31992L0069

ДИРЕКТИВА 92/69/ЕИО НА КОМИСИЯТА
от 31 юли 1992 година
относно седемнадесетото адаптиране към техническия прогрес на Директива 67/548/ЕИО на Съвета за сближаването на законовите, подзаконовите и административните разпоредби относно класификацията, опаковането и етикетирането на опасни вещества

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива 67/548/ЕИО на Съвета от 27 юни 1967 г. за сближаването на законовите, подзаконовите и административните разпоредби относно класификацията, опаковането и етикетирането на опасни вещества ([1]); последно изменена с Директива 92/32/ЕИО ([2]), и по-специално членове 28 и 29 от нея,

като има предвид, че член 3, параграф 1 от Директива 67/548/ЕИО и член 3 от Директива 88/379/ЕИО на Съвета от 7 юни 1988 г. за сближаването на законовите, подзаконовите и административните разпоредби относно класификацията, опаковането и етикетирането на опасни вещества ([3]), последно изменена с Директива 90/492/ЕИО на Комисията ([4]), предвиждат физико-химичните свойства, токсичността и екотоксичността на веществата и препаратите да се определят съгласно методите, посочени в приложение V към Директива 67/548/ЕИО;

като има предвид, че текстът на приложение V към Директива 67/548/ЕИО се публикува в момента в две части, които респективно са приложението към Директива 84/449/ЕИО на Комисията ([5]) и приложението към Директива 88/302/ЕИО на Комисията ([6]);

като има предвид, че с оглед отчитане на техническото развитие е необходимо да се преразгледат изпитвателните методи, които фигурират в приложението към Директива 84/449/ЕИО на Комисията;

като има предвид, че с оглед отчитане на техническото развитие е необходимо да се преразгледа изпитвателният метод за тест за инхибиране на водорасли, който понастоящем фигурира в приложение към Директива 88/302/ЕИО на Комисията и поради това този изпитвателен метод трябва да се прехвърли в приложението към Директива 84/449/ЕИО;

като има предвид, че е уместно да се намали до минимум броят на животните, използвани за експериментални цели, в съответствие с Директива 86/609/ЕИО на Съвета за сближаването на законовите, подзаконовите и административните разпоредби на държавите-членки относно защитата на животните, използвани за експериментални цели ([7]);

като има предвид, че разпоредбите на настоящата директива са в съответствие със становището на Комитета по адаптиране към техническия прогрес на директивите относно премахване на техническите пречки пред търговията с опасни вещества и препарати,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Приложението към Директива 84/449/ЕИО се заменя с приложението към настоящата директива.

([1]) ОВ 196, 16.8.1967 г., стр. 1.
([2]) ОВ L 154, 5.6.1992 г., стр. 1.
([3]) ОВ L 187, 16.7.1988 г., стр. 14.
([4]) ОВ L 275, 5.10.1990 г., стр. 35.
([5]) ОВ L 251, 19.9.1984 г., стр. 1.
([6]) ОВ L 133, 30.5.1988 г., стр. 1 и ОВ L 136, 2.6.1988 г., стр. 20.
([7]) ОВ L 358, 18.12.1986 г., стр. 1.

Член 2

Тестовият метод за инхибиране на водорасли, описан в приложението към Директива 88/302/ЕИО, се заличава.

Член 3

Държавите-членки въвеждат в сила законовите, подзаконовите и административните разпоредби, необходими, за да се съобразят с настоящата директива не по-късно от 30 октомври 1993 г. Държавите-членки незабавно информират Комисията за това.

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа позоваване на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване.

Процедурата на позоваване се определя от държавите-членки.

Член 4

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 31 юли 1992 година.

За Комисията

Karel VAN MIERT

Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

към Директива 92/69/ЕИО на Комисията от 31 юли 1992 г. относно седемнадесетото адаптиране към техническия прогрес на Директива 67/548/ЕИО на Съвета за сближаване на законовите, подзаконовите и административните разпоредбите относно класифицирането, опаковането и етикетирането на опасни вещества ([1])

([1]) ОВ L 383, 29.12.1992 г., стр. 113.

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ

ЧАСТ А:	МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФИЗИКОХИМИЧНИ СВОЙСТВА	37
А.1.	Температура на топене/замръзване	37
А.2.	Температура на кипене	47
А.3.	Относителна плътност	53
А.4.	Парно налягане	58
А.5.	Повърхностно напрежение	79
А.6.	Разтворимост във вода	86
А.8.	Коефициент на разпределение	95
А.9.	Точка на възпламеняване	106
А.10.	Запалимост (твърди вещества)	108
А.11.	Запалимост (газове)	111
А.12.	Запалимост (при контакт с вода)	113
А.13.	Пирофорни свойства на твърди вещества и течности	117
А.14.	Експлозивни свойства	119
А.15.	Температура на самозапалване (течности и газове)	130
А.16.	Относителна температура на самозапалване при твърди вещества	131
А.17.	Оксидиращи свойства (твърди вещества)	134
Част Б:	МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТОКСИЧНОСТ	139
Общо въведение: част Б		139
Б.1.	Остра токсичност (орална)	142
Б.1а.	Остра токсичност (орална) — метод на фиксираната доза	145
Б.2.	Остра токсичност (инхалаторна)	149
Б.3.	Остра токсичност (дермална)	153
Б.4.	Остра токсичност (кожно дразнение)	156
Б.5.	Остра токсичност (очно дразнение)	159
Б.6.	Кожна чувствителност	163
Б.7.	Токсичност (орална) с многократни дози (28 дни)	168
Б.8.	Токсичност (инхалаторна) с многократни дози (28 дни)	172
Б.9.	Токсичност (дермална) с многократни дози (28 дни)	176
Б.10.	Мутагенно действие („in vitro“ цитогенетичен тест върху бозайници)	180
Б.11.	Мутагенно действие („in vivo“ цитогенетичен тест в костен мозък на бозайници, хромозомен анализ)	183
Б.12.	Мутагенно действие (микронуклеус тест (с микроядра)	186
Б.13.	Мутагенно действие (Esherichia coli — метод за обратни мутации)	189
Б.14.	Мутагенно действие (Salmonella typhimurium — метод за обратни мутации)	192

Част B:	МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА ЕКОЛОГИЧНА ТОКСИЧНОСТ	195
B.1.	Остра токсичност при рибите	195
B.2.	Остра токсичност за *Daphnia*	204
B.3.	Изпитване за потискане растежа на водорасли	211
B.4.	Определяне на пряката биологична разградимост	219
	B.4.A: Определяне на DOC чрез скоростта на отмиране	226
	B.4.Б: Модифициран скрининг на ОИСР	229
	B.4.B: Метод за отделяне на CO_2	234
	B.4.Г: Изпитване чрез манометрична респирометрия	239
	B.4.Д: Изпитвате по метода на изолираните проби	243
	B.4.E: MITI (Министерство на търговията и индустрията на Япония)	248
	Приложения	253
B.5.	Разграждане — биохимична потребност от кислород	258
B.6.	Разграждане — химична потребност от кислород	259
B.7.	Разграждане — абиотична хидролиза като функция от pH	261

ВЪВЕДЕНИЕ

Настоящото приложение установява методите за определяне на физикохимичните, токсикологичните и екотоксичните свойства, включени в приложения VII и VIII към Директива 79/831/ЕИО. Те се основават на методи, признати и препоръчани от компетентните международни органи (по-специално като ОИСР).

Когато такива методи не съществуват, са възприети национални стандарти или одобрени с консенсус научни методи. Най-общото правило е, тестовете да се извършват с веществото, което е посочено в Директивата. Трябва да се има предвид влиянието, което примесите могат да окажат върху резултатите от изпитванията.

Когато методите от настоящото приложение не са подходящи за изследването на дадено свойство, декларирщото лице е длъжно да обоснове използването на алтернативния метод.

Тестовете и изследванията върху животни трябва да се провеждат в съответствие с националните разпоредби и да бъдат съобразени с принципите на хуманността и международните постижения в областта на защитата на животните.

При наличието на няколко равностойни изпитвателни методи, следва да се избере метода, при който се използва минимален брой животни.

ЧАСТ А: МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФИЗИКОХИМИЧНИ СВОЙСТВА

А.1. ТЕМПЕРАТУРА НА ТОПЕНЕ/ЗАМРЪЗВАНЕ

1. **МЕТОД**

Повечето от описаните методи се основават на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСР (1). Основните принципи са дадени в позоваванията (2) и (3).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Описаните методи и апаратура се прилагат за определяне на температурата на топене на веществата, без никакви ограничения относно тяхната степен на чистота.

Изборът на метода зависи от природата на веществото, което трябва да се изследва. По тази причина, ограничаващият фактор ще бъде свързан с това, дали веществото може да се приведе в прахообразно състояние (лесно или трудно) или не.

За някои вещества е по-подходящо да се определя температурата на замръзване или втвърдяване. Ето защо, в този метод са включени стандарти и за тези определения.

Когато, поради по-особените свойства на веществото, определянето на гореспоменатите параметри е по-трудно, може да се определи точката на застиване.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Температурата на топене се определя като температурата, при която се извършва фазовият преход от твърдо към течно състояние при атмосферно налягане; тази температура напълно съответства на температурата на замръзване.

Фазовият преход при много вещества се извършва в температурен интервал, наричан „интервал на топене“.

Превръщане на мерните единици (K към °C)

$t = T - 273{,}15$

t: Целзиева температура, градус Целзий (°C)

T: термодинамична температура, по Келвин (K)

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не във всички случаи, когато се изследва ново вещество, е необходимо да се използват вещества за сравнение. Преди всичко, те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода и да позволяват сравнение с резултатите, получени по други методи.

Някои калибровъчни вещества са изброени в (4).

1.4. ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАТЕЛНИЯ МЕТОД

Определя се температурата (температурния интервал) на фазовия преход от твърдо към течно или от течно към твърдо състояние. На практика, когато се нагрява или се охлажда проба от изследваното вещество при атмосферно налягане, се определят началната температура на топене или замръзване и температурата в последната фаза на топенето или замръзването. Описани са пет типа методи, а именно: капилярен метод, методи с горещи подложки, методи за определяне температурата на замръзване, методи на термичния анализ и определяне точката на застиване (разработен за нефтени масла).

В някои случаи, е по-подходящо вместо температурата на топене да се измери температурата на замръзване.

1.4.1. **Капилярен метод**

1.4.1.1. *Устройства за температура на топене с течностна баня*

Малко количество от фино стритото вещество се поставя в капилярка и се стръсква в плътна маса. Капилярката се нагрява заедно с термометър. Повишаването на температурата се регулира така че да не надвишава 1 K/min по време на самото топене. Определят се началната и крайната температури на топене.

1.4.1.2. *Устройства за температура на топене с метален блок*

Както е описано в 1.4.1.1., но капилярката и термометърът са разположени в нагрят метален блок и могат да се наблюдават през отвори в блока.

1.4.1.3. *Отчитане с фотоклетка*

Пробата в капилярката се нагрява автоматично в метален цилиндър. С помощта на отвор в цилиндъра, светлинен лъч се насочва през веществото към прецизно калибрирана фотоклетка. В процеса на топене оптичните свойства на повечето вещества се променят от непрозрачно към прозрачно. Интензитетът на светлината, която достига до фотоклетката се увеличава и тя изпраща сигнал за спиране към цифровия индикатор, отчитащ температурата на платинов съпротивителен термометър, разположен в нагревателната камера. Този метод не е подходящ за някои силно оцветени вещества.

1.4.2. **Горещи подложки**

1.4.2.1. *Кофлеров апарат с гореща пръчка*

Кофлеровият апарат с гореща пръчка използува две парчета метал с различна топлопроводимост, нагрявани електрически, с пръчка, направена така, че температурният градиент да е почти линеен по дължината ѝ. Температурата на горещата пръчка може да се изменя по дължината и между 283 и 573 K се отчита със специално устройство, включващо плъзгач с показалец и етикети, направени специално за дадената пръчка. За да се определи температурата на топене, веществото се разстила на тънък пласт направо по повърхността на горещата пръчка. След няколко секунди се появява рязка разделителна линия между течната и твърдата фаза. Температурата на разделителната линия се отчита като стрелката се нагласява да лежи върху нея.

1.4.2.2. *Микроскоп за стапяне*

Използуват се няколко вида горещи масички за микроскопа, които служат за определяне температурата на топене на съвсем малки количества от веществото. При повечето от горещите масички, температурата се измерва с чувствителна термодвойка, но понякога се използуват и живачни термометри. Типичният апарат за температура на топене с микроскоп с гореща масичка има нагревателна камера, съдържаща метална плочка върху която пробата се поставя на стъкло. В центъра на металната плочка има отвор, през който навлиза светлината от осветителното огледало на микроскопа. Когато се използва, камерата е затворена със стъклена пластинка, така че да се изолира въздухът около пробата.

Нагряването на пробата се регулира с реостат. За много точни измервания на оптически анизотропни вещества може да се използва поляризирана светлина.

1.4.2.3. *Менискусен метод*

Този метод се използва специално за полиамиди.

Визуално се определя температурата, при която се измества менискусът от силиконово масло, включено между горещата подложка и покривното стъкло, което се поддържа от пробния образец от полиамид.

1.4.3. **Метод за определяне температурата на замръзване**

Пробата се слага в специална епруветка и се поставя в апарат за определяне температурата на замръзване. По време на охлаждането, пробата се разбърква внимателно без прекъсване, а температурата се измерва на подходящи интервали от време. Когато температурата остане постоянна при няколко последователни измервания, тази температура (коригирана с грешката на термометъра) се отчита като температура на замръзване.

Трябва да се избягва преохлаждането, като се поддържа равновесие между твърдата и течната фаза.

1.4.4. **Термичен анализ**

1.4.4.1. *Диференциален термичен анализ (ДТА)*

При тази техника се прави запис на разликата в температурите на веществото и на сравнителен материал като функция от температурата, доколкото веществото и сравнителния материал са подложени на една и съща контролирана температурна програма. Когато пробата претърпява преход, свързан с промяна на енталпията, тази промяна се проявява като ендотермично (топене) или екзотермично (замръзване) отклонение от основната линия на записа на температурата.

1.4.4.2. *Диференциална сканираща калориметрия (ДСК)*

При тази техника се прави запис на разликата в подадената енергия към веществото и към сравнителния материал като функция от температурата, доколкото веществото и сравнителния материал са подложени на една и съща контролирана температурна програма. Тази енергия представлява енергията, необходима да се установи нулева температурна разлика между веществото и сравнителния материал. Когато пробата претърпява преход, свързан с промяна на енталпията, тази промяна се регистрира като ендотермично (топене) или екзотермично (замръзване) отклонение от основната линия на записа на топлинния поток.

1.4.5. **Точка на застиване**

Този метод е разработен за нефтени масла и е подходящ да се използува за маслообразни вещества с ниски температури на топене.

След предварително нагряване, пробата се охлажда с определена скорост и характеристиките ѝ на течливост се изследват на интервали от 3 K. Най-ниската температура, при която все още се наблюдава движение на веществото се отчита като точка на застиване.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Приложимостта и точността на различните методи, които се използват за определяне температурата на топене/интервала на топене са дадени в следните таблици:

ТАБЛИЦА: ПРИЛОЖИМОСТ НА МЕТОДИТЕ

А. Капилярни методи

Метод за измерване	Вещества, които могат да се разпрашават	Вещества, които се разпрашават трудно	Температурен интервал	Оценка на точността (1)	Съществуващ стандарт
Устройства за температура на топене с водна баня	да	само в известна степен	273 до 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Устройства за температура на топене с метален блок	да	само в известна степен	293 до > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Отчитане с фотоклетка	да	няколко допълнителни приспособления	253 до 573 K	± 0,5 K	

(1) Зависи от типа на апарата и степента на чистота на веществото.

Б. Методи с горещи подложки и методи със замразяване

Метод за измерване	Вещества, които могат да се разпрашават	Вещества, които се разпрашават трудно	Температурен интервал	Оценка на точността (1)	Съществуващ стандарт
Кофлер с гореща пръчка	да	не	283 до > 573 K	± 1 K	ANSI ASTM D 3451-76
Микроскоп за стапяне	да	само в известна степен	273 до > 573 K	± 0,5 K	DIN 35736
Менискусен метод	не	специално за полиамиди	293 до > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Методи за температура на замръзване	да	да	223 до 573 K	± 0,5 K	Например BS 4695

(1) Зависи от типа на апарата и степента на чистота на веществото.

В. Термичен анализ

Метод за измерване	Вещества, които могат да се разпрашават	Вещества, които се разпрашават трудно	Температурен интервал	Оценка на точността (1)	Съществуващ стандарт
Диференциален Термичен Анализ	да	да	173 до 1273 K	До 600 K ± 0,5 K до 1273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Диференциална Сканираща Калориметрия	да	да	173 до 1273 K	до 600 K ± 0,5 K до 1273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Зависи от типа на апарата и от степента на чистота на веществото.

Г. Точка на застиване

Метод за измерване	Вещества, които могат да се разпрашават	Вещества, които се разпрашават трудно	Температурен интервал	Оценка на точността (1)	Съществуващ стандарт
Точка на застиване	за нефтени масла и маслени субстанции	за нефтени масла и маслени субстанции	223 до 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Зависи от типа на апарата и от степента на чистота на веществото.

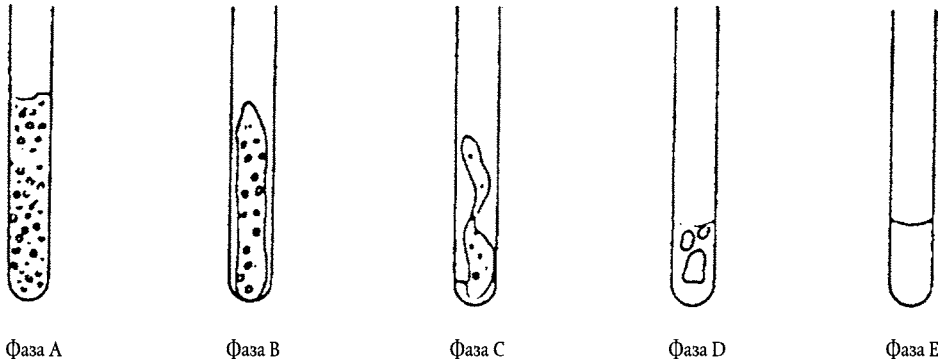
1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ

Процедурите на почти всички методи за изпитване са описани в международни и национални стандарти (виж допълнение 1).

1.6.1. **Методи с капилярна тръбичка**

При бавно повишаване на температурата, фино разпрашените вещества обикновено преминават през фазите на топене, показани на фигура 1.

Фигура 1



Фаза A: (Начало на топенето): фини капчици полепват равномерно по вътрешната стена на капилярката.

Фаза B: появява се просвет между пробата и вътрешната стена, който се дължи на свиване на стопилката.

Фаза C: свитата проба започва да се свлича надолу и да се втечнява.

Фаза D: на повърхността се образува напълно оформен менискус, но значително количество от пробата все още е в твърдо състояние.

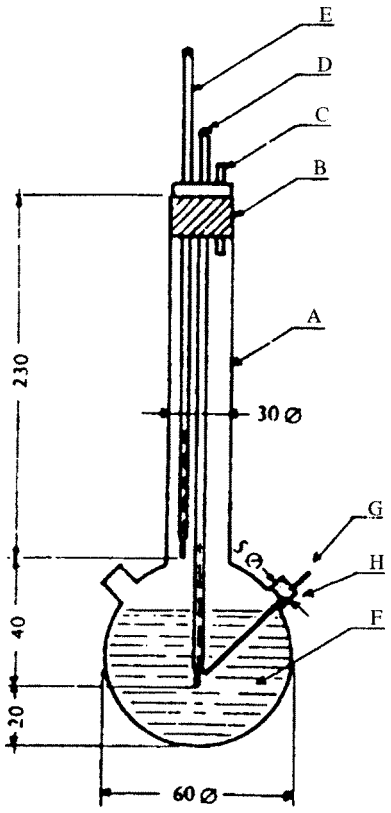
Фаза E: (Крайна фаза на топенето): вече няма твърди частици.

При определяне температурата на топене се отчитат: температурата в началото на топенето и тази в крайната му фаза.

1.6.1.1. *Прибори за определяне температурата на топене в апарат с течностна баня*

На фигура 2 е показан един тип стандартизиран апарат за температура на топене, изработен от стъкло (JIS K 0064); всички размери са в милиметри.

Фигура 2



A: Измервателен съд
B: Запушалка
C: Вентилационен отвор
D: Термометър
E: Спомагателен термометър
F: Течност за банята
G: Стъклена капилярка, 80 до 100 mm дължина, 1,0 ± 0,2 mm вътрешен диаметър, 0,2 до 0,3 mm дебелина на стената
H: Странична тръба

Течност за банята:

Трябва да се избере подходяща течност. Изборът на течността зависи от температурата на топене, която трябва да се определя: например течен парафин за температури на топене не по-високи от 473 K, силиконово масло за температури на топене не по-високи от 573 K.

За температури на топене над 523 K може да се използва смес, която се състои от три части сярна киселина и две части калиев сулфат (масово съотношение). Ако се използва такава течност, трябва да се вземат подходящи предпазни мерки.

Термометър:

Могат да се използуват само такива термометри, които съответстват на изискванията на долните или на еквивалентни стандарти:

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

Процедура на измерване:

Сухото вещество се стрива на фин прах в хаванче и се поставя в капилярка, запоена от едната страна, така че нивото на запълване да е приблизително 3 mm след като веществото се сбие в плътна маса. За да се получи равномерно уплътнена проба, капилярката трябва да се пуска от височина около 700 mm през вертикална стъклена тръба върху часовниково стъкло.

Напълнената капилярка се поставя в банята, така че средната част на живачния резервоар на термометъра да се допира до нея в областта, където е разположена пробата. Обикновено капилярката се въвежда в апарата около 10 K преди да се достигне температурата на топене.

Течността в банята се нагрява по такъв начин, че покачването на температурата да е приблизително 3 K/min. Течността трябва да се разбърква. При около 10 K под очакваната температура на топене, скоростта на покачване на температурата се регулира да не надвишава 1 K/min.

Изчисления:

Температурата на топене се изчислява както следва:

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

където:

T = коригираната температура на топене в K

T_D = температурата, отчетена по термометъра D в K

T_E = температурата, отчетена по термометъра E в K

n = брой деления на живачната нишка на термометър D при нивото на потапяне на ствола му.

1.6.1.2. *Уреди за измерване температурата на топене в метален блок*

Апаратура:

Тя се състои от:

— цилиндричен метален блок, горната част на който е куха и образува камера (виж фигура 3),

— метална запушалка с два или повече отвора, които позволяват капилярките да се монтират в металния блок,

— нагревателна система за металния блок, осигурена например от електрическо съпротивление, включено в блока,

— реостат за регулиране на входното напрежение (ако се използва електрическо нагряване),

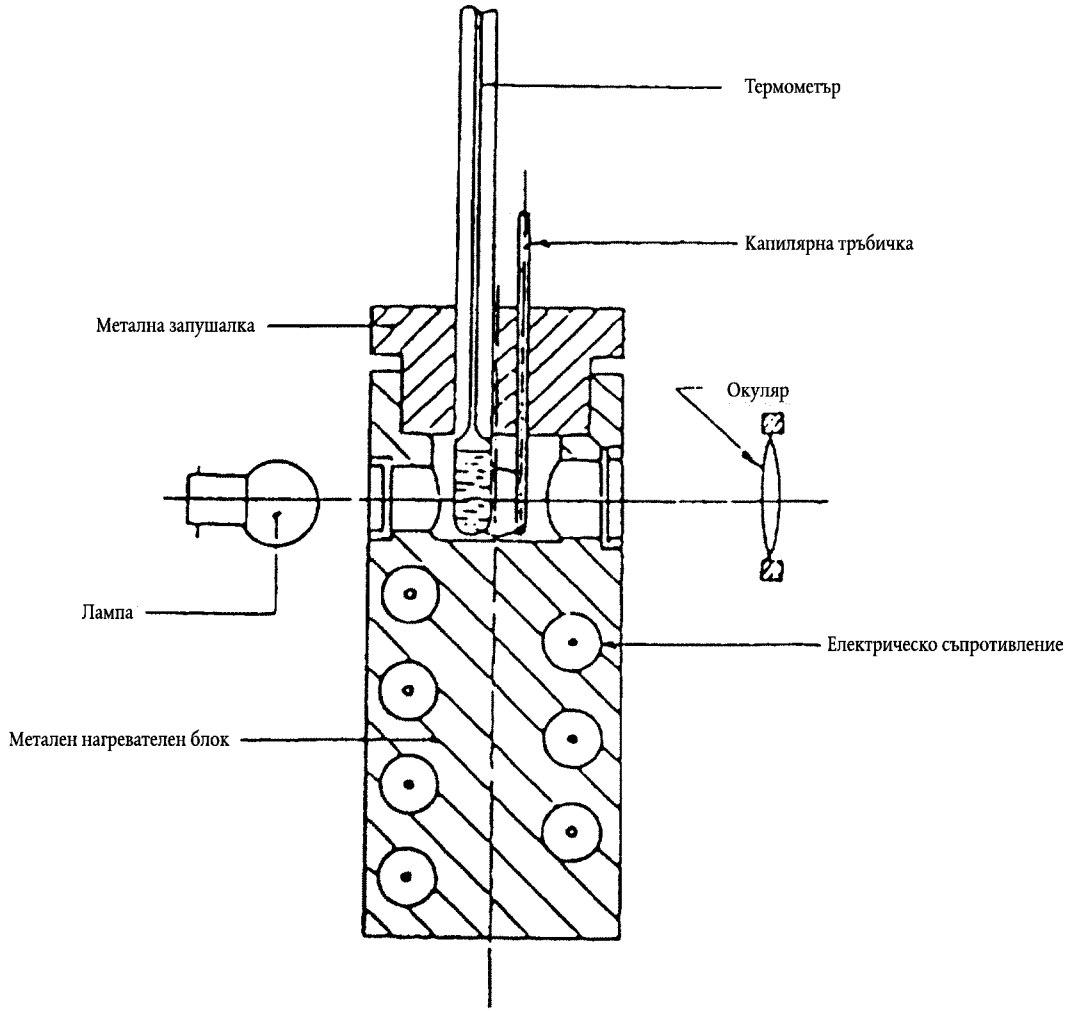
— четири прозорчета от термоустойчиво стъкло на страничните стени на камерата, диаметрално разположени и под прав ъгъл едно спрямо друго. Пред едно от тези прозорчета се монтира окуляр за наблюдение на капилярката. Другите три прозорчета се използуват за осветяване вътрешността на апарата с помощта на лампи,

— капилярка от термоустойчиво стъкло, запоена в единия край (виж 1.6.1.1).

Термометър:

Виж стандартите, споменати в 1.6.1.1. Могат да се прилагат и термоелектрични измерителни устройства със съпоставима точност.

Фигура 3



1.6.1.3. *Отчитане с фотоклетка*

Апаратура и процедура:

Апаратът се състои от метална камера с автоматична нагревателна система. Три капилярки се напълват както е описано в 1.6.1.1 и се поставят в пещта.

Може да се направят няколко линейни покачвания на температурата за калибриране на апарата и подходящото температурно покачване се нагласява електрически на предварително подбрана постоянна линейна скорост. Записващите устройства показват действителната температура на пещта и температурата на веществото в капилярката.

1.6.2. **Горещи подложки**

1.6.2.1. *Кофлер с гореща пръчка*

Виж допълнението.

1.6.2.2. *Топилен микроскоп*

Виж допълнението.

1.6.2.3. *Менискусен метод (полиалиди)*

Виж допълнението.

Скоростта на нагряване при температурата на топене трябва да е по-ниска от 1 K/min.

1.6.3. **Методи за определяне температурата на замръзване**

Виж допълнението.

1.6.4. **Термичен анализ**

1.6.4.1. *Диференциален термичен анализ*

Виж допълнението.

1.6.4.2. *Диференциална сканираща калориметрия*

Виж допълнението.

1.6.5. **Определяне точката на застиване**

Виж допълнението.

2. **ДАННИ**

В някои случаи е необходима корекция на термометъра.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

По възможност протоколът от изпитването трябва да включва следната информация:

— използван метод,

— точна спецификация на веществото (вид и примеси) и предварителни стъпки на пречистване, ако има такива,

— оценка на точността.

Като температура на топене се съобщава средно аритметичното от най-малко две измервания, които са в обхвата на оценката на точността (виж таблиците).

Ако разликата в температурите на началната и крайната фази на топенето е в границите на точността на метода, температурата в крайната фаза на топенето се приема за температура на топене на веществото; в другия случай трябва да се съобщават и двете температури.

Ако веществото се разлага или сублимира преди да се достигне температурата на топене, трябва да бъде указана температурата, при която се наблюдава този ефект.

Всяка информация и бележки, свързани с интерпретацията на резултатите, трябва да се отразят в протокола, особено онези, които се отнасят до примесите и физичното състояние на веществото.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

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

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

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

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

Допълнение

За допълнителни технически детайли може да се направи справка, например със следните стандарти.

1. **Капилярни методи**

1.1. Приспособления за измерване температурата на топене в течна баня

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals (Стандартен метод за изпитване на относителните начална и крайна точки на топене и области на топене на органични химикали);
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range (Метод за определяне точката на топене и/или интервал на топене);
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapilarverfahren (Определяне интервала на топене на смоли по капилярен метод);
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products (Методи за изпитване точката на топене на химически продукти).

1.2. Приспособления за измерване температурата на топене в метален блок

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen (Визуално определяне на температурата на топене на частично кристални пластмаси);
ISO 1218 (E)	Plastics – Polyamides – Determination of „melting point“ (Пластмаси – Полиамиди – Определяне на „точка на топене“);

2. **Нагорещени подложки**

2.1. Гореща пръчка на Кофлер

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings (Стандартни препоръчителни практики за изпитване на полимерни прахообразни покрития);

2.2. Микроскоп за точка на топене

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen (Визуално определяне на температурата на топене на частично кристални пластмаси);

2.3. Менискусен метод (полиамиди)

ISO 1218 (E)	Plastics – Polyamides – Determination of „melting point“ (Пластмаси – Полиамиди – Определяне на „точка на топене“);
ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resine injection moulding and extrusion materials (Стандартни характеристики на материали за шприцоване под налягане и екструдиране на основата на ацетални смоли);
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion“. Methode du ménisque (Полиамидни смоли. Определяне на „точката на топене“. Менискусен метод.);

3. **Методи за определяне температурата на замръзване**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point (Метод за определяне точката на кристализация);
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve) (Метод за определяне точката на топене на нефтен парафин (крива на охлаждане)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen (Определяне точката на замръзване на авиационни бензини, автомобилни бензини и моторни бензоли);
ISO 2207	Cires de petrole: détermination de la temperature de figeage (Нефтен восък: определяне точката на застиване);
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren (Определяне точката на застиване на мастни киселини);
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines (Точка на топене на парафини);
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation) (Метод за определяне точката на кристализация (точката на замръзване));
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point (Метод за определяне точката на замръзване).

4. **Термичен анализ**

4.1. Диференциален термичен анализ

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis (Стандартен метод за оценка на термичната устойчивост на химикали чрез методите на диференциалния термичен анализ);
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis (Стандартни определения на термините, отнасящи се до термичния анализ);
ASTM 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data (Стандартна практика за докладване на данни от термичния анализ);
DIN 51005	Thermische Ana!yse, Begriffe (Термичен анализ. Основни понятия).

4.2. Диференциална сканираща калориметрия

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis (Стандартен метод за оценка на термичната устойчивост на химикали чрез методите на диференциалния термичен анализ);
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis (Стандартни определения на термините, отнасящи се до термичния анализ);
ASTM 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data (Стандартна практика за докладване на данни от термичния анализ);
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe (Термичен анализ. Основни понятия);

5. **Определяне на точката на застиване**

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 (Стандартен метод за определяне точката на застиване на нефтени масла);
ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point. (Нефтени масла – Определяне точката на застиване).

А.2. ТЕМПЕРАТУРА НА КИПЕНЕ

1. МЕТОДИ

Повечето от описаните методи се основават на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСР (1). Основните принципи са дадени в позоваванията (2) и (3).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Описаните тук методи и апаратури могат да се прилагат за течности и нискотопими вещества, ако те не претърпяват химична реакция преди да се достигне температурата им на кипене (например автоокисление, прегрупировка, разграждане и др.). Методите могат да се прилагат за чисти и за непречистени течни вещества.

Акцентира се на методите, които използуват отчитане с фотоклетка и термичен анализ, защото те позволяват да се определят както температурата на кипене, така и температурата на топене. Нещо повече, измерванията могат да се извършват автоматично.

„Динамичният метод“ има това предимство, че може да се използува и за определяне на парното налягане, а температурата на кипене не е необходимо да се коригира към нормално налягане (101,325 кРа), защото то може да се задава по време на измерването с маностат.

Забележки:

Влиянието, което примесите оказват върху определянето на температурата на кипене зависи в голяма степен от природата на тези примеси. Когато в пробата има летливи примеси, които могат да повлияят на резултатите, веществото може да се пречисти.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Нормалната температура на кипене е температурата, при която наляганието на наситените пари над течността е 101,325 кРа.

Ако температурата на кипене не се измерва при нормално атмосферно налягане, зависимостта на парното налягане от температурата може да се опише с уравнението на Клаузиус-Клапейрон:

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

където:

p = парното налягане на веществото в паскали

ΔH_v = неговата топлина на изпарение в J mol^{-1}

R = универсалната моларна газова константа = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = термодинамичната температура в K

Температурата на кипене се определя спрямо външното налягане по време на измерването.

Превръщане на мерните единици:

Налягане (единици: кРа)

100 kPa = 1bar = 0,1 MPa

(„bar“ все още е резрешена единица, но не се препоръчва)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(използването на единиците „mm Hg“ и „Torr“ не е позволено)

1. atm = стандартна атмосфера = 101 325 Pa

(използването на единицата „atm“ не е позволено)

Температура (единици: K)

$t = T - 273{,}15$

t: температура по Целзий, градус Целзий (°C)

T: термодинамична температура, по Келвин (K)

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не във всички случаи когато се изследва ново вещество е необходимо да се използват вещества за сравнение. Преди всичко, те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода, а също и да позволяват да се прави сравнение с резултатите, получени по други методи.

Някои калибровъчни вещества могат да се намерят в методите, изброени в допълнението.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Пет от методите за определяне температурата на кипене (интервала на кипене) се основават на измерване температурата на кипене, останалите два метода се основават на термичен анализ.

1.4.1. **Определяне с помощта на ебулиометър**

По начало ебулиометрите са предназначени за определяне на молекулното тегло по нарастването на температурата на кипене, но те също са подходящи и за точни измервания на самата температура на кипене. Един съвсем просто устроен апарат е описан в ASTM D 1120-72 (виж допълнението). В този апарат, при равновесни условия атмосферно налягане, течността се нагрява докато започне да кипи.

1.4.2. **Динамичен метод**

Този метод включва измерване на температурата на повторна кондензация на парите с помощта на подходящ термометър в обратния хладник по време на кипенето. При този метод може да се изменя налягането.

1.4.3. **Дестилационен метод за температура на кипене**

Този метод включва дестилация на течността, измерване температурата на повторна кондензация на парите и определяне количеството на дестилата.

1.4.4. **Метод на Сиволобоф** (Siwoloboff)

Пробата се нагрява в епруветка, поставена в течността на нагревателна баня. В епруветката с пробата е потопена запоена капилярка, която съдържа въздушно мехурче в долната си част.

1.4.5. **Отчитане с фотоклетка**

По принципа на Сиволобоф се провежда автоматично фотоелектрично измерване, като се използва увеличаващия се брой мехурчета.

1.4.6. **Диференциален термичен анализ**

При тази техника се прави запис на разликата в температурите на веществото и на сравнителен материал като функция от температурата, докато веществото и материала за сравнение са подложени на една и съща контролирана температурна програма. Когато пробата претърпява преход, свързан с промяна на енталпията, тази промяна се отбелязва като ендотермично отклонение (кипене) от основната линия на температурния запис.

1.4.7. **Диференциална сканираща калориметрия**

При тази техника се прави запис на разликата в подадените енергии към веществото и към сравнителен материал като функция от температурата, докато веществото и сравнителния материал са подложени на една и съща контролирана температурна програма. Тази енергия представлява енергията, необходима да се установи нулева температурна разлика между изследваното вещество и образеца. Когато пробата претърпява преход, свързан с промяна на енталпията, тази промяна се отбелязва чрез ендотермично отклонение (кипене) от основната линия на записа на топлинния поток.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Приложимостта и точността на различните методи за определяне температурата на кипене/интервала на кипене са дадени в таблица 1.

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ НА МЕТОДИТЕ

Метод на изпитване	Оценка на точността	Съществуващ стандарт
Ебулиометър	± 1,4 K (до 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (до 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Динамичен метод	± 0,5 K (до 600 K) (2)	
Дестилационен процес (област на кипене)	± 0,5 K (до 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
По Сиволобоф	± 2 K (до 600 K) (2)	
Отчитане с фотоклетка	± 0,3 K (при 373 K) (2)	
Диференциална термична калориметрия	± 0,5 K (до 600 K) ± 2,0 K (до 1273 K)	ASTM E 537-76
Диференциална сканираща калориметрия	± 0,5 K (до 600 K) ± 2,0 K (до 1273 K)	ASTM 537-76

(1) Тази точност е валидна само за опростен апарат, като например описания в ASTM D 1120-72; тя може да се подобри с по-усъвършенствани ебулиометрични прибори.
(2) Валидна само за чисти вещества. Използването при други условия трябва да се оправдае.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ

Начините на работа при някои от методите са описани в международни и национални стандарти (Виж допълнението).

1.6.1. **Ебулиометър**

Виж допълнението.

1.6.2. **Динамичен метод**

Виж метод А.4. за определяне на парното налягане.

Записва се температурата на кипене, която се наблюдава при приложено налягане от 101,325 кРа.

1.6.3. **Дестилационен процес (интервал на кипене)**

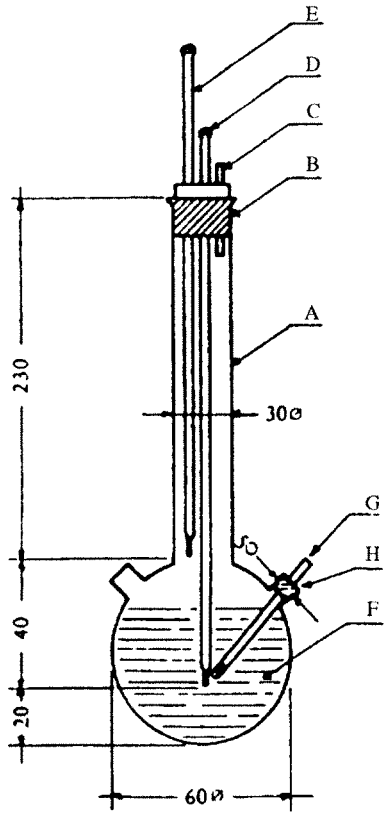
Виж допълнението.

1.6.4. **Метод на Сиволобоф.**

Пробата се нагрява в апаратурата за определяне на температура на топене в епруветка с диаметър приблизително 5 mm (фигура 1).

На фигура 1 е показан един тип стандартизиран апарат за температури на топене и кипене (JIS K 0064) (направен е от стъкло, всички размери са в милиметри).

Фигура 1



A : Измервателен съд
B : Запушалка
C : Вентилационна тръбичка
D : Термометър
E : Спомагателен термометър
F : Течност на банята
G : Епруветка за пробата, максимум 5 mm външен диаметър; съдържа капилярка с дължина приблизително 100 mm; приблизителен вътрешен диаметър 1 mm и приблизителна дебелина на стената от 0,2 до 0,3 mm.
H : Странична тръба

В тръбата за пробата се поставя капилярка (кипяща капилярка), запоена на разстояние около 1 cm над долния край. Нивото, до което се запълва с изследваното вещество е такова, че запоената част на капилярката да се намира под повърхността на течността. Тръбата с пробата, съдържаща кипящата капилярка се закрепва или към термометъра с гумена лента или се фиксира с подпора отстрани (виж фигура 2).

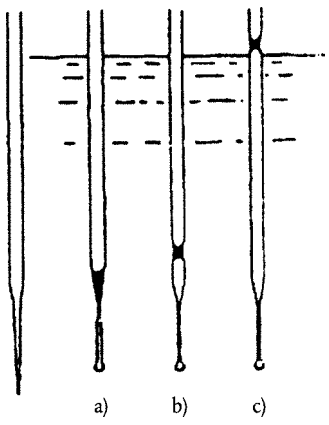
Фигура 2

Принцип по Сиволобоф



Фигура 3

Модифициран принцип



Течността за банята се избира според температурата на кипене. При температури до 573 K може да се използва силиконово масло. Течен парафин може да се използва само до 473 K. Отначало нагряването на течността в банята трябва да се нагласи така, че скоростта на повишаване на температурата да е 3 K/min. Течността на банята трябва да се разбърква. При около 10 K под очакваната температура на кипене нагряването се забавя, така че скоростта на повишаване на температурата да не надвишава 1 K/min. С приближаването до температурата на кипене, от кипящата капилярка бързо започват да се появяват мехурчета.

Температурата на кипене е тази температура, когато при моментно охлаждане, веригата от мехурчета се прекъсва и течността в капилярката започва внезапно да се покачва. Показанието на термометъра в този момент представлява температурата на кипене на веществото.

При модифицирания принцип (фигура 3), температурата на кипене се определя в капилярка за температура на топене. Капилярката се изтегля на дължина около 2 cm в единия край така че да образува остър връх (a) и се засмуква малко количество от пробата. Отвореният край на изтънената капилярка се затваря чрез стопяване така, че в края да се разположи малко въздушно мехурче. При нагряването в апарата за температура на топене (b) въздушното мехурче се разширява. Температурата на кипене съответства на температурата, при която тапата, образувана от веществото над въздуха, достигне до нивото на течността на банята (c).

1.6.5. **Отчитане с фотоклетка**

Пробата се нагрява в капилярка във вътрешността на нагрят метален блок.

През подходящ отвор в блока се насочва светлинен лъч, който преминава през веществото и попада върху прецизно калибрирана фотоклетка.

В процеса на повишаване температурата на пробата, единични въздушни мехурчета се появяват от кипящата капилярка. Когато се достигне температурата на кипене, броят на мехурчетата нараства много. Това води до промяна в интензитета на светлината, регистрирана от фотоклетката и изпраща сигнал за застопоряване показанието на индикатора, който отчита температурата на платинов съпротивителен термометър, разположен в блока.

Този метод е особено подходящ, защото позволява измервания при температури под стайната до 253,15 K (- 20 °C), без да се налагат промени в апарата. Приборът просто трябва да се постави в охлаждаща баня.

1.6.6. **Термичен анализ**

1.6.6.1. *Диференциален термичен анализ*

Виж допълнението.

1.6.6.2. *Диференциална сканираща калориметрия*

Виж допълнението.

2. **ДАННИ**

При малки отклонения от нормалното налягане (максимум ± 5 кPa), температурите на кипене се нормализират към T_n с числовото уравнение на Сидни Юнг:

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

където:

$\Delta p = (101\ 325 - p)$ [отбележи знака]

p = измерено налягане в кPa

f_T = скоростта на промяна на температурата на кипене с налягането в K/кPa

T = измерената температура на кипене в K

T_n = температурата на кипене, коригирана към нормално налягане в K

Коефициентите на температурната корекция f_T и уравненията за тяхното приблизително определяне за много вещества са включени в споменатите по-горе международни и национални стандарти.

Например методът в DIN 53171 дава следните груби корекции за разтворители, включени в бои:

ТАБЛИЦА 2: КОЕФИЦИЕНТИ ЗА ТЕМПЕРАТУРНА КОРЕКЦИЯ f_T

Температура T (K)	Корекционен коефициент 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	0,40
548,15	0,45
573,15	0,47

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

По възможност, при отчитане на резултатите от изпитването трябва да се включи следната информация:

— използван метод,

— точна спецификация на веществото (вид и примеси) и предварителни етапи на пречистване, ако има такива,

— оценка на точността.

Като температура на кипене се съобщава средното аритметично от най-малко две измервания, които са в границите на оценката на точността (виж таблица 1).

Трябва да се укажат както измерените температури на кипене и тяхната средна стойност, така и налягането (наляганията) в kPa, при което са проведени измерванията. За предпочитане е наляганията да са близки до нормалното атмосферно налягане.

Цялата информация и бележките относно интерпретацията на резултатите трябва да се докладват и особено онези, които са свързани с примесите и физичното състояние на веществото.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

(1) ОИСР, Paris, 1981, Test guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final.

(2) IUPAC, B.Le Neindre, B.Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Burretworths, London 1975, volume II.

(3) R.Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

Допълнение

За допълнителни технически детайли, може да се направи справка например със следните стандарти:

1. **Ебулиометър**

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

2. **Дестилационен процес (интервал на кипене)**

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

3. **Диференциален термичен анализ и диференциална сканираща калориметрия**

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

А.3. ОТНОСИТЕЛНА ПЛЪТНОСТ

1. **МЕТОД**

Описаните методи се основават на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСР (1). Основните принципи са дадени в позоваване (2).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Описаните методи за определяне на относителната плътност са приложими за твърди и течни вещества, без всякакво ограничение с оглед тяхната степен на чистота. Различните методи, които могат да се използват, са дадени в таблица 1.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Относителната плътност D_4^{20} на твърди вещества и течности представлява съотношението между масата на даден обем от веществото, което ще се изследва, определена при 20 °C, и масата на същия обем вода, определена при 4 °C. Относителната плътност е безразмерна величина.

Плътността на едно вещество ρ е частното на масата m и обема му v.

В системата SI плътността ρ се дава в kg/m^3.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ (1) (3)

Не е необходимо да се използват вещества за сравнение във всички случаи когато се изследва ново вещество. Преди всичко, те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода и да позволяват да се правят сравнения с резултатите, получени по други методи.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДИТЕ

Използват се четири класа методи.

1.4.1. **Методи основани на силата на изтласкване**

1.4.1.1. *Ареометър (за течни вещества)*

Достатъчно точни и бързи измервания на плътността могат да се получат с плаващи ареометри, които позволяват плътността на една течност да се изчисли от дълбочината на потапяне по показанията на градуирана скала.

1.4.1.2. *Хидростатична везна (за течни и твърди вещества)*

За определяне на плътността може да се използва разликата в теглата на изследваната проба, измерени във въздуха и в подходяща течност (например вода).

За твърди вещества, измерената плътност е представителна само за конкретната проба, с която е извършено измерването. За определяне плътността на течности, тяло с известен обем, v се претегля отначало на въздуха и след това в течността.

1.4.1.3. *Метод с потопено тяло (за течни вещества)* (4)

При този метод плътността на една течност се определя от разликата в резултатите, получени при претеглянето на течността преди и след потапянето на тяло с известен обем в нея.

1.4.2. **Пикнометрични методи**

За твърди вещества или течности могат да се използват пикнометри с различни форми и с известни обеми. Плътността се изчислява от разликата в теглата на празния и пълния пикнометър и неговия известен обем.

1.4.3. **Пикнометри с въздушно сравняване** (за твърди вещества)

Плътността на едно твърдо вещество с произволна форма може да се измери при стайна температура с помощта на пикнометър с въздушно сравняване. Обемът на веществото се измерва на въздуха или в инертен газ в цилиндър с променлив калибриран обем. За да се изчисли плътността, след като приключи измерването на обема, се прави едно измерване и на масата.

1.4.4. **Осцилиращ денситометър** (5) (6) (7)

Плътността на една течност може да се измери с осцилиращ денситометър. Механичен осцилатор, конструиран под формата на U-видна тръба се привежда в трептене при резонансната честота на осцилатора, която зависи от масата му. Въвеждането на проба променя резонансната честота на осцилатора. Апаратът трябва да се калибрира с помощта на две течности с известни плътности. Препоръчително е тези течни вещества да се подберат така че плътностите им да покриват обхвата, в който ще се извършва измерването.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Приложимостта на различните методи, които се използват за определяне на относителната плътност е показана в таблицата.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ

В допълнението са дадени като примери стандарти, в които може да се направи справка за допълнителни технически подробности.

Изпитванията трябва да се извършват при 20 °C, като се правят поне по две измервания.

2. **ДАННИ**

Виж стандартите.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

По възможност, протоколът от изпитванията трябва да включва следната информация:

— използван метод,

— точна спецификация на веществото (вид и примеси) и предварителни етапи на пречистване, ако има такива.

Относителната плътност D_4^{20} трябва да се съобщава по начина, определен в 1.2., заедно с физичното състояние на измерваните вещества.

Цялата информация и бележките относно интерпретацията на резултатите трябва да се включат в протокола, особено онези, които са свързани с примесите и физичното състояние на веществото.

ТАБЛИЦА: ПРИЛОЖИМОСТ НА МЕТОДИТЕ

Метод на измерване	Плътност		Твърди вещества	Течности
	Максимален възможен динамичен вискозитет	Съществуващи стандарти		
1.4.1.1. Хидрометър		да	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Хидростатична везна				
а) твърди вещества	да			ISO 1183 (A)
б) течности		да	5 Pa s	ISO 901 и 758
1.4.1.3. Метод с потопено тяло		да	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Пикнометър				ISO 3507
а) твърди вещества	да			ISO 1183 (B) NF T 20-053
б) течности		да	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Пикнометър с въздушно сравняване	да			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Осцилиращ денситометър		да	5 Pa s	

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

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

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

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

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

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

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

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

Допълнение

За допълнителни технически детайли може да се направи справка например със следните стандарти:

1. **МЕТОДИ СЪС СИЛА НА ИЗТЛАСКВАНЕ**

1.1. Ареометър

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions (Ареометър; Основни инструкции);
DIN12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use;
	Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation;
	Part III: Use and test.
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose;
NF T 20-050	Chemical products for industrial use - Determination of density of liquids - Areometric method;
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers;

1.2. Хидростатична везна

За твърди вещества

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics;
NF T 20-049	Chemical products for industrial use - Determination of 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 elastomers; determination of density;

За течни вещества

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

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 и 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. Метод с потопено тяло

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

2. **ПИКНОМЕТРИЧНИ МЕТОДИ**

2.1. За течни вещества

ISO 3507	Pycnometers;
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C;
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous);
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $l00,10^{-6}$ m^2 s^{-1} at 15 °C);

DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798);
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than l00,10^{-6} m^2 s^{-1} at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C);
DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen);
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801);
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol - water mixture);
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous);
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer;
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density;
ASTM D 297	Section 15: Rubber products - chemical analysis;
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds;
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method);
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method;
NF T 20-053	Chemical products for industrial use - Determination of density of solids in powder and liquids - Pyknometric method;

2.2. За твърди вещества

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

3. **ПИКНОМЕТЪР С ВЪЗДУШНО СРАВНЯВАНЕ**

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

А.4. ПАРНО НАЛЯГАНЕ

1. **МЕТОД**

Повечето от описаните методи се основават на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСР (1). Основните принципи са дадени в позоваванията (2) и (3).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

За провеждането на това изпитване е полезно да се знае предварително структурата, температурата на топене и температурата на кипене на веществото.

Не съществува единствена измервателна процедура, приложима за целия обхват от парни налягания. Затова се препоръчва да се използват няколко метода за измерване на парното налягане от $< 10^{-4}$ до 10^5 Pa.

Примесите обикновено влияят върху парното налягане до степен, която зависи значително от вида им.

Когато в пробата има летливи примеси, които биха могли да повлияят на резултата, веществото може да се пречисти. Също така, може да е подходящо да се укаже и парното налягане на материала с техническа степен на чистота.

Някои от описаните тук методи използват апарати с метални части; това трябва да се има предвид когато се изследват вещества с корозивно действие.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Парното налягане на едно вещество е налягането на наситените пари над твърдото или течно вещество. В условията на термодинамично равновесие, парното налягане на чистото вещество зависи само от температурата.

Трябва да се използва SI– единицата за налягане, която е Паскал (Pa).

Мерните единици, употребявани в миналото и техните коефициенти на превръщане са следните:

1 Torr (= 1 mm Hg) =	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 атмосфера =	$1{,}013 \times 10^5$ Pa
1 bar =	10^5 Pa

SI -единицата за температура е Келвин (K).

Универсалната моларна газова константа R е 8,314 J mol^{-1} K^{-1}.

Зависимостта на парното налягане от температурата се описва с уравнението на Клаузиус-Клапейрон:

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

където:

p = парното налягане на веществото в паскали

ΔH_v = неговата топлина на изпарение в J mol^{-1}

R = универсалната моларна газова константа в J mol^{-1} K^{-1}

T = термодинамичната температура в K

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не е необходимо да се използват сравнителни вещества във всички случаи, когато се изследва ново вещество. Преди всичко, те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода, както и да позволяват сравнение с резултатите, получени по други методи.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДИТЕ

Предложени са седем метода за определяне на парното налягане, които могат да се прилагат в различни обхвати от парни налягания. Във всеки метод, парното налягане се определя при няколко температури. В ограничен температурен интервал, логаритъмът от парното налягане на едно чисто вещество е линейна функция на обратната стойност на температурата.

1.4.1. **Динамичен метод**

При динамичния метод се измерва температурата на кипене, която се отнася за дадено налягане.

Препоръчителен обхват:

10^3 до 10^5 Pa.

Този метод се препоръчва също и за определяне на нормалната температура на кипене и е приложим за тази цел до 600 K.

1.4.2. **Статичен метод**

При статичния процес се определя парното налягане, което се установява в една затворена система при дадена температура в условията на термодинамично равновесие. Този метод е подходящ за еднокомпонентни и многокомпонентни твърди и течни вещества.

Препоръчителен обхват:

10 до 10^5 Pa.

Ако се вземат предпазни мерки, горният метод може да се използва и в областта от 1 до 10 Pa.

1.4.3. **Изотенископ**

Този стандартизиран метод също е статичен, но обикновено не е подходящ за многокомпонентни системи. Допълнителна информация може да се получи в ASTM метод D-2879-86.

Препоръчителен обхват:

от 100 до 10^5 Pa.

1.4.4. **Ефузионен метод: Везна за парно налягане**

Определя се количеството вещество, което напуска една клетка за единица време, през отвор с известен размер, в условията на вакуум, така че връщането на веществото в клетката да е пренебрежимо малко (например чрез измерване на импулса, който парната струя генерира върху чувствителна везна или чрез измерване на загубата на тегло).

Препоръчителна област:

от 10^{-3} до 1 Pa.

1.4.5. **Ефузионен метод: по загубата на тегло или чрез улавяне на изпареното вещество**

Методът се основава на измерване масата от изпитваното вещество, която изтича под формата на пари за единица време, от Кнудсенова клетка (4), през микро-отверстие в условията на свръх-вакуум. Масата на изтеклите пари може да се получи или като се определи загубата на маса от клетката, или чрез кондензация на парите при ниска температура и определяне количеството на изпареното вещество, като се използва хроматографски анализ. Парното налягане се изчислява чрез прилагане на зависимостта на Херц—Кнудсен.

Препоръчителен обхват:

от 10^{-3} до 1 Pa.

1.4.6. **Метод с насищане на газ**

Поток от инертен газ-носител се пропуска над веществото по такъв начин, че да се насити с неговите пари. Количеството на пренесения материал от известно количество газ-носител може да се измери или като се събере в подходящ уловител, или с помощта на присъединена последователно аналитична техника. След това, това количество се използува, за да се изчисли парното налягане при дадена температура.

Препоръчителен обхват:

от 10^{-4} до 1 Pa.

Ако се вземат предпазни мерки, този метод може да се прилага също и в областта от 1 до 10 Pa.

1.4.7. **Въртящ се ротор**

В измерителния уред с въртящ се ротор, същинският измервателен елемент е малко стоманено топче, което е окачено в магнитно поле и се върти с висока скорост. Налягането на газа се изчислява от забавянето на стоманеното топче, което зависи от натиска върху него.

Препоръчителен обхват:

от 10^{-4} до 0,5 Pa.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Различните методи за определяне на парното налягане са сравнени по тяхната приложимост, повторяемост, възпроизводимост, обхват на измерване и съществуващ стандарт.

ТАБЛИЦА: КРИТЕРИЙ ЗА КАЧЕСТВО

Метод на измерване	Вещества		Оценка на повторяемостта (1)	Оценка на възпроизводимостта (1)	Препоръчителен обхват	Съществуващ стандарт
	твърди вещества	течности				
1.4.1. Динамичен метод	Ниско топими	да	до 25 %	До 25 %	10^3 Pa до 2×10^3 Pa	-
			1 до 5 %	1 до 5 %	2×10^5 Pa до 10^5Pa	-
1.4.2. Статичен метод	да	да	5 до 10 %	5 до 10 %	10 Pa до 10^5Pa (2)	NFT 20-048 (5)
1.4.3. Изотенископ	да	да	5 до 10 %	5 до 10 %	10^2 Pa до 10^5Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4. Ефузионен метод: везна за парно налягане	да	да	5 до 20 %	до 50 %	10^{-3} до 1 Pa	NFT 20-047 (6)
1.4.5. Ефузионен метод:загуба на тегло	да	да	10 до 30 %	-	10^{-3} до 1 Pa	-
1.4.6. Метод с насищане на газ	да	да	10 до 30 %	до 50 %	10^{-4} до 1 Pa (2)	-
1.4.7. Метод с въртящ се ротор	да	да	10 до 20 %	-	10^{-4} до 0,5 Pa	-

(1) Зависи от степента на чистота.

(2) Този метод може да се използва и в областта 1 до 10 Pa като се вземат предпазни мерки.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ

1.6.1. **Динамично измерване**

1.6.1.1. *Апаратура*

Измервателната апаратура по принцип се състои от съд за кипене с присъединен към него стъклен или метален хладник (фигура 1), устройство за измерване на температурата и устройство за регулиране и измерване на налягането. Един типичен измервателен апарат, показан на схемата, е направен от термоустойчиво стъкло и е съставен от пет части:

Голямата, отчасти двойностенна тръба се състои от нагреваема връзка на шлиф с кожух, хладник, охладителен съд и входен отвор.

Стъкленият цилиндър, с „помпа“ на Котрел, е монтиран в зоната за кипене на тръбата и има груба повърхност от грапаво стъкло, за да се избегнат „тласъците“ при кипенето.

Температурата се измерва с подходящ термочувствителен елемент (например съпротивителен термометър, изолирана термодвойка), вкаран в апарата до точката на измерването (№ 5, фигура 1) през подходящ вход (напр. връзка с мъжки шлиф).

Направени са необходимите връзки към устройствата за регулиране и измерване на налягането.

Разширение, което действа като буферен обем е свързано към измервателния апарат с помощта на капилярна тръба.

Съдът, в който става кипенето се загрява с нагревателен елемент (например патронен нагревател), въведен в стъкления апарат от долната му страна. Необходимият за нагряването ток се настройва и регулира с термодвойка.

Нужният вакуум в диапазона от 10^2 Pa до около 10^5 Pa се създава с вакуумпомпа.

Подходящ клапан се използва за дозиране на въздуха или азота, чрез които се регулира налягането (измервателен обхват приблизително 10^2 до 10^5 Pa) и за вентилация.

Налягането се измерва с манометър.

1.6.1.2. *Процедура на измерване*

Парното налягане се измерва като се определя температурата на кипене на пробата при няколко определени налягания между грубо 10^3 и 10^5 Pa. Ако при постоянно налягане, температурата също не се променя, това показва, че е достигната температурата на кипене. С този метод не могат да се измерват вещества, които образуват пяна.

Веществото се поставя в чистия сух съд за пробата. Проблеми могат да възникнат с веществата, които не са в прахообразно състояние, но в някои случаи те могат да се решат като се нагрее охладителния кожух. След напълване на съда, апаратът се затваря плътно при фланеца и веществото се дегазира. След това, се наглася на най-ниското желано налягане и се включва нагряването. В същото време, температурният сензор се свързва със записващо устройство.

Равновесието е достигнато, когато при постоянно налягане се отчита една и съща температура на кипене. Особено много трябва да се внимава кипенето да не става на тласъци. Освен това, в охладителя трябва да се извършва пълна кондензация на парите. Когато се определя парното налягане на нискотопими твърди вещества, трябва да се вземат мерки да не се блокира кондензатора.

След като се регистрира тази равновесна точка, уредът се наглася на по-високо налягане. Процесът продължава по този начин докато се достигне налягане от 105 Pa (общо приблизително 5 до 10 измервателни точки). За проверка, равновесните точки трябва да се повторят и при намаляване на налягането.

1.6.2. **Статично измерване**

1.6.2.1. *Апаратура*

Апаратът се състои от контейнер за пробата, нагревателна и охладителна система за регулиране на температурата на пробата и за измерване на температурата. Апаратът също включва и прибори за регулиране и измерване на налягането. Фигури 2a и 2b илюстрират основните използвани принципи.

Камерата за пробата (фигура 2a) е ограничена от едната страна от подходящ високовакуумен клапан. Към другата му страна е прикрепена U–образна тръба, която съдържа подходяща манометрична течност. Единият край на U–образната тръба се разклонява към вакуумпомпата, цилиндъра с азот или вентилационния клапан и към манометъра.

Вместо U–образна тръба може да се използва манометър с индикатор за налягане (фигура 2b).

За да се регулира температурата на пробата, съдът с пробата заедно с клапана и U–образната тръба (или манометъра) се поставят в баня, в която температурата се поддържа постоянна с точност ± 0,2 K. Измерванията на температурата стават върху външната стена на съда, съдържащ пробата или вътре в самия съд.

За обезвъздушаване на апаратурата се използва вакуумпомпа с охлаждащ уловител за парите преди нея.

При метод 2a, парното налягане на веществото се измерва индиректно като се използва нулев индикатор. При това се отчита факта, че плътността на течността в U-видната тръба се променя, ако температурата се измени значително.

В зависимост от обхвата на налягането и химичните отнасяния на веществото, като нулеви индикатори в U-видната тръба могат да се използват следните течности: силиконови течности, фталати. Изпитваното вещество не бива да се разтваря забележимо или да реагира с течността в U-видната тръба.

В областта от нормалното въздушно налягане до 102 Pa, в манометъра може да се използва живак, докато силиконовите течности и фталатите са подходящи да се използват под 102 Pa до 10 Pa. Нагреваемите мембранни капацитивни манометри могат да се прилагат дори под 10^{-1} Pa. Съществуват и други типове манометри, които могат да се ползват под 102 Pa.

1.6.2.2. *Процедура на измерване*

Преди измерването всички компоненти на апаратурата, показана на фигура 2, трябва основно да се почистят и подсушат.

При метод 2a, U-видната тръба се напълва с избраната течност, която трябва да се дегазира при повишена температура преди да започне отчитането.

Изпитваното вещество се поставя в апарата, който се затваря и температурата се намалява достатъчно, за да може да се дегазира. Температурата трябва да е достатъчно ниска, за да осигурява пълно изпомпване на въздуха, но в случай на многокомпонентна система, тя не бива да променя състава на материала. Ако е необходимо, равновесието може да се установи по-бързо чрез разбъркване.

Пробата може да се преохлади с помощта например на течен азот (като се внимава да се избегне кондензацията на въздуха или на помпената течност) или със смес от етанол и сух лед. За нискотемпературни измервания се използва баня с регулируема температура, свързана с хладилен ултратермостат.

Клапанът над съда с пробата се отваря и в продължение на няколко минути се засмуква, за да се отстрани въздухът. След това клапанът се затваря и температурата на пробата се понижава до най-ниското желано ниво. Ако е необходимо, операцията по дегазирането трябва да се повтори няколко пъти.

Когато пробата се нагрява, налягането на парите се увеличава. Това променя равновесието на течността в U-видната тръба. За да се компенсира тази промяна, в апарата през клапан се въвеждат азот или въздух, докато течността в индикатора на налягането отново достигне нулата. Необходимото за това налягане може да се отчете с прецизен манометър при стайна температура. Това налягане съответства на парното налягане на веществото при дадената температура на измерване.

Метод 2b е подобен, но парното налягане се отчита директно.

Температурната зависимост на парното налягане се определя на подходящи малки интервали (приблизително 5 до 10 измервателни пункта общо) докато се достигне желаният максимум. За проверка, отчитането при ниски температури трябва да се повтори.

Ако стойностите, измерени при това повторно отчитане не съвпадат с кривата, получена при повишаване на температурата, това може да се дължи на една от следните причини:

1. Пробата все още съдържа въздух (например високовискозните материали) или нискокипящи вещества, които се отделят при нагряването и могат да се отстранят чрез засмукване след допълнително преохлаждане.

2. Температурата на охлаждане не е достатъчно ниска. В този случай, като охлаждащ агент трябва да се използва течен азот.

   Ако причината е 1 или 2, то измерванията трябва да се повторят.

3. Веществото претърпява химична реакция в изследвания температурен интервал (например разграждане, полимеризация).

1.6.3. **Изотенископ**

Пълно описание на този метод може да се намери в позоваване 7. Принципът на измервателното устройство е показан на фигура 3. Подобно на статичния метод, описан в 1.6.2, изотенископът е подходящ за изследване на твърди вещества и на течности.

Когато се изпитват течности, самото вещество служи за флуид в спомагателния манометър. В изотенископа се поставя количество от течността, достатъчно да запълни резервоара и късото коляно на манометъра. Изотенископът се присъединява към система за вакуум и се обезвъздушава, след което се запълва с азот. Евакуацията и прочистването на системата се повтарят два пъти, за да се отстрани остатъчният кислород. Напълненият изотенископ се поставя в хоризонтално положение, така че пробата да се разстеле на тънък пласт в резервоара за пробата и в зоната на манометъра (U-видна част). Налягането на системата се намалява до 133 Pa и пробата внимателно се нагрява до малко преди да закипи (отстраняване на разтворените фиксирани газове). След това изотенископът се поставя в такова положение, че пробата да се върне в резервоара и в късото коляно на манометъра докато и двете се запълнят изцяло с течност. Налягането се поддържа, както за дегазиране; изтегленият край на резервоара за пробата се нагрява с малък пламък, докато отделената пара се разшири достатъчно, за да измести част от пробата от горната част на резервоара и рамото на манометъра към манометричната зона на изотенископа, като по този начин се създава изпълнено с пари и свободно от азот пространство.

След това изотенископът се поставя в баня с постоянна температура и налягането на азота се регулира докато се изравни с това на пробата. Равновесното налягане се отчита в манометричната зона на изотенископа. При равновесие, парното налягане на азота е равно на парното налягане на веществото.

При твърди вещества в зависимост от обхвата от налягания и температури, се използват манометричните течности, посочени в 1.6.2.1. С дегазираната течност на манометъра се запълва едно разширение върху дългото рамо на изотенископа. След това твърдото вещество, което ще бъде изпитвано, се поставя в резервоара и се дегазира при повишаване на температурата. После, изотенископът се накланя така че течността в манометъра да навлезе в U-образната тръба. Измерването на парното налягане като функция от температурата се прави както е описано в 1.6.2.

1.6.4. **Ефузионен метод: везна за измерване на парно налягане**

1.6.4.1. *Апаратура*

В позоваване (1) са описани няколко варианти на апаратурата. Описаната тук апаратура илюстрира основния принцип (фигура 4). На фигура 4 са показани главните компоненти на апаратурата, която включва: високовакуумен контейнер от неръждаема стомана или стъкло, устройства за създаване и измерване на вакуума и вградени приспособления за измерване на парното налягане с везна. В апаратурата са включени следните вградени приспособления:

— изпарителна пещ с фланец и въртящ се вход. Изпарителната пещ представлява цилиндричен съд, направен например от мед или от химически устойчива сплав с добра топлопроводимост. Също така, може да се използва и стъклен съд с медна стена. Пещта има диаметър приблизително от 3 до 5 cm и е висока от 2 до 5 cm. За преминаването на потока от парите са направени от един до три отвора с различни размери. Пещта се нагрява или с нагревателна плоча отдолу, или с нагревателна спирала по външната стена. За да се избегне разсейването на топлината към основната плоча, нагревателят се прикрепя към нея с помощта на метал, който има ниска топлопроводимост (никелово-сребърна или хромово-никелова стомана), напр. никелово-сребърна тръба, прикрепена към въртящия се вход, ако се използва пещ с няколко отвора. Този начин на свързване има това предимство, че позволява да се използва медна пръчка. Медната пръчка дава възможност охлаждането да става с охлаждаща баня от външната страна,

— ако капакът на медната пещ има три отвора с различни размери, разположени на 90° един спрямо друг, могат да се покрият няколко области от парни налягания в целия обхват на измерване (отворите са приблизително от 0,30 до 4,50 mm в диаметър). Големите отвори се използват за ниски парни налягания и обратно. Като се върти пещта, може да се нагласи желаният отвор или междинното положение на парния поток (отвор на пещта – преграда – блюдо на везната) и така потокът от молекули се насочва или отклонява през отвора на пещта към блюдото на везната. За измерване на температурата на веществото, в подходяща точка се поставя термодвойка или съпротивителен термометър,

— над преградата се намира блюдото, което е част от високочувствителна микровезна (виж по-долу). Блюдото на везната е приблизително 30 mm в диаметър. Подходящ материал за направата му е алуминий със златно покритие,

— блюдото на везната е заобиколено от цилиндрична охладителна кутия, направена от бронз или мед. В зависимост от типа на везната, охладителната кутия има отвори за рамото на везната и един прегражден отвор за потока от молекули. Тя трябва да гарантира пълна кондензация на парите върху блюдото. Разсейването на топлината към външната среда се осигурява например от медна пръчка, свързана с охладителната кутия. Пръчката е насочена към основната плоча и е термично изолирана от нея, например с тръба от хромово-никелова стомана. Пръчката е потопена в Дюаров съд, съдържащ течен азот под основната плоча или течният азот циркулира през пръчката. По този начин, охладителната кутия се поддържа при температура приблизително −120 °C. Блюдото на везната се охлажда изключително чрез излъчване и е достатъчно надеждно за изследваната област от налягания (охлаждането става приблизително 1 час преди началото на измерването),

— везната е разположена над охладителната кутия. Подходящи везни са например високочувствителната двураменна електронна микровезна (8) или високочувствителният прибор с подвижна намотка (виж ОИСР Ръководство за изпитване 104, издание от 12.05.1981 г.),

— основната плоча също включва електрически връзки за термодвойки (или съпротивителни термометри) и нагревателни реотани,

— вакуумът в съда се създава от парциална вакуумпомпа или от високовакуумна помпа (необходимият вакуум от приблизително 1 до 2×10^{-3} Pa се получава след 2 часа изпомпване). Налягането се регулира с подходящ йонизационен манометър.

1.6.4.2. *Процедура на изпърване*

Съдът се напълва с изследваното вещество и капакът се затваря. Преградата и охлаждащата кутия се плъзгат напряко на пещта. Апаратът се затваря и вакуумпомпите се включват. Крайното налягане преди да започнат измерванията трябва да е приблизително 10^{-4} Pa. Охлаждането на охладителната кутия започва при 10^{-2} Pa.

След като се достигне нужният вакуум, започва калибровъчната серия при най-ниската желателна температура. Нагласява се съответният отвор на капака; потокът на пàрите преминава през преградата направо над отвора и удря охладеното блюдо на везната. Блюдото трябва да е достатъчно голямо, за да може целият поток, насочен през преградата да попадне върху него. Моментът на потока на пàрите действа като сила на натиск върху блюдото на везната и молекулите кондензират по охладената повърхност.

Моментът и едновременната кондензация произвеждат сигнал върху записващото устройство. Оценката на сигналите осигурява два вида информация:

1. В описания тук апарат, парното налягане се определя направо от момента върху блюдото на везната (за това не е необходимо да се знае молекулното тегло (2). Когато се оценяват показанията на записващото устройство, трябва да се вземат предвид и геометричните фактори като отвора на пещта и ъгъла на молекулния поток.

2. Едновременно може да се измери и масата на кондензата и от нея може да се изчисли скоростта на изпарение. Парното налягане може също да се изчисли от скоростта на изпарение и молекулното тегло като се използва уравнението на Херц (2):

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

където:

G = скоростта на изпарение (kg s^{-1} m^{-2})

M = моларната маса (g mol^{-1})

T = температурата (K)

R = универсалната моларна газова константа (J mol^{-1} K^{-1})

p = парното налягане (Pa)

След като се достигне нужният вакуум, серията от измервания се започва при най-ниската измервателна температура.

При следващите измервания температурата се увеличава на малки интервали, докато се достигне максималната ѝ желана стойност. След това, пробата се охлажда отново, при което може да се отчете втора крива на парното налягане. Ако втората крива не потвърждава резултатите от първата, то е възможно веществото да се разлага в температурния обхват на измерването.

1.6.5. **Ефузионен метод – чрез загуба на тегло**

1.6.5.1. *Апаратура*

Ефузионният апарат се състои от следните основни части:

— резервоар, който може да се термостатира и обезвъздушава и в който са разположени ефузионните клетки,

— високовакуумна помпа (например дифузионна или турбомолекулярна помпа) с вакуумметър,

— уловител на парите, за който се използва течен азот или сух лед.

На фигура 5 е показан като пример един алуминиев вакуумен резервоар с електрическо нагряване, с 4 ефузионни клетки от неръждаема стомана. Тънък лист от неръждаема стомана с дебелина около 0,3 mm, на който има ефузионно отверстие с диаметър от 0,2 до 1,0 mm, е прикрепен към ефузионната клетка посредством решетъчен капак.

1.6.5.2. *Процедура на измерване*

Сравнителното и изпитваното вещество се поставят в отделно ефузионни клетки, металната диафрагма с отверстието се осигурява с помощта на решетъчния капак и всяка от клетките се претегля с точност до 0,1 mg. Клетката се поставя в термостатирания апарат, който се вакуумира, докато налягането достигне стойност, по-малка от една десета от очакваното налягане. На определени интервали от време – между 5 и 30 часа, в апарата се пропуска въздух и чрез повторно претегляне се определя масата, която е загубила клетката.

За да е сигурно, че резултатите не са повлияни от летливи примеси, клетката се претегля на точно определени интервали от време. Така се проверява дали ефузионната скорост е постоянна през най-малко два такива интервала.

Парното налягане p в ефузионната клетка се дава със следното уравнение:

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

където:

p = парното налягане (Pa)

m = масата на веществото, напускащо клетката за време t (kg)

t = времето (s)

A = площ на отвора (m^2)

K = корекционен коефициент

R = универсалната газова константа (J mol^{-1} K^{-1})

T = температурата (K)

M = молекулната маса (kg mol^{-1})

Корекционният коефициент K зависи от съотношението между дължината и радиуса на цилиндричното отверстие:

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

Горното уравнение може да се запише така:

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

където: $E = \frac{1}{KA}\sqrt{2\pi R}$ и представлява ефузионната константа на клетката.

Тази ефузионна константа на клетката E може да се определи със сравнително вещество (2,9), като се използва следното уравнение:

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

където:

$p_{(r)}$ = парното налягане на сравнителното вещество (Pa)

$M_{(r)}$ = молекулната маса на сравнителното вещество (kg mol^{-1})

1.6.6. **Метод с насищане на газ**

1.6.6.1. *Апаратура*

Типичната апаратура, която се използва за провеждането на това изпитване обхваща голям брой компоненти. Тези компоненти са дадени на фигура 6a и са описани по-долу (1).

Инертен газ:

Газ-носителят не бива да реагира химически с изпитваното вещество. Обикновено азотът е подходящ за тази цел, но в някои случаи може да е необходимо да се използват други газове (10). Използваният газ трябва да е сух (виж фигура 6a, ключ 4: сензор за относителна влажност).

Регулиране на потока:

Необходима е подходяща система за регулиране на газа, която да осигури постоянен предварително подбран поток през колоната за насищане.

Уловители на пàрите:

Те зависят от характеристиките на конкретната проба и от избрания метод за анализ. Пàрите трябва да се задържат количествено под форма, която позволява последващо анализиране. За някои изследвани вещества са подходящи уловители с течности като хексан или етилен гликол. За други, може да са приложими твърди адсорбенти.

Една алтернатива на улавянето на парите и следващият им анализ са директните аналитични техники (като хроматографията), които се включват веднага след апаратурата. Те могат да се използват за определяне количеството на материала, пренесен от известно количество газ-носител. Освен това, може да се измерва и загубата на маса от пробата.

Топлообменник:

За измервания при различни температури може да се наложи в апаратурата да се включи и топлообменник.

Колона за насищане:

Изпитваното вещество се отлага в разтвор върху подходящ инертен носител. Покритият носител се насипва в колоната за насищане, чиито размери и дебит трябва да са такива, че да осигуряват пълното насищане на газ-носителя. Колоната за насищане трябва да е термостатирана. При измервания над стайната температура, областта между насищащата колона и уловителя трябва да се нагрява, за да се избегне кондензацията на изпитваното вещество.

За да се намали дифузията на материала, след насищащата колона може да се постави капилярка (фигура 6b).

1.6.6.2. *Процедура на измерване*

Приготвяне на колоната за насищане:

Разтвор на изпитваното вещество в леснолетлив разтворител се прибавя към достатъчно количество носител. Трябва да се добави достатъчно количество от изпитваното вещество, за да се поддържа насищането през цялото време на измервателната процедура. Разтворителят се изпарява напълно на въздух или в ротационен изпарител и добре смесеният материал се насипва в колоната за насищане. След термостатиране на пробата, през апарата се пропуска сух азот.

Измерване:

Уловителите или включения в линията детектор, се свързват към изходящата линия от колоната и започва да се отчита времето. Дебитът на потока се проверява в началото и на равни интервали от време докато трае измерването. За целта се използва филм-дебитомер (със сапунена ципа) или се правят непрекъснати измервания с мас-дебитомер.

Трябва да се измерва налягането на изхода от колоната. Това може да се направи по следните начини:

а) като се включи манометър между колоната за насищане и уловителите (това може да не даде добри резултати, защото така се увеличават мъртвият обем и повърхността на адсорбция), или

б) като се определя спадът на налягането през дадената улавяща система като функция от дебита на потока за всеки отделен опит (това може да не дава задоволителни резултати при уловителите с течност).

Времето, необходимо да се събере достатъчно количество от изпитваното вещество за различните аналитични методи, се определя с предварителни опити или чрез изчисления. Като алтернатива на събирането на вещество за последващо анализиране, може да се използва последователно свързана към апаратурата количествена аналитична техника (например хроматография). Преди да се изчисли парното налягане при дадена температура, трябва да се направят предварителни експерименти, за да се определи максималния дебит на потока, при който газът-носител изцяло ще се насити с парите на веществото. Това става със сигурност, ако газът-носител преминава през колоната достатъчно бавно, така че по-малък дебит на потока да не дава по-големи стойности на парното налягане при изчисленията.

Специфичният аналитичен метод се определя в зависимост от природата на изпитваното вещество (например газова хроматография или гравиметрия).

Определя се количеството вещество, пренесено от известно количество газ-носител.

1.6.6.3. *Изчисляване на парното налягане*

Парното налягане се изчислява от плътността на парите W/V по уравнението:

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

където:

p = парното налягане (Pa)

W = масата на изпареното вещество (g)

V = обемът на наситения газ (m^3)

R = универсалната моларна газова константа (J mol^{-1} K^{-1})

T = температурата (K)

M = моларната маса на изпитваното вещество (g mol^{-1})

Измерените обеми трябва да се коригират за разликите в температурата и налягането между дебитомера и термостатираната колона. Ако дебитомерът е разположен успоредно на пароуловителя, то е необходимо да се изчислят корекциите за всеки изпарен компонент в уловителя (1).

1.6.7. **Въртящ се ротор (8, 11, 13)**

1.6.7.1. *Апаратура*

Техниката с въртящ се ротор може да се провежда с вискозиметър с въртящ се ротор, както е показано на фигура 8. Схематичен чертеж на експерименталната установка е показан на фигура 7.

Измервателната апаратура обикновено се състои от измервателна глава с въртящ ротор, разположена в термостатиран съд (температурата се регулира в рамките на 0,1 °C). Контейнерът с пробата се поставя в термостатиран съд (регулиране на температурата до 0,01 °C); всички останали части на установката се държат при по-висока температура, за да се избегне кондензацията. Приспособление с високовакуумна помпа е свързано към системата чрез високовакуумни клапани.

Измервателната глава с въртящ се ротор се състои от стоманено топче (4—5 mm в диаметър), поставено в тръба. Топчето е окачено и стабилизирано в магнитно поле, за което обикновено се използва комбинация от постоянни магнити и регулиращи бобини.

Топчето се привежда във въртеливо движение от въртящите се полета, създадени от намотките. Измервателни намотки, които отчитат винаги наличната слаба несиметрична намагнитеност на топчето, позволяват да се измери неговата скорост на въртене.

1.6.7.2. *Процедура на измерване*

Когато топчето достигне дадена скорост на въртене v(o), (обикновено около 400 оборота в секунда), задвижването му се прекратява и скоростта му започва да намалява поради триенето с газовете.

Падането на скоростта на въртене се измерва като функция от времето. Понеже триенето, дължащо се на магнитното окачване е незначително в сравнение с триенето на газа, то налягането на газа се дава с уравнението:

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

където:

$\bar{c}$ = средна скорост на газовите молекули

r = радиус на топчето

ρ = масова плътност на топчето

σ = коефициент на тангенциалния импулсен пренос (σ = 1 за идеално сферична повърхност на топчето)

t = време

v(t) = скорост на въртене след време t

v(o) = начална скорост на въртене.

Уравнението може да се запише и така:

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

където t_n, t_{n-1} са времената, необходими за даден брой N завъртания. Тези интервали от време са последователни и $t_n > t_{n-1}$.

Средната скорост на газовата молекула с се дава със:

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

където:

T = температурата

R = универсалната моларна газова константа

M = моларната маса.

2. **ДАННИ**

Парното налягане при всеки от описаните методи трябва да се определи поне при две температури. За да се провери дали кривата на парното налягане е линейна, за предпочитане е да се направят три или повече измервания в областта от 0 до 50 °C.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Докладването на резултатите от измерването трябва, ако е възможно, да включва следната информация:

— използван метод,

— точна спецификация на веществото (вид и примеси) и предварителни етапи на пречистване, ако има такива,

— най-малко две стойности на парното налягане и температурата, за предпочитане в областта от 0 до 50 °C,

— всички необработени данни,

— кривата на зависимостта на log p от 1/T,

— изчисление на парното налягане при 20 или 25 °C.

Ако се забележи преход (промяна в състоянието, разграждане), трябва да се отбележи следната информация:

— естество на промяната,

— температура, при която се извършва промяната при атмосферното налягане,

— парно налягане при 10 и 20 °C под температурата на прехода и 10 и 20 °C над тази температура (освен ако преходът е от твърдо към газообразно състояние).

Цялата информация и бележките, свързани с интерпретацията на резултатите трябва да се включат в протокола, особено когато се касае за замърсявания или за физичното състояние на веществото.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

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

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

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

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

(5) NF T 20-048 AFNOR (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 – Vapor pressure balance method.

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

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

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

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

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

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

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

Допълнение 1

Изчислителен метод

ВЪВЕДЕНИЕ

Изчислените стойности на парното налягане могат да се използват:

— за да се прецени кой от използваните експериментални методи е подходящ,

— да се получи оценка или граничните стойности в случаите, когато експерименталният метод не може да се приложи по технически причини (включително когато парното налягане е много ниско),

— да помогнат да се разпознаят онези случаи, в които е оправдано да не се проведе експериментално измерване, тъй като най-вероятно парното налягане е < 10^{-5} Pa при температурата на околната среда.

ИЗЧИСЛИТЕЛЕН МЕТОД

Парното налягане на течности и твърди вещества може да се изчисли като се използва модифицираната корелация на Уотсън (а). Експериментално е необходимо да се определи само точката на кипене при нормални условия. Методът е приложим върху цялата област от парни налягания от 10^{5} до 10^{-5} Pa.

Подробна информация върху метода е дадена в „Наръчник на методите за изчисляване на химични свойства“ (б).

ИЗЧИСЛИТЕЛНА ПРОЦЕДУРА

Съгласно буква б) парното налягане се изчислява както следва:

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

Където:

T = температурата, за която се изчислява налягането на парите

T_b = точка на кипене при нормални условия

P_{vp} = парно налягане при температура T

ΔH_{vb} = топлина на изпарение

ΔZ_b = коефициент на свиваемост (оценен на 0,97)

m = емпиричен коефициент, зависещ от физичното състояние при интересуващата ни температура.

По-нататък,

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

Където K_F е емпиричен коефициент, отчитащ полярността на веществото. В позоваване б) са дадени коефициентите K_F за няколко типа съединения.

Доста често могат да се намерят данни, в които точката на кипене е дадена при понижено налягане. В такъв случай, съгласно буква б), парното налягане се изчислява така:

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

Където T_1 е точката на кипене при пониженото налягане P_1.

ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Когато се използва изчислителен метод, в протокола с резултатите трябва да се включи съответната документация от изчисленията.

ПОЗОВАВАНЕ

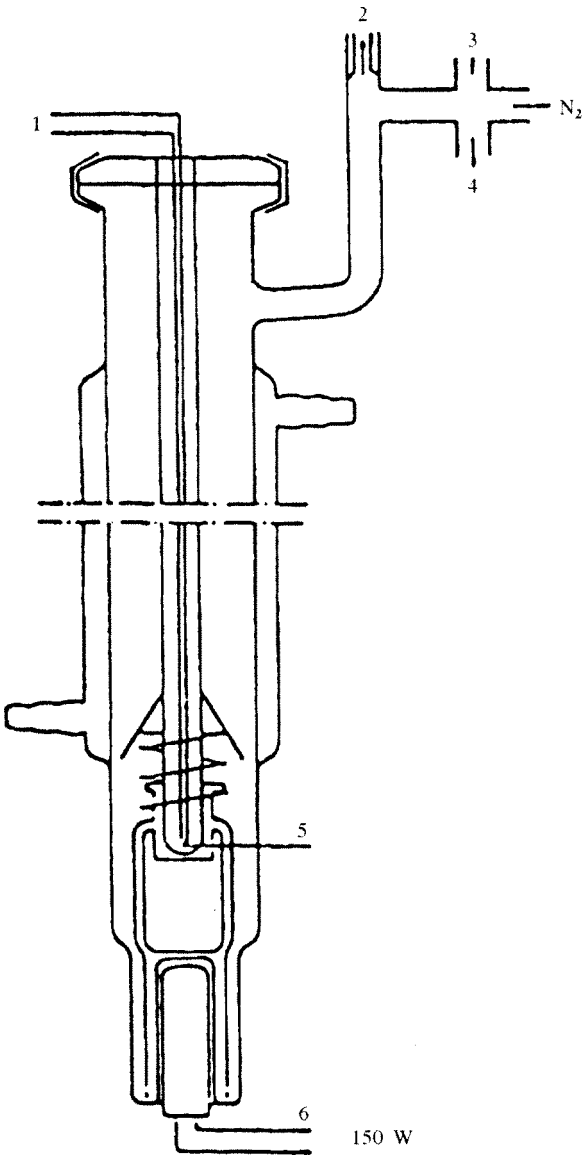
а) K. M. Watson, Ind. Eng. Chem; 1943, vol. 35, 398.

б) №W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt. Handbook of Chemical Property Estimation Methods, Mc Graw Hill, 1982.

Допълнение 2

Фигура 1

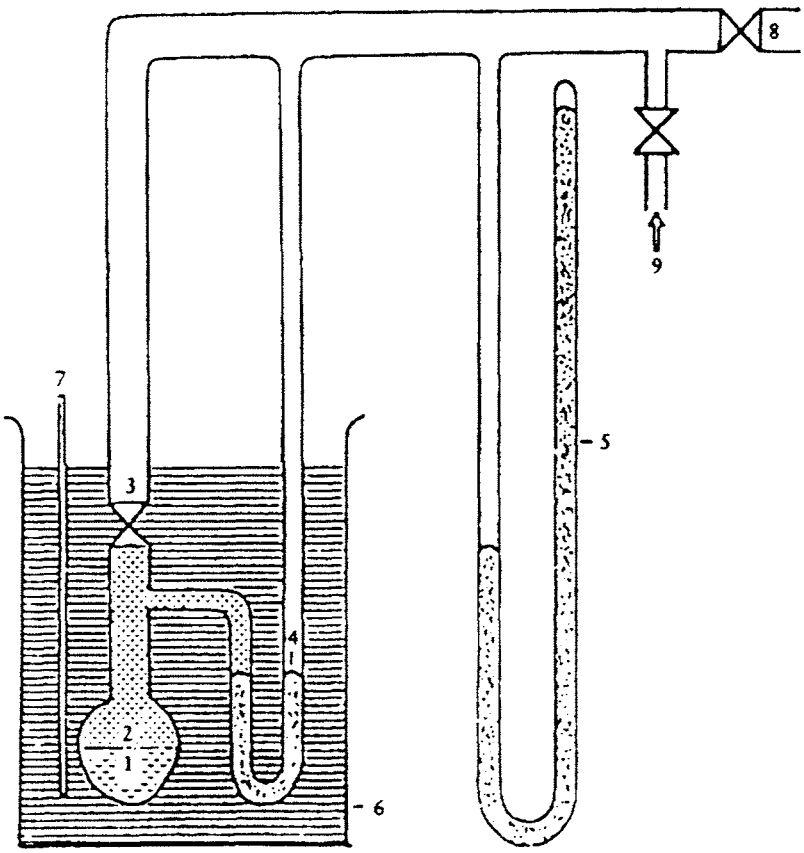
Апаратура за определяне кривата на налягането на парите по динамичния метод.



1 = Термодвойка
2 = Вакуумен буферен обем
3 = Прибор за измерване на налягането
4 = Вакуум
5 = Точка на измерване
6 = Нагревателен елемент около 150 W

Фигура 2а

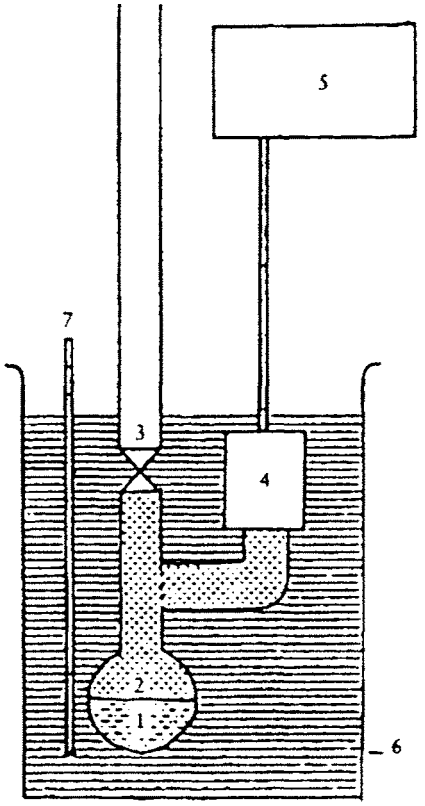
Апаратурата за определяне кривата на налягането на парите по статичния метод (при използване на U-виден манометър)



1. Изпитвано вещество
2. Парна фаза
3. Високовакуумен клапан
4. U-видна тръба (спомагателен манометър)
5. Манометър
6. Температурна баня
7. Прибор за измерване на температурата
8. Към вакуум помпата
9. Вентилационен отвор

Фигура 2б

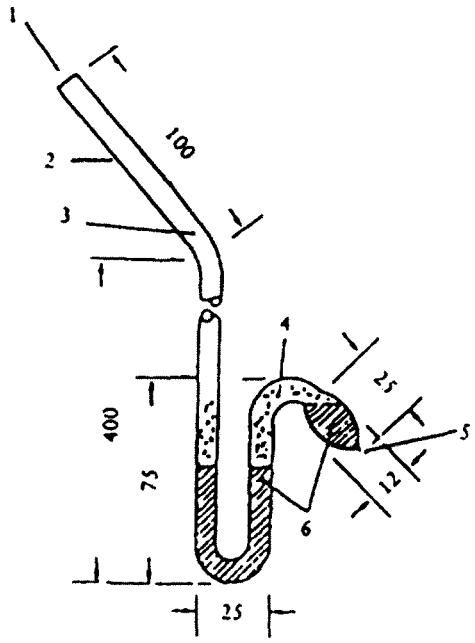
Апаратура за определяне кривата на налягането на парите по статичния метод *(при използване на индикатор за налягането)*



1. Изпитвано вещество
2. Парна фаза
3. Високовакуумен клапан
4. Прибор за измерване на налягането
5. Индикатор за налягане
6. Температурна баня
7. Устройство за измерване на температурата

Фигура 3

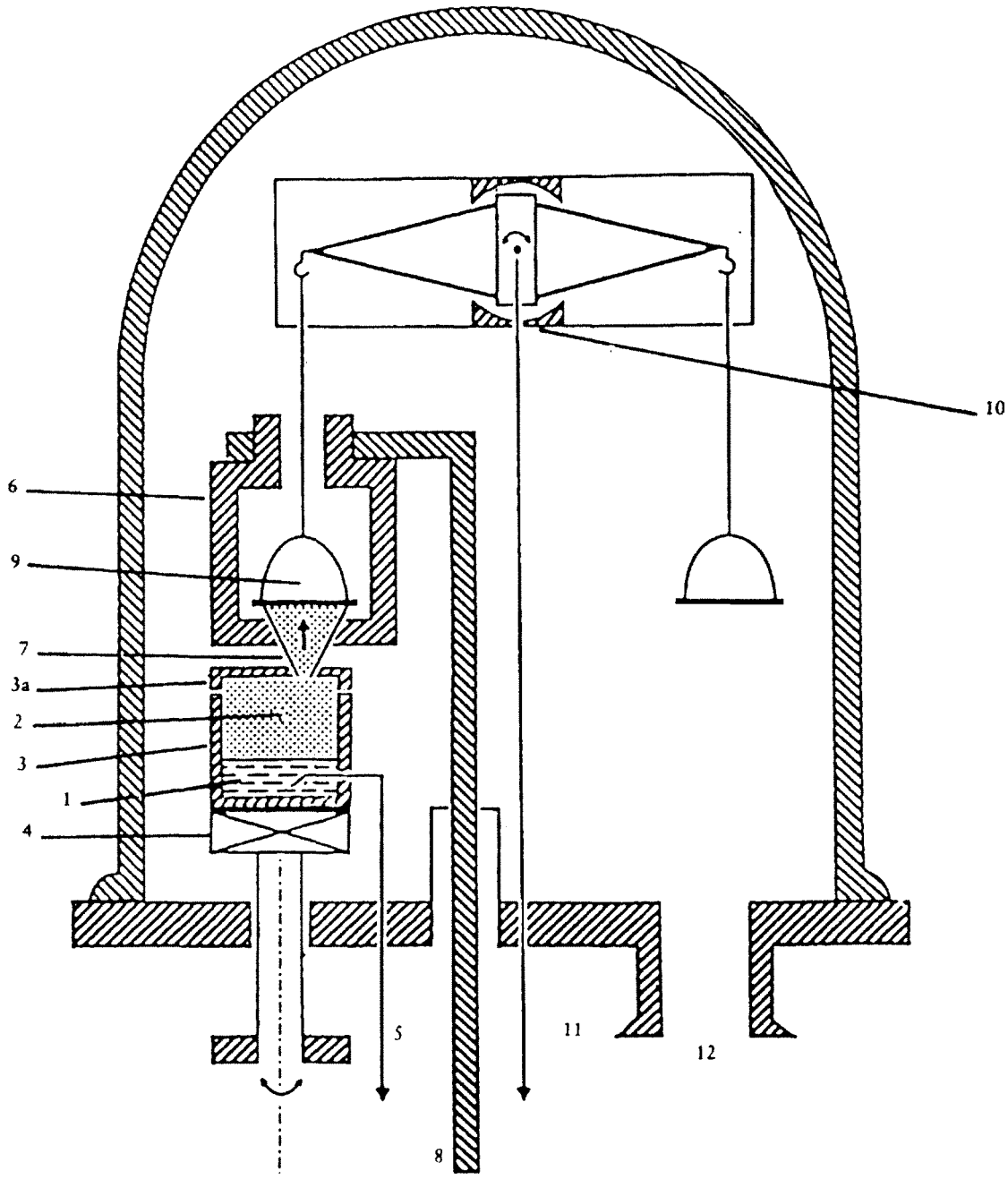
Изотенископ (виж позоваване 7)



1. Към системата за контролиране и измерване на налягането
2. Тръба с външен диаметър 8 mm
3. Сух азот в системата за регулиране на налягането
4. Пари на пробата
5. Малък заострен край
6. Течна проба

Фигура 4

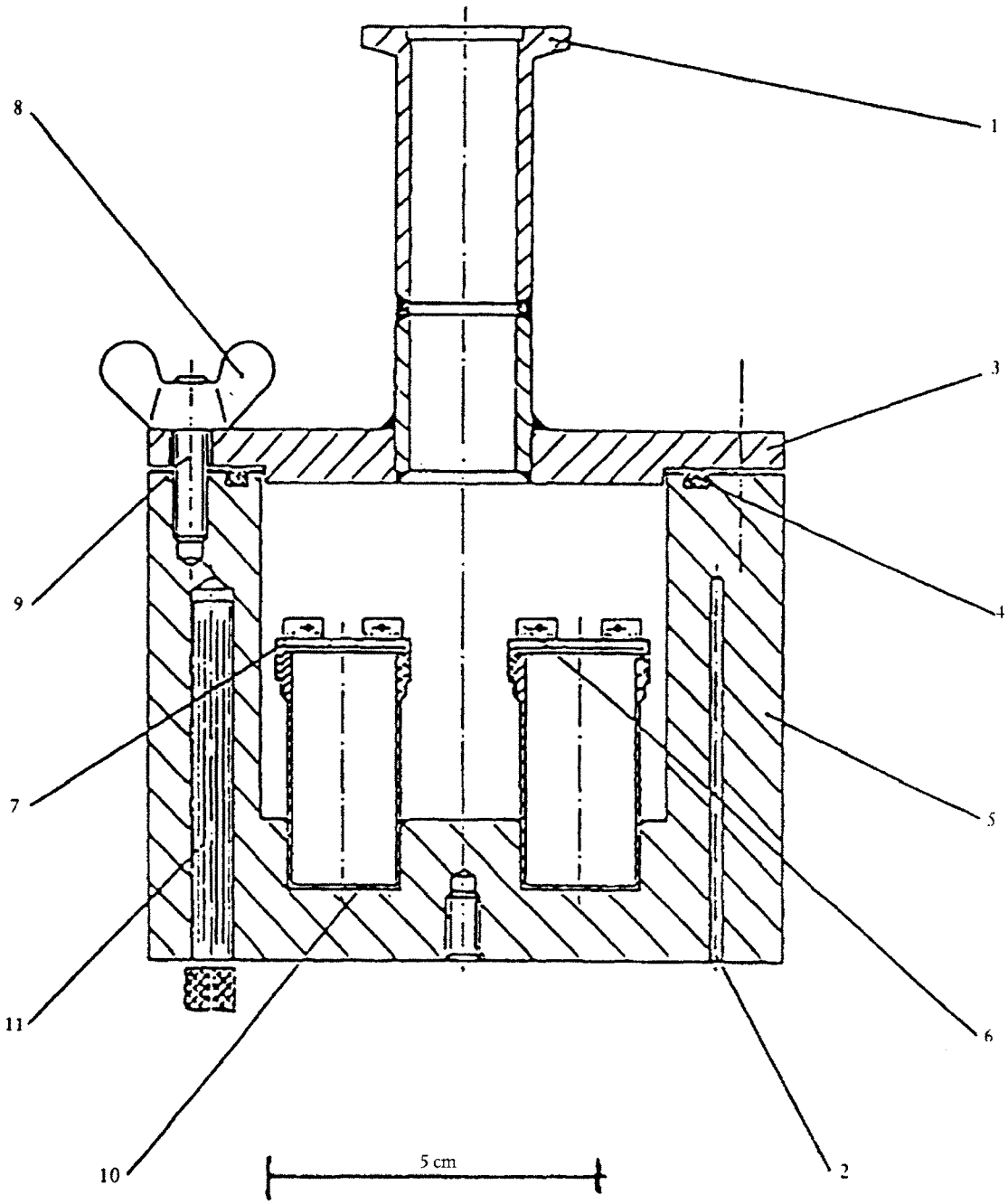
Апаратура за определяне кривата на налягането на парите по метода с везна за парно налягане.



1. Изпитвано вещество
2. Парна фаза с поток от пари
3. Изпарителна пещ с въртящ се вход
3а. Капак на пещта с отвор
4. Нагряване (охлаждане) на пещта
5. Измерване температурата на пробата
6. Охлаждителна кутия
7. Преграда
8. Охлаждаща пръчка за охлаждителната кутия
9. Блюдо на везната
10. Микровезна
11. Към записващото устройство
12. Към високовакуумната помпа

Фигура 5

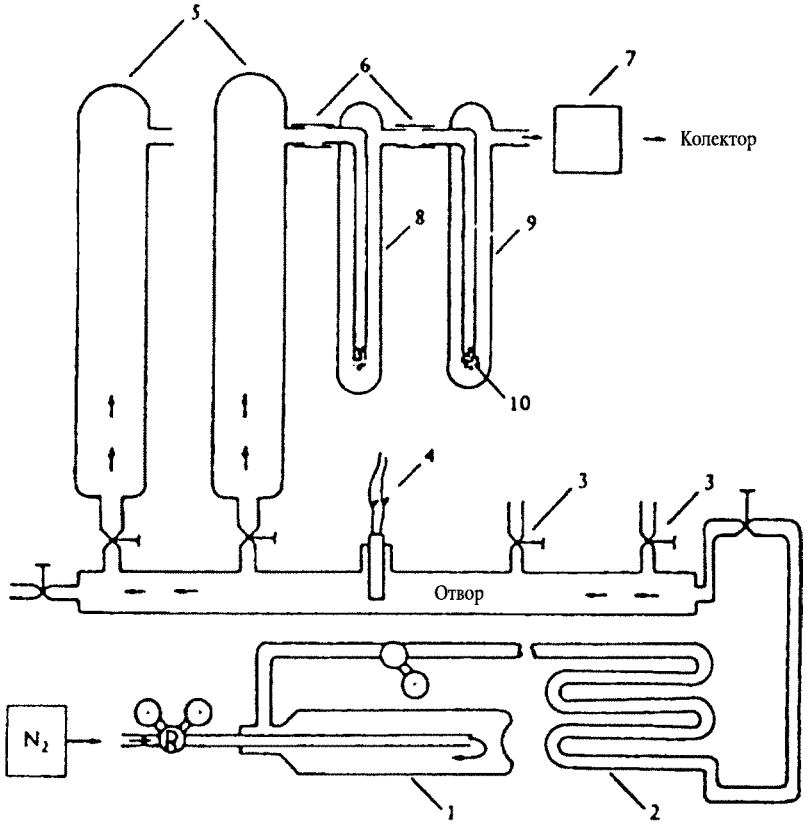
Примерна апаратура за изпаряване при ниско налягане по ефузионния метод при обем на ефузионната клетка 8 cm^3



1. Връзка към вакуума
2. Отвори за платинов съпротивителен термометър или за измерване и контролиране на температурата (2)
3. Капак за вакуум-резервоара
4. О-пръстен
5. Алуминиев вакуумен резервоар
6. Устройство за инсталиране и изваждане на ефузионните клетки
7. Решетъчен капак
8. Крилчати гайки (6)
9. Болтове (6)
10. Ефузионни клетки от неръждаема стомана
11. Тръбни нагреватели (6)

Фигура 6а

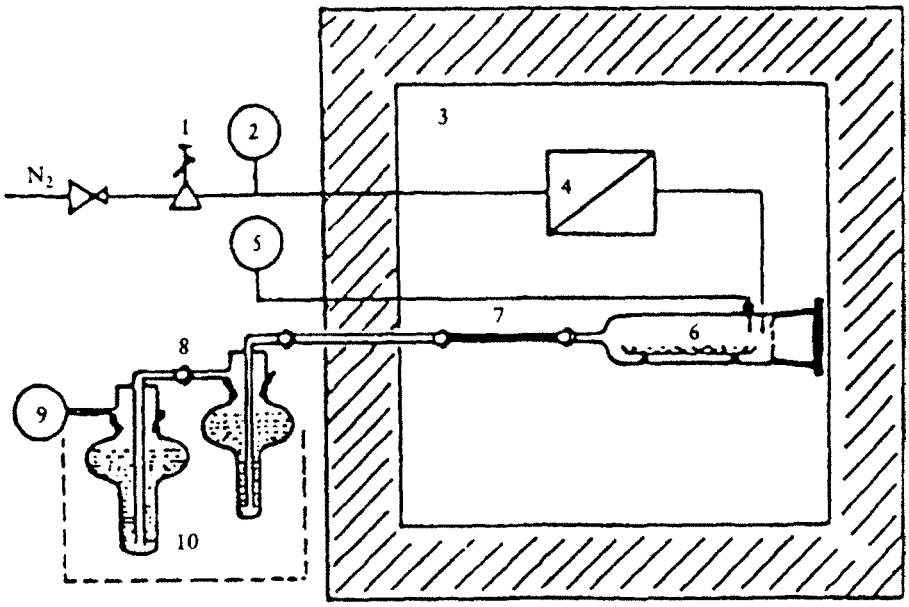
Пример на поточна система за определяне на налягането на парите по метода с насищане на инертен газ



1. Регулатор на потока
2. Топлообменник
3. Иглени вентили
4. Сензор за относителна влажност
5. Колона за насищане
6. Свръзки от политетрафлуоретен (тефлон)
7. Дебитомер
8. Барботьор (абсорбер)
9. Маслен уловител
10. Барботьор с порьозна пластинка

Фигура 6б

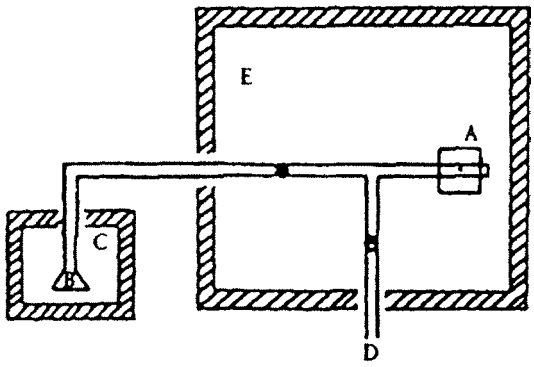
Пример на система за определяне на налягането на парите по метода с насищане на инертен газ - с капилярка, разположена след камерата за насищане.



1. Термокондуктивен мас - дебитомер
2. Манометър
3. Термостатирана камера
4. Серпантина за термостатиране на газа-носител
5. Термометър (Pt 100)
6. Камера за насищане на газа
7. Капилярка
8. Абсорбционни съдове
9. Газов разходомер
10. Охлаждаем уловител

Фигура 7

Пример на експериментална установка за метода с въртящ се ротор

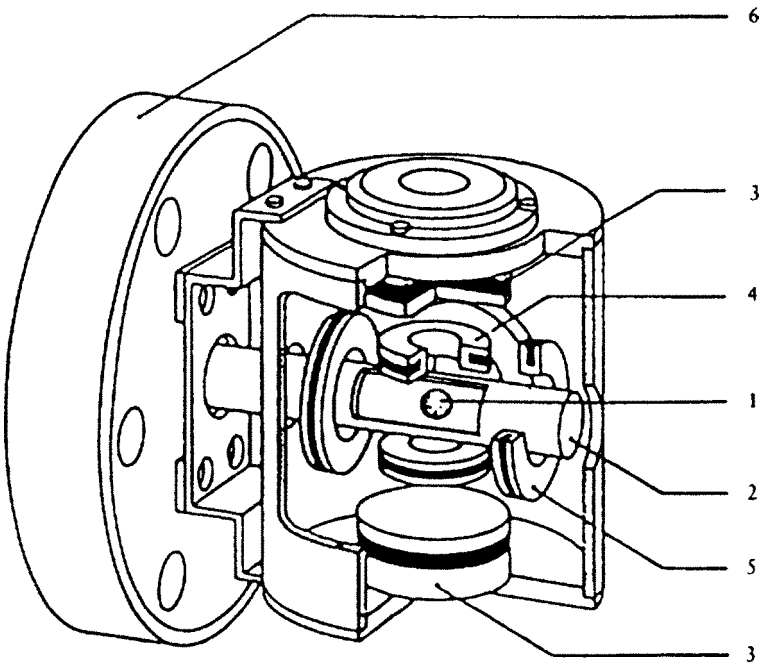


Апаратура за определяне налягането на парите

A. Сензорна глава на въртящия ротор
B. Клетка с пробата
C. Термостат
D. Вакуумна линия (турбопомпа)
E. Въздушен термостат

Фигура 8

Пример на измерителна глава с въртящ се ротор



1. Топче
2. Вакуумирано тръбовидно удължение на 6
3. Постоянни магнити (2)
4. Намотки (2) за вертикална стабилизация
5. Задвижващи намотки (4)
6. Свързващ фланец

А.5. ПОВЪРХНОСТНО НАПРЕЖЕНИЕ

1. **МЕТОД**

Описаните методи се основават на Ръководството на ОИСР за провеждане на изпитвания (1). Основните принципи са дадени в позоваване (2).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Описаните методи се прилагат за изпитване на повърхностното напрежение на водни разтвори.

Преди да се извършат тези изпитвания, е полезно да се има предварителна информация за разтворимостта във вода, структурата, хидролизните свойства и критичната концентрация на мицелообразуване на веществото.

Описаните по-долу методи са приложими за повечето химични съединения без каквито и да било ограничения свързани с тяхната степен на чистота.

Измерването на повърхностното напрежение с тензиометър с пръстен е ограничено до водни разтвори с динамичен вискозитет, по-нисък от 200 mPa s.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Енталпията на единица площ от свободната повърхност се нарича повърхностно напрежение.

Повърхностното напрежение се измерва във:

N/m (SI – единица) или

mN/m (SI – поделиница)

1 N/m = 10^3 dynes/cm

1 mN/m = 1 dyne/cm в излязлата от употреба CGS система.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не е необходимо използването на вещества за сравнение във всички случаи, при които се изпитва ново вещество. Те трябва преди всичко да служат за периодична проверка на действието на метода, както и да позволяват сравнение с резултатите, получени по други методи.

В литературните източници (1) и (3) са дадени сравнителни вещества, които покриват широк обхват от повърхностни напрежения.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДИТЕ

Методите се основават на измерването на максималната сила, която трябва да се приложи вертикално върху скоба или пръстен, намиращи се в контакт с повърхността на изпитваната течност, поставена в измервателен съд, за да се отделят от повърхността ѝ, или върху пластинка, единият край на която се допира до повърхността, за да се прекъсне образуваният филм.

Веществата, които се разтварят във вода до концентрация най-малко 1 mg/l се изпитват във воден разтвор само при една концентрация.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Методите могат да осигурят по-висока точност от тази, която вероятно се изисква при измервания за контрол на защитата на околната среда.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ

Приготвя се разтвор на веществото в дестилирана вода. Концентрацията на този разтвор трябва да бъде 90 % от концентрацията на наситения разтвор на веществото във вода; когато разтворимостта на веществото надвишава 1 g/l, при изпитванията се използва разтвор с концентрация 1 g/l. Не е необходимо да се извършват изпитвания върху вещества, чиято разтворимост във вода е по-ниска от 1 mg/l.

1.6.1. **Метод с използване на пластинка**

Виж ISO 304 и NF T 73-060 (Повърхностно активни вещества – определяне на повърхностното напрежение чрез изтегляне на течни филми).

1.6.2. **Метод с използване на скоба**

Виж ISO 304 и NF T 73-060 (Повърхностно активни вещества – определяне на повърхностното напрежение чрез изтегляне на течни филми).

1.6.3. **Метод с използване на пръстен**

Виж ISO 304 и NF T 73-060 (Повърхностно активни вещества – определяне на повърхностното напрежение чрез изтегляне на течни филми).

1.6.4. **Метод на ОИСР с хармонизиран пръстен**

1.6.4.1. *Апаратура*

За това изпитване могат да се използват тензиометри. Те се състоят от следните елементи:

— подвижна масичка за пробата,

— система за измерване на силата,

— измервателно тяло (пръстен),

— измервателен съд.

1.6.4.1.1. Подвижна масичка за пробата

Подвижната масичка е предназначена да поддържа измерителния съд с контролируема температура, в който е поставена течността за изпитване. Тя е монтирана на стенд заедно с измерителната система за сила.

1.6.4.1.2. Динамометър

Динамометърът (виж фигурата) е разположен над масичката за пробата. Грешката при измерването на силата не бива да надвишава ± 10^{-6} N, което съответства на грешка в границите на ± 0,1 mg при измерване на масата. В повечето случаи измервателната скала на разпространените в търговската мрежа тензиометри е калибрирана в mN/m, така че повърхностното напрежение може да се отчита направо в mN/m с точност 0,1 mN/m.

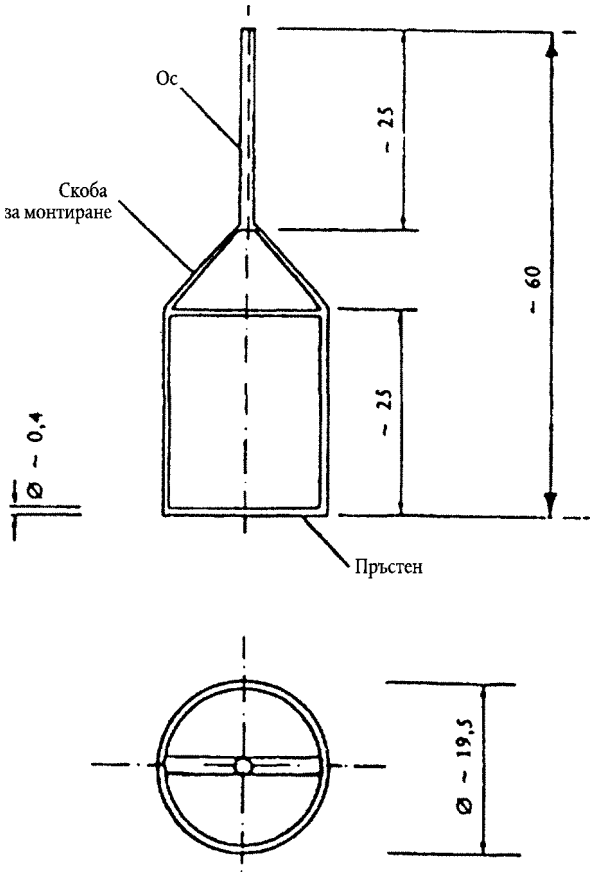
1.6.4.1.3. Измервателно тяло (пръстен)

Пръстенът обикновено се прави от платиново-иридиева жица с дебелина около 0,4 mm и обиколка 60 mm. Пръстенът се провесва в хоризонтално положение от метална ос и монтираща скоба, направена от жица, така че да се осигури връзката с динамометъра (виж фигурата).

Фигура

Измервателно тяло

(Всички размери са дадени в милиметри)



1.6.4.1.4. Измервателен съд

Измервателният съд, съдържащ разтвора за изпитване, е стъклен съд, чиято температура може да се контролира. Той трябва да е проектиран така, че по време на измерването, температурата на изпитвания разтвор и на газовата фаза над него да остава постоянна, а пробата да не може да се изпарява. Допуска се използването на цилиндрични стъклени съдове с вътрешен диаметър не по-малък от 45 mm.

1.6.4.2. *Подготовка на апаратурата*

1.6.4.2.1. Почистване

Стъклените съдове се почистват внимателно. Ако е необходимо, те се измиват с гореща бихромна смес, след това със сироповидна фосфорна киселина (от 83 до 98 тегловни % H_3PO_4), основно се изплакват с течаща вода и накрая се измиват с двойно дестилирана вода до неутрална реакция. След това се подсушават или се изплакват с част от течната проба, която подлежи на изпитване.

Пръстенът първо се изплаква основно с вода, за да се отстранят всички разтворими във вода вещества. После за кратко се потапя в бихромна смес, измива се с двойно дестилирана вода до неутрална реакция и накрая се загрява за малко над метанолов пламък.

Забележка:

Замърсяванията от вещества, които не се разтварят или разрушават от бихромната смес и от фосфорната киселина, такива като силиконовите материали, трябва да се отстранят с помощта на подходящ органичен разтворител.

1.6.4.2.2. Калибриране на апаратурата

Подготовката на апаратурата се състои в проверката на нулевата точка и настройване на показанията на инструмента, което да позволи провеждането на достоверни измервания в mN/m.

Инсталиране:

Апаратурата трябва да се нивелира, с помощта например на спиртен нивелир, върху основата на тензиометъра, като се регулират нивелиращите винтове на основата.

Нагласяване на нулата:

След монтирането на пръстена върху апаратурата и преди потапянето му в течността, показанието на тензиометъра трябва да се нулира и да се провери дали пръстенът е разположен успоредно на повърхността на течността. За тази цел, течната повърхност може да се използва като огледало.

Калибриращи процедури:

Действителното пробно калибриране може да се извърши с помощта на коя да е от следните две процедури:

а) Чрез масата: процедурата използва тежести с определено тегло (между 0,1 и 1,0 g), разположени върху пръстена. Калибрационен коефициент Фа, с който се умножават всички показания на инструмента, се определя по уравнение

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

където:

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

m = масата на допълнителната тежест (g)

g = земното ускорение (981 cm s^{-2} при морското равнище)

b = средната обиколка на пръстена (cm)

σ_a = показанието на тензиометъра след поставянето на тежестта върху пръстена (mN/m)

б) Чрез вода: използва се чиста вода, чието повърхностно напрежение например при 23 °C е равно на 72,3 mN/m. Тази процедура се изпълнява по-бързо, отколкото калибрирането по тегло, но винаги съществува опасност повърхностното напрежение на водата да не е истинското поради наличието на следи от повърхностно-активни вещества като замърсители.

Калибрационният коефициент Φ_b, по който трябва да се умножават всички показания на инструмента, се определя по уравнение (2):

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

където:

σ_o = стойността на повърхностното напрежение на водата, дадена в позоваването(mN/m)

σ_g = измерената стойност на повърхностното напрежение на водата (mN/m)

И двете се взимат при една и съща температура.

1.6.4.3. *Подготовка на пробите*

Приготвят се водни разтвори с необходимите концентрации от изпитваните веществата, които не съдържат неразтворени вещества.

Разтворът трябва да се държи при постоянна температура (± 0,5 °C). Тъй като повърхностното напрежение на разтвора в измервателния съд се променя с течение на времето, трябва да се направят няколко измервания през различни интервали от време и да се начертае крива, показваща зависимостта на повърхностното напрежение от времето. Когато спрат да се наблюдават повече изменения се счита, че е достигнато равновесното състояние.

Прахът и газообразните замърсявания от други вещества пречат на измерването. Затова трябва да се работи под защитен похлупак.

1.6.5. **Условия на изпитването**

Изпитването се извършва при около 20 °C, като температурата се контролира с точност от ± 0,5 °C.

1.6.6. **Провеждане на изпитването**

Изпитваният разтвор се прехвърля в добре почистен измервателен съд, като се внимава да не се образува пяна. След това, съдът се поставя върху масичката на измервателната апаратура. Горният край на масичката заедно с измервателния съд се повдига, докато пръстенът се потопи под повърхността на разтвора. После горният край на масичката се сваля постепенно и равномерно (със скорост приблизително 0,5 cm/min), така че пръстенът да се отдели от повърхността. Това продължава до достигане на максималната стойност на силата. Течният слой, прикрепен към пръстена, не бива да се отделя от него. След приключване на изпитването, пръстенът отново се потапя под повърхността и измерването се повтаря, докато се достигне постоянна стойност на повърхностното напрежение. При всяко определяне, трябва да се записва изминалото време от момента на прехвърлянето на разтвора в измервателния съд. Отчита се максималната сила, необходима за отделянето на пръстена от повърхността на течността.

2. **ДАННИ**

За да се изчисли повърхностното напрежение, отчетеното показание на апаратурата в mN/m първо се умножава по калибрационния коефициент Φ_a или Φ_b в зависимост от използваната процедура на калибриране. Така се получава една стойност, която е само приблизителна и се нуждае от корекции.

Харкинс и Джордан (4) са определили емпирично корекционните коефициенти за измерените стойности на повърхностното напрежение по метода на пръстена. Тези стойности зависят от размерите на пръстена, плътността на течността и нейното повърхностно напрежение.

Тъй като определянето на корекционния коефициент по таблиците на Харкинс и Джордан за всяко отделно измерване е много трудоемък процес, при изчисляването на повърхностното напрежение на водни разтвори може да се използва една улеснена процедура, която отчита от таблица направо коригираната стойност на повърхностното напрежение. (Когато отчетените при опита стойности се намират между табличните, се прилага интерполация).

ТАБЛИЦА: КОРИГИРАНЕ НА ИЗМЕРЕНОТО ПОВЪРХНОСТНО НАПРЕЖЕНИЕ

Само за водни разтвори, $\rho \cong 1\ g/cm^3$

R = 9,55 mm (среден радиус на пръстена)

r = 0,185 mm (радиус на проводника, от който е направен пръстена)

Отчетена стойност в резултат от експеримента (mN/m)	Коригирана стойност (mN/m)	
	Тегловно калибриране (виж 1.6.4.2.2.(a)	Водно калибриране (виж 1.6.4.2.(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	—

Тази таблица е съставена въз основа на данни от корекциите на Харкинс и Джордан. Тя е подобна на таблицата в DIN стандарта (DIN 53914) за вода и водни разтвори (плътност $\rho = 1\ g/cm^3$) и се отнася за пръстен с размери R = 9,55 mm (среден радиус на пръстена) и r = 0,185 mm (радиус на проводника на пръстена). Таблицата предоставя коригираните стойности на повърхностното напрежение за изпитвания, проведени след калибриране с тежести или след калибриране с вода.

Без предварително калибриране, повърхностното напрежение може да се изчисли по следната формула:

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

където:

F = силата, измерена с динамометър, в точката на прекъсване на филма

R = радиус на пръстена

f = корекционният коефициент (1)

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ С РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

По възможност протоколът с резултатите от изпитването трябва да включва следната информация:

— използван метод,

— тип на използвания разтвор,

— точно определение на веществото (вид и примеси),

— резултати от изпитванията: повърхностно напрежение (отчетено) – включват се показанията при отделните измервания и тяхната средно-аритметична стойност, както и коригираната средна стойност (в която са взети под внимание типа на оборудването и корекционната таблица),

— концентрация на разтвора,

— температура на изпитването,

— време на престояване на разтвора; по-точно времето между приготвянето и измерването на разтвора,

— описание на зависимостта на повърхностното напрежение от времето след прехвърлянето на разтвора в измервателния съд,

— трябва да се докладва цялата информация и бележки върху интерпретацията на резултатите, особено онези, които са свързани с примесите и физичното състояние на веществата.

3.2. АНАЛИЗИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Като се има предвид, че повърхностното напрежение на водата е 72,75 mN/m при 20 °C, веществата с повърхностно напрежение, по-ниско от 60 mN/m, определено при условията на този метод, трябва да се разглеждат като повърхностно активни вещества.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

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

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

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

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

А.6. РАЗТВОРИМОСТ ВЪВ ВОДА

1. МЕТОД

Описаният метод се основава на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСР (1).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

За провеждането на това изпитване, е полезно да се разполага с предварителна информация за структурната формула, парното налягане, дисоциационната константа и хидролизата (като функция от pH) на веществото.

Не съществува универсален метод, с който да се покрие целият обхват от разтворимости във вода.

Двата метода за изпитване, описани по-долу, покриват цялата област от разтворимости, но не могат да се използват за летливи вещества:

— единият метод, който се прилага към почти чисти вещества с ниски разтворимости (< 10^{-2} грама на литър), стабилни във вода, се нарича „метод на елуиране от колона“,

— другият метод, който се прилага към почти чисти вещества с по-високи разтворимости (> 10^{-2} грама на литър), стабилни във вода, се нарича „метод на стъкленицата“.

Разтворимостта на изпитваното вещество може значително да се повлияе от присъствието на примеси.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Разтворимостта във вода на едно вещество се определя като масовата концентрация на наситения разтвор на веществото във вода при дадена температура. Разтворимостта във вода се дава в единици маса за обем разтвор. Мерната единица в системата SI е kg/m^3 (може също да се използва и грам на литър).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не е необходимо да се използват вещества за сравнение във всички случаи, когато се изпитва ново вещество. Преди всичко, те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода и да позволяват сравнение с резултатите, получени по други методи.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Приблизителното количество на пробата и времето, необходимо за достигане на масовата концентрация на насищане трябва да се определят с просто предварително изпитване.

1.4.1. **Метод на елуиране от колона**

Този метод се основава на елуиране на изпитваното вещество с вода от микроколона, запълнена с инертен носител, например стъклени перли или пясък, покрит с излишък от изпитваното вещество. Разтворимостта във вода се определя, когато масовата концентрация на елуата стане постоянна. Това се изразява като плато в кривата на зависимостта на концентрацията от времето.

1.4.2. **Метод на стъкленицата**

При този метод, веществото (твърдите вещества трябва да се привеждат в прахообразно състояние) се разтваря във вода при температура, малко по-висока от температурата на изпитването. Когато се достигне насищането, сместа се охлажда и се държи при температурата на изпитването като се разбърква колкото е необходимо, до достигане на равновесие. Също така, изпитването може да се проведе и направо при желаната температура, ако с помощта на подходящи проби се докаже, че е достигнато равновесие. След това, с подходящ аналитичен метод се определя масовата концентрация на веществото във водния разтвор, който не бива да съдържа неразтворени частици.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

1.5.1. **Повторяемост**

При метода на елуиране от колона е възможно да се получат разлики < 30 %; за метода на стъкленицата, трябва да се наблюдават разлики < 15 %.

1.5.2. **Чувствителност**

Тя зависи от аналитичния метод, но трябва да могат да се определят масови концентрации до 10^{-6} грама на литър.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Условия на изпитването**

За предпочитане е изпитването да се провежда при 20 ± 0,5 °C. Ако температурната зависимост на разтворимостта е > 3 % на °C, то изпитването трябва да се направи при още две температури, които да са поне с 10 °C над и под първоначално подбраната температура. В този случай точността, с която се поддържа температурата трябва да бъде ± 0,1 °C. Избраната температура трябва да се поддържа постоянна във всички свързани части на оборудването.

1.6.2. **Предварително изпитване**

Към приблизително 0,1 g от пробата (твърдите вещества трябва да са в разпрашено състояние), поставена в градуиран цилиндър от 10 ml със стъклена запушалка, при стайна температура се прибавят нарастващи обеми дестилирана вода, както е показано в таблицата:

0,1 g разтворими в „x“ ml вода	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Приблизителна разтворимост (грама на литър)	> 1000	1 000 до 200	200 до 1000	100 до 50	50 до 10	10 до 1	< 1

След всяко прибавяне на посоченото количество вода, сместа се разклаща силно в продължение на 10 минути и визуално се проверява за наличието на неразтворени частици. Ако след прибавянето на 10 ml вода, пробата или частици от нея останат неразтворени, опитът трябва да се повтори в мерителен цилиндър от 100 ml с по-големи обеми вода. При по-ниски разтворимости, времето, необходимо за разтваряне на веществото трябва да е значително по-дълго (трябва да се предвидят поне 24 часа). Приблизителната разтворимост се дава в таблицата под онзи обем добавена вода, при който настъпва пълното разтваряне на пробата. Ако веществото все още очевидно не е разтворено, трябва да се предвидят повече от 24 h (максимум 96 h) или да се предприеме ново разреждане, за да се разбере кой от двата метода – методът на елуиране от колона или методът на стъкленицата – трябва да се приложи.

1.6.3. **Метод на елуиране от колона**

1.6.3.1. *Носител, разтворител и елуиращ агент*

При метода на елуиране от колона носителят трябва да бъде инертен. Материалите, които могат да се използват като носители, са стъклени перли или пясък. За да може изпитваното вещество да се отложи върху носещия материал, се използва подходящ летлив разтворител с аналитична степен на чистота. Като елуиращ агент се използва вода, двойнодестилирана в стъклен или кварцов апарат.

Забележка:

Не бива да се ползва вода, взета направо от органичен йонообменник.

1.6.3.2. *Натоварване на веществото върху носителя*

Приблизително 600 mg от носещия материал се претеглят и прехвърлят в облодънна колба от 50 ml.

Подходящо количество от изпитваното вещество се претегля и разтваря в избрания разтворител. Част от този разтвор се прибавя към носещия материал. Разтворителят трябва да се изпари напълно, например с ротационен изпарител. В противен случай, поради ефектите на разпределение на повърхността на носителя, колоната няма да може да се насити с вода.

Натоварването на носещия материал може да създаде проблеми (неверни резултати), ако изпитваното вещество се отлага под формата на масло или в различно кристално състояние. Проблемът трябва да се разглежда експериментално и подробностите да се опишат в протокола.

Натовареният с веществото носител се оставя да се просмуче за около два часа в около 5 ml вода, след което суспензията се поставя в микроколоната. Също така, възможно е сухият носител, натоварен с веществото да се насипе в микроколоната, предварително запълнена с вода и да се изчака около два часа, докато се достигне равновесие.

Процедура на изпитване:

Елуирането на веществото от носещия материал може да се извърши по един от двата начина:

— рециркулационна помпа (виж фигура 1),

— нивелиращ съд (виж фигура 4).

1.6.3.3. *Метод на елуиране от колона с рециркулационна помпа*

Апаратура

На фигура 1 е показано схематично подреждането на апаратите в една типична за целта система. На фигура 2 е показана подходяща микроколона; колоната може да има произволни размери, стига те да покриват изискванията за възпроизводимост и чувствителност на метода. В колоната трябва да е предвидено входно разширение, което може да поема поне пет пъти по-голям обем вода от обема на колоната и в което да могат да се поставят най-малко пет проби. От друга страна, размерът може да е и по-малък в случай, че се използва разтворител, който да замести първоначалните пет обема, предназначени за отстраняване на примесите.

Колоната трябва да се свърже с рециркулационна помпа, с която може да се контролира подаването на потоци от приблизително 25 ml/h. Помпата се свързва чрез съединения, направени от политетрафлуороетилен (P.T.F.E.) и/или стъкло. При събирането на колоната и помпата трябва да се предвидят приспособления за отбиране на проби от изходния поток и за изравняване на налягането във входното пространство с атмосферното. Пълнителят в колоната лежи върху малка тапа (5 mm) от стъклена вата, която служи и за филтриране на твърдите частици. Рециркулационната помпа може да бъде например, перисталтична или мембранна помпа (трябва да се вземат мерки помпата да не се замърсява и/или да не абсорбира веществото от тръбата).

Процедура на изпитване

Потокът през колоната се стартира. Препоръчително е да се работи при скорост на потока приблизително 25 ml/h (за описаната тук колона, това съответства на 10 обема на колоната за час). Първите пет обема (минимум) се изхвърлят, за да се отстранят разтворимите във вода примеси. След това, рециркулационната помпа се пуска да работи докато се установи равновесие. Настъпването на равновесието се определя с пет последователни проби, чиито концентрации, взети в произволен ред, не се различават една от друга с повече от ± 30 %. Тези проби трябва да се отбират на интервали от време, не по-малки от времето, необходимо за преминаването на 10 колонни обема от елуиращия агент.

1.6.3.4. *Метод на елуиране от колона с нивелиращ съд*

Апаратура (виж фигури 4 и 3)

Нивелиращ съд: свързването към нивелиращия съд се прави като се използва шарнир от шлифовано стъкло, който е свързан чрез тръбички от политетрафлуороетилен (PTFE). Препоръчително е да се работи при приблизителна скорост на потока от 25 ml/h. Последователни фракции от елуата се събират и анализират по избрания метод.

Процедура на изпитването

Разтворимостта във вода се определя по онези фракции от елуата, чиито концентрации са постоянни (± 30 %) при най-малко пет последователни фракции.

И в двата случая (при използването на рециркулационна помпа и на нивелиращ съд), трябва да се направи второ измерване при скорост на потока, два пъти по-малка от първата. Ако резултатите от двата опита са съвместими, изпитването се счита за успешно; ако при по-малка скорост на потока се получи по-висока стойност за разтворимостта, то скоростта на потока отново се намалява наполовина и това продължава докато при два последователни експеримента се получи една и съща разтворимост.

И в двата случая (при използването на рециркулационна помпа и на нивелиращ съд), отбраните фракции трябва да се проверяват за наличието на колоидни частици чрез изпитване за Тиндалов ефект (разсейване на светлината). Наличието на такива частици прави резултатите невалидни и изпитването трябва да се повтори след като се подобри филтрирането от колоната.

Трябва да се записва pH на всяка проба. При същата температура трябва да се направи още едно изпитване.

1.6.4. **Метод на стъкленицата**

1.6.4.1. *Апаратура*

За метода на стъкленицата са необходими следните материали:

— обичайните лабораторни прибори и стъклария,

— приспособление, в което разтворите могат да се разбъркват при контролирани постоянни температури,

— центрофуга (за предпочитане термостатирана), и

— оборудване за аналитични изпитвания.

1.6.4.2. *Процедура на изпитване*

Количеството вещество, необходимо да насити желания обем вода, се изчислява при предварителните изпитвания. Необходимият обем вода зависи от аналитичния метод и от областта, в която се намира разтворимостта. Около пет пъти по-големи количества материал от определените по-горе, се претеглят и се поставят в три стъклени съда, снабдени със стъклени запушалки (например центрофужни епруветки или колби). След това, съдовете се затварят и съдържанието им се размесва при 30 °C (трябва да се използват клатачни машини или бъркалки, които могат да работят при постоянна температура, например магнитна бъркалка в термостатирана водна баня). След един ден, един от съдовете се взима и чрез периодично разклащане се темперира отново за 24 часа, но при температурата на изпитването. След това, съдържанието на съда се центрофугира също при температурата на изпитването и концентрацията на изпитваното вещество в бистрата водна фаза се определя с подходящ аналитичен метод. Другите две стъкленици се обработват по същия начин след първоначално темпериране при 30 °C, продължаващо съответно два и три дни. Ако резултатите за концентрацията при поне два от съдовете съвпадат с исканата точност, изпитването се счита за сполучливо. Ако резултатите от съдове 1, 2 и 3 показват тенденция към нарастване на получените стойности за разтворимостта, то цялото изпитване трябва да се повтори при по-продължителни времена за темпериране.

Измервателната процедура може да се провежда също и без предварителна инкубация при 30 °C. За да се определи скоростта, с която се установява равновесието на насищане, се вземат проби, докато времето на разбъркване спре да влияе върху концентрацията на изпитвания разтвор.

Трябва да се записва pH на всяка проба.

1.6.5. **Анализ**

За тези определения, се предпочита специфичен за дадено вещество аналитичен метод, тъй като малки количества от разтворените примеси могат да доведат до големи грешки в измерената величина на разтворимостта. Примери за такива методи са: газова или течна хроматография, титриметрични методи, фотометрични методи, волтаметрични методи.

2. **ДАННИ**

2.1. МЕТОД НА ЕЛУИРАНЕ ОТ КОЛОНА

При всяко изпитване, трябва да се изчислява средната стойност на най-малко пет последователни проби, взети в платото на насищане, както и стандартното отклонение. Резултатите трябва да се дават в единици маса за обем разтвор.

Сравняват се средните стойности, получени при две изпитвания с различни скорости на потока. Те трябва да се различават с по-малко от 30 %.

2.2. МЕТОД НА СТЪКЛЕНИЦАТА

Дават се индивидуалните резултати за всяка от трите стъкленици. Онези резултати, които се считат за еднакви (с разлика по-малка от 15 %) се осредняват и получената средна стойност се дава в единици маса за обем разтвор. Когато разтворимостта е много голяма (> 100 грама на литър), се налага превръщането на единиците за маса в единици обем, като се използва плътността.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. МЕТОД НА ЕЛУИРАНЕ ОТ КОЛОНА

Протоколът с резултатите трябва по възможност да включва следната информация:

— резултати от предварителното изпитване,

— точна определение на веществото (вид и примеси),

— индивидуалните концентрации, скорости на потока и pH за всяка проба,

— средните стойности и стандартните отклонения на най-малко пет проби от платото на насищане при всеки опит,

— средната стойност на два последователни успешни опита,

— температурата на водата по време на насищането,

— използван метод за анализ,

— природа на носещия материал,

— натоварване на носещия материал,

— използван разтворител,

— данни за химична неустойчивост на веществото в процеса на изпитването и използван метод,

— всяка информация относно интерпретиране на резултатите, особено онази, която се отнася до примесите и физичното състояние на веществото.

3.2. МЕТОД НА СТЪКЛЕНИЦАТА

Протоколът с резултатите от изпитването трябва по възможност да включва следната информация:

— резултати от предварителното изпитване,

— точно определение на веществото (вид и примеси),

— индивидуални резултати от аналитичните определения, както и средната стойност в случаите, когато за всяка колба са определени повече от една стойности,

— pH на всяка проба,

— средната стойност за различните колби, които са дали близки резултати,

— температура на изпитването,

— аналитичен метод,

— данни за химична неустойчивост на веществото в процеса на изпитването и използван метод,

— всяка информация относно интерпретирането на резултатите, особено онази, която се отнася до примесите и физичното състояние на веществото.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

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

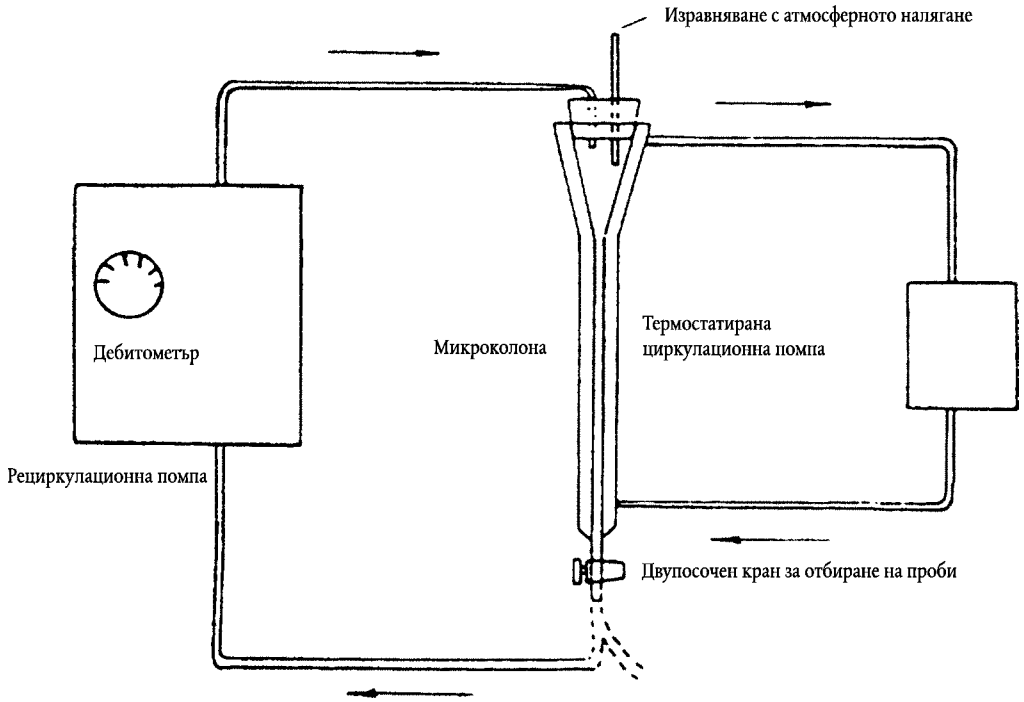
(2) NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

Допълнение

Фигура 1

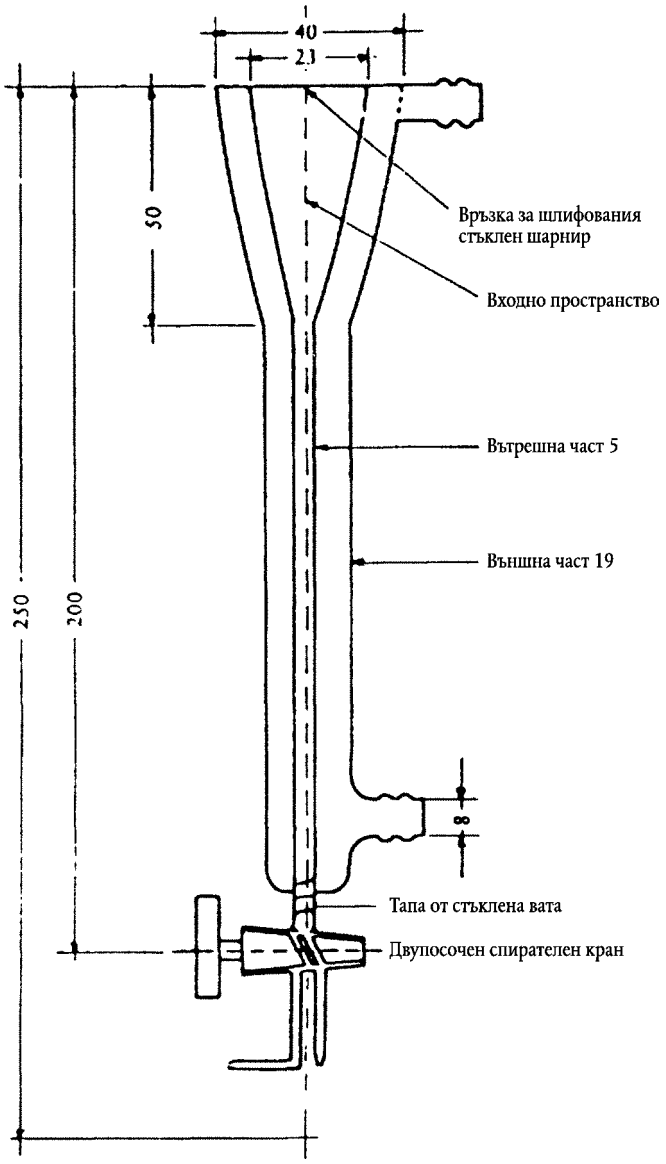
Метод на елуиране от колона с рециркулационна помпа



Фигура 2

Типична микроколона

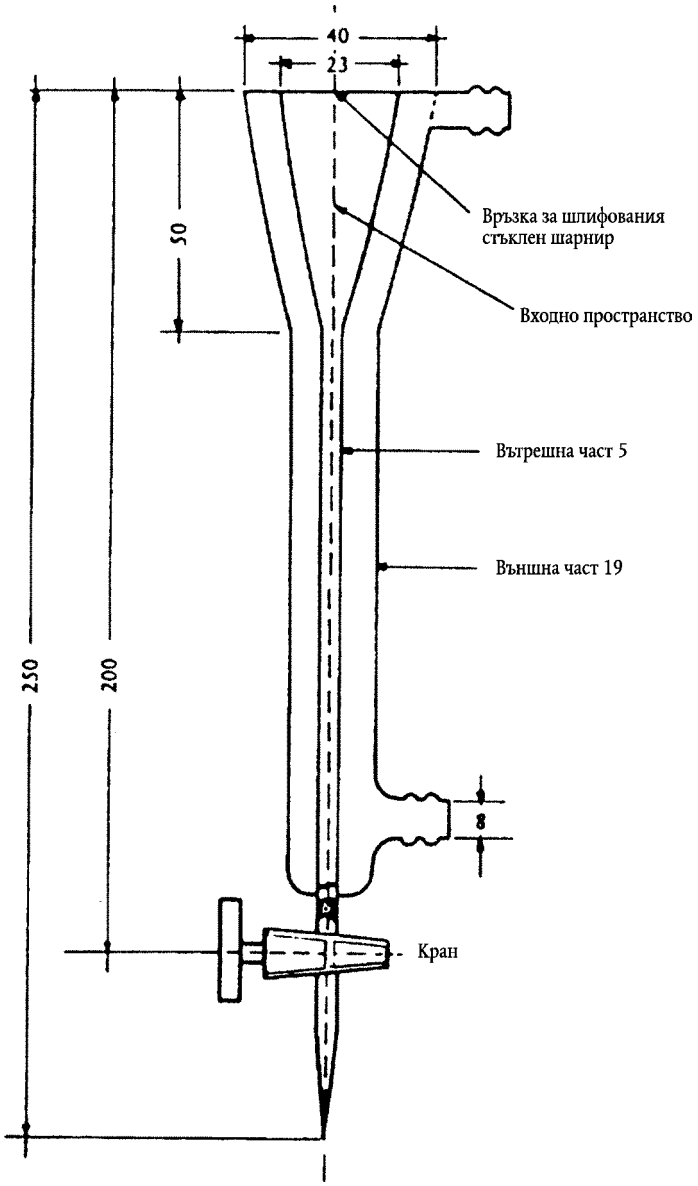
(всички размери са в милиметри)



Фигура 3

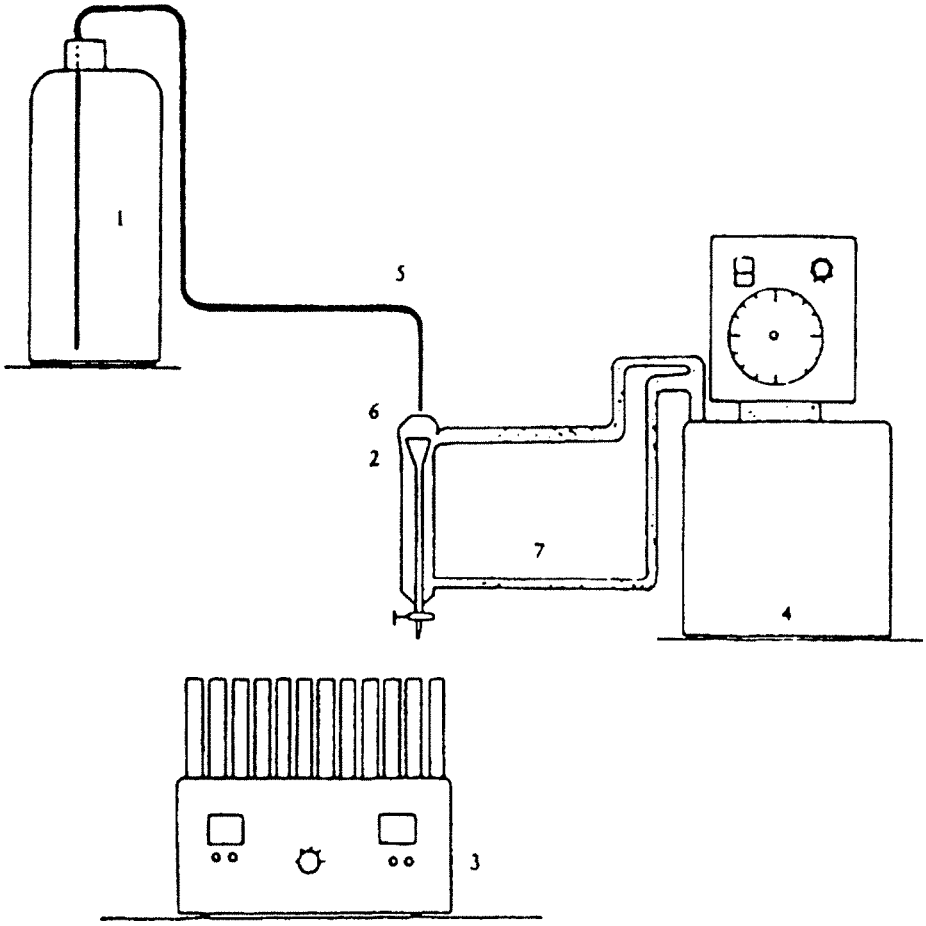
Типична микроколона

(всички размери са в милиметри)



Фигура 4

Метод на елуиране от колона с нивелиращ съд



1 = Нивелиращ съд (например стъкленица с обем 2,5 литра)
2 = Колона (виж фигура 3)
3 = Колектор за фракциите
4 = Термостат
5 = Тефлонови тръбички
6 = Шлифован стъклен шарнир
7 = Водна линия (между термостата и колоната; вътрешен диаметър приблизително 8 mm)

А.8. КОЕФИЦИЕНТ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ

1. **МЕТОД**

Методът на „разклащането в стъкленица“ се основава на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСР (1).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

За провеждането на това изпитване е полезно да се разполага с предварителна информация за структурната формула, дисоциационната константа, разтворимостта във вода, хидролизата, разтворимостта в n–октанол и повърхностното напрежение на веществото.

Изпитванията върху вещества, които могат да се йонизират трябва да се провеждат в нейонната им форма (свободна киселина или свободна база). Тя се получава с помощта на подходящ буфер с pH, най-малко една единица по-ниско (свободна киселина) или по-високо (свободна база) от pK на веществото.

Този изпитвателен метод обхваща две отделни процедури: метода на разклащането в стъкленица и високочувствителна течна хроматография (HPLC). Първият метод се прилага, когато стойността на log P_{ow} (виж по-долу при определенията) попада в областта от 2 до 4, а вторият, в областта от 0 до 6. Преди да се провежда коя да е от двете експериментални процедури, отначало трябва да се направи предварителна оценка на коефициента на разпределение.

Методът на разклащането в стъкленица се прилага само с абсолютно чисти вещества, разтворими във вода и n–октанол. Той не може да се използва за повърхностно активни вещества (за които трябва да се предостави изчислена стойност или приблизителна оценка, основана на разтворимостите им в n–октанол и във вода, получени поотделно).

HPLC методът не може да се прилага за силни киселини и основи, метални комплекси, повърхностно активни материали или вещества, които реагират с елуиращия агент. За такива вещества трябва да се предостави изчислена стойност или приблизителна оценка, основана на разтворимостите им в n–октанол и във вода, получени поотделно.

Методът на HPLC е по-малко чувствителен към присъствието на примеси в изпитваното вещество, отколкото методът на разклащането в стъкленица. Независимо от това, и при този метод в някои случаи присъствието на примеси може да доведе до трудно интерпретиране на резултатите, защото определянето на пиковете става несигурно. За смеси, които дават недобро разделяне на пиковете, трябва да се посочват горната и долната граница на log P.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Коефициентът на разпределение (P) се дефинира като съотношението между равновесните концентрации (c_i) на разтвореното вещество в двуфазна система, която се състои от два практически несмесващи се разтворителя, в случая и:

$$P_{ow} = \frac{C_{Oktanool}}{C_{vesi}}$$

Така, че коефициентът на разпределение (P) представлява съотношение между две концентрации и обикновено се дава във формата на логаритъм при основа 10 (log P).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Метод на разклащането в стъкленица

Веществата за сравнение не е необходимо да се използват във всички случаи, когато се изпитва ново вещество. Преди всичко, те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода и да позволяват сравнение с резултатите, получени по други методи.

HPLC метод

За да се установи съотношението, в което се намират данните за дадено вещество, получени по HPLC метода и неговата P-стойност, трябва да се начертае калибрационна графика на log P спрямо хроматографските данни. За целта се използват най-малко 6 точки, получени от сравнителни вещества. Подборът на подходящи сравнителни вещества остава на грижата на потребителя. Където е възможно, поне едно съединение за сравнение трябва да има P_{ow}, по-високо от това на изпитваното вещество, а друго съединение за сравнение да има P_{ow}, по-ниско от това на изпитваното вещество. За стойности на log P по-малки от 4, калибрирането трябва да се основава на данни, получени по метода на разклащането в стъкленица. За стойности на log P, по-големи от 4, калибрирането трябва да се базира на утвърдени литературни данни, ако те се съгласуват с изчислените стойности. По-висока точност може да се постигне, ако се изберат сравнителни вещества, подобни по структура на изпитваното вещество.

В списъците със стойности (2) и (3) могат да се намерят обширни списъци със стойностите на log P_{ow} за много групи от химични вещества. Ако не могат да се открият данни за коефициентите на разпределение на вещества, структурноподобни на изпитваното, може да се направи по-общо калибриране, като се използват други съединения за сравнение.

В допълнение 2 е даден списък от вещества, които се препоръчват като сравнителни, а също и техните P_{ow} стойности.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

1.4.1. **Метод на разклащането в стъкленица**

За да се намери коефициентът на разпределение, трябва да се достигне равновесие между всички взаимодействащи компоненти на системата и да се определят концентрациите на разтвореното вещество в двете фази. Изучаването на литературата по този въпрос показва, че за решаването на проблема, т.е. смесването на двете фази и последващото им разделяне с цел определянето на равновесната концентрация на изпитваното вещество, могат да се използват няколко различни техники.

1.4.2. **HPLC метод**

Изпитването с HPLC се провежда в аналитични колонки с търговски пълнител, състоящ се от дълги въглеводородни вериги (например C_8, C_{18}), химически свързани към силициев диоксид. Химичните вещества, инжектирани в такава колонка се придвижват по дължината ѝ с различна скорост, поради различната степен на разпределение между подвижната фаза и неподвижната въглеводородна фаза. Смеси от химични вещества се елуират по реда на тяхната хидрофобност, като веществата, разтворими във вода се елуират първи, а веществата, разтворими в мазнини се елуират последни, в съответствие с техните коефициенти на разпределение между въглеводородната и водната фази. Това позволява да се установи връзка между времето на задържане в такава колонка (с обърната фаза) и коефициента на разпределение n-октанол/вода. Коефициентът на разпределение се извежда от коефициента на пропускане k, който се дава с израза:

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

където t_r = времето на задържане на изпитваното вещество в колоната, а t_o = средното време, необходимо на една молекула от разтворителя да премине през колоната (мъртво време).

Не е необходимо да се прилагат количествени аналитични методи. Нужно е само да се определят времената на елуиране.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

1.5.1. **Повторяемост**

Метод на разклащането в стъкленица

За да се постигне точното определяне на коефициента на разпределение, трябва да се направят по две изпитвания при три различни експериментални условия, които могат да се задават като се променя количеството на изпитваното вещество, както и съотношенията между обемите на разтворителите. Определените стойности за коефициента на разпределение, изразени в десетични логаритми трябва да попадат в областта ± 0,3 логаритмични единици.

HPLC метод

За да се увеличи достоверността на резултатите, трябва да се правят по две изпитвания. Стойностите на log P, получени при отделните изпитвания трябва да попадат в областта ± 0,1 логаритмични единици.

1.5.2. **Чувствителност**

Метод на разклащането в стъкленица

Областта, в която може да се използва методът, се определя от ограниченията на аналитичната процедура. Тя трябва да позволява оценка на стойностите на $\log P_{ow}$ в областта от 2 до 4 (в някои случаи, като се подберат условията, тази област може да се разшири до $\log P_{ow} = 5$), като концентрациите на разтвореното вещество във всяка от двете фази не надвишават 0,01 мола на литър.

HPLC метод

Методът HPLC позволява коефициентите на разпределение да се определят в областта на $\log P_{ow}$ от 0 до 6.

Обикновено, коефициентът на разпределение на едно вещество може да се прецени с точност до ± 1 логаритмична единица от стойността, получена по метода с разклащане на стъкленица. Типичните корелации могат да се намерят в литературните източници (4) (5) (6) (7) (8). По-висока точност се постига, когато корелационните графики се базират на структурноподобни съединения (9).

1.5.3. **Специфичност**

Метод на разклащането в стъкленица

Законът на Нернст за разпределението се отнася само за разредени разтвори при постоянна температура, налягане и pH. Той се прилага само за чисти вещества, разпределени между два чисти разтворителя. Резултатите могат да се повлияят, ако се окаже, че в едната или и в двете фази има няколко различни разтворени вещества.

Дисоциацията или асоциацията на разтворените молекули води до отклонения от закона на Нернст за разпределението. Тези отклонения се откриват по това, че коефициентът на разпределение започва да зависи от концентрацията на разтвора.

Този метод не може да се прилага без да се нанасят корекции за вещества, които могат да преминават в йонно състояние, поради многобройните равновесия, които се установяват в системата. За такива вещества, вместо вода, могат да се използват буферни разтвори; pH на буфера трябва да се различава от pK_a на веществото с поне една pH-единица и винаги трябва да се внимава дали това pH е приложимо за дадената среда.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Предварителна оценка на коефициента на разпределение**

За предпочитане е коефициентът на разпределение да се намери чрез изчислителни методи (виж допълнение 1) или когато е възможно, от съотношението на разтворимостите на изпитваното вещество в чистите разтворители (10).

1.6.2. **Метод на разклащането в стъкленица**

1.6.2.1. *Подготовка*

n-Октанол: определянето на коефициента на разпределение трябва да се извършва в реактив с висока аналитична степен на чистота.

Вода: трябва да се използва дестилирана или бидестилирана в стъклен или кварцов съд вода. Ако е оправдано, за вещества, които имат йонна форма, вместо вода се използват буферни разтвори.

Забележка:

Не бива да се използва вода, взета направо от йонообменник.

1.6.2.1.1. Предварително насищане на разтворителите

Преди определянето на коефициента на разпределение, двете фази на системата от разтворители трябва взаимно да се наситят, като се разклащат при температурата на експеримента. За да се направи това, е добре в два големи лабораторни съда да се поставят съответно n–октанол с висока степен на чистота и вода, към всеки съд да се добави достатъчно количество от другия разтворител и съдовете да се разклащат в продължение на 24 часа на механична клатачка. След това, те се оставят да престоят достатъчно дълго, така че фазите да се разделят и да се постигне състоянието на насищане.

1.6.2.1.2. Подготовка за изпитването

Целият обем на двуфазната система трябва да запълни почти изцяло измервателния съд. Това ще помогне да се избегне загубата на материал чрез изпарение. Съотношението на обемите на разтворителите и количеството вещество, които ще се използват при изпитването, се определят от следните фактори:

— предварителната оценка на коефициента на разпределение (виж по-горе),

— минималното количество от изпитваното вещество, необходимо за провеждането на аналитичната процедура, и

— ограничението за максималната концентрация във всяка от фазите, което е 0,01 мола на литър.

Извършват се три изпитвания. При първото се използва изчисленото обемно съотношение на n–октанола към водата; при второто, това съотношение се разделя на две; при третото, отношението се умножава по две (например 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Изпитвано вещество

Приготвя се сток-разтвор в n–октанола, наситен с вода. Концентрацията на този разтвор трябва да се определи с висока точност преди той да се използва за определянето на коефициента на разпределение. Разтворът се съхранява при условия, осигуряващи стабилността му.

1.6.2.2. *Условия на изпитването*

Температурата на изпитването трябва да се поддържа постоянна (± 1 °C) и да бъде в интервала от 20 до 25 °C.

1.6.2.3. *Процедура на изпитването*

1.6.2.3.1. Установяване равновесието на разпределение

За всяко изпитване при дадени условия трябва да се приготвят по два изпитвателни съда, съдържащи необходимото, точно премерено количество от двата разтворителя, заедно с нужното количество сток-разтвор.

Фазите на n–октанола трябва да се премерят по обем. Измервателните съдове се поставят в подходяща клатачна машина или се разклащат на ръка. Ако се използва центрофужна епруветка, препоръчително е тя да се завърта бързо на 180° около напречната ѝ ос, така че задържания въздух да преминава през двете фази. Опитът е показал, че 50 такива завъртания обикновено са достатъчни да се достигне равновесието на насищане. За по-голяма сигурност, е добре да се направят 100 завъртания за пет минути.

1.6.2.3.2. Разделяне на фазите

Когато е необходимо, разделянето на фазите се постига като сместа се центрофугира. Това се прави на лабораторна центрофуга, в която се поддържа стайна температура или, ако се използва центрофуга без температурен контрол, центрофужните епруветки трябва да се темперират при температурата на изпитването поне един час преди анализа.

1.6.2.4. *Анализ*

За да се определи коефициентът на разпределение, е необходимо да се измери концентрацията на изпитваното вещество във всяка от фазите. Това може да се направи като се вземе част от отделните фази във всяка епруветка при всяко измерване и тя се анализира с помощта на избраната процедура. Трябва да се изчисли общото количество вещество в двете фази и да се сравни с първоначално въведеното количество.

Пробата от водната фаза трябва да се вземе така, че рискът от замърсяване със следи от n–октанол да е минимален. За целта може да се използва стъклена спринцовка с подвижна игла. Първоначално, спринцовката се запълва частично с въздух. Въздухът внимателно се изпуска, докато иглата преминава през слоя от n–октанол. Със спринцовката се поема необходимият обем от водната фаза. След това, тя бързо се изважда от разтвора и иглата се отстранява. Тогава, съдържанието на спринцовката може да се използва като проба от водната фаза. Концентрацията в двете разделени фази се определя за предпочитане по метод, специфичен за веществото. Примери за подходящи аналитични методи са следните:

— фотометрични методи,

— газова хроматография,

— високочувствителна течна хроматография.

1.6.3. **HPLC метод**

1.6.3.1. *Подготовка*

Апаратура

Необходим е течен хроматограф, снабден с помпа за равномерно подаване на течности и подходящо отчитащо устройство. Препоръчва се да се използва инжекционен клапан с инжекционни скоби. Присъствието на полярни групи в неподвижната фаза може значително да влоши действието на HPLC колоната. Затова, неподвижната фаза трябва да има минимален процент от полярни групи (11). Могат да се използват търговските пълнители от микрочастици за обърнати фази или готови напълнени колони. Между инжекционната система и аналитичната колона може да се постави предпазна колона.

Подвижна фаза

Като елуиращи разтворители (които се дегазират преди употреба) се използват метанол и вода със степени на чистота за колонна хроматография. Прилага се изократно елуиране. Съотношенията метанол/вода трябва да предвиждат минималното съдържание на вода да бъде 25 %. Обикновено, сместа метанол/вода 3:1 (v/v) е подходяща за елуиране на съединения с log P = 6 в рамките на един час при скорост на потока = 1 ml/min. За вещества с по-високи стойности на log P, може да се наложи намаляване на времето за елуиране (също и на сравнителните вещества) като се намалят полярността на подвижната фаза или дължината на колоната.

Веществата с много ниска разтворимост в n–октанол често дават необичайно ниски стойности на log P_{ow} по HPLC метода; пиковете на тези вещества понякога се появяват с фронта на разтворителя. Това вероятно се дължи на факта, че процесът на разпределение е твърде бавен, за да се достигне равновесие за времето, което обикновено се предвижда за разделянето чрез HPLC. Възможно е, като се намали скоростта на потока и/или съотношението метанол/вода, да се достигне до получаването на достоверна величина.

Както изпитваните, така и сравнителните вещества трябва да са разтворими в подвижната фаза в концентрации, достатъчни да позволят изпитването им. Използването на добавки към сместа от метанол и вода се разрешава само в изключителни случаи, тъй като те променят свойствата на колоната. За получаването на хроматограми с добавки, задължително се използва отделна колона от същия тип. Ако сместа метанол–вода не е подходяща, може да се използва смес от друг органичен разтворител и вода, например етанол–вода или ацетонитрил–вода.

Стойността на pH на елуиращия агент е важна за съединенията, които могат да преминават в йонна форма. Тя трябва да бъде в работната pH-област на колоната, която обикновено е между 2 и 8. Препоръчва се използването на буфери. Трябва да се внимава да се избегне утаяването на соли и замърсяването на колоната, което може да се получи при някои смеси органичен разтворител/буферен разтвор. Измервания с HPLC с неподвижна фаза на базата на силициев диоксид при pH над 8 не се препоръчват, тъй като употребата на алкална подвижна фаза може да доведе до бързо влошаване качествата на колоната.

Разтворени вещества

Сравнителните вещества трябва да бъдат с възможно най-голяма степен на чистота. Ако е възможно, веществата, които ще се изпитват и тези, които ще се използват за калибриране се разтварят в подвижната фаза.

Условия на измерването

Температурата по време на измерването не бива да се променя с повече от ± 2 K.

1.6.3.2. *Изперване*

Изчисляване на мъртвото време t_o

Мъртвото време t_o може да определи или като се използва хомоложна серия (например n-алкилметил кетони) или органични съединения, които не се задържат (например тиоуреа или формамид). С помощта на хомоложна серия, мъртвото време t_o се изчислява като една поредица от най-малко седем члена на хомоложния ред се инжектират в колоната и се определят съответните времена на задържане. Времената на задържане $t_{r(nc + 1)}$ се нанасят на графика като функция на $t_{r(nc)}$, а отрязъкът a и наклонът b се определят по регресионното уравнение:

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

(n_c = броят въглеродни атоми). Тогава мъртвото време се дава със:

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

Калибрационна графика

Следващата стъпка е да се построят корелационни криви на log k към log p за подходящи сравнителни вещества. На практика, серия от 5 до 10 сравнителни вещества, чиито log p е близо до очакваната област, се инжектират едновременно и времената им на задържане се определят за предпочитане на записващ интегратор, свързан към измерителната системата. Съответните логаритми от коефициента на пропускане, log k, се изчисляват и нанасят като функция от log p, определен по метода на разклащането в стъкленица. Калибрирането се прави през равномерни интервали поне веднъж дневно, така че да се отчитат възможните измемения в работата на колоната.

Определяне на коефициента на пропускане на изпитваното вещество

Изпитваното вещество се инжектира в колоната с колкото е възможно по-малко количество от подвижната фаза. Определя се времето на задържане (два пъти), което позволява да се изчисли коефициента на пропускане k. Коефициентът на разпределение на изпитваното вещество може да се получи от корелационната графика на сравнителните вещества. За много ниски или много високи коефициенти на разпределение се налага да се извърши екстраполация. В тези случаи, трябва да се внимава за границите на достоверност на регресионната права.

2. **ДАННИ**

Метод на разклащането в стъкленица

Надеждността на определените стойности на P може да се провери, като се сравнят средните стойности от двукратните определения и средната стойност, получена от целия опит.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът с резултатите трябва по възможност да включва следната информация:

— точно описание на веществото (вид и примеси),

— когато горните методи не могат да се приложат (например при повърхностно активни вещества), трябва да се представи стойност, изчислена посредством разтворимостите в n–октанол и във вода, намерени поотделно,

— цялата информация и бележките относно интерпретирането на резултатите, особено онези, свързани с примесите и физичното състояние на веществото.

За метода на разклащането в стъкленица

— резултатите от предварителните изпитвания, ако има такива,

— температурата на изпитването,

— данни за аналитичната процедура, с която са определяни концентрациите,

— време и скорост на центрофугиране, ако е провеждано такова,

— намерените концентрации в двете фази при всяко измерване (това означава, че се представят общо 12 концентрации),

— тегло на изпитваното вещество, обем на отделните фази във всеки от измервателните съдове и изчисленото общо количество изпитвано вещество, което присъства във фазите след достигането на равновесие,

— изчислените стойности на коефициента на разпределение (P) и тяхната средна стойност за отделните експерименти, проведени при дадени условия, както и средната стойност за всички опити. Ако има предположение, че коефициентът на разпределение зависи от концентрацията, това също трябва да се отбележи в протокола,

— съобщава се стандартното отклонение на индивидуалните P-стойности от средната стойност,

— средната стойност на P от всички изпитвания трябва да се изрази и като десетичен логаритъм,

— изчисленото теоретично P_{ow}, когато тази величина е била определена или когато измерената стойност е > 10^{-4},

— pH на използваната вода, както и това на водната фаза по време на експеримента,

— ако са използвани буфери, трябва да се даде обосновка защо вместо вода е използван буфер, неговият състав, концентрация и pH, pH на водната фаза преди и след експеримента.

За метода на HPLC:

— резултатите от предварителните изпитвания, ако има такива,

— изпитвани и сравнителни вещества и тяхната степен на чистота,

— температурна област на изпитванията,

— pH, при което са правени изпитванията,

— детайлно описание на аналитичната и предпазната колона, подвижната фаза и средствата, с които са провеждани изпитванията,

— данни за времето на задържане и литературни стойности на log P на сравнителните вещества, използвани за калибриране,

— данни за направената регресионна права (log k към log P),

— данни за средното време на задържане и за интерполираната log P-стойност на изпитваното съединение,

— описание на оборудването и условията на работа,

— профили на елуирането,

— количества на изпитваното и на сравнителните вещества, въведени в колоната,

— мъртво време и как е измерено.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

(1) ОИСР, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C (18) 30 final.

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

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

(4) L. Renberg, G. Sundstroem and K. Sundh-Nygaerd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Допълнение 1

Методи за изчисляване и за приблизителна оценка

ВЪВЕДЕНИЕ

Общо въведение към изчислителните методи, както и различни данни и примери са дадени в Ръководството с методи за определяне на химични свойства (a).

Изчислените стойности на P_{ow} могат да се използват:

— за да се определи кой от експерименталните методи е по-подходящ (метода на разклащането в стъкленица се прилага в областта: log P_{ow} = 2 до 4, а метода на HPLC в областта: log P_{ow} = 0 до 6),

— за да се изберат подходящи условия на изпитването (например сравнителни вещества за HPLC процедурите, съотношение n–октанол/вода за метода на разклащането в стъкленица),

— като вътрешнолабораторна проверка за възможни експериментални грешки,

— за да се осигури приблизителна оценка на P_{ow} в случаите, когато експерименталните методи не могат да се приложат по технически причини.

МЕТОДИ ЗА ОЦЕНКА

Предварителна преценка на коефициента на разпределение

Стойността на коефициента на разпределение може да се оцени приблизително като се използват разтворимостите на изпитваното вещество в чистите разтворители.

За тази цел се пресмята:

$$P_{\text{приблизително}} = \frac{\text{наситен с}_{\text{n-октанол}}}{\text{наситен с}_{\text{вода}}}$$

ИЗЧИСЛИТЕЛНИ МЕТОДИ

Принцип на изчислителните методи

Всички изчислителни методи се основават на формалното фрагментиране на молекулата на подходящи подструктури, за които са известни надеждни стойности на log P_{ow}. След това log P_{ow} на цялата молекула се изчислява като се сумират стойностите на съответните фрагменти и се прибавят корекционни членове, отчитащи вътрешномолекулните взаимодействия.

Списък с константите на фрагментите и корекционните членове може да се намери в литературните източници (б)(в)(г)(д), някои от които редовно се осъвременяват (б).

Критерии за качество

По принцип надеждността на изчислителния метод се намалява с усложняването на изпитваното съединение. В случаите на прости молекули с ниски молекулни тегла и една или две функционални групи, могат да се очакват отклонения от 0,1 до 0,3 логаритмични единици в стойностите на log P_{ow}, получени по различни методи на фрагментиране и измерената стойност на тази величина. Когато молекулите са по-сложни, грешката става по-голяма. Тя зависи от надеждността и достъпността на фрагментационните константи, както и от възможността да се разпознаят вътрешномолекулните взаимодействия (например водородни връзки). Тя също зависи и от правилното използване на корекционните членове (този проблем отпада, ако се използва компютърния софтуер CLOGP-3)(б). За съединения, които могат да преминават в йонно състояние е важно правилното пресмятане на заряда и степента на йонизацията.

Изчислителни процедури

π-Метод на Ханш

Първоначалната константа за хидрофобен заместител π, въведена от Фуджира и сътрудници (е) е дефинирана като:

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

където P_{ow}(PhX) е коефициентът на разпределение на ароматното производно, а P_{ow}(PhH) е този на основното съединение.

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

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

Съответно на названието си, π-методът се прилага предимно за ароматни съединения. π–Стойностите на голям брой заместители са дадени в таблици в (б)(в)(г). Те се използват за изчисляване log P_{ow} за ароматни молекули или ароматни субструктури.

Метод на Рекер

Според Рекер (g) стойността на log P_{ow} се изчислява така:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_i \text{Vastasmõj u arvestavad liikmed}$$

където f_i представляват константите на различни молекулни фрагменти, а a_i представлява честотата, с която те се срещат в изпитваната молекула. Корекционните членове могат да се представят като интегрален множител на една обща константа C_m (така наречената „магическа константа“). Фрагментационните константи f_i и C_m се определят от списък от 1054 експериментално получени стойности на P_{ow} (825 съединения) като се използва мултипликационен регресионен анализ (c)(h). Определянето на членовете, отчитащи вътрешно молекулните взаимодействия става по редица от правила, описани в позоваванията (д)(з)(и).

Метод на Ханш и Лео

Според Ханш и Лео (в), стойността на log P_{ow} се изчислява по уравнението:

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

където f_i представляват константите на различни молекулни фрагменти, F_j – корекционните членове, а *a* и *b* са съответните честоти, с които се срещат тези фрагменти. Изведени от експерименталните стойности на P_{ow}, по принципа на пробата и грешката, са получени списъци от стойностите на атомни и групови фрагменти, както и списъци с корекционните членове F_j (така наречените „фактори“). В (а)(в) са предложени корекционните членове за няколко различни класа. Доста трудоемко и бавно е да се вземат под внимание всички правила и корекционни параметри. Затова са разработени софтуерни продукти (б).

Комбиниран метод

Изчисляването на log P_{ow} за сложни молекули може значително да се подобри, ако молекулата се раздели на по-големи структури, за които могат да се намерят точни log P_{ow} стойности или от таблици (б)(в) или от собствени измервания. Такива фрагменти (например хетероцикли, антрахинон, азобензен) могат да се комбинират с π–величините на Ханш или с фрагментационните константи на Рекер и Лео.

Забележки

i) Изчислителните методи могат да се прилагат само за съединения, които преминават частично или напълно в йонно състояние, където е възможно да се предвидят необходимите корекционни фактори.

ii) Ако може да се предположи наличието на вътрешномолекулни водородни връзки, трябва да се прибавят съответните корекционни членове (прибл. + 0,6 до + 1,0 log P_{ow} единици) (а). Данни за присъствието на такива връзки могат да се получат от пространствени модели или от спектроскопски данни за молекулата.

iii) Ако са възможни няколко тавтомерни форми, за основа на изчисленията се взема най-вероятната форма.

iv) Внимателно трябва да се следят промените, които се правят в списъците от константи на фрагментите.

Отчитане на резултатите

Когато се използват методи за изчисляване или приблизителна оценка, в протокола трябва по възможност да се включи следната информация:

— описание на веществото (смес, примеси и т.н.),

— признаци за възможни вътрешномолекулни водородни връзки, за дисоциация, поява на заряд или какви да са други необичайни ефекти (напр. тавтомерия),

— описание на изчислителния метод,

— указание какви бази данни са използвани или предоставяне на такива,

— особености при подбора на фрагментите,

— разбираема документация от изчисленията.

ПОЗОВАВАНИЯ

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

б) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremon, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP –3).

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

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

д) F. Rekker, H. M., de Kort, Eur. J. Med. Chem. – Chill. Ther. 1979, vol. 14, 479.

е) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Am. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175.

ж) R. F. Rekker, The hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol.1.

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

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

Допълнение 2

Препоръчвани сравнителни вещества за HPLC метода

№	Сравнително вещество	Log P_{ow}	pK_a
1	2- Бутанон	0,3	
2	4-Ацетилпиридин	0,5	
3	Анилин	0,9	
4	Ацетанилид	1,0	
5	Бензилов алкохол	1,1	
6	p-Метоксифенол	1,3	pKa = 10,26
7	Феноксиоцетна киселина	1,4	pKa = 3,12
8	Фенол	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Динитрофенол	1,5	pKa = 3,96
10	Бензонитрил	1,6	
11	Фенилацетонитрил	1,6	
12	4-Метилбензилов алкохол	1,6	
13	Ацетофенон	1,7	
14	2-Нитрофенол	1,8	pKa = 7,17
15	3-Нитробензоена киселина	1,8	pKa = 3,47
16	4-Хлороанилин	1,8	pKa = 4,15
17	Нитробензен	1,9	
18	Канелен алкохол	1,9	
19	Бензоена киселина	1,9	pKa = 4,19
20	p-Крезол	1,9	pKa = 10,17
21	Канелена киселина	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Анизол	2,1	
23	Метилбензоат	2,1	
24	Бензен	2,1	
25	3-Метил бензоена киселина	2,4	pKa = 4,27
26	4-Хлорфенол	2,4	pKa = 9,1
27	Трихлороетилен	2,4	
28	Атрацин	2,6	
29	Етилбензоат	2,6	
30	2,6-Дихлоробензонитрил	2,6	
31	3-Хлорбензоена киселина	2,7	pKa = 3,82
32	Толуен	2,7	
33	1-Нафтол	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Дихлоранилин	2,8	
35	Хлорбензен	2,8	
36	Алил-фенил етер	2,9	
37	Бромбензен	3,0	
38	Етилбензен	3,2	
39	Бензофенон	3,2	
40	4-Фенилфенол	3,2	pKa = 9,54
41	Тимол	3,3	
42	1,4-Дихлорбензен	3,4	
43	Дифениламин	3,4	pKa = 0,79
44	Нафтален	3,6	
45	Фенилбензоат	3,6	
46	Изопропилбензен	3,7	
47	2,4,6-Трихлорфенол	3,7	pKa = 6
48	Бифенил	4,0	
49	Бензилбензоат	4,0	
50	2,4-Динитро-6-sec.-бутилфенол	4,1	
51	1,2,4-Трихлрбензен	4,2	
52	Додеканова киселина	4,2	
53	Дифенилов етер	4,2	
54	n-Бутилбензен	4,5	
55	Фенантрен	4,5	
56	Флуорантен	4,7	
57	Дибензил	4,8	
58	2,6-Дифенилпиридин	4,9	
59	Трифениламин	5,7	
60	ДДТ	6,2	
	Други сравнителни вещества с нисък log P_{ow}		
1	Никотинова киселина	– 0,07	

А.9. ТОЧКА НА ВЪЗПЛАМЕНЯВАНЕ

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Преди да се проведе това изпитване, е полезно да се разполага с предварителна информация относно запалимостта на веществото. Изпитвателната процедура се прилага за течни вещества, чиито пари могат да се възпламенят от източници на възпламеняване. Методите за изпитване, изброени в този текст, дават достоверни резултати само за онези обхвати от точки на възпламеняване, които са посочени в отделните методи.

При подбора на метода трябва да се предвижда възможността за химична реакция между веществото и държателя на пробата.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Точката на възпламеняване е най-ниската температура, коригирана към налягане 101,325 kPa, при която една течност, в условията на метода, отделя пари в такова количество, че в измервателния съд се получават запалими пари или смес, запалима на въздух.

Единици: °C

$t = T\ 273{,}15$

(като t е изразено в °C и T в K).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Веществата за сравнение не е необходимо да се използват при всички случаи, когато се изпитва ново вещество. Преди всичко, те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода и да позволяват сравняване с резултатите, получени по други методи.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Веществото се поставя в изпитвателен съд и се нагрява или охлажда до температурата на изпитване по начина, който е описан при отделните методи за изпитване. Правят се опити за запалване на веществото, за да се разбере дали пробата може да се възпламени при дадената температура.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

1.5.1. **Повторяемост**

Повторяемостта е различна в зависимост от областта, в която се намира точката на възпламеняване и от използвания метод за измерването ѝ; максимум 2 °C.

1.5.2. **Чувствителност**

Чувствителността зависи от използвания метод на изпитване.

1.5.3. **Специфичност**

Специфичността на някои от методите е ограничена до няколко обхвата от точки на възпламеняване и е свързана с данните за самото вещество (например висок вискозитет).

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Подготовка**

Проба от изпитваното вещество се поставя в изпитвателния апарат съгласно 1.6.3.1. и/или 1.6.3.2.

С оглед на безопасността, се препоръчва при този метод да се употребяват само проби с малък размер до 2 cm^3 от горива или токсични вещества.

1.6.2. **Условия на изпитването**

Доколкото е съобразно с оглед безопасността, апаратът трябва да се постави на място, където не става течение.

1.6.3. **Извършване на изпитването**

1.6.3.1. *Равновесен метод*

Виж ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Неравновесен метод*

Апарат на Абел:

Виж BS 2000 част 170, NF M07-011, NF T66-009.

Апарат на Абел-Пенски:

Виж EN 57, DIN 51755 част 1 (за температури от 5 до 65 °C), DIN 51755 част 2 (за температури под 5 °C), NF M07-036.

Апарат на Таг:

Виж ASTM D 56.

Апарат на Пенски-Мартенс:

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

Забележки:

Когато точката на възпламеняване, определена по неравновесния метод от 1.6.3.2. се окаже 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C или 55 ± 2 °C, тя трябва да се потвърди със същия апарат по равновесния метод.

В протокола се посочват само методите, чрез които се определя температурата, при която е измерена точката на възпламеняване.

За да се определи точката на възпламеняване на вискозни течности (бои, лепила и други подобни), съдържащи разтворители, се използват само апарати и методи за изпитване, подходящи за определяне точката на възпламеняване на вискозни течности.

Виж ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 част 1.

2. **ДАННИ**

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът с резултатите трябва по възможност да включва следната информация:

— точно определяне на веществата (вид и примеси),

— съобщава се използваният метод, както и всички възможни отклонения от него,

— резултатите и всички допълнителни бележки относно тяхното интерпретиране.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Няма.

А.10. ЗАПАЛИМОСТ (ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Преди да се проведе това измерване, е полезно да се разполага с предварителна информация относно потенциалните експлозивни свойства на веществото.

Методът трябва да се прилага само върху прахообразни, зърнести или пастообразни вещества.

За да не бъдат включвани всички вещества, които могат да се запалват, а само онези, които горят бързо или чието поведение при горене по някакъв начин е особено опасно, за лесно запалими, се считат само веществата със скорост на изгаряне, по-висока от някаква гранична стойност.

Особено опасно е, ако накаляването до бяло се разпространи през разпрашен метал, защото гасенето на пожара е свързано с много трудности. Разпрашените метали се считат за лесно запалими, ако поддържат разпространението на накаляването през масата си в рамките на определено време.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Време на изгаряне, изразено в секунди.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма определени.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Веществото се формова в непрекъсната лента или ако е прахообразно, се насипва под формата на лента, дълга около 250 mm. Провежда се предварителен скрининг, за да се определи дали при запалване с газова горелка, горенето се разпространява с пламък или започва тлеене. Ако в рамките на определено време, горенето се разпространи до над 200 mm от дължината на лентата, тогава се провежда пълната програма за измерване скоростта на изгаряне.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Не са определени.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Предварителен скрининг-метод**

Веществото се формова в непрекъсната лента или се насипва под формата на купчинка с дължина 250 mm, ширина 20 mm и височина 10 mm върху плоча от негорящ непорьозен материал с ниска топлопроводимост.

Горещият пламък на газовата горелка (с минимален диаметър 5 mm) се допира до единия край на лентата докато пудрата се запали или най-много за 2 минути (5 минути за разпрашени метали или метални сплави). Трябва да се проследи дали горенето се разпространява до 200 mm от дължината на лентата в рамките на 4 минути (или 40 минути за разпрашени метали). Ако веществото не се запали или не разпространява горенето (чрез изгаряне с пламък или чрез тлеене) до 200 mm от лентата за по-малко от 4 минути (или 40 минути), то веществото не се счита за високо запалимо и не е необходимо да се провеждат повече измервания. Ако веществото разпространява горенето на 200 mm дължина за по-малко от 4 минути (или 40 минути за разпрашени метали), трябва да се приложи описаната по-долу процедура (точка 1.6.2. и нататък).

1.6.2. **Измерване скоростта на горене**

1.6.2.1. *Подготовка*

Прахообразните или зърнестите вещества се насипват свободно в матрица с дължина 250 mm и триъгълно напречно сечение с височина на вътрешната част 10 mm и ширина 20 mm. От двете страни на матрицата надлъжно се монтират две метални пластини като странични ограничители. Те изпъкват с 2 mm над горния край на триъгълното сечение (виж фигурата). След това, матрицата се пуска три пъти от височина 2 cm върху твърда повърхност и при необходимост се допълва догоре. После страничните ограничители се махат и излишното вещество се изважда. Върху матрицата се поставя плоча от негорящ непорьозен материал с ниска топлопроводимост, приспособлението се обръща и матрицата се отстранява.

Пастообразните вещества се разстилат върху плочата от негорящ гладък материал с ниска топлопроводимост под формата на въже с дължина 250 mm и напречно сечение около 1 cm^2.

1.6.2.2. *Условия на изпитването*

Ако изпитваното вещество е чувствително на влага, изпитването трябва да се извърши, колкото е възможно по-бързо след неговото изваждане от контейнера.

1.6.2.3. *Провеждане на изпитването*

Купчинка от веществото се поставя напречно на въздушния поток във вентилационен шкаф.

Скоростта на въздуха трябва да е достатъчно голяма, за да се избегне излитането на парите в лабораторията и не бива да се променя по време на изпитването. Около апарата се издига защитен екран.

Горещият пламък от газова горелка (с минимален диаметър 5 mm) се използва за запалването на купчината от единия край. Когато купчината изгори до дължина 80 mm, се измерва скоростта на изгаряне на следващите 100 mm. Изпитването се провежда шест пъти (освен ако по-рано не се наблюдава положителен резултат), като всеки път се използва чиста студена плоча.

2. **ДАННИ**

За изчисления се използват времето на изгаряне, получено от предварителния скрининг (1.6.1.) и най-краткото време на изгаряне от най-много шест изпитвания (1.6.2.3.)

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗМЕРВАНЕТО

Протоколът с резултатите от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

— точно определение на веществото (вид и примеси),

— описание на изпитваното вещество, неговото физично състояние, включително съдържанието на влага,

— резултати от предварителния скрининг и от измерването на скоростта на изгаряне, ако такова е правено,

— всички допълнителни бележки относно интерпретирането на резултатите.

3.2. ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Прахообразните, зърнестите или пастообразните вещества трябва да се считат за лесно запалими, ако времето на изгаряне, получено при кое да е изпитване, съгласно изпитвателната процедура, описана в 1.6.2., е по-малко от 45 секунди. Разпрашените метали или метални сплави се считат за лесно запалими, ако те могат да се възпламенят и пламъкът или зоната на реакцията се разпространяват по цялата дължина на образеца за 10 минути или по-малко.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

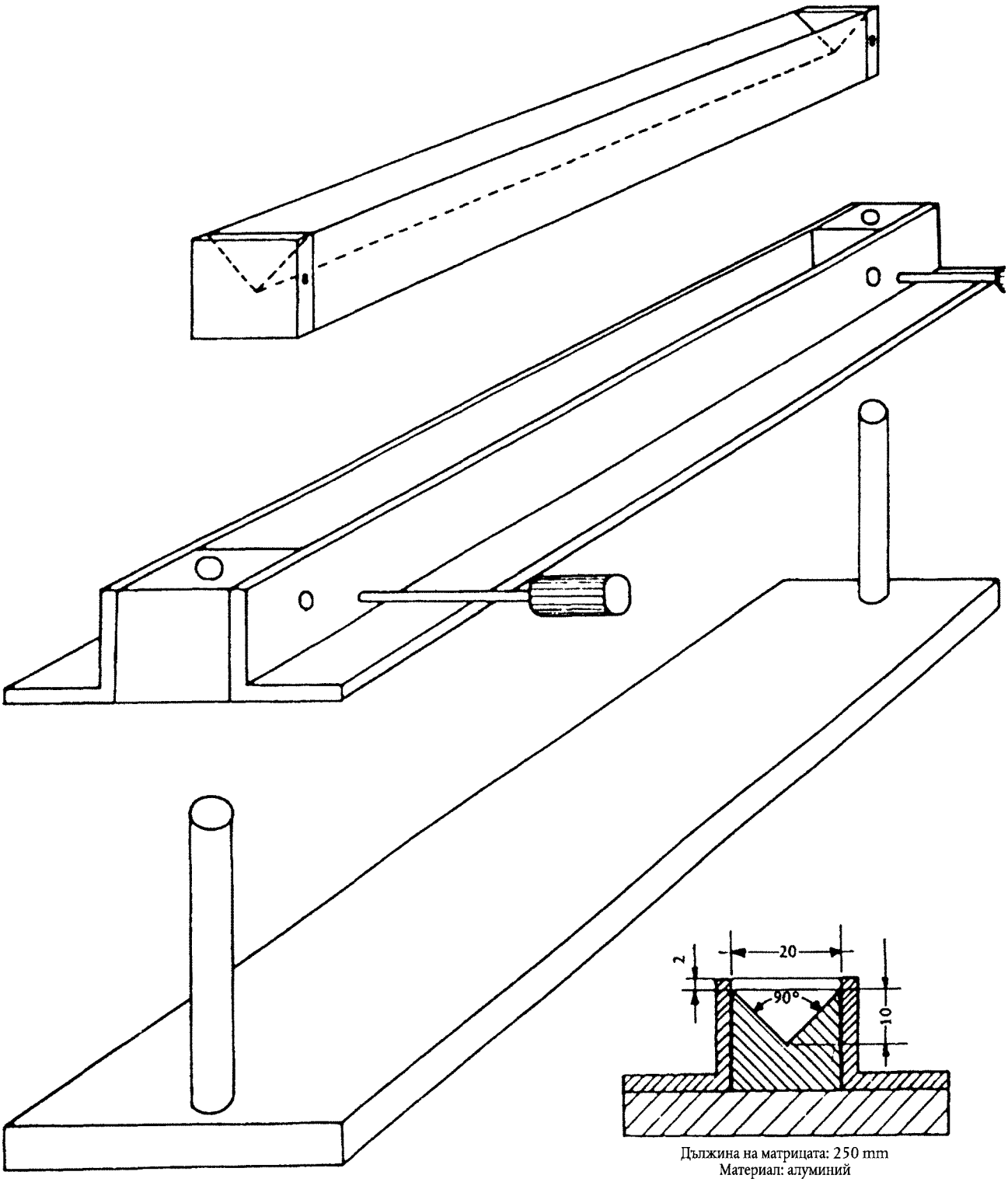
(1) NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

Допълнение

Фигура

Матрица и спомагателни приспособления за приготвяне на купчинката от веществото

(Всички размери са в милиметри)



А.11. ЗАПАЛИМОСТ (ГАЗОВЕ)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този метод позволява да се определи дали газовете, смесени с въздух при стайна температура (до 20 °C) и атмосферно налягане, са запалими и ако е така, в каква област от концентрации става запалването. Смеси с нарастващи концентрации на изпитвания газ във въздух се подлагат на действието на електрическа искра и се наблюдава дали следва запалване.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Областта на запалимост представлява областта от концентрации между горната и долната граница на експлозивност. Горната и долната експлозивни граници са онези граници на концентрацията на запалимия газ при смесването му с въздуха, при които не става разпространяване на пламък.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма определени.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Концентрацията на газа във въздух се увеличава постепенно, като на всяка стъпка сместа се подлага на действието на електрическа искра.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Не са определени.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Апаратура**

Измервателният съд представлява изправен стъклен цилиндър с минимален вътрешен диаметър 50 mm и минимална височина 300 mm. Запалителните електроди са разделени на разстояние от 3 до 5 mm и са разположени на височина 60 mm от дъното на цилиндъра. Цилиндърът е снабден с отвор за намаляване на налягането. Апаратът трябва да бъде защитен с екран, за да се ограничават щетите при експлозия.

Като средство за запалване се използва стояща индукционна искра с продължителност 0,5 секунди, която се генерира от трансформатор за високо напрежение с изходно напрежение от 10 до 15 kV (максимална входна мощност 300 W). Пример на един подходящ апарат е описан в позоваване(2).

1.6.2. **Условия на изпитване**

Изпитването трябва да се провежда при стайна температура (около 20 °C).

1.6.3. **Провеждане на изпитването**

Смес от газ и въздух с известна концентрация на газа се въвежда в стъкления цилиндър с помощта на дозираща помпа. През сместа се прекарва искра и се наблюдава дали пламъкът се отделя самостоятелно от източника на възпламеняване и дали се разпространява независимо. Концентрацията на газа се променя на стъпки от 1 % (обемен), докато протече запалването по описания по-горе начин.

Ако химичната структура на газа показва, че той може да не е запалим и ако стехиометричната му смес с въздуха може да се пресметне, тогава е нужно да се изпитват на стъпки от 1 % само смеси с концентрации на газа до 10 %, следователно стехиометричният състав е над 10 %.

2. **ДАННИ**

За определянето на това свойство, единствената полезна информация е наличието на разпространение на пламъка.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът с резултатите трябва по възможност да съдържа следната информация:

— точно определение на веществото (вид и примеси),

— описание и размери на използвания апарат,

— температурата, при която е проведено изпитването,

— измерени концентрации и получени резултати,

— резултат от изпитването: незапалим газ или лесно запалим газ,

— ако е направено заключението, че газът не е запалим, трябва да се съобщи обхватът от концентрации, в който е проведено изпитването на стъпки от 1 %,

— да се отчете цялата информация и всички бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

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

(2) W. Berthold, B. Conrad, T. Grewer, H. Grosse. Einer Standart-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen. Chem.-Ing. -Tech. 1984, vol. 56, 2, 126-127. Wortmann, T. Rekker und H. Schacke.'Entwicklung.

А.12. ЗАПАЛИМОСТ (ПРИ КОНТАКТ С ВОДА)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този метод за изпитване може да се използва, за да се определи дали реакцията на дадено вещество с вода или влажен въздух води до появата на опасно количество от един или няколко газа, които може да се окажат лесно запалими.

Методът може да се прилага, както за твърди, така и за течни вещества. Той не се прилага за вещества, които се запалват спонтанно при контакт с въздуха.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Лесно запалими: веществата, които при контакт с вода или влажен въздух отделят лесно запалими газове в опасни количества с минимална скорост 1 литър/kg за един час.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Веществото се изпитва съгласно описаната по-долу последователност от стъпки; ако при коя да е стъпка протече запалване, повече изпитвания не са необходими. Ако е известно, че веществото не реагира бурно с вода, се продължава до стъпка 4 (виж точка 1.3.4.)

1.3.1. **Стъпка 1**

Изпитваното вещество се поставя в плитък съд, съдържащ дестилирана вода при 20 °C и се наблюдава дали отделеният газ се запалва или не.

1.3.2. **Стъпка 2**

Изпитваното вещество се поставя на филтърна хартия, която плува на повърхността на съд, напълнен с дестилирана вода при 20 °C и се наблюдава дали отделеният газ се запалва. Филтърната хартия е необходима само да задържа веществото на едно място, така че да се увеличи вероятността от запалване.

1.3.3. **Стъпка 3**

Прави се купчинка от изпитваното вещество с височина приблизително 2 cm и диаметър 3 cm. Към купчинката се капват няколко капки вода и се наблюдава дали отделеният газ се запалва.

1.3.4. **Стъпка 4**

Изпитваното вещество се смесва с дестилирана вода при 20 °C и скоростта на отделяне на газ се измерва в продължение на седем часа на едночасови интервали. Ако скоростта на отделянето на газа е променлива или нараства в края на седем часовия период, времето на изпитване трябва да се удължи до максимум пет дена. Изпитването се прекратява в момента, в който скоростта на отделяне надвиши 1 l/kg за час.

1.4. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не са определени.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Не са дадени.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Стъпка 1**

1.6.1.1. *Условия на изпитване*

Изпитването се провежда при стайна температура (около 20 °C).

1.6.1.2. *Провеждане на изпитването*

Малко количество (приблизително 2 mm в диаметър) от изпитваното вещество се поставя в плитък съд с дестилирана вода. Следи се: i) дали се отделя газ и ii) дали газът се запалва. Ако се наблюдава запалване на газа, повече изпитвания на веществото не са нужни, защото то се определя за опасно.

1.6.2. **Стъпка 2**

1.6.2.1. *Приспособление за изпитване*

Филтърна хартия се поставя да легне на повърхността на дестилирана вода в какъв да е подходящ съд, например изпарителен съд с диаметър 100 mm.

1.6.2.2. *Условия на изпитване*

Изпитването се провежда при стайна температура (около 20 °C).

1.6.2.3. *Провеждане на изпитването*

Малко количество от изпитваното вещество (приблизително 2 mm в диаметър) се поставя в центъра на филтърната хартия. Следи се: i) дали се отделя газ и ii) дали газът се запалва. Ако се наблюдава запалване на газа, повече изпитвания на веществото не са нужни, защото то се определя за опасно.

1.6.3. **Стъпка 3**

1.6.3.1. *Условия на изпитване*

Изпитването се провежда при стайна температура (около 20 °C).

1.6.3.2. *Провеждане на изпитването*

Оформя се купчинка от изпитваното вещество с височина приблизително 2 cm и диаметър 3 cm, на върха на която се прави вдлъбнатина. Във вдлъбнатината се прибавят няколко капки вода и се следи: i) дали се отделя газ и ii) дали газът се запалва. Ако се наблюдава запалване на газа, повече изпитвания на веществото не са нужни, защото то се определя за опасно.

1.6.4. **Стъпка 4**

1.6.4.1. *Апаратура*

Апаратурата се приготвя, както е показано на фигурата.

1.6.4.2. *Условия на изпитване*

Проверява се дали контейнерът с веществото съдържа прахообразни частици с размери < 500 μm. Ако прахът е повече от 1 тегловен % от общото количество или веществото е ронливо, то цялото вещество трябва да се стрие на прах преди изпитването, така че при съхранение или работа с него, да няма възможност за намаляване размера на частиците. В противен случай, веществото се изпитва така, както е получено. Изпитването се провежда при стайна температура (около 20 °C) и атмосферно налягане.

1.6.4.3. *Провеждане на изпитването*

От 10 до 20 ml вода се поставят в делителната фуния на апарата. Десет грама от веществото се слагат в коничната колба. Обемът на отделения газ може да се измерва с някое подходящо приспособление. Запушалката на делителната фуния се маха, за да може водата да влиза в коничната колба и часовникът се пуска. Отделеният газ се измерва на всеки час в продължение на седем часа. Ако по време на този период отделянето на газ е неравномерно или, ако в края на периода скоростта на отделяне нараства, изпитването трябва да продължи до максимум пет дни. Ако в кой да е момент на изпитването скоростта на отделяне на газа надвиши 1 l/kg за час, изпитването се прекратява. Изпитването се провежда три пъти.

Ако химичната природа на газа не се знае, той трябва да се анализира. Когато газът съдържа лесно запалими компоненти и не е известно дали цялата смес не е лесно запалима, трябва да се приготви смес със същия състав и да се изпитва по метод А.11.

2. **ДАННИ**

Веществото се счита за опасно, ако:

— при коя да е от стъпките на изпитвателната процедура настъпи спонтанно запалване,

или

— има отделяне на запалим газ със скорост, по-голяма от 1 l/kg вещество за един час.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът с резултатите трябва по възможност да съдържа следната информация:

— точно определение на веществото (вид и примеси),

— детайлно описание на първоначалното приготвяне на изпитваното вещество,

— резултати от изпитванията (стъпки 1, 2, 3 и 4),

— химична природа на отделения газ,

— скорост на отделяне на газа, ако стъпка 4 (1.6.4.) е била изпълнена,

— всички допълнителни бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

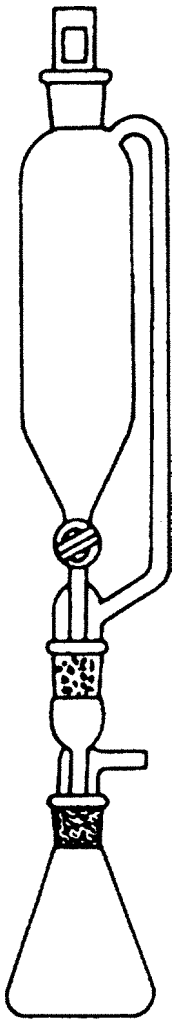
(1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

(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.

Допълнение

Фигура

Апаратура



А.13. ПИРОФОРНИ СВОЙСТВА НА ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА И ТЕЧНОСТИ

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Процедурата за изпитване се прилага за твърди и течни вещества, които се запалват спонтанно на стайна температура (около 20 °C), малко след като са влезли в контакт с въздуха.

Веществата, които трябва да бъдат изложени на въздух за часове или дни при стайна температура или при нарастващи температури преди да се запалят, не са обект на изпитване по този метод.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Счита се, че пирофорни свойства притежават вещества, които се запалват или овъгляват при условията, описани в точка 1.6.

Самозапалването на течности може да се изпитва също и по метод А.15. (Температура на самозапалване (течности и газове).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не са предвидени.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Веществото, твърдо или течно, се смесва с инертен носител и се привежда в контакт с въздуха при температура на околната среда за период от пет минути. Ако течните вещества не се запалят, те се абсорбират върху филтърна хартия и се излагат на въздух при температурата на околната среда (около 20 °C) за пет минути. Ако твърдото вещество или течността се запалят или ако течността се запали или овъгли филтърната хартия, тогава веществото се счита за пирофорно.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Повторяемост: с оглед безопасността, един положителен резултат се счита за достатъчен за причисляване на веществото към пирофорните вещества.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Апаратура**

Порцеланова чашка с диаметър към 10 cm се запълва с диатомит до височина приблизително 5 mm при стайна температура (около 20 °C).

Забележка:

Диатомитът или друго подобно лесно достъпно инертно вещество, се приема като представителна проба на почвата, върху която изпитваното вещество може да се разлее в случай на злополука.

За изпитването на течности, които не се запалват на въздуха, ако са в контакт с инертен носител, е необходимо да се използва суха филтърна хартия.

1.6.2. **Провеждане на изпитването**

а) Прахообразни твърди вещества

От 1 до 2 cm^3 от изпитваното вещество се изсипват от височина около 1 m върху негоряща повърхност и се наблюдава дали веществото се запалва по време на падането или в рамките на пет минути след това.

Процедурата се повтаря шест пъти, освен ако преди това не настъпи запалване.

б) Течности

Около 5 cm^3 от изпитваната течност се изливат в предварително приготвена порцеланова чашка и се наблюдава дали веществото ще се запали в рамките на пет минути.

Ако след шесткратно повторение на тази процедура не настъпи запалване, се провежда следното изпитване:

0,5 ml от изпитваната проба се изпръскват от спринцовка върху нагъната филтърна хартия и се следи дали филтърната хартия ще се запали или ще се овъгли в рамките на пет минути след прибавянето на течността. Опитът се повтаря три пъти, освен ако запалване или овъгляване на хартията не настъпи по-рано.

2. **ДАННИ**

2.1. ОБРАБОТВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Изпитването се прекратява веднага след получаване на положителен резултат при кой да е от опитите.

2.2. ОЦЕНКА НА ДАННИТЕ

Ако веществото, смесено с инертен носител, се запали до пет минути след като е изложено на въздуха или ако течността овъгли или изгори филтърната хартия до пет минути след като е накапана върху нея и изложена на въздуха, то съответното вещество се счита за пирофорно.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът с резултатите трябва по възможност да съдържа следната информация:

— точно определение на веществото (вид и примеси),

— резултати от изпитванията,

— всички допълнителни бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

(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

А.14. ЕКСПЛОЗИВНИ СВОЙСТВА

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Методът предоставя експериментална схема, предназначена да определи дали дадено твърдо или пастообразно вещество е експлозивно, когато е подложено на действието на пламък (термична чувствителност) или на удар, или триене (чувствителност към механични въздействия) и дали дадена течност може да експлодира под действието на пламък или при удар.

Методът се състои от три части:

а) изпитване на термичната чувствителност (1);

б) изпитване на механичната чувствителност при удар (1);

в) изпитване на механичната чувствителност при триене (1).

Методът осигурява данни за оценка на вероятността да се причини експлозия чрез някое обичайно въздействие. Той не е предназначен да установява дали веществото може да експлодира при всякакви условия.

Методът е подходящ за определяне дали едно вещество е експлозивно (термична и механична чувствителност) при точно определените условия, посочени в директивата. Той се базира на различни типове апарати, широко използвани в много страни (1), които обикновено дават значими резултати. Трябва да се признае, че методът не е окончателен. При него може да се използва и алтернативна апаратура, освен описаната, в случай, че тя е международно утвърдена и може да се направи адекватна връзка на резултатите с онези, получени с установената апаратура.

Когато достъпните термодинамични данни (например топлина на образуване, топлина на разлагане) и/или отсъствието на някои функционални групи (2) в структурната формула показват извън всякакво съмнение, че веществото не може бързо да се разлага с отделяне на газове или освобождаване на топлина (т.е. материалът не е експлозивен), не е необходимо да се провеждат изпитвания. За течностите не се изисква изпитване на механична чувствителност при триене.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Експлозивни вещества

За експлозивни се считат вещества, които могат да експлодират при действието на пламък или които са чувствителни към удар или триене в определената апаратура (или проявяват по-голяма механична чувствителност от 1,3-динитробензена в алтернативна апаратура).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

За методите с триене и удар като сравнително вещество се използва кристален 1,3-динитробензен с техническа чистота, пресят до размер на частиците 0,5 mm.

За втората серия от изпитвания за триене и удар се използва перхидро-1,3,5-тринитро-1,3,5-триазин (RDX, хексоген, циклонит – CAS 121-82-4), прекристализиран от воден циклохексанон, пресят във влажно състояние през 250 μm, съхраняван над сито от 150 μm и изсушен при 103 ± 2 °C (за 4 часа).

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

За да се определят условията за безопасното провеждане на трите изпитвания на чувствителността, е необходимо да се проведат предварителни изпитвания.

1.4.1. **Определяне на условията за безопасна работа (3)**

С оглед безопасността, преди провеждането на основните изпитвания, много малки проби (около 10 mg) от веществото се подлагат на нагряване на открито с газова горелка, на удар в някакъв подходящ по форма апарат и на триене с дървен чук върху наковалня или в каква да е по форма фрикционна машина. Целта е да се установи дали веществото е толкова чувствително и експлозивно, че предписаните изпитвания, по-специално тези за термичната чувствителност, трябва да се провеждат със специални предпазни мерки, така че да се избегне нараняването на оператора.

1.4.2. **Термична чувствителност**

Методът включва нагряване на веществото в стоманена тръба, закрита с пластинки с отвори с различен диаметър на дупките, при което се определя дали веществото може да експлодира в условията на интензивно нагряване в затворено пространство.

1.4.3. **Механична чувствителност (удар)**

Методът включва подлагане на веществото на удар с точно определена маса, която се пуска върху него от определена височина.

1.4.4. **Механична чувствителност (триене)**

Методът включва подлагане на твърдото или пастообразно вещество на триене между стандартни повърхности при определени условия на натиск и относителна скорост на движение.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Не са определени.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Термична чувствителност (ефект от пламък)**

1.6.1.1. *Апарат*

Апаратът се състои от стоманена тръба за еднократна употреба със затварящи приспособления за многократна употреба (фигура 1), инсталирана в нагревателно защитно устройство. Всяка тръба е направена от лист закалена стомана (виж допълнението) и има вътрешен диаметър 24 mm, дължина 75 mm и дебелина на стената 0,5 mm. На отворения край на тръбите са монтирани фланци, които позволяват затварянето на тръбите с перфорирани плочи. Приспособлението за затваряне се състои от плочка с централен отвор, устойчива на високо налягане, закрепена здраво за тръбата с помощта на винтово съединение от две части (гайка и резбована втулка). Гайката и резбованата втулка са направени от хромово-магнезиева стомана (виж допълнението), която не дава искри до 800 °C. Плочките с отворите са с дебелина 6 mm и са направени от термоустойчива стомана (виж допълнението). Те могат да имат различен диаметър на отворите.

1.6.1.2. *Условия на изпитването*

Обикновено, веществата се изпитват във вида в който са получени, макар че в някои случаи, например ако са пресовани, в отлята форма или сбити по някакъв друг начин, може да се наложи да се натрошат преди изпитването.

За твърдите вещества, количеството материал, което ще се използва при всяко изпитване, се определя като се използва двуетапна подготвителна процедура. Празна тръба се напълва с 9 cm^3 вещество, което се трамбова със сила 80 N, приложена към цялото напречно сечение на тръбата. За по-голяма безопасност или ако физичната форма на пробата може да се промени при натиск, могат да се използват други способи за пълнене на тръбата, например ако веществото е много чувствително на триене, то трамбоването не е подходящо. Ако материалът се свие, се прибавя още от него и отново се трамбова докато тръбата се изпълни до височина 55 mm от горния край. Определя се масата на веществото, необходима да запълни тръбата до това ниво (55 mm). Още на два пъти се прибавя по толкова вещество, което се трамбова също със сила 80 N. След това се прибавя още материал чрез трамбоване или, ако е необходимо се изважда докато тръбата се напълни на височина 15 mm от горния край. Провежда се второ пробно пълнене на тръбата, като се започне с една трета от количеството, използвано за запълването ѝ при първата проба Прибавя се още два пъти същото количество вещество при трамбоване с 80 N и нивото на веществото се нагласява на 15 mm от горния край, като се добавя или изважда от материала. При следващите експерименти се използва количеството вещество, определено при второто пробно пълнене на тръбата. Тръбата се пълни, като на три пъти се прибавят равни количества вещество и всеки път обемът на веществото се довежда до 9 cm^3 чрез натиск с необходимата сила. Процедурата може да се улесни, като се използват ограничителни пръстени.

Течностите и геловете се натоварват в тръбата до височина 60 mm, като се внимава, особено при геловете, да не се образуват кухини. Долният край на резбованата втулка се приплъзва върху тръбата, поставя се подходяща плочка с отвор и след като се смаже с малко масло на основата на молибденов дисулфид, гайката се затяга. Важно е да се провери да няма от изпитваното вещество между фланеца и пластинката, а също и в гънките на резбата.

Нагряването става с пропан от индустриална бутилка, снабдена с регулатор на налягането (60 до 70 mbar) през дозатор. Пропанът се разпределя равномерно (което се разбира визуално, като се наблюдават пламъците на горелките) чрез тръба с разклонения към четирите горелки. Горелките са разположени около изпитателната камера, както е показано на фигура 1. Четирите горелки общо изразходват около 3,2 литра пропан на минута. Могат да се използват и други горивни газове и горелки, но скоростта на нагряване трябва да бъде такава, каквато е описана на фигура 3. При всички апарати, скоростта на нагряване трябва да се проверява периодично като се използват тръби, напълнени с дибутилфталат, както е отбелязано на фигура 3.

1.6.1.3. *Провеждане на изпитванията*

Всяко изпитване се провежда, докато тръбата се пръсне на парчета. Ако това не стане, нагряването продължава не повече от пет минути. Изпитването, което довежда до фрагментиране на тръбата на три или повече парчета (в някои случаи парчетата са свързани помежду си с тънки ивици метал както е показано на фигура 2), се отчита като експлозия. Изпитване, при което се получават по-малко парчета или изобщо не настъпва фрагментация, се счита, че не е довело до експлозия.

Най-напред се прави серия от три изпитвания с плочки с диаметър на отворите 6,0 mm. Ако не се получи експлозия, се провежда втора серия от три изпитвания с диаметър на отвора 2,0 mm. Ако по време и на двете серии от изпитвания се получат експлозии, повече изпитвания не се правят.

1.6.1.4. *Оценка на резултатите*

Изпитването се счита за положително, ако и при двете описани по-горе серии от изпитвания се получат експлозии.

1.6.2. **Механична чувствителност (удар)**

1.6.2.1. *Апарат (фигура 4)*

Най-важните части на един типичен апарат с падащ чук са следните: блок от лята стомана с основа, наковалня, колона, водачи, подвижни тежести, устройство за освобождаване и държател на пробата. Стоманената наковалня с размери 100 mm (диаметър) x 70 mm (височина) е завинтена за горния край на стоманен блок с размери 230 mm (дължина) x 250 mm (ширина) x 200 mm (височина), който има излята основа с размери 450 mm (дължина) x 450 mm (ширина) x 60 mm (височина). Колона, направена от закалена стоманена тръба без спойки, е закрепена здраво с държател, завинтен към задната част на стоманения блок. Четири винта задържат апарата към монолитен бетонен блок с размери 60 × 60 × 60 cm, така че водещите релси да са съвършено вертикални и подвижните тежести да падат свободно (използват се тежести от 5 и 10 kg, направени от плътна стомана). Удрящата повърхност на тежестите е от закалена стомана, HRC от 60 до 63 и има минимален диаметър 25 mm.

Измерваната проба е затворена в ударно устройство, съставено от два коаксиални цилиндъра от плътна стомана, разположени един над друг в кух цилиндричен водещ жлеб (също от стомана). Стоманените цилиндри трябва да бъдат с диаметър 10 (0,003, 0,005) mm и височина 10 mm, да имат полирани повърхности, заоблени краища (радиус на кривината 0,5 mm) и твърдостта на HRC 58 до 65. Кухият цилиндър трябва да бъде с външен диаметър 16 mm, полиран отвор от 10 (+ 0,005, + 0,010) mm и височина 13 mm. Ударното устройство е монтирано върху междинна наковалня (26 mm диаметър и 26 mm височина), направена от стомана и центрована с помощта на пръстен с отвори, които позволяват излитането на парите.

1.6.2.2. *Условия на изпитването*

Обемът на пробата трябва да бъде 40 mm^3 или да е подходящо подбран при използването на алтернативни апарати. Твърдите вещества се измерват в сухо състояние и трябва да се подготвят по следния начин:

а) стритите вещества се пресяват през сито с размер на порите 0,5 mm; целият материал, преминал през ситото, се използва за изпитването;

б) пресованите, излети или сбити по друг начин вещества се натрошават на малки парченца и се пресяват; пресетите частици с размери между 0,5 и 1 mm в диаметър, се използват при изпитването и се смятат за представителна фракция на първоначалното вещество.

Веществата, които се доставят в пастообразна форма, се изпитват в сухо състояние. Ако това не е възможно, трябва да се отстрани колкото може по-голямо количество от разредителя. Течностите се изпитват като между долния и горния стоманен цилиндър се оставя пролука от 1 mm.

1.6.2.3. *Провеждане на изпитванията*

Провежда се серия от шест изпитвания, като тежест с тегло 10 kg се пуска от височина 0,40 m (40 J). Ако при тези шест опита се получи експлозия, се провежда нова серия, също от шест изпитвания, но като маса с тегло 5 kg се пуска от височина 0,15 m (7,5 J). В друг апарат, пробата се сравнява с избрано сравнително вещество, като се използва предварително установена процедура (например техниката up-and-down или друга).

1.6.2.4. *Оценка на резултатите*

Резултатите от изпитванията се считат за положителни, ако протече експлозия (избухване в пламъци или изгърмяване, което се приравнява за експлозия), поне веднъж при кой да е от опитите с утвърдения апарат, или ако пробата е по-чувствителна от 1,3-динитробензен или от циклонит при алтернативен начин на изпитване.

1.6.3. **Механична чувствителност (триене)**

1.6.3.1. *Апарат (фигура 5)*

Фрикционният апарат се състои от основна плоча, излята от стомана, върху която е монтирано фрикционното устройство. То се състои от фиксиран порцеланов пестик и подвижна порцеланова плочка. Порцелановата плочка е поставена в шейна, която се движи в два водача. Шейната е свързана с електромотор чрез свързващ лост, ексцентрик и подходяща зъбна предавка, така че порцелановата плочка да се придвижва само един път назад и напред под пестика на разстояние 10 mm. Порцелановият пестик може да се натовари например с 120 или 360 нютона.

Плоската порцеланова плочка се изработва от бял технически порцелан (грапавост 9 до 32 μm) и е с размери 25 mm (дължина) × 25 mm (ширина) × 5 mm (височина). Цилиндричният порцеланов пестик също се прави от бял технически порцелан и е дълъг 15 mm, диаметърът му е 10 mm, краищата му са грапави и имат сферична форма с радиус на кривината 10 mm.

1.6.3.2. *Условия на изпитването*

Обемът на пробата трябва да бъде 10 mm^3 или друг подходящ за алтернативния апарат.

Твърдите вещества се измерват в сухо състояние и се подготвят както следва:

а) стритите вещества се пресяват през сито с размер на порите 0,5 mm; целият материал, преминал през ситото, се използва за измерването;

б) пресованите, излети или сбити по друг начин вещества, се натрошават на малки парченца и се пресяват; пресетите частици с размери < 0,5 mm в диаметър се използват при изпитването.

Веществата, които обикновено се доставят като пасти, се изпитват, ако е възможно, в сухо състояние. Ако веществото не може да се приготви в сухо състояние (след отстраняване на максималното възможно количество от разредителя), то се изпитва под формата на филм с дебелина 0,5 mm, ширина 2 mm и дължина 10 mm, направен в матрица.

1.6.3.3. *Провеждане на изпитванията*

Порцелановият пестик се довежда върху изпитваната проба и се натоварва. По време на изпитването, грапавините на порцелановата плочка трябва да са разположени напряко на посоката на движението. Трябва да се внимава за следното: пестикът да се опира върху пробата, под него да има достатъчно количество изпитван материал и също така, плочката да се придвижва правилно под пестика. Порцелановата плочка трябва да изминава 10 mm напред и назад под пестика за време 0,44 секунди. Всяка от повърхностите на плочката и на пестика се използва само веднъж; двата края на всеки пестик служат за два опита, а всяка от двете повърхности на плочката служи за три опита.

Провежда се серия от шест измервания с товар от 360 N. Ако по време на тези шест опита се получи положителен резултат, се провежда серия от нови шест измервания при натоварване от 120 N. При други апарати, пробата се сравнява с избрано сравнително съединение, като се използва утвърдена процедура (например техниката up-and-down или друга).

1.6.3.4. *Оценка на резултатите*

Резултатът от изпитването се смята за положителен, ако се получи експлозия (пращене и/или гръм или избухване в пламъци, равносилни на експлозия) поне веднъж при всеки от опитите с утвърдената фрикционна апаратура, или ако задоволява еквивалентните критерии при алтернативно изпитване.

2. ДАННИ

По принцип се счита, че едно вещество е експлозивно по смисъла на директивата, ако е получен положителен резултат при изпитването на термичната чувствителност или на чувствителността при удар или при триене.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ИЗПИТВАНЕ

Протоколът от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

— вид, състав, чистота, съдържание на влага и т.н. на изпитваното вещество,

— физична форма на пробата и дали тя е била натрошавана, чупена и/или пресявана,

— наблюдения по време на изпитванията на термичната чувствителност (например маса на пробата, брой на фрагментите и др.),

— наблюдения при изпитването на механичната чувствителност (образуване на значително количество дим или пълно разлагане с взрив, пламъци, искри, гърмеж, пращене и т.н.),

— резултати от всеки вид изпитвания,

— ако е използван алтернативен апарат трябва да се представи научна обосновка, както и доказателство за корелацията между резултатите, получени с утвърдения апарат и тези, получени с еквивалентния апарат,

— всички полезни коментари, като например позоваване на изпитвания на подобни продукти, които може да се отнасят до правилното интерпретиране на резултатите,

— всички допълнителни бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

3.2. ИНТЕРПРЕТИРАНЕ И ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Протоколът от изпитванията трябва да споменава всички резултати, които са сметнати за погрешни, аномални или непредставителни. Ако някой от резултатите се отхвърля, трябва да се даде обяснение, както и резултатите от всички алтернативни или спомагателни изпитвания. В случай, че отхвърлянето на даден аномален резултат не може да се обясни, той трябва да се приеме за действителен и да се използва при класифицирането на веществото.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

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

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

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

Допълнение

Пример за спецификация на материалите за изпитването на термичната чувствителност (виж DIN 1623).

(1) Тръба: Спецификации на материалите № 1.0336.505 g

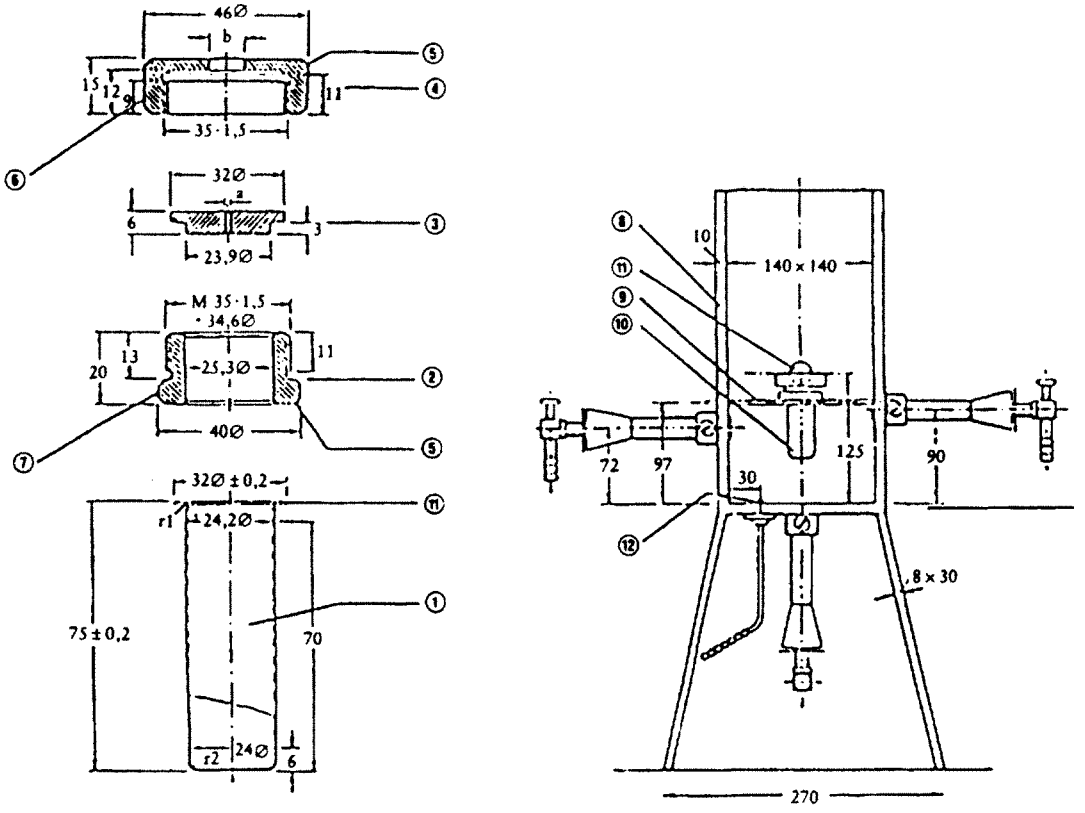
(2) Плочка с отверстия: Спецификация на материалите № 1.4873

(3) Резбована втулка и гайка: Спецификация на материалите № 1.3817

Фигура 1

Апарат за измерване на термичната чувствителност

(всички размери са в милиметри)



Фиг.1а Стоманена тръба и спомагателни приспособления

(1) тръба
(1а) външен фланец
(2) резбована втулка; резба с ниска степен на триене
(3) плочка с отвор a = 2,0 или 6,0 mm в диаметър
(4) гайка b = 10 mm в диаметър
(5) повърхност с жлебове
(6) две плоскости за гаечен ключ размер 41

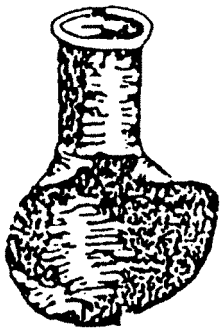
Фиг.1б Нагревателни и защитни приспособления

(7) две плоскости за гаечен ключ размер 36
(8) камера, предпазваща от летящи парчета
(9) два подпорни поста за тръбата
(10) сглобена тръба
(11) място на задната горелка; останалите горелки се виждат
(12) контролна дюза

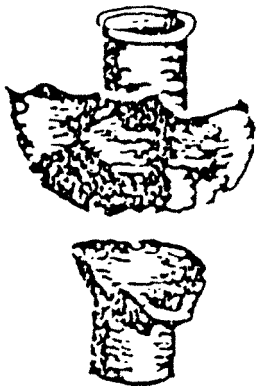
Фигура 2

Изпитване на термичната чувствителност

(примери за фрагментиране)



Експлозия



Експлозия



Няма експлозия



Няма експлозия



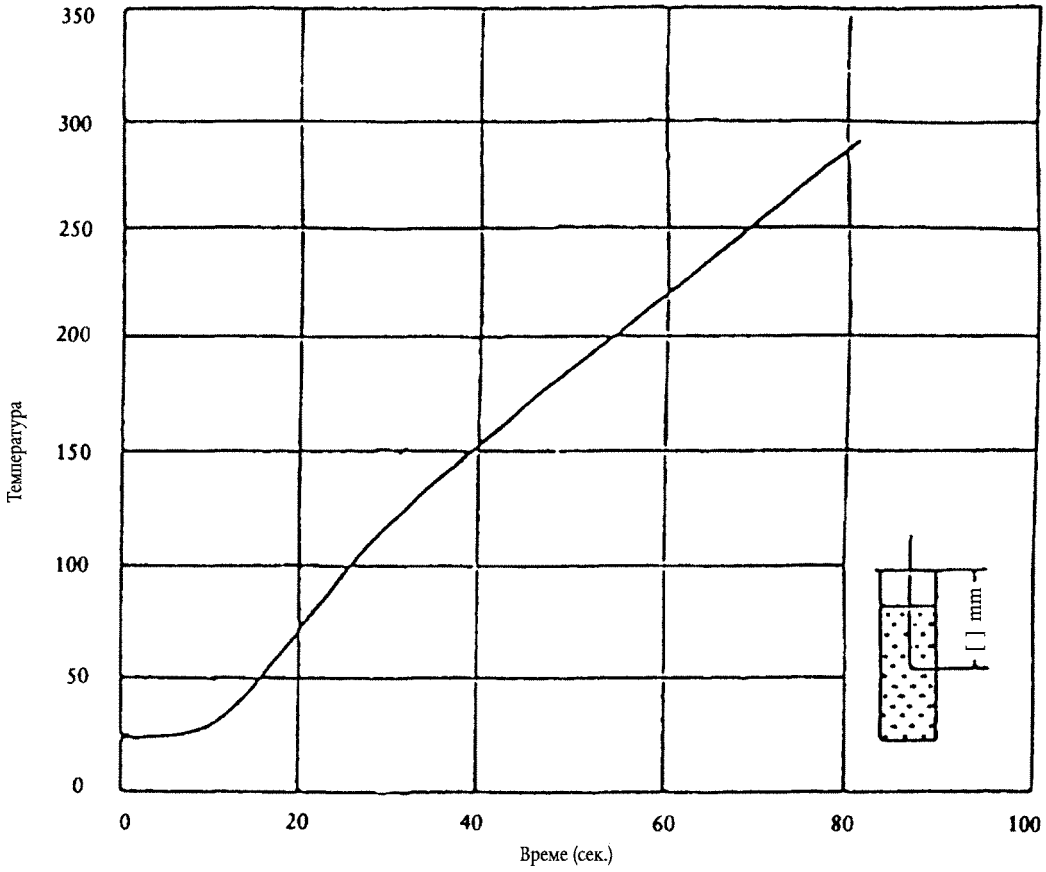
Няма експлозия



Няма експлозия

Фигура 3

Калибриране на скоростта на нагряване за изпитването на термичната чувствителност

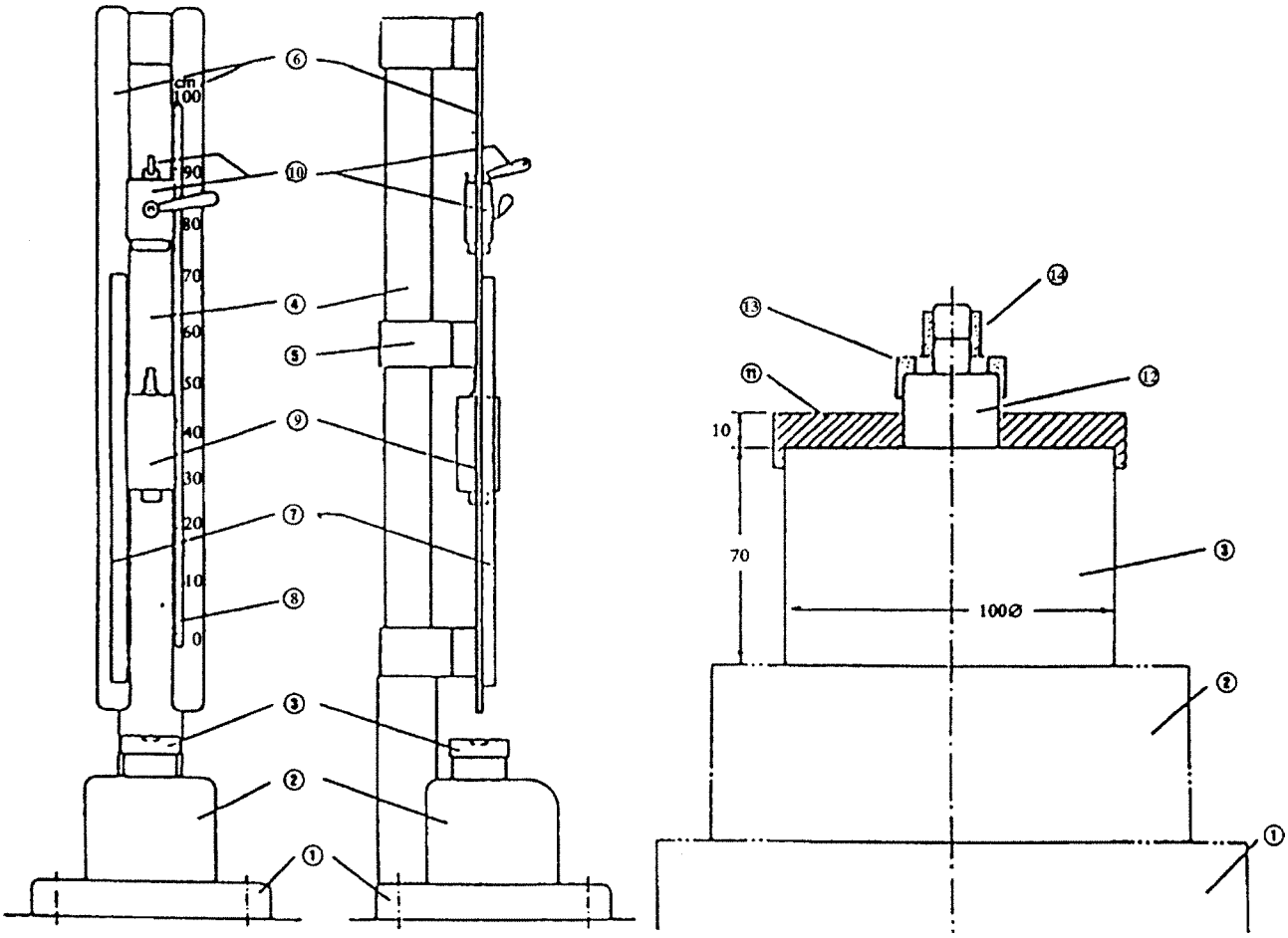


Крива температура/време, получена при нагряването на дибутилфталат (27 cm^3) в затворена тръба (плоча с отвор 1,5 mm) посредством пропанов пламък със скорост 3,2 литра/минута. Температурата е измерена с хром-алумелова термодвойка, обшита с неръждаема стомана с диаметър 1 mm и разположена централно на разстояние 43 mm под пръстена на тръбата. Скоростта на нагряване между 135 °C и 285 °C трябва да бъде между 185 и 215 K в минута.

Фигура 4

Апарат за изпитване на удар

(всички размери са в милиметри)



Фиг. 4а Падащ чук, отпред и отстрани, общ изглед

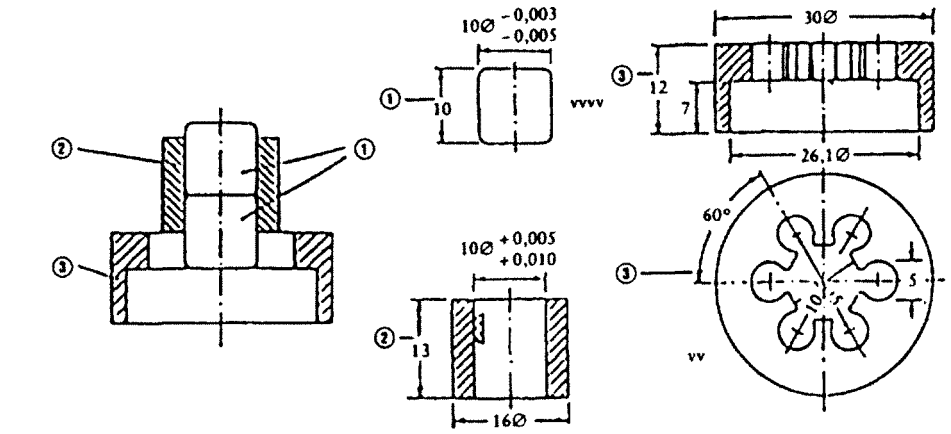
(1) основа 450 × 450 × 60
(2) стоманен блок 230 × 250 × 200
(3) наковалня 100 диаметър × 70
(4) колона
(5) междинен напречен елемент
(6) два водача
(7) зъбчата рамка

Фиг. 4б Падащ чук, долна част

(8) градуирана скала
(9) падащ чук (падаща маса)
(10) подпорно и освобождаващо устройство
(11) локализираща плоча
(12) междинна наковалня (заменяема), 26 диаметър × 26
(13) локализиращ пръстен с отвори
(14) ударно устройство

Фигура 4

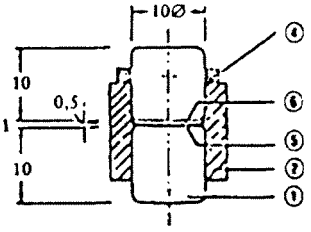
Продължение

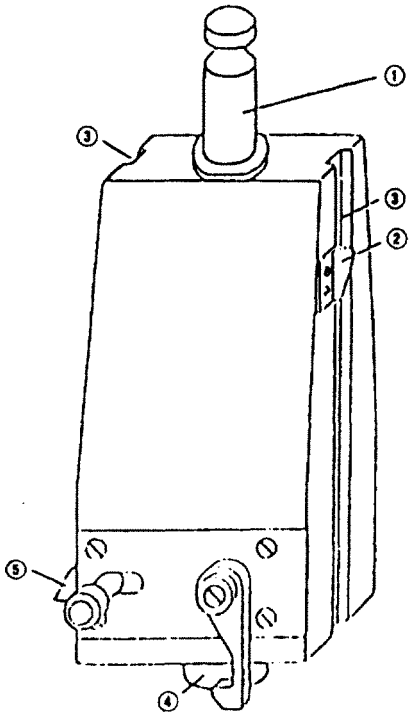


Фиг. 4в Устройство за удар върху вещества в прахообразна или пастообразна форма

(1) стоманен цилиндър
(2) водещ пръстен за стоманените цилиндри
(3) локализиращ пръстен с отвори
  а) вертикален срез
  б) хоризонтален срез
(4) гумен пръстен
(5) течност (40 mm^3)
(6) пространство без течност

Фиг. 4г Ударно устройство за течни вещества



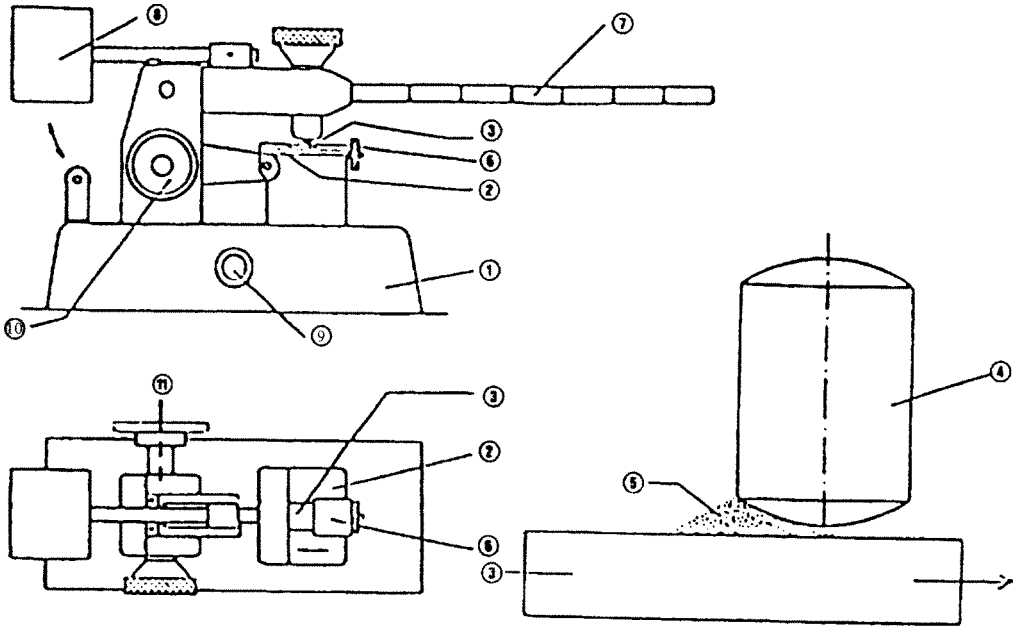


Фиг. 4д Чук (падаща маса от 5 kg)

(1) висящ кран
(2) приспособление за маркиране на височината
(3) позиционен жлеб
(4) цилиндрична ударна глава
(5) запиращо езиче

Фигура 5

Апарат за чувствителност при триене



Фиг. 5а Фрикционен апарат
Вертикален и хоризонтален изглед

(1) стоманена основа
(2) подвижна шейна
(3) порцеланова плочка 25 × 25 × 5 mm, закрепена на шейната
(4) фиксиран порцеланов пестик, 10 диаметър × 15 mm
(5) изпитвано вещество, приблизително 10 mm^3

Фиг. 5б Стартова позиция на пестика върху пробата

(6) държач за пестика
(7) товарно рамо
(8) противотежест
(9) копче за включване и изключване
(10) колело за нагласяване на шейната на стартова позиция
(11) посока към електродвигателя

А.15. ТЕМПЕРАТУРА НА САМОЗАПАЛВАНЕ (ТЕЧНОСТИ И ГАЗОВЕ)

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Това изпитване не се отнася за експлозивни вещества, както и веществата, които се самозапалват при контакт с въздуха на стайна температурата. Процедурата за изпитване е приложима за газове, течности и пари, които в присъствието на въздух могат да се запалят от нагорещена повърхност.

Температурата на самозапалване може да бъде понижена значително при използване на примеси с каталитични свойства, от материала на нагорещената повърхност или поради това, че обемът на измервателния съд е твърде голям.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Степента на самозапалване се изразява чрез температурата на самозапалване. Температурата на самозапалване е най-ниската температура, при която изпитваното вещество се запалва, смесвайки се с въздух при условията, определени в метода.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Веществата за сравнение са посочени в стандартите (виж 1.6.3.). Преди всичко, те трябва да служат за периодична проверка на ефикасността на метода, както и да позволяват сравнение с резултатите, получени по други методи.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Методът определя минималната температура на вътрешната повърхност на затворен съд, която води до запалването на газ, пара или течност, впръскани в съда.

1.5. **КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО**

Точността зависи от областта, в която се намира температурата на самозапалване, както и от използвания метод за изпитване.

Чувствителността и специфичността зависят от използвания метод за изпитване.

1.6. **ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**

1.6.1. Апаратура

Апаратурата е описана в метода по т. 1.6.3.

1.6.2. **Условия на измерването**

Проба от изпитваното вещество се измерва по метода от точка 1.6.3.

1.6.3. Провеждане на изпитването

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

2. ДАННИ

Записва се температурата на изпитването, атмосферното налягане, използваното количество от пробата и времето до момента на запалването.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът с резултатите от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

— точно идентифициране на веществото (вид и примеси),

— количество на пробата; атмосферното налягане,

— използван апарат,

— резултати от изпитванията (температури, при които са проведени изпитванията; резултати, свързани със запалването; съответни времена до запалването),

— всички допълнителни бележки, свързани с интерпретиране на резултатите.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Няма.

А.16. ОТНОСИТЕЛНА ТЕМПЕРАТУРА НА САМОЗАПАЛВАНЕ ПРИ ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Това изпитване не се отнася за експлозивни вещества, както и за вещества, които се самозапалват при контакт с въздух на стайна температурата.

Целта на това изпитване е да се осигури предварителна информация за самозапалването на твърдите вещества при повишаване на температурата.

Ако топлината, която се отделя при взаимодействие на веществото с кислород или при екзотермичното му разлагане, не се разсейва достатъчно бързо в околната среда, се получава самонагряване, което води до самозапалване. Следователно, самозапалване настъпва, когато скоростта на топлопроизводството е по-висока от скоростта на топлоотделянето.

Процедурата за изпитване се използва като предварителен скрининг-метод за твърди вещества. Като се има предвид сложната същност на процесите на запалване и изгаряне на твърди вещества, определената по този метод температура на самозапалване, трябва да се използва само за сравнителни цели.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Температурата на самозапалване, получена по този метод, е минималната температура на околната среда, в °C, при която определено количество вещество ще се запали при определени условия.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Определено количество от изпитваното вещество се поставя в пещ при стайна температура; записва се кривата за температура/време, регистрираща условията в средата на пробата, докато температурата на пещта се повиши до 400 °C (или до точката на топене на веществото, ако тя е по-ниска) при скорост на повишаване 0,5 °C/min. Във връзка с целта на това изпитване, температурата на пещта, при която температурата на пробата достигне 400 °C чрез самонагряване, се нарича температура на самозапалване.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Апаратура**

1.6.1.1. *Пещ*

Температурно-програмирана лабораторна пещ (вместимост около 2 литра), снабдена с устройство за въздушна циркулация и обезопасена срещу експлозии. За да се избегне потенциалната опасност от взрив, отделените при разлагането на веществото газове не бива да влизат в контакт с електронагревателните елементи.

1.6.1.2. *Куб от телена мрежа*

Парче от телена мрежа с размер на отворите 0,045 mm, направена от неръждаема стомана се изрязва по начина, показан на фигура 1. Мрежата се сгъва под формата на куб с открит горен край и се закрепва с тел.

1.6.1.3. *Термодвойки*

Подходящи термодвойки.

1.6.1.4. *Записващо устройство*

Двуканално записващо устройство от 0 до 600 °C или за съответното напрежение.

1.6.2. **Условия на изпитване**

Веществата се изпитват във вида, в който са получени.

1.6.3. **Провеждане на изпитването**

Кубът се напълва с изпитваното вещество, стръсква се внимателно и се прибавя още вещество, докато се напълни догоре. След това, кубът се окачва в центъра на пещта при стайна температура. Едната от термодвойките се поставя в центъра на куба, а другата – между куба и стената на пещта, за да се отчита температурата на пещта.

Температурите на пещта и на пробата се записват непрекъснато, докато температурата на пещта се повишава до 400 °C или до точката на топене (ако е по-ниска) при скорост на повишаване 0,5 °C/min.

Когато веществото се запали, термодвойката, поставена в него ще покаже много рязко повишаване на температурата над тази на пещта.

2. **ДАННИ**

За оценяване се използва температурата на пещта, при която температурата на пробата достигне 400 °C чрез самонагряване (виж фигура 2).

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът с резултатите от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

— описание на изпитваното вещество,

— резултати от изпитванията, включително кривата за температура/време,

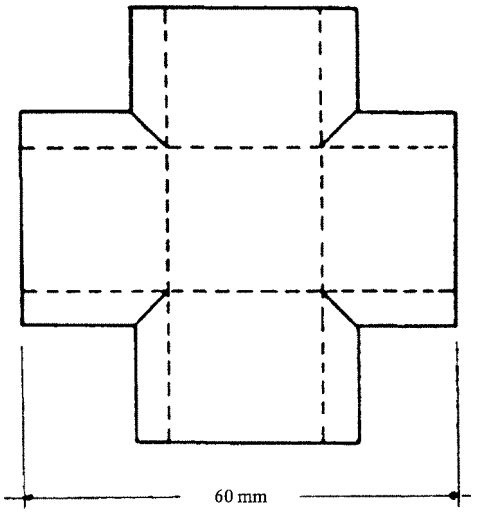
— всички допълнителни бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

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

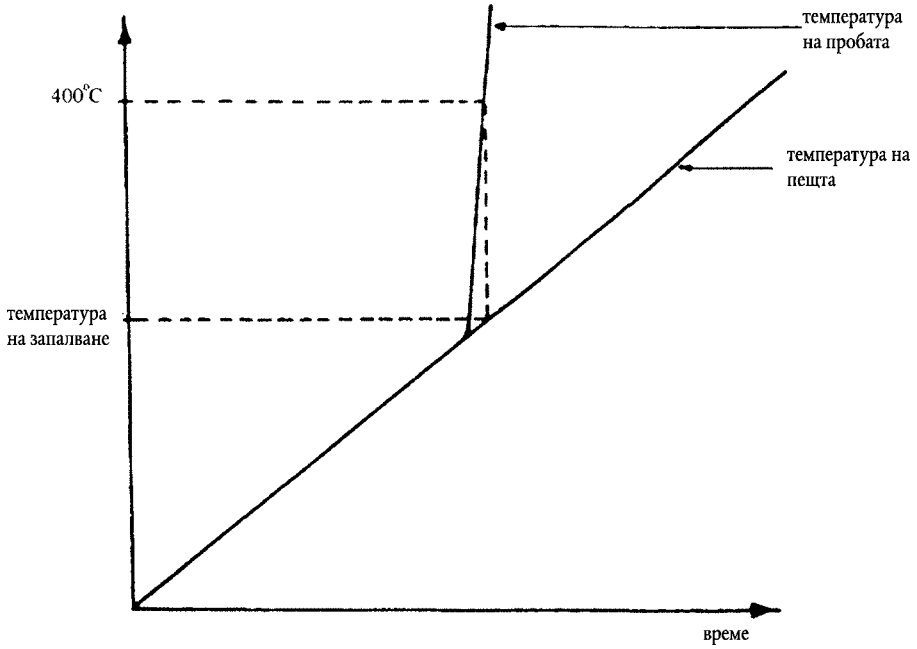
Фигура 1

Начин на изработване на измервателния куб с дължина на страната 20 mm.



Фигура 2

Типична крива температура/време



А.17. ОКСИДИРАЩИ СВОЙСТВА (ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА)

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Преди да се проведе това изпитване, ще е от полза да се разполага с предварителна информация за евентуалните експлозивни свойства на веществото.

Методът е неприложим за течности, газове, експлозивни или лесно запалими вещества, както и за органични пероксиди.

Провеждането на това изпитване не е необходимо, когато проучването на структурната формула показва без съмнение, че веществото не реагира екзотермично с горивни материали.

За да се разбере дали изпитването трябва да се провежда при специални мерки за сигурност, е необходимо да се направи предварително изпитване.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Време на изгаряне: реакционното време в секунди, необходимо на зоната, в която протича реакцията да премине по цялата дължина на образеца, в съответствие с процедурата, описана в 1.6.

Скорост на изгаряне: изразява се в милиметри за секунда.

Максимална скорост на изгаряне: най-високата стойност на скоростта на изгаряне, получена при смеси, съдържащи от 10 до 90 тегловни % окислител.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

За изпитването, както и за предварителното изпитване, като вещество за сравнение се използва бариев нитрат с аналитична чистота.

Приготвената съгласно точка 1.6 смес от бариев нитрат и прахообразна целулоза, се използва като смес за сравнение. Тя има максимална скорост на изгаряне (обикновено това е смес, съдържаща 60 тегловни % бариев нитрат).

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

С оглед безопасността, се провежда предварително изпитване. Ако предварителното изпитване покаже ясно, че изпитваното вещество притежава оксидиращи свойства, не е необходимо да се провеждат повече изпитвания. В противен случай, веществото се подлага на пълната процедура за изпитване.

При пълното изпитване, изпитваното вещество и определено горивно вещество се смесват в различни съотношения. След това, от всяка смес се оформя купчинка, която се запалва от единия край. Определената максимална скорост на изгаряне се сравнява с тази на сравнителната смес.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Всеки метод на стриване и смесване се приема за валиден в случай, че максималната скорост на изгаряне при шест отделни опита се различава от средноаритметичната с не повече от 10 %.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Подготовка**

1.6.1.1. *Изпитвано вещество*

Размерът на частиците на изпитваното вещество се намалява до < 0,125 mm по следния начин: веществото се пресява, остатъчната фракция се стрива и тази процедура се повтаря, докато цялата проба премине през ситото.

Може да се използват всякакви методи на стриване и пресяване, стига те да са в съответствие с критериите за качество.

Преди да се приготви сместа, веществото се суши при 105 °C до достигане на постоянно тегло. Ако температурата на разлагане на изпитваното вещество е по-ниска от 105 °C, то се суши при подходяща по-ниска температура.

1.6.1.2. *Горивно вещество*

Като горивно вещество се използва прахообразна целулоза. Целулозата трябва да бъде от вид, използван за тънкослойна или за колонна хроматография. Целулоза с дължини на нишките, по-големи от 85 % между 0,020 и 0,075 mm е подходяща за целта. Разпрашената целулоза се прокарва през сито с размер на порите 0,125 mm. По време на цялото изпитване се използва една и съща партида целулоза.

Преди приготвянето на сместа, прахообразната целулоза се суши при 105 °C до постоянно тегло.

Ако при предварителното изпитване се използва дървесно брашно, то трябва да се приготви от влажна дървесина, като се събере порцията, която преминава през сито с размер на порите 1,6 mm, разбъркva се добре и се суши 4 часа при 105 °C на пласт, не по-дебел от 25 mm. След това се охлажда и се съхранява до употребата в обезвъздушен контейнер, запълнен колкото е възможно повече. За предпочитане е да се използва в рамките на 24 часа след сушенето.

1.6.1.3. *Източник на възпламеняване*

Като източник на възпламеняване се използва горещ пламък от газова горелка (минимален диаметър 5 mm). Ако се използва друг източник (например при изпитване в инертна атмосфера), той трябва да се опише и използването му да се обоснове.

1.6.2. **Провеждане на изпитването**

Забележка:

Смесите от окислители и целулоза или дървесно брашно, трябва да се третират като потенциално експлозивни и с тях да се работи със съответното внимание.

1.6.2.1. *Предварително изпитване*

Сухото вещество се смесва добре с изсушената целулоза или дървесно брашно в тегловно съотношение 2 към 1 и сместа се оформя като малка конусовидна купчинка с размери 3,5 cm (диаметър на основата) × 2,5 cm (височина). Оформянето на купчинката става чрез пълнене и трамбоване в конусообразна матрица (например лабораторна стъклена фуния със запушен ствол).

Купчинката се поставя върху хладка незапалима гладка плоча с ниска топлопроводимост. Изпитването се провежда във вентилационен шкаф, както е описано в 1.6.2.2.

Източникът на възпламеняване се допира до конуса. Интензивността и продължителността на получената реакция се наблюдават и записват.

Ако реакцията е бурна, веществото се счита за оксидиращо.

В случай, че резултатът буди съмнение, то е необходимо да се проведе цялата поредица от процедури, описана по-долу.

1.6.2.2. *Последователност на изпитвателните процедури*

Смеси от оксидиращото вещество и целулозата със съдържание на оксидиращ от 10 до 90 тегл. % се приготвят, като концентрацията на веществото нараства с по 10 % при всяка следваща смес. В случай, че резултатите са на границата на две концентрации, за да се получи по-точна стойност на максималната скорост на изгаряне, трябва да се приготвят и смеси с междинно съдържание.

Купчинката се оформя с помощта на матрица. Матрицата е направена от метал, има дължина 250 mm, триъгълно напречно сечение с височина 10 mm и вътрешна ширина 20 mm. От двете страни на матрицата в надлъжна посока се монтират две метални пластинки като странични ограничители, които изпъкват с по 2 mm над горния край на триъгълното сечение (виж фигурата). В това приспособление се насипва свободно малък излишък от сместа. След като матрицата се пусне веднъж от височина 2 cm върху твърда повърхност, излишното вещество се изстъргва с помощта на наклонен лист, страничните ограничители се снемат и останалият прах се заглажда с валяк. След това, върху матрицата се поставя плоча от незапалим непорьозен материал с ниска топлопроводимост, приспособлението се обръща и матрицата се отстранява.

Купчинката се поставя срещу въздушен поток във вентилационен шкаф.

Скоростта на въздушния поток трябва да е достатъчно висока, за да се избегне проникването на дим в лабораторията. Тя не бива да се променя по време на изпитването. Около апарата се издига защитен екран.

Тъй като целулозата, както и някои изпитвани вещества са хигроскопични, изпитването трябва да се проведе колкото е възможно по-бързо.

Единият край на купчинката се запалва чрез допиране на пламък.

След като зоната на реакцията се разпространи на първоначално разстояние от 30 mm, се измерва времето на реакцията за следващите 200 mm.

Провежда се изпитване със сравнително вещество и поне по едно изпитване със смесите на веществото с целулоза с концентрации в определената област.

Ако максималната скорост на изгаряне се окаже значително по-висока от тази на сместа за сравнение, изпитването се прекратява; в противен случай, то се провежда по пет пъти за всяка от трите смеси с най-високи скорости на изгаряне.

Ако има съмнение, че полученият положителен резултат не е реален, изпитването трябва да се повтори, като вместо целулоза се използва инертно вещество с подобен размер на частиците, например кизелгур. Също така, изпитването на сместа (изпитвано вещество целулоза) с най-висока скорост на изгаряне трябва да се повтори в инертна атмосфера (< 2 % v/v съдържание на кислород).

2. **ДАННИ**

От съображения за безопасност, като характеристика за оксидиращите свойства на изпитваното вещество, се приема максималната скорост на изгаряне, а не средната стойност на скоростта на изгаряне.

За оценяване се използва най-високата стойност на скоростта на изгаряне, получена след шест опита с определена смес.

Начертава се графика на най-високите стойности на скоростта на изгаряне за всяка смес към концентрациите на окислителя. От графиката се снема максималната скорост на изгаряне.

Шестте измерени стойности на скоростта на изгаряне, получени при един опит със сместа с най-висока скорост на изгаряне, не трябва да се различават от средноаритметичната стойност с повече от 10 %; в противен случай, методите на стриване и смесване трябва да се подобрят.

Сравнява се получената максимална скорост на изгаряне с тази на сравнителното вещество (виж 1.3.).

Ако изпитванията се провеждат в инертна атмосфера, максималната скорост на реакцията се сравнява с тази на сместа за сравнение също в инертна атмосфера.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

— вид, състав, чистота, влагосъдържание и т.н. на изпитваното вещество,

— всяка обработка на изпитваното вещество (например стриване, сушене, …),

— източник на възпламеняване, използван при изпитването,

— резултати от изпитванията,

— начин на протичане на реакцията (например пламък, горящ на повърхността, изгаряне в цялата маса на веществото, информация, свързана с продуктите на изгарянето, …),

— всички допълнителни бележки относно интерпретацията на резултатите, включително описание на интензивността на реакцията (пламъци, искри, дим, бавно тлеене и т.н.) и приблизителната продължителност, получена при предварителния скрининг, както за изпитваното, така и за сравнителното вещество,

— резултати от изпитвания с инертно вещество, ако има такива,

— резултати от изпитвания в инертна атмосфера, ако има такива.

3.2. АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Едно вещество се счита за оксидиращо, когато:

а) при предварителното изпитване е протекла бурна реакция;

б) при провеждането на пълното изпитване, максималната скорост на изгаряне на изпитваните смеси е по-голяма или равна на максималната скорост на изгаряне на сместа целулоза/бариев нитрат, използвана за сравнение.

За да се избегне получаването на неверни положителни резултати, получените при изпитване на смесеното с инертен материал вещество и/или при изпитване в инертна атмосфера данни, също трябва да се вземат предвид при интерпретиране на резултатите.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

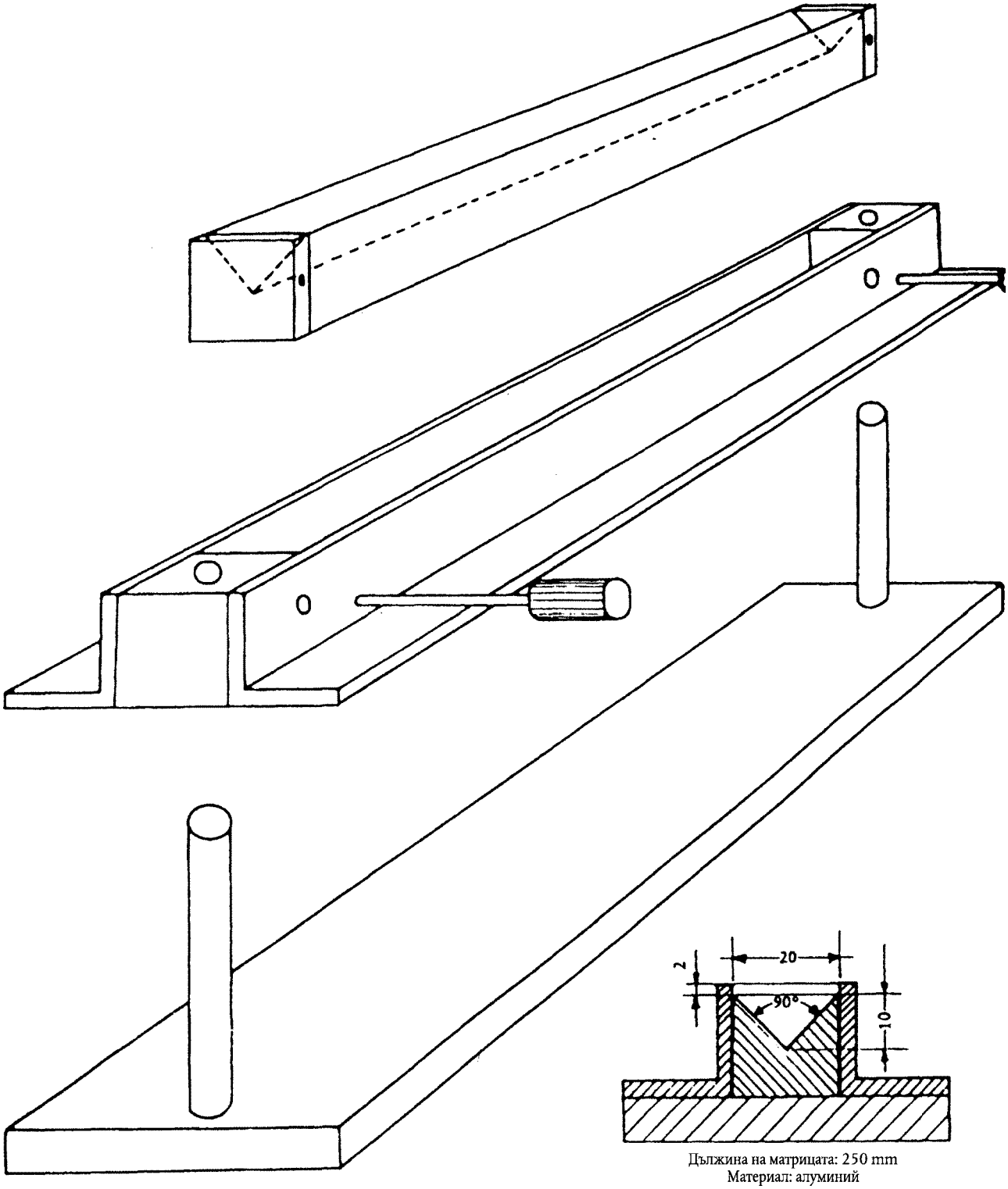
(1) NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Допълнение

Фигура

Матрица и спомагателни приспособления за приготвянето на купчинката

(Всички размери са в милиметри)



Дължина на матрицата: 250 mm
Материал: алуминий

ЧАСТ Б: МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТОКСИЧНОСТ

ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ: ЧАСТ Б

А. **ВЪВЕДЕНИЕ**

Виж общо въведение

Б. **ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

i) **Остра токсичност** включва неблагоприятните ефекти, които възникват за определено време (обикновено 14 дни) след прилагане на еднократна доза от дадено вещество.

ii) **LD_{50}** (средна летална доза) е статистически определената еднократна доза от едно вещество, за която се очаква да причини смърт при 50 % от опитните животни. Стойността на LD_{50} се изразява като маса на изпитваното вещество на единица маса на опитното животно (милиграми на килограм).

iii) **LC_{50}** (средна летална концентрация) е статистически определената концентрация на едно вещество, за която се очаква да причини смърт по време на експозицията или за дадено време след нея при 50 % от животните, изложени на действието ѝ в продължение на точно определен интервал от време. Величината LC_{50} се изразява като маса изпитвано вещество на стандартен обем въздух (милиграми на литър).

iv) **Ниво, без неблагоприятен ефект** е максималната доза или ниво на експозиция използвани при изпитване, които не предизвикват забележими признаци на токсичност.

v) **Подостра/Субхронична токсичност** включва неблагоприятните ефекти, които се появяват при експерименталните животни в резултат на многократно ежедневно дозиране със или експониране на химично вещество за кратък период от очакваната продължителност на живота им.

vi) **Максимално поносима доза (MTD) е** най-високата доза, при която се проявяват признаци на токсичност при животните, дължащи се на изследваното вещество, без да има значителни ефекти върху преживяемостта на животните.

vii) **Кожно дразнене** е появата на обратими възпалителни промени на кожата, вследствие прилагането на изпитваното вещество.

viii) **Очно дразнене** е появата на обратими промени в окото, следствие прилагането на изпитваното вещество върху предната повърхност на окото.

ix) **Кожна чувствителност** (алергичен контактен дерматит) е имунологично предизвикана кожна реакция към веществото.

Специфични определения за инхалаторна токсичност

— **аерозол** се дефинира като частици (твърди и/или течни) хомогенно разпръснати във въздуха,

— **аеродинамичният диаметър** е диаметърът на сфера за единица плътност (1 g cm^{-3}), имаща същата крайна стойност на утаяване като въпросната частица,

— **средният аеродинамичен диаметър на масата** е изчислен аеродинамичен диаметър, който разделя размера на разпределение на аерозола наполовина, когато се измерва чрез масата,

— **геометричното стандартно отклонение** е отношението от измерените 84 перцентила към 50 перцентила и показва наклона на кривата за кумулативно разпределение на размера на частиците, приемайки че разпределението е с нормален логаритъм.

Специфични определения за процедурата на фиксираната доза при определяне на острата орална токсичност

— **доказана токсичност** се отнася до токсични ефекти, наблюдавани вследствие на въвеждане на изпитваното вещество, които са с такава тежест, че въвеждането на следващата по-висока доза може да причини смърт,

— **дискриминираща доза** е най-високото ниво от четири фиксирани дози, което не предизвиква смърт, свързана с действието на веществото (включително и при хората).

В. **МУТАГЕНЕЗА (включително прескрининг тест за канцерогенност)**

За предварителна оценка на мутагенния потенциал на дадено вещество е необходимо да се получи информация за две категории параметри, генни мутации и хромозомни аберации.

Тези две параметра се оценяват със следните тестове:

i) Тестове за доказване на генни (точкови) мутации в прокариотни клетки като *Salmonella typhimirium*; тестове използващи *Escherichia coli* са също приемливи. Изборът между тези два тесторганизма се определя от естеството на химическото вещество, което се изпитва;

ii) Тестове за доказване на хромозомни аберации при клетки на бозайници отглеждани „ин витро"; „ин виво" процедура (микронуклеус тест или анализ на метафазите н клетки на костен мозък) е също приемлива. При липса на противопоказания обаче, методите „ин витро" решително са за предпочитане.

Г. **ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ**

При оценката и интерпретацията на изследванията, трябва да се съобразят ограниченията в степента, до която резултатите от опити върху животни и *ин витро* тестовете могат да бъдат екстраполирани директно за човека.

Доказани неблагоприятни ефекти при хора, където съществуват, трябва да се използват за определяне на потенциалните ефекти от химически вещества върху човешката популация.

Д. **БИБЛИОГРАФСКИ ПОЗОВАВАНИЯ**

Токсикологията е развиваща се експериментална наука и за всяка тема е налице изобилие от литература. Подходяща информация може да се намери в ръководствата на ОИСР.

Допълнителни забележки

Грижи за животните

При провеждане на изпитванията за токсичност, са необходими строг контрол на околните условия и подходящи грижи за животните.

i) Условия на отглеждане

Обкръжаващите експериметалните животни условия, в помещенията или клетките, трябва да са подходящи за изследвания вид. За плъхове, мишки и морски свинчета, подходящи са условията със стайна температура 22 °C + 3 °C и относителна влажност от 30 до 70 %; за зайци температура 20 + 3 °C и относителна влажност от 30 до 70 %.

Някои експериментални методи са особено чувствителни към температурните влияния и в тези случаи, детайлите по подходящите условия трябва да бъдат включени в описанието на метода за изпитване. При всички изпитвания на токсичното действие, трябва да се следят температурата и влажността, да се записват и отразяват в окончателния отчет от изпитването.

При изкуствено осветление, трябва да се осигуряват 12 часа светлина и 12 часа тъмнина. Детайлите по осветлението трябва да се отразяват и включат в окончателния отчет от изпитването.

В отчетите за експерименти върху животни е важно да се посочи видът на клетката, броя на животните във всяка клетка по време на експозицията на химичното вещество и във всеки следващ период на наблюдение.

ii) Условия на хранене

Режимът на хранене трябва да отговаря на всички хранителни изисквания за дадения вид експериментални животни. Когато изследваното вещество се въвежда с храненето, хранителната стойност може да бъде намалена вследствие на взаимодействие между веществото и хранителните съставки.

Възможността от такава реакция трябва да се вземе под внимание когато се интерпретират резултатите от изпитването.

Замърсители в храната, за които е известно, че могат да влияят върху токсичността, не трябва да присъстват в оказващи ефект концентрации.

Защита на животните

При провеждане на изпитване, трябва да се отчита благосъстоянието на животните. Някои примери са дадени накратко по-долу. Точната формулировка и/или условията трябва да се прочетат в текста на методите:

— За определяне на остра орална токсичност се въвежда алтернативен метод, „Процедура на фиксирана доза“. Тази процедура не използва смъртността като специфичен показател. Тя изисква по-малък брой животни и причинява по-малко болка и страдание, отколкото класическото определяне на острата орална токсичност,

— Броят на използваните животни е намален до научно приемливия минимум: само 5 животни от един и същ пол за доза се изпитват при методи Б.1 и Б.3; само 10 животни (и 5 за негативна контролна група) се използват за определяне на кожна чувствителност при морски свинчета с максимализиращия тест (Метод Б.6); броят на животните необходими за положителен контрол при изследване на мутагенезата „ин виво“ е също намален (методи Б.11 и Б.12),

— Болката и страданието на животните по време на експеримент се намаляват до минимум: животните с тежки и трайни признаци на страдание и болка трябва да бъдат умъртвени хуманно; при вещества с корозивни или дразнещи свойства, предизвикващи болка и страдание не трябва да се провежда изследване (методи Б.1, Б.2 и Б.3),

— Изследване с много високи дози се избягва при използване на лимитиращ тест не само при изследвания за остра токсичност (методи Б.1, Б.2 и Б.3), но и при „ин виво“ тестовете за мутагенеза (методи Б.11 и Б.12),

— Стратегията за изпитване на дразнене сега позволява да не се провежда тестване или да се редуцира до едно изпитване, ако има достатъчна научна обосновка.

Такава научна обосновка може да се основава на физикохимичните свойства на веществото, на резултатите от вече проведени други изпитвания или одобрени „ин витро“ тестове. Например, ако е проведено изпитване за остра дермална токсичност с ограничена доза от веществото (метод Б.3.) и не се наблюдава кожно дразнене, по-нататъшно изследване на кожното дразнене (метод Б.4) не е необходимо; съединенията, които показват категорично корозивно или силно изразено кожно дразнене (метод Б.4) не трябва да се изследват за очно дразнещо действие (метод Б.5).

Б.1 ОСТРА ТОКСИЧНОСТ (ОРАЛНА)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (А)

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Виж Общо въведение, част Б (Б)

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество се въвежда орално с градуирана сонда на няколко групи експериментални животни по една доза за група. Избраните дози са на базата на резултатите от тест за определяне на приблизителни дози. След това се наблюдават ефектът и смъртността. Умрелите животни по време на експеримента и преживелите при завършването му, се аутопсират. Методът е насочен за изследване предимно на различни видове гризачи.

Животните с тежки и трайни признаци на страдание и болка трябва да бъдат умъртвени хуманно. При вещества с корозивни или дразнещи свойства, за които е известно, че предизвикват изразена болка и страдание, не трябва да се провежда изследване.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Подготовка**

Животните се държат при експериментални условия на отглеждане и хранене, най-малко пет дни преди започване на опита. Преди започване на експеримента млади възрастни плъхове се разпределят произволно в опитни групи. Когато е необходимо, изпитваното вещество се разтваря или се приготвя суспенсия в подходящ разтворител. Препоръчва се, където е възможно, на първо място да се има предвид воден разтвор, след това разтвор в растителна мазнина и накрая в други разтвори или суспенсии. Токсичните свойства на разтворителя трябва да се познават или да се определят преди или по време на опита. При плъховете въвежданият обем нормално не трябва да надхвърля 10 ml/kg на телесна маса, освен при водните разтвори, където може да достигне 20 ml/kg на телесна маса. Различията в обема трябва да се намалят до минимум с изчисляване на концентрациите, за да се осигури постоянен обем при всички дози.

1.6.2. **Условия на опита**

1.6.2.1. *Експериментални животни*

Плъхът е предпочитан вид, освен ако няма противопоказания.

Използват се най-често прилаганите лабораторни животински видове. За всеки пол, преди началото на опита, се отчита обхватът на различията в телесната маса на животните, който трябва да е ± 20 % от подходящата средна стойност.

1.6.2.2. *Брой и пол*

За всяка доза, трябва да се използват най-малко пет животни от един пол (гризачи). Ако се използват женски животни, те трябва да не са чифтосвани и да не са бременни. Когато има информация, че даден пол е забележимо по-чувствителен, използват се животни от този пол.

Забележка: При определяне острата токсичност върху животни, по-висши от гризачите, трябва да се използва по-малък брой животни.

Дозите трябва да бъдат внимателно избрани и трябва да се положат усилия да не се надвишават умерено токсичните. При тези тестове трябва да се избягва въвеждане на летални дози от изследваното вещество.

1.6.2.3. *Избор на дози*

Броят на дозите трябва да бъде достатъчен, най-малко три, на подходящи интервали, за да се оформят опитни групи с област на токсични ефекти и смъртност. Данните трябва да са достатъчни за получаване на кривата доза/реакция и когато е възможно, да позволяват приемливо определяне на LD_{50}.

1.6.2.4. *Гранично изпитване*

При използването на гризачи за гранично изпитване, то може да се проведе по гореописаната процедура с една доза, поне 2000 mg/kg телесна маса, на група от пет мъжки и пет женски животни. Ако веществото предизвика летален ефект, се провежда пълно изследване.

1.6.2.5. *Период на наблюдение*

Периодът на наблюдение трябва да бъде най-малко 14 дни. Продължителността му обаче не трябва да бъде твърдо фиксирана. Той трябва да се определя от токсичните реакции, скоростта им на поява и продължителността на възстановителния период; може да бъде продължен когато се прецени, че е необходимо. Времето, за което се появяват и отзвучават признаците на токсичност и времето, когато настъпва смъртта са важни, особено, когато има тенденция смъртта да настъпи по-късно.

1.6.3. **Процедура**

Животните трябва да се държат гладни преди въвеждане на веществото. За плъховете, храната трябва да се отнеме за цяла нощ; за животни с по-висока скорост на метаболизма е подходящ по-кратък период на гладуване; водата не се ограничава. На следващия ден, животните трябва да се претеглят и след това да им се въведе изследваното вещество в еднократна доза. Ако не е възможно еднократно въвеждане на веществото, то се дава на по-малки части за период от време не надхвърлящо 24 часа. След въвеждане на веществото, храната се отстранява за следващите три-четири часа. Ако се въвежда на части за определен период, може да е необходимо да се даде храна и вода на животните в зависимост от продължителността на периода.

След въвеждането се провежда наблюдение и се регистрират индивидуални данни за всяко животно. Наблюдения трябва да се провеждат по-често през първия ден.

Прецизен клиничен преглед трябва да се прави поне един път ежедневно, други наблюдения трябва да се правят с подходящи действия с оглед намаляване загубата на опитните животни, а именно аутопсия или замразяване на намерените мъртви животни, изолиране или умъртвяване на слабите или умиращите животни. Наблюденията включват промените в кожата и козината, очите и лигавиците, а също дихателната, сърдечно-съдовата, автономната и централна нервна системи, соматичната моторна активност и поведението. Специално внимание трябва да се насочи към наблюдение на тремор, гърчове, слюнчене, диария, неподвижност, сънливост и кома. Времето на смъртта трябва да се отбележи колкото е възможно по-точно.

Умрелите животни и преживелите животни по време на опита се аутопсират. Всички макроскопски патологични промени трябва да се регистрират. Когато има показания, трябва да се вземат тъкани за хистопатологично изследване.

Оценка на токсичност в другия пол

След завършване на изследването при един пол, най-малко на една група от пет животни от другия пол се въвежда от изследваното вещество, за да се установи дали животните от този пол не са значително по-чувствителни към него. Употребата на по-малък брой животни може да се докаже при всеки отделен случай. Ако има достатъчна информация, която показва, че животните от изследвания пол са значително по-чувствителни, изследване на животни от другия пол не се прави.

2. **ДАННИ**

Данните трябва да бъдат обобщени в таблична форма, като са отразени броят на животните в началото на опита, времето на смъртта на отделните животни, броя на животните, при които са наблюдават други признаци на токсичност, описание на токсичните ефекти и находките от аутопсията. Индивидуалната телесна маса на животните трябва да се определи и отрази преди въвеждането на субстанцията, след това седмично и при смъртта. Трябва да се изчислят промените в телесната маса и да се отразяват, когато преживяемостта надхвърля един ден. Животните, които са убити хуманно поради причинени от субстанцията страдание и болка, се отразяват като умрели от веществото. LD_{50} трябва да се определя по признат метод. Оценката на резултатите трябва да включва зависимост (ако съществува) между експозицията на животните на изследваното вещество, честотата и тежестта на всички отклонения, включително на поведението, клинични, макроскопски увреждания, промени в телесната маса, смъртност, и всички други токсикологични ефекти.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването, ако е възможно, трябва да съдържа следната информация:

— вид, порода, произход на животните, условия на обкръжаващата среда, храна и други,

— експериментални условия,

— нива на дозите (какъв е разтворителя, ако се използва, и концентрация на разтвора),

— пол на опитните животни,

— отразяване в таблици на резултатите от отговора по пол и дози (брой на животните, които са умрели или умъртвени по време на опита, брой на животните показали признаци на токсичност, брой на експонираните животни),

— време на смъртта след въвеждане на веществото, причини и критерии приложени при хуманното убиване на животните,

— всички наблюдения,

— стойността на LD_{50} за пола, обект на пълно изпитване, определена след 14 дни (с означаване на метода на определяне),

— 95 % доверителен интервал за LD_{50} (където може да се осигури),

— крива за доза/смъртност (когато методът на определяне позволява това),

— находки от аутопсията,

— хистопатологични находки,

— резултати от всеки тест на другия пол,

— обсъждане на резултатите (специално внимание трябва да се обърне на влиянието, което хуманното убиване на животните по време на опита може да има върху изчислената стойност за LD_{50}),

— интерпретация на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Виж Общо въведение, част Б (Д).

Б.1а ОСТРА ТОКСИЧНОСТ (ОРАЛНА) — МЕТОД НА ФИКСИРАНАТА ДОЗА

1. **МЕТОД**

Този метод за изпитване е еквивалентен на ОИСР TG 420 (2001)

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (А)

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Виж Общо въведение, част Б (Б)

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитването на острата орална токсичност осигурява информация за неблагоприятните ефекти, които могат да възникнат в кратък период от време след поглъщането на еднократна доза от изследваното вещество.

Методът на фиксираната доза се провежда на два етапа.

В предварителен ориентировъчен опит се изследват ефектите на няколко дози въведени орално със сонда на по едно животно от един пол в зависимост от резултата от предишната доза. Ориентировъчният опит дава информация за зависимостта доза/токсичност, включително определяне на минималната летална доза. Обикновено на първия етап се използват не повече от пет животни.

В основното изпитване, веществото се въвежда орално със сонда на групи от пет мъжки и пет женски животни в една от предварително определените дози (5, 50, 500 или 2000 mg/kg). Използваната доза се определя от предварителния ориентировъчен опит и е тази, която е вероятно да предизвика „доказана токсичност“ (виж 1.2. Определения), но не смърт.

След въвеждането се провежда наблюдение на ефектите.

Когато началната избрана доза предизвиква доказана токсичност без летален изход, по-нататъшно изследване не се налага.

При отсъствие на доказана токсичност при избраната доза, веществото трябва да се изпитва при следващото по-високо ниво. Когато животните умират или когато се налага хуманно убиване поради тежка токсична реакция, веществото трябва да се изпитва при следващата по-ниска доза.

Процедурата позволява идентифициране на дискриминиращата доза (виж 1.2. Определения), която е най-високата доза от предварителния опит, която може да се въведе без да предизвика смърт (включително и на хората).

Животните с тежки и трайни признаци на страдание и болка се подлагат на хуманно умъртвяване. Третиране с вещества с корозивно или дразнещо действие, предизвикващо изразена болка и страдание, не трябва да се провежда.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Подготовка**

1.6.1.1. *Опитни животни*

Предпочитаният вид е плъх, ако няма противопоказания.

Трябва да се използва най-често прилаганият лабораторен животински вид. За всеки пол, преди началото на опита се отчита обхватът на различията в телесната маса на животните, който трябва да е в границите на + 20 % от подходящата средна стойност.

Животните се държат при експериментални условия на отглеждане и хранене най-малко пет дни преди започване на опита. Преди започване на експеримента, млади, здрави плъхове се разпределят произволно в опитни групи и се маркират за предварителния и за основния опит. На практика, за основното изследване може да е необходима само една група от всеки пол.

1.6.1.2. *Подготовка на дозите и въвеждане*

Когато е необходимо, изпитваното вещество се разтваря или суспендира в подходящ разтворител. Препоръчва се, където е възможно, на първо място да се има предвид воден разтвор, след това разтвор в растително масло и накрая, други разтворители или суспенсии. Токсичните свойства на разтворителя трябва да се познават или да се определят преди или по време на опита. При плъховете, въвежданият обем нормално не трябва да надхвърля 10 ml/kg от телесната маса, освен при водните разтвори, където може да достигне 20 ml/kg. Разликите в обема трябва да се намалят до минимум, чрез изчисляване на концентрациите, с цел осигуряване постоянен обем при всички дози.

Животните трябва да се държат гладни преди въвеждане на веществото. За плъховете храната трябва да се отнеме за цяла нощ; без да се ограничава достъпа до вода. На следващия ден, животните трябва да се претеглят и след това да им се въведе изследваното вещество в еднократна доза. Ако не е възможно еднократно въвеждане на веществото, то се дава на по-малки части за период от време не надхвърлящо 24 часа. След въвеждане на веществото, храната се отстранява за следващите три-четири часа. Ако се въвежда на части за определен период, може да е необходимо да се даде храна и вода на животните в зависимост от продължителността на периода.

1.6.2. **Процедура**

1.6.2.1. *Предварителен опит*

Ефектът на различни дози се изследват върху едно животно за доза. В отсъствие на информация показваща, че мъжкият пол е по-чувствителен, обикновено да се използват женски животни. Въвеждането е последователно през най-малко 24 часа до следващата доза. Всички животни се наблюдават внимателно най-малко 7 дни за признаци на токсичност. Прилагат се следните начални дози: 5, 50, 500 и 2000 mg/kg. Ако началната избрана доза не предизвиква тежка токсичност, а следващата по-висока доза предизвиква смърт, тогава е необходимо да се изследва една или повече междинни дози. По този начин е възможно събирането на информация за дозите, които предизвикват някои признаци на токсичност и минималната доза, която предизвиква смърт.

Трябва да се положи усилие да се избере начална доза, като се използват доказателства от подобни вещества. При липса на информация, се препоръчва най-напред да се използва доза от 500 mg/kg. При отсъствие на признаци на отравяне при началната доза се изследва следващата по-висока. Ако не се появи смъртност при 2000 mg/kg, предварителният опит е завършен и основният опит трябва да започне при същата доза. Ако се появят тежки ефекти при началната доза (500 mg/kg) изискващи хуманно умъртвяване, се прилага следващата по-ниска доза (50 mg/kg) на друго животно. Ако това животно преживее, другите животни трябва да бъдат третирани с подходящите междинни нива между фиксираните дози. Обикновено в опита не се очаква да се използват повече от пет животни.

1.6.2.2. *Основен опит*

За всяка доза трябва да се използват най-малко 10 животни (пет женски и пет мъжки). Женските не трябва да бъдат чифтосвани и бременни.

Принцип на метода на фиксираната доза е прилагането само на умерено токсични дози. Въвеждане на летални дози от изследваното вещество трябва да се избягва.

Използваната доза в опита се избира между четирите фиксирани дози, а именно 5, 50, 500 или 2000 mg/kg телесна маса. Началната избрана доза трябва да предизвика доказана токсичност, но не свързана с веществото смъртност (включително хуманно умъртвяване; случайната смърт не се включва, но трябва да се отбелязва). Ако тази доза предизвиква доказана токсичносг, но не свързана с веществото смъртност, не се налага по-нататъшно изследване.

При отсъствие на доказана токсичност от въвеждането на избраната доза веществото се изследва при следващата по-висока. Животните обаче трябва да бъдат наблюдавани до завършване на периода на наблюдение. Когато при тежка токсична реакция се налага животните да бъдат хуманно умъртвени или има свързана с веществото смъртност, то трябва да се изследва при следващото по-ниско ниво. Животните, които не трябва да бъдат хуманно умъртвени, също трябва да бъдат наблюдавани до края на периода на наблюдение.

След въвеждането, се провежда наблюдение. Системно се регистрират индивидуалните данни за всяко животно.

Периодът на наблюдение трябва да бъде най-малко 14 дни. Продължителността му обаче не трябва да бъде твърдо фиксирана. Той трябва да се определя от токсичните реакции, скоростта им на поява и продължителността на възстановителния период; може да бъде продължен когато се прецени, че е необходимо. Времето, за което се появяват и отзвучават признаците на токсичност и времето, когато настъпва смърт са важни, особено, когато има тенденция смърт да настъпи по-късно.

Прецизен клиничен преглед трябва да се провежда най-малко два пъти в деня на третирането и един път дневно след това. Животните с очевидна болка или с тежки признаци на страдание трябва да бъдат хуманно умъртвени. Допълнителни наблюдения са необходими през първите няколко дни след третирането, ако животните продължават да показват признаци на токсичност. Опитът може да приключи, ако е очевидно, че началната приложена доза е твърде висока.

Наблюденията включват промените в кожата и козината, очите и лигавиците, дихателната, сърдечно-съдовата, автономната и централната нервна система, соматичната моторна активност и поведението. Специално внимание трябва да се насочи към наблюдение на тремор, гърчове, слюнчене, диария, неподвижност, сънливост и кома.

Индивидуалната телесна маса трябва да се определя непосредствено преди въвеждането на изследваното вещество, ежедневно през следващите три дни и един път седмично след това. Умрелите животни по време на опита и преживелите в края на опита се аутопсират. Всички макроскопски патологични промени трябва да се отбележат. При макроскопски показания трябва да се вземат тъкани за хистопатологично изследване.

Изследване на втора доза или при извънредни обстоятелства на трета доза може да се изискват в зависимост от резултатите от предходящата доза.

В случай, че изследваното вещество предизвиква смърт при 5 mg/kg телесна маса (или когато предварителният опит показва, че ще се получи смъртност при тази доза), се налага острата токсичност на веществото да бъде изследвана по-нататък.

2. ДАННИ

Резултатите от двата опита, предварителен и основен, трябва да бъдат обобщени в таблична форма, като се отразят броят на животните в началото на опита, броят на животните, при които са наблюдават други признаци на токсичност, броят на намерените мъртви животни по време на опита или умъртвени по хуманни причини; описание на токсичните ефекти и за основния опит, където е наблюдавана доказана токсичност, свързана с веществото; времето за развитие на всеки токсичен ефект и находките от аутопсията.. Трябва да се изчислят промените в телесната маса и да се отразяват, когато преживяемостта надхвърля един ден.

Животните, които са убити хуманно поради причинени от субстанцията страдание и болка, се отразяват като умрели от веществото.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването, ако е възможно, трябва да съдържа следната информация:

— вид, линия, източник на животните, условия на обкръжаващата среда, храна и други,

— експериментални условия,

— нива на дозите (използван разтворител и концентрация на разтвора),

— пълни резултати от всички изследвани дози,

— отразяване в таблици на резултатите от отговорите по пол и дози (брой на животните, които са третирани, промени в телесната маса, където е приложимо, брой на умрелите или умъртвените по време на опита животни, брой на животните показали признаци на токсичност; естество, тежест и продължителност на ефектите).

— време на поява и отзвучаване на признаци на токсичност,

— време на смъртта или умъртвяване след въвеждане на веществото, причини и критерии, приложени при хуманното убиване на животните,

— резултати от аутопсията,

— резултати от хистопатологичните изследвания,

— обсъждане на резултатите,

— интерпретиране на резултатите, включително признаците на доказана токсичност и дискриминиращата доза определена в опита.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

ДОЗА	РЕЗУЛТАТИ	ИНТЕРПРЕТИРАНЕ
5 mg/kg телесна маса	По-малко от 100 % преживяемост	Съединения, които са СИЛНО ТОКСИЧНИ
	100 % преживяемост, но има очевидни признаци на токсичност	Съединения, които са ТОКСИЧНИ
	100 % преживяемост без очевидни признаци на токсичност	Виж резултатите при 50 mg/kg
50 mg/kg телесна масаа	По-малко от 100 % преживяемост	Съединения, които може да са ТОКСИЧНИ или СИЛНО ТОКСИЧНИ. Виж резултатите при 5 mg/kg.
	100 % преживяемост, но има очевидни признаци на токсичност	Съединения, които са ВРЕДНИ.
	100 % преживяемост без очевидни признаци на токсичност	Виж резултатите при 500 mg/kg.
500 mg/kg телесна маса	По-малко от 100 % преживяемост	Съединения, които може да са ТОКСИЧНИ или ВРЕДНИ. Виж резултатите при 50 mg/kg.
	100 % преживяемост, но има очевидни признаци на токсичност	Счита се, че тези съединения не притежават съществена остра токсичност.
	100 % преживяемост без очевидни признаци на токсичност	Виж резултатите при 2000 mg/kg.
2000 mg/kg телесна маса	По-малко от 100 % преживяемост	Виж резултатите при 500 mg/kg.
	100 % преживяемост със или без очевидни признаци на токсичност	Съединения, които не притежават съществена остра токсичност.

Виж също Общо въведение, част Б (Г).

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Виж Общо въведение, Част Б (Д)

Б.2. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ (ИНХАЛАТОРНА)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Полезно е да се разполага с предварителна информация за разпределението на частиците по размери, както и за парното налягане, температурата на топене, температурата на кипене, точката на възпламеняване и експлозивните свойства (когато могат да намерят приложение) на изпитваното вещество.

Виж също Общо въведение към част Б (А).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Виж Общо въведение към част Б (Б).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Няколко групи от експериментални животни се подлагат на въздействието на изпитваното вещество за определен период от време, при нарастващи концентрации, като за всяка група се използва една концентрация. След това се провеждат наблюдения върху ефектите и случаите на смърт. Животните, умрели по време на изпитването се подлагат на аутопсия. Оцелелите животни в края на изпитването също се аутопсират.

Животните, които показват тежки и трайни симптоми на стрес и болка може да се наложи да бъдат убити по хуманен начин. Дозирането на изпитваните вещества по начин, за който се знае, че причинява значителна болка и стрес поради разяждащи или остро дразнещи въздействия, няма нужда да се прилага.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Подготовка**

Животните се настаняват и хранят при експерименталните условия най-малко пет дни преди началото на опита. Преди изпитването, по случаен начин се подбират възрастни здрави и млади животни и се разпределят в съответния брой групи. Няма нужда животните да се подлагат на симулирана (предварителна) експозиция, освен ако това не е включено в изискванията към използвания тип апаратура за експониране.

Твърдите изпитвани вещества трябва да се стрият до получаването на частици с подходящ размер.

Когато е необходимо, към изпитваното вещество може да се прибави подходящ носител, който ще помогне да се получи нужната концентрация на веществото в атмосферата. В такива случаи, трябва да се предвиди контролна група за носителя. Ако за улесняване на дозирането се използва носител или други добавки, за тях трябва да е известно, че нямат токсични ефекти. За тази цел могат да се използват данни, получени при предишни опити.

1.6.2. **Условия на изпитването**

1.6.2.1. *Опитни животни*

Плъховете са предпочитаният вид за този опит, освен ако няма други данни. Използват се обичайните лабораторни породи. В началото на изпитването диапазонът на масата на животните не бива да надвишава ± 20 % спрямо съответната средна стойност за всеки от половете.

1.6.2.2. *Брой и пол*

При всяка концентрация се използват най-малко 10 гризача (пет женски и пет мъжки). Женските не бива да са раждали, нито да са бременни.

Забележка: При опитите за остра токсичност с животни от по-висш разред от гризачите, трябва да се обмисли използването на по-малък брой животни.

Дозите трябва да се подберат внимателно, като се полагат усилия да не се надвиши умерено токсичната доза. При тези изпитвания трябва да се избягва въвеждането на летални дози от веществото.

1.6.2.3. *Концентрации на експозицията*

Концентрациите трябва да бъдат достатъчно на брой (поне три) и да са правилно разпределени, така че да се получат групи от животни с определен обхват от токсични въздействия и степени на смъртност. Данните трябва да бъдат достатъчни за начертаването на крива концентрация/смъртност и където е възможно, да позволят приемливо определяне на стойността на LC_{50}.

1.6.2.4. *Гранично изпитване*

Ако експозицията на пет мъжки и пет женски опитни животни на 5 mg/l газ, или аерозол на течни или твърди вещества, в продължение на четири часа дневно в рамките на 14 дни не предизвиква смъртност свързана с третирането, по-нататъшно изследване се смята за ненужно. В случаи, когато изследваното вещество има физико-химична характеристика (включително експлозивни свойства) непозволяваща достигане на тези концентрации, то се прилага максимално постижимата технически концентрация на изследваното вещество.

1.6.2.5. *Време на експозицията*

Периодът на експозицията трябва да бъде четири часа.

1.6.2.6. *Апаратура*

Опитите с животните се провеждат в апаратура за инхалации, проектирана така, че да поддържа динамичен въздушен поток (поне 12 смени на въздуха за един час), да осигурява подходящо съдържание на кислород и равномерно разпределение на веществото в атмосферата за експозиция. Когато се използва камера, нейната конструкция трябва да е такава, че да свежда до минимум струпването на животните и да осигурява максимално тяхната експозиция чрез вдишване на изпитваното вещество. Основно правило за осигуряването на стабилна атмосфера в камерата е общият „обем“ на опитните животни да не е по-голям от 5 % от обема на камерата. Могат да се използват индивидуални камери, които да обхващат устата и носа, само главата или цялото тяло. Първите два вида камери спомагат да бъде сведено до минимум поемането на веществото по други пътища.

1.6.2.7. *Период на наблюдение*

Периодът на наблюдение трябва да бъде най-малко 14 дни. Продължителността на наблюденията, обаче, не бива да е строго фиксирана. Тя се определя от токсичните реакции, скоростта, с която те настъпват и времетраенето на възстановителния период. Така периодът на наблюдение може да се удължи, докогато се сметне за необходимо. Времето, за което се появяват и изчезват симптомите на токсичното действие, както и времето на смъртта са много важни, особено когато съществува тенденция към забавяне на смъртния изход.

1.6.3. **Процедура**

Животните се претеглят малко преди експозицията. Те се подлагат на въздействието на изпитваното вещество при съответната концентрация за период от четири часа, който се отчита след нагласяването на концентрацията в камерата. Времето за постигане на нужната концентрация в камерата трябва да бъде кратко. Температурата по време на изпитването трябва да се поддържа в интервала 22 ± 3 °C. В идеалния случай, относителната влажност трябва да бъде между 30 и 70 %, но понякога (например при изпитването на някои аерозоли) това не може да се постигне. Поддържането на малко по-ниско налягане в камерата (≤ 5 mm воден стълб) би предотвратило изтичане на изпитваното вещество в околната среда. По време на експозицията, на животните не бива да се дават храна и вода. Трябва да се използват подходящи системи за създаване и контрол на атмосферата за изпитването. Тези системи трябва да осигуряват колкото е възможно по-бързото постигане на стабилни условия на експозицията. Камерата трябва да е така проектирана и с нея да се работи по такъв начин, че да се поддържа равномерно разпределение на изпитваното вещество в обема на камерата.

Провеждат се следните измервания или наблюдения:

— а) на дебита на въздушния поток (постоянно);

— б) на действителната концентрация на изпитваното вещество. Тя се измерва в зоната на дишане поне три пъти по време на експозицията (при някои атмосфери, например аерозоли във високи концентрации, може да е необходимо по-често контролиране на концентрацията). По време на експозицията, концентрацията не бива да варира с повече от ± 15 % от средната стойност. При някои аерозоли обаче, това ниво на контрол не може да се постигне. В такива случаи, се налага да се приемат по-широки граници на вариране на концентрациите. При аерозолите трябва да се провеждат анализи на размера на частиците толкова често, колкото е необходимо (поне един път за всяка група животни);

— в) на температурата и влажността (ако е възможно, непрекъснато).

Наблюдения се провеждат както по време на експозицията, така и след това. Те се записват системно, като се води индивидуален протокол за всяко животно. През първия ден наблюденията се правят много често. Обстоен клиничен преглед трябва да се прави поне един път на всеки работен ден. Другите наблюдения се правят ежедневно, като се предприемат мерки за свеждане до минимум на загубата на животни от изпитването, например, аутопсия или замразяване на животните, намерени мъртви и изолиране или умъртвяване на слабите или умиращи животни.

Наблюденията трябва да включват промените на кожата и козината, очите, лигавиците, измененията в дихателната, кръвоносната, автономната и централната нервна система, както и соматичната моторна активност и поведението на животните. Особено внимание трябва да се обърне на наблюденията на дишането, треморите, конвулсиите, слюнкоотделянето, диария, летаргия, сън и кома. Времето на смъртта трябва да се записва колкото е възможно по-точно. Масата на всяко животно се определя по веднъж на седмица след експозиция и при настъпването на смъртта.

Животните, умрели по време на изпитването, както и оцелелите до края на експеримента се подлагат на аутопсия, като особено внимание се обръща на измененията в горните и долните дихателни пътища. Записват се всички видими макроскопски патологични изменения. Където е нужно, трябва да се вземат тъкани за хистопатологично изпитване.

2. ДАННИ

Данните се обобщават в табличен вид. За всяка група от опитни животни те трябва да показват – брой на животните в началото на изпитването, време на смъртта на всяко животно, брой на животните, показали други симптоми на токсичното действие, описание на токсичните ефекти и находките при аутопсията. Когато времето на преживяване е по-дълго от един ден, трябва да се изчисляват и записват промените в телесната маса. Животните, които са умъртвени по хуманни съображения поради свързани с веществото признаци на стрес и болка, се отчитат като умрели в резултат на въздействието на веществото. Стойността на LC_{50} се определя по утвърдения метод. Оценката на данните трябва да включва връзката (ако има такава) между експозицията на животното и проявите и степента на всички аномалии, включително тези в поведението, клиничните аномалии, видимите поражения, промените в телесната маса, смъртността и другите ефекти на токсичното действие.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

— вид, порода, източник, условия на околната среда, хранителен режим и т.н.,

— условия на изпитването: описание на апаратурата за експозиция,

в това число конструкцията, типа, размерите, източника на въздух, системата за получаване на аерозоли, метода за кондициониране на въздуха и метода за разполагане на животните в камерата (когато е използвана камера). Също трябва да се описват техническите средства за измерване на температурата, влажността и концентрацията на аерозола, както и разпределението на частиците по размери.

Данни за експозицията:

Данните за експозицията трябва да се представят в табличен вид, като се представят със средните си стойности и измерените отклонения (например, стандартното отклонение) и, ако е възможно, да включват:

а) дебитите на въздушния поток през апаратурата за инхалиране;

б) температура и влажност на въздуха;

в) номиналните концентрации (общото количество изследвано вещество, подадено в апаратурата за инхалиране, разделено на обема въздух);

г) природата на носителя (ако е използван);

д) действителните концентрации в изпитваната зона на дишане;

е) масовия среден аеродинамичен диаметър (MMAD) и геометричното стандартно отклонение (GSD);

ж) периода за влизане на апаратурата в режим;

з) периода на експозиция;

— таблични данни за отговора по пол и ниво на експозицията (например – брой животни, които са умрели или са били убити по време на изпитването; брой животни, показващи признаци на токсично действие; брой животни, подложени на експозиция);

— времена на смъртта по време на експозицията или след нея, причини и използвани критерии за умъртвяването по хуманни съображения;

— всички наблюдения;

— стойността на LC_{50} за всеки от половете, определена в края на наблюдателния период (като се посочи и метода на изчисляване);

— 95 % интервал на достоверност за LC_{50} (където може да се предостави);

— крива доза/смъртност и наклон на кривата (където е възможно да се измери в зависимост от метода на определянето);

— находки при аутопсията;

— всички хистопатологични находки;

— обсъждане на резултатите (особено внимание се обръща на ефекта, който оказва умъртвяването на животни по хуманни съображения по време на изпитването, върху изчислената стойност на LC_{50});

— интерпретиране на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Виж Общо въведение, част Б (Д).

Б.3. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ (ДЕРМАЛНА)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж общо въведение, част Б (А).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Виж общо въведение, част Б (Б).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество се въвежда орално с градуирана сонда на няколко групи експериментални животни по една доза за група. Избраните дози са на базата на резултатите от тест за определяне на приблизителни дози. След това се наблюдават ефектът и смъртността. Умрелите животни по време на експеримента и преживелите при завършването му, се аутопсират. Методът е насочен за изследване предимно на различни видове гризачи.

Животните с остри и продължителни симптоми на болка и стрес може да се наложи да бъдат убити по хуманен начин. Не бива да се прилага дозиране на изследваните вещества по начини, за които е известно, че причиняват силна болка и стрес, поради характерни за тях ефекти на разяждане или силно дразнене.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Подготовка**

Животните се разполагат по клетки и се държат и хранят в експериментални условия най-малко пет дена преди началото на експеримента. Преди изпитването, млади полово зрели животни в добро здравословно състояние се подбират по произволен начин и се разпределят на групи. Приблизително 24 часа преди опита, козината по гръбната (дорзалната) част на тялото се отстранява чрез подрязване или бръснене. Трябва да се внимава да не се охлузи кожата, защото това би могло да промени нейната пропускливост. За прилагането на изпитваното вещество е необходимо да се почистят най-малко 10 % от повърхността на тялото. При изпитването на твърди вещества (които може да се приведат в прахообразно състояние), веществото трябва добре да се омокри с вода или, ако е необходимо, с подходящ носител, за да се осигури добър контакт с кожата. Ако се използва носител, трябва да се има предвид неговото влияние върху проникването на веществото през кожата. По принцип, течните вещества се прилагат без разреждане.

1.6.2. **Условия на изпитването**

1.6.2.1. *Опитни животни*

Могат да се използват плъхове или зайци в зряла възраст. Възможно е използването и на други видове животни, но за това е необходима обосновка. Използват се обикновените лабораторни породи. Вариациите в телесната маса на животните в началото на изпитването не бива да надвишават ± 20 % от съответната средна стойност за всеки от двата пола.

1.6.2.2. *Брой и пол*

При всяко ниво на дозиране се използват най-малко пет животни. Всички те трябва да са от един и същи пол. Женските не бива да са раждали, както и да не са бременни. Ако има информация, че един от двата пола проявява значително по-висока чувствителност, то се използват животни от този пол.

Забележка: При изследванията за остра токсичност с животни от по-висш разред от гризачите, трябва да се обмисли употребата на по-малък брой животни. Дозите трябва да се подбират внимателно, като се полагат усилия да не се надвишават умерено токсичните дози. При тези изпитвания се избягва прилагането на летални дози от веществото.

1.6.2.3. *Нива на дозите*

Те трябва да са достатъчно на брой (поне три) и да са правилно разпределени количествено, така че при изпитването да се получат групи от животни с определен обхват от токсични ефекти и нива на смъртност. При определянето на нивата на дозите трябва да се вземат под внимание всички ефекти на дразнене и разяждане на кожата. Данните трябва да са достатъчни за получаването на крива доза/отговор и, когато е възможно, да позволяват приемливо определяне на LD_{50}.

1.6.2.4. *Гранично изпитване*

С помощта на описаните по-горе процедури може да се проведе гранично изпитване с една доза на ниво най-малко 2000 mg/kg телесна маса върху група от 5 мъжки и 5 женски животни. Ако това доведе до смъртност, свързана със съединението, може да се реши провеждане на пълното изследване.

1.6.2.5. *Период на наблюдение*

Периодът на наблюдение трябва да бъде най-малко 14 дни. Продължителността на наблюдението, обаче, не бива да се фиксира точно. Тя се определя от реакциите на токсичното въздействие, скоростта, с която те настъпват и времетраенето на възстановителния период. Така тя може да се удължи, докогато се сметне за необходимо. Времето, за което се появяват и изчезват симптомите на токсичното действие, тяхната продължителност и момента на смъртта са важни, особено когато съществува тенденция към забавяне на смъртния изход.

1.6.3. **Процедура**

Животните се разполагат по клетки индивидуално. Изпитваното вещество се нанася равномерно върху площ около 10 % от общата повърхност на тялото. При силно токсичните вещества, покритата повърхност от тялото може да бъде и по-малка, но при всички случаи покриването трябва да стане на колкото е възможно по-тънък и равномерен пласт.

Изпитваните вещества се поддържат в контакт с кожата с помощта на марлена превръзка и лепенки, които не предизвикват дразнене. Времетраенето на експозицията е 24 часа. Мястото на прилагане трябва да се покрие допълнително по подходящ начин, така че марлята и веществото да са добре закрепени и да се избегне възможността животното да погълне веществото. За тази цел може да се използват приспособления за ограничаване на движенията, но пълното обездвижване на животното не е препоръчително.

В края на експозиционния период останалото вещество се отстранява, като кожата се почиства с вода (ако е възможно) или по друг подходящ начин.

Наблюденията се записват системно в реда, в който са направени. За всяко животно се води индивидуален протокол. През първия ден наблюденията се провеждат често. Поне веднъж на всеки работен ден се прави обстоен клиничен преглед. Останалите наблюдения се провеждат ежедневно, като се прави всичко възможно загубата на животни да бъде сведена до минимум, например – аутопсия или замразяване на животните, намерени мъртви и изолиране или умъртвяване на слабите или умиращи животни.

Наблюденията трябва да включват: промени в козината, третираната кожа, очите и лигавиците, както и на дихателната, кръвоносната, автономната и централната нервна система, соматичната моторна активност и поведението на животните. Особено внимание трябва да се обръща за тремори, конвулсии, слюнкоотделяне, диария, летаргия, сън и кома. Времето на смъртта се записва колкото е възможно по-точно. Животните, умрели по време на изпитването, както и оцелелите до края на изпитването, се подлагат на аутопсия. Записват се всички видими патологични изменения. Когато е необходимо, някои тъкани се вземат за хистопатологично изследване.

Оценка на токсичното действие при другия пол

След приключването на опита с единия пол, група от най-малко пет животни от другия пол също се подлага на третиране. Така може да се разбере дали животните от този пол не са забележимо по-чувствителни към изпитваното вещество. В отделни случаи е оправдано използването на по-малък брой животни. Когато има адекватна информация, показваща, че животните от изследвания пол са много по-чувствителни, то експериментирането с другия пол може и да не се прави.

2. ДАННИ

Данните се обобщават в табличен вид, като за всяка група животни се показват: брой на животните в началото на изпитването, време на смъртта на всяко животно поотделно, брой животни с други признаци на токсично въздействие, описание на токсичните ефекти и находките при аутопсията. Индивидуалните телесни маси на животните се определят и записват непосредствено преди прилагането на изпитваното вещество, по един път на седмица след това и при смъртта. Когато времето на преживяване е по-голямо от един ден, измененията в теглото на животните се изчисляват и записват. Животните, убити по хуманни съображения заради стреса и болката, свързани с въздействието на веществото, се отчитат като случаи на смърт, причинена от веществото. Стойността на LD_{50} трябва да се определи по утвърдения метод.

Оценката на данните трябва да включва преценка на зависимостта (ако има такава) между експозицията на животните и появата и остротата на всички аномалии, включително в поведението и клиничните аномалии, видимите поражения, промените в телесната маса, смъртността и всички останали токсикологични ефекти.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

— вид, порода, източник, условия на средата, диета и т.н.;

— условия на изпитването (включително метода за почистване на кожата и вида на превръзката: плътно прилепваща(запушваща) или неоклузивна);

— нива на дозите (с носителите (ако са използвани) и концентрациите);

— пол на третираните животни;

— таблични данни за отговора по пол и ниво на дозата (т.е. брой на животните, умрели или убити по време на опита; брой на животните със симптоми на токсично действие; общ брой на животните);

— време на смъртта след дозирането; причини и критерии за умъртвяването на животни по хуманни съображения;

— всички наблюдения;

— стойността на LD_{50} за пола, подложен на цялостно изследване, определена на четиринадесетия ден и метода на определянето ѝ;

— 95 % интервал на достоверност за LD_{50} (където може да се предостави);

— крива доза/смъртност и наклон на кривата (където методът позволява да се определи);

— находки при аутопсията;

— всички хистопатологични находки;

— резултатите от всички направени изпитвания върху другия пол;

— обсъждане на резултатите (особено внимание се обръща на ефекта, който умъртвяването на животните по хуманни съображения по време на изпитването, оказва върху изчислената стойност на LD_{50});

— интерпретиране на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Виж общо въведение, част Б (Г).

4. ПОЗОВАВАНИЯ

Виж общо въведение, част Б (Д).

Б.4. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ (КОЖНО ДРАЗНЕНИЕ)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (А).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Виж Общо въведение, част Б (Б).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Предварителни проучвания

Необходимо е внимателно да се проучи цялата достъпна информация за дадено вещество, за да се ограничи неговото изпитване до условията, при които вероятно ще се получи остра реакция. Следната информация може да бъде от полза, когато се преценява дали да се направи пълно или единично изпитване върху животни или да не се правят допълнителни изпитания.

i) Физикохимични свойства и химична активност. Силно киселинните или алкалните вещества (с pH ≤ 2 или ≥ на 11,5, например) може да не се нуждаят от изследване за установяване на първично кожно дразнене, ако притежават корозивни свойства. Алкалният или киселинният резерв също трябва да се вземе под внимание.

ii) При наличие на убедителни доказателства за остър ефект от добре валидирани in vitro тестове може да не се изисква пълно изпитване.

iii) Резултати от изследвания на остра токсичност. Ако острата токсичност е изпитана при контакт с кожата с лимитиращия тест (2000 mg/kg т.м) и не е наблюдавано кожно дразнене, не е необходимо по-нататъшно изследване за кожно дразнене. Освен това не е необходимо да се изпитват вещества с доказана остра токсичност при кожен контакт.

Изпитваното вещество се прилага в единична доза върху кожата на няколко опитни животни, като всяко животно се използва като своя собствена контрола. Степента на раздразнение се отчита и класифицира след определен интервал от време, след което се описва, за да се направи пълна оценка на ефекта. Продължителността на наблюдението трябва да позволява да се направи пълна оценка на обратимостта на наблюдавания ефект.

Животните, при които се наблюдават тежки и устойчиви признаци на страдание и болка, могат да бъдат убити по хуманен начин.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Подготовка**

Приблизително 24 часа преди изпитването трябва да се отстрани козината от гръбната област на тялото на животното, чрез подстригване или бръснене.

По време на подстригването или бръсненето трябва да се внимава да не се ожули кожата. Трябва да се използват само здрави животни без кожни наранявания.

Някои породи зайци имат гъсти окосмени участъци, които са по-забележими през някои периоди от годината. Изпитваните вещества не трябва да се прилагат в участъци на гъсто окосмяване.

Когато се изпитват твърди вещества (които могат да бъдат пулверизирани, ако това е необходимо), те трябва да се овлажнят в достатъчна степен с вода или там, където е необходимо, с подходящ разтворител, за да се постигне добър контакт с кожата. Когато се използват носители, трябва да се отчита тяхното влияние върху раздразнението на кожата, причинено от пробата. Течните изследвани вещества се прилагат обикновено без да се разреждат.

1.6.2. **Условия на опита**

1.6.2.1. *Опитни животни*

Независимо, че могат да се използват няколко вида бозайници, обикновено се предпочитат бели зайци.

1.6.2.2. *Брой на животни*

Ако резултатите от ин витро скрининга или други съображения дават основание да се предполага, че дадено вещество може да причини некроза (т.е,. че има корозивни свойства) трябва да се предвиди единично изпитване върху животни. Ако резултатите от него не показват корозивност, желателно е да се проведат допълнителни изпитвания поне върху още две животни.

За пълно изпитване се използват най-малко три възрастни животни. Не са необходими отделни животни от нетретирана контролна група. Допълнителни животни могат да се използват за изясняване на съмнителни реакции.

1.6.2.3. *Дози*

В случай, че няма противопоказания, дозите са 0,5 ml за течните или 0,5 g за твърдите или полутвърди вещества, които се прилагат на изследваното място. Съседните участъци нетретирана кожа се използват като контролни.

1.6.2.4. *Период на наблюдение*

Продължителността на периода на наблюдение не трябва да се определя с абсолютна точност. Тя трябва да е достатъчна, за да се направи пълна оценка на обратимостта на наблюдавания ефект, като за това обикновено са достатъчни 14 дни след прилагането.

1.6.3. **Процедура**

Животните трябва да бъдат разпределени в отделни клетки. Изпитваното вещество се нанася върху малък участък (приблизително 6 cm^2) от кожата и се покрива с марля, която се прикрепя с недразнеща лепенка. Ако се изпитват течни вещества или пасти, може да се наложи нанасянето им върху марля, която се поставя върху кожата и се прикрепя с помощта на подходяща плътно прилепващаили полуплътно прилепващапревръзка през периода на експониране. Трябва да се предотврати достъпът на животното до марлята и последващото поглъщане или вдишване на изпитваното вещество.

В края на периода на експозиция, остатъкът от изпитваното вещество се отстранява с вода или подходящ разтворител, без да се променя отговорът и да се нарушава целостта на епидермиса.

Обикновено продължителността на експозицията е четири часа.

Ако се предполага, че веществото може да причини некроза (т.е., че е корозивно), продължителността на експозиция може да се намали (например до един час или три минути). При това изпитване може първоначално да се използва едно животно и ако това не е невъзможно поради острата кожна токсичност на изпитваното съединение, могат да се приложат едновременно три проби. Първата се отстранява след три минути. При отсъствие на сериозна кожна реакция, втората се отстранява след един час. Ако наблюденията на този етап показват, че е необходима четиричасова експозиция, която може да се осъществи по хуманен начин, третата проба се отстранява след този период, а реакциите се класифицират.

В този случай (т.е. при четиричасова експозиция) изпитването трябва да се допълни с изследване най-малко на още две животни освен, ако се прецени, че това не е хуманно (например, ако след четиричасова експозиция се наблюдава некроза).

Ако при триминутна или едночасова експозиция се наблюдава сериозна кожна реакция (например некроза), изпитването трябва да се прекрати незабавно.

По-продължителна експозиция може да се препоръча при някои условия, например за прогнозиране на модела на използване и експозиция при човека.

1.6.3.1. *Наблюдение и класифициране*

Животните трябва да се наблюдават за признаци на еритема и едем, а реакциите трябва да се класифицират на 60^{тата} минути, а после след 24^{ия}, 48^{ия} и 72^{ия} час от отстраняването на пробата. Кожното дразнение се класифицира и регистрира по системата, дадена на таблица 1. По-нататъшно наблюдение е необходимо ако в рамките на 72 часа не е установена обратимост на ефекта. Освен наблюдението за дразнение е необходимо да се опишат подробно всички сериозни увреждания, като разяждане (необратимо разрушаване на кожната тъкан) или други токсични ефекти.

Методи като хистопатологичен преглед или измерване дебелината на кожните гънки могат да се използват за изясняване на съмнителни реакции или замаскирани отговори от оцветяване на кожата в резултат на действието на изпитваното вещество.

2. ДАННИ

Данните трябва да бъдат обобщени под формата на таблици, показващи за всяко животно степените на дразнение, еритема и едем през периода на наблюдение. Необходимо е да се регистрират всички сериозни увреждания, степените и характера на дразнението, обратимостта или разяждането, както и всеки друг наблюдаван токсичен ефект.

3. РЕЗУЛТАТИ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНИЯТА

Ако е възможно, отчетът от изпитването трябва да включва следните данни:

— видове изследвани животни, порода, доставчик, условия на средата на отглеждане, хранителен режим и други,

— условия на изпитване (физико-химични свойства на химичния продукт, методи на кожна подготовка и почистване, вид на превръзката: плътно прилепващаили полуоклузивна),

— подреждане в таблици на данните за иритативния отговор за всяко животно през всички периоди на наблюдение (първия, 24^{ия}, 48^{ия}и 72^{ия} час часа след отстраняване на пробата),

— описание на всяка наблюдавана сериозно увреждане, включително и разяждащо действие,

— описание на степените и характера на наблюдаваното възпаление и на всички хистопатологични находки,

— описание на всеки токсичен ефект различен от кожното възпаление,

— обсъждане на резултатите,

— интерпретация на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. ПОЗОВАВАНИЯ

Виж Общо въведение, част Б (Д).

Допълнение

Таблица I. Скала на кожните промени

Образуване на еритема и ескара

	Стойност
Липса на еритема	0
Много лека еритема (едва забележима)	1
Добре изразена еритема	2
Умерена до тежка еритема	3
Тежка еритема (силна червенина) или образуване на ескари(дълбоки рани), които не дават възможност за оценка на еритемата	4

Образуване на едем

Липса на едем	0
Много лек едем (едва забележим)	1
Лек едем (с ясно изразени граници)	2
Умерен едем (с краища, повдигнати около 1 mm)	3

Б.5. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ (ОЧНО ДРАЗНЕНИЕ)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б(А).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б(Б).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Предварителни проучвания

Необходимо е внимателно да се проучи цялата достъпна информация за дадено вещество, за да се ограничи неговото изпитване до условията, при които вероятно ще се получи остра реакция. В тази връзка, от полза може да бъде следната информация:

i) Физико-химични свойства и химична активност. Силно киселинните или алкалните вещества, с pH ≤ 2 или ≥ на 11,5, може да не се изпитват, ако има вероятност да причинят тежки увреждания. Алкалният или киселинния резерв също трябва да се вземе под внимание.

ii) Резултати от добре валидирани алтернативни изследвания; вещества, с доказани потенциални разяждащи или силно дразнещи свойства може да не се нуждаят от допълнително изпитване за очно дразнение, ако се предполага, че прилагането на настоящия метод ще доведе до тежки поражения на очите.

iii) Резултати от изследвания за кожно дразнене. Вещества с установено разяждащо или остро дразнещо кожно действие при изследване за кожно дразнение, не се нуждаят от по-нататъшно изпитване, ако се предполага, че ще доведат до тежки поражения на очите.

Изпитваното вещество се нанася в единична доза в окото на няколко опитни животни, а нетретираното око се използва като контрола. Степента на дразнението се оценява и класифицира през определен интервал, след което продължава да се описва, за да се направи пълна оценка на ефекта. Продължителността на наблюдение трябва да позволи да бъде направена пълна оценка на обратимостта или необратимостта на наблюдавания ефект.

Животните, при които се наблюдават тежки и устойчиви признаци на страдание и болка трябва да бъдат убити по хуманен начин.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Подготовка**

Очите на всяко опитно животно трябва да бъдат прегледани в срок от 24 часа преди началото на изследването. Не бива да се използват животни с очно дразнение, очни дефекти или увреждания на роговицата.

1.6.2. **Условия на изпитването**

1.6.2.1. *Опитни животни*

Независимо, че се използват различни опитни животни, препоръчва се за изпитването да бъдат използвани здрави възрастни бели зайци.

1.6.2.2. *Брой на животните*

Ако се очакват силно изразени увреждания, изпитването трябва да бъде проведено върху едно животно. Ако резултатите от изследването при един заек дават основание да се смята, че веществото, изследвано по тази процедура ще има силен дразнещ (обратим) или разяждащ (необратим) ефект върху окото, не е необходимо по-нататъшно изследване за кожно дразнение върху други животни. Понякога може да се наложи изпитване на допълнителни животни за проучване на специфични аспекти на действие.

Обикновено се използват най-малко три опитни животни. Допълнителни животни могат да се използват за изясняване на съмнителни реакции.

1.6.2.3. *Нива на дозите*

Течни вещества се изпитват при доза 0,1 ml. При изпитване на твърди, прахообразни вещества и пасти, количеството на използвания обем трябва да бъде 0,1 ml или приблизително тегло 0,1 g (теглото трябва винаги да се отбелязва). Ако изпитваният материал е твърд или гранулиран, той трябва да бъде смлян на ситен прах. Обемът на частиците трябва да бъде измерен след леко уплътняване, например чрез потупване на измерителния контейнер.

За вещества в пулверизатори с помпа или в контейнери за аерозоли под налягане, изследваната течност трябва да се пулверизира, като се съберат 0,1 ml и да се прилага на капки в окото, според описанието за изпитване на течности.

1.6.2.4. *Период на наблюдение*

Продължителността на периода на наблюдение не трябва да се фиксира с абсолютна точност. Тя трябва да е достатъчна, за да се направи оценка на обратимостта или необратимостта на наблюдавания ефект, като за това, обикновено са достатъчни не повече от 21 дни след прилагането.

1.6.3. **Процедура**

Животните трябва да бъдат разпределени в индивидуални клетки. Изпитваното вещество се поставя в конюнктивалния сак на едното око на всяко животно, след леко издърпване на долния клепач от очната ябълка. Клепачите се съединяват леко за около секунда, за да не изтече изпитваното вещество. Другото, нетретирано око, служи за контрола.

Ако се смята, че веществото може да причини неоправдана болка, преди прилагането, може да се използва местна упойка. Видът, концентрацията и времето на прилагане на местната упойка трябва да бъдат правилно подбрани, за да се избегнат значителни различия в реакцията спрямо изпитваното вещество в резултат на прилагането на упойката. Ето защо тя трябва да се приложи и на второто око, по същия начин.

Очите на опитното животно не бива да се промиват в продължение на 24 часа след прилагането на изпитваното вещество. Ако е необходимо, промивка може да се направи на 24-ия час.

За някои вещества с доказан от изследването дразнещ ефект, се препоръчва при допълнителното изпитване, очите на зайците да се промиват скоро след прилагането на веществото. В тези случаи се препоръчва да се използват три заека. Половин минута след прилагането, очите на зайците се промиват в продължение на половин минута с обем и скорост на струята, които няма да причинят увреждания на окото.

1.6.3.1. *Наблюдение и класифициране*

Необходимо е да бъде направен преглед на очите на първия, 24^{ия}, 48^{ия} и 72^{ия} час. Ако на 72^{ия} час, няма данни за очни наранявания, изследването може да бъде прекратено.

Продължително наблюдение може да бъде проведено при постоянно дразнение на роговицата или друго очно дразнение, за да се определи прогресирането на увреждането, както и тяхната обратимост или необратимост. Освен наблюдения на роговицата, ириса и конюнктива, необходимо е да се записват и съобщават всички други забелязани увреждания. Степените на очната реакция (под формата на таблица), трябва да бъдат записвани при всеки преглед. (Класифицирането на очните реакции може да бъде интерпретирано по различен начин. Ето защо, в помощ на лабораториите за изпитване, наблюдение и интерпретиране на наблюденията, може да се използва илюстрирано ръководство за очно дразнение).

При прегледа на реакциите, за улеснение може да се използват бинокулярна лупа, ръчна лампа с визьор, офталмоскоп или друг подходящ уред. След записване на резултатите на 24-тия час, очите на всеки опитен заек могат да бъдат прегледани допълнително с флуоресцин.

2. ДАННИ

Данните трябва да бъдат обобщени под формата на таблици, показващи за всяко животно степените на дразнение за определения период на наблюдение. Необходимо е да се регистрират степента и характерът на дразнението, наличието на сериозни увреждания, както и всеки друг неочен наблюдаван ефект.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ОТЧЕТЕН ПРОТОКОЛ

Ако е възможно, отчетът от изпитването трябва да включва следните данни:

— данни за опитните животни (видове, порода, условия на отглеждане, хранителен режим и други),

— условия на опита (физико-химични свойства на изпитваното вещество),

— подреждане в таблици на данните за дразнещата (разяждаща) реакция при всяко животно за всеки период на наблюдение (например на първия, 24-^{ия}, 48^{ия} и 72^{ия} час),

— описание на всяко наблюдавано сериозно увреждане,

— описание на степента и характера на наблюдаваното дразнение или разяждане, включващо засегнатата част на роговицата и обратимостта,

— описание на метода за класифициране на степента дразнение на първия, 24-тия, 48-ия и 72-ия час (например ръчна лампа, биомикроскоп, флуоресцин);

— описание на всеки неочен наблюдаван ефект,

— описание на резултатите,

— интерпретация на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Виж Общо въведение, част Б (Д).

Допълнение

ТАБЛИЦА: СКАЛА НА ОЧНИТЕ УВРЕЖДАНИЯ

Роговица

Помътняване: степен на плътност (отчитането се извършва за участъка с най-плътно помътняване)	
Отсъствие на язва или помътняване	0
Разпръснати или дифузни зони на помътняване (изключва се лекото замъгляване на нормалния блясък); детайлите на ириса са ясно различими	1
Ясно различима полупрозрачна зона; детайлите на ириса са леко замъглени	2
Зона със седефен цвят; детайлите на ириса не се забелязват; големината на зеницата се определя трудно	3
Непрозрачна роговица; ирисът не се различава през помътнената роговица	4

Ирис

Без промени	0
Забележимо увеличени гънки, конгестия (застой), оток, умерена перикорнеална хиперемия; или инфекция; ирисът реагира на светлина (вялата реакция се счита за признак на увреждане)	1
Кръвоизлив, разрушаване на нормалната структура, което е видимо макроскопски, или липса на реакция на светлина	2

Конюнктиви

Еритем (отнася се за палпебралната и булбарната конюнктива, като се изключват роговицата и ириса)	
Нормални кръвоносни съдове	0
Хиперемия на някои кръвоносни съдове	1
Дифузно кървавочервено оцветяване; отделните кръвоносни съдове са трудно различими	2
Дифузно тъмночервено оцветяване	3
Хемоза: Подуване (отнася се за конюнктивата на клепачите и/или мигателните ципи)	
Липсва подуване	0
Наличие на подуване, забелязва се известна разлика спрямо нормалното състояние	1
Ясно изразено подуване с частично обръщане на клепачите	2
Подуване със затворени приблизително наполовина клепачи	3
Подуване със затворени повече от наполовина клепачи	4

Б.6. КОЖНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Забележки:

Чувствителността и способността на методите за изпитване да откриват потенциалните сенсибилизатори на кожата при човека се смятат за много важни в системата за класифициране на токсичността по отношение за здравето на хората.

Не съществува единствен метод за изпитване, който би могъл да идентифицира адекватно всички вещества с потенциално сенсибилизиращо действие за човешката кожа и който да е подходящ за всички видове вещества.

При избора на метода трябва да се вземат предвид такива фактори като физичните свойства на веществото, включително и неговата способност да прониква през кожата.

Разработени са два вида изпитвания с морски свинчета: изпитвания с адювант, при които алергичното състояние се засилва чрез разтваряне или суспендиране на изпитваното вещество в пълния адювант на Фройнд (FCA) и изпитвания без адювант.

Изпитванията с адювант се предпочитат, защото изглежда са по-точни в предвиждането на вероятните ефекти на кожно сенсибилизиране, които дадено вещество може да има при хората, отколкото изпитванията без използване на FCA.

Изпитването чрез максимално натоварване при морски свинчета (GPMT = Guinea-Pig Maximisation Test) е един широко използван метод с адювант. Въпреки, че могат да се използват и някои други методи за улавяне на потенциала на едно вещество да предизвиква реакция на кожна свръхчувствителност, GPMT се счита за най-предпочитаната техника с използване на адювант.

За много класове от химични вещества методите без адювант (предпочитаният метод е този на Buehler) се смятат за по-ниско чувствителни.

При някои случаи, може да има основателни причини да се избере теста на Buehler, включващ локално прилагане, а не подкожно инжектиране, както е при метода чрез максимално натоварване на морски свинчета. Когато се използва теста на Buehler, трябва да се представи научна обосновка за това.

В настоящия метод са описани както GPMT, така и теста на Buehler. Могат да се използват и други видове изследвания в случай, че те са утвърдени и може да се даде добра научна обосновка за приложението им.

Ако в рамките на утвърдено изпитване за отсяване се получат положителни резултати, изпитваното вещество може да се отбележи като потенциален сенсибилизатор и провеждането на повече изпитвания с морски свинчета може да се окаже излишно. В случай, че при такова изпитване се получи отрицателен резултат, трябва да се проведе изпитването с морските свинчета, като се използва описаната при този метод процедура.

Виж също Общо въведение, Част Б(А).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Виж Общо въведение, Част Б (Б)

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Следните вещества, разредени както е необходимо, се препоръчват, както и всяко друго сенсибилизиращо вещество, известно от литературата или което принадлежи към групата на изпитваното вещество.

- р-фенилендиамин	CAS № 106-50-3
- 2,4-динитрохлорбензен	CAS № 97-00-7
- калиев дихромат	CAS № 7778-50-9
- неомицин сулфат	CAS № 1405-10-3
- никелов сулфат	CAS № 7786-81-4

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

След първоначална експозиция на изпитваното вещество (период на „индукция“) животните се подлагат след около две седмици след последната индукционна експозиция на „предизвикваща“ експозиция на изпитваното вещество с оглед установяване дали се предизвиква състояние на свръхчувствителност. Сенсибилизацията се определя чрез изследване на кожната реакция към разрешаващата експозиция.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Метод на максималното натоварване при морски свинчета (GPMT)**

1.6.1.1. *Подготовка*

Млади здрави бели морски свинчета се подбират по случаен начин и се разпределят на опитна и контролна групи. Преди дозирането се обезкосмяват с електрическа бръсначка или чрез избръсване в областта на раменния пояс. Трябва да се внимава да не се увреди кожата.

1.6.1.2. *Условия на изпитването*

1.6.1.2.1. Опитни животни

Използват се обичайните лабораторни породи от бели морски свинчета с телесна маса под 500 г.

1.6.1.2.2. Брой и пол

Могат да се използват мъжки и/или женски животни. Ако се използват женски, те не трябва да са раждали, нито да са бременни. Опитната група се състои от минимум 10 животни, а контролната от поне 5. Използването на по-малък брой животни трябва да се обоснове. При несигурни резултати, хистопатологичното изследване може да помогне на решението дали изпитването да се повтори на друга група животни.

Когато не е възможно да се направи окончателно заключение дали изпитваното вещество е или не е сенсибилизатор, се препоръчва изпитване на допълнителни животни, на най малко 20 опитни и 10 контролни животни.

1.6.1.2.3. Нива на дозите

Концентрацията на изпитваното вещество е подбрана на такова ниво, че да предизвиква слабо изразено кожно дразнение, добре понасяно от животните във всяка индукционна фаза.

Предизвикващата концентрация трябва да бъде максималната, която не предизвиква кожно дразнение при несенсибилизираните животни.

Тези концентрации могат да бъдат определени от малко пилотно проучване (две до три животни).

1.6.1.2.4. Период на наблюдение

В периода на индукция се провеждат наблюдения за проверка на възможните ефекти на дразнение. След предизвикващата експозиция се отчитат кожните реакции 24 и 48 часа след отстраняване на пробата.

1.6.1.3. *Процедура*

Животните се претеглят преди началото и в края на изпитването. Раменната област се обезкосмява. Процедурата се състои в две фази:

1.6.1.3.1. Индукция

Ден 0 — третирана група

Следните двойки от подкожни инжекции, всяка по 0,1 ml, се поставят в раменната област, така че всяка двойка да е разположена от всяка страна на гръбнака.

Инжекция 1:	0,1 ml от пълния адювант на Фройнд (FCA) смесен с вода или физиологичен разтвор в 1:1,
Инжекция 2:	0,1 ml от изпитваното вещество при необходимост в подходящ носител,
Инжекция 3:	0,1 ml от изпитваното вещество в FCA.

При инжекция 3, разтворимите във вода вещества се разтварят в 0,05 ml вода и 0,05 ml неразтворен FCA. Когато се изпитват маслоразтворими или неразтворими вещества, те се смесват с неразтворен FCA.

При инжекция 3, крайната концентрация на изпитваното вещество трябва да е равна на тази при инжекция 2.

Инжекциите 1 и 2 се поставят близко една до друга и най-близо до главата, докато 3 се поставя към каудалната (опашната) част на почистената област.

Ден 0 — контролна група

Следните двойки подкожни инжекции се поставят на същите места като по-горе:

Инжекция 1:	0,1 ml от пълния адювант на Фройнд (FCA) смесен с вода или физиологичен разтвор в 1:1,
Инжекция 2:	0,1 ml само от носителя,
Инжекция 3:	0,1 ml от носителя в FCA.

Ден 6 — Контролна и третирана групи

Ако веществото не е кожен дразнител, мястото на изпитването след остригване и/или избръсване се нанася 0,5 ml 10 % натриев лаурилсулфат във вазелин, така че да се получи локално дразнение.

Ден 7 — третирана група

Мястото на прилагането отново се почиства от косми. Изпитваното вещество в подходящ носител (изборът на носителя трябва да се обоснове; твърдите вещества се стриват фино и се включват в подходящия носител; течностите, ако е подходящо, могат да се прилагат директно) се нанася върху филтърна хартия (2 x 4 cm) и се поставя върху полето за изпитване и контакта се осъществява чрез плътна превръзка за 48 часа.

Ден 7 — контролна група

Мястото на прилагането отново се почиства от косми. Само носителят се поставя по същия начин на изпитваната област и се държи в контакт с кожата в продължение на 48 часа посредством плътна превръзка.

1.6.1.3.2. Проба за имунен отговор (предизвикване)

Ден 21

Страничните части на тялото на третираните и контролни животни се обезкосмяват. Епикутанна проба или камера с изпитваното вещество се поставят от едната страна на третираните животни, а от другата се поставя проба или камера само с носителя.

Контактът се осъществява чрез плътно прилепваща превръзка за 24 часа.

Контролната група се третира по същия начин.

Дни 23 и 24

— 21 часа след отстраняването на пробата, областта на предизвикващата реакция се почиства и обезкосмява, ако е необходимо,

— 3 часа по-късно (48 часа след прилагането на предизвикващата доза) се наблюдава и отчита кожната реакция,

— 24 часа след това наблюдение се прави повторно наблюдение (72 часа), което също се регистрира.

За да се уточнят резултатите, получени при първото изпитване, ако е необходимо се провежда второ изпитване с нова контролна група превозни средства приблизително една седмица след първото изпитване.

1.6.1.3.3. Наблюдение и отчитане

Всички кожни реакции и необичайни прояви по време на индукцията и предизвикващата експозиция се регистрират и отчитат.

Ако е необходимо да се доизяснят съмнителни реакции или отговори, замаскирани от оцветяване с изпитваното вещество, може да се използват хистопатологични изследвания или измерване на дебелината на кожната гънка.

1.6.2. **Тест на Buehler**

1.6.2.1. *Подготовка*

Здрави, млади бели морски свинчета се подбират по случаен начин и се разпределят на опитна и контролна групи. Преди дозирането се обезкосмяват с електрическа бръсначка или чрез избръсване от едната страна на тялото. Трябва да се внимава да не се увреди кожата.

1.6.2.2. *Условия на изпитването*

1.6.2.2.1. Опитни животни

Използват се обичайните лабораторни породи от бели морски свинчета с телесна маса под 500 г.

1.6.2.2.2. Брой и пол

Могат да се използват мъжки и/или женски животни. Ако се използват женски, те не трябва да са раждали, нито да са бременни. Опитната група се състои от минимум 20 животни, а контролната от поне 10. Използването на по-малък брой животни трябва да се обоснове. При несигурни резултати, хистопатологичното изследване може да помогне на решението дали изпитването да се повтори на друга група животни.

1.6.2.2.3. Нива на дозите

Концентрацията на изпитваното вещество за всяка индукционна фаза е подбрана на най-високото ниво, което се понася от животните по отношение на системен ефект и което за дразнещите вещества предизвиква слабо до умерено изразено кожно дразнене при по-голямата част от животните. Предизвикващата концентрация трябва да бъде максималната, която не предизвиква кожно дразнене при не сенсибилизираните животни. Тези концентрации могат да бъдат определени от малко пилотно проучване (две до три животни).

1.6.2.2.4. Период на наблюдение

В периода на индукция се провеждат наблюдения за проверка на ефектите на дразнене. След предизвикващата експозиция се отчитат кожните реакции 24 и 48 часа след отстраняване на пробата, т.е. 30 и 54 часа след началото на прилагането.

1.6.2.3. *Процедура*

Животните се претеглят преди началото и в края на изпитването.

Процедурата се състои в две фази:

1.6.2.3.1. Индукция

Ден 0 — третирана група

Един от хълбоците се обезкосмява. 0,5 ml от изпитваното вещество в подходящ носител (изборът на носителя трябва да се обоснове; течностите, ако е подходящо, могат да се прилагат директно) се нанася върху памучна марля. Тя се поставя върху полето за изпитване и контакта се осъществява чрез плътна превръзка или камера за 6 часа.

Ден 0 — контролна група

Един от хълбоците се обезкосмява. Нанася се само носител по същия начин както при третираната група. Контактът с кожата се осъществява чрез плътна превръзка или камера за 6 часа.

Дни 7 и 14

Провеждат се същите прилагания както на ден 0 на същото кожно поле (почистено от косми, ако е необходимо) на ден 7 и на ден 14.

1.6.2.3.2. Предизвикване

Ден 28

Нетретираният хълбок при опитните и контролни животни се почиства от косми. Плътна, плътно прилепваща превръзка или камера, съдържаща 0,5 ml от изпитваното вещество в максимална недразнеща концентрация, се поставя в задната част на полето на третираните животни. В предната част на полето се поставя плътно прилепваща превръзка или камера само с носителя.

Плътните превръзки се държат в контакт с кожата 6 часа чрез подходяща превръзка.

Контролната група се третира по същия начин.

Дни 29 и 30

— 21 часа след отстраняването на пробата, областта на предизвикващата реакция се почиства и обезкосмява, ако е необходимо,

— три часа по-късно (30 часа от началото на предизвикващата експозиция) се наблюдава и отчита кожната реакция,

— 24 часа след това наблюдение се прави повторно наблюдение (54 часа), което също се регистрира.

1.6.2.3.3. Наблюдение и отчитане

Всички кожни реакции и необичайни прояви по време на индукцията и предизвикващата експозиция се регистрират и отчитат.

Ако е необходимо да се доизяснят съмнителни реакции или отговори, замаскирани от оцветяване с изпитваното вещество, може да се използват хистопатологични изследвания или измерване на дебелината на кожната гънка.

2. ДАННИ (GPMT и тест на BUEHLER)

Данните трябва да се оформят в табличен вид, като са показани данните за кожната реакция на всяко отделно животно при всяко наблюдение.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ (GPMT И ТЕСТ НА BUEHLER)

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО (GPMT и тест на Buehler)

Протоколът от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

— условия на изпитването,

— носител и концентрации на изпитваното вещество, използвани за индукцията и предизвикването,

— брой, възраст и пол на животните,

— индивидуални телесни маси на животните в началото на изпитването,

— всяко наблюдение направено на всяко животно включително балова система, ако е използвана,

— обсъждане на резултатите,

— интерпретация на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ (GPMT и тест на Buehler)

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Виж Общо въведение, част Б (Д).

Б.7. ТОКСИЧНОСТ (ОРАЛНА) С МНОГОКРАТНИ ДОЗИ (28 ДНИ)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (А).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Виж Общо въведение, част Б (Б).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество се въвежда орално ежедневно в точно определени дози на няколко групи опитни животни в продължение на 28 дни. По време на въвеждането животните се наблюдават ежедневно за разкриване на признаци на токсичност. Животните, умрели по време на изпитването и преживелите, убити в края на изпитването се подлагат на аутопсия.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Подготовка**

Животните са отглеждат във вивариални условия и се хранят най-малко пет дни до началото на изпитването. Преди изпитването здрави, млади плъхове се подбират по случаен начин и се разпределят в опитни групи. Изпитваното вещество може да се въвежда с диетата, със стомашна сонда или с водата за пиене. Всички животни трябва да се дозират по един и същ начин по време на целия експеримент. Ако се използва носител или друга добавка за улесняване на дозирането, те трябва да бъдат непредизвикващи токсични ефекти. Ако е необходимо се използват исторически данни.

1.6.2. **Условия на изпитването**

1.6.2.1. *Експерилентални животни*

Предпочитаният вид гризачи са плъховете, ако няма противопоказания. Трябва да се използват обичайните лабораторни породи, като се подбират млади здрави животни и дозирането трябва да започне точно преди плъховете да са на възраст шест седмици и в някои случаи да не са на възраст повече от осем седмици.

В началото на изпитването, различията в телесните маси на животните трябва да не надвишават ± 20 % от съответната средна стойност.

1.6.2.2. *Брой и пол*

За всяко ниво на дозата се използват поне по 10 животни (пет женски и пет мъжки). Женските не трябва да са раждали и бременни. Ако е планирано част от животните да бъдат убивани на междинни етапи на изпитването, то първоначалният брой животни трябва да се увеличи съответно с толкова, колкото ще бъдат убити преди края на изпитването.Освен това, съпътстваща група от 10 животни (по пет от двата пола) може да бъде третирана с високо ниво на дозата в продължение на 28 дни и наблюдавана в продължение на 14 дни след края на третирането наличие на обратимост, устойчивост или късна поява на токсичните ефекти. Използва се също и съпътстваща контролна група от 10 животни (по пет от двата пола).

1.6.2.3. *Нива на дозите*

Трябва да има поне три експериментални и една контролна група животни. С изключение на въвеждането на изпитваното вещество животните от контролната група се третират по същия начин, както и тези от експерименталните групи. Ако за въвеждането на веществото се използва носител, то контролната група трябва да получи носителя по същия начин, както в експерименталните групи и да получи същото количество носител, като това в групата, получавала най-висока доза от веществото. Най-високото ниво трябва да предизвиква токсични ефекти, но без наличие или много малко на брой смъртни случай. При най-ниското ниво не трябва да се доказват белези на токсичност. Когато има определено ниво на експозиция на хората, най-ниското изпитвано ниво трябва да го превишава. Най-добре е когато средното ниво на дозите предизвиква минимални наблюдавани токсични ефекти. Ако се използват повече от една междинни дози, нивата трябва да са на такива интервали, че да може да се получи градация на токсичните ефекти. При групите с ниска и междинна доза и при контролите, смъртността трябва да е бъде ниска с оглед смислена оценка на резултатите.

Когато изпитваното вещество се въвежда с диетата, нивото на дозата се определя или като постоянна концентрация в диетата (ppm — части на милион или mg/kg храна) или като постоянно количество спрямо телесната маса на животното; ако се използва алтернативен метод, той трябва да се опише точно. Когато веществото се прилага чрез стомашна сонда, дозата се дава по едно и също време на деня и се нагласява през интервали (седмично или на две седмици) така че да се поддържа постоянно ниво спрямо телесната маса на животното.

1.6.2.4. *Гранично изпитване*

Ако в 28-дневно изпитване проведено съгласно метода описан по-долу, ниво от 1000 mg/kg/телесна маса/дневно или по-високо ниво, свързано с възможна експозиция на хора, която е известна, не дава данни за токсични ефекти, по-нататъшно изпитване не е необходимо. За вещества с ниска токсичност е важно да се осигури въвежданите с храната количества и други свойства на включеното за изпитване вещество да не пречат на нормалните хранителни изисквания.

1.6.2.5. *Период на наблюдение*

Всички животни трябва да бъдат наблюдавани ежедневно и да се документират признаците на токсичност, включително времето на поява, степента и продължителността. Трябва да се документира времето на настъпване на смърт и времето, когато признаците на токсичност се появяват и изчезват.

1.6.3. **Процедура**

Животните се третират с изпитваното вещество ежедневно, по седем дни в седмицата за период от 28 дни. Животните от всяка съпътстваща група, предназначени за последващо наблюдение се задържат за още 14 дни без третиране, за да се установи влошаване или запазване на токсичните ефекти.

Наблюденията трябва да включват промени в кожата или козината, очите и лигавиците, както и дихателната, кръвоносната, автономната и централна нервна системи, соматомоторната активност и поведението на животните. Трябва да се правят ежеседмични измервания на консумацията на храна (и консумацията на вода, когато изпитваното вещество се въвежда с водата за пиене) и животните да се претеглят ежеседмично.

Редовните наблюдения на животните са необходими за осигуряване, колкото е възможно, на липса на загуба на животни, породена от канибализъм, разлагане на тъкани и неправилно поставяне. В края на периода на изпитване, всички преживели животни от несъпътстващите групи, се аутопсират. Животните в предсмъртно състояние или в тежко страдание или болка трябва да се отстранят, когато това се забележи, да бъдат хуманно убити и аутопсирани.

В края на изпитването на всички животни, включително и на контролните, трябва да се направят следните изследвания:

1. хематологично изследване, включващо най-малко хематокрит, концентрация на хемоглобин, брой на еритроцитите, общ брой на левкоцитите и диференциално броене и измерване на кръвосъсирващия потенциал;

2. клинична биохимия на кръвта, включваща най-малко един параметър за функциите на черния дроб и бъбреците, аланин аминотрансфераза (по-рано известна като глутамин пируватна трансаминаза), серумна аспартат аминотрансфераза (по-рано известна като глутамин оксалоцетна трансаминаза), урея, албумин, креатинин, общ билирубин и общ серумен белтък.

Други необходими изследвания, които могат да бъдат необходими за адекватна токсикологична оценка, са определяне на калций, фосфор, хлориди, натрий, калий, глюкоза на гладно, анализ на липиди, хормони, киселинно/алкалното равновесие, метхемоглобин и холинестеразната активност.

Допълнителни клинико-биохимични изследвания могат да се проведат, ако е необходимо, за да се разшири проучването на наблюдаваните ефекти.

1.6.3.1. *Аутопсия, макроскопски оглед*

Всички животни, участвали в изпитването се подлагат на пълен макроскопски оглед след аутопсия. Поне черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези и тестисите трябва да се претеглят влажни, колкото е възможно най-бързо след разрязването, за да се избегне изсъхването им. Органи и тъкани (черен дроб, бъбреци, слезка, тестиси, надбъбречни жлези, сърце и всички органи, показващи макроскопски увреждания или промени на място), трябва да се запазят в подходяща среда за възможно последващо хистопатологично изследване.

1.6.3.2. *Хистопатологично изследване*

Трябва да се направят хистопатологични изследвания на запазените органи и тъкани на животните от групата с най-високо ниво на дозата и от контролната група. Ако в групите с най-високо ниво на дозата се наблюдават поражения, свързани с третирането, трябва да се изследват и всички групи с по-ниски нива на дозиране. Животните от съпътстващите групи трябва да се изследват хистологично със специална насоченост към тези органи и тъкани, при които се намират ефекти в третираните групи.

2. **ДАННИ**

Данните трябва да се представят в таблична форма, като е отразен за всяка изпитвана група броят на животните в началото на изпитването и броя на животните, показали всеки вид увреждане.

Всички наблюдавани ефекти трябва да се оценят с подходящ статистически метод. Може да се използва всеки признат статистически метод.

3. **ДОКЛАДВАНЕ**

3.1. ДОКЛАДВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва да съдържа, ако е възможно, следната информация:

— вид, порода; източник, условия на отглеждане, диета и други,

— условия на изпитването,

— нива на дозиране (включително носителя, ако е използван) и концентрации,

— данни за токсичния отговор по пол и доза,

— ниво без ефект, когато е възможно,

— време на настъпване на смъртта в периода на изпитването или дали животните преживяват до края му,

— токсични или други ефекти,

— време на наблюдение на всяка необичайна находка и нейното последователно развитие,

— данни за храненето и телесната маса,

— използвани хематологични тестове и всички резултати от тях,

— използвани клинико-биохимични тестове и всички резултати от тях,

— находки при аутопсията,

— подробно описание на всички хистопатологични находки,

— статистическа обработка на резултатите, когато е уместно,

— обсъждане на резултатите,

— интерпретиране на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Виж Общо въведение, част Б (Д).

Б.8. ТОКСИЧНОСТ (ИНХАЛАТОРНА) С МНОГОКРАТНИ ДОЗИ (28 ДНИ)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Необходимо е да се получи предварителна информация относно размера на разпръсканите частици, парния натиск, точка на топене, точка на кипене, точка на запалване и експлозивност (ако е приложимо) на веществото.

Виж Общо въведение, част Б (А).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (Б).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Отделни групи от опитни животни се експонират на изследваното вещество в градуиращи концентрации за период от 28 дни, като за всяка група животни се използва определена концентрация. Ако е необходимо, може да се добави подходящ носител, който да улесни получаването на подходяща концентрация на веществото във въздуха в камерата. В този случай трябва да се използва контролна група експонирана на носителя. По време на експеримента, животните се наблюдават ежедневно за откриване на признаци на токсичност. Животните, починали по време на експеримента, както и тези преживели до края на опита се аутопсират.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Подготовка**

Животните се държат в условията на експериментално отглеждане и хранене най-малко пет дни преди експеримента. Преди експеримента, млади и здрави животни се подбират на случаен принцип и се разпределят съгласно изисквания брой в групи. Ако е необходимо, може да се добави подходящ носител, който да улесни получаването на подходяща концентрация на веществото във въздуха в камерата. В случай, че се използват разтворители, с оглед улесняване на дозировката, то за тях трябва да е известно, че не предизвикват токсични ефекти. Използването на данни от историческа контрола е допустимо, стига да се счете за подходящо.

1.6.2. **Условия на опита**

1.6.2.1. *Опитни животни*

Предпочитан животински вид са плъховете, освен ако няма противопоказания.

Използват се обичайните лабораторни породи и за двата пола, като в началото на опита, допустимата разлика в теглото на животните не трябва да надвишава ± 20 % от средната стойност за групата.

1.6.2.2. *Брой и пол на животните*

Най-малко 10 гризача (пет мъжки и пет женски) се използват за всяко ниво на концентрация. Женските не трябва да са раждали или бременни. Ако се предвижда убиване на животни по време на опита, групите трябва да бъдат допълнително попълнени с предвидения брой. Освен това една сателитна (допълнителна) група от 10 животни (по пет от двата пола) се експонират на най-високата концентрация от изследваното вещество в продължение на 28 дни и се наблюдават за развитие на обратими, персистиращи или по-късно проявяващи се токсични ефекти 14 дни след приключване на опита. Получените резултати се сравняват с допълнителна контролна група от десет животни (по пет от двата пола).

1.6.2.3. *Концентрации*

Използват се най-малко три концентрации и една контрола. При използване на носител, се използва и контролна група, изложена на действието на носителя в концентрация, отговарящи на концентрацията на носителя в най-високо експонираната група. С изключение на експозицията на изпитваното вещество, животните от контролните групи се отглеждат по идентичен начин на опитните. Най-високата концентрация трябва да предизвиква токсични ефекти и да не предизвиква летален изход. Ако все пак тази концентрация води до леталитет, то той трябва да бъде минимален. Най-ниската концентрация не трябва да предизвиква токсични ефекти. Теоретично междинната концентрация би трябвало да предизвиква минимални токсични ефекти. Ако се използват повече от една междинни концентрации, те трябва да позволяват отчитането на степенни разлики в токсичните ефекти. При ниските и междинните групи, както и при контролната, смъртните случаи трябва да бъдат малко, което позволява добра оценка на резултатите.

1.6.2.4. *Продължителност на въздействие*

Продължителността на експонирането трябва да е шест часа дневно, но при определени условия може да се използва и друга продължителност.

1.6.2.5. *Апаратура*

Животните трябва да се изследват с апаратура, предназначена да поддържа динамичен въздушен поток, с най-малко 12 подавания на час, с оглед осигуряването на подходящо съдържание на кислород в опитната атмосфера и равномерна експозиция в атмосферата на въздушната камера. Когато се използва въздушна камера, тя трябва да е с дизайн, който да не допуска струпването на животните и да оптимизира експонирането им на изследваното вещество. Като общо правило за осигуряване на стабилност на атмосферата, общият обем на опитните животни не трябва да надвишава 5 % от обема на камерата. Орално-назално, на цялата глава само или на цялото тяло в индивидуални клетки експониране може да се използва. Първите два способа се прилагат, когато се цели намаляване до минимум на приема на изследваното вещество чрез останалите пътища.

1.6.2.6. *Период на наблюдение*

Опитните животни се наблюдават ежедневно за признаци на токсичност по време на целия опит и на възстановителния период. Отбелязват се времето на настъпване на смъртта, както и това на появата и изчезването на токсичните ефекти.

1.6.3. **Процедура**

Животните се експонират на опитното вещество от пет до седем дни в седмицата, за период от 28 дни. Животните от всички сателитни групи се проследяват допълнително 14 дни, през които те не се третират, за отчитане на обратимостта или персистирането на токсичните ефекти. Температурата, при която се провежда опитът, трябва да се поддържа 22 ± 3 °C.

Теоретично, влажността трябва да бъде между 30 % и 70 %, но на практика това е трудно постижимо. Поддържането на леко отрицателно налягане вътре в камерата ще предотвратява изтичането на изследваното вещество в околната среда. По време на експонирането не се дават храна и вода. Използва се динамична инхалаторна система с подходяща система за аналитичен контрол на концентрацията. За определяне на подходящите концентрации се препоръчва да се направи предварителен тест. Въздушният поток трябва да бъде изчислен по начин, осигуряващ хомогенни условия за експониране в камерата. Системата трябва да осигури максимално бързото постигане на оптималните условия на опита.

Измервания или мониторинг се извършват на следните параметри:

а) ниво на въздушния поток (постоянно);

б) концентрацията на изследваното вещество в зоната на дишане най-малко три пъти по време на експонирането. Концентрацията не трябва да варира повече от ± 15 % от средната стойност по време на експонирането. При някои аерозоли обаче е допустимо отклонение от тази величина. По време на експеримента концентрациите в камерите трябва да се поддържат постоянни. Задължително трябва да се прави анализ на размера на частиците поне веднъж седмично за всяка изследвана концентрация;

в) температурата и влажността(постоянно, при възможност).

По време и след експонирането, се провеждат наблюдения, които систематично се записват. Всяко животно се проследява индивидуално. Всички животни се наблюдават ежедневно, като установените признаци на токсичност се записват включително времето на тяхната поява, тежест и продължителност. Наблюденията трябва да включват промени в кожата, козината, очите, лигавиците, дишането, кръвообращението, вегетативната и централната нервна система, двигателната активност и начина на поведение. Телесната маса трябва да бъде измервана веднъж седмично. Препоръчва се консумацията на храна да се измерва веднъж седмично. Редовните наблюдения на животните са необходими, за да се осигури, че животните не са отпаднали от експеримента в резултат на канибализъм, автолиза или неправилно разположение в камерите. В края на експеримента всички животни от не сателитните групи се аутопсират. Болните животни, животните показали признаци на силна болка или стрес трябва да бъдат отстранявани от експеримента веднага щом бъдат забелязани, хуманно убити и аутопсирани.

В края на опита, на всички животни, включително и контролните, се провеждат следните изследвания:

1. хематологични: хематокрит, концентрация на хемоглобин, общ брой еритроцити, общ и диференциален брой левкоцити, кръвосъсирващ потенциал;

2. клинико-лабораторни и биохимични, които включват определянето в кръв най-малко един от параметрите за чернодробна и бъбречна функции; аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, уреа, албумин, креатинин, общ билирубин, и общ белтък.

При необходимост за адекватна токсикологична оценка, могат да се проведат и други изследвания, като определяне на калций, фосфор, хлориди, калий, глюкоза, липиди, хормони, основи/бази баланс, метхемоглобин и активност на холинестераза.

Допълнителни клинико-биохимични изследвания могат да се проведат, ако е необходимо, за да се разшири проучването на наблюдаваните ефекти.

1.6.3.1. *Макроскопски оглед*

Всички животни участвали в опита се подлагат на пълен макроскопски оглед. Черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези, белите дробове и тестисите се претеглят веднага след аутопсията, за да се избегне изсъхването им. Органи и тъкани (респираторен тракт, черен дроб, бъбреци, слезка, тестиси, надбъбречни жлези, сърце и всички други органи показващи големи патологични изменения или промени в размера) се съхраняват в подходяща среда с оглед евентуални бъдещи хистопатологични изследвания. Белите дробове, трябва да се извадят невредими, да се претеглят и третират с подходящ фиксатор за запазване на структурата им.

1.6.3.2. *Хистопатологични изследвания*

Хистопатологични изследвания се провеждат върху фиксирани органи и тъкани от контролата и опитната група, експонирана на най-високата концентрация. Органите и тъканите, при които се установяват изменения, дължащи се на изпитваното вещество, се изследват и при животните от групите, третирани с по-ниска концентрация. Животните от сателитните групи също се изследват хистологично, като се обръща внимание на органите и тъканите, показали изменения при другите групи.

2. **ДАННИ**

Данните се представят в таблична форма, като се посочва броят на животните във всяка група в началото на опита и броят на животните с всеки отделен вид увреждане.

Всички получени резултати се обработват с подходящ статистически метод. Всички признати статистически методи могат да бъдат използвани.

3. ДОКЛАДВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

По възможност, протоколът от изпитването трябва да съдържа:

— вид, порода, източник, околна среда, хранителен режим и други,

— опитни условия, като:

Описание на апаратурата, включително вид, тип, размери, източник на въздухоподаване, система за генериране на аерозолите, метод на отглеждане на животните, както и разполагането им в камерата. Трябва да се опише апаратурата за измерване на температурата, влажността и аерозолната концентрация.

Данни за експонирането:

Данните за експонирането трябва да бъдат отразени в таблици, представени със средни стойности и отклонения. Таблиците трябва да съдържат:

а) дебит на въздушния поток през апаратурата за инхалации;

б) температура и влажност на въздуха;

в) номинални концентрации (общото количество на изпитваното вещество, подадено в инхалационната апаратура, разделено на обема на въздуха);

г) природа на носителя (ако е използван);

д) действителни концентрации в зоната на дишане;

е) масовия медианен аеродинамичен диаметър (MMAD) и геометричното стандартно отклонение (GSD);

— данни за отговора на токсичното въздействие по пол и концентрация,

— време на смъртта през периода на изпитването или дали животните са преживели до края,

— описание на токсичните или други ефекти; ниво, при което няма ефекти,

— времето, в което е забелязан всеки аномален признак и неговото следващо развитие,

— данни за храната и телесната маса,

— използвани хематологични анализи и резултатите от тях,

— клинични биохимични анализи и резултатите от тях,

— находки при аутопсията,

— детайлно описание на всички хистопатологични находки,

— статистическа обработка на резултатите (където е възможна),

— обсъждане на резултатите,

— интерпретиране на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. ПОЗОВАВАНИЯ

Виж Общо Въведение, част Б (Д).

Б.9. ТОКСИЧНОСТ (ДЕРМАЛНА) С МНОГОКРАТНИ ДОЗИ (28 ДНИ)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж Общо въведение, Част Б (А).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Виж Общо въведение, Част Б (Б).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество се прилага ежедневно в продължение на 28 дни върху кожата, в нарастващи дози при няколко групи експериментални животни, като за всяка група се използва по една доза. По време на експозицията, животните се наблюдават всеки ден за появата на симптоми на токсичното действие. Животните, умрели по време на изпитването се подлагат на аутопсия, а преживелите се аутопсират в края на изпитването.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Подготовка**

Животните се настаняват и хранят в лабораторни условия най-малко пет дни преди началото на изпитването. Преди изпитването, млади здрави животни се избират по случаен начин и (също случайно) се разпределят на експериментални и контролни групи. Малко преди началото на изпитването се подстригва козината по гръбната част на тялото. Козината може и да се обръсне, но това се прави около 24 часа преди изпитването. Обикновено се налага ежеседмично подстригване или бръснене на козината, като се внимава да не се охлузи кожата. За прилагането на изпитваното вещество трябва да се почистят не по-малко от 10 % от повърхността на тялото. За точното определяне на площта от тялото, която трябва да се почисти от косми, а също и на размера на покритието, е необходимо да се взема предвид телесната маса на животното. При изпитването на твърди вещества (които могат да се стрият до прахообразно състояние, ако се сметне за необходимо), изпитваното вещество трябва добре да се намокри с вода или с подходящ носител, което осигурява добър контакт с кожата. Течните вещества по принцип се прилагат без разреждане. Веществото се прилага ежедневно по пет до седем дена в седмицата.

1.6.2. **Условия на изпитване**

1.6.2.1. *Опитни животни*

Може да се използват зрели плъхове, зайци или морски свинчета. Употребата на други видове е също възможна, но трябва да се обоснове.

В началото на изпитването, интервалът в който варират масите на животните не бива да е по-голям от ± 20 % от съответната средна стойност.

1.6.2.2. *Брой и пол*

При всяко ниво на дозиране се използват най-малко 10 животни (пет женски и пет мъжки) със здрава кожа. Женските не бива да са раждали, нито да са бременни. Ако е планирано част от животните да бъдат убивани на междинни етапи от експеримента, първоначалният брой животни трябва да се увеличи с толкова, колкото ще бъдат убити преди края на изпитването. Освен това, „сателитна“ група от 10 животни (по пет от двата пола) може да се третира с високо ниво на дозата за 28 дни. В продължение на 14 дни след това при тази група се провеждат наблюдения за случаи на обратимост, задържане или забавяне на токсичните ефекти. Използва се също и сателитна контролна група от 10 животни (по пет от двата пола).

1.6.2.3. *Нива на дозите*

Необходими са най-малко три нива на дозите и една контрола или контрола с носител (ако е използван носител). Експозиционният период трябва да бъде поне по шест часа на ден. Прилагането на изпитваното вещество трябва да става по едно и също време на деня; интервалите между експозициите се регулират (на една или две седмици), така че да се поддържа постоянно ниво на дозата спрямо телесната маса на животните. Животните от контролната група се третират по същия начин, както и тези от експерименталните групи с тази разлика, че при тях не се прилага изпитваното вещество. Когато за улесняване на дозирането е използван носител, животните от контролната група се третират с носителя по същия начин, както и животните от третираните групи, като количеството на приложения носител съвпада с това, получавано от групата с най-високо ниво на дозата. Най-високото ниво на дозиране трябва да води до появата на токсични ефекти, но не и (или не в големи размери) да предизвиква смъртта на животните. При най-ниското ниво на дозата не бива да се наблюдават никакви признаци на токсично действие. Когато съществува използваема оценка за експозицията при хора, най-ниското ниво трябва да я надвишава. В идеалния случай, междинното ниво на дозата трябва да води до минимални видими токсични ефекти. Ако се използват повече от една междинни дози, то техните нива трябва да са правилно разпределени в количествено отношение, така че да се получи градация на токсичните ефекти. Случаите на смърт в групите с ниско и междинно ниво на дозата, както и в контролните групи, трябва да са минимален брой, което би позволило съдържателна оценка на резултатите.

Ако прилагането на изпитваното вещество предизвиква силно дразнене на кожата, концентрациите се намаляват, което може да доведе до намаление или отсъствие на другите ефекти от токсичното действие при високи нива на дозата. Нещо повече, ако кожата е силно разранена, то е необходимо изпитването да се прекрати и да се предприеме нов опит при по-ниски концентрации.

1.6.2.4. *Гранично изпитване*

Ако предварителното изпитване при ниво на дозата 1000 mg/kg или при по-висока доза, свързана с възможна експозиция на хора (ако е известна), не доведе до токсични ефекти, то повече изпитвания могат да се смятат за излишни.

1.6.2.5. *Период на наблюдение*

Експерименталните животни се наблюдават всеки ден за симптоми на токсичното действие. Записват се времето на смъртта, както и времената на поява и изчезване на симптомите.

1.6.3. **Процедура**

Животните трябва да се разположат в индивидуални клетки. Третирането с изпитваното вещество в идеалния случай става по седем дни в седмицата в продължение на 28 дни. Животните от всички сателитни групи, предназначени за продължителни наблюдения, се оставят без третиране още 14 дни, при което се проследява възстановяването от токсичните симптоми или тяхното устойчиво задържане. Времето за експозиция трябва да бъде поне шест часа на ден.

Изпитваното вещество се прилага на равномерен слой върху площ, приблизително 10 % от телесната повърхност. При вещества с висока токсичност, покритата площ може да бъде и по-малка, но във всички случаи тя трябва да се покрие с колкото е възможно по-тънък и равномерен пласт.

По време на експозицията, изпитваното вещество се задържа в контакт с кожата с помощта на марлена превръзка и лепенка, която не дразни кожата. Мястото на прилагане на веществото се покрива допълнително по подходящ начин, така че превръзката и веществото да се задържат стабилно и, освен това, да се предотврати поглъщането на веществото от животното. За целта могат да се използват приспособления за ограничаване на движенията, но пълното обездвижване не се препоръчва. Може да се използва и „защитен обездвижващ нашийник“.

В края на периода на експозиция, останалото изпитвано вещество се отстранява, ако може с вода, или кожата се почиства по друг подходящ начин.

Провежда се ежедневно наблюдение на всички животни и симптомите на токсичното действие се записват заедно с времето на появата им, тяхната острота и продължителност. Наблюденията трябва да включват изменения в кожата и козината, очите и лигавиците, както и промените в дихателната, кръвоносната, автономната и централната нервна система, соматомоторната активност и поведението. Масата на животните трябва да се измерва всяка седмица. Препоръчва се също всяка седмица да се измерва и консумацията на храна. Редовното наблюдаване на животните е необходимо и за да се избегне загубата на животни по такива причини като канибализъм, автолиза на тъканите или неправилно положение в клетката. В края на проучвателния период, всички оцелели животни от основните (не сателитните) третирани групи се подлагат на аутопсия. Умиращите животни, както и животните с признаци на тежък стрес или болка трябва да се отстраняват от изпитването в момента, в който са забелязани, да бъдат убивани безболезнено и подлагани на аутопсия.

Изброените по-долу анализи се правят в края на теста на всички животни, включително тези от контролните групи:

1. хематологични анализи, които да включват най-малко хематокрит, концентрация на хемоглобина, брой на еритроцитите, общо и диференциално броене на левкоцитите и измерване потенциала на съсирване;

2. клинична биохимия на кръвта, в това число поне по един параметър за чернодробна и бъбречна функция: серумна аланин аминотрансфераза (първоначално известна като глутамат пируват трансаминаза), серумна аспартат аминотрансфераза (първоначално позната като глутамат оксалоацетат трансаминаза), карбамиден азот, албумин, кръвен креатинин, общ билирубин и общ белтък в серума;

Други анализи, които може да са необходими за правилната токсикологична оценка са следните: калций, фосфор, хлориди, натрий, калий, глюкоза при гладуване, анализ на липиди, хормони, киселинно-основен баланс, метхемоглобин и холинестеразна активност.

Когато е необходимо, за разширяване на изпитванията върху наблюдаваните ефекти, може да се включат и допълнителни клинични биохимични анализи.

1.6.4. **Аутопсия**

Всички животни, участвали в изпитването, трябва да се подложат на пълна макроскопска аутопсия. Най-малко черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези и тестисите се претеглят във влажно състояние, колкото е възможно по-бързо след дисекцията (така че да не изсъхват). Някои органи и тъкани, т.е. нормална и третирана кожа, черен дроб, бъбрек, слезка, тестиси, надбъбречни жлези, сърце и критични органи (т.е. онези органи, които показват видими поражения или изменения в размерите) трябва да се запазят в подходяща среда за възможно бъдещо хистопатологично изпитване.

1.6.5. **Хистопатологично изпитване**

В групата с високо ниво на дозата, както и в контролната група се правят хистопатологични изпитвания на запазените органи и тъкани. Органите и тъканите, които показват дефекти, свързани с действието на изпитваното вещество при най-високата доза, трябва да се изпитват и във всички групи с по-ниски нива на дозиране. При хистологичното изпитване на животните от сателитната група особено ударение се поставя върху онези органи и тъкани, при които са наблюдавани ефекти в останалите третирани групи.

2. **ДАННИ**

Данните се обобщават в таблична форма, като за всяка изпитвана група се дава броят на животните в началото на изпитването и броят на животните, показали различните видове увреждания.

Всички наблюдавани резултати се обработват с подходящ статистически метод. Може да се използва всеки от общоприетите статистически методи.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва, по възможност да съдържа следната информация:

— данни за животните (вид, порода, източник, условия на средата, диета и др.),

— условия на изпитване (включително видът на превръзката: плътно прилепваща или не-оклузивна),

— нива на дозиране (в това число и носителя, ако е използван) и концентрации,

— когато е възможно, се указва и нивото, при което не се наблюдават ефекти,

— данни за отговора на токсичното действие по пол и доза,

— време на смъртта в процеса на изпитването или дали животните са преживели до края на изпитването,

— токсични или други ефекти,

— време на наблюдаване на всеки аномален признак и неговото следващо развитие,

— данни за храната и телесната маса,

— използвани хематологични анализи и резултатите от тях,

— използвани клинични биохимични анализи и резултатите от тях,

— находки при аутопсията,

— детайлно описание на всички хистопатологични находки,

— статистическа обработка на резултатите (когато е възможна),

— обсъждане на резултатите,

— интерпретиране на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Виж Общо въведение, част Б (Д).

Б.10. МУТАГЕННО ДЕЙСТВИЕ („IN VITRO“ ЦИТОГЕНЕТИЧЕН ТЕСТ ВЪРХУ БОЗАЙНИЦИ)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (A).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (B).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

„In vitro“ цитогенетичният тест е ускорен тест за изпитване на мутагенно действие, с който се разкриват структурни хромозомни аберации в култивирани клетки от бозайници. Използват се както култури от перманентни клетъчни линии, така и първични клетъчни култури. След експониране на изпитваното химично вещество в присъствието и без наличието на подходяща метаболитно активираща система, клетъчните култури се третират с инхибитори на митотичното вретено, като колхицин, за натрупване на клетки на етап от митотичния цикъл, наподобяващ метафазата (с-метафаза). Клетките се събират на подходящи периоди за изготвяне на метафазни хромозомни препарати. Препаратите се оцветяват и метафазните клетки се анализират за хромозомни аберации.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Подготовка**

1.6.1.1. *Клетки*

Използват се перманентни клетъчни линии или първични клетъчни култури, т.е клетки от китайски хамстери и човешки лимфоцити. Преди третирането на клетките, изпитваните вещества се разтварят в културалната среда или в подходящи носители.

1.6.1.2. *Метаболитно активираща система*

Клетките трябва да бъдат експонирани на изпитваното вещество както в присъствието, така и без наличието на подходяща метаболитно активираща система. Най-широко използваната система е обогатената с кофактори, постмитохондриална фракция, приготвена от черен дроб на гризачи, третирани с ензимни индуктори.

1.6.2. **Условия за провеждане на метода**

Брой култури

За всеки етап от експерименталната постановка се използват най-малко дупликатни култури.

Използване на негативни и позитивни контроли:

Като негативни контроли се използват културите, експонирани на разтворителя (в случаите когато разтворителят не е културална среда или вода), чернодробната ензимно активираща смес, чернодробната ензимно активираща смес и разтворителя, и нетретираните контроли.

Във всеки експеримент се включва позитивна контрола. В случаите, когато за активиране на изпитваното вещество се използва чернодробна ензимно активираща смес, като позитивна контрола трябва да се използва вещество, за което е известна необходимостта от метаболитна активация.

Дози:

Прилагат се най-малко три дози от изпитваното вещество с не по-малко от 1,0 log интервал между дозите. Най-високата доза трябва да потиска приблизително с 50 % митотичната активност или да показва други признаци за цитотоксичност. Нетоксичните изпитвани вещества трябва да се тестват до лимита на разтворимост или до максимална концентрация от 5 mg/ml.

Условия за култивиране:

Използват се подходящи културална среда и условия за инкубиране (т.е. температура, използвани културални съдове, CO_2 концентрация и влажност).

1.6.3. **Процедура**

1.6.3.1. *Подготовка на културите*

Перманентни клетъчни линии: Клетките се получават от съхраняваните перманентни култури чрез трипсинизация или разклащане, посяват се в културални съдове при подходяща плътност и се инкубират при 37 °C.

Човешки лимфоцити: Хепаринизирана цяла кръв се добавя към културалната среда, съдържаща фитохемаглутинин, фетален телешки серум и антибиотици, и се инкубира при 37 °C.

1.6.3.2. *Третиране на културите с изпитваното вещество*

i) Третиране без наличието на чернодробна ензимно активираща смес

При възможност, всяко третиране трябва да обхваща най-малко периода на един пълен клетъчен цикъл и схемите на фиксация трябва да осигуряват анализ на първите след третирането митози на клетки, експонирани през различни етапи на клетъчния цикъл.

Когато третирането не обхваща продължителността на един пълен клетъчен цикъл, периодите на фиксиране се подбират с оглед получаването на проби клетки на различни етапи от клетъчния цикъл по време на третирането, т.е. G_1, S и G_2.

Изпитваното химично вещество се добавя към културите от перманентните клетъчни линии през експоненциалната фаза на растеж. Човешките лимфоцитни култури се третират през периода на полу-синхронен статус.

ii) Третиране в присъствието на чернодробна ензимно активираща смес

За целите на третирането, изпитваното вещество в комбинация с активиращата система трябва да присъства за възможно най-продължителен период от време, без да оказва токсичен ефект върху клетките. Ако поради причини на токсичност, това третиране не обхваща продължителността на целия клетъчен цикъл, периодите на фиксация се подбират с оглед получаването на проби от клетки, които са били на различни етапи от клетъчния цикъл по време на третирането, т.е. G_1, S и G_2.

Получаване на клетки:

Клетъчните култури се третират с инхибитор на митотичното вретено за един подходящ период от време преди получаването на клетките. За изготвянето на хромозомни препарати всяка клетъчна култура се обработва отделно. Необходимо е наличието най-малко на два периода за получаване на клетки. Препоръчва се единият от тях да бъде приблизително след приключването на един клетъчен цикъл, а другият – по-късно, за да се обхванат всички етапи на клетъчния цикъл, включително и при неговото забавяне.

1.6.3.3. *Хромозомни препарати*

Изготвянето на хромозомни препарати включва хипотонична обработка на клетките, фиксация, разстилане върху предметни стъкла и оцветяване.

Анализ

Най-малко 100 добре разпръснати метафази от всяка култура се анализират за хромозомни аберации. Преди анализа, препаратите се кодират. При култивираните човешки лимфоцити се анализират само метафази, съдържащи 46 центромери.

При перманентните клетъчни линии се анализират само метафазите, съдържащи ± 2 центромери от модалния им брой.

В допълнение, за всяка изпитвана доза с теста трябва да се оцени митотичният индекс, или когато е подходящо, някой друг показател за цитотоксичност.

2. ДАННИ

Резултатите се представят в таблична форма. Хроматидният тип аберации (гепове, брейкове, обмени), хромозомният тип аберации (т.е. гепове, брейкове, минитс, рингове, дицентрици, полицентрици) и броят на аберантните метафази (с и без гепове) се посочват отделно за всички третирани и контролни култури.

Резултатите се обработват с подходящи статистически методи.

Резултатите от изпитването трябва да бъдат сравнени с данните от успоредните негативни контроли.

Провеждат се най-малко два независими експеримента. И един експеримент може да е достатъчен, в случай, че може да се обоснове научно. Не е необходимо вторият експеримент да бъде проведен идентично на първия. За получаването на по-полезни данни, се предпочита промяна в някои от параметрите на теста.

3. ДОКЛАДВАНЕ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от проведеното изпитване трябва, при възможност, да включва следната информация:

— използвани клетки,

— условия за провеждане на метода: състав на средата, CO_2 концентрация, температура при инкубацията, време за инкубиране, изпитвани дози, продължителност на третирането, продължителност на третирането с използвания инхибитор на митотичното вретено и концентрацията му, тип на използваната чернодробна ензимно активираща смес, позитивни и негативни контроли,

— брой клетъчни култури,

— брой анализирани метафази (данните се посочват отделно за всяка култура),

— митотичен индекс или друг показател за цитотоксичност,

— тип и брой аберации, посочени отделно за всяка третирана и контролна култура; модален брой хромозоми за използваните перманентни клетъчни линии,

— статистически анализ,

— обсъждане на резултатите,

— интерпретация на резултатите,

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. ПОЗОВАВАНИЯ

Виж Общо въведение, част Б (Д).

Б.11. МУТАГЕННО ДЕЙСТВИЕ („IN VIVO“ ЦИТОГЕНЕТИЧЕН ТЕСТ В КОСТЕН МОЗЪК НА БОЗАЙНИЦИ, ХРОМОЗОМЕН АНАЛИЗ)

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (А).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (В).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Този „in vivo“ цитогенетичен тест е ускорен метод за изпитване на мутагенно действие, с който се разкриват структурни хомозомни аберации. Хромозомните аберации обикновено се оценяват в първите митози след третирането. Основната част хромозомни аберации, индуцирани от химични мутагени, са от хроматиден тип.

Този метод използва клетки от костен мозък на бозайници, които се експонират на изпитваните химични вещества чрез подходящи пътища на въвеждане и се убиват на последователни интервали след експозицията. Преди да бъдат убити, експерименталните животни се третират допълнително с инхибитор на митотичното вретено, като колхицин, с цел натрупване на клетки на наподобяващ метафазата етап от митозата (с-метафаза). От костно-мозъчните клетки се изготвят хромозомни препарати, които след изсушаване на въздух се оцветяват и метафазите се анализират микроскопски за хромозомни аберации.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Подготовка**

Изпитваните вещества се разтварят във физиологичен разтвор. Неразтворимите вещества се разтварят или суспендират в подходящи носители.

Използват се прясно приготвени разтвори на изпитваното вещество. В случай на използване на носител за подпомагане на въвеждането на изпитваните дози, той не трябва да взаимодейства с изпитваното вещество или да проявява токсични ефекти.

1.6.2. **Условия за провеждане на изпитването**

1.6.2.1. *Експерилентални животни*

Използват се следните видове гризачи – плъхове, мишки или китайски хамстери. Здрави, млади, полово зрели животни се разпределят по случаен начин в опитни и контролни групи.

1.6.2.2. *Брой и пол*

Опитните и контролни групи се състоят от най-малко пет женски и пет мъжки животни в група. Така, в случай, че експерименталната постановка включва няколко периода на пробовземане след третирането, на всеки период ще се убиват по десет животни за група.

За позитивната контролна група е достатъчно наличието на един период на пробовземане.

1.6.2.3. *Път на въвеждане*

Обикновено, изпитваните вещества би трябвало да се въвеждат само еднократно. При наличие на токсикологична информация, може да се използва режим на многократно третиране, но само при условие че изпитваното вещество не проявява цитотоксични ефекти върху костния мозък. Най-често използваните пътища на въвеждане са през устата и с интраперитонеално инжектиране. В определени случаи, могат да са подходящи и други пътища на въвеждане.

1.6.2.4. *Използване на негативни и позитивни контроли*

Като позитивна контрола се използва вещество, за което е известно, че индуцира хромозомни аберации „in vivo“. В схемата на всеки експеримент се включва също така и негативна (за разтворител) контролна група.

1.6.2.5. *Изпитвани дози*

При използване на метода, в основната батерия методи за мутагенно действие изпитваното вещество се прилага в една доза, която е максимално поносимата доза или доза, предизвикваща проява на цитотоксичност, като частично инхибиране на митозата.

За нетоксичните вещества максималната (лимит) доза, която трябва да се изпитва при еднократно въвеждане е 2000 mg/kg телесна маса.

При режим на многократно въвеждане лимит дозата е 1000 mg/kg телесна маса дневно.

Допълнителни дози могат да бъдат използвани при наличие на научна обосновка.

При използване на метода за проверка, се изпитват още най-малко две допълнителни дози.

1.6.3. **Процедура**

Изпитването може да бъде проведено по два начина:

i) Животните се третират еднократно с максимално поносимата доза на изпитваното вещество. В първия случай, проби се взимат 24 часа след третирането. Ако на този етап резултатите са отчетливо позитивни, необходимостта от следващо пробовземане може да отпадне. В случай обаче на негативни или двусмислени резултати, с оглед на възможността от въздействие на изпитваното вещество върху кинетиката на клетъчния цикъл, се включват един по-ранен и един по-късен периоди на пробовземане, адекватно разпределени в интервала от 6 до 48 часа.

   При изпитване на допълнителни дози проби трябва да се взимат през периода на повишена чувствителност, или ако няма такава информация — 24 часа след третирането.

ii) Режим на многократно третиране може да се използва по показания на базата на данни за фармакокинетиката и метаболизма на изпитваното вещество, като проби се взимат 6 и 24 часа след последното третиране.

Изготвяне на костно-мозъчни препарати

Преди убиването животните се инжектират интраперитонеално с подходяща доза на инхибитор на митотичното вретено с цел получаването на адекватен брой клетки в с-метафаза. Костен мозък се получава от двете феморални кости чрез промиване с изотоничен разтвор, непосредствено след убиването на животните. След подходяща хипотонична обработка, клетките се фиксират, след това се разстилат върху предметни стъкла. След изсушаване на въздух, препаратите се оцветяват.

Анализ

Препаратите се кодират преди микроскопския анализ. Най-малко 50 добре разпръснати метафази с пълен брой центромери се анализират от всяко животно за структурни хромозомни аберации. В допълнение, за всяко животно се определят митотичните индекси.

2. **ДАННИ**

Данните се представят в таблична форма. Хроматидният и изохроматидният тип аберации (гепове, брейкове, обмени) и митотичните индекси, в случаите когато са определени, се посочват отделно за всички третирани и контролни животни. Посочват се също така среден брой и стандартни отклонения за всяка експериментална и контролна група. Данните се анализират с подходящи статистически методи.

3. **ДОКЛАДВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от проведеното изпитване трябва, при възможност, да включва следната информация:

— вид, линия и възраст на използваните животни,

— брой животни за всеки пол в опитните и контролни групи,

— условия за провеждане на метода: детайлно описание на режимите на третиране и пробовземане, изпитвани дози, продължителност на третирането и концентрация на използвания инхибитор на митотичното вретено,

— брой анализирани метафази на животно,

— митотични индекси, в случаите когато са определени,

— тип и брой аберации, посочени отделно за всяко опитно и контролно животно,

— признаци на токсичност в хода на изпитването,

— статистически анализ,

— обсъждане на резултатите,

— интерпретация на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Виж Общо въведение, част Б (Д).

Б.12. МУТАГЕННО ДЕЙСТВИЕ (МИКРОНУКЛЕУС ТЕСТ (С МИКРОЯДРА)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (А).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (В).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Микронуклеус тестът е ускорен „in vivo“ тест върху бозайници за разкриване на хромозомни нарушения или увреждане на митотичния апарат от химични вещества. Този метод се основава на повишаването на честотата на микронуклеусите в полихроматофилните еритроцити при третираните животни в сравнение с контролите.

Микронуклеусите се формират от хромозомни фрагменти или цели хромозоми, които изостават в хода на митозата. При развитието на еритробластите в еритроцити главното ядро се изхвърля, докато микронуклеусът може да остане в цитоплазмата. В този метод се използват незрели полихроматофилни еритроцити от костен мозък на лабораторни бозайници, които са експонирани на изпитваните вещества чрез подходящи пътища на въвеждане. След екстракция на костния мозък, се изготвят и оцветяват костно-мозъчни натривки. Полихроматофилните еритроцити се анализират микроскопски за микронуклеуси и се определя съотношението на полихроматофилните към нормохромните еритроцити.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Подготовка**

Изпитваните вещества се разтварят в изотоничен разтвор. Неразтворимите вещества се разтварят или суспендират в подходящи носители. Ако се използва носител, той не трябва да взаимодейства с изпитваното вещество или да предизвиква токсични ефекти. Обикновено се използват прясно приготвени разтвори на изпитваното вещество.

1.6.2. **Условия за провеждане на изпитването**

1.6.2.1. *Експериментални животни*

Препоръчват се мишки, но могат да се използват и други видове бозайници. Здрави, млади, полово зрели животни се разпределят по случаен начин в опитни и контролни групи.

1.6.2.2. *Брой и пол*

Опитните и контролни групи се състоят от най-малко пет женски и пет мъжки животни в група. Така, в случай, че експерименталната постановка включва няколко периода на пробовземане след третирането, на всеки период ще се убиват по десет животни за група. За позитивната контролна група е достатъчно наличието на един период на пробовземане.

1.6.2.3. *Път на въвеждане*

Обикновено, изпитваните вещества би трябвало да се въвеждат само еднократно. При наличие на токсикологична информация може да се използва режим на многократно третиране, но само при условие че изпитваното вещество не проявява цитотоксични ефекти върху костния мозък. Най-често използваните пътища на въвеждане са през устата и с интраперитонеално инжектиране. В определени случаи, могат да са подходящи и други пътища на въвеждане.

1.6.2.4. *Използване на негативни и позитивни контроли*

Всеки експеримент трябва да включва позитивни и негативни (за разтворител) контроли.

1.6.2.5. *Изпитвани дози*

При използване на метода за мутагенно действие изпитваното вещество се прилага в една доза, която е максимално поносимата доза или доза, предизвикваща проява на цитотоксичност, като промяна в съотношението на полихроматофилните към нормохромните еритроцити.

За нетоксичните вещества максималната (лимит) доза, която трябва да се изпитва при еднократно въвеждане е 2000 mg/kg телесна маса.

При режим на многократно въвеждане лимит дозата е 1000 mg/kg телесна маса дневно.

Допълнителни дози могат да бъдат използвани при наличие на научна обосновка.

При използване на метода за проверка се изпитват още най-малко две допълнителни дози.

1.6.3. **Процедура**

Изпитването може да бъде проведено по два начина:

i) Животните се третират с изпитваното вещество еднократно. Периодите на пробовземане трябва да съвпадат с максималния отговор на метода, който варира за отделните изпитвани вещества. Следователно, проби от костен мозък се вземат най-малко двукратно, като пробовземането започва не по-рано от 12 часа след третирането и не надхвърля 48 часа.

   При изпитване на допълнителни дози, проби трябва да се взимат през периода на повишена чувствителност, или ако няма такава информация – 24 часа след третирането.

ii) Режим на многократно третиране може да се използва по показания на базата на данни за фармакокинетиката и метаболизма на изпитваното вещество, като проби трябва да се взимат еднократно, не по-рано от 12 часа след последното третиране.

Изготвяне на костно-мозъчни препарати

Костен мозък се получава от двете феморални кости чрез промиване с изотоничен разтвор, непосредствено след убиването на животните. Клетките се утаяват чрез центрофугиране и плаващите отгоре клетки се изхвърлят. Капки от хомогенната клетъчна суспензия се нанасят върху предметни стъкла и се изтеглят като натривки. След изсушаване на въздух, препаратите се оцветяват.

Анализ

Препаратите се кодират преди микроскопския анализ. Най-малко 1000 полихроматофилни еритроцити се анализират от всяко животно, за честота на микронуклеуси.

Съотношението на нормохромни към полихроматофилни еритроцити се определя за всяко животно въз основа на изброяването на общо 1000 еритроцити.

2. **ДАННИ**

Данните се представят в таблична форма. Броят анализирани полихроматофилни еритроцити, броят полихроматофилни еритроцити с микронуклеуси и процентът микронуклеирани клетки, както и съотношението на нормохромни към полихроматофилни еритроцити се посочват отделно за всяко опитно и контролно животно. Посочват се също така среден брой и стандартни отклонения за всяка експериментална и контролна група. Данните се анализират с подходящи статистически методи.

3. **ДОКЛАДВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от проведеното изпитване трябва, при възможност, да включва следната информация:

— вид, линия и възраст на използваните животни,

— брой животни за всеки пол в опитните и контролни групи,

— условия за провеждане на метода: детайлно описание на режимите на третиране и пробовземане, изпитвани дози, данни за токсичност, негативни и позитивни контроли,

— критерии за анализ на микронуклеуси,

— „доза-ефект“ зависимост, при възможност,

— признаци на токсичност в хода на изпитването,

— статистически анализ,

— обсъждане на резултатите,

— интерпретация на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Виж Общо въведение, част Б (Д).

Б.13. МУТАГЕННО ДЕЙСТВИЕ (ESCHERICHIA COLI — МЕТОД ЗА ОБРАТНИ МУТАЦИИ)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (A).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (B).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Escherichia coli tryptophan (trp) ревертантната система е микробиален метод, с който се отчита $trp^- \rightarrow trp^+$ реверсията при въздействието на химични вещества, които предизвикват промени на базите в генома на този организъм.

Бактериите се експонират на изпитваните химични вещества със и без метаболитна активация. След подходящ период на инкубация върху минимална хранителна среда, ревертантните колонии се изброяват и се сравняват с броя на спонтанните ревертанти при нетретираните и/или за разтворител контролни култури.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Следните методи могат да се използват за провеждане на метода: (1) метод с предварителна инкубация; и (2) директен инкорпорационен метод, при който бактерията и изпитваното вещество се смесват с повърхностния агар и се изливат върху селективен агар в петриева паничка.

1.6.1. **Подготовка**

1.6.1.1. *Бактерии*

Бактериите се култивират при 37 °C до късна експоненциална или ранна стационарна фаза на растеж. Клетъчната плътност трябва да бъде приблизително 10^8 до 10^9 клетки на cm^3.

1.6.1.2. *Метаболитна активация*

Бактериите трябва да се експонират на изпитваното вещество както в присъствието, така и без наличие на подходяща метаболитно активираща система. Най-широко използвана система е обогатената с кофактори постмитохондриална фракция, приготвена от черен дроб на гризачи, третирани с ензимни индуктори.

1.6.2. **Условия за провеждане на метода**

1.6.2.1. *Тест щамове*

Трябва да се използват три щама, WP2, WP2uvr A и WP2uvr A pKM101. За подготовка на запас от бактериални култури и тяхното съхраняване, трябва да се използват общо възприети методи. Задължително се проверяват растежната зависимост и генетичната идентичност на щамовете, тяхната чувствителност към UV облъчване или митомицин C и устойчивостта им към ампицилин на щам WP2uvr A pKM101. Честотата на спонтанна реверсия на щамовете трябва да бъде в очакваните граници.

1.6.2.2. *Хранителни среди*

Използва се хранителна среда, подходяща за изразяването и подбора на мутантни колонии със съответен повърхностен агар.

1.6.2.3. *Използване на негативни и позитивни контроли*

Изпитванията трябва да включват успоредни контроли — нетретирани и за разтворител. Изисква се изпитване и на позитивни контроли с две цели:

i) Потвърждаване на чувствителността на бактериалните щамове.

За сериите опити без метаболитна активация, като позитивни контроли, могат да се използват метил метан сулфонат, 4-нитроквинолин оксид или етилнитрозоурея.

ii) Контрол върху активността на метаболитно активиращата система.

Като позитивна контрола за активността на използваната метаболизираща система за всички бактериални щамове се прилага 2-аминоантрацен. При възможност, трябва да се използва позитивна контрола от същия химичен клас, от който е изпитваното химично вещество.

1.6.2.4. *Количество на изпитваното вещество/петриева паничка*

Изпитват се най-малко пет различни концентрации с 0,5 log интервали между отделните петриеви панички. Веществата се изпитват до границата на разтворимост или токсичност. Показатели за токсичност са намаляването на броя спонтанни ревертанти, нарушаването на фона от ауксотрофни бактерии или степента на преживяемост на третираните култури. Нетоксичните химични вещества трябва да се изпитват в концентрации до 5 mg/петриева паничка, преди да се даде заключение за негативен резултат от изпитването на съответните химични вещества.

1.6.2.5. *Условия за инкубация*

Петриевите панички се инкубират за 48—72 часа при 37 °C.

1.6.3. **Процедура**

При директния метод на вкарване, без ензимна активация, химичното вещество и 0,1 cm^3 от свежата бактериална култура се добавят към 2 cm^3 повърхностен агар. В сериите опити с метаболитна активация 0,5 cm^3 от чернодробната ензимно активираща смес, съдържаща оптимално количество пост-митохондриална фракция, се добавя към повърхностния агар след прибавянето на изпитваното химично вещество и бактерията. Съдържанието на всяка епруветка се смесва и се излива върху повърхността на селективен агар в петриева паничка. След втвърдяването на повърхностния агар, петриевите панички се инкубират при 37 °C за 48 до 72 часа. В края на инкубационния период се отчита броя на ревертантните колонии за всяка петриева паничка.

При използването на метода с предварителна инкубация, смес от изпитваното химично вещество, 0,1 cm^3 свежа бактериална култура и оптимално количество чернодробна ензимно активираща смес или същото количество буфер, се инкубира преди да се добави 2 cm^3 повърхностен агар. Всички останали етапи в разработката на този метод са аналогични на директния метод на вкарване.

Броят репликати за всички опитни и контролни групи при използването и на двата метода, е най-малко три петриеви панички.

2. **ДАННИ**

Броят ревертантни колонии за петриева паничка се представя за контролните и опитните групи

Индивидуалният брой ревертанти за петриева паничка, средният брой ревертантни колонии за петриева паничка и стандартните отклонения трябва да се представят за изпитваното химично вещество и контролите.

Данните трябва да се обработят с подходящи статистически методи.

Провеждат се най-малко два самостоятелни експеримента. Не е необходимо вторият експеримент да възпроизвежда началния. За получаването на по-полезни данни се предпочита промяна в някои от параметрите на теста.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от проведеното изпитване трябва, при възможност, да включва следната информация:

— бактерия, използван щам,

— условия за провеждане на метода: изпитвани дози, токсичност, състав на хранителните среди, режими на третиране (предварителна инкубация, инкубация), метаболитно активираща система, вещества за сравнение, негативни контроли,

— индивидуален брой ревертанти за всяка петриева паничка, среден брой ревертантни колонии за петриева паничка, стандартно отклонение, „доза-ефект“ зависимост при възможност,

— обсъждане на резултатите,

— интерпретация на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Виж Общо въведение, част Б (Г).

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Виж Общо въведение, част Б (Д).

Б.14. МУТАГЕННО ДЕЙСТВИЕ (SALMONELLA TYPHIMURIUM — МЕТОД ЗА ОБРАТНИ МУТАЦИИ)

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (А).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Виж Общо въведение, част Б (С).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Salmonella typhimurium histidine (his) ревертантната система е микробиален метод, с който се отчита his^- → his^+ реверсията при въздействието на химични вещества, които предизвикват заместване на бази или индуцират фреймшифтни мутации в генома на този организъм.

Бактериите се експонират на изпитваните химични вещества със и без метаболитна активация и се изливат върху минимална хранителна среда. След подходящ период на инкубация, ревертантните колонии се изброяват и се сравняват с броя на спонтанните ревертанти при нетретираните и/или контролните култури за разтворител.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. **Подготовка**

1.6.1.1. *Бактерии*

Свежи култури от бактериите се култивират при 37 °C до късна експоненциална или ранна стационарна фаза на растеж. Клетъчната плътност трябва да бъде приблизително 10^8 до 10^9 клетки на cm^3.

1.6.1.2. *Метаболитна активация*

Бактериите трябва да се експонират на изпитваното вещество както в присъствието, така и без наличие на подходяща метаболитно активираща система. Най-широко използвана система е обогатената с кофактори постмитохондриална фракция, приготвена от черен дроб на гризачи, третирани с ензимни индуктори.

1.6.2. **Условия за провеждане на метода**

1.6.2.1. *Тест щамове*

Трябва да се използват най-малко четири щама, TA 1535, TA 1537 или TA 97, TA 98 и TA 100; други щамове като TA 1538 и TA 102 могат да се използват допълнително. За подготовка на запас от бактериални култури и тяхното съхраняване трябва да се използват общо възприети методи. Задължително се проверяват растежната зависимост и генетичната идентичност на щамовете, тяхната чувствителност към UV облъчване и кристалвиолет, и устойчивостта им към ампицилин. Честотата на спонтанна реверсия на щамовете трябва да бъде в очакваните граници.

1.6.2.2. *Хранителни среди*

Използва се хранителна среда, подходяща за изразяването и подбора на мутантни колонии със съответен повърхностен агар.

1.6.2.3. *Използване на негативни и позитивни контроли*

Изпитванията трябва да включват успоредни контроли – нетретирани и за разтворител. Изисква се изпитване и на позитивни контроли с две цели:

i) Потвърждаване на чувствителността на бактериалните щамове.

За сериите опити без метаболитна активация могат да бъдат използвани следните вещества:

Щамове	Ревертира с
TA 1535, TA 100	Натриев азид
TA 1538, TA 98, TA 97	2-нитрофлуорен
TA 1537	9-аминоакридин
TA 102	куменов хидропероксид

ii) Контрол върху активността на метаболитно активиращата система.

Като позитивна контрола за активността на използваната метаболизираща система за всички бактериални щамове се прилага 2-аминоантрацен. При възможност, трябва да се използва позитивна контрола от същия химичен клас, от който е изпитваното химично вещество.

1.6.2.4. *Количество на изпитваното вещество/петриева паничка*

Изпитват се най-малко пет различни концентрации с 0,5 log интервали между отделните петриеви панички. Веществата се изпитват до границата на разтворимост или токсичност. Показатели за токсичност са намаляването на броя спонтанни ревертанти, нарушаването на фона от ауксотрофни бактерии, или степента на преживяемост на третираните култури. Нетоксичните химични вещества трябва да се изпитват в концентрации до 5 mg/петриева паничка, преди да се даде заключение за негативен резултат от изпитването на съответните химични вещества.

1.6.2.5. *Условия за инкубация*

Петриевите панички се инкубират за 48 до 72 часа при 37 °C.

1.6.3. **Процедура**

При директния метод на вкарване без ензимна активация химичното вещество и 0,1 cm^3 от свежата бактериална култура се добавят към 2 cm^3 повърхностен агар. В сериите опити с метаболитна активация 0,5 cm^3 от чернодробната ензимно активираща смес, съдържаща оптимално количество пост-митохондриална фракция, се добавя към повърхностния агар след прибавянето на изпитваното химично вещество и бактерията. Съдържанието на всяка епруветка се смесва и се излива върху повърхността на селективен агар в петриева паничка. След втвърдяването на повърхностния агар, петриевите панички се инкубират при 37 °C за 48 до 72 часа. В края на инкубационния период, се отчита броя на ревертантните колонии за всяка петриева паничка. При използването на метода с предварителна инкубация, смес от изпитваното химично вещество, 0,1 cm^3 свежа бактериална култура и оптимално количество чернодробна ензимно активираща смес, или същото количество буфер се инкубира преди да се добави 2 cm^3 повърхностен агар. Всички останали етапи в разработката на този метод са аналогични на директния метод на вкарване.

Броят репликати за всички опитни и контролни групи при използването и на двата метода е най-малко три петриеви панички.

2. **ДАННИ**

Броят ревертантни колонии за петриева паничка се представя за контролните и опитните групи.

Индивидуалният брой ревертанти за петриева паничка, средният брой ревертантни колонии за петриева паничка и стандартното отклонение трябва да се представят за изпитваното химично вещество и контролите.

Данните трябва да се обработят с подходящи статистически методи.

Провеждат се най-малко два самостоятелни експеримента. Не е необходимо вторият експеримент да възпроизвежда началния. За получаването на по-полезни данни, се предпочита промяна в някои от параметрите на теста.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от проведеното изпитване трябва, при възможност, да включва следната информация:

— бактерия, използван щам,

— условия за провеждане на метода: изпитвани дози, токсичност, състав на хранителните среди, режими на третиране (предварителна инкубация, инкубация), метаболитно активираща система, вещества за сравнение, негативни контроли,

— индивидуален брой ревертанти за всяка петриева паничка, среден брой ревертантни колонии за петриева паничка, стандартно отклонение, „доза-ефект“ зависимост при възможност,

— обсъждане на резултатите,

— интерпретация на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Виж Общо въведение, Част Б(Г)

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Виж Общо въведение, част Б (Д).

ЧАСТ В: МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА ЕКОЛОГИЧНА ТОКСИЧНОСТ

В.1. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ ПРИ РИБИТЕ

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на този тест е да определи острата летална токсичност на вещество за риба в прясна вода. Желателно е да се разполага, доколкото е възможно, с данни за разтворимостта във вода, парното налягане, химическата устойчивост, дисоциационните константи и биологичното разграждане на веществото, за да се улесни избора на най-подходящия метод за тестване /статичен, полу-статичен или с постоянно водоподаване/ с оглед осигуряването на достатъчно постоянни концентрации на изследваното вещество при провеждане на теста.

Допълнителната информация (например структурна формула, степен на пречистеност, естество и процентно съдържание на значими примеси, наличие и количества на добавки, и разделителен коефициент n-octanol/ вода) следва да се взема предвид, както при подготовката на теста, така при интерпретацията на резултатите.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Остра токсичност е видимото вредно въздействие, причинено в организъм при излагане за кратко време /дни/ на въздействие на вещество. В настоящия тест, острата токсичност е изразена като средна летална концентрация (LC_{50}), това е концентрацията във вода, която умъртвява 50 % от опитното количество риба при непрекъснато излагане, и която трябва да бъде посочена.

Всички концентрации на тестваното вещество са посочени в тегло за обем (милиграми на литър). Те могат да бъдат изразени също и в тегло за тегло ($mg.kg^{-1}$).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Референтното вещество може да се тества като средство за доказване, че в условията на лабораторен опит, реакциите на изследваните видове не се променят съществено.

За този тест не се посочват вещества за сравнение.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Може да се извърши ограничен тест със 100 mg/l, за да се докаже, че LC_{50} е по-голяма от тази концентрация.

Рибите се излагат на тестваното вещество, добавяно във водата в определен обхват от концентрации в продължение на 96 часа. Умъртвените бройки се отчитат на интервали от поне 24 часа, и на всеки наблюдаван интервал, където е възможно, се изчисляват концентрациите, умъртвили 50 % от рибите (LC_{50}).

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Критериите за качество се прилагат както към ограничения тест, така и към пълния метод на изследване.

Смъртността при контролните риби не трябва да надвишава 10 % (или не повече от 1 риба, ако са използвани по-малко от 10 бройки) до края на експеримента.

Концентрацията на разтворения кислород трябва да бъде с над 60 % от стойността на въздухонаситеността на водата по време на теста.

Концентрациите на тестваното вещество следва да се поддържат в рамките до 80 % от първоначалните концентрации в продължение на целия експеримент.

За вещества, които лесно се разтварят в опитната среда, получавайки по този начин стабилни разтвори, т.е. такива, които няма, в известен значителен размер, да се изпарят, разложат, хидролизират или адсорбират, първоначалната концентрация може да бъде приета за равна на номиналната концентрация. Следва да се представят доказателства, че през периода на теста концентрациите са били поддържани постоянни и че критериите за качество са били спазени.

За вещества, които са:

i) слабо разтворими в опитната среда; или

ii) способни да образуват стабилни емулсии или дисперсии; или

iii) нестабилни във водни разтвори;

като първоначална концентрация се приема измерената концентрация в разтвора (или, ако е технически невъзможно, във водна колона) в началото на теста. Концентрацията се определя след период на равновесие, но преди въвеждането на опитната риба.

Във всеки един от тези случаи при бъдещи изпитвания трябва по време на теста да бъде потвърдена актуалната показана концентрация или че качествените критерии са били спазени

pH не трябва да варира с повече от 1 единица.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Могат да се използват 3 вида процедури:

Статичен тест:

Това е тест за токсичност, при който не се добавя от опитния разтвор. (Разтворите остават непроменени през целия период на теста.)

Полу-статичен тест:

Това е тест без добавяне от опитния разтвор, но при равномерно подновяване на целия опитен разтвор след продължителни периоди от време (например на 24 часа).

Постоянно водоподаване:

Това е тест за токсичност, при който водата се обновява постоянно в опитните камери, а химическото вещество, което се изследва, се пренася с използваната вода за подновяване на опитната среда.

1.6.1. **Химически реактиви**

1.6.1.1. *Разтвори на опитните вещества*

Стандартни разтвори с необходимата сила се приготвят чрез разтваряне на веществото в дейонизирана вода или във вода съгласно описанието в точка 1.6.1.2.

Избраните опитни концентрации се приготвят чрез разреждане на стандартния разтвор. Ако се тестват високи концентрации, веществото може да бъде разтворено директно във водата.

Обикновено, веществата се изследват само до границата на разтворимост. За някои вещества (например вещества с ниска разтворимост във вода, или висок P_{ow}, или тези, които образуват по-скоро стабилна дисперсия отколкото истински разтвор във вода), се допуска опитната концентрация да бъде над границата на разтворимост за веществото, за да се гарантира, че е получено максималното съотношение между разтворимост и стабилна концентрация. Важно е обаче, тази концентрация по никакъв начин да не нарушава опитната система (например появата на филм на водната повърхност, пречейки за окисляването на водата, и т.н.).

Ултразвукова дисперсия, органични разтворители, емулгатори или дисперсанти могат да се използват като помощни съединения за приготвяне на стандартни разтвори на вещества с ниска водоразтворимост или да спомагат за разпръскването на тези вещества в опитната среда. Когато се използват такива спомагателни вещества, всички опитни концентрации следва да съдържат еднакво количество от спомагателните вещества, и допълнителните бройки контролна риба да бъдат изложени на същата концентрация от спомагателното вещество, каквато се използва в опитните серии. Концентрацията на такива помощни съединения следва да бъде сведена до минимум, но в никакъв случай не трябва да надвишава 100 mg/l в опитната среда.

Тестът се провежда без регулиране на pH. Ако се появят симптоми за настъпили промени в pH, препоръчва се тестът да бъде повторен с регулиране на pH и резултатите да се отбележат. В този случай, стойността на pH на стандартния разтвор следва да се нагласи към стойността на pH на водата за разреждане, освен ако няма специфични причини това да не се направи. Предпочитани за целта са HCL и NaOH. Това регулиране на pH следва да се извърши така, че концентрацията на опитното вещество в стандартния разтвор да не се промени в значителна степен. Ако в резултат от регулацията на pH настъпи някаква химическа реакция или при опитното вещество протече физическо утаяване, това също трябва да се отбележи.

1.6.1.2. *Съхранение и разреждане на водата*

Може да се използва питейна вода от водопровода (незамърсена от потенциално вредните концентрации на хлор, тежки метали или други вещества), природна вода с добро качество или пречистена вода (виж допълнение 1). Предпочитат се води с обща твърдост между 10 и 250 mg/l (както $CaCO_3$) и с pH между 6,0 и 8,5.

1.6.2. **Апаратура**

Всички уреди трябва да бъдат изработени от химически инертен материал:

— автоматична система за разреждане (за теста с постоянно водоподаване),

— измервател на кислород,

— уред за определяне твърдостта на водата,

— подходяща апаратура за температурен контрол,

— pH-метър.

1.6.3. **Опитни риби**

Рибите трябва да са в добро здраве и да нямат никакви малформации.

Използаните видове следва да се подбират въз основа на практически критерии, каквито са постоянно наличие в течение на годината, лесно отглеждане, подходящи за тестване, относителна чувствителност към химикали, както и на всякакви икономически, биологически или екологични фактори, които съществуват. Необходимостта от сравняемост на получените данни и съществуващата международна хармонизация (позоваване 1) следва също да бъдат взети предвид при избора на вида риба.

Списък на видовете риба, които са препоръчителни за изпълнението на този тест, е представен в допълнение 2. Най-предпочитаните видове са рибите „зебра“ и „дъга“.

1.6.3.1. *Отглеждане*

За предпочитане е опитните риби да бъдат от един род, с еднаква големина и възраст. Те трябва да се отглеждат най-малко 12 дни при следните условия:

натоварване:

подходящо за системата (рециркулация или постоянно водоподаване) и за видовете риба,

вода:

виж 1.6.1.2.,

светлина:

осветление в продължение на 12—16 часа дневно,

концентрация на разтворения кислород:

най-малко 80 % от стойността на въздухонаситеността на водата,

хранене:

3 пъти седмично или дневно, преустановява се 24 часа преди стартиране на теста.

1.6.3.2. *Смъртност*

След 48 часа от началото на периода, смъртността се отчита както следва:

— над 10 % от популацията след 7 дни:

отстранява се цялата партида,

— между 5 и 10 % от популацията:

периодът на отглеждане се продължава с още 7 дни. Ако не се намерят повече умъртвени индивиди, партидата се одобрява, в противен случай трябва да бъде отстранена,

— под 5 % от популацията:

цялата партида се одобрява.

1.6.4. **Адаптация**

Рибите трябва да бъдат поставени във вода с качеството и температурата, която ще се използва за теста, най-малко 7 дни преди да бъдат използвани.

1.6.5. **Процедура на теста**

Окончателният тест се предхожда от тест за определяне на обхвата, от който да се получи информация за диапазона на концентрациите, които ще се използват в основния експеримент.

Извършва се един контролен тест без опитното вещество, и ако е уместно, провежда се и един контролен тест със спомагателното вещество, в допълнение към опитните серии.

В зависимост от физическите и химически свойства на опитното вещество, следва да се избере подходящата за теста процедура – статичен тест, полу-статичен тест или с постоянно водоподаване, за да бъдат спазени критериите за качество.

Рибите се излагат на въздействие на веществото, както е описано по-долу:

— продължителност: 96 часа,

— брой на животните: поне 7 на концентрация,

— съдове: с подходящ капацитет в зависимост от препоръчителното натоварване,

— натоварване: препоръчва се максимално натоварване от 1 g/l за статичните и полу-статични тестове, а за тези с постоянно водоподаване – се допуска по-голямо натоварване,

— опитна концентрация: най-малко 5 концентрации, различаващи се една от друга чрез постоянен фактор, не надвишаващ 2,2, и доколкото е възможно разширяване на обхвата от 0 до 100 % смъртност,

— вода: виж 1.6.1.2.,

— светлина: осветление в продължение на 12–16 часа дневно,

— температура: подходяща за вида на рибата (приложение 2), но с допустимото отклонение от ± 1 °C за всеки отделен тест,

— концентрация на разтворения кислород: не по-малко от 60 % от стойността на въздухонаситеността на водата при избраната температура,

— хранене: никакво.

Рибите се наблюдават след първите 2 до 4 часа и поне на интервали от 24 часа. Рибите се смятат за умрели, ако при допир на опашатите крачета няма никаква реакция, и никакви признаци на дишане не са видими. Мъртвите риби се отстраняват след оглед и смъртните случаи се записват.

Записват се и видимите ненормални поведения (например загуба на равновесие, промени в начина на плуване, дихателната функция, пигментацията и др.).

Ежедневно се извършват измервания на pH, разтворения кислород и температурата.

Ограничен тест

Използвайки описаните за този метод процедури, може да бъде извършен ограничен тест с концентрация на дозата 100 mg/l, за да се докаже, че LC_{50} е по-висока от тази концентрация.

Ако естеството на веществото е такова, че концентрация от 100 mg/l в опитната вода не може да бъде постигната, следва да се извърши ограничен тест при концентрация, равна на разтворимостта на веществото (или максималната концентрация, формираща стабилна дисперсия) в използваната среда (виж също 1.6.1.1.).

Ограниченият тест следва да се извърши с 7 до 10 риби, със същия брой на контролните риби. (Според биномната теория, когато са използвани 10 риби и е регистрирана нулева смъртност, това е 99,9 %-но доказателство, че LC_{50} е по-голяма от използваната концентрация в ограничения тест. При 7, 8 или 9 риби, липсата на смъртност е поне 99 %-но доказателство, че LC_{50} е по-голяма в сравнение с използваната концентрация.)

В случай на смъртност, следва да се извърши пълно проучване. Ако се наблюдават почти смъртоносни въздействия, те трябва да бъдат отбелязани.

2. ОЦЕНКА НА ДАННИТЕ

За всеки отчетен интервал (24, 48, 72 и 96 часа) се построява зависимост на процентната смъртност за всеки препоръчителен период на излагане спрямо стойностите на концентрация върху логаритмична хартия.

При възможност за всеки отчетен интервал, LC_{50} и границите на точност (p = 0,05) следва да бъдат отчетени при използване на стандартните процедури; тези стойности следва да се закръглят до един, или най-много два знака (ето примери за закръгляване: 173,5 на 170; 0,127 на 0,13; 1,21 на 1,2).

В случаите, когато наклонът на кривата от съотношението концентрация/процентна смъртност е прекалено стръмен и изчисляването на LC_{50} се затруднява, достатъчна е само оценката на стойността по графиката.

Когато две концентрации, при съотношение 2,2, дават показания за смъртност само 0 и 100 %, тези две стойности са достатъчни за отчитане на обхвата, в който попада LC_{50} .

Ако е забелязано, че стабилността или хомогенността на опитното вещество не може да се поддържа, това трябва да бъде записано в доклада, и да се внимава при интерпретацията на резултатите.

3. РЕЗУЛТАТИ

Протоколът от изпитването трябва, при възможност, да включва следната информация:

— данни за опитната риба (научно наименование, вид, доставчик, някакво предварително третиране, размери и брой на използваните индивиди за всяка опитна концентрация),

— източник на водата за разреждане и нейните основни химически характеристики (pH, твърдост, температура),

— в случаи, когато веществото е с ниска разтворимост във вода, да се посочват методите за приготвяне на стандартните и тестовите разтвори,

— концентрацията на използваните спомагателни съединения,

— списък на използваните концентрации и всяка налична информация за стабилността в концентрациите на опитния химикал и тестовия разтвор,

— ако са извършени химически анализи, да се посочат използваните методи и получените резултати,

— резултати от ограничения тест, ако е извършен,

— обосновка за избора и подробности за използваната опитна процедура (например статичен или полу-статичен метод, размер на дозите, скорост на водоподаването и аериране на водата, ако е приложено такова, натоварване на рибата, и други),

— описание на опитната апаратура,

— режим на осветление,

— концентрации на разтворения кислород, стойности на pH и температурите на тестовите разтвори на всеки 24 часа,

— доказателства, че критериите за качество са спазени,

— таблица, показваща натрупаната смъртност при всяка концентрация и контролните риби (и контролни риби със спомагателни вещества, ако се налага) на всеки от препоръчителните интервали за наблюдение,

— графика на съотношението между концентрация/процентна смъртност в края на теста,

— при възможност, стойностите на LC_{50} на всеки от препоръчителните интервали за наблюдение (при 95 % допустима точност),

— използвани статистически процедури при определяне стойностите на LC_{50},

— ако е използвано референтно вещество, посочват се получените резултати,

— най-високата опитна концентрация, при която не е настъпила смъртност през периода на теста,

— най-ниската опитна концентрация, при която е отчетена 100 %-на смъртност по време на теста.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

(1) ОИСР, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR–Determination of the acute toxicity of a substance to Brachydanio rerio–Static and Flow Through methods–NFT 90–303 June 1985.

(3) AFNOR–Determination of the acute toxicity of a substance to Salmo gairdneri -Static and Flow - Through methods–NFT 90–305 June 1985.

(4) ISO 7346/1, /2 and /3–Water Quality–Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan–Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden–Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506–Water–Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van Poecilia reticulata, 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R., Ökotoxikologie, Grundlagen fur die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J. T .and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, tExp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

Допълнение 1

Пречистена вода

Пример за подходяща вода за разреждане

Всички химикали трябва да са с качество „чист за анализ“.

Използва се дестилирана вода с добро качество или дейонизирана вода с проводимост под 5 μScm^{-1}.

Апаратурата за дестилиране на вода не трябва да съдържа части, изработени от мед.

Стандартни разтвори

$CaCl_2 . 2H_2O$ (калциев хлорид дихидрат): 11,76 g,
Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

$MgSO_4 . 7H_2O$ (магнезиев сулфат хептахидрат): 4,93 g,
Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

$NaHCO_3$ (нариев бикарбонат): 2,59 g,
Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

KCl (калиев хлорид): 0,23 g,
Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

Пречистена вода за разреждане

Смесват се по 25 ml от всеки от 4-те стандартни разтвора и се долива до 1 литър.

Аерира се докато концентрацията на разтворения кислород се изравни със стойността на въздухонаситеността на водата.

pH следва да бъде 7,8 ± 0,2.

При необходимост pH се нагласява към това на NaOH (натриев хидроксид) или на HCL (солна киселина).

Така приготвената вода за разреждане се оставя да престои 12 часа и не трябва повече да се аерира.

Сумата от калциевите и магнезиевите йони в този разтвор е 2,5 mmol/litre. Съотношението на Ca/Mg йони е 4:1, а на Na/K йони – 10:1. Общата алкалност на разтвора е 0,8 mmol/litre.

Евентуалните отклонения при приготвяне на водата за разреждане не следва да водят до промени в състава или свойствата на водата.

Допълнение 2

Препоръчителни видове риба за провеждане на изпитванията

Препоръчани видове	Препоръчан обхват на температурата за изпитване (°C)	Препоръчана обща дължина на експерименталното животно (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Рибка-зебра	от 20 до 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	Бодливка от 20 до 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758)Обикновен шаран	от 20 до 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850) Оризиа	от 20 до 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Гупи	от 20 до 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Дребна сладководна риба	от 20 до 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Дъгова пастърва	от 12 до 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Златна рибка	от 20 до 24	6,0 ± 2,0

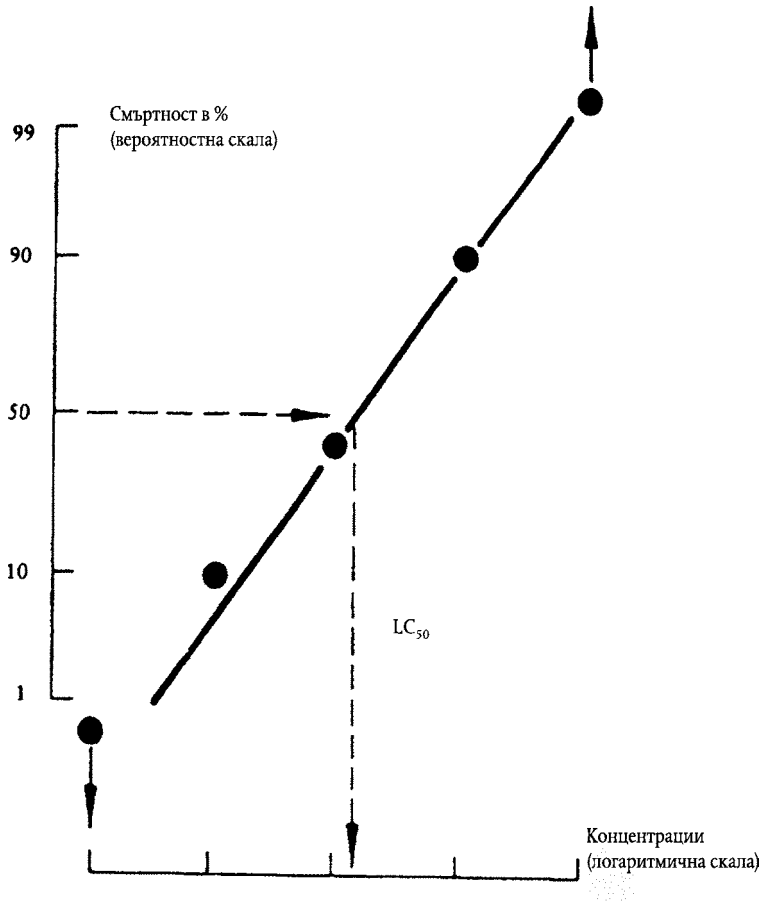
Събиране

Изброените по-горе риби са лесни за отглеждане и/или лесни за намиране през цялата година. Те могат да се развъждат и култивират в рибни ферми или в лаборатория, при условия на контрол за болести и паразити, така че експерименталните животни да бъдат здрави и с известен произход. Тези риби се намират в много части на света.

Допълнение 3

Пример за зависимостта концентрация: процент смъртност.

Пример за определяне на LC_{50} използвайки логаритмични координати.



B.2. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ ЗА DAPHNIA

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на това изпитване е да се определи медианната ефективна концентрация (EC_{50}) на дадено вещество за обездвижване на Daphnia в прясна вода. Преди да се започне изпитването желателно е да има, доколкото е възможно, информация за разтворимостта във вода, парно налягане, химичната стабилност, дисоциационните константи и биологичната разградимост на веществото

Както при планирането на изпитването, така и при тълкуването на резултатите, следва да се взема под внимание допълнителна информация (например структурна формула, степен на чистота, естество и процентно участие на значимите примеси, присъствие и количество на добавки, както и коефициента на разпределение n-октанол/вода)

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Изискването в директивата да се определи LC_{50} за Daphnia се счита за изпълнено с определянето на EC_{50} чрез описания тук метод за тестване.

Острата токсичност се изразява като медианна ефективна концентрация (EC_{50}) на обездвижване. Това е концентрацията, в смисъл на начални стойности, която обездвижва 50 % от Daphnia в изследваната група за период на експозиция, чиято продължителност трябва да се зададе предварително.

Обездвижване

Онези животни, които не са способни да плуват в продължение на 15 секунди след леко разклащане на съда за провеждане на изпитването, се считат за обездвижени.

Всички концентрации на изпитваното вещество се дават като тегло за единица обем ($mg.l^{-1}$). Също така те биха могли да се изразяват и в тегловни единици ($mg.kg^{-1}$).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Веществото за сравнение може да се изпита, за да се покаже, че при условията на лабораторното изпитване чувствителността на изпитваните видове не е променена значително.

Резюме на резултатите от междулабораторен тест за четири различни вещества е даден в допълнение 2.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Може да се направи гранично изпитване със 100 mg на литър за да се покаже, че EC_{50} е по-висока от тази концентрация.

Екземплярите Daphnia се експонират на изпитваното вещество прибавено в различни концентрации към вода за 48 часа. Ако се използва по-кратко изпитване, то трябва да се оправдае в протокола.

При равни други условия на изпитването и съответен обхват от концентрации на изпитваното вещество, различните концентрации на изпитваното вещество показват различна средна степен на ефект върху способността за плуване на Daphnia. Различните концентрации дават различен процент от Daphnia, неспособни повече да плуват в края на изпитването. Концентрациите, които причиняват 0 или 100 % обездвижване, се получават направо от наблюденията при изпитването, докато стойностите на EC_{50} за 48 часа се определят чрез изчисление, ако е възможно.

За този метод се използва статична система, освен ако изпитвателните разтвори не се подновяват по време на експозицията.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Критериите за качество трябва да са приложими както при граничното изпитване, така и при пълното изпитване.

Обездвижването при контролните екземпляри не трябва да превишава 10 % в края на изпитването.

Изпитваните Daphnia в контролната група не трябва да са улавяни на повърхността на водата.

Желателно е концентрацията на разтворения кислород в съдовете на изпитването да остава над 3 mg l^{-1} по време на изпитването. При никакви обстоятелства, обаче, концентрацията на разтворения кислород не трябва да спада под 2 mg l^{-1} .

Концентрацията на изпитваното вещество трябва да се поддържа в границите над 80 % от началната концентрация по време на цялото изпитване.

За вещества, които се разтварят лесно в изпитваната среда, давайки стабилни разтвори, т.е. онези които няма да се изпарят, деградират, хидролизират или адсорбират в значителна степен, началната концентрация може да се приеме еквивалентна на номиналната концентрация. Трябва да се представят доказателства, че концентрациите са поддържани по време на цялото изпитване и критериите за качество са били изпълнени.

За вещества, които са:

i) слабо разтворими в изпитателната среда, или

ii) способни да формират стабилни емулсии или дисперсии, или

iii) нестабилни във водни разтвори,

началната концентрация трябва да се вземе като концентрация, измерена в разтвора (или, ако технически не е възможно, измерена във водния стълб) в началото на изпитването. Концентрацията трябва да се определи след период на настъпване на равновесие, но преди да се въведат изпитваните организми.

Във всеки от тези случаи, трябва да се извършват по-нататъшни измервания по време на изпитването, за да се потвърдят истинските концентрации на експозицията и изпълнението на критериите за качество.

Активната реакция (pH) не трябва да се изменя с повече от 1 единица.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Реагенти**

1.6.1.1. *Разтвори на изпитваните вещества*

Изходни разтвори с определена концентрация се приготвят чрез разтваряне на веществото в дейонизирана вода или във вода, както е описано в 1.6.1.2.

Избраните за изпитване концентрации се приготвят чрез разреждане на изходните разтвори. Ако се изпитват високи концентрации, веществото може да се разтвори направо във водата за разреждане.

Веществата нормално би трябвало да се изпитват до границата на разтворимостта им. За някои вещества (например вещества имащи слаба разтворимост във вода, или високо P_{ow},(висок коефициент на разпределение n-октанол-вода) или такива формиращи по-скоро стабилни дисперсии, отколкото истински водни разтвори) е приемливо да се изпитват концентрации над нивото на разтворимост, за да се гарантира получаването на максималната разтворена/стабилна концентрация. Важно е, обаче, тази концентрация да не пречи по друг начин на системата за изпитване (например, образуване на филм от веществото върху водната повърхност, който да пречи на достъпа на кислород във водата, и т.н.).

Може да се използва ултразвуково дисперсиране, органични разтворители, емулгатори или дисперсиращи агенти при приготвяне на изходните разтвори на вещества със слаба разтворимост във вода или, за да се подпомогне дисперсирането на тези вещества в средата за провеждане на изпитването. Когато се използват такива спомагателни вещества, всички изпитвани концентрации трябва да съдържат еднакво количество от спомагателните вещества, и допълнителна контрола с Daphnia трябва да бъде изложена на същата концентрация на допълнителното вещество, като тази, използвана в изпитвателните серии. Концентрацията на такива допълнителни вещества трябва да се свежда до минимум и в никакъв случай да не превишава 100 mg на литър в изпитвателната среда.

Изпитването се провежда без регулиране на pH. Ако има доказателство за значителна промяна в pH, се препоръчва изпитването да се повтори с регулиране на pH и резултатите да се отразят в протокола. В този случай, стойността на pH на изходния разтвор се регулира към стойността на pH на водата за разтваряне, освен ако има специфични причини това да не се прави. HCl и NaOH са предпочитани за тази цел. Това регулиране на pH се прави по такъв начин, че концентрацията на изпитваното вещество в изходния разтвор да не се променя значително. Ако регулирането доведе до някаква химична реакция или физическо утаяване на изпитваното вещество, това трябва да се отрази в протокола.

1.6.1.2. *Вода за извършване на изпитването*

При това изпитване се използва възстановена вода (виж допълнение 1 и позоваване (2) ISO 6341). За да се избегне нуждата от аклиматизация преди изпитването, препоръчва се водата за културата от Daphnia да бъде с подобни качества (pH, твърдост), както водата използвана при изпитването.

1.6.2. **Апаратура**

Използва се нормална лабораторна апаратура и съоръжения. За предпочитане е оборудването, което ще е в контакт с изпитвателните разтвори да бъде изцяло от стъкло:

— оксиметър/апарат за измерване на кислород (с микроелектрод или друг подходящ уред за измерване на разтворен кислород в проби с малък обем),

— подходяща апаратура за регулиране на температурата,

— pH-метър,

— оборудване за определяне твърдостта на водата.

1.6.3. **Опитен организъм за изпитването**

Daphnia magna (водна бълха) се предпочита като изпитвателен обект за провеждане на изпитването, въпреки че е разрешено и използването на Daphnia pulex. Животните в началото на теста трябва да са по-млади от 24 часа, да са отгледани в лаборатория, да не са видимо болни и да са с позната предистория (например отглеждане, предишни третирания и т.н.).

1.6.4. **Процедура на изпитването**

Едно изпитване за установяване на обхвата може да предхожда същинското изпитване, за да се установят концентрациите, които да се използват при основното изпитване.

Заедно с изпитвателните серии може да се пусне и една контрола без изпитваното вещество и, ако е подходящо — една контрола, съдържаща допълнително вещество.

Daphnia се подлагат на въздействието, както е описано по-долу:

— *продължителност*: за предпочитане 48 часа,

— *брой животни*: най-малко 20 животни за всяка изпитвана концентрация, като за предпочитане те да са разделени на четири групи от по пет животни или на две групи по 10,

— *зареждане*: за всяко животно трябва да се осигурят по най-малко 2 ml от изпитвателния разтвор,

— *изпитвателни концентрации:* разтворите за изпитването трябва да се приготвят непосредствено преди поставянето на Daphnia, като е за предпочитане да не се използва друг разтворител освен вода. Концентрациите се приготвят в геометрични серии при съотношение на концентрациите не надвишаващо 2.2. Заедно с контролите се изпитват и концентрации, достатъчни за причиняване на 0 и 100 % обездвижване след 48 часа и концентрации в обхвата на средната степен на обездвижване, позволяващи изчисление на EC_{50} за 48 часа,

— *вода:* виж 1.6.1.2,

— *светлина:* по желание може да се приложи цикъл светлина-тъмнина,

— *температура:* температурата на изпитването трябва да бъде между 18 и 22 °C, но за всяко отделно изпитване трябва да е постоянна в границите на ± 1 °C,

— *аериране:* разтворите не трябва да се аерират с мехури,

— *хранене:* никакво.

Активната реакция pH и концентрацията на кислород в контролите и при всички изпитвателни концентрации трябва да се измерят на края на изпитването. pH на изпитвателните разтвори не трябва да бъде променяно.

Летливите съединения трябва да се изпитват в напълнени догоре и затворени съдове, достатъчно големи, за да не се допусне недостиг на кислород.

Daphnia се проверяват след най-малко 24-часова експозиция и отново след 48 часа.

Гранично изпитване

Използвайки процедурите описани в този метод, може да се направи граничен тест с 100 mg на литър за да се покаже, че EC_{50} е по-висока от тази концентрация.

Ако естеството на веществото е такова, че във водата за изпитването не могат да бъдат достигнати 100 mg на литър, граничният тест трябва да се проведе с концентрации равни на разтворимостта на веществото (или с максималната концентрация, която образува стабилна дисперсия) в използваната среда (виж също точка 1.6.1.1).

Граничният тест трябва да се зареди с 20 Daphnia, разделени в две или четири групи, и същия брой контроли. Ако се получи обездвижване, трябва да се направи пълно изследване.

2. ДАННИ И ОЦЕНКА

За всеки период когато са записвани наблюдения (24 и 48 часа), на графика върху логаритмична милиметрова хартия се нанасят смъртността в проценти срещу концентрацията.

Когато е възможно и за всяко време на наблюдение се изчисляват EC_{50} и доверителните граници (при p = 0.05) използвайки стандартната процедура. Тези стойности се закръгляват до една, или най-много до две значещи цифри (примери за закръгляване до две цифри: 170 за 173.5; 0.13 за 0.127; 1.2 за 1.21).

В случаите когато наклонът на кривата концентрация/процент е много стръмен, за да позволи изчисляване на EC_{50}, достатъчна е графичната оценка на тази стойност.

Когато две непосредствено съседни концентрации, при отношение 2.2, дават само 0 и 100 % обездвижване, тези две стойности са достатъчни да покажат обхвата, в който попада EC_{50}.

Ако се установи, че не може да се поддържа стабилност или хомогенност на изпитваното вещество, това трябва да се отрази в протокола и да се вземат съответни мерки при тълкуването на резултатите.

3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът с резултатите от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

— информация за организма, използван при изпитването (научно наименование, порода, доставчик или източник, всякакво предварително третиране, метод на отглеждане, включително източник, вид и количество на храната, честота на хранене),

— източник на водата за разреждане и важни химични характеристики (pH, температура, твърдост),

— в случай на вещество с малка разтворимост във вода - метода на приготвяне на изходния и тестовия разтвори,

— концентрация на всяко от допълнителните вещества,

— списък на използваните концентрации и всяка известна информация за стабилността при концентрациите на изпитвания химикал в изпитвателния разтвор,

— ако са правени химически анализи - използваните методи и получените резултати,

— резултатите от граничното изпитване, ако е правено такова,

— описание на оборудването,

— режим на осветяване,

— концентрации на разтворения кислород, стойности на pH и на температурите на изпитвателните разтвори,

— доказателство, че критериите за качество са били изпълнявани,

— таблица, показваща кумулативното обездвижване при всяка концентрация и при контролата (също и контролата с допълнителното вещество, ако се изисква) за всяко от препоръчаните времена на наблюдение (24 и 48 часа),

— графика на кривата на отговора концентрация/процент в края на изпитването;

— ако е възможно, стойностите за EC_{50} за всяко препоръчано време на наблюдение (с доверителен интервал 95 %),

— използвани статистически процедури при определяне стойностите на EC_{50},

— ако е използвано вещество за сравнение - получените резултати,

— най-високите изпитвани концентрации, които не са предизвиквали обездвижване по време на периода на изпитването,

— най-ниските изпитвани концентрации, които са предизвиквали 100 % обездвижване по време на периода на изпитването.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

(1) ОИСР, Paris, 1981, Test Guidelines 202, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) International Standard ISO, Water Quality -Determination of inhibition of mobility of Daphnia magna Straus, ISO 6341-1989

(3) AFNOR Inhibition of mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera -Crustacea) NFT 90 301 (January 1983).

(4) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen fur die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(5) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (Lll).

(6) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(7) Litchfield, J .T .and Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. and Exper. Ther., 1949, vol. 96, 99-113.

(8) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3,793-821.

(9) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

(10) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM, 1977, STP 634, 65-84.

(11) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

Допълнение I

Пречистена вода

Пример за подходяща вода за разреждане (съгласно ISO 6341)

Всички химикали трябва да са с качество „чист за анализ“.

Използва се дестилирана вода с добро качество или дейонизирана вода с проводимост под 5 μScm^{-1}.

Апаратурата за дестилиране на вода не трябва да съдържа части, изработени от мед.

Стандартни разтвори

$CaCl_2.2H_2O$ (калциев хлорид дихидрат): 11,76 g,
Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

$MgSO_4.7H_2O$ (магнезиев сулфат хептахидрат): 4,93 g,
Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

$NaHCO_3$ (нариев бикарбонат): 2,59 g,
Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

KCl (калиев хлорид): 0,23 g,
Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

Пречистена вода за разреждане

Смесват се по 25 ml от всеки от 4-те стандартни разтвора и се долива до 1 литър.

Аерира се, докато концентрацията на разтворения кислород се изравни със стойността на въздухонаситеността на водата.

pH следва да бъде 7,8 ± 0,2.

При необходимост pH се нагласява към това на NaOH (натриев хидроксид) или на HCL (солна киселина).

Така приготвената вода за разреждане се оставя да престои 12 часа и не трябва повече да се аерира.

Сумата от калциевите и магнезиевите йони в този разтвор е 2,5 mmol/litre. Съотношението на Ca/Mg йони е 4:1, а на Na/K йони – 10:1. Общата алкалност на разтвора е 0,8 mmol/litre.

Евентуалните отклонения при приготвяне на водата за разреждане не следва да водят до промени в състава или свойствата на водата.

Допълнение 2

Преглед на резултатите от проведения в страните от ЕИО рингов тест през 1978г. (цитирано също в позоваване 2)

Внимание: целта на този рингов тест е да се определи EC_{50} за 24 часа.

Използвани вещества:

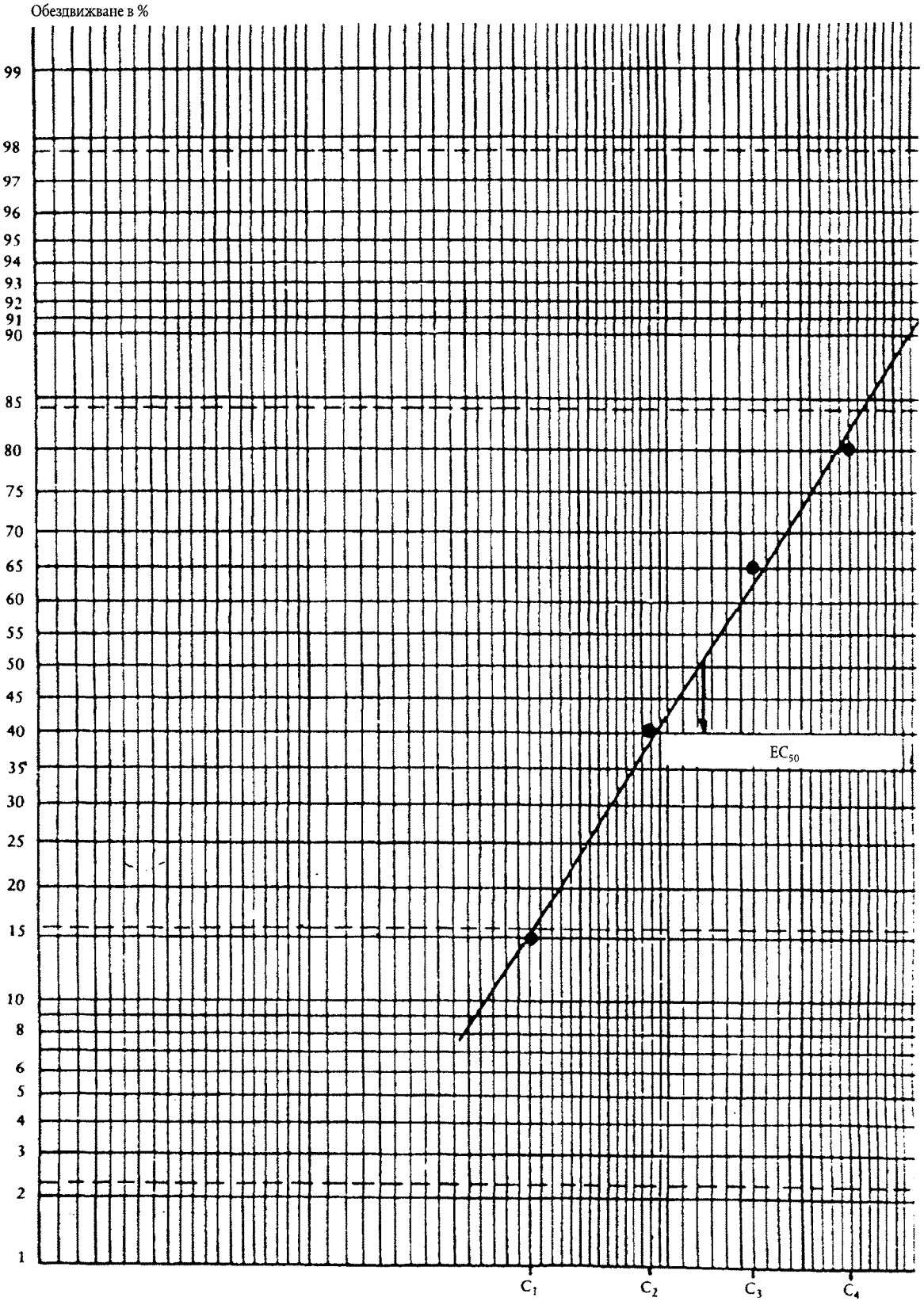
1. Калиев дихромат
2. Тетрапропилбензенсулфонова киселина
3. Тетрапропилбензенсулфонова киселина, натриева сол
4. Трихлоро-2,4,5-феноксиоцетна киселина, калиева сол

Вещество	Брой участващи лаборатории	Брой изчислени резултати	EC_{50}-24 ч. mg/l Средни стойности
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

Допълнение 3

Пример за концентрация: процент обездвижване

Пример за определяне на EC_{50} с използване на логаритмична милиметрова хартия



B.3. ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОТИСКАНЕ РАСТЕЖА НА ВОДОРАСЛИ

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на това изпитване е да се определи ефектът на дадено вещество върху растежа на видове едноклетъчни зелени водорасли. Относително кратки (72 часа) изпитвания могат да покажат ефекти върху няколко поколения. Този метод може да се адаптира за използване с много видове едноклетъчни водорасли, като в такива случаи към протокола от изпитването трябва да се приложи и описание на метода за изпитване.

Този метод е най-лесно приложим за разтворими във вода вещества, които при условията на изпитването остават във водата.

Методът може да се използва за вещества, които не възпрепятстват директно измерването на растежа на водораслите.

Преди да започне изпитването, желателно е да се разполага, доколкото е възможно, с информация за разтворимостта във вода, парното налягане, химичната стабилност, дисоциационните константи и биологичната разградимост на веществото.

Както при планирането на теста, така и при тълкуването на резултатите, следва да се взема под внимание допълнителната информация (например структурна формула, степен на чистота, природата и процентното съдържание на значимите примеси, присъствие и количество на добавки, както и коефициента на съотношението n-октанол/вода).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Плътност: брой клетки в милилитър;

Растеж: увеличаване на плътността за периода на изпитването;

Скорост на растеж: увеличение на плътността за единица време:

EC_{50}: при този метод това е концентрацията на изпитваното вещество, която причинява 50 % намаляване на растежа (E_bC_{50}) или на скоростта на растеж (E_rC_{50}) сравнено с контролата;

NOEC (КБНЕ – концентрация без наблюдаван ефект): при този метод това е най-високата изпитвана концентрация, при която не се наблюдава значимо потискане на растежа в сравнение с контролата.

Всички концентрации на изпитваното вещество се дават като маса за единица обем ($mg.l^{-1}$). Те също биха могли да се изразяват и в тегловни единици ($mg.kg^{-1}$).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Веществото за сравнение може да се изпита, за да се покаже, че при условията на лабораторния тест чувствителността на изпитваните видове не се е променила значително.

Ако се използва вещество за сравнение, резултатите трябва да се дадат в протокола от изпитването. Като вещество за сравнение може да се използва калиев дихромат, но неговият цвят може да се отрази на качеството и интензивността на светлината, достигаща до клетките, както и ако се използват спектрофотометрични определяния. Калиевият дихромат е използван в международен междулабораторен тест (виж позоваване (3) и допълнение 2).

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Може да се проведе гранично изпитване със 100 mg на литър, за да се покаже, че EC_{50} е по-висока от тази концентрация.

Експоненциално, растящите култури от избрани зелени водорасли се експонират на различни концентрации от изпитваното вещество за няколко поколения при определени условия.

Изпитвателните разтвори се инкубират за период от 72 часа, по време на който се измерва плътността на клетките на всеки 24 часа. Определя се подтискането на растежа спрямо контролна култура.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Критериите за качество следва да се прилагат както при граничното изпитване, така и при пълното изпитване.

Плътността на клетките в контролните култури би трябвало да се увеличава не по-малко от 16 пъти за три дни.

Концентрациите на изпитваното вещество трябва да се поддържат в границите над 80 % от началните концентрации през цялото време на изпитването.

За вещества, които се разтварят лесно в тестваната среда, давайки стабилни разтвори, т.е. такива, които не се изпаряват, деградират, хидролизират или адсорбират в значителна степен, началната концентрация може да бъде приета като еквивалент на номиналната концентрация. Трябва да се представят доказателства, че концентрациите са били поддържани през цялото време на теста и че критериите за качество са били изпълнени задоволително.

За вещества, които:

i) са слабо разтворими в изпитваната среда; или

ii) са способни да формират стабилни емулсии или дисперсии; или

iii) са нестабилни във водни разтвори;

началните концентрации трябва да се приемат като концентрациите, измерени в началото на изпитването. Концентрацията се определя след период на установяване на равновесие.

Във всички такива случаи, по време изпитването трябва да се правят по-нататъшни измервания, за да се докажат истинските концентрации, на които са изложени водораслите или че критериите за качество са изпълнени.

Известно е, в биомасата на водораслите по време на изпитването могат да се включат значителни количества от изпитваното вещество. Следователно, с цел спазване на горепосочените критерии, трябва да се вземат предвид и двете количества – това на веществото, включено в биомасата на водораслите, и количеството в разтвора (или, ако не е технически възможно, измерено във водния стълб). Ако обаче, определянето на концентрацията на веществото в биомасата на водораслите представлява значителен технически проблем, спазването на критериите за качество може да се покаже и чрез зареждане на съд за изпитване с най-високата концентрация на веществото, но без водорасли и измерване на концентрацията в разтвора (или, ако не е технически възможно във водния стълб), в началото и в края на периода на изпитването.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Реагенти**

1.6.1.1. *Разтвори на изпитваните вещества*

Основни разтвори с необходимата концентрация се приготвят чрез разтваряне на веществото в дейонизирана вода или във вода, съгласно 1.6.1.2.

Избраните концентрации на разтворите за изпитването се приготвят чрез прибавяне на подходящи аликвотни части към предкултури от водорасли (виж допълнение 1). Веществата нормално следва да се изпитват само до границата им на разтворимост. За някои вещества (например вещества, имащи слаба разтворимост във вода, или високо P_{ow} (коефициент на съотношението n-октанол/вода), или такива формиращи по-скоро стабилни дисперсии, отколкото истински водни разтвори), е приемливо да се прилагат концентрации над нивото на разтворимост, за да се гарантира получаването на максималната разтворена/стабилна концентрация. Важно е, обаче, тази концентрация да не пречи по друг начин на системата на изпитване (например чрез образуване на филм от веществото върху водната повърхност, който да пречи на достъпа на кислород във водата, и т.н.).

При приготвяне на изходни разтвори на вещества със слаба разтворимост във вода или за подпомагане на дисперсирането на тези вещества в изпитваната среда може да се използва ултразвуково диспергиране, органични разтворители, емулгатори или дисперсиращи агенти. Когато се използват такива спомагателни вещества, всички изпитвани концентрации би трябвало да съдържат еднакво количество от спомагателното вещество, и една допълнителна контрола да бъде експонирана при същата концентрация на допълнителното вещество, като тази, използвана в тестовите серии. Концентрацията на такива допълнителни вещества трябва да се свежда до минимум и в никакъв случай да не превишава 100 mg на литър в тестовата среда.

Изпитването се провежда без регулиране на pH. Ако има доказателство за значителна промяна в pH, се препоръчва изпитването да се повтори с регулиране на pH и резултатите да се отразят в протокола. В този случай, стойността на pH на изходния разтвор се регулира към стойността на pH на водата за разтваряне, освен ако има специфични причини това да не се прави. HCl и NaOH са предпочитани за тази цел. Това регулиране на pH се прави по такъв начин, че концентрацията на изпитваното вещество в изходния разтвор да не се променя значително. Ако регулирането доведе до някаква химична реакция или физическо утаяване на изпитваното вещество, това трябва да се отрази в протокола.

1.6.1.2. *Среда за провеждане на изпитването*

Водата трябва да е дестилирана с добро качество или дейонизирана с проводимост не по-висока от 5 $\mu S.cm^{-1}$. Апаратурата за дестилиране на водата не трябва да съдържа никакви части, направени от мед.

Препоръчва се следната среда:

Приготвят се четири изходни разтвора според следващата таблица. Изходните разтвори се стерилизират чрез мембранно филтриране или чрез автоклавиране и се съхраняват на тъмно при 4 °C. Изходен разтвор номер 4 се стерилизира само чрез мембранно филтриране. Тези изходни разтвори се разреждат до получаване на крайните хранителни концентрации в разтворите за изпитване.

Хранителна среда	Концентрация в изходния разтвор		Крайна концентрация в разтвора за изпитване	
Изходен разтвор 1: макрохранителни съставки				
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
Изходен разтвор 2: Fe -EDTA				
$FeCl_3.6H_2O$	80	mg/1	0,08	mg/l
$Na_2EDTA.2H_2O$	100	mg/l	0,1	mg/l
Изходен разтвор 3: микроелементи				
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
Изходен разтвор 4: $NaHCO_3$				
$NaHCO_3$	50	g/l	50	mg/l

Активната реакция (pH) на средата след достигане на равновесие с въздуха е приблизително 8.

1.6.2. **Апаратура**

— нормални лабораторни технически средства,

— колби със съответен обем (например, подходящи са конични колби от 250 ml, когато обемът на изпитвания разтвор е 100 ml). Всички колби трябва да са изработени от еднакъв материал и да имат еднакви размери,

— апаратура за култивиране: шкаф или бокс, в който може да се поддържа температура от 21 °C до 25 °C с точност ± 2 °C и непрекъснато еднакво осветление в спектралния обхват от 400 до 700 nm. Ако водораслите в контролните култури са достигнали препоръчаната скорост на растеж, може да се счита, че условията за растеж, включително интензитета на светлината са подходящи.

При средно ниво на концентрациите на изпитваните разтвори се препоръчва използването на светлина с интензитет от 60 до 120 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (35 до 70 x 10^{18} фотони.$m^{-2}.s^{-1}$) когато се измерва в обхвата от 400 до 700 nm, използвайки подходящ светломер. Ако инструментите за измерване на светлината са калибрирани в луксове, приемлив е обхватът от 6000 до 10 000 lx.

Интензитетът на светлината може да се постигне с четири до седем флуоресцентни лампи от 30 W с универсална бяла светлина (цветна температура около 4300 K), на разстояние 0.35 m от водорасловата култура,

— измерването на плътността на клетките се прави по метода на директно броене на живите клетки, например микроскоп с камери за броене. Могат да се използват обаче и други процедури като (фотометрия, турбидиметрия, и други), ако са достатъчно чувствителни и се покаже, че дават добра корелация с плътността на клетките.

1.6.3. **Организми за изпитване**

Предполага се, че използваните видове зелени водорасли са бързо растящи видове и са подходящи за култивиране и изпитване. Предпочитат се следните видове:

— *Selenastrum capricornutum,* например щам ATCC 22662 или щам CCAP 278/4,

— *Scenedesmus subspicatus,* например щам 86.81 SAG.

Забележка:

ATCC = Американска колекция от типови култури (САЩ)

CCAP = Център за култури от водорасли и протозоа (Великобритания)

SAG = Колекция от водораслови култури (Гьотинген, Германия)

Ако са използвани други видове, щамът трябва да се отрази в протокола от изпитването.

1.6.4. **Процедура на изпитването**

Обхватът от концентрации, при които се очаква да се получи ефект, се определя на базата на резултатите от изпитването за намиране на обхвата.

Двете мерки за растежа (биомаса и скорост на растеж) могат да дадат коренно различни измерения за потискането на растежа. И двете обаче трябва да се използват в изпитването за намиране на обхвата, за да се осигури геометричната прогресия от концентрации, която да позволи да се оценят както E_bC_{50} , така и E_rC_{50}.

Начална плътност на клетките

Препоръчва се началната плътност на клетките да бъде приблизително 10^4 клетки/ml за Selenastrum capricornutum и Scenedesmus subspicatus. Когато се използват други видове, тяхната биомаса трябва да е сравнима.

Концентрации на изпитваното вещество

За изпитването се приготвят най-малко пет концентрации в геометрична серия с отношение на концентрациите не надвишаващо 2.2 пъти. При най-ниската изпитвана концентрация не трябва да се наблюдава ефект върху растежа на водораслите. Най-високата изпитвана концентрация трябва да подтисне растежа най-малко с 50 % в сравнение с контролата или, за предпочитане е, да спре напълно растежа.

Повторения и контрол

Планът на изпитването трябва да включва три повторения за всяка изпитвана концентрация. Залагат се и три контроли без изпитваното вещество, и ако е подходящо, три контроли, съдържащи допълнително вещество. Ако е оправдано, планът на изпитването може да се промени, като се увеличава броят на концентрациите и се намалява броят на повторенията за дадена концентрация.

Изпълнение на изпитването

Тестовите културите, съдържащи желаните концентрации от изпитваното вещество и желаното количество водораслова култура се приготвят чрез прибавяне на аликвотни части от основните разтвори на изпитваното вещество към съответните количества предкултури от водорасли (виж допълнение 1).

Културите се разклащат и се поставят в апаратурата за култивиране. Водораслите се поддържат в суспензия чрез разклащане, разбъркване или продухване с въздух, за да се подобри газовия обмен и се намалят промените в pH на изпитваните разтвори. Културите трябва да се поддържат при температура от 21 до 25 °C с регулиране в границите на ± 2 °C.

Плътността на клетките във всяка колба се определя най-малко на 24, 48 и 72 часа след започване на изпитването. Когато плътността на клетките се измерва по метод различен от директното броене, за определяне на фоновите стойности се използва филтрирана среда от водорасли, съдържаща съответна концентрация на изпитвания химично вещество.

Активната реакция (pH) се измерва в началото на теста и на 72-я час.

Активната реакция (pH) на проверките нормално не би трябвало да се отклонява с повече от 1.5 единици по време на изпитването.

Изпитване на летливи вещества

До момента няма общо приет начин за изпитване на летливи вещества. Когато дадено вещество показва тенденция за изпаряване, могат да се използват затворени стъкленици с по-голямо пространство над разтвора. Когато се изчислява пространството над разтвора в затворени стъкленици, трябва да се вземе предвид възможността за недостиг на CO_2 (виж позоваване 4). Предлагани са различни варианти на този метод (виж позоваване 4).

Трябва да се направят опити за определяне количеството на веществото, което остава в разтвора, като се препоръчва изключително внимание при тълкуването на резултатите от изпитвания в затворени системи с летливи химични вещества.

Гранично изпитване

Като се използват процедурите, описани в този метод, се прави едно гранично изпитване със 100 mg на литър, за да се покаже, че LC_{50} е по-висока от тази концентрация.

Ако природата на веществото е такова, че във водата за изпитването не могат да бъдат достигнати 100 mg на литър, граничният тест трябва да се проведе с концентрации равни на разтворимостта на веществото (или с максималната концентрация, която образува стабилна дисперсия) в използваната среда (виж също точка 1.6.1.1).

Граничното изпитване трябва да се направи най-малко в три повторения, със същия брой контроли. И двете измерения на растежа (биомаса и скорост на растеж) трябва да се използват при граничното изпитване.

Ако при граничното изпитване се намери средно намаление от 25 % или повече в биомасата или в скоростта на растеж между граничното изпитване и контролите, трябва да се направи пълно изпитване.

2. ДАННИ И ОЦЕНКА

Измерената плътност на изпитваните култури и на контролите се подрежда в таблици заедно с концентрациите на изпитваното вещество и времената на измерване. Средната стойност на плътността на клетките за всяка изпитвана концентрация на веществото и тази на контролите се нанася на графика срещу времето (0-72 часа), за да се получат кривите на растеж.

За да се определи отношението концентрация/ефект могат да се използват следните два подхода. Някои вещества могат да стимулират растежа при ниски концентрации. Вземат се пред вид само данни, показващи потискане на растежа между 0 и 100 %.

2.1. СРАВНЕНИЕ НА ПЛОЩИТЕ ПОД КРИВИТЕ НА РАСТЕЖА

Площта между кривите на растежа и хоризонталната линия $N = N_0$ може да се изчисли по формулата:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \cdots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

където:

A = площ,

N_o = брой клетки/ml при време t_0 (началото на изпитването),

N_1 = измерен брой клетки/ml при t_1,

N_n = измерен брой клетки/ml при време t_n,

t_1 = време на първото измерване при започване на изпитването,

t_n = време на n-то измерване след започването на изпитването,

n = брой измервания направени след започването на изпитването.

Процентът на подтискане на клетъчния растеж за всяка изпитвана концентрация (I_A) се изчислява по следната формула:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

където

A_c = площта между кривата на растежа на контролата и хоризонталната линия $N = N_o$.

A_t = площта между кривата на растежа при концентрация t и хоризонталната линия $N = N_o$.

Стойностите на I_A се нанасят на графика върху полулогаритмични или логаритмични координати срещу съответните концентрации. Ако са нанесени на графиката, точките се съединяват с права линия, прекарана на око или изчислена чрез регресионен анализ.

EC_{50} се оценява от линията на регресия чрез отчитане на концентрацията, която отговаря на 50 % подтискане (I_A = 50 %). За да се обозначи, че тази стойност е недвусмислено свързана с този метод на изчисление, се препоръчва да се използва символа E_bC_{50}. Важно е E_bC_{50} да се цитира заедно със съответния период на експозиция, например E_bC_{50} (0-72 часа).

2.2. СРАВНЕНИЕ НА СКОРОСТИТЕ НА РАСТЕЖ

Средната специфична скорост на растеж (μ) за експоненциално растящи култури може да бъде изчислена като:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

където t_0 е времето на започване на изпитването.

Друга възможност е да се намери средната специфична скорост на растеж от наклона на регресионната права в графиката ln N срещу време.

Процентът на подтискане на специфичната скорост на растеж за всяка концентрация на изпитваното вещество ($I_\mu t$) се изчислява по формулата:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

Където:

μ_c = средна специфична скорост на растеж при контролата,

μ_t = средна специфична скорост на растеж при изпитвана концентрация t.

Процентното намаляване на средната специфична скорост на растеж за всяка изпитвана концентрация, сравнена със стойността на контролата, се нанася на графика срещу логаритъма на концентрацията. EC_{50} може да се отчете от получената графика. За да се обозначи недвусмислено, че тази стойност е получена по този метод на изчисление, се препоръчва да се използва символът E_rC_{50}. Времето на измерването трябва да се означи, например стойността, която се отнася за времена 0 и 72 часа. Важно е да се цитира съответният период на експозиция, ако стойността се отнася за време от 0 до 72 часа, символът става E_rC_{50} (0-72 часа).

Забележка: специфичната скорост на растеж е логаритмична величина и малки промени в скоростта на растеж могат да доведат до големи промени в биомасата. Поради това стойностите E_bC_{50} и E_rC_{50} не могат да се сравняват числено.

2.3. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА NOEC (КОНЦЕНТРАЦИЯ БЕЗ НАБЛЮДАВАН ЕФЕКТ)

NOEC, т.е. концентрацията без наблюдаван ефект, се определя чрез подходяща статистическа процедура за сравнение на множество проби (например анализ на дисперсията или тест на Dunett), като се използват индивидуалните стойности на площите A под кривите на растеж (виж точка 2.1) или специфичните скорости на растеж μ (виж точка 2.2).

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Протоколът с резултатите от изпитването, трябва по възможност, да съдържа следната информация:

— изпитвано вещество: данни за неговата химична идентификация,

— тестови организми: произход, лабораторна култура, номер на щама, метод на култивиране,

— условия на теста изпитването:

  — дата на започване и край на изпитването и неговата продължителност,

  — температура,

  — състав на средата,

  — апаратура за култивиране,

  — pH на разтворите при започване и в края на теста (трябва да се даде обяснение, ако са наблюдавани промени в pH по-големи от 1,5 единици),

  — използвано средство и метод за разтваряне на изпитваното вещество и концентрацията му в разтворите за изпитването,

  — интензитет и качество на светлината,

  — концентрации при изпитването (измерени или номинални).

— резултати:

  — клетъчна плътност за всяка стъкленица при всяко време на измерване и метод на измерване на клетъчната плътност,

  — средни стойности на клетъчната плътност,

  — криви на растежа,

  — графично представяне на връзката между концентрация и ефект,

  — стойности на EC и метод за изчисляване,

  — NOEC (концентрация без забележим ефект),

  — други наблюдавани ефекти.

4. ПОЗОВАВАНИЯ

(1) ОИСР, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge Scenedesmus subspicatus“, in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

(3) ISO 8692- Water quality -Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and Selenastrum capricornutum.

(4) S.Galassi and M. Vighi - Chemosphere, 1981, vol.10, 1123-1126.

Допълнение 1

Пример на процедура за култивиране на водорасли

Общи наблюдения

Целта на култивирането по описаната процедура е получаване на водораслови култури за провеждане на изпитвания за токсичност.

Трябва да се използват подходящи методи, които да гарантират, че водорасловите култури не са заразени с бактерии (ISO 4833). Желателно е културите да са чисти от чужди организми, но съществено важно е те да са и едновидови.

Всички операции трябва да се извършват при стерилни условия, за да се избегне замърсяване с бактерии или с други водорасли. Замърсените култури се изхвърлят.

Процедури за получаване на водораслови култури

Приготвяне на хранителните разтвори (среди):

Средата може да се приготви чрез разреждане на концентрирани изходни разтвори на хранителни вещества. За приготвяне на твърда среда се прибавя 0.8 % агар. Използваната среда трябва да е стерилна. Стерилизация чрез автоклавиране може да доведе до загуба на NH_3.

Изходна култура:

Изходните култури са малки култури от водорасли, които редовно се прехвърлят в свежа среда, за да послужат като начален материал за изпитването. Ако културите не се използват постоянно, те се разстилат в наклонени епруветки с агар. Прехвърлят се в свежа среда (пресяват се) най-малко веднъж на два месеца.

Изходните култури се отглеждат в конични колби, съдържащи съответна среда (обем около 100 ml). Когато водораслите се инкубират при 20 °C с непрекъснато осветяване, е необходимо пресяване всяка седмица.

По време на пресяването дадено количество от „старата“ култура се прехвърля със стерилни пипети в колба със свежа среда, така че при бързо растящите видове началната концентрация да е 100 пъти по-малка от тази в старата култура.

Скоростта на растеж на видовете може да се определи от кривата на растеж. Ако тя е известна, може да се оцени плътността, с която културата трябва да се прехвърли в нова среда. Това трябва да стане преди културата да достигне фазата на смърт.

Предкултура:

Предкултурата служи да даде определено количество водорасли подходящо за отглеждане на тестови култури. Предкултурата се инкубира при условията на изпитването и се използва, когато е вече във фаза на експоненциален растеж, обикновено след инкубационен период от около три дни. Когато културите от водорасли съдържат деформирани или ненормални клетки, те трябва да се изхвърлят.

Допълнение 2

ISO 8692 – Качество на водата – Изпитване подтискането на растежа на водораслите Scenedesmus subspicatus и Selenastrum capricornutum в прясна вода. В този стандарт са докладвани следните резултати от междулабораторно изпитване с калиев дихромат, в което са участвали 16 лаборатории:

	Средна стойност (mg/l)	Обхват (mg/l)
E_rC_{50} (0—72 ч)	0,84	от 0,60 до 1,03
E_bC_{50} (0—72 ч)	0,53	от 0,20 до 0,75

В.4. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПРЯКАТА БИОЛОГИЧНА РАЗГРАДИМОСТ

ЧАСТ I. ОБЩИ СЪОБРАЖЕНИЯ

I.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Описани са шест метода, които позволяват скрининг на химични вещества за пряка биологична разградимост в аеробна водна среда:

а) Метод за определяне на разтворен органичен въглерод (DOC) чрез скоростта на отмиране (Метод В.4-А);

б) Модифициран скрининг метод на ОИСР за определяне на DOC чрез скоростта на отмиране (Метод В.4-Б);

в) Метод за отделяне на въглероден диоксид (CO_2) (Модифициран метод на Щурм) (Метод В.4-В);

г) Манометрична респирометрия (Метод В.4-Г);

д) Метод на изолираните проби (Метод В.4-Д);

е) MITI (Министерство на Международната Търговия и Индустрията – Япония (Метод В.4-Е).

Общите положения за всичките шест изпитвания са дадени в Част I на метода. Специфичните детайли за отделните методи са дадени в Части II-VII. Приложенията съдържат определения, формули и указателен материал.

Едно междулабораторно сравнително изпитване, проведено от ОИСР през 1988 г., показва, че методите дават съвместими резултати. Един или друг от методите обаче може да бъде предпочетен в зависимост от физичните характеристики на изпитваното вещество.

I.2. ИЗБОР НА ПОДХОДЯЩИЯ МЕТОД

За да се избере най-подходящият метод, е необходима информация за разтворимостта, парното налягане и адсорбционните характеристики на химичното вещество. Трябва да са известни химичната структура и формулата, за да се изчисляват теоретичните стойности и/или да се проверяват измерените стойности на параметрите, например ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (виж приложения 1 и 2).

Изпитваните химични вещества, които са разтворими във вода до не по-малко от 100 mg/l могат да бъдат оценявани чрез всички методи, при положение, че не са летливи и не се адсорбират. За онези химични вещества, които са трудно разтворими във вода, летливи или адсорбиращи се, подходящите методи са показани в таблица 1. Начинът, по който се работи с трудно разтворими във вода и летливи химични вещества, е описан в приложение 3. Умерено летливите химични вещества могат да се изпитват по метода за определяне на органичен въглерод (DOC) чрез скоростта на отмиране, ако има достатъчно въздушно пространство в съдовете (които трябва да са подходящо затворени). В този случай трябва да се постави и абиотична контрола, за да се вземат под внимание всички физични загуби.

Таблица 1: Приложимост на методите за изпитване

Изпитване	Аналитичен метод	Подходящ за вещества, които са:		
		трудно разтворими	летливи	адсорбиращи се
Определяне на разтворен органичен въглерод чрез скоростта на отмиране	Разтворен органичен въглерод	—	—	+ / –
Модифициран [OECD] метод на ОИСР за определяне чрез скоростта на отмиране	Разтворен органичен въглерод	—	—	+ / –
Метод с отделяне на CO_2	Респирометрия: отделяне на CO_2	+	—	+
Манометрична респирометрия	Манометрична респирометрия: потребление на кислород	+	+ / –	+
Метод на изолираните проби	Респирометрия: разтворен кислород	+ / –	+	+
MITI	Респирометрия: потребление на кислород	+	+ / –	+

При тълкуването на получените резултати е необходима информация за чистотата или относителните дялове на основните компоненти на изпитвания материал, особено когато резултатите са ниски или гранични.

Информацията за токсичността на химичното вещество спрямо бактерии (приложение 4) може да бъде особено полезна при избирането на подходящи концентрации за изпитване и може да бъде особено важна за правилното тълкуване при ниски стойности на биологичното разграждане.

I.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

За да се провери процедурата веществата за сравнение, които изпълняват критериите за биоразградимост, се изпитват чрез поставяне в съответна колба, успоредно на хода на нормалното изпитване.

Подходящи химични вещества са анилин (прясно дистилиран), натриев ацетат и натриев бензоат. Всички тези сравнителни вещества се разграждат по изброените методи, дори когато нарочно не е добавен инокулант

Счита се, че трябва да се търси сравнително вещество, което е лесно биоразградимо, но изисква прибавяне на инокулант. Предлаган е калиев хидрогенфталат, но са необходими повече доказателства за това вещество, за да може да бъде прието като сравнително.

При респирометричните изпитвания азотсъдържащите съединения могат да повлияват върху потреблението на кислород поради нитрификацията (виж приложения 2 и 5).

I.4. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДИТЕ ЗА ИЗПИТВАНЕ

Разтвор или суспензия на изпитваното вещество в минерална среда се инокулира и се инкубира при аеробни условия на тъмно или при дифузна светлина. Количеството на DOC в изпитвания разтвор, дължащо се на инокуланта, трябва да се поддържа колкото може по-ниско в сравнение с количеството на DOC, дължащо се на изпитваното вещество. Ендогенната активност на инокуланта се отчита чрез залагане на контролна проба с инокулант, но без изпитваното вещество, въпреки че, ендогенната активност на клетките в присъствие на веществото няма да съвпадне точно с ендогенната контрола. Успоредно се залага и вещество за сравнение, за да се провери протичането на процедурите.

Най-общо разграждането се проследява чрез определяне на параметри, като DOC, продукция на CO_2 и потребление на кислород, като измерванията се правят на достатъчно чести интервали, за да може да се отчете началото и краят на биоразграждането. С автоматични респирометри измерванията са непрекъснати. DOC понякога се измерва като допълнение на други параметри, но това обикновено се прави само в началото и в края на изпитването. Може да се използва и специфичен химичен анализ, за да се оцени първоначалното разграждане на изпитваното вещество и да се определи концентрацията на всички образувани междинни вещества (задължително при изпитването по MITI).

Нормално, изпитването продължава 28 дни. Изпитванията могат да завършат и преди 28 дни, т.е. тогава, когато кривата на биологичното разграждане е достигнала плато при поне 3 определяния. Изпитванията могат да продължат и повече от 28 дни, когато кривата показва, че биоразграждането е започнало, но платото не е достигнато за 28 дни.

I.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

I.5.1. **Възпроизводимост**

Поради природата на биоразграждането и смесените бактериални популации, използвани като инокулант, определянето трябва да се прави най-малко в две повторения.

От опит се знае, че колкото по-високи концентрации микроорганизми се прибавят първоначално към изпитваната среда, толкова по-малки са разликите между повторенията. Кръгови (междулабораторни) изпитвания са показали също така, че може да има големи различия в резултатите, получени от различни лаборатории, но нормално се получава добро съвпадение при лесно биоразградими съединения.

I.5.2. **Валидност на изпитването**

Едно изпитване се счита за валидно, ако при повторенията разликата между най-ниската и най-високата стойност при отстраняване на изпитваното химично вещество на платото, в края на теста или в края на 10-дневен период е по-малка от 20 % и ако процентното разграждане на сравнителното вещество е достигнало равнището на биоразграждане за 14 дни. Ако което и да е от тези условия не е изпълнено, изпитването следва да бъде повторено. Поради строгостта на методите, ниските стойности невинаги означават, че изпитваното вещество не се разгражда в естествени условия, но показват, че е необходима повече работа, за да се установи биоразграждането.

Ако при едно изпитване за токсичност, съдържащо както изпитваното вещество, така и веществото за сравнение, се получи по-малко от 35 % разграждане (на основата на DOC) или по-малко от 25 % (на основата на ThOD или $ThCO_2$) за 14 дни, изпитваното вещество може да се приеме като инхибитор (виж приложение 4). Тестовите серии следва да бъдат повторени, използвайки по възможност по-ниски концентрации на изпитваното вещество при по-висока концентрация на инокуланта, но не повече от 30 mg частици/литър.

I.6. ОБЩИ ПРОЦЕДУРИ И ПОДГОТОВКА

Общите условия, приложими към изпитванията, са обобщени на таблица 2. Апаратурата и другите експериментални условия, приложими специфично за всеки индивидуален тест, са описани по-долу под заглавието на съответния тест.

Таблица 2: Условия на изпитването

Изпитване	Определяне на DOC чрез скоростта на отмиране	Метод за отделяне на CO_2	Манометрична респирометрия	Модифициран скрининг метод на ОИСР	Метод на изолираните проби	MITI (I)
Концентрация на изпитваното вещество като mg/l			100		2—10	100
mg DOC/l	10—40	10—20		10—40		
mg ThOD/l			50—100		5—10	
Концентрация на инокуланта (в броя клетки/l, приблизително)	≤ 30 mg/l суспендирани частици или ≤ 100 ml отток [изходяща вторична вода]/l (10^7—10^8)			0.5 ml вторичен отток/l (10^5)	≤ 5ml отток /l (10^4—10^6)	30 mg/l суспендирани частици (10^7—10^8)
Концентрация на елементите в минералната среда (в mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05–0,1				0,05–0,1	0,15
pH	7.4 + 0.2					За предпочитане 7.0
Температура	22 + 2 °C					25 + 1 °C

DOC = разтворен органичен въглерод ThOD = теоретично потребление на кислород SS = суспендирани частици

I.6.1. **Вода за разреждане**

Използва се дестилирана или дейонизирана вода, несъдържаща инхибиращи концентрации на токсични вещества (например Cu^{++} йони). Водата трябва да съдържа не повече от 10 % от органичния въглерод, внесен с изпитвания материал. Високата чистота на водата за изпитването е необходима, за да се елиминират високи стойности на контролната проба. Замърсяването може да се дължи на присъщи очиствания, а също така на йонообменните смоли и разграден материал от бактерии или водорасли. За всяка серия изпитвания се използва само една партида вода, предварително проверена чрез анализ за DOC. Такава проверка не е необходима при изпитването по метода на изолираните проби, но потреблението на кислород на водата трябва да е ниско.

I.6.2. **Изходни разтвори на минерални компоненти**

За да се направят разтворите за изпитване, се приготвят изходни разтвори с определени концентрации на минералните компоненти. За методите: определяне на DOC чрез скоростта на отмиране, Модифицирания скрининг на ОИСР, Отделяне на CO_2, Манометрична респирометрия и този на изолираните проби, могат да бъдат използвани следните изходни разтвори (с различни фактори на разреждане). Факторите на разреждане, а за изпитването по MITI и специфичното приготвяне на минералната среда, са дадени под заглавията на специфичните методи за изпитване.

Изходни разтвори:Приготвят се следните изходни разтвори, като се използват химични вещества със степен ЧЗА („чист за анализ“).

а)	Монокалиев дихидрогенортофосфат, KH_2PO_4	8,50 g
	Дикалиев монохидрогенортофосфат, K_2HPO_4	21,75 g
	Динатриев монохидрогенортофосфат дихидрат, Na_2HPO_4-$2H_2O$	33,40 g
	Амониев хлорид, NH_4Cl	0,50 g
	Разтварят се във вода и се долива до 1 литър. Стойността на pH на разтвора следва да бъде 7,4.	
б)	Калциев хлорид, безводен, $CaCl_2$	27,50 g
	или Калциев хлорид дихидрат, $CaCl_2.2H_2O$	36,40 g
	Разтварят се във вода и се долива до 1 литър.	
в)	Магнезиев сулфат хептахидрат, $MgSO_4.7H_2O$	22,50 g
	Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.	
г)	Железен(III) хлорид хексахидрат, $FeCl_3.6H_2O$	0,25 g
	Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.	

Забележка: За да се избегне приготвянето на този разтвор непосредствено преди употреба, прибавя се една капка концентрирана HCl или 0.4 g динатриева сол на етилендиаминотетраоцетна киселина (EDTA) на литър.

I.6.3. **Изходни разтвори на химични вещества**

Например, разтварят се 1–10 g, както е подходящо, от изпитваното или сравнителното вещество в дейонизирана вода и се доливат до 1 литър, ако разтворимостта превишава 1 g/l. В противен случай, се приготвят изходните разтвори в минерална среда или веществото се добавя направо към минералната среда. При работа с по-малко разтворими химични вещества виж приложение 3, но при метода на MITI (Метод B.4-E) не могат да се използват нито разтворители, нито емулгатори.

I.6.4. **Инокулант (култура от микроорганизми)**

Инокулантът може да произхожда от различни източници: активна утайка, пречистена отпадъчна вода (нехлорирана), повърхностни води и почви или смес от всичко това. Ако при методите за изпитване за определяне на DOC чрез скоростта на отмиране. При методите отделяне на CO_2 и манометрична респирометрия се използва активна утайка, която трябва да е взета от пречиствателна станция или от лабораторно звено, която получава предимно битови отпадъчни води. Опитът показва, че инокуланти от други източници дават по-голямо разсейване в резултатите. За изпитванията по Модифицирания метод на ОИСР и метода на изолираните проби са необходими по-разредени инокуланти без утаечни флокули и като източник се предпочита оттока от градска станция за пречистване на отпадъчни води (ГСПОВ) или от лабораторно звено. За изпитването по метода на MITI инокулантът се извлича от смесени източници, както е описано под заглавието на това специфично изпитване.

I.6.4.1. *Инокулант от активна утайка*

Взема се свежа проба от активната утайка от басейна за аериране на една ГСПОВ или от лабораторно звено, които преработват предимно битови отпадъчни води. Ако е необходимо, се отстраняват твърдите частици чрез филтриране през фино сито и след това утайката се съхранява при аеробни условия.

Друга възможност е утайката да се остави да се утаи или да се центрофугира (например при 1100 G в продължение на 10 min.) след премахване на по-грубите частици. Оставят се да изплуват на повърхността ненужните частици. Утайката може да се промива с минерална среда. Концентрираната утайка се разрежда с минерална среда до концентрация 3-5 g суспендирани вещества на литър и се аерира, колкото се изисква.

Утайката трябва да се вземе от обикновена добре работеща пречиствателна станция. Ако утайката трябва да бъде взета от пречиствателна станция, работеща при висока скорост на обработка или има съмнение, че съдържа инхибитори, тя трябва да се промие. Ресуспендираната утайка се утаява или центрофугира след разбъркване, отлива се супернатантата и промитата с нова минерална среда утайка отново се ресуспендира. Тази процедура се повтаря докато се прецени, че утайката е свободна от странични вещества или инхибитор.

След достигане на пълно суспендиране или при необработена утайка, преди употреба се отделя проба за определяне на сухото тегло на суспендираните частици.

Друга възможност е да се хомогенизира активната утайка (3-5 g суспендирани частици/l). Утайката се обработва в механичен хомогенизатор в продължение на 2 min при средна скорост. Хомогенизираната утайка се утаява за 30 min или по-дълго, ако е необходимо, и течността се отлива, а утайката се използва като посявка (инокулант) след 10-кратно разреждане в минерална среда.

I.6.4.2. *Други източници на инокуланти*

Инокулантите могат да произхождат от оттока на ГСПОВ или от лабораторно звено, получаващи предимно битови отпадъчни води. Взема се прясна проба и се съхранява при аеробни условия по време на транспортирането. Оставя се да се утаи за 1 час или се филтрира през груб хартиен филтър, а отлятата течност или филтратът се запазват при аеробни условия, докогато се изисква. От този тип култура могат да се използват до 100 ml на литър среда.

Друг източник на инокулант са повърхностните води. В този случай се взема проба от подходяща повърхностна вода, например речна, езерна, и се съхранява при аеробни условия, докато се изисква. Ако е необходимо, инокулантът се концентрира чрез филтриране или центрофугиране.

I.6.5. **Предварителна подготовка на микроорганизмите**

Микроорганизмите могат да се адаптират предварително към условията на експеримента, но не и към изпитваното вещество. Предварителната подготовка се състои от аериране на активната утайка в минерална среда или в оттока в продължение на 5-7 дни при температурата на изпитването. Предварителната подготовка понякога подобрява точността на методите за изпитване чрез намаляване стойностите на контролната проба. Счита се, че е излишно посевките за метода на MITI да се подготвят предварително.

I.6.6. **Абиотични контроли**

Когато се налага, се прави проверка за възможно абиотично разграждане на изпитваното вещество чрез определяне изразходването на DOC, потреблението на кислород или отделянето на въглероден диоксид в стерилни контроли, несъдържащи инокуланта. Пробата се стерилизира чрез филтриране през мембранен филтър (0.2-0.45 μm) или чрез добавяне на подходящо токсично вещество в съответна концентрация. Ако се използва мембранна филтрация, пробите се взимат асептично, за да се поддържа стерилността. Ако не е предварително определена адсорбцията на изпитваното веществ, методите за изпитване, които измерват биоразграждането като изразходване на DOC, по-специално при инокуланти от активна утайка, следва да включват и абиотична контрола, която е посята с инокулант и отровена.

I.6.7. **Брой на колбите**

Броят на колбите при един типичен опит е описан под заглавието на всеки от методите за изпитване.

Могат да се използват следните видове колби:

Суспензия за изпитване: съдържа изпитваното вещество и инокуланта.

Контролна проба за инокуланта: съдържа само инокулант.

Проба за контрол на процедурата: съдържа сравнителното вещество и инокуланта.

Проба за абиотичен стерилен контрол: стерилна, съдържа изпитвано вещество (виж I.6.6).

Проба за контрол на адсорбцията: съдържа изпитвано вещество, инокулант и стерилизиращ агент.

Контрола за токсичност: съдържа изпитвано вещество, сравнително вещество и инокулант.

Задължително е определянето в изпитваната суспензия и в контролната проба за инокуланта да се правят успоредно. Препоръчително е определянията и в другите колби да се изпълняват също така успоредно.

Това, обаче, невинаги е възможно. Трябва да се осигури вземане на достатъчно проби или отчитания, за да може да се позволи оценяването на процента на разграждане през 10-дневния период.

I.7. ДАННИ И ИЗЧИСЛЯВАНЕ

При изчисляването на процентното разграждане D_t се използват средните стойности от измерване на две повторения на параметъра в съдовете за изпитване и в контролата за инокуланта. Формулите са разяснени по-долу в разделите за специфичните методи за изпитване. Ходът на разграждането се изрязява графично, като се отбелязва 10-дневният период. Изчислява се и се нанася в протокола достигнатия процент на разграждане в края на 10-дневния период и стойността при платото или в края на изпитването, което от двете е по-подходящо

При респирометрични изпитвания азотсъдържащи съединения могат да повлияват потреблението на кислород поради нитрификацията (виж приложения 2 и 5).

I.7.1. **Разграждане, измервано чрез определяне на разтворения органичен въглерод (DOC)**

Процентът на разграждане D_t за всяко време, в което е взета една проба, трябва да се изчислява поотделно за колбите, съдържащи изпитваното вещество, като се използват средните стойности от две повторни измервания на DOC с оглед да може да се оцени валидността на изпитването (виж 1.5.2). За изчислението се използва следното уравнение:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

където:

D_t = % разграждане за време t,

C_o = средна начална концентрация на DOC в среда с инокулант, съдържаща изпитваното вещество (mg DOC/l),

C_t = средна концентрация на DOC в среда с инокулант, съдържаща изпитваното вещество към времето t (mg DOC/l),

C_{bo} = средна начална концентрация на DOC в контролна проба с инокулант в минерална среда (mg DOC/l),

C_{bt} = средна концентрация на DOC в контролна проба с култура в минерална среда към времето t (mg DOC/l).

Всички концентрации се измерват експериментално.

I.7.2. **Разграждане, измервано чрез специфичен анализ**

Когато са достъпни специфични аналитични данни, първоначалното биоразграждане се изчислява по формулата:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

където:

D_t = % на разграждане за времето t, нормално 28 дни,

S_a = остатъчно количество от изпитваното вещество в среда с инокулант към края на изпитването (mg),

S_b = остатъчно количество от изпитваното вещество в контролната проба с вода/среда, към която е прибавено само изпитваното вещество (mg).

I.7.3. **Абиотично разграждане**

Когато се използва стерилна абиотична контрола, за изчисляване на процента на абиотичното разграждане се използва

$$\% \text{ абиотично разграждане } = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

където:

$C_{s(o)}$ = концентрация на DOC в стерилната контрола към деня 0

$C_{s(t)}$ = концентрация на DOC в стерилната контрола към деня t

I.8. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

По възможност протоколът от изпитването трябва да съдържа следното:

— изпитвани и сравнителни химични вещества и тяхната чистота,

— условия на изпитването,

— инокулант: естество и място на вземане и всякакво предварително третиране,

— съотношение и естество на индустриалните отпадъци в канализацията, ако са известни,

— продължителност на изпитването и температура,

— начин на обработка, в случай на трудно разтворими химични вещества,

— приложен метод за изпитване; следва да бъдат представени научно-обосновани причини обяснение за всяка промяна в процедурата,

— таблица с данни,

— всякакви наблюдавани явления на инхибиране,

— всяко наблюдавано абиотично разграждане,

— специфични данни от химичен анализ, ако са достъпни,

— аналитични данни от междинните продукти, ако са достъпни,

— следва ясно да са обозначени кривата/диаграмата на процента на разграждане във времето за изпитваните и за сравнителните вещества; латентната фаза (лаг-фазата), фазата на разграждане, 10-дневния период от време и наклона (виж приложение 1). Ако изпитването се съгласува с критериите за валидност, за графиката може да се използва средният процент на разграждане в колбите, съдържащи изпитваното вещество,

— процента на усвояване след 10-дневен период и при платото или в края на изпитването.

ЧАСТ II. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА DOC ЧРЕЗ СКОРОСТТА НА ОТМИРАНЕ (Метод B.4-A)

II.1. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Един измерен обем от бактериална култура в минерална среда, съдържаща позната концентрация на изпитваното вещество (10-40 mg DOC/l) като единствен номинален източник на органичен въглерод, се аерира на тъмно или при дифузна светлина при 22 ± 2 °C.

Разграждането се следи чрез анализ на DOC на чести интервали през един 28-дневен период от време. Степента на биоразграждане се изчислява чрез изразяване на концентрацията на изразходвания DOC (коригирана с тази на контролната проба с инокулант като процент от първоначалната концентрация. Степента на първичното биоразграждане може също да се изчисли от допълнителния химичен анализ, направен в началото и в края на инкубацията.

II.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

II.2.1. **Апаратура**

а) конични колби, напр. 250 ml до 2 l, в зависимост от необходимия обем за анализа на DOC;

б) клатачна машина за разполагане на коничните колби или с автоматично регулиране на температурата, или използвана в пространство с постоянна температура, и с достатъчна мощност, за да се поддържат аеробни условия във всички колби;

в) апарат за филтриране, с подходящи мембрани;

г) анализатор за DOC;

д) апарат за определяне на разтворен кислород;

е) центрофуга.

II.2.2. **Приготвяне на минерална среда**

За приготвянето на изходните разтвори виж I.6.2.

Смесват се 10 ml от разтвор (а) с 800 ml вода за разреждане, добавя се по 1 ml от разтвори (б) до (г) и се долива до 1 l.

II.2.3. **Предварителна подготовка и приготвяне на инокуланта**

Инокулантът може да произхожда от различни източници: активна утайка, отток от канализация, повърхностни води, почви или смес от всички тях.

Виж I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. и I.6.5.

II.2.4. **Подготовка на колбите**

Като един пример: наливат се порции от по 800 ml минерална среда в конични колби от 2 l и се добавят достатъчни обеми от изходните разтвори на изпитваните и сравнителните вещества в отделни колби до достигане на концентрация на веществата, еквивалентна на 10-40 mg DOC/l. Проверяват се стойностите на pH и се коригират, ако е необходимо до 7.4. В колбите се добавя инокулантът от активна утайка или друг източник (виж I.6.4.) до достигане на крайна концентрация не по-голяма от 30 mg суспендирани частици на литър. Приготвят се също така контролни проби с инокулант в минерална среда, но без изпитваното или сравнителното вещество.

Ако е необходимо, използва се един съд, за да се провери възможният ефект на инхибиране на изпитваното вещество чрез посявка на разтвор, съдържащ в минерална среда съпоставими концентрации от изпитваното и сравнително вещество.

Също така, ако се налага, се зарежда допълнителна стерилна колба, за да се провери дали изпитваното вещество се разгражда абиотично, като се използва разтвор на веществото без инокулант (виж I.6.6.).

Допълнително, ако се подозира, че изпитваното вещество се адсорбира значително върху стъклото, утайката и т.н., се прави предварителна оценка на степента на адсорбция, а с това и на пригодността на метода за изпитване на веществото (виж таблица 1). Зарежда се колба, съдържаща изпитваното вещество, инокуланта и стерилизиращ агент.

Във всички колби се долива минерална среда до 1 l и след размесване се взема проба от всяка колба за определяне на началната концентрация на DOC (виж приложение 2.4). Отворите на колбите се покриват например с алуминиево фолио така, че да се позволи свободен обмен на въздух между колбата и околната атмосфера. След това, съдовете се поставят в клатачната машина за започване на изпитването.

II.2.5. **Брой на колбите при един типичен експеримент**

Колби 1 и 2: изпитвана суспензия

Колби 3 и 4: контролна проба с инокулант

Колба 5: проба за контрол на процедурата

за предпочитане, когато е необходимо:

Колба 6: абиотична стерилна контрола

Колба 7: проба за контрол на адсорбцията

Колба 8: контрола за токсичност

Виж също I.6.7.

II.2.6. **Изпълнение на изпитването**

По време на цялото изпитване се определя концентрацията на DOC двукратно във всяка колба през известни интервали от време, достатъчно често, за да може да се определи началото на 10-дневния период и процента на изразходване в края на 10-дневния период. Взема се само минималния обем от изпитваната суспензия, необходим за всяко определяне.

Ако е необходимо, преди вземането на пробите се възстановяват загубите от изпарение в колбите чрез прибавяне на достатъчно количество вода за разреждане (I.6.1). При вземането на проба, средата с инокуланта се разклаща добре и се проверява, дали материалът, прилепнал по стените на съдовете, е разтворен или суспендиран преди да се вземе пробата. Веднага след вземането, пробата се филтрира през мембранен филтър или центрофугира (приложение 2.4). В същия ден се прави анализ на филтрираните или центрофугираните проби, в противен случай те се съхраняват при 2-4 °C за максимум 48 часа или под – 18 °C за по-дълги периоди.

II.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

II.3.1. **Обработка на резултатите**

Пресмята се процентът на разграждане за времето t, както е дадено в I.7.1. (определяне на DOC) или по избор, в I.7.2. (специфичен анализ).

Всички резултати се записват в предоставените таблици с данни

II.3.2. **Валидност на резултатите**

Виж I.5.2.

II.3.3. **Протокол от изпитването**

Виж I.8.

II.4. ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ

По-долу е даден примерен протокол за данни.

ИЗПИТВАНЕ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА DOC ЧРЕЗ СКОРОСТТА НА ОТМИРАНЕ

1. **ЛАБОРАТОРИЯ**

2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

3. **ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО**

Име:

Концентрация на изходния разтвор: …mg/l като химично вещество

Начална концентрация в средата: …mg/l като химично вещество

4. **ИНОКУЛАНТ**

Източник:

Извършена обработка:

Предварителна подготовка, ако има такава:

Концентрация на суспендирани вещества в реакционната смес: mg/l

5. **ОПРЕДЕЛЯНИЯ НА ВЪГЛЕРОД**

Анализатор на въглерод:

	Колба номер		DOC след n дни (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Изпитвано вещество плюс инокулант	1	a_1					
		a_2					
		a, средно $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, средно $C_{b(t)}$					
Контролна проба с инокулант без изпитваното вещество	3	c_1					
		c_2					
		c, средно $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		D, средно $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ОЦЕНЯВАНЕ НА ПЪРВИЧНИ ДАННИ**

Колба №.		% на разграждане след n дни				
		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				
Средно (1)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(1) D_1 и D_2 не следва да се осредняват, ако има значителна разлика помежду им.

Забележка: Подобни протоколи могат да се използват за сравнителното вещество и за контролата за токсичност.

7. **АБИОТИЧНА КОНТРОЛНА ПРОБА (по избор)**

	Време (дни)	
	0	t
Концентрация на DOC (mg/l) в стерилната контрола	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ абиотично разграждане } = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **СПЕЦИФИЧЕН ХИМИЧЕН АНАЛИЗ**

	Остатъчно количество от изпитваното вещество в края на изпитването (mg/l)	% на първично разграждане
Стерилна контрола	S_b	
Среда за изпитване с инокулант	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ЧАСТ III. МОДИФИЦИРАН СКРИНИНГ НА ОИСР (Метод B.4-Б)

III. 1. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

В едно измерено количество минерална среда, съдържаща позната концентрация на изпитваното вещество (10-40mg DOC на литър) като единствен номинален източник на органичен въглерод, се инокулират с 0,5 ml отток на литър среда. Сместа се аерира на тъмно или на дифузна светлина при 22 ± 2 °C.

Разграждането се следи чрез анализ на DOC на чести интервали за 28-дневен период . Степента на биоразграждане се изчислява чрез изразяване на концентрацията на изразходвания DOC (коригирана с тази на контролата с инокуланта) като процент от първоначалната концентрация. Степента на първичното биоразграждане може също да се изчисли от допълнителен химичен анализ, направен в началото и в края на инкубацията.

III.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

III.2.1. **Апаратура**

а) конични колби, 250 ml до 2 l, в зависимост от необходимия обем за анализ на DOC;

б) клатачна машина за разполагане на коничните колби или с автоматично регулиране на температурата, или използвана в пространство с постоянна температура, и с достатъчна мощност, за да се поддържат аеробни условия във всички колби.

в) апарат за филтриране с подходящи мембрани;

г) анализатор за DOC;

д) апарат за определяне на разтворен кислород;

е) центрофуга.

III.2.2. **Приготвяне на минерална среда**

За приготвянето на изходните разтвори виж 1.6.2.

Смесват се 10 ml от разтвор (а) с 80 ml вода, прибавят се по 1 ml от разтвори от (б) до (г) и се долива до 1 l.

Този метод използва само 0,5 ml отток на литър като инокулант и поради това, средата трябва да се подсили с микроелементи и растежни фактори. Това се прави чрез добавяне на 1 ml от всеки от следните разтвори на литър от крайната среда:

Разтвор на микроелементи:

Манганов сулфат тетрахидрат, $MnSO_4 . 4H_2O$	39.9 mg
Борна киселина, H_3BO_3	57.2 mg
Цинков сулфат хептахидрат, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42.8 mg
Амониев хептамолибдат, $(NH_4)6\ Mo_7O_{24}$	34.7 mg
Fe-хелат ($FeCl_3$ етилендиаминтетраоцетна киселина)	100 mg

Разтварят се във вода и се доливат с разреждаща вода до 1 литър.

Разтвор на витамини:

Екстракт от дрожди	15,0 mg

Разтваря се екстракт от дрожди в 100 ml вода. Стерилизира се чрез филтриране през мембранен филтър 0.2 µm или се приготвя пресен.

III.2.3. **Приготвяне и предварителна подготовка на инокулант**

Инокулантът се взема от оттока на ГСПОВ или лабораторно звено, приемаща предимно битови отпадъчни води. Виж I.6.4.2. и I.6.5.

Използва се 0,5 ml на литър минерална среда.

III.2.4. **Подготовка на колбите**

Като един пример: наливат се порции от по 800 ml минерална среда в конични колби от 2 l и се добавят достатъчни обеми от изходните разтвори на изпитваните и сравнителните вещества в отделни колби до достигане на концентрация на химичното вещество, еквивалентна на 10-40 mg DOC/l. Проверяват се стойностите на pH и се коригират, ако е необходимо до 7.4. В колбите се добавя инокулант от оттока на ГСПОВ в количество 0.5 ml/l (виж I.6.4.2) Приготвят се също така контролни проби с инокулант в минерална среда, но без изпитваното или сравнителното вещество.

Ако е необходимо, използва се един съд, за да се провери възможният ефект на инхибиране на изпитваното вещество чрез посявка на разтвор, съдържащ в минерална среда съпоставими концентрации от изпитваното и сравнителното вещество. Също така, ако се налага, се зарежда допълнителна стерилна колба, за да се провери дали изпитваното вещество се разгражда абиотично, като се използва разтвор на веществото без инокулант (виж I.6.6.).

Допълнително, ако се подозира, че изпитваното вещество се адсорбира значително върху стъкло, утайка и т.н., се прави предварителна оценка на степента на адсорбция, а с това и на пригодността на метода за изпитване на химичното вещество (виж таблица 1). Зарежда се колба, съдържаща изпитваното вещество, инокуланта и стерилизиращ агент.

Във всички колби се долива минерална среда до 1 l и след размесване се взема проба от всяка колба за определяне на началната концентрация на DOC (виж приложение 2.4). Отворите на колбите се покриват например с алуминиево фолио така, че да се позволи свободен обмен на въздух между колбата и околната атмосфера. След това съдовете се поставят в клатачната машина за започване на изпитването.

III.2.5. **Брой на колбите при типичен експеримент**

Колби 1 и 2: изпитвана суспензия

Колби 3 и 4: контролна проба с инокулант

Колба 5: проба за контрол на процедурата

за предпочитане, когато е необходимо:

Колба 6: абиотична стерилна контрола

Колба 7: проба за контрол на адсорбцията

Колба 8: контрола за токсичност

Виж също I.6.7.

III.2.6. **Изпълнение на изпитването**

По време на цялото изпитване се определя концентрацията на DOC двукратно във всяка колба през известни интервали от време, достатъчно често, за да може да се определи началото на 10-дневния период и процента на изразходване в края на 10-дневния период. Взема се само минималния обем от изпитваната суспензия, необходим за всяко определяне.

Ако е необходимо, преди вземането на пробите се възстановяват загубите от изпарение в колбите чрез прибавяне на достатъчно количество вода за разреждане (I.6.1). При вземането на проба, средата с инокуланта се разклаща добре и се проверява, дали материалът, полепнал по стените на съдовете, е разтворен или суспендиран преди да се вземе пробата. Веднага след вземането пробата се филтрира през мембранен филтър или центрофугира (приложение 2.4). В същия ден се прави анализ на филтрираните или центрофугираните проби, в противен случай те се съхраняват при 2-4 °C за максимум 48 часа или под – 18 °C за по-дълги периоди.

III.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

III.3.1. **Обработка на резултатите**

Пресмята се процента на разграждане за времето t, както е дадено в I.7.1. (определяне на DOC) или по избор, в I.7.2. (специфичен анализ).

Всички резултати се записват в предоставените таблици с данни.

III.3.2. **Валидност на резултатите**

Виж I.5.2.

III.3.3. **Протокол от изпитването**

Виж I.8.

III.4. ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ

По-долу е даден примерен протокол за данни.

МОДИФИЦИРАНО ИЗПИТВАНЕ НА ОИСР

1. **ЛАБОРАТОРИЯ**

2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

3. **ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО**

Име:

Концентрация на изходния разтвор: mg/l като химично вещество

Начална концентрация на средата: mg/l като химично вещество

4. **ИНОКУЛАНТ**

Източник:

Извършена обработка:

Предварителна подготовка, ако има такова:

Концентрация на суспендирани частици в реакционната смес: mg/l

5. **ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЪГЛЕРОДА**

Анализатор на въглерод

	Колба No.		DOC след n дни (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Изпитвано вещество плюс инокулант	1	a_1					
		a_2					
		a, средно $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		B, средно $C_{b(t)}$					
Контролен инокулант без изпитваното вещество	3	c_1					
		c_2					
		C, средно $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		D, средно $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ОЦЕНЯВАНЕ НА ПЪРВИЧНИТЕ ДАННИ**

Колба №		% на разграждане след n дни				
		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				
Средна стойност (1)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(1) D_1 и D_2 не трябва да се осредняват, ако имат значителна разлика.

Забележка: Подобни протоколи могат да се използват за сравнителното химично вещество и за контролата за токсичност.

7. **АБИОТИЧНА КОНТРОЛА (по избор)**

	Време (дни)	
	0	t
Концентрация на DOC (mg/l) в стерилната контрола	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ абиотично разграждане } = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **СПЕЦИФИЧЕН ХИМИЧЕН АНАЛИЗ (по избор)**

	Остатъчно количество от изпитваното вещество в края на изпитването (mg/l)	% на първично разграждане
Стерилна контрола	S_b	
Среда за изпитване с инокуланта	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ЧАСТ IV. МЕТОД ЗА ОТДЕЛЯНЕ НА CO_2 (Метод B.4-B)

IV.1. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Един измерен обем на инокулант в минерална среда, съдържаща позната концентрация от изпитваното химично вещество (10-20 mg DOC или TOC/l) като единствен номинален източник на органичен въглерод, се аерира чрез преминаване на контролиран дебит на чист от въглероден диоксид въздух на тъмно или при дифузна светлина. Разграждането се проследява повече от 28 дни чрез определяне на произведения въглероден диоксид, който се улавя в бариев или натриев хидроксид и се измерва чрез титруване на остатъчния хидроксид или като неорганичен въглерод. Количеството въглероден диоксид, произведено от изпитваното вещество (коригирано с това, което произхожда от контролния инокулант) се изразява като процент от $ThCO_2$. Степента на биоразграждане може също да бъде изчислена чрез допълнителен анализ на DOC, който се прави в началото и в края на инкубацията.

IV.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

IV.2.1. **Апаратура**

а) колби от 2 до 5 l, всяка снабдена с тръба за аериране достигаща почти до дъното на съда и отдушник;

б) магнитни бъркалки, при оценяване на трудно разтворими химични вещества;

в) колби за абсорбция на газа;

г) уред за контролиране и измерване на въздушния поток;

д) апарат за поглъщане на въглероден диоксид, за подготовка на въздух несъдържащ въглероден диоксид; съответно може да се използва смес от несъдържащ CO_2 кислород и несъдържащ CO_2 азот от газови колби в правилно съотношение (20 % O_2 : 80 % N_2);

е) уред за определяне на въглероден диоксид, или чрез титруване или чрез някаква друга форма на анализатор на неорганичен въглерод;

ж) уред за мембранно филтриране (по избор);

з) анализатор на DOC (по избор).

IV.2.2. **Приготвяне на минерална среда**

За приготвянето на изходните разтвори, виж I.6.2.

Смесват се 10 ml от разтвор (а) с 800 ml разреждаща вода, прибавят се по 1 ml от разтворите (б) до (г) и се долива до 1 l .

IV.2.3. **Приготвяне и предварителна подготовка на инокуланта**

Инокулантът може да произлиза от различни източници: активна утайка, отточни канални води, повърхностни води, почви или смес от всички тях.

Виж I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 и I.6.5.

IV.2.4. **Приготвяне на колбите**

Като пример са дадени обемите и теглата, необходими за 5-литрови колби, съдържащи 3 l от суспензията. Ако се използват по-малки обеми, стойностите се променят съответно, но трябва да се осигури точно измерване на образувания въглероден диоксид.

Във всяка 5-литрова колба се прибавят 2400 ml минерална среда. Прибавя се подходящ обем от приготвената активна утайка (виж I.6.4.1 и I.6.5), за да се получи концентрация на суспендираните частици не по-висока от 30 mg/l в крайните 3 l смес на инокуланта.

Друга възможност е първо да се разреди приготвената утайка до суспензия от 500-1000 mg/l в минералната среда, преди аликвотна част от нея да се прибави към съдържанието на колба от 5 l с оглед да се получи концентрация от 30 mg/l. Това осигурява по-голяма точност. Могат да се използват и други източници на инокулант (виж I.6.4.2.).

Тези смеси с инокулант се аерират с несъдържащ CO_2 въздух в продължение на 12 часа, за да се изчисти системата от въглероден диоксид.

Прибавят се поотделно известни обеми от изходните разтвори на изпитваното и сравнителното вещество към два броя колби до получаване на концентрации на дадените химични вещества от 10 до 20 mg DOC или TOC/l. Оставят се няколко колби без добавка на вещества като контролен инокулант. Трудно разтворимите вещества за изпитване се прибавят директно в колбите на базата на обем или на тегло и с тях се процедира както е описано в приложение 3.

Ако се изисква, една колба се използва за проверка на възможен инхибиторен ефект на изпитваното химично вещество чрез прибавяне на изпитваното и сравнителното вещества при същата концентрация, както в другите колби.

Също така, ако се изисква, една стерилна колба се използва за проверка дали изпитваното вещество се разгражда абиотично, използвайки разтвор на веществото без инокулант (виж I.6.6.). Стерилизира се чрез прибавяне на токсично вещество с подходяща концентрация.

Обемите на суспензиите във всички колби се доливат до 3 l чрез прибавяне на минерална среда, предварително аерирана с въздух, свободен от CO_2. По избор могат да се отделят проби за анализ на DOC (виж приложение 2.4) и/или за друг специфичен анализ. Абсорбционните колби се свързват с отдушниците на колбите.

Ако се използва бариев хидроксид, се присъединяват три абсорбционни колби, като всяка съдържа по 100 ml от 0,0125 M (mol/l) разтвор на бариев хидроксид, последователно към всяка 5-литрова колба. Разтворът не трябва да съдържа утаен сулфат и карбонат и неговата концентрация трябва да се определя непосредствено преди употреба. Ако се използва натриев хидроксид, се присъединяват два абсорбционни съда, като вторият действа като контрола на първия, за да се покаже, че цялото количество въглероден диоксид е абсорбирано в първия съд. За абсорбция са подходящи колби, които се затварят с капачки от серумни колби. Прибавя се 200 ml 0,05 M (mol/l) натриев хидроксид към всяка колба, което е достатъчно да абсорбира цялото количество въглероден диоксид, отделен когато изпитваното вещество се разгради напълно. Натриевият хидроксид, даже прясно приготвен, съдържа следи от карбонати. Това се коригира чрез намаляване със стойността на карбоната, съдържащ се в контролната проба.

IV. 2.5. **Брой на колбите при типичен експеримент**

Колби 1 и 2: изпитвана суспензия

Колби 3 и 4: контролна проба с инокуланта

Колба 5: проба за контрол на процедурата

и за предпочитане, когато е необходимо:

Колба 6: абиотична стерилна контрола

Колба 7: контрола за токсичност

Виж също I.6.7.

IV.2.6. **Изпълнение на изпитването**

Изпитването започва с барботиране на суспензиите с въздух без CO_2 при дебит 30-100 ml/min. Периодично се вземат проби от абсорбента на въглероден диоксид за анализ на съдържанието на CO_2. По време на първите десет дни се препоръчва анализът да се прави всеки втори или трети ден и след това всеки пети ден до 28-ия ден, така че да бъде определен 10-дневния период.

На 28-мия ден се вземат проби (по избор) за DOC и/или специфичен анализ, измерва се pH на суспензиите и се добавя 1 ml концентрирана солна киселина към всяка колба. Колбите се аерират 12 часа, за да се изчисти въглеродния диоксид от изпитваните суспензии. На 28-ия ден се прави последен анализ за отделения въглероден диоксид.

В дните на измерване на CO_2 се откача абсорберът с бариев хидроксид, който е най-близо до колбата и разтворът на хидроксид се титрува с 0,05 M [mol/l] HCl, като се използва фенолфталеин като индикатор. Преместват се останалите абсорбери с едно място по-близо до колбата и се поставя нов абсорбер съдържащ 100 ml пресен 0,0125 M [mol/l] бариев хидроксид най-накрая на редицата. Необходимото титруване се прави, например, когато се вижда значителна утайка в първия абсорбер и преди да има видима във втория, или най-малко веднъж на седмица. При избран абсорбент NaOH се взема малка проба със спринцовка (в зависимост от характеристиките на използвания апарат за анализ на въглерод) от разтвора на натриевия хидроксид от абсорбера най-близо до колбата. Пробата се инжектира в частта за неорганичен въглерод на анализатора на въглерод за директен анализ на отделения въглероден диоксид.

Съдържанието на втория абсорбер се анализира едва в края на изпитването, за да се коригира за някакъв евентуален пренос на въглероден диоксид.

IV.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

IV.3.1. **Обработка на резултатите**

Количеството уловен в абсорбера CO_2 след титруване се дава като:

$$mg\ CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

където:

V = обема M (mol/l) на HCl, използвана за титруване на 100 ml от абсорбера (ml),

C_B = концентрация на разтвора на бариевия хидроксид (mol/l),

C_A = концентрация на разтвора на солна киселина (mol/l),

Ако C_B е 0.0125 mol/l и C_A е 0.05 mol/l, титрирането за 100 ml бариев хидроксид е 50 ml и теглото на CO_2 се дава от:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{титрувани HCl(ml)} = 1{,}1 \times \text{ ml HCl}$$

Така в този случай, факторът за изчисляване на отделеното количество mg CO_2 по обема на HCl, изразходвана за титруване, е 1,1.

Изчисляват се поотделно теглата на отделения CO_2 произведен само от инокуланта и от инокуланта плюс изпитваното вещество, като се използват съответните стойности от титруването; а разликата е теглото на CO_2,. отделен само от разграждането на изпитваното вещество.

Например, ако само при инокуланта е титрувано с 48 ml, а при инокуланта плюс изпитваното вещество с 45 ml, тогава:

CO_2 от инокуланта = 1.1 × (50-48) = 2,2 mg

CO_2 от инокуланта плюс изпитваното вещество = 1.1 × (50-45) = 5,5 mg,

и така теглото на произведения CO_2 от изпитваното вещество е 3,3 mg.

Процентът на биоразграждане се изчислява от:

$$\%\ \text{разграждане} = \frac{\text{(mg) произведен } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{(mg) прибавено изпитвано вещество}}$$

или

$$\%\ \text{разграждане} = \frac{\text{(mg) } CO_2 \text{ произведен } \times 100}{\text{(mg) ТОС добавено при изпитване}}$$

където 3,67 е фактор на преобразуване (44/12) на въглерода във въглероден диоксид.

Процентът разграждане се получава след всеки интервал от време чрез прибавяне на процентните стойности за $ThCO_2$ изчислени за всеки от дните до времето, до което е измервано.

При абсорберите с натриев хидроксид количеството произведен въглероден диоксид се изчислява, изразено като неорганичен въглерод (IC) (mg), чрез умножаване на концентрацията на IC в абсорбента по обема на абсорбента.

Процентът на разграждане се изчислява от:

Изчислява се намалението на DOC (по избор), както е описано в I.7. Тези и всички останали резултати се записват във формуляра за данни.

IV.3.2. **Валидност на резултатите**

Съдържанието на неорганичен въглерод (IC) в суспензията с изпитваното вещество в минерална среда в началото на изпитването трябва да бъде по-малко от 5 % от общия въглерод (TC) и общото отделяне на CO_2 от контролния инокулант в края на изпитването нормално не следва да надвишава 40 mg/l среда. Ако получените стойности са по-високи от 70 mg CO_2/литър, резултатите и експерименталната техника трябва критично да се проверят.

Виж също I.5.2.

IV.3.3. **Протокол от изпитването**

Виж I.8.

IV. 4. ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ

Тук е даден примерен протокол за данни.

ИЗПИТВАНЕ ЗА ОТДЕЛЯНЕ НА ВЪГЛЕРОДЕН ДИОКСИД

1. **ЛАБОРАТОРИЯ**

2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

3. **ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО**

Име:

Концентрация на изходния разтвор: mg/l като химично вещество

Начална концентрация в средата: mg/l като химично вещество

Общ въглерод, добавен към колбата: mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **ИНОКУЛАНТ**

Източник:

Извършена обработка:

Предварителна подготовка, ако има такава:

Концентрация на суспендирани вещества в реакционната смес: mg/l

5. **ОТДЕЛЯНЕ НА ВЪГЛЕРОДЕН ДИОКСИД И РАЗГРАЖДАНЕ**

Метод: $Ba(OH)_2$ (или NaOH)

Време (ден)	Образуван CO_2 от изпитването (mg)		Образуван CO_2 от контролната проба (mg)		Кумулиран CO_2 (mg) (изпитване минус средно от контролата)		$\frac{\text{кумулиран } CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 2	средно	3 4	средно	1	2	1	2	средно
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Забележка: подобни форми могат да се използват за сравнителното вещество и за контролата за токсичност.

6. **АНАЛИЗ НА ВЪГЛЕРОД (не е задължителен)**

Анализатор на въглерод: …

Време (ден)	Контрола mg/l	Изпитвано вещество mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 ([1])	$C_{b(t)}$	C_t
([1]) или в края на инкубацията		

$$\% \text{ изразходван DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **АБИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ (по избор)**

$$\% \text{ абиотично разграждане} = \frac{CO_2 - \text{образуван } CO_2 \text{в стерилна стъкленица след 28дни (mg)}}{ThCO_2\,(mg)} \times 100$$

ЧАСТ V. ИЗПИТВАНЕ ЧРЕЗ МАНОМЕТРИЧНА РЕСПИРОМЕТРИЯ (Метод B.4-Г)

V.1. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Измерено количество от инокуланта в минерална среда, съдържаща известна концентрация от изпитваното вещество (100 mg/l от изпитваното вещество, така че да даде 50-100 mg ThOD/литър) като единствен номинален източник на органичен въглерод се разбърква в затворена колба при постоянна температура (± 1 °C или още по-точно) за 28 дни. Консумацията на кислород се определя или чрез измерване на количеството кислород (проведен електролитно), необходим да поддържа постоянен газов обем в респирометричната колба, или от изменението на обема или налягането (или комбинация от двете) в апаратурата. Отделеният въглероден диоксид се абсорбира от разтвор на калиев хидроксид или друг подходящ абсорбент. Количеството кислород, погълнат от изпитваното вещество (коригирано с това на контролния инокулант, изпитван успоредно), се изразява като процент от ThOD или ХПК (COD). По избор, първичното биоразграждане може да се изчислява чрез допълнителен специфичен анализ, изпълнен в началото и в края на инкубацията, а пълното биоразграждане чрез анализ на DOC.

V.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

V.2.1. **Апаратура**

а) подходящ респирометър;

б) устройство за регулиране на температурата, поддържащо ± 1 °C или по-добро;

в) уред за мембранно филтриране (по избор);

г) уред за анализ на въглерод (по избор).

V.2.2. **Приготвяне на минерална среда**

За приготвянето на изходните разтвори виж I.6.2.

Смесват се 10 ml от разтвор (а) с 800 ml вода за разреждане, прибавя се по 1 ml от разтвори (б) до (г) и се долива до 1 литър.

V.2.3. **Приготвяне и предварителна подготовка на инокуланта**

Инокулантът може да произхожда от различни източници: активна утайка, отток на канални води, повърхностни води, почви или смес от всички.

Виж I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 и I.6.5.

V.2.4. **Приготвяне на колбите**

Приготвят се разтвори от изпитвания и сравнителното вещество на отделни партиди, еквивалентни на минерална среда с концентрация, обикновено 100 mg вещество/литър (даваща най-малко 50-100 mg ThOD/литър), като се използват изходните разтвори.

Изчислява се ThOD на базата на образуване на амониеви соли, освен ако не се очаква нитрификация, когато изчисляването трябва да се базира върху образуването на нитрат (виж приложение 2.2)

Определят се стойностите на pH и ако е необходимо се коригират до 7,4 ± 0,2.

Трудно разтворими вещества се прибавят на по-късни етапи (виж по-долу).

Ако трябва да се определя токсичността на изпитваното вещество, се приготвя допълнително разтвор в минерална среда, съдържащ изпитваното и сравнителното вещество в същите концентрации, както в индивидуалните разтвори.

Ако се изисква измерване на физико-химичното усвояване на кислорода, се приготвя разтвор на изпитваното вещество, обикновено 100 mg ThOD/литър, който се стерилизира чрез прибавяне на подходящо токсично вещество (виж I.6.6).

Необходимите обеми от разтворите на изпитвания и сравнителното вещество се дублират най-малко в по две колби. Към други колби се налива само минерална среда (за контролния инокулант) и, ако се изисква, смесен разтвор от изпитваното и сравнителното вещества и стерилен разтвор.

Ако изпитваното вещество е трудно разтворимо, се прибавя директно на този етап, на базата на обем или на тегло, или се процедира както е описано в приложение 3. Прибавя се калиев хидроксид, гранули натриева вар (смес от натриев хидроксид и калциев оксид) или друг абсорбент в клетките за абсорбция на CO_2.

V.2.5. **Брой на колбите при типичен експеримент**

Колби 1 и 2: изпитвана суспензия

Колби 3 и 4: контролна проба с инокулант

Колба 5: проба за контрол на процедурата

за предпочитане, когато е необходимо:

Колба 6: стерилна контрола

Колба 7: контрола за токсичност

Виж също I.6.7.

V.2.6. **Изпълнение на изпитването**

Съдовете се оставят да достигнат желаната температура и подходящите съдове се посяват с приготвена активна утайка или друг източник на инокулант, така че да се получи концентрация на суспендирани частици не по-висока от 30 mg/l. Апаратурата се сглобява, включва се разбъркването, проверява се за херметичност по отношение на въздуха и започва измерването на поемането на кислород. Обикновено не са необходими повече грижи освен отчитането на необходимите данни и ежедневни проверки дали се поддържа точната температура и съответното разбъркване.

Усвояването на кислород се изчислява по редовно правени отчитания, на чести интервали, като се използват методите, дадени от производителя на апаратурата. В края на инкубацията, нормално 28 дни, се измерва pH на съдържанието на колбите, по-специално ако поемането на кислород е ниско или по-високо от $ThOD_{NH4}$ (за азот-съдържащи съединения).

Ако е необходимо, в началото и в края се вземат проби от респирометричните колби за анализ на DOC или на друго специфично вещество (виж приложение 2.4). При първото вземане на проба трябва да е сигурно, че е известен обема на оставащата в колбата суспензия. Когато кислородът се консумира от N-съдържащо съединение, се определя увеличението на концентрацията на нитрит и нитрат за 28 дни и се изчислява корекцията за кислорода, консумиран чрез нитрификацията (приложение 5).

V.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

V.3.1. **Обработка на резултатите**

Усвоеното количество кислород (mg) от изпитваното вещество след дадено време (коригирано с това на контролния инокулант за същото време), се разделя на теглото на използваното за изпитването вещество. Това дава биохимичната потребност от кислород (BOD), изразена като mg кислород/mg изпитвано вещество, което е

$$BOD = \frac{(mg)O_2,\text{усвоено от изпитваното вещество} - (mg)O_2,\text{усвоен от контролната проба}}{(mg)\text{ изпитвано вещество в колбата}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ за mg изпитвано вещество}$$

Определя се процентът на биологичното разграждане или като:

$$\%\text{ на биоразграждане} = \%ThOD = \frac{BOD\ ((mg)\ O_2/(mg)\text{ химично вещество})}{ThOD\ ((mg)\ O_2/\text{на химично вещество}(mg))} \times 100$$

или като:

$$\%\ COD = \frac{BOD\ ((mg)\ O_2/(mg)\text{ химично вещество})}{COD\ ((mg)\ O_2/\text{на химично вещество}(mg))} \times 100$$

Следва да се отбележи, че тези два метода не дават непременно същата стойност; препоръчително е да се използва последният метод.

За изпитвани вещества, съдържащи азот, се използва подходяща ThOD (NH_4 или NO_3) според това, което се знае или се очаква да стане при наличие на нитрификация (приложение 2.2). Ако има нитрификация, но тя още не е завършила, корекцията за консумиран кислород чрез нитрификацията се изчислява от промените в концентрацията на нитрита и нитрата (приложение 5).

Когато по избор се правят определяния на органичен въглерод и/или на специфично вещество, процентът на разграждане се изчислява, както е описано в I.7.

Всички резултати се записват в приложения протокол за данни.

V.3.2. **Валидност на резултатите**

Кислородът, усвоен от контролния инокулант е нормално 20-30 mg O_2/литър и не трябва да е по-висок от 60 mg/l за 28 дни. Стойности по-високи от 60 mg/l изискват критична проверка на данните и експерименталните техники. Ако стойностите на pH са извън областта 6 – 8,5 и кислородната консумация от изпитваното вещество е по-малко от 60 %, изпитването трябва да се повтори с по-ниска концентрация на изпитваното вещество.

Виж също I.5.2.

V.3.3. **Протокол от изпитването**

Виж I.8.

V. 4. ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ

Тук е даден примерен протокол за данни.

ИЗПИТВАНЕ ЧРЕЗ МАНОМЕТРИЧНА РЕСПИРОМЕТРИЯ

1. **ЛАБОРАТОРИЯ**

2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

3. **ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО**

Име:

Концентрация на изходния разтвор: mg/l

Начална концентрация в средата, C_o: mg/l

Обем на колбата за изпитване (V): ml

ThOD или COD: mg O_2/mg изпитвано вещество (NH_4 или NO_3)

4. **ИНОКУЛАНТ**

Източник: …

Извършена обработка: …

Предварителна подготовка, ако има такава: …

Концентрация на суспендирани частици в реакционната смес: … mg/l

5. **УСВОЯВАНЕ НА КИСЛОРОД: БИОРАЗГРАДИМОСТ**

		Време (ден)											
		0		7		14			21			28	
Усвоен O_2 (mg) от изпитваното вещество	1												
	2												
	a, средно												
Усвоен O_2 (mg) от контролен инокулант	3												
	4												
	b, средно												
Коригирано BOD (mg)	$(a_1 — b_m)$												
	$(a_2 — b_m)$												
BOD за mg	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												
изпитваното вещество $\frac{BHT}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Средно (1)												
V = обем на средата в колбата за изпитването.													

(1) D_1 и D_2 не се осредняват, ако имат значителна разлика.

Забележка: Подобни протоколи може да се използват за сравнителното вещество и за контролата за токсичност.

6. **КОРЕКЦИЯ ЗА НИТРИФИКАЦИЯ (виж допълнение V)**

Ден	0	28	Разлика
i) Концентрация на нитрат (mg N [азот]/литър)			(N)
ii) Кислороден еквивалент(4.57 x N [азот] x V) (mg)	—	—	
iii) Концентрация на нитрит (mg N [азот]/литър)			(N)
iv) Кислороден еквивалент(3.43 x N [азот] x V) (mg)	—	—	
ii + iv) Общ кислороден еквивалент	-	-	

7. **АНАЛИЗ НА ВЪГЛЕРОД (по избор)**

Анализатор на въглерод: …

Време (ден)	Контрола mg/l	Изпитвано вещество mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (1)	(C_{blt})	(C_t)
(1) или в края на инкубацията		

$$\% \text{ употребен DOC } = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **СПЕЦИФИЧНО ВЕЩЕСТВО (по избор)**

S_b = концентрация на физико-химичната (стерилна) контрола на 28-ия ден

S_a = концентрация в колбата с инокулата на 28-ия ден

$$\% \text{ на биоразграждане } = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **АБИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ (по избор)**

a = консумация на кислород в стерилната колба след 28 дни, mg

$$\text{Консумация на } O_2 \text{за mg изпитваното вещество } = \frac{a}{C_o V}$$

(Виж параграфи 1 и 3)

$$\% \text{ на абиотично разграждане } = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

ЧАСТ VI. ИЗПИТВАНЕ ПО МЕТОДА НА ИЗОЛИРАНИТЕ ПРОБИ (Метод B.4-Д)

VI.1. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Разтвор на изпитваното вещество в минерална среда, обикновено 2-5 mg/l, се инокулира със сравнително малък брой микроорганизми от смесена популация и се държи в пълни догоре, затворени колби на тъмно при постоянна температура. Разграждането се следи чрез анализ на разтворения кислород през 28-дневен период. Количеството на усвоения от изпитваното вещество кислород, се коригира с това на успоредно заложения контролен инокулант и се изразява като процент от ThOD или COD.

VI.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

VI.2.1. **Апаратура**

а) колби за BOD със стъклени запушалки, 250-300 ml;

б) водна баня или инкубатор, за съхранение на колбите при постоянна температура (±1 °C или по-точно), без светлина;

в) големи стъклени колби (2-5 литра) за приготвяне на среда и пълнене на колбите за BOD;

г) кислороден електрод или оксиметър, или уреди и реагенти за титруване по Winkler.

VI.2.2. **Приготвяне на минерална среда**

За приготвянето на изходните разтвори, виж I.6.2.

Смесват се по 1 ml от разтвори (а) до (г) и се долива с вода за разреждане до 1 литър.

VI.2.3. **Приготвяне на инокулант**

Инокулант обикновено се взема от оттока на пречиствателна станция или .лабораторно звено, приемащи предимно битови отпадъчни води. Алтернативен източник на инокулант са повърхностните води. Нормално се използва от една капка (0,05 ml) до 5 ml от филтрата за 1 литър среда. Може да са необходими допълнителни опити за да се открие оптималният обем за даден отток (виж I.6.4.2 и I.6.5).

VI.2.4. **Приготвяне на колбите**

Минералната среда се аерира силно в продължение на най-малко 20 min. Всяка серия се провежда с минерална среда от една партида. Обикновено средата е готова за използване след престой от 20 часа при температурата на изпитването. Определя се концентрацията на разтворения кислород с контролна цел, като стойността би трябвало да бъде около 9 mg/l при 20 °C. Всички операции на прехвърляне и пълнене с наситената с въздух среда се извършват без отделяне на мехурчета, например като се използват сифони.

Приготвят се успоредни групи от колби за BOD за определяне на изпитвания и сравнителното вещество в едновременни експериментални серии. Събират се достатъчен брой колби за BOD, включително контролен инокулант, за да е възможно измерването на потреблението на кислород да се прави най-малко в две повторения на определени интервали от време, например след 0, 7, 14, 21 и 28 дни. Може да са необходими и повече колби, за да се идентифицира надеждно 10-дневният период.

Прибавя се напълно аерирана минерална среда към големи колби, така че да се напълнят до една трета. Тогава се добавя достатъчно количество от изходните разтвори на изпитваното вещество и на сравнителното вещество към отделни големи колби, така че крайната концентрация на веществата да не е по-висока от 10 mg/l. В друга голяма колба, която е контрола на минералната среда, не се прибавят вещества.

За да не се ограничава активността на инокуланта, концентрацията на разтворения кислород не трябва да спада под 0,5 mg/l в колбите за BOD. Това ограничава концентрацията на изпитваното вещество до около 2 mg/l. За трудно разграждащи се вещества и за такива с ниска ThOD, обаче, могат да използват 5-10 mg/l. В някои случаи е препоръчително да се пуснат успоредни серии от изпитваното вещества в две различни концентрации, например 2 и 5 mg/l. Нормално, BOD се изчислява на базата на образуване на амониеви соли, но ако се очаква или се знае, че има нитрификация, изчислява се на базата на образуване на нитрат ($ThOD_{NO3}$, виж приложение 2.2). Ако, обаче, има нитрификация, но тя не е завършила, промените в концентрацията на нитрита или нитрата се коригират след определяне чрез анализ (виж приложение V).

Ако ще се изследва токсичността на веществото (в случай, например, че при предишно изпитване е намерена ниска стойност на биоразградимост), е необходима друга серия от колби.

Приготвя се друга голяма колба с аерирана минерална среда (до около една трета от обема) плюс изпитваното вещество и сравнителното вещество с крайни концентрации, които обикновено са същите, както в другите големи колби.

Към разтворите в големите колби се прибавя инокулант от оттока (една капка или около 0.05 ml до 5 ml/l) или от друг източник, като например речна вода (виж I.6.4.2.). Накрая разтворите се довеждат до обема с аерирана минерална среда, като се използва маркуч, който достига до дъното на колбата, за да се осигури подходящо смесване.

VI.2.5. **Брой на колбите при един типичен експеримент**

В типичен експеримент се използват следните колби:

Най-малко 10, съдържащи изпитвано вещество и инокулант (суспензии за изпитване),

Най-малко 10, съдържащи само инокулант (контролен инокулант),

Най-малко 10, съдържащи сравнително вещество и инокулант (проба за контрол на процедурата),

и, когато е необходимо, 6 колби съдържащи изпитвано вещество, сравнително вещество и инокулант (контрола за токсичност). За да се идентифицира със сигурност 10-дневният период, са необходими около два пъти повече колби.

VI.2.6. **Изпълнение на изпитването**

Всеки приготвен разтвор се разпределя веднага в съответната група от колби за BOD с маркуч, започвайки от долната четвърт (не от дъното) на съответната голяма колба, до напълването на всички колби за BOD. Потупва се леко за да се освободят всички въздушни мехурчета. Анализира се разтвореният кислород в колбите в нулевия момент по Winkler или с електрод. Съдържанието на колбите може да се консервира за по-късен анализ по метода на Winkler чрез прибавяне на манганов (II) сулфат и натриев хидроксид (първи реагент по Winkler). Запушените колби, съдържащи кислород, фиксиран като кафяв манганов (III) хидратиран оксид се съхраняват внимателно на тъмно при 10-20 °C за не повече от 24 часа, преди да се продължат следващите етапи на метода на Winkler. Затварят се останалите повторения на колбите, като се внимава да не се включат въздушни мехурчета и се инкубират при 20 °C на тъмно. Всяка серия трябва да се придружава от пълна успоредна серия за определяне на контролния инокулант. Отделят се най-малко по две колби от всяка серия за анализ на разтворения кислород на определени интервали от време (най-малко веднъж на седмица) по време на 28-дневната инкубация.

Ежеседмичното вземане на проби позволява оценка на процента на усвояване при 14-дневен период, докато вземането на проби на всеки 3-4 дни позволява да се идентифицира 10-дневният период, което ще изисква още двойно повече колби.

За азотсъдържащи изпитвани вещества трябва да се направят корекции за усвояването на кислород чрез нитрификацията. За да се направи това, се определя разтвореният кислород по метода с кислороден електрод и след това се вземат проби от колба за БПК за анализ за нитрит и нитрат. От увеличението на концентрацията на нитрита и нитрата се изчислява използваният кислород (виж приложение V).

VI.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

VI.3.1. **Обработка на резултатите**

Първо се изчислява BOD след всеки период от време чрез изваждане на намалението на кислорода (mg O_2/литър) при контролния инокулант от това, показано от изпитваното вещество. Разделя се коригираната стойност с концентрацията (mg/l) на изпитваното вещество, за да се получи специфичната БПК като mg кислород на mg изпитвано вещество. Изчислява се процента на биоразградимост, като се разделя специфичната BOD със специфичната ThOD (изчислена според приложение 2.2) или COD (определена чрез анализ, виж приложение 2.3). Така:

$$\text{ВНТ} = \frac{(\text{mg})\text{O}_2 \text{ поет от изпитваното вещество} - (\text{mg})\text{O}_2 \text{ поет от празната проба}}{(\text{mg})\text{изпитвано вещество в колбата}}$$

$$= (\text{mg})\text{O}_2 \text{ mg изпитвано вещество}$$

$$\%\text{ на разграждане} = \frac{\text{ВНТ } ((\text{mg})\ \text{O}_2/(\text{mg})\ \text{изпитвано вещество})}{\text{СТО } ((\text{mg})\ \text{O}_2/(\text{mg})\ \text{изпитвано вещество})} \times 100$$

или

$$\%\text{ на разграждане} = \frac{\text{ВНТ } ((\text{mg})\ \text{O}_2/(\text{mg})\ \text{изпитвано вещество})}{\text{КНТ } ((\text{mg})\ \text{O}_2/(\text{mg})\ \text{изпитвано вещество})} \times 100$$

Трябва да се отбележи, че тези два метода не дават непременно еднаква стойност; препоръчва се използването на последния.

За изпитвани вещества, които съдържат азот, се използва подходяща ThOD (NH_4 или NO_3) според това, което се знае или очаква да стане при наличие на нитрификация (приложение 2.2). Ако има нитрификацията, но тя още не е завършила, корекцията за консумиран кислород чрез нитрификацията се изчислява от промените в концентрацията на нитрит и нитрат (приложение V).

VI.3.2. **Валидност на резултатите**

Намалението на кислорода в контролния инокулант трябва да надвишава 1,5 mg разтворен кислород/литър след 28 дни. Стойности, по-високи от тази, изискват проверка на експерименталните техники. Остатъчната концентрация на кислород в изпитателните колби не трябва да спада под 0,5 mg / литър през цялото време. Такива ниски кислородни нива са валидни само, ако методът за определяне на разтворения кислород позволява точното измерване на такива равнища.

Виж също I.5.2.

V.3.3. **Протокол от изпитването**

Виж I.8.

VI. 4. ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ

Тук е даден примерен протокол за данни.

ИЗПИТВАНЕ ПО МЕТОДА НА ИЗОЛИРАНИТЕ ПРОБИ

1. **ЛАБОРАТОРИЯ**

2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

3. **ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО**

Име:

Концентрация на изходния разтвор: mg/l

Начална концентрация в колбата: mg/l

ThOD или COD: mg O_2/mg изпитвано вещество

4. **ИНОКУЛАНТ**

Източник: …

Извършена обработка: …

Предварителна подготовка, ако има такава: …

Концентрация в реакционната смес: … mg/l

5. **ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РАЗТВОРЕНИЯ КИСЛОРОД**

Метод: по Winkler/с електрод

Анализи на съдържанието в колбите

Време на инкубация (дни)			Разтворен кислород (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Инокулант без вещество	1	C_1				
	2	C_2				
Средно	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Изпитвано вещество	1	a_1				
	2	a_2				
Средно	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Забележка: Подобни формуляри могат да се използват за сравнителното съединение и за контролата за токсичност.

6. **КОРЕКЦИЯ ЗА НИТРИФИКАЦИЯ (виж приложение V)**

Време на инкубация (дни)	0	n_1	n_2	n_3
i) Концентрация на нитрат (mg N/l)				
ii) Промяна в концентрацията на нитрат (mg N/l)	—			
iii) Кислороден еквивалент (mg/l)	—			
iv) Концентрация на нитрит (mg N/l)				
v) Промяна в концентрацията на нитрит (mg N/l)	—			
vi) Кислороден еквивалент (mg/l)	—			
iii + vi) Общ кислороден еквивалент (mg/l)	—			

7. **НАМАЛЯВАНЕ НА РАЗТВОРЕНИЯ КИСЛОРОД: % НА РАЗГРАЖДАНЕ**

	Намаляване след n дни (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
КОЛБА 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
КОЛБА 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
КОЛБА 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{конц. на изп.} \times \text{ThOD химикал}}$				
КОЛБА 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{конц. на изп.} \times \text{ThOD химикал}}$				
$\%\ D_{\text{средно}} = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(1) Не се изчислява средна стойност ако има значителна разлика между повторенията.

m_{to} = стойност в колбата към време 0

m_{tx} = стойност в колбата към време x

m_{bo} = средна стойност в контролата към време 0

m_{bx} = средна стойност в контролата към време x

Прилага се също корекция за нитрификация от iii + vi в секция 6.

8. **НАМАЛЯВАНЕ НА РАЗТВОРЕНИЯ КИСЛОРОД В КОНТРОЛНИЯ ИНОКУЛАНТ**

Потреблението на кислород от контролния инокулант е: $(m_{bo} - m_{b28})$ mg/l. Това потребление е важно за валидността на изпитването. То трябва да бъде по-малко от 1,5 mg/l.

ЧАСТ VII. ИЗПИТВАНЕ ПО M.I.T.I (Метод B.4-E)

VII.1. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Усвояването на кислород от разтвори при разбъркване или от суспенсии на изпитваното вещество в минерална среда, с инокуланта от специално отгледани, неадаптирани микроорганизми, се измерва автоматично за период от 28 дни в затъмнен, затворен респирометър при 25 ± 1 °C. Отделеният въглероден диоксид се абсорбира в натриева вар. Биоразградимостта се изразява като процент на усвоения кислород (коригиран с усвояването от контролния инокулант) от теоретичната потребност (ThOD). Процентът на първичната биоразградимост може да се изчисли също от допълнителен специфичен химичен анализ, правен в началото и в края на инкубацията или, по избор, чрез анализ на разтворения органичен въглерод (DOC).

VII. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

VII.2.1. **Апаратура**

а) автоматичен електролитен BOD-метър или респирометър, нормално съоръжен с 6 колби, по 300 ml всяка и с чаши, съдържащи абсорбент на CO_2;

б) пространство с постоянна температура и/или водна баня при 25 ± 1 °C или по-добра;

в) устройство за мембранно филтриране (по избор);

г) анализатор на въглерод (по избор).

VII.2.2. **Приготвяне на минерална среда**

Приготвят се следните изходни разтвори, като се използват реагенти и вода със степен „чист за анализи“ (I.6.1.):

а)	Монокалиев дихидрогенортофосфат, KH_2PO_4	8,50 g
	Дикалиев монохидрогенортофосфат, K_2HPO_4	21,75 g
	Динатриев монохидрогенортофосфат додекахидрат, $Na_2HPO_4\ 12H_2O$	44,60 g
	Амониев хлорид, NH_4Cl	1,70 g
	Разтварят се във вода и се доливат до 1 литър	
	Стойността на pH на разтвора трябва да е 7,2	
б)	Магнезиев сулфат хептахидрат, $MgSO_4\ 7H_2O$	22,50 g
	Разтваря се във вода и се долива до 1 литър	
в)	Калциев хлорид безводен, $CaCl_2$	27,50 g
	Разтваря се във вода и се долива до 1 литър	
г)	Железен (III) хлорид хексахидрат, $FeCl_3\ 6H_2O$	0,25 g
	Разтваря се във вода и се долива до 1 литър	

Вземат се по 3 ml от всеки разтвор (а), (б), (в) и (г) и се долива вода до 1 литър.

VII.2.3. **Приготвяне на инокулант**

Събират се свежи проби от не по-малко от десет места, главно от области, където се използват и изхвърлят различни химични вещества. От места като пречиствателни станции на канални и промишлени отпадъчни води, от реки, езера, морета, събират се еднолитрови проби от утайка, повърхностна почва, вода и т.н. и се смесват добре. След премахване на плуващите материали и успокояване, се регулира pH на супернатантата до стойност 7 ± 1 с натриев хидроксид или фосфорна киселина.

Използва се подходящ обем от филтрираната супернатанта, за да се напълни утаителен съд за промиване на активната утайка и течността се аерира в продължение на 23 1/2 часа. Тридесет минути след спиране на аерацията се отлива около една трета от целия обем на супернатантата, като към утаения материал се добавя равен обем от разтвор (pH 7), съдържащ по 0,1 % от глюкоза, пептон и монокалиев ортофосфат, и се възобновява аерацията. Тази процедура се повтаря по веднъж на ден. Утаителят трябва да работи по правилата на добрата практика: оттокът трябва да е бистър, температурата трябва да се поддържа 25 ± 2 °C, pH трябва да е 7 ± 1, утайката трябва да е добре утаена, трябва да има добра аерация, която да поддържа сместа аеробна през цялото време, трябва да присъстват първаци и активността на утайката трябва да се изпитва спрямо сравнително вещество най-малко на всеки три месеца. Утайката не се използва като инокулант, ако станцията не е работила поне един месец, но след не повече от четири месеца. След това се вземат проби от най-малко 10 места през нееднакви интервали от време, веднъж на всеки три месеца.

За да се поддържат свежата и старата утайка с еднаква активност, филтрираната супернатанта от използваната активна утайка се смесва с равен обем филтрирана супернатанта от прясно събрана смес от десет източника и комбинираната течност се култивира, както е описано по-горе. Утайка за инокуланта се взема 18-24 часа след като апаратурата е била захранена.

VII.2.4. **Приготвяне на колбите**

Приготвят се следните шест колби:

№ 1: изпитваното вещество във вода за разреждане с концентрация 100 mg/l

№ 2, 3 и 4: изпитваното вещество в минерална среда с концентрация 100 mg/l

№ 5: сравнително вещество (напр. анилин) в минерална среда с концентрация 100 mg/l

№ 6: само минерална среда

Трудно разтворимите изпитвани вещества се добавят директно, на базата на обем или тегло, или се постъпва както е описано в приложение 3, с изключение на това, че не могат да се използват нито разтворители, нито емулгатори. Абсорбентите на CO_2 се прибавят към всички колби в специалните чашки. Регулира се pH до 7,0 в колби с номера 2, 3 и 4.

VII.2.5. **Изпълнение на изпитването**

Поставя се малък обем инокулант в колби с номера 2, 3 и 4 (изпитвани суспензии), номер 5 (контрола на активността) и номер 6 (контролен инокулант), така че да се получи концентрация на суспендираните частици 30 mg/l. Инокулантът не се прибавя към колба номер 1, която служи като абиотична контрола. Апаратурата се сглобява, проверява се за пропуски на въздух и се включват бъркалките. Започва измерване на усвояването на кислород на тъмно. Всеки ден се проверява температурата, разбъркването и кулометричния записващ уред за потреблението на кислород, като се отбелязва всяка промяна в цвета на съдържимото в колбите. Потреблението на кислород се отчита директно от шест колби по съответен метод, например с шестканален записващ уред, който дава кривата на BOD. В края на инкубацията, обикновено 28 дни, се измерва pH на съдържимото в колбите и се определя концентрацията на остатъчното изпитвано вещество и разградните му продукти и, в случай на разтворими във вода вещества, и концентрацията на DOC (приложение 2.4). Обръща се специално внимание на летливите вещества. Ако се очаква нитрификация, се определят концентрациите на нитрат и нитрит, ако е възможно.

VII.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

VII.3.1. **Обработка на резултатите**

Разделя се потреблението на кислород (mg) от изпитваното вещество след дадено време, коригирано с това на контролния инокулант за същото време, на теглото на използваното за изпитването вещество. Това дава BOD, изразена като mg кислород/mg изпитвано вещество, което е:

$$\text{ВНТ} = \frac{(\text{mg})\ \text{mg}\ O_2\text{употребен от изпитваното вещество} - (\text{mg})O_2\text{употребен от контролата}}{(\text{mg})\ \text{изпитвано вещество в колбата}}$$

mg O_2/mg изпитвано вещество

Тогава процентът на биоразграждането се получава от:

$$\% \text{ биоразграждане } = \% \text{ ThOD } = \frac{\text{ВНТ } ((\text{mg})\ O_2/(\text{mg})\ \text{вещество})}{\text{СТО } ((\text{mg})\ O_2/(\text{mg})\ \text{вещество})} \times 100$$

За смеси, ThOD се изчислява от елементния анализ, както за просто съединение. Използва се подходяща ThOD ($ThOD_{NH4}$ или $ThOD_{NO3}$) според това дали нитрификацията липсва или е пълна (приложение 2.2). Ако обаче, има нитрификация, но тя не е напълно завършена, тогава корекцията за усвоения кислород се изчислява от промените в концентрациите на нитрит и нитрат (приложение V).

Процентът на първоначалното биоразграждане се изчислява от загубата на специфично (родителско) химично вещество (виж 1.7.2.).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Ако е имало загуба на изпитваното вещество в колба номер 1, измерваща физико-химичното потребление, това се отразява в протокола и се използва концентрацията на изпитваното вещество (S_b) след 28 дни в тази колба, за да се изчисли процентът на биоразграждането.

Когато е направено определяне на DOC (не задължително), се изчислява процентът на пълното биоразграждане от:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

както е описано в I.7.1. Ако е имало загуба на DOC в колба номер 1, измерваща физико-химичното изразходване, концентрацията на DOC в тази колба се използва, за да се изчисли процентът на биоразграждането.

Всички резултати се записват в приложените формуляри за данни.

VII.3.2. **Валидност на резултатите**

Потреблението на кислород в контролния инокулант е нормално 20-30 mg O_2/l и не трябва да е по-високо от 60 mg/l за 28 дни. Стойности по-високи от 60 mg/l изискват критична проверка на данните и експерименталните техники. Ако стойността на pH е извън областта 6-8,5 и потреблението на кислород от изпитваното вещество е по-малко от 60 %, изпитването трябва да се повтори с по-ниска концентрация на изпитваното вещество.

Виж също I.5.2.

Ако процентът на разграждане на анилин, изчислен от консумацията на кислород, не надвишава 40 % след 7 дни и 65 % след 14 дни, изпитването се счита за невалидно.

VII.3.3. **Протокол от изпитването**

Виж I.8.

VII.4. ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ

По-долу е даден примерен протокол за данни.

ИЗПИТВАНЕ ПО МІТІ (I)

1. **ЛАБОРАТОРИЯ**

2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

3. **ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО**

Име:

Концентрация на изходния разтвор: … mg/l като химично вещество

Начална концентрация в средата, C_o: … mg/l като химично вещество

Обем на реакционната смес, V: … ml

ThOD: … mg O_2/l

4. **ИНОКУЛАНТ**

Места на вземане на проби от утайка:

1) … 6) …
2) … 7) …
3) … 8) …
4) … 9) …
5) … 10) …

Концентрация на суспендираните частици в активната утайка след аклиматизация със синтетична отпадъчна вода = mg/l

Обем на активната утайка за литър от крайната среда = ml

Концентрация на утайката в крайната среда = mg/l

5. **ПОТРЕБЛЕНИЕ НА КИСЛОРОД: БИОРАЗГРАЖДАНЕ**

Вид на използвания респирометър:

			Време (дни)				
			0	7	14	21	28
O_2 потребление (mg) от изпитваното вещество	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 потребление (mg) от контролата	b						
Коригирано потребление на O_2 (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
BOD на mg изпитваното вещество	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Колба 1					
		Колба 2					
		Колба 3					
% на разграждане $\frac{\text{BHT}}{\text{ThOD}} \times 100$		1					
		2					
		3					
		средно [1]					

[1] Да не се взима средна стойност, ако има значителна разлика между повторенията.

Забележка: Подобни протоколи могат да се използват за сравнителното съединение.

6. **АНАЛИЗ НА ВЪГЛЕРОД** (по избор)

Анализатор на въглерод: …

Колба	DOC				Измерен	Коригиран
	% DOC изразходван		Средно			
Вода + изпитвано вещество	a				—	—
Утайка + изпитвано вещество	b1		b1 – c			
Утайка + изпитвано вещество	b2		b2 – c			
Утайка + изпитвано вещество	b3		b3 – c			
Контрола	c		—		—	—

$$\% \text{ разграден DOC } = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **ДАННИ ОТ СПЕЦИФИЧЕН ХИМИЧЕН АНАЛИЗ**

	Остатъчно количество от изпитвано вещество в края на изпитването	% на разграждане
Контролна проба с вода	S_b	
Среда с инокулант	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ на разграждане } = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Изчислява се % разграждане съответно за колби a_1, a_2 и a_3.

8. **ЗАБЕЛЕЖКИ**

Следва да се приложи крива за BOD във времето, ако има такава.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

СЪКРАЩЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

DO: Разтворен кислород (mg/l) е концентрацията на разтворения кислород в една водна проба.

BOD: Биохимична потребност от кислород (g) е количеството кислород, консумирано от микроорганизмите при метаболизиране на едно изпитвано съединение, изразявано също така като g усвоен кислород за g от изпитваното съединение (Виж метод C.5).

COD: Химична потребност от кислород (g) е количеството кислород, използвано при окисляването на едно изпитвано съединение с горещ, кисел бихромат; представлява мярка за количеството на наличната окислима материя. Изразява се също така като g кислород, усвоен за g от изпитваното съединение (Виж метод C.6).

DOC: Разтворен органичен въглерод е органичният въглерод, присъстващ в разтвора или който преминава през филтър 0,45 μm, или остава в супернатанта след центрофугиране при 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4000 G) за 15 min.

ThOD: Теоретична потребност от кислород (mg) е общото количество кислород, необходимо за пълното окисляване на едно химично вещество. То се изчислява от молекулната формула (виж приложение II.2) и се изразява също като mg кислород, необходим за mg от изпитваното съединение.

$ThCO_2$: Теоретичен въглероден диоксид (mg) е изчисленото количество въглероден диоксид, което ще се получи от известно или измерено съдържание на въглерод в изпитваното съединение, когато то бъде напълно минерализирано. Изразява се също като mg въглероден диоксид, отделян от mg от изпитваното съединение.

TOC: Общ органичен въглерод в пробата е сумата от органичния въглерод в разтвора и в суспензията.

IC: Неорганичен въглерод

TC: Общ въглерод е сумата от органичния и неорганичния въглерод в една проба.

Първично биологично разграждане:

е изменение на химичната структура на едно вещество, причинено от биологично действие, и имаща за резултат загуба на специфично свойство на това вещество.

Пълно биологично разграждане (аеробно):

е равнището на постигнато разграждане, когато изпитваното съединение е напълно усвоено от микроорганизмите и в резултат на това са произведени въглероден диоксид, вода, минерални соли и нови микробни клетъчни съставки (биомаса).

Лесно биоразградими:

Условна класификация на химичните вещества, които са преминали през определени изпитвания за пълна биоразградимост. Тези изпитвания са толкова неоспорими, че се счита, че такива съединения бързо и напълно се разграждат биологично във водна среда при аеробни условия.

Присъщо биоразградими:

Класификация на химични вещества, за които има неоспорими доказателства за биологично разграждане (първично или пълно), от което и да е признато изпитване за биоразградимост.

Склонност към третиране:

Способността на съединенията да бъдат отстранявани при биологичната преработка на отпадъчни води без да повлияват вредно на нормалното протичане на процесите на третиране. Най-общо, бързо разградимите съединения подлежат на третиране, но това не важи за всички присъщо биоразградими съединения. Абиотични процеси могат също да действат.

Латентно време (лаг-фаза):

е времето от посяването на инокуланта (при изследване чрез скоростта на отмиране) докато процентът на разграждане се увеличи най-малко до 10 %. Латентното време често е много променливо и слабо възпроизводимо.

Време на разграждане:

Времето от края на латентното време до времето, при което са достигнати 90 % от максималното равнище на разграждане.

10-дневен период:

10-те дни, които непосредствено следват достигане на 10 % разграждане.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

ИЗЧИСЛЯВАНЕ И ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПОДХОДЯЩИ ОБОБЩЕНИ ПАРАМЕТРИ

В зависимост от избрания метод, ще се изискват определени обобщени параметри. Следващата част описва получаването на тези стойности. Използването на тези параметри е описано при отделните методи.

1. **Съдържание на въглерод**

Съдържанието на въглерод се изчислява, когато елементният състав е известен или от данните от елементния анализ на изпитваното вещество.

2. **Теоретична потребност от кислород (ThOD)**

Теоретичната потребност от кислород (ThOD) може да бъде изчислена, ако елементният състав е известен или е определен чрез елементен анализ. Така за съединението:

$$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$$

без нитрификация:

$$ThOD_{NH4} = 16\frac{[2c + 1/2(h - cl - 3\,n) + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\,mg/mg$$

или с нитрификация:

$$ThOD_{NO3} = 16\frac{[2c + 1/2(h - cl) + 5/2\,n + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\,mg/mg$$

3. **Химична потребност от кислород (COD)**

Химичната потребност от кислород (COD) се определя според метод B.6.

4. **Разтворен органичен въглерод (DOC)**

Разтвореният органичен въглерод (DOC) е по определение разтвореният органичен въглерод на всяко химично вещество или смес във вода, преминаващи през филтър 0,45 μm.

Пробите се вземат от съдовете за изпитване и веднага се филтрират с апаратура за филтриране, използвайки подходящ мембранен филтър. Първите 20 ml (количеството може да се намали, когато се използват малки филтри) от филтрата се изхвърлят. Обеми от по 10-20 ml или по-малки, ако ще се инжектират (обемът зависи от количеството, необходимо за анализатора на въглерод), се оставят за анализ на въглерод. Концентрацията на DOC се определя с апарат за анализ на органичен въглерод, който е способен да измерва точно концентрации на въглерод, равни или по-ниски от 10 % от началната концентрация на DOC, използвана при изпитването.

Филтрираните проби, които не могат да бъдат анализирани същия работен ден се оставят в хладилник при 2-4 °C за 48 часа или под –18 °C за по-дълги периоди.

Забележки:

Мембранните филтри често са импрегнирани с повърхностноактивни вещества, които им осигуряват хидрофилност. В такъв случай, филтърът може да съдържа до няколко mg разтворим органичен въглерод, който да пречи на определянето на биологичната разградимост. Повърхностноактивни вещества и други разтворими органични съединения се премахват от филтрите чрез варене в дейонизирана вода 3 пъти по 1 час. Филтрите след това се съхраняват във вода за 1 седмица. Ако се използват филтърни патрони за еднократна употреба, всяка партида трябва да се проверява дали отделя разтворим органичен въглерод.

В зависимост от типа на мембранния филтър, изпитваното вещество може да се задържи чрез адсорбция. Тогава трябва да се получи сигурност, че изпитваното вещество не се задържа върху филтъра.

Вместо филтриране, за отделяне на TOC от DOC може да се използва *центрифугиране* при 40 000 $m.s^{-2}$ (4000 G) за 15 min. Методът не е надежден при начални концентрации < 10 mg DOC/l, ако или не са премахнати всички бактерии, или въглеродът като част от бактериалната плазма се е разтворил повторно.

ПОЗОВАВАНИЯ

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P. 65,

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139,

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrosen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschus (NAW) in DIN Deutsches Institut fur Normung e. V.,

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly watersoluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13(1), 169.

ПРИЛОЖЕНИЕ III

ОЦЕНКА НА БИОЛОГИЧНАТА РАЗГРАДИМОСТ НА ТРУДНОРАЗТВОРИМИ ВЕЩЕСТВА

При изпитванията за биологична разградимост на трудноразтворими вещества, трябва да се обърне внимание на следните аспекти.

Докато хомогенните течности рядко биха създали проблем при вземането на проба, препоръчва се твърдите материали да се хомогенизират по съответен начин, за да се избегнат грешки, дължащи се на липсата на хомогенност. Трябва особено да се внимава, когато се вземат представителни проби от по няколко mg от смеси на химични вещества или от вещества, съдържащи големи количества примеси.

По време на изпитването могат да се използват различни форми на разбъркване. Трябва да се използва само разбъркване дотолкова, че да се поддържа химичното вещество диспергирано, без да се стига до претопляне, образуване на много пяна или излишни сили на разкъсване.

Може да се използва емулгатор даващ стабилна дисперсия на химичното вещество. Той трябва да не е токсичен за бактериите, не трябва да е биоразградим и да причинява образуване на пяна при условията на изпитването.

Същите критерии се прилагат за разтворителите, както и за емулгаторите.

Не се препоръчва използване на твърди носители при изпитване на твърди вещества, но те могат да са подходящи сами за себе си.

Когато се използват допълнителни вещества като емулгатори, разтворители и носители, трябва да се пусне контролна проба с тях.

Всеки от трите респирометрични метода за CO_2, BOD, MITI може да се използва за проучване на биоразградимостта на трудно разтворими съединения.

ПОЗОВАВАНИЯ

— de Morsier, A. et al., Biodegradation of poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833,

— Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

ПРИЛОЖЕНИЕ IV

ОЦЕНКА НА БИОЛОГИЧНОТО РАЗГРАЖДАНЕ НА ВЕЩЕСТВА, ЗА КОИТО СЕ ПРЕДПОЛАГА, ЧЕ СА ТОКСИЧНИ КЪМ ИНОКУЛАНТА

Когато дадено химично вещество е подложено на изпитване за лесна биоразградимост и се оказва, че не е биоразградимо, се препоръчва следната процедура, ако е желателно да се разбере дали инхибира или е инертено (Reynolds et al., 1987).

Подобни или идентични посявки трябва да се използват при изпитванията за токсичност и биологично разграждане.

За да се оцени токсичността на химичното вещество, изпитвано в изпитванията за лесна биоразградимост, изглеждат подходящи един или комбинация от следните методи: за инхибиране скоростта на дишане на активната утайка (изпитване за инхибиране респирацията на активната утайка), за BOD и/или за инхибиране на растежа.

Ако трябва да се избегне инхибиране, дължащо се на токсичност, се препоръчва концентрациите на изпитваното вещество при изпитването за лесна биоразградимост да са по-ниски от 1/10 от стойностите на EC_{50} (или по-ниски от 1/20 от стойностите на EC_{20}) получени при изпитването на токсичността. Съединения със стойности на EC_{50} по-високи от 300 mg/l не е вероятно да имат токсични ефекти при изпитването за лесна биоразградимост.

Стойности на EC_{50} по-ниски от 20 mg/l биха поставили сериозни проблеми при последващото изпитване. Трябва да се използват ниски концентрации, които се нуждаят от използване на строгия и чувствителен метод на изолираните проби или на материал, белязан с ^{14}C. Друга възможност е, че един аклиматизиран инокулант би позволил да се използват по-високи концентрации при изпитването. В последният случай, обаче, се загубва критерия за лесна биоразградимост.

ПОЗОВАВАНИЯ

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

ПРИЛОЖЕНИЕ V

КОРЕКЦИЯ НА ПОТРЕБЛЕНИЕТО НА КИСЛОРОД ПРИ ПОВЛИЯВАНЕ ЧРЕЗ НИТРИФИКАЦИЯ

Грешките, дължащи се на факта, че не е взета предвид нитрификацията при оценката на потреблението на кислород при изпитването за биоразградимост на несъдържащи азот вещества, са незначителни (не по-големи от 5 %), даже ако окисляването на амониевия азот в средата е непостоянно, както в опитните съдове, така и в съдовете с контролния инокулант. При азотсъдържащи изпитвани вещества, обаче, могат да възникнат сериозни грешки.

Ако е налице нитрификация, но тя не е завършена, наблюдаваното потребление на кислород в реакционната среда може да се коригира с количеството кислород, използвано за окисляване на амоняка до нитрит или нитрат. Това има място, ако промените в концентрацията на нитрити и нитрати по време на инкубацията са определени, като се отчитат следните уравнения:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2H_2O \quad (1)$$

$$2HNO_2 + O_2 = 2HNO_3 \quad (2)$$

или обобщено:

$$2\ NH_4Cl + 4O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

От уравнение (1) потреблението на кислород от 28 g азот, съдържащ се в амониевия хлорид (NH_4Cl), който се окислява до нитрит, е 96 g, т.е. фактор 3,43 (96/28). По същия начин от уравнение (3) потреблението на кислород от 28 g азот, окислен до нитрат е 128 g, т.е. коефициент 4,57 (128/28).

Тъй като реакциите са последователни, извършвани от отделни и различни бактериални видове, е възможно концентрацията на нитрита да се увеличава или намалява, като в последния случай може да се получи еквивалентна концентрация на нитрат. Така кислородът, консумиран за образуване на нитрат, е 4.57 умножено по увеличението на концентрацията на нитрата, докато кислородът, консумиран за образуването на нитрит, е 3,43 умножено по увеличението на концентрацията на нитрита или с намаляването на неговата концентрация загубата на кислород е -3,43 умножено с намаляването на концентрацията.

Това означава:

O_2, консумиран при образуване на нитрат = 4,57 × увеличението на концентрацията на нитрат (4)

и

O_2, консумиран при образуване на нитрит = 3,43 × увеличението на концентрацията на нитрит (5)

и

O_2, изгубен при преобразуването на нитрит = -3,43 × намалението на концентрацията на нитрит (6)

Така че:

Потреблението на O_2, дължащо се на нитрификация = ± 3,43 × изменението на концентрацията на нитрит + 4.57 × увеличението на концентрацията на нитрат (7)

И така:

Потреблението на O_2, дължащо се на окисление на въглерода = общото наблюдавано потребление – потреблението, дължащо се на нитрификация (8)

Алтернативно, когато е определен само общият окислен N, потреблението на кислород, дължащо се на нитрификация, може да се вземе на първо приближение като 4,57 × увеличението на окисления N.

Тогава коригираната стойност на консумацията на кислород, дължаща се на окисление на въглерода, след това се сравнява с $ThOD_{NH3}$, както е изчислено в приложение II.

B.5. РАЗГРАЖДАНЕ — БИОХИМИЧНА ПОТРЕБНОСТ ОТ КИСЛОРОД

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на метода е измерване на биохимичната потребност от кислород (BOD) на твърди или течни органични вещества.

Данните, получени при това изпитване се отнасят за разтворими във вода съединения. Летливи съединения и такива с ниска разтворимост във вода могат също да се изпитват, най-малко по принцип.

Методът е приложим за изпитване на онези органични материали, които не са инхибиращи за бактерии при концентрациите, използвани при изпитването. Ако изпитваният материал не е разтворим при изпитваните концентрации, се прилагат специални мерки, като използване на ултразвук, за да се получи добро диспергиране на изпитвания материал.

При избора на подходящи концентрации на изпитване и при интерпретирането на ниски резултати може да бъде полезна информацията за токсичността на химичното вещество.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

BOD се определя като масата на разтворения кислород, необходима за определен обем от разтвора на веществото, за да извърши биохимично окисление при зададени условия.

Резултатите се изразяват като грамове BOD на грам от изпитваното вещество.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Желателно е използването на вещество за сравнение, за да се провери активността на културата.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

В предварително определено количество от веществото, разтворено или диспергирано в добре аерирана подходяща среда, се поставя култура от микроорганизми и се инкубира при определена постоянна околна температура на тъмно.

BOD се определя от разликата в съдържанието на разтворен кислород в началото и в края на изпитването. Продължителността на изпитването трябва да бъде най-малко пет дни и не повече от 28 дни.

Определя се и една празна проба, пусната успоредно, но несъдържаща изпитваното вещество.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Определянето на BOD не може да се счита като валидно за определяне на биоразградимостта на дадено вещество. Това изпитване може да се разглежда само като изпитване за скрининг.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Приготвят се предварителни разтвори или дисперсии на веществото, за да се получи концентрация на BOD, подходяща за използвания метод. BOD тогава се определя, като се следва подходящ национален или международен стандартизиран метод.

2. **ДАННИ И ИЗЧИСЛЕНИЯ**

BOD, съдържаща се в предварителния разтвор, се изчислява по избран стандартизиран метод и се превръща в грамове BOD на грам от изпитваното вещество.

3. **ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Трябва да се цитира използваният метод.

Биохимичната потребност от кислород трябва да е средна стойност от най-малко три валидни измервания.

Цялата информация и забележки с отношение към интерпретирането на резултатите трябва да се отразят в протокола, по-специално от гледище на примесите, физическото състояние, токсичните ефекти и присъщ състав на веществото, които биха повлияли на резултатите.

Използването на добавки за инхибиране на биологичната нитрификация трябва да се отрази в протокола.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Списък на стандартизираните методи, например:

NF T 90 -103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: 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.

B.6. РАЗГРАЖДАНЕ — ХИМИЧНА ПОТРЕБНОСТ ОТ КИСЛОРОД

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на метода е измерване на химичната потребност от кислород (COD) на твърди или течни органични вещества по произволно избран стандартен начин при фиксирани лабораторни условия.

Информация за формулата на веществото ще бъде полезна при провеждането на това изпитване и при интерпретиране на получения резултат (например, соли на халогени, железни соли на органични съединения, хлорсъдържащи органични съединения).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Химичната потребност от кислород е мярка за окисляемостта на веществото, изразена като еквивалентното количество кислород на един оксидиращ агент, усвоено от веществото при фиксирани лабораторни условия.

Резултатът се изразява като грамове COD на грам от изпитваното вещество.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Невинаги, когато се изпитва ново вещество, има нужда от използване на вещества за сравнение. Те трябва да служат най-вече за калибриране на метода от време на време и да позволят сравнение на резултатите, когато е приложен друг метод.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Предварително определено количество от веществото, разтворено или диспергирано във вода, се окислява на обратен хладник с калиев дихромат в силна сернокисела среда със сребърен сулфат като катализатор в продължение на два часа. Остатъчният дихромат се определя чрез титруване със стандартизиран фероамониев сулфат.

В случай на хлоросъдържащи вещества се прибавя живачен сулфат (*), за да се намали пречещото влияние на хлора.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Поради произволния начин на определяне, COD е „индикатор за окисляемост“ и като такъв, се използва като практически метод за измерване на органична материя.

Хлоридите могат да пречат на това изпитване. Неорганични редуциращи или оксидиращи агенти също могат да пречат на определянето на COD.

Някои циклични съединения и много летливи вещества (напр. нискомолекулни мастни киселини) не се окисляват напълно при това изпитване.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Предварителният разтвор или дисперсия на веществото се приготвя така, че да се получи COD между 250 и 600 mg/l.

Забележки:

В случай на трудноразтворими или недиспергиращи се вещества, се претегля фина пудра от веществото или течно вещество в количество, отговарящо на 5 mg COD и се поставя в експерименталната апаратура с вода.

Химичната потребност от кислород (COD) често и специално в случай на трудно разтворими вещества се определя успешно в един вариант на метода, т.е. в затворена система с изравнител на налягането (H. Kelkenberg, 1975). При тази модификация съединения, които трудно се определят по конвенционалния метод, например оцетна киселина, могат често да бъдат успешно определени количествено. Методът, обаче не работи в случай на пиридин. Ако концентрацията на калиев дихромат, както е предписано в позоваване (1) се повиши до 0,25 N (0,0416 mol/l), директното претегляне на 5-10 mg от веществото се улеснява, което е много важно за определянето на COD на вещества, трудно разтворими във вода (позоваване (2).

От друга страна, COD се определя, като се следва който и да е подходящ национален или международен стандартизиран метод.

2. **ДАННИ И ОТЧИТАНЕ**

COD, съдържаща се в експерименталната колба, се изчислява като се следва избран стандартизиран метод и се превръща в грамове COD на грам от изпитваното вещество.

(*) След използване разтворите, съдържащи живачни соли, трябва да се обработят за да се избегне разнасяне на живак в околната среда.

3. **ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

В протокола се отразява използваният метод за сравнение.

Химичната потребност от кислород трябва да е средна стойност от най-малко три измервания. Цялата информация и забележки, отнасящи се до интерпретирането на резултатите, трябва да се запишат в протокола, особено отнасящите се до примесите, физично състояние, токсични ефекти и присъщи свойства на веществото (ако са известни), които биха повлияли на резултатите.

Трябва да се отрази и използването на живачен сулфат, за да се намали пречещото влияние на хлоридите.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

(1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13,169.

Списък на стандартизирани методи, например:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

B.7. РАЗГРАЖДАНЕ — АБИОТИЧНА ХИДРОЛИЗА КАТО ФУНКЦИЯ ОТ pH

1. **МЕТОД**

Този метод е основан на метода в Ръководство за изпитване на ОИСР (1).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Хидролизата е една важна реакция, която контролира абиотичното разграждане. Тази реакция в частност е приложима за вещества с ниска биоразградимост и тя може да повлияе върху присъствието на дадено вещество в околната среда.

Повечето реакции на хидролиза са от псевдо първи порядък и следователно полувремената на разграждане са зависими от концентрацията. Това обикновено позволява екстраполация на резултатите, получени при лабораторни концентрации към условията на околната среда.

Още повече, публикувани са няколко примера (2), показващи задоволително съгласуване между резултатите, установени в чисти и природни води за няколко типа химични вещества.

За изпълнение на това изпитване е полезно да има предварителна информация за парното налягане на веществото.

Този метод е приложим само за разтворими във вода вещества. Примесите могат да повлияят на резултатите.

Хидролитичното поведение на химични вещества трябва да се изпитва при стойности на pH, обикновено намирани в околната среда (pH 4 до 9).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Под хидролиза се разбира реакция на веществото RX с вода. Тази реакция може да бъде представена като смяна на групата X с OH:

$$RX + HOH \rightleftharpoons ROH + HX \quad [1]$$

Скоростта, с която концентрацията на RX намалява се дава със:

$$\text{скорост} = k[H_2O] \cdot [RX] \quad [2]$$

Понеже водата присъства в голям излишък в сравнение с химикала, този тип реакция обикновено се описва като реакция от псевдо-първи порядък, при която наблюдаваната скоростна константа се дава със зависимостта:

$$k_{\text{набл.}} = k \times [H_2O] \quad [3]$$

Тази константа може да бъде определена за дадена стойност на pH и за дадена температура T , като се използва изразът:

$$k_{\text{набл.}} \frac{2{,}303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

където:

t = време

C_o = концентрацията на веществото във време 0

C_t = концентрацията на веществото във време t

2,303 = коефициент на превръщане между натурални и десетични логаритми.

Концентрациите се изразяват в грамове на литър или молове на литър.

Измерението на тази константа $k_{\text{набл}}$ е (време)$^{-1}$.

„Периодът на полуразграждане“ $t_{1/2}$ се определя като времето, необходимо за намаляването на концентрацията на изпитваното вещество с 50 %, което е:

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

От изразите (4) и (5) може да се покаже, че:

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{\text{набл.}} \quad [6]$$

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не е необходимо използването на сравнителни вещества във всички случаи, когато се изследва ново вещество. Те трябва да служат преди всичко за проверка на изпълнението на метода от време на време и да позволяват сравнение с резултати, получени по друг метод.

Следните вещества могат да се използват като сравнителни вещества (1):

Ацетилсалицилова киселина (аспирин)

О,О-диетилов 0-(6-метил-2-(1-метилетил)4-пиримидинилов) естер на фосфоротиовата киселина (димпилат, диазинон).

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Веществото се разтваря във вода при ниска концентрация. Температурата и pH се контролират.

Намаляването на концентрацията на веществото във времето се следи с подходяща аналитична процедура.

Логаритъмът на концентрацията се нанася на графика срещу времето и ако линията е права от наклона, може да се получи скоростната константа от първи порядък (виж точка 2).

Когато практически е трудно да се определи скоростната константа директно за дадена температура, обикновено е възможно тя да се оцени чрез използване зависимостта на Arrhenius, която дава зависимостта на скоростната константа от температурата. От линейната графика на логаритъма на скоростната константа, определена при дадена температура като функция на реципрочната стойност на абсолютната температура K, е възможна екстраполация на стойността на скоростната константа, която не може да се получи директно.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

В позоваване (2) е публикувано, че измерванията на скоростните константи на хидролиза при 13 класа органични структури може да бъде много точно.

Повторяемостта зависи в частност от контрола на pH и температурата и може да се повлияе от наличието на микроорганизми и в специални случаи, от концентрацията на разтворения кислород.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Реагенти**

1.6.1.1. *Буферни разтвори*

Изпитването се провежда при три стойности на pH: 4,0; 7,0 и 9,0.

За тази цел, буферните разтвори се приготвят, като се използват чисти за анализ химикали и дестилирана или дейонизирана стерилна вода. Някои примери на буферни системи са дадени в приложението.

Използваната буферна система може да повлияе върху скоростта на хидролизата. Ако има доказателства за това, трябва да се използва алтернативна буферна система. В позоваване (2) се препоръчва използване на боратни или ацетатни буфери вместо фосфатен.

Ако не е известна стойността на pH на буферните разтвори спрямо температурата, използвана по време на изпитването, тя може да се определи при избраната температура с калибриран pH-метър с точност ± 0,1 pH единици.

1.6.1.2. *Разтвори за изпитване*

Изпитваното вещество трябва да бъде разтворено в избрания буфер и концентрацията му да не надвишава 0,01 M [mol/l] или половината на концентрацията на насищане, според това кое от двете е по-ниско.

Използването на смесващи се с вода органични разтворители се препоръчва само за вещества с ниска разтворимост във вода.

Количеството на разтворителя трябва да е по-малко от 1 % и не трябва да пречи на процеса на хидролиза.

1.6.2. **Апаратура**

Трябва да се използват стъклени колби със запушалки, без смазка по шлифовете.

Ако веществото или буферната система са летливи, или ако изпитването се провежда при повишени температури, се предпочитат епруветки със запушалки със септум и на винт, като се избягва да има пространство над течността.

1.6.3. **Аналитичен метод**

Методът трябва да е специфичен, за да позволява определяне на изпитваното вещество при концентрациите в разтвори за изпитване и може да се състои от комбинация от подходящи аналитични техники.

Използваният аналитичен метод зависи от природата на веществото и трябва да е достатъчно точен и чувствителен, за да открива намаление в размер на 10 % от началната концентрация.

1.6.4. **Условия на изпитването**

Изпитването трябва да се провежда в термостатирано затворено пространство или на водна баня с постоянна температура, настроена на ± 0,5 °C около избраната температура. Температурата трябва да се поддържа и измерва в рамките на ± 0,1 °C. Влиянието на фотолизата трябва се избягва по подходящ начин.

За вещества, които се окисляват лесно, ще бъде необходимо да се отстрани разтвореният кислород (например чрез продухване с азот или аргон в продължение на пет минути преди приготвянето на разтвора).

1.6.5. **Процедура на изпитването**

1.6.5.1. *Предварително изпитване*

За всички вещества предварителното изпитване трябва да се провежда при 50 ± 0,5 °C при три стойности на pH: 4.0, 7.0 и 9.0. Правят се достатъчен брой измервания, за да се оцени дали за всяка стойност на pH и при 50 °C времето на полуразграждане ($t_{1/2}$) е по-ниско от 2,4 часа или се наблюдава по-малко от 10 % хидролиза след пет дни. (Може да се прецени, че тези стойности съответстват респективно на времена на полуразграждане по-малки от един ден или по-големи от една година при условия по-представителни от тези на околната среда (25 °C).

Ако при предварителното изпитване се установи, че 50 % или повече от изпитваното вещество е хидролизирано за 2,4 часа при 50 °C или по-малко от 10 % са били хидролизирани за пет дни при всяка от pH стойностите (4, 7 и 9), не е необходимо по-нататъшно изпитване.

В други случаи, както и за индивидуални стойности на pH, за които това условие не е изпълнено, се прилага изпитване 1.

1.6.5.2. *Изпитване 1*

Изпитване 1 се провежда при една температура. За предпочитане е тя да е 50 ± 0.5 °C и, ако е възможно - при стерилни условия, за тези стойности на pH, за които предварителното изпитване е показало необходимост от по-нататъшно изпитване.

Подбира се достатъчен брой на пробите (не по-малко от четири), за да се покрие обхватът от 20 до 70 % хидролиза и да се изпита дали реакцията е от псевдо-първи порядък при дадените стойности на pH.

За всяка стойност на pH, за която се провежда изпитване 1, се определя порядъкът на реакцията.

Оценка на скоростната константа при 25 °C:

Решението как да протече експериментът зависи от това дали от изпитване 1 може да се направи извод, че реакцията е от псевдо-първи порядък или не.

Ако не може да се направи извод от изпитване 1, че реакцията със сигурност е от псевдо-първи порядък, се провеждат по-нататъшни експерименти, както е описано в от изпитване 2.

Ако може сигурно да се заключи от изпитване 1, че реакцията е от псевдо-първи порядък, се провеждат по-нататъшни експерименти както е описано в изпитване 3. (Друга възможност е, че при специални обстоятелства може от скоростните константи при 50 °C да се изчислят скоростните константи при 25 °C, като се използват резултатите от изпитване 1 (виж 3.2.).

1.6.5.3. *Изпитване 2*

Това изпитване се провежда при всяка стойност на pH, за която резултатите от изпитване 1 са показали, че е необходимо да се направи:

— или при една температура по-ниска от 40 °C,

— или при две температури над 50 °C, различаващи се помежду си с най-малко 10 °C.

За всяка стойност на pH и температура, при които се провежда изпитване 2, се вземат най-малко шест адекватно разпределени точки така, че степента на хидролиза да е в обхвата от 20 до 70 %.

За една стойност на pH и температура определянето се провежда в двойно повторение. Когато изпитване 2 се изпълнява при две температури над 50 °C, предпочита се двойните повторения да са при по-ниската от тези две температури.

За всяка pH стойност и температура, при които е проведено изпитване 2, по възможност се дава графична оценка на времето на полуразграждане ($t_{1/2}$).

1.6.5.4. *Изпитване 3*

Това изпитване се провежда при всяка стойност на pH, за която резултатите от изпитване 1 са показали необходимостта това да се направи:

— или при една температура по-ниска от 40 °C,

— или при две температури над 50 °C, различаващи се помежду си с най-малко 10 °C.

За всяко pH и температура, където се провежда изпитване 3, се избират три точки, първата при време 0, а втората и третата - когато степента на хидролиза е по-висока от 30 %. Изчисляват се константата $к_{obs}$ и времето $t_{1/2}$.

2. **ДАННИ**

За реакция от псевдо-първи порядък стойностите на $к_{obs}$ за всяка стойност на pH и температура на изпитването могат да се намерят от графиката на логаритмите на концентрацията срещу времето, като се използва изразът:

$$к_{набл.} = - \text{наклон} \times 2{,}303 \qquad [7]$$

След това $t_{1/2}$ може да се изчисли от уравнение [6].

Когато е подходящо, $k_{25\ °C}$ може да се оцени чрез прилагане на уравнението на Arrhenius.

За реакция, която не е от псевдо-първи порядък виж 3.1.

3. **ДОКЛАДВАНЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва да съдържа по възможност следната информация:

— спецификация на веществото,

— всички резултати получени със сравнителните вещества,

— принципа и подробностите на използвания аналитичен метод,

— за всяко изпитване: температурата, стойността на pH, състав на буфера и таблица с всички данни за концентрация-време,

— за реакции от псевдо-първи порядък: стойностите на k_{obs} при $t_{1/2}$ и процедурата за изчисляването им,

— за реакции не от псевдо-първи порядък: резултатите, нанесени на графика като логаритъм на концентрацията спрямо времето,

— цялата информация и наблюдения, необходими за тълкуването на резултатите.

3.2. ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Може да се окаже възможно изчислението на приемливи стойности на скоростната константа (при 25 °C) на изпитваното вещество, при условие че вече съществуват експериментални стойности на активационната енергия за хомолози на изпитваното вещество и при положение, че може разумно да се приеме, че размерът на активационната енергия на изпитваното вещество е от същия порядък.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

(1) ОИСР, Paris, 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) W. Mabey and T. Mill, „Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions," J. Phys. Chem. Ref. Data, 1978, vol. 7 (2), 383-415.

Допълнение

БУФЕРНИ СМЕСИ

A. **CLARK И LUBS**

Стойностите на pH, дадени в тези таблици, са изчислени чрез измервания на потенциала, като се използват стандартните уравнения на Sörensen. Действителната стойност на pH е с 0,04 единици по-висока от стойностите в таблицата.

Състав	pH
0,1 mol/l калиев хидрогенфталат + 0,1 N HCl при 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml фталат до 100 ml	3,8
0,1 mol/l калиев хидрогенфталат + 0,1 N NaOH при 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фталат до 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фталат до 100 ml	4,2
0,1 mol/l монокалиев фосфат + 0,1 N NaOH при 20 °C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	7,2

0,1 mol/l H_3BO_3 в 0,1 mol/l KCI + 0,1 N NaOH при 20 °C	
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	7,0
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	9,2

Б. **KOLTHOFF И VLEESHOUWER**

Състав	pH
0,1 mol/l монокалиев цитрат и 0,1 N NaOH при 18 °C (прибавя се малко кристалче тимол, за да не мухлясва)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	4,2

В. **SÖRENSEN**

0,05 mol/l боракс + 0,1 N HCI

Състав		pH			
Боракс (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 mol/l боракс + 0.1N NaOH

Състав		pH			
Боракс (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