedlet får inte inverka på hydrolysprocessen.

1.6.2. **Apparatur**

Glasflaskor med propp skall användas, men fett får inte appliceras på den slipade ytan.

Om ämnet eller buffertsystemet är flyktigt, eller om testet görs vid förhöjda temperaturer, är förseglade eller membranförslutna rör att föredra och tomma utrymmen skall undvikas.

1.6.3. **Analysmetod**

Metoden skall vara specifik så att den medger bestämning av testämnet vid testlösningens koncentrationer och den kan gärna bestå av en kombination av lämpliga analystekniker.

Vilken analysmetod som skall användas beror på ämnets art. Metoden skall vara tillräckligt noggrann och sensitiv för att upptäcka en minskning på 10 % av den initiala koncentrationen.

1.6.4. **Testbetingelser**

Testet utförs i ett termostatreglerat avgränsat utrymme eller i ett bad med en konstant temperatur på ± 0,5 °C av den valda temperaturen. Temperaturen skall hållas inom ± 0,1 °C. Åtgärder skall vidtas för att undvika inverkan av fotolys.

Alla lämpliga försiktighetsåtgärder skall vidtas för att förhindra upplösning av syre (t. ex. genombubbling med kväve eller argon i fem minuter innan lösningen framställs).

1.6.5. **Testförfarande**

1.6.5.1. *Förberedande test*

För alla ämnen skall ett förberedande test utföras vid 50 ± 0,5 °C med tre pH-värden: 4,0, 7,0 och 9,0. Tillräckligt antal mätningar skall göras för att uppskatta om halveringstiden ($t_{1/2}$) vid varje pH-värde och vid 50 °C är mindre än 2,4 timmar eller om mindre än 10 % hydrolys observeras efter fem dagar. (Man kan uppskatta att dessa värden motsvarar halveringstider som är mindre än en dag respektive längre än ett år under betingelser som är mer representativa för miljön (25 °C).

Om det förberedande testet visar att 50 % eller mer av testämnet vid vart och ett av de tre pH-värdena (4, 7 och 9) har hydrolyserats på 2,4 timmar vid 50 °C, eller mindre än 10 % har hydrolyserats efter fem dagar behöver ytterligare test inte göras.

I andra fall och för enskilda pH-värden för vilka detta villkor inte har uppfyllts, utförs test 1.

1.6.5.2. *Test 1*

Test 1 utförs vid en temperatur, helst 50 ± 0,5 °C och, om det är möjligt, under sterila betingelser vid de pH-värden för vilka det förberedande testet har visat att det är nödvändigt med ytterligare test.

Tillräckligt antal prov (minst fyra) skall väljas så att de täcker intervallet 20 — 70 % hydrolys för att undersöka om reaktionen vid de angivna pH-värdena är av *pseudo*-första ordningen.

Reaktionens ordning bestäms för varje pH-värde vid vilket test 1 utförs.

Hastighetskonstanten uppskattas vid 25 °C.

Det fortsatta testförfarandet är beroende av om det vid test 1 kan fastställas att reaktionen är av *pseudo*-första ordningen.

Om det vid test 1 inte med säkerhet kan fastställas att reaktionen är av *pseudo*-första ordningen skall ytterligare test göras enligt anvisningarna för test 2.

Om det vid test 1 med säkerhet kan fastställas att reaktionen är av *pseudo*-första ordningen skall ytterligare test göras enligt anvisningarna för test 3. (Alternativt kan det under vissa omständigheter vara möjligt att beräkna hastighetskonstanter vid 25 °C utifrån konstanter vid 50 °C, vilka har beräknats på basis av resultaten från test 1 (se 3.2.)

1.6.5.3. *Test 2*

Detta test utförs för alla pH-värden för vilka resultaten från test 1 har visat att detta test är nödvändigt:

— antingen vid en temperatur under 40 °C

— eller vid två temperaturer över 50 °C med minst 10 °C skillnad.

För varje pH-värde och temperatur vid vilka test 2 utförs skall minst sex lämpligt fördelade datapunkter bestämmas så att hydrolysgraden ligger i intervallet 20 - 70 %.

För ett pH-värde och en temperatur görs två bestämningar. Om test 2 görs vid två temperaturer över 50 °C skall den andra bestämningen utföras vid den lägre av dessa två temperaturer.

För varje pH-värde och temperatur vid vilka test 2 utförs skall där så är möjligt halveringstiden ($t_{1/2}$) uppskattas genom en grafisk framställning.

1.6.5.4. *Test 3*

Detta test utförs för alla pH-värden för vilka resultaten från test 1 har visat att detta test är nödvändigt:

— antingen vid en temperatur under 40 °C

— eller vid två temperaturer över 50 °C med minst 10 °C skillnad.

För varje pH-värde och temperatur vid vilka test 3 utförs skall tre datapunkter bestämmas, den första vid tid 0 och den andra och tredje när hydrolysgraden är högre än 30 %. Konstanten k_{obs} och $t_{1/2}$ skall beräknas.

2. **DATA**

För reaktioner av *pseudo*-första ordningen kan värdet för k_{obs} för varje pH-värde och varje testtemperatur erhållas från den grafiska framställningen av logaritmen av koncentrationen som en funktion av tiden med användning av uttrycket:

$$k_{obs} = - \text{lutning} \times 2{,}303 \qquad [7]$$

Vidare kan $t_{1/2}$ beräknas enligt ekvation 6.

Uppskatta $k_{25\,°C}$ genom att tillämpa Arrhenius ekvation, där så är möjligt.

För reaktioner som inte är av *pseudo*-första ordningen, se 3.1.

3. RAPPORTERING

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Specifikation av ämnet.

— Alla resultat som erhållits med referensämnen.

— Principer och detaljuppgifter för använd analysmetod.

— För varje test: temperatur, pH-värde, buffertsammansättning och en tabell över alla datapunkter avseende koncentration och tid.

— För reaktioner av *pseudo*-första ordningen: värdena för k_{obs} och $t_{1/2}$ och hur dessa har beräknats.

— För reaktioner som inte är av *pseudo*-första ordningen framställs resultaten grafiskt som logaritmer av koncentration som en funktion av tiden.

— Alla uppgifter och observationer som är nödvändiga för att tolka resultaten.

3.2. TOLKNING AV RESULTAT

Det kan vara möjligt att beräkna acceptabla värden för testämnets hastighetskonstant (vid 25 °C), förutsatt att det redan finns experimentella värden för aktiveringsenergin för ämnen som är homologa med testämnet och förutsatt att det är rimligt att anta att testämnets aktiveringsenergi är av samma storleksordning.

4. HÄNVISNINGAR

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111, rådets beslut C(81) 30 slutligt.

2) W. Mabey och T. Mill, "Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions", J. Phys. Chem. Ref. Data, 1978, vol. 7.2, s. 383-415.

Tillägg

BUFFERTBLANDNINGAR

A. CLARK OCH LUBS

De pH-värden som rapporteras i dessa tabeller har beräknas utifrån de potentiella mätningarna enligt Sörensens standardekvationer (1909). Det faktiska pH-värdet är 0,04 enheter högre än de angivna värdena.

Sammansättning	pH-värde
0,1 M kaliumhydrogenftalat + 0,1 N HCl vid 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalat till 100 ml	3,8
0,1 M kaliumhydrogenftalat + 0,1 N NaOH vid 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalat till 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalat till 100 ml	4,2
0,1 M monokaliumfosfat + 0,1 N NaOH vid 20 °C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat till 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat till 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat till 100 ml	7,2

0,1 M H_3BO_3 i 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH vid 20 °C

16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra till 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra till 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra till 100 ml	9,2

B. **KOLTHOFF OCH VLEESHOUWER**

Sammansättning	pH-värde
0,1 M monokaliumcitrat och 0,1 N NaOH vid 18 °C (tillsätt små tymolkristaller eller ett par milligram kvicksilverjodider för att förebygga mögelbildning)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat till 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat till 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat till 100 ml	4,2

C. **SÖRENSEN**

0,05 M borax + 0,1 N HCl

Sammansättning		pH-värde			
Borax (ml)	HCl (ml)	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M borax + 0,1 N NaOH

Sammansättning		pH-värde			
Borax (ml)	NaOH (ml)	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12