31992L0069

SMĚRNICE KOMISE 92/69/EHS

ze dne 31. července 1992,

kterou se po sedmnácté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 67/548/EHS ze dne 27. června 1967 o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek ([1]), naposledy pozměněnou směrnicí 92/32/EHS ([2]), a zejména na články 28 a 29 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že čl. 3 odst. 1 směrnice 67/548/EHS a článek 3 směrnice Rady 88/379/EHS ze dne 7. června 1988 o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných přípravků ([3]), naposledy pozměněné směrnicí Komise 90/492/EHS ([4]), stanoví, že fyzikálně-chemické vlastnosti, toxicita a ekotoxicita látek a přípravků musí být určeny podle metod stanovených v příloze V směrnice 67/548/EHS;

vzhledem k tomu, že text přílohy V směrnice 67/548/EHS je v současné době zveřejněn ve dvou částech, kterými jsou příloha směrnice Komise 84/449/EHS ([5]) a příloha směrnice Komise 88/302/EHS ([6]);

vzhledem k tomu, že za účelem zohlednění technického rozvoje je nezbytné upravit zkušební metody, které jsou uvedeny v příloze směrnice Komise 84/449/EHS;

vzhledem k tomu, že za účelem zohlednění technického rozvoje je také nezbytné upravit zkušební metodu inhibice růstu řas, která je nyní uvedena v příloze směrnice Komise 88/302/EHS, a při této příležitosti přesunout tuto zkušební metodu do přílohy směrnice 84/449/EHS;

vzhledem k tomu, že je vhodné omezit na minimum počet zvířat používaných pro experimentální účely v souladu se směrnicí Rady 86/609/EHS o sbližování právních a správních přepisů členských států týkajících se ochrany zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely ([7]);

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Výboru pro přizpůsobení technickému pokroku směrnic o odstranění technických překážek obchodu na úseku nebezpečných látek a přípravků,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Příloha směrnice 84/449/EHS se nahrazuje přílohou této směrnice.

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

Článek 2

Zkušební metoda inhibice růstu řas popsaná v příloze směrnice 88/302/EHS se zrušuje.

Článek 3

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí do 30. října 1993. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Tyto předpisy přijaté členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním vyhlášení.

Způsob odkazu si stanoví členské státy.

Článek 4

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 31. července 1992.

Za Komisi

Karel VAN MIERT

člen Komise

PŘÍLOHA

Příloha směrnice Komise 92/69/EHS ze dne 31. července 1992, kterou se po sedmnácté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek [1]

[1] Úř. věst. L 383, 29.12.1992, s. 113.

OBSAH

ÚVOD

ČÁST A:	METODY PRO STANOVENÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ	262
A.1	Bod tání/bod tuhnutí	262
A.2	Bod varu	272
A.3	Relativní hustota	278
A.4	Tlak par	283
A.5	Povrchové napětí	304
A.6	Rozpustnost ve vodě	311
A.8	Rozdělovací koeficient	320
A.9	Bod vzplanutí	331
A.10	Hořlavost (pevné látky)	333
A.11	Hořlavost plynů	336
A.12	Hořlavost (při styku s vodou)	338
A.13	Pyroforické vlastnosti pevných látek a kapalin	342
A.14	Výbušné vlastnosti	344
A.15	Bod samozápalu (kapaliny a plyny)	355
A.16	Relativní teplota samozápalu pevných látek	356
A.17	Oxidační vlastnosti (pevné látky)	359
ČÁST B:	METODY STANOVENÍ TOXICITY	364
Obecný úvok		364
B.1	Akutní toxicita (orální)	367
B.1 bis	Akutní toxicita (orální)	370
B.2	Akutní toxicita (inhalační)	374
B.3	Akutní toxicita (dermální)	378
B.4	Akutní toxicita (kožní dráždivost)	381
B.5	Akutní toxicita (oční dráždivost)	384
B.6	Senzibilizace kůže	388
B.7	Orální toxicita (28denní opakovaná aplikace)	393
B.8	Inhalační toxicita (28denní opakovaná aplikace)	397
B.9	Dermální toxicita (28denní opakovaná aplikace)	401
B.10	Mutagenita (cytogenetická zkouška na savčích buňkách in vitro)	405
B.11	Mutagenita (cytogenetická analýza chromosomů v buňkách kostní dřeně savců in vivo)	408
B.12	Mutagenita (test mikrojader)	411
B.13	Mutagenita (zkouška na reversní mutace u bakterií Escherichia coli)	414
B.14	Mutagenita (zkouška na reversní mutace u bakterií Slamonella typhimurium)	417

ČÁST C: METODY PRO STANOVENÍ EKOTOXICITY..... 420

C.1 Akutní toxicita pro ryby..... 420
C.2 Akutní toxicita pro dafnie..... 429
C.3 Zkouška inhibice růstu řas..... 436
C.4 Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti..... 444
C.4-A: Zkouška na úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC)..... 451
C.4-B: Modifikovaná screeningová zkouška OECD..... 454
C.4-C: Zkouška na uvolňování CO2..... 459
C.4-D: Zkouška manometrickou respirometrií..... 464
C.4-E: Zkouška v uzavřených lahvičkách..... 468
C.4-F: Zkouška MITI (Ministerstvo zahraničního obchodu a průmyslu, Japonsko)..... 473
Přílohy..... 478
C.5 Rozklad: biochemická spotřeba kyslíku..... 483
C.6 Rozklad: chemická spotřeba kyslíku..... 484
C.7 Abiotický rozklad: hydrolýza jako funkce pH..... 486

ÚVOD

V této příloze jsou popsány zkušební metody pro stanovení fyzikálněchemických, toxikologických a ekotoxikologických vlastností uvedených v přílohách VII a VIII směrnice 79/831/EHS. Vycházejí z metod uznaných a doporučených příslušnými mezinárodními subjekty (zejména OECD).

Pokud takové metody nebyly k dispozici, byly převzaty národní normy nebo metody, u nichž došlo mezi vědci k dohodě. Zkoušky by měly být obecně prováděny s látkami definovanými ve směrnici. Pozornost je třeba věnovat možnému vlivu nečistot na výsledky zkoušek.

Nejsou-li metody v této příloze pro zkoumání určité vlastnosti vhodné, musí oznamovatel zdůvodnit použití alternativní metody.

Zkoušky a studie na zvířatech musí být prováděny v souladu s vnitrostátními předpisy a musí při nich být zohledněny humánní principy a mezinárodní vývoj v oblasti ochrany zvířat.

Z rovnocenných zkušebních metod se zvolí metoda vyžadující menší počet zvířat.

ČÁST A: METODY PRO STANOVENÍ FYZIKÁLNĚCHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ

A.1 BOD TÁNÍ/BOD TUHNUTÍ

1. **METODA**

Většina dále popsaných metod je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Jejich základní principy jsou uvedeny v literatuře (2) a (3).

1.1 ÚVOD

Popsané metody a přístroje jsou určeny ke stanovení bodu tání látek bez omezení z hlediska stupně jejich čistoty.

Výběr metody závisí na povaze látky, která má být zkoumána. Omezením bude tedy skutečnost, zda lze danou látku rozmělnit na prášek snadno, obtížně nebo zda ji nelze rozmělnit.

U některých látek je vhodnější stanovení bodu tuhnutí nebo krystalizace a normalizované metody pro tato stanovení jsou v této metodě rovněž uvedeny.

Nelze-li vzhledem ke zvláštním vlastnostem látky dobře stanovit žádný z uvedených parametrů, může být vhodné stanovit bod tekutosti.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod tání je definován jako teplota, při níž dochází za atmosférického tlaku k přechodu z pevného do kapalného skupenství a která za ideálních podmínek odpovídá bodu tuhnutí.

Vzhledem k tomu, že u mnoha látek dochází k fázovému přechodu v rozmezí teplot, je toto rozmezí často nazýváno rozmezím bodu tání.

Přepočet jednotek (K na °C):

$t = T - 273{,}15$

t: Celsiova teplota, stupně Celsia (°C)

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při zkoumání nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Některé kalibrační látky jsou uvedeny v literatuře (4).

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Stanovuje se teplota (teplotní rozmezí) fázového přechodu z pevného do kapalného skupenství nebo z kapalného do pevného skupenství. V praxi se při zahřívání/ochlazování vzorku zkoušené látky za atmosférického tlaku stanoví teploty počátku tání/tuhnutí a konce tání/tuhnutí. Je popsáno pět typů metod, jmenovitě kapilární metoda, metody používající zahřívací bloky, metody stanovení bodu tuhnutí, metody termické analýzy a stanovení bodu tekutosti (vyvinuto pro minerální oleje).

V některých případech může být vhodné měřit bod tuhnutí místo bodu tání.

1.4.1 **Kapilární metoda**

1.4.1.1 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní*

Malé množství jemně rozmělněné látky se vpraví do kapiláry a zhutní se. Kapilára se zahřívá spolu s teploměrem, přičemž se rychlost nárůstu teploty během tání nastaví na méně než 1 $K \cdot min^{-1}$. Stanoví se teploty počátku a konce tání.

1.4.1.2 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem*

Provádí se podobně jako v bodě 1.4.1.1 s tím rozdílem, že kapilára a teploměr jsou umístěny v kovovém vyhřívaném bloku a pozorují se otvory v bloku.

1.4.1.3 *Detekce fotočlánkem*

Vzorek v kapiláře se automaticky zahřívá v kovovém válci. Otvorem ve válci prochází látkou světelný paprsek na přesně kalibrovaný fotočlánek. Při tání mění většina látek optické vlastnosti a z neprůhledných se mění na průhledné. V tomto okamžiku vzroste intenzita světla dopadajícího na fotočlánek a do zařízení odečítajícího teplotu platinového odporového teploměru umístěného v topné komůrce je vyslán signál k zastavení zaznamenávání. Tato metoda není vhodná pro některé silně zbarvené látky.

1.4.2 **Zahřívací bloky**

1.4.2.1 *Koflerův zahřívací stolek*

Koflerův zahřívací stolek je tvořen dvěma kovovými částmi s různou teplotní vodivostí, je vyhříván elektricky a je konstruován tak, že teplotní gradient je po jeho délce téměř lineární. Teplota stolku se může měnit od 283 do 573 K; stolek je vybaven speciálním zařízením pro odečítání teploty, tvořeným jezdcem s ukazatelem a stupnicí navrženou pro daný stolek. Pro stanovení bodu tání se látka nanese v tenké vrstvě přímo na povrch stolku. Během několika sekund se vytvoří ostrá dělicí linie mezi kapalnou a pevnou fází. Teplota v místě dělicí linie se odečte po nastavení ukazatele na tuto dělicí linii.

1.4.2.2 *Tavicí mikroskop*

Pro stanovení bodu tání velmi malých množství látek se používají různé typy mikroskopů s ohřívacím stolkem. Většina ohřívacích stolků využívá k měření teploty citlivé termočlánky, používají se však i rtuťové teploměry. Typický přístroj pro stanovení bodu tání pomocí mikroskopu s ohřívacím stolkem má ohřívací komoru s kovovou deskou, na kterou se umístí vzorek na podložním sklíčku. Ve středu kovové desky je otvor, kterým může procházet světelný paprsek odražený osvětlovacím zrcátkem mikroskopu. Při měřeních se ohřívací komora přikryje skleněnou destičkou, aby se omezila cirkulace vzduchu v místě, kde se nachází vzorek.

Ohřev vzorku se kontroluje regulačním odporem. Pro velmi přesná měření opticky anisotropních látek lze používat polarizované světlo.

1.4.2.3 *Menisková metoda*

Tato metoda se používá především pro polyamidy.

Vizuálně se stanoví teplota, při které se zřetelně posune meniskus silikonového oleje uzavřeného mezi ohřívacím blokem a skleněnou krycí destičkou umístěnou na vzorku zkoušeného polyamidu.

1.4.3 **Metoda stanovení bodu tuhnutí**

Vzorek se vloží do speciální zkumavky, která se umístí do přístroje pro stanovení bodu tuhnutí. Během ochlazování se vzorek nepřetržitě pomalu míchá a ve vhodných intervalech se odečítá teplota. Jakmile je teplota po několik odečtů konstantní (po odpovídající korekci teploměru), je zaznamenána jako bod tuhnutí.

Podchlazení je nutno zabránit udržováním rovnováhy mezi pevnou a kapalnou fází.

1.4.4 **Termická analýza**

1.4.4.1 *Diferenční termická analýza (DTA)*

Při této technice se zaznamenává teplotní rozdíl mezi látkou a referenčním materiálem, jež jsou podrobeny stejnému řízenému teplotnímu programu. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna zaznamenána jako endotermická (tání) nebo exotermická (tuhnutí) odchylka od základní linie záznamu teploty.

1.4.4.2 *Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)*

Při této technice se látka a referenční materiál podrobí stejnému řízenému teplotnímu programu a zaznamenává se rozdíl energie absorbované látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty. Tato energie je energií potřebnou k zachování nulového teplotního rozdílu mezi látkou a referenčním materiálem. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna zaznamenána jako endotermická (tání) nebo exotermická (tuhnutí) odchylka od základní linie záznamu tepelného toku.

1.4.5 **Bod tekutosti**

Metoda byla vyvinuta pro minerální oleje a je vhodná pro měření olejovitých látek s nízkým bodem tání.

Po počátečním zahřátí se vzorek určitou rychlostí ochlazuje a v intervalech po 3 K se stanovuje jeho tekutost. Nejnižší teplota, při níž je ještě pozorován pohyb látky, se zaznamená jako bod tekutosti.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Použitelnost a přesnost různých metod stanovení bodu tání/rozmezí bodu tání jsou uvedeny v této tabulce.

TABULKA: POUŽITELNOST METOD

A. Kapilární metody

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost [1]	Existující norma
Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní	ano	pouze pro několik látek	273 až 573 K	±0,3 K	JIS K 0064
Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem	ano	pouze pro několik látek	293 až > 573 K	±0,5 K	ISO 1218 (E)
Detekce fotočlánkem	ano	pro některé látky s použitím přídavných zařízení	253 až 573 K	±0,5 K	

[1] Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

B. Zahřívací bloky a stanovení bodu tuhnutí

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Koflerův zahřívací stolek	ano	ne	283 až > 573 K	±1,0 K	ANSI/ASTM D 345176
Tavicí mikroskop	ano	pouze pro několik látek	273 až > 573 K	±0,5 K	DIN 53736
Menisková metoda	ne	především pro polyamidy	293 až > 573 K	±0,5 K	ISO 1218 (E)
Metoda stanovení bodu tuhnutí	ano	ano	223 až 573 K	±0,5 K	např. BS 4695
(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.					

C. Termická analýza

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Diferenční termická analýza	ano	ano	173 až 1 273 K	do 600 K ±0,5 K do 1 273 K ±2,0 K	ASTM E 53776
Diferenční skenovací kalorimetrie	ano	ano	173 až 1 273 K	do 600 K ±0,5 K do 1 273 K ±2,0 K	ASTM E 53776
(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.					

D. Bod tekutosti

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Teplota tekutosti	pro minerální oleje a olejovité látky	pro minerální oleje a olejovité látky	223 až 323 K	±3,0 K	ASTM D 9766
(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.					

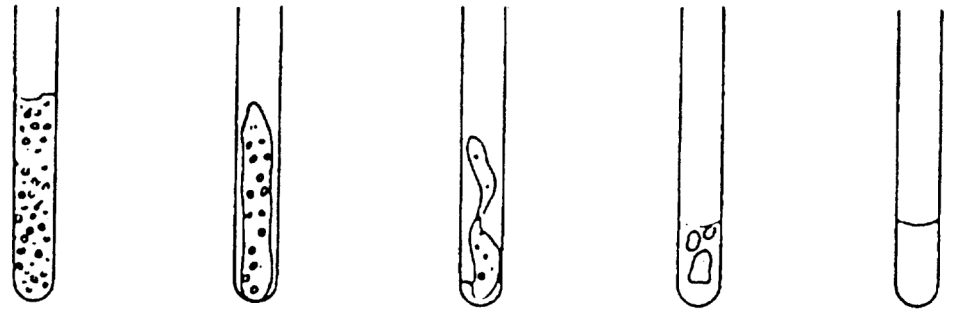
1.6 POPIS METOD

Postupy téměř všech těchto zkušebních metod jsou popsány v národních a mezinárodních normách (viz doplněk 1).

1.6.1 **Kapilární metody**

Při pomalém vzestupu teploty lze u jemně práškovitých látek obvykle rozlišit stupně tání znázorněné na obrázku 1.

Obrázek 1



Fáze A (Počátek tání): na vnitřní straně trubičky se stejnoměrně drží jemné kapičky.

Fáze B V důsledku smrštění vzorku se mezi vnitřní stěnou a vzorkem tvoří mezera.

Fáze C Smrštěný vzorek se začíná hroutit dolů a stává se tekutým.

Fáze D Na povrchu se tvoří úplný meniskus, ale značná část vzorku je dosud pevná.

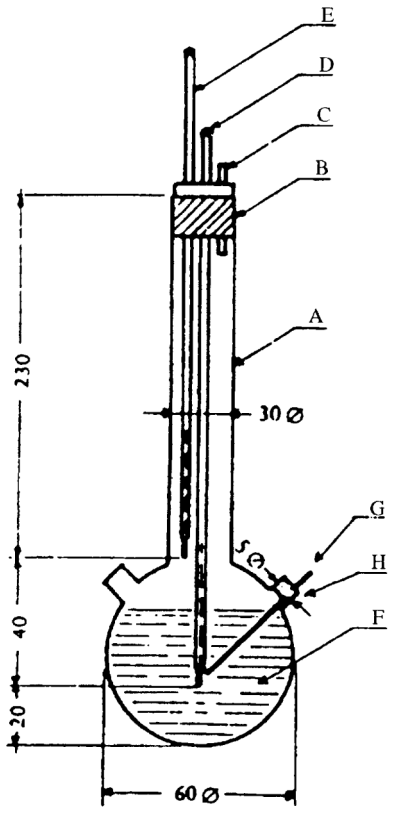
Fáze E (Konečná fáze tání): Vzorek již neobsahuje žádné pevné částice.

Během stanovení bodu tání se zaznamenávají teploty počátku tání a konečné fáze.

1.6.1.1 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní*

Na obrázku 2 je znázorněna normalizovaná skleněná aparatura pro stanovení bodu tání (JIS K 0064); všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech.

Obrázek 2



A: Měřicí baňka
B: Zátka
C: Trubice pro vyrovnání tlaku
D: Teploměr
E: Pomocný teploměr
F: Kapalinová lázeň
G: Skleněná kapilára, délka 80–100 mm, vnitřní průměr 1,0 mm ±0,2 mm, síla stěny 0,2 až 0,3 mm
H: Boční hrdlo

Kapalinová lázeň:

Je třeba zvolit vhodnou kapalinu. Volba kapaliny závisí na bodu tání, který má být stanoven, např. kapalný parafin pro stanovení bodu tání nižšího než 473 K, silikonový olej pro stanovení bodu tání nižšího než 573 K.

Pro stanovení bodu tání vyššího než 523 K lze použít směs tří hmotnostních dílů kyseliny sírové a dvou hmotnostních dílů síranu draselného. S tímto typem směsi je třeba pracovat s náležitou opatrností.

Teploměr:

Měly by se používat pouze teploměry, které splňují požadavky norem ASTM E 171, DIN 12770, JIS K 8001 nebo rovnocenných norem.

Postup:

Suchá látka se jemně rozetře v třecí misce a vpraví se do kapiláry zatavené na jednom konci, a to tak, aby po zhutnění byla kapilára naplněna do výšky přibližně 3 mm. Má-li se dosáhnout stejnoměrného zhutnění, nechá se kapilára dopadnout z výšky přibližně 700 mm skleněnou trubicí na hodinové sklíčko.

Naplněná kapilára se vloží do lázně tak, aby se střední část rtuťové baňky teploměru dotýkala kapiláry v místě, kde se nachází vzorek. Kapilára se obvykle vkládá do lázně při teplotě asi o 10 K nižší, než je bod tání.

Lázeň se zahřívá tak, aby vzestup teploty činil přibližně 3 $K \cdot min^{-1}$. Lázeň se míchá. Asi 10 K pod očekávaným bodem tání se růst teploty upraví na nejvýše 1 $K \cdot min^{-1}$.

Výpočet:

Bod tání se vypočte takto:

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

kde:

T = korigovaný bod tání v K

T_D = odečet teploty na teploměru D v K

T_E = odečet teploty na teploměru E v K

n = počet stupňů, o něž rtuťový sloupec teploměru D vyčnívá z kapaliny.

1.6.1.2 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem*

Přístroj:

Je tvořen:

— válcovým kovovým blokem, jehož horní část je dutá a tvoří komoru (viz obrázek 3),

— kovovou krycí deskou se dvěma nebo více otvory, kterými je možno do kovového bloku zavést trubičky,

— ohřívacím systémem kovového bloku, například elektrickým topným odporem uzavřeným v kovovém bloku,

— regulačním odporem pro regulaci příkonu, je-li použit elektrický ohřev,

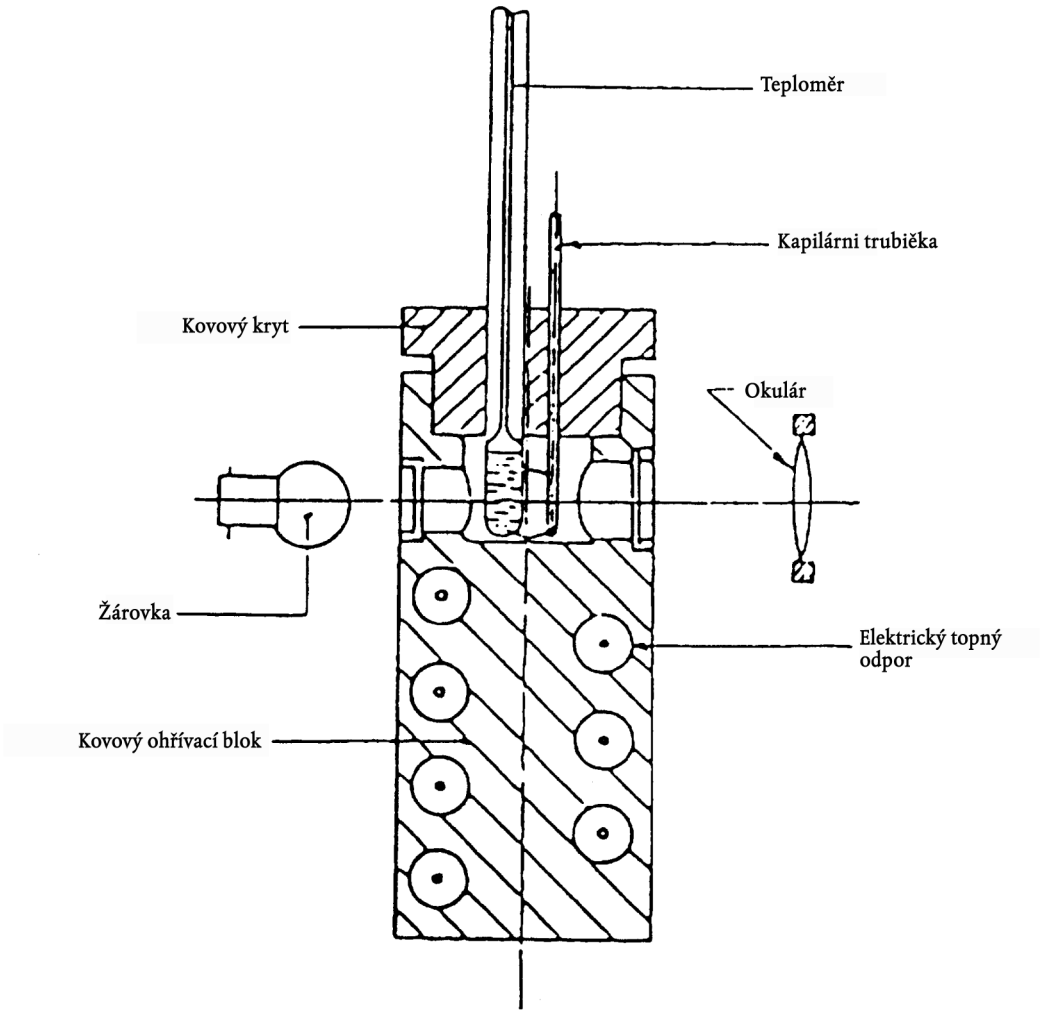
— čtyřmi okénky ze žáruvzdorného skla v bočních stěnách ohřívací komory, orientovanými vůči sobě pod pravým úhlem. Před jedním z těchto okének je umístěn okulár pro pozorování kapilární trubičky. Ostatní tři okénka slouží k osvětlení vnitřního prostoru žárovkami,

— kapilární trubičkou z žáruvzdorného skla zatavenou na jednom konci (viz 1.6.1.1).

Teploměr:

Viz normy uvedené v 1.6.1.1. Je rovněž možné použít termoelektrické měřicí přístroje srovnatelné přesnosti.

Obrázek 3



1.6.1.3 *Detekce fotočlánkem*

Přístroj a postup:

Přístroj se skládá z kovové komory s automatickým ohřívacím zařízením. Tři kapilární trubičky se naplní podle bodu 1.6.1.1 a umístí se do ohřívací komory.

Pro kalibraci přístroje je k dispozici několik lineárních režimů růstu teploty, přičemž vhodný lineární růst teploty se elektricky nastaví předem zvolenou konstantou. Zaznamenávací zařízení ukazují teplotu v ohřívací komoře a teplotu látky v kapilárách.

1.6.2 **Zahřívací bloky**

1.6.2.1 *Koflerův zahřívací stolek*

Viz doplněk.

1.6.2.2 *Tavicí mikroskop*

Viz doplněk.

1.6.2.3 *Menisková metoda (pro polyamidy)*

Viz doplněk.

V oblasti bodu tání by měla být rychlost ohřevu menší než 1 K min^{-1}.

1.6.3 **Metody stanovení bodu tuhnutí**

Viz doplněk.

1.6.4 **Termická analýza**

1.6.4.1 *Diferenční termická analýza*

Viz doplněk.

1.6.4.2 *Diferenční skenovací kalorimetrie*

Viz doplněk.

1.6.5 **Stanovení bodu tekutosti**

Viz doplněk.

2. **DATA**

V některých případech je nutno provést korekci teploměru.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,

— odhad přesnosti.

Jako bod tání se uvede střední hodnota alespoň dvou měření, jejichž výsledky leží v rozmezí odhadnuté přesnosti (viz tabulky).

Leží-li rozdíl teplot počáteční a konečné fáze tání v mezích přesnosti metody, uvede se jako bod tání konečná teplota, v opačném případě se uvedou obě teploty.

Jestliže se látka před dosažením bodu tání rozkládá nebo sublimuje, uvede se teplota, při které dochází k pozorovanému jevu.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

4. **LITERATURA**

(1) OECD, 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, volume II, 803–834.

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

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

Doplněk

Další technické podrobnosti je možné zjistit například v těchto normách:

1. **Kapilární metody**

1.1 Přístroje pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní

ASTM E 3269	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2 Přístroje pro stanovení bodu tání s kovovým blokem

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

2. **Zahřívací bloky**

2.1 Koflerův zahřívací stolek

ANSI/ASTM D 345176	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

2.2 Tavicí mikroskop

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunssttoffen

2.3 Menisková metoda (polyamidy)

ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point“
ANSI/ASTM D 213366	Standard specificatin for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion“. Méthode du ménisque

3.	**Metody stanovení bodu tuhnutí**	
	BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
	BS 4695	Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (Cooling Curve)
	DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
	ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la temperature de figeage
	DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
	NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
	NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
	ISO 1392	Method for the determination of the freezing point
4.	**Termická analýza**	
4.1	Diferenční termická analýza	
	ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
	ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
	ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
	DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe
4.2	Diferenční skenovací kalorimetrie	
	ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
	ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
	ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
	DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe
5	**Stanovení bodu tekutosti**	
	NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point ďécoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
	ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
	ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point.

A.2 BOD VARU

1. **METODA**

Většina dále popsaných metod je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Jejich základní principy jsou uvedeny v literatuře (2) a (3).

1.1 ÚVOD

Popsané metody a zařízení lze použít pro kapaliny a látky s nízkým bodem tání, pokud nepodléhají chemickým reakcím pod bodem varu (např. autooxidaci, přesmyku, rozkladu atd.). Metody lze použít jak pro čisté kapalné látky, tak pro kapalné látky obsahující nečistoty.

Přednost mají metody využívající detekci fotočlánkem a metody termické analýzy, protože umožňují stanovení jak bodu tání, tak bodu varu. Tato měření mohou být navíc prováděna automaticky.

„Dynamická metoda“ má tu výhodu, že ji lze použít i ke stanovení tlaku par a přitom není třeba korigovat bod varu na normální tlak (101,325 kPa), neboť tento tlak lze během měření nastavit manostatem.

Poznámky:

Vliv nečistot na stanovení bodu varu závisí ve velké míře na jejich povaze. Jestliže vzorek obsahuje těkavé nečistoty, které mohou ovlivnit výsledky, může být látky přečištěna.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Standardní bod varu je definován jako teplota, při které je tlak par dané kapaliny roven 101,325 kPa.

Jestliže se měření bodu varu neprovádí za normálního tlaku, lze závislost tlaku par na teplotě popsat Clausiovou-Clapeyronovou rovnicí:

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

kde

p = tlak par látky v Pa

ΔH_v = výparné teplo v $J \cdot mol^{-1}$

R = univerzální molární plynová konstanta = 8,314 $J\ mol^{-1} \cdot K^{-1}$

T = termodynamická teplota v K

Bod varu se uvádí s ohledem na okolní tlak při měření.

Přepočty:

Tlak (jednotka: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(jednotka „bar“ je nadále přípustná, její používání se však nedoporučuje)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 torr

(jednotky „mm Hg“ a „torr“ nejsou povoleny)

1 atm = standardní atmosféra = 101 325 Pa

(jednotka „atm“ není povolena).

Teplota (jednotka: K)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsiova teplota, stupeň Celsia (°C)

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Některé kalibrační látky jsou uvedeny v doplňku.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Pět metod stanovení bodu varu (teplotního rozmezí bodu varu) je založeno přímo na měření teploty varu, další dvě využívají termální analýzy.

1.4.1 **Stanovení ebuliometrem**

Ebuliometry byly původně vyvinuty pro stanovení molekulové hmotnosti na základě zvýšení teploty varu, jsou však vhodné také pro přesná měření bodu varu. Velmi jednoduchý přístroj je popsán v normě ASTM D 112072 (viz doplněk). V tomto přístroji se kapalina zahřívá za rovnovážných podmínek při atmosférickém tlaku, dokud nezačne vřít.

1.4.2 **Dynamická metoda**

Metoda zahrnuje měření teploty kondenzace páry vhodným teploměrem umístěným za varu ve zpětném toku (refluxu). U této metody lze měnit tlak.

1.4.3 **Destilační metoda pro stanovení bodu varu**

Metoda zahrnuje destilaci kapaliny a měření teploty kondenzace páry, přičemž se stanovuje také množství destilátu.

1.4.4 **Postup podle Siwoloboffa**

Vzorek se zahřívá ve zkumavce, která je ponořena do tepelné lázně. Do zkumavky se vzorkem je zasunuta zatavená kapilára, v jejíž spodní části se nachází vzduchová bublinka.

1.4.5 **Detekce fotočlánkem**

Při použití principu unikajících bublinek podle Siwoloboffa se provádí automatické fotoelektrické měření.

1.4.6 **Diferenční termická analýza**

Při této technice se zaznamenává teplotní rozdíl mezi látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty, přičemž látka a referenční materiál se podrobí témuž řízenému teplotnímu programu. Jestliže u studované látky dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna indikována jako endotermická odchylka (var) od základní linie záznamu teploty.

1.4.7 **Diferenční skenovací kalorimetrie**

Při této technice se látka a referenční materiál podrobí stejnému řízenému teplotnímu programu a zaznamenává se rozdíl energie absorbované látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty. Tato energie je energií potřebnou k zachování nulového teplotního rozdílu mezi látkou a referenčním materiálem. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna indikována jako endotermická odchylka (var) od základní linie záznamu tepelného toku.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Použitelnost a přesnost různých metod používaných pro stanovení bodu/teplotního rozmezí bodu varu jsou uvedeny v tabulce 1.

TABULKA 1: SROVNÁNÍ METOD

Metoda měření	Odhadnutá přesnost	Existující norma
Stanovení ebuliometrem	±1,4 K (do 373 K) (1), (2) ±2,5 K (do 600 K) (1), (2)	ASTM D 112072 (1)
Dynamická metoda	±0,5 K (do 600 K) (2)	
Destilační metoda (stanovení rozmezí bodu varu)	±0,5 K (do 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Postup podle Siwoloboffa	±2 K (do 600 K) (2)	
Detekce fotočlánkem	±0,3 K (při 373 K) (2)	
Diferenční termická analýza	±0,5 K (do 600 K) ±2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 53776
Diferenční skenovací kalorimetrie	±0,5 K (do 600 K) ±2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 53776

(1) Tato přesnost platí pouze pro jednoduchý přístroj, popsaný např. v normě ASTM D 112072; může být zlepšena užitím dokonalejšího ebuliometru.
(2) Platí pouze pro čisté látky. Užití za jiných okolností by mělo být zdůvodněno.

1.6 POPIS METOD

Postupy některých zkušebních metod jsou popsány v mezinárodních a národních normách (viz doplněk).

1.6.1 **Ebuliometr**

Viz doplněk.

1.6.2 **Dynamická metoda**

Viz metoda A.4 pro stanovení tlaku par.

Zaznamená se teplota varu naměřená při tlaku 101,325 kPa.

1.6.3 **Destilační metoda (stanovení rozmezí bodu varu)**

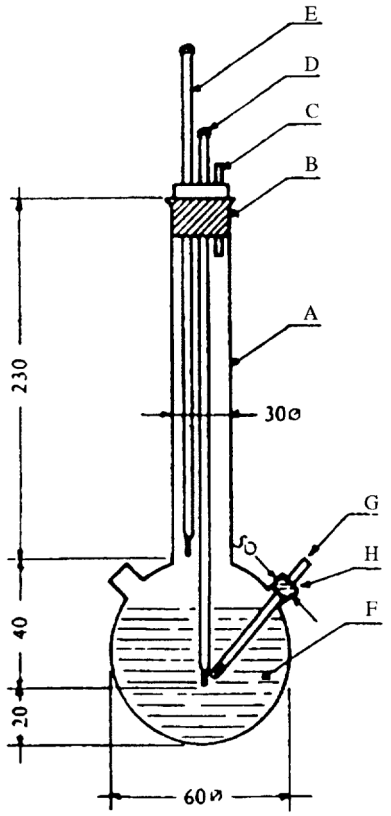
Viz doplněk.

1.6.4 **Postup podle Siwoloboffa**

Vzorek se zahřívá ve zkumavce o průměru přibližně 5 mm v přístroji pro stanovení bodu tání (obrázek 1).

Na obrázku 1 je znázorněn normalizovaný přístroj pro stanovení bodu varu (JIS K 0064) (přístroj je skleněný, všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech).

Obrázek 1



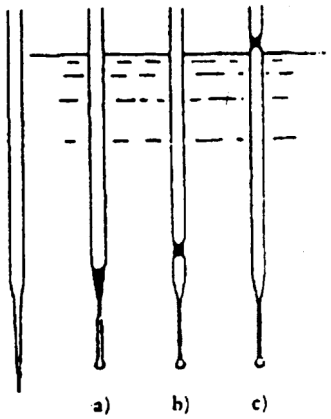
A: Měřicí baňka
B: Zátka
C: Trubice pro vyrovnání tlaku
D: Teploměr
E: Pomocný teploměr
F: Kapalinová lázeň
G: Zkumavka o vnějším průměru max. 5 mm, v níž je vložena kapilára o délce asi 100 mm s vnitřním průměrem 1 mm a sílou stěny přibližně 0,2 až 0,3 mm
H: Boční hrdlo

Do zkumavky se vloží kapilára (varná kapilára) zatavená asi 1 cm nad spodním koncem. Zatavená část kapiláry musí ležet pod hladinou kapaliny. Zkumavka obsahující kapiláru se upevní buď pryžovou páskou k teploměru, nebo pomocí bočního držáku (viz obrázek 2).

Obrázek 2
Princip podle Siwoloboffa



Obrázek 3
Modifikovaný princip



Kapalina pro lázeň se volí podle bodu varu. Pro teploty do 573 K lze použít silikonový olej. Parafinový olej lze použít pouze do 473 K. Kapalina v lázni se zahřívá tak, aby vzestup teploty byl zpočátku asi 3 K min^{-1}. Lázeň se míchá. Asi 10 K před očekávaným bodem tání se zahřívání sníží tak, aby nárůst teploty byl nejvýše 1 K min^{-1}. Krátce před dosažením bodu varu začnou z varné kapiláry rychle unikat bublinky.

Bodu varu je dosaženo, když při ochlazování náhle ustane unikání bublinek a kapalina začne v kapiláře stoupat. Příslušný údaj na teploměru je bodem varu látky.

Modifikovanou metodou (obrázek 3) se bod varu stanovuje v kapiláře pro stanovení bodu tání. Ta se vytáhne do tenké špičky dlouhé asi 2 cm (a) a do ní se nasaje malé množství vzorku. Otevřený konec tenké části kapiláry se zataví tak, aby na konci byla malá vzduchová bublinka. Při zahřívání v aparatuře pro stanovení bodu tání (b) se vzduchová bublinka rozpíná. Bod varu odpovídá teplotě, při které sloupeček látky dosáhne hladiny kapalinové lázně (c).

1.6.5 **Detekce fotočlánkem**

Vzorek se zahřívá v kapiláře ve vyhřívaném kovovém bloku.

Otvory v bloku se vede světelný paprsek tak, aby procházel látkou na přesně kalibrovaný fotočlánek.

Při zvyšování teploty vzorku stoupají z kapiláry jednotlivé vzduchové bublinky. Při dosažení bodu varu počet bublinek značně vzroste. To vede ke změně intenzity světla zaznamenané fotočlánkem a vyvolá signál v měřicím přístroji, kterým se zastaví zaznamenávání teploty měřené platinovým odporovým teploměrem umístěným v bloku.

Tato metoda je zvláště vhodná, protože umožňuje stanovení teplot nižších než laboratorní teplota až do 253,15 K (–20 °C) bez jakékoli úpravy přístroje. Pouze je třeba umístit přístroj v chladicí lázni.

1.6.6 **Termická analýza**

1.6.6.1 *Diferenční termická analýza*

Viz doplněk.

1.6.6.2 *Diferenční skenovací kalorimetrie*

Viz doplněk.

2. **DATA**

Při malých odchylkách od normálního tlaku (nejvýše ±5 kPa) se hodnoty teploty varu přepočítávají na normalizovanou teplotu T_n pomocí SidneyovyYoungovy rovnice:

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

kde:

Δp = (101,325 – p) [pozor na znaménko]

p = naměřený tlak v kPa

f_T = velikost změny teploty varu v závislosti na změně tlaku v K kPa^{-1}

T = naměřená teploty varu v K

T_n = teplota varu korigovaná na normální tlak v K

Teplotní korekční faktory f_T a rovnice pro jejich aproximaci jsou uvedeny pro řadu látek ve zmíněných mezinárodních a národních normách.

Například metoda podle DIN 53171 uvádí přibližné korekce pro rozpouštědla obsažená v nátěrových hmotách:

TABULKA 2: TEPLOTNÍ KOREKČNÍ FAKTORY f_T

Teplota T (K)	Korekční faktor f_T (K kPa^{-1})
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,

— odhad přesnosti.

Jako bod varu se uvede střední hodnota alespoň dvou měření, jejichž výsledky leží v rozmezí odhadnuté přesnosti (viz tabulka 1).

Uvedou se naměřené teploty varu a jejich střední hodnota a dále hodnota tlaku v kPa, při kterém byla měření provedena. Tlak by se měl pokud možno blížit normálnímu tlaku.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

4. **LITERATURA**

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

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, (*eds.*). Experimental thermodynamics. Butterworths, London 1975, volume II.

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

Doplněk

Další technické podrobnosti je možné zjistit například v těchto normách:

1. **Ebuliometr**

ASTM D 112072 Standard test method for boiling point of engine antifreezes

2. **Destilační postupy (teplotní rozmezí bodu varu)**

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 20608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Diferenční termická analýza a diferenční skenovací kalorimetrie**

ASTM E 53776	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 47385	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 47286	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

A.3 RELATIVNÍ HUSTOTA

1. **METODA**

Popsané metody jsou založeny na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Základní principy jsou uvedeny v literatuře (2).

1.1 ÚVOD

Popsané metody stanovení relativní hustoty jsou použitelné pro pevné a kapalné látky bez jakýchkoli omezení, pokud jde o jejich čistotu. Jednotlivé metody, které lze použít, jsou uvedeny v tabulce 1.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Relativní hustota D_4^{20} pevných látek nebo kapalin je poměr mezi hmotností určitého objemu zkoumané látky stanovenou při 20 °C a hmotností stejného objemu vody stanovenou při 4 °C. Relativní hustota nemá rozměr.

Hustota látky ρ je podíl hmotnosti látky m a jejího objemu V.

Jednotkou hustoty ρ v soustavě SI je $kg \cdot m^{-3}$.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY (1,3)

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METOD

Používají se čtyři skupiny metod.

1.4.1 **Vztlakové metody**

1.4.1.1 *Hustoměry* (pro kapaliny)

Dostatečně přesné a rychlé stanovení hustoty lze provést plovoucími hustoměry, které umožní stanovit hustotu kapaliny odečtením hloubky jejich ponoření na kalibrované stupnici.

1.4.1.2 *Hydrostatické váhy* (pro kapaliny a pevné látky)

Ke stanovení hustoty zkoušeného vzorku lze využít rozdíl mezi jeho hmotností stanovenou na vzduchu a ve vhodné kapalině (např. vodě).

U pevných látek je naměřená hustota reprezentativní jen pro daný použitý vzorek. Při stanovení hustoty kapalin se zváží těleso známého objemu nejdříve na vzduchu a poté v kapalině.

1.4.1.3 *Metoda ponořené kuličky* (pro kapaliny) (4)

Touto metodou se stanoví hustota kapaliny z rozdílu mezi výsledky vážení kapaliny před ponořením kuličky známého objemu do zkoušené kapaliny a po něm.

1.4.2 **Pyknometrické metody**

Pro pevné látky a kapaliny lze použít pyknometry různých tvarů o známém objemu. Hustota se vypočte z rozdílu výsledků vážení plného a prázdného pyknometru a z jeho známého objemu.

1.4.3 **Vzduchový srovnávací pyknometr** (pro pevné látky)

Hustotu pevné látky v libovolné formě je možné měřit při pokojové teplotě plynovým srovnávacím pyknometrem. Objem látky se měří ve vzduchu nebo v inertním plynu v kalibrovaném válci nastavitelného objemu. Pro výpočet hustoty se po skončení měření objemu provede vážení.

1.4.4 **Oscilační densimetr** (5,6,7)

Hustotu kapaliny lze měřit oscilačním densimetrem. Mechanický oscilátor konstruovaný ve tvaru Utrubice se rozkmitá na rezonanční kmitočet, který závisí na jeho hmotnosti. Po vložení vzorku se rezonanční kmitočet oscilátoru změní. Aparaturu je nutné kalibrovat dvěma kapalinami o známé hustotě. Kapaliny by měly být voleny nejlépe tak, aby pokrývaly rozmezí, ve kterém leží hustota měřeného vzorku.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Použitelnost různých metod pro stanovení relativní hustoty je uvedena v tabulce.

1.6 POPIS METOD

Normy uvedené jako příklady, ve kterých je možno vyhledat technické podrobnosti, jsou uvedeny v doplňku.

Zkoušky musí být provedeny při 20 °C a provedou se nejméně dvě měření.

2. **DATA**

Viz normy.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění.

Relativní hustota D_4^{20} se uvede podle definice v bodě 1.2 společně se skupenstvím měřené látky.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a skupenství látky.

TABULKA: POUŽITELNOST METOD

Metoda měření	Hustota		Nejvyšší možná hodnota dynamické viskozity	Existující norma
	pevné látky	kapaliny		
1.4.1.1 Hustoměr		ano	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2 Hydrostatické váhy				
a) pevné látky	ano			ISO 1183 (A),
b) kapaliny		ano	5 Pa s	ISO 901 a 758
1.4.1.3 Metoda ponořené kuličky		ano	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2 Pyknometr				ISO 3507,
a) pevné látky	ano			ISO 1183 (B), NF T 20053,
b) kapaliny		ano	500 Pa s	ISO 758
1.4.3 Vzduchový srovnávací pyknometr	ano			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4 Oscilační densimetr		ano	5 Pa s	

4. **LITERATURA**

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

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

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

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

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

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

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

Doplněk

Technické podobnosti lze vyhledat například v těchto normách.

1. **VZTLAKOVÉ METODY**

1.1 Hustoměr

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use
	Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation
	Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20050	Chemical products for industrial use – Determination of density of liquids – Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 Hydrostatické váhy

Pro pevné látky	
ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics including cellular plastics
NF T 20049	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
Pro kapaliny	
ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 a 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 Metoda ponořené kuličky

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

2. **PYKNOMETRICKÉ METODY**

2.1 Pro kapaliny

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

DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100{,}10^{-6}$ 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 to 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	Pycnometr with groundin 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 20053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pycnometric method

2.2 Pro pevné látky:

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pycnometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **VZDUCHOVÉ SROVNÁVACÍ PYKNOMETRY**

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

A.4 TLAK PAR

1. **METODA**

Většina dále popsaných metod je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Jejich základní principy jsou uvedeny v literatuře (2) a (3).

1.1 ÚVOD

Pro provádění zkoušky je užitečné mít předběžné informace o struktuře, bodu tání a bodu varu zkoušené látky.

Neexistuje žádný postup vhodný pro celý rozsah tlaku par. Proto je pro měření tlaku par v rozmezí od $<10^{-4}$ Pa do 10^5 Pa doporučeno několik metod.

Nečistoty mají obvykle na tenzi par vliv, a to v rozsahu, který do značné míry závisí na druhu nečistoty.

Jsouli ve vzorku přítomny těkavé nečistoty, které by mohly ovlivnit výsledek, může být látka přečištěna. Může být vhodné uvést tenzi par technického materiálu.

U některých zde popsaných metod se užívají přístroje s kovovými díly. Tato skutečnost by měla být vzata v úvahu při zkoušení korozivních látek.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Tlak par látky je definován jako tlak nasycené páry nad pevnou nebo kapalnou látkou. Při termodynamické rovnováze je tlak par čisté látky pouze funkcí teploty.

Jednotkou tlaku v soustavě SI je pascal (Pa).

Dále jsou uvedeny některé dříve používané jednotky s odpovídajícími přepočítávacími faktory:

1 torr (= 1 mm Hg)	= 1,333 10^2 Pa
1 fyzikální atmosféra (atm)	= 1,013 10^5 Pa
1 bar	= 10^5 Pa

Jednotkou termodynamické teploty v soustavě SI je kelvin (K).

Univerzální molární plynová konstanta R má hodnotu 8,314 $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$.

Závislost tlaku par na teplotě je popsána ClausiovouClapeyronovou rovnicí:

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

kde

p = tlak par látky v Pa,

ΔH_v = výparné teplo v $J \cdot mol^{-1}$,

R = univerzální molární plynová konstanta v $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$,

T = termodynamická teplota v K.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍCH METOD

Pro stanovení tlaku par je navrženo sedm metod, které lze používat v různých oblastech hodnot tlaku par. Každou z metod se stanovuje tlak par při různých teplotách. V omezeném rozsahu teplot je logaritmus tlaku par čisté látky nepřímo úměrný teplotě.

1.4.1 **Dynamická metoda**

Při dynamické metodě se měří teplota varu při daném tlaku.

Doporučený rozsah:

10^3 až 10^5 Pa,

Tato metoda se rovněž doporučuje pro stanovení bodu varu a je vhodná až do teploty 600 K.

1.4.2 **Statická metoda**

Statickou metodou se měří tlak par, který se ustaví při termodynamické rovnováze v uzavřeném systému při dané teplotě. Tato metoda je vhodná pro jednosložkové i vícesložkové pevné látky a kapaliny.

Doporučený rozsah:

10 až 10^5 Pa

Při potřebné pečlivosti lze tuto metodu použít také pro oblast od 1 do 10 Pa.

1.4.3 **Isoteniskop**

Tato normalizovaná metoda je rovněž statickou metodou, obecně však není vhodná pro vícesložkové systémy. Bližší informace lze získat v metodě ASTM D287986.

Doporučený rozsah:

100 až 10^5 Pa.

1.4.4 **Efusní metoda: Váhy pro měření tlaku par**

Ve vakuu se stanoví množství látky, které opustí měřicí celu za časovou jednotku otvorem známé velikosti tak, že může být zanedbán návrat látky do měřicí cely (např.měřením impulsů generovaných prouděním par na citlivých vahách nebo stanovením ztráty hmotnosti).

Doporučený rozsah:

10^{-3} až 1 Pa.

1.4.5 **Efusní metoda: Měření hmotnostního úbytku nebo měření záchytem parní fáze**

Metoda je založena na stanovení hmotnosti par zkoušené látky unikající za jednotku času z Knudsenovy komůrky (4) mikrodýzou za podmínek vysokého vakua. Hmotnost difundujících par může být zjištěna buď stanovením úbytku hmotnosti komůrky, nebo kondenzací par při nízké teplotě a stanovením jejich množství chromatografickou analýzou. Tlak se vypočte za použití Herzovy-Knudsenovy rovnice.

Doporučený rozsah:

10^{-3} až 1 Pa

1.4.6 **Metoda nasycení plynu**

Nad látkou se vede proud inertního nosného plynu tak, že se nasytí jejími parami. Množství látky, které se přenese známým množstvím nosného plynu, lze stanovit zachycením ve vhodném lapači nebo průtokovou analytickou technikou. Z něho se vypočte tlak par při dané teplotě.

Doporučený rozsah:

10^{-4} až 1 Pa.

Při potřebné pečlivosti lze tuto metodu použít také pro oblast od 1 do 10 Pa.

1.4.7 **Rotující tělísko**

V zařízení s rotujícím tělískem je měřicím prvkem malá ocelová kulička zavěšená v magnetickém poli, která vysokou rychlostí rotuje. Tlak plynu se odvozuje ze zpomalení ocelové kuličky, které je závislé na tlaku plynu.

Doporučená oblast měření:

10^{-4} až 0,5 Pa.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

V následující tabulce je uvedeno srovnání různých metod stanovení tlaku par z hlediska jejich použitelnosti, opakovatelnosti, reprodukovatelnosti, oblasti měření a existujících norem.

KRITÉRIA JAKOSTI

Metoda měření	Látky		Odhad opakovatelnosti (1)	Odhad reprodukovatelnosti (1)	Doporučená oblast	Existující norma
	pevné	kapalné				
1.4.1 Dynamická metoda	s nízkým bodem tání	ano	do 25 %	do 25 %	10^3 Pa až 2×10^3 Pa	—
			1 až 5 %	1 až 5 %	2×10^3 Pa až 10^5 Pa (2)	—
1.4.2 Statická metoda	ano	ano	5 až 10 %	5 až 10 %	10 Pa až 10^5 Pa (2)	NF T 20048(5)
1.4.3 Isoteniskop	ano	ano	5 až 10 %	5 až 10 %	10^2 Pa až 10^5 Pa	ASTMD 287986
1.4.4 Efusní metoda - váhy pro měření tlaku par	ano	ano	5 až 20 %	do 50 %	10^{-3} Pa až 1 Pa	NF T 20047(6)
1.4.5 Efusní metoda - měření úbytku par	ano	ano	10 až 30 %	—	10^{-3} Pa až 1 Pa	—
1.4.6 Metoda sycení plynu	ano	ano	10 až 30 %	do 50 %	10^{-4} Pa až 1 Pa (2)	—
1.4.7 Metoda rotujícího tělíska	ano	ano	10 až 20 %	—	10^{-4} Pa až 0,5 Pa	—

(1) V závislosti na stupni čistoty látky.
(2) Metody mohou být při pečlivém provedení použity také pro rozmezí 1 až 10 Pa.

1.6 POPIS METOD

1.6.1 **Dynamická metoda**

1.6.1.1 *Aparatura*

Aparatura je obecně tvořena varnou nádobou s nasazeným chladičem ze skla nebo kovu (obrázek l), zařízením pro měření teploty, zařízením pro regulaci a měření tlaku. Typická měřicí aparatura znázorněná na obrázku je ze žáruvzdorného skla a skládá se z pěti částí:

Velká, částečně dvojitě oplášťovaná trubice sestává ze zábrusového spoje, z chladiče, z chladicí baňky a ze vpusti.

Skleněný válec s Cottrellovou vývěvou je umístěn ve varné část trubice a má zdrsněný vnitřní povrch ze slinutého skla, aby se zabránilo „utajenému" varu.

Teplota se měří vhodným teplotním čidlem (např. odporovým teploměrem, plášťovým termočlánkem) zasunutým do aparatury až k místu měření (obrázek 1, číslo 5) přes vhodnou spojku (např. s vnějším zábrusem).

Musí být vytvořeno nezbytné spojení k regulátoru tlaku a k měřicímu zařízení.

Přes kapiláru je s měřicí aparaturou spojena kulatá baňka, která slouží jako vyrovnávací objem.

Varná nádoba je vyhřívána topnou vložkou např. zavedenou zespoda do skleněné aparatury. Požadovaná intenzita proudu pro ohřev se nastavuje a reguluje prostřednictvím termočlánku.

Potřebný podtlak mezi 10^2 Pa a přibližně 10^5 Pa se dosáhne pomocí vývěvy.

K měření a regulaci tlaku vzduchu nebo dusíku (měřicí rozsah přibližně 10^2 až 10^5 Pa) a k ventilaci se použije vhodný ventil.

Tlak se měří manometrem.

1.6.1.2 *Postup měření*

Pro stanovení tlaku par vzorku se měří jeho teplota varu při různých specifikovaných tlacích mezi asi 10^3 a 10^5 Pa. Ustálení teploty při konstantním tlaku znamená, že bylo dosaženo teploty varu. Tato metoda není vhodná pro měření látek, které pění.

Látka se umístí do čisté, suché vzorkovnice. Při plnění pevných látek, které nejsou ve formě prášku, může dojít k problémům, kterým se však lze někdy vyhnout zahřátím chladicího pláště. Po naplnění se aparatura uzavře přírubou a látka se odplyní. Poté se nastaví nejnižší požadovaný tlak a zapne se ohřev. Současně se teplotní čidlo připojí k zapisovači.

Rovnováhy je dosaženo, je-li při konstantním tlaku zaznamenána konstantní teplota varu. Je třeba věnovat zvláštní pozornost tomu, aby se zabránilo prudkému uvolňování par během varu. Navíc musí dojít k úplné kondenzaci v chladiči. Při stanovování tlaku par u nízkotajících pevných látek je třeba dbát na to, aby nedošlo k ucpání chladiče.

Po zaznamenání naměřeného rovnovážného teplotního bodu se nastaví vyšší tlak. Takto se pokračuje, dokud se nedosáhne tlaku 10^5 Pa (celkem asi 5 až 10 měření). Pro kontrolu se musí stanovení rovnovážných bodů opakovat při klesajících hodnotách tlaku.

1.6.2 **Statické měření**

1.6.2.1 *Aparatura*

Aparatura se skládá ze zásobníku vzorku, z ohřívací a chladicí soustavy k regulaci teploty vzorku a měření teploty. Aparatura též zahrnuje zařízení k nastavení a měření tlaku. Základní principy jsou znázorněny na obrázcích 2a a 2b.

Baňka na vzorek (obrázek 2a) je z jedné strany uzavřena vhodným vysokovakuovým ventilem. Z druhé strany je připojena Utrubice obsahující vhodnou manometrickou kapalinu. Jeden konec Utrubice je napojen k vývěvě, k tlakové lahvi s dusíkem, nebo k odvzdušňovacímu ventilu a k manometru.

Místo Utrubice se dá použít manometr s ukazatelem tlaku (obrázek 2b).

Za účelem regulace teploty vzorku je baňka se vzorkem spolu s ventilem a Utrubicí či tlakoměrem umístěna v lázni s konstantní teplotou udržovanou s přesností ±0,2 K. Teplota se měří na vnější straně baňky se vzorkem nebo v baňce samotné.

K evakuaci aparatury se užije vývěva s protiproudým chlazeným lapačem.

U metody 2a se tlak par látky měří nepřímo za použití indikátoru nuly. Přitom se zohledňuje skutečnost, že se hustota kapaliny při velkých změnách teploty v Utrubici mění.

V závislosti na rozsahu tlaků a v závislosti na chemickém chování zkoušené látky jsou jako indikátory nuly pro Utrubici vhodné tyto látky: silikonové oleje, ftaláty. Zkoušená látka se nesmí znatelně rozpouštět ani nesmí reagovat s kapalinou v Utrubici.

V oblasti normálního tlaku vzduchu do 10^2 Pa lze v manometru používat rtuť, zatímco silikonové oleje a ftaláty je vhodné používat pro tlak od 10 Pa do 10^2 Pa. Ohřívatelné membránové kapacitní manometry lze dokonce používat pro tlak nižší než 10^{-1} Pa. Existují též jiná měřidla tlaku, která lze použít pro tlaky pod 10^2 Pa.

1.6.2.2 *Postup měření*

Před měřením se všechny části aparatury znázorněné na obrázku 2 důkladně očistí a vysuší.

V případě metody 2a se Utrubice naplní zvolenou kapalinou, která musí být před použitím odplyněna za zvýšené teploty.

Zkoušená látka se vloží do aparatury, která se uzavře a sníží se v ní teplota, aby došlo k odplynění. Teplota musí být dostatečně nízká, aby se zajistilo vysátí vzduchu, aniž by došlo u vícesložkových směsných materiálů ke změně jejich složení. V případě potřeby lze rovnováhy rychleji dosáhnout mícháním.

Vzorek může být podchlazen např. kapalným dusíkem (je nutno zabránit kondenzaci vzduchu nebo kapaliny z vývěvy) nebo směsí ethylalkoholu a suchého ledu. Pro měření nízkých teplot se použije lázeň s teplotou regulovanou připojením k chladicímu systému (ultrakryomatu).

Při otevřeném ventilu nádoby se vzorkem se připojí na několik minut odsávání, aby se odstranil vzduch. Ventil se poté uzavře a teplota vzorku se sníží na nejnižší požadovanou úroveň. Je-li to nutné, musí se odplyňovací postup několikrát opakovat.

Při zahřívání vzorku roste tlak par. To mění rovnováhu kapaliny v Utrubici. Aby se změna kompenzovala, připouští se ventilem dusík nebo vzduch do té doby, dokud není indikátor tlaku opět na nule. Tlak potřebný k ustavení nulové hodnoty může být odečten přesným manometrem při laboratorní teplotě. Tento tlak odpovídá tenzi par látky při dané teplotě měření.

Metoda 2b je podobná, ale tlak par se odečítá přímo.

Závislost tlaku par na teplotě se stanoví ve vhodných krátkých intervalech (celkem přibližně 5 až 10 bodů měření) až do požadovaného maxima. Odečty při nízkých teplotách se musí pro kontrolu opakovat.

Neleží-li hodnoty zjištěné z opakovaných odečtů na křivce zjištěné pro zvyšující se teplotu, může to být způsobeno jednou z těchto příčin:

1. Vzorek stále obsahuje vzduch (např. u vysoce viskózních materiálů) nebo obsahuje látky s nízkým bodem varu, které jsou při zahřátí uvolňovány a které lze odstranit odsátím po předchozím podchlazení.

2. Teplota podchlazení není dostatečně nízká. V tomto případě se použije jako chladicí médium tekutý dusík.

   Pokud nastane případ 1 nebo 2, musí se měření opakovat.

3. V látce probíhá ve vyšetřovaném teplotním rozsahu chemická reakce (např. rozklad, polymerace).

1.6.3 **Isoteniskop**

Úplný popis této metody je uveden v literatuře (7). Princip měřicího zařízení je znázorněn na obrázku 3. Podobně jako statická metoda popsaná v bodě 1.6.2 je isoteniskop vhodný k vyšetřování pevných látek i kapalin.

V případě kapalin slouží látka samotná jako indikační sloupec v pomocném manometru. Do isoteniskopu se odměří množství kapaliny postačující k naplnění baňky a krátkého ramene manometru. Isoteniskop se připojí k vakuovému systému, evakuuje se a poté se naplní dusíkem. Evakuace a výplach systému se opakuje dvakrát, aby se odstranil veškerý zbytkový kyslík. Naplněný isoteniskop se umístí do horizontální polohy, aby se vzorek rozprostřel v baňce a v Učásti manometru do tenké vrstvy. Tlak v systému se sníží na 133 Pa a vzorek se opatrně zahřeje právě k varu (odstranění rozpuštěných plynů). Poté se isoteniskop vrátí do původní polohy tak, aby se vzorek vrátil do baňky a krátkého ramene manometru, takže oba díly jsou zcela naplněny kapalinou. Tlak se udržuje jako při odplyňování; špička baňky se zahřívá malým plamenem, dokud uvolněná pára neexpanduje natolik, že přetlačí část vzorku z horní části baňky a ramene manometru do manometrické části isoteniskopu, přičemž se vytvoří prostor bez dusíku, naplněný výhradně parami.

Isoteniskop se poté vloží do lázně se stálou teplotou a tlak dusíku se upraví tak, aby se rovnal tlaku vzorku. Rovnovážný tlak je udáván manometrickou částí isoteniskopu. V rovnováze se rovná tlak dusíku tenzi par látky.

U pevných látek se v závislosti na oblasti tlaku a teploty používají manometrické kapaliny uvedené v bodě 1.6.2.1. Odplyněná manometrická kapalina se naplní do rozšířené části dlouhého ramene isoteniskopu. Poté se vyšetřovaná látka naplní do baňky a odplyní se při zvýšené teplotě. Isoteniskop se poté nakloní, aby manometrická kapalina natekla do Utrubice. Měření závislosti tlaku par na teplotě se provede jako v bodě 1.6.2.

1.6.4 **Efusní metoda: Váhy pro měření tlaku par**

1.6.4.1 *Aparatura*

V literatuře jsou popsána různá provedení aparatury (1). Aparatura popsaná zde slouží ke znázornění použitého obecného principu (obrázek 4). Na obrázku 4 jsou znázorněny hlavní části aparatury složené z vysokovakuové komory z korozivzdorné oceli nebo ze skla, z vývěvy a měřiče vakua a z vestavěného zařízení pro měření tlaku par pomocí vah. V aparatuře jsou vestavěny tyto díly:

— odpařovací pícka s přírubou a otočnou průchodkou. Odpařovací pícku tvoří válcová nádoba vyrobená např. z mědi nebo z chemicky odolné slitiny s dobrou tepelnou vodivostí. Rovněž lze použít skleněnou nádobu opatřenou měděným pláštěm. Pícka má průměr přibližně 3 až 5 cm a je 2 až 5 cm vysoká. Je opatřena jedním až třemi otvory různé velikosti pro průchod par. Pícka je vyhřívána buď podstavenou vyhřívací destičkou, nebo topnou spirálou v plášti. Aby nedošlo k rozptylování tepla do základní desky, je spojení vyhřívací destičky se základní realizováno deskou přes materiál s nízkou tepelnou vodivostí (stříbroniklová nebo chromniklová ocel); je-li např. použita pícka s několika průchody, je izolace tvořena stříbroniklovými trubicemi připojenými k rotující ose pícky. Toto uspořádání je výhodné, neboť umožňuje zavedení měděné tyče. Je tím umožněno chlazení z vnějšku chladicí lázní,

— je-li měděné víko pícky opatřeno třemi otvory různého průměru, jejichž poloha je posunuta vůči sobě o 90°, pokrývá měření široký rozsah tlaků par (otvory o průměru 0,30 až 4,50 mm). Široké otvory se použijí při nízkých tlacích par a naopak. Otáčením pícky se žádaný otvor nebo mezipoloha nastaví do směru toku páry (v ose se nachází otvor pícky – clona – miska vah) a proud molekul se propustí nebo odkloní otvorem pícky na misku vah. Pro měření teploty látky se na vhodné místo umístí termočlánek nebo odporový teploměr,

— nad clonou je miska velmi citlivých mikrovah (viz níže). Miska vah má průměr přibližně 30 mm. Vhodným materiálem je pozlacený hliník,

— miska vah je obklopena válcovitým chladicím blokem z mosazi nebo mědi. Otvory v bloku jsou přizpůsobeny typu raménka podle typu vah a otvor ve cloně musí umožnit průchod proudu molekul a současně musí zajišťovat úplné zkapalnění par na misce. Odvod tepla směrem ven je zajištěn např. měděnou tyčí připojenou k chladicímu bloku. Tyč prochází základní deskou a je od ní tepelně izolována např. trubicí z chromniklové oceli. Tyč je ponořena do Dewarovy nádoby s kapalným dusíkem umístěné pod základní deskou a/nebo se zajistí cirkulace kapalného dusíku přímo provrtanou tyčí. Chladicí blok je tak udržován při teplotě −120 °C. Miska vah je chlazena výhradně vyzařováním, které pro vyšetřovanou oblast tlaku postačuje (zahájení chlazení přibližně 1 hodinu před začátkem měření),

— váha je umístěna nad chladicím blokem. Vhodné váhy jsou např. vysoce citlivé dvojramenné elektronické mikrováhy nebo vysoce citlivý přístroj s pohyblivou cívkou (viz Pokyny OECD pro zkoušení 104, vydání ze dne 12. 5. 1981),

— v základní desce jsou také elektrické zásuvky pro připojení termočlánků (nebo odporových teploměrů) a topných spirál,

— vakuum se vytváří v nádobě pomocí středněvakuové nebo vysokovakuové pumpy (požadované vakuum přibližně 1 až $2 \cdot 10^{-3}$ Pa, kterého se dosáhne po dvouhodinovém odsávání). Tlak se sleduje vhodným ionizačním manometrem.

1.6.4.2 *Postup měření*

Nádoba se naplní zkoušenou látkou a uzavře se víčkem. Clona a chladicí blok jsou vysunuty proti pícce. Aparatura se uzavře a spustí se vývěvy. Před zahájením měření by měl být tlak asi 10^{-4} Pa. Od 10^{-2} Pa je třeba začít s chlazením chladicího bloku.

Po dosažení potřebného vakua se zahájí řada kalibračních měření při nejnižší požadované teplotě. Otevře se odpovídající otvor ve víku, proud páry projde clonou umístěnou nad ním a dopadne na ochlazovanou misku vah. Miska vah musí být dostatečně velká, aby zajistila zachycení veškeré páry procházející clonou. Hybnost proudu par působí jako síla proti misce vah a molekuly se srážejí na jejím studeném povrchu.

Hybnost a současná kondenzace vytvářejí signál v zapisovači. Vyhodnocení signálu poskytuje dva druhy informací:

1. V popsaném zařízení je tlak par určen přímo z působení na misku vah (k tomu není třeba znát molekulovou hmotnost (2)). Při vyhodnocení odečtu musí být vzaty v úvahu geometrické faktory, jako jsou otvor v pícce a úhel molekulárního proudu.

2. Současně může být měřeno množství kondenzátu, z čehož může být vypočtena rychlost vypařování. Tlak par může být také vypočítán z rychlosti vypařování a z molekulové hmotnosti pomocí Hertzovy rovnice (2).

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

kde

G = rychlost vypařování ($kg \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$),

M = molekulová hmotnost ($g \cdot mol^{-1}$),

T = termodynamická teplota (K),

R = univerzální molární plynová konstanta ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$),

p = tlak páry (Pa).

Poté, co je dosaženo potřebného vakua, začíná série měření při nejnižší možné teplotě.

Pro další měření se teplota zvyšuje v malých intervalech, dokud se nedosáhne její nejvyšší požadované hodnoty. Vzorek se poté znovu ochladí a je možné zaznamenat druhou křivku tlaku par. Jestliže se při druhém opakování nepotvrdí výsledek prvního měření, je možné, že se látka v dané teplotní oblasti měření rozkládá.

1.6.5 **Efusní metoda: Měření hmotnostního úbytku**

1.6.5.1 *Aparatura*

Zařízení se skládá z těchto částí:

— blok, ve kterém jsou umístěny efusní komůrky, s možností termostatování a evakuace,

— vysokovakuová vývěva (např. difusní vývěva nebo turbomolekulární vývěva) a podtlakové měřidlo,

— zařízení pro zachycování par se zkapalněným dusíkem nebo suchým ledem.

Elektricky vyhřívaný hliníkový vakuový blok se čtyřmi ocelovými efusními komůrkami je znázorněn jako příklad na obrázku 5. Membrána z korozivzdorné oceli tloušťky asi 0,3 mm s efusním otvorem o průměru 0,2 až 1 mm je připojena k efusní komůrce víčkem opatřeným závitem.

1.6.5.2 *Postup měření*

Do každé efusní komůrky se umístí referenční a zkoušená látka, kovová membrána s otvorem se zajistí šroubovacím víčkem a každá komůrka se zváží s přesností na 0,1 mg. Měřicí komůrka se umístí do termostatovaného bloku, který se poté evakuuje na tlak nižší, než je jedna desetina očekávaného tlaku par. Ve stanovených časových intervalech v rozmezí od 5 do 30 h se do zařízení vpouští vzduch a úbytek hmotnosti efusní komůrky se stanoví opakovaným vážením.

Aby bylo zajištěno, že výsledky nebudou ovlivněny těkavými nečistotami, váží se komůrka opakovaně ve stanovených časových intervalech a tak se kontroluje, zda je rychlost odpařování konstantní nejméně po dva měřicí intervaly.

Tlak par p je dán vztahem:

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

kde

p = tlak par (Pa),

m = hmotnost látky opouštějící komůrku za čas t (kg),

t = čas (s),

A = plocha otvoru (m^2),

K = korekční faktor,

R = univerzální plynová konstanta ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$),

T = teplota (K),

M = molekulární hmotnost ($kg \cdot mol^{-1}$).

Korekční faktor *K* závisí na poměru délky a poloměru kruhového otvoru:

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

Výše uvedená rovnice může být zapsána ve tvaru

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

kde $E = \frac{1}{KA}\sqrt{2\,\pi\,R}$ je efusní konstanta komůrky.

Tato efusní konstanta může být určena s využitím referenčních látek (2, 9) pomocí této rovnice:

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

kde

$p_{(r)}$ = tlak par referenční látky (Pa),

$M_{(r)}$ = molekulární hmotnost referenční látky ($kg \cdot mol^{-1}$).

1.6.6 **Metoda nasycení plynu**

1.6.6.1 *Aparatura*

Typická aparatura používaná pro tuto zkoušku se skládá z řady dále popsaných a na obrázku 6a vyobrazených částí (1).

Inertní plyn:

Nosný plyn nesmí se zkoušenou látkou chemicky reagovat. Obvykle je vhodný dusík, někdy je však nutné použít jiné plyny (10). Použitý plyn musí být suchý (viz obrázek 6a, číslo 4: čidlo pro měření relativní vlhkosti plynu).

Kontrola průtoku:

Pro kontrolu průtoku plynu je nezbytný vhodný regulační systém pro zajištění konstantního a podle potřeby nastavitelného průtoku plynu sytící kolonou.

Zařízení pro zachycování par:

Jejich výběr závisí na vlastnostech zkoumané látky a na zvolené analytické metodě. Páry by se měly zachycovat kvantitativně a ve formě, která umožní následnou analýzu. Pro některé zkoušené látky jsou vhodné lapače obsahující kapaliny jako hexan nebo ethylenglykol. Pro jiné látky lze použít pevné absorbenty.

Jako alternativní metody zachycení páry a následné analýzy mohou být ke stanovení množství hmoty transportované známým množstvím nosného plynu použity průtokové analytické techniky, jako je chromatografie. Navíc může být měřen úbytek hmotnosti vzorku.

Výměník tepla:

Pro měření při různých teplotách může být nezbytné zabudovat do aparatury výměník tepla.

Sytící kolona:

Zkoušená látka se v rozpuštěné formě nanese na vhodný inertní nosič. Nosič s nanesenou látkou se vloží do sytící kolony. Kolona by měla být dimenzována a průtok plynu nastaven tak, aby bylo zaručeno úplné nasycení nosného plynu. Sytící kolonu je nutno termostatovat. Má-li se měřit při teplotách nad laboratorní teplotou, musí být části aparatury mezi sytící kolonou a zařízeními pro zachycování par rovněž ohřívány, aby se zamezilo kondenzaci zkoušené látky.

Za sytič kolony může být umístěna kapilára (obrázek 6b), aby se snížil tok hmoty způsobený difuzí.

1.6.6.2 *Postup měření*

Příprava syticí kolony:

Roztok zkoušené látky ve vysoce těkavém rozpouštědle se přidá k přiměřenému množství nosiče. Mělo by být přidáno dostatečné množství zkoušené látky, aby bylo zajištěno nasycení po celou dobu zkoušky. Rozpouštědlo se úplně odpaří na vzduchu nebo v rotačním odpařovači a pečlivě promísený materiál se přidá do syticí kolony. Po zahřátí vzorku se aparaturou vede suchý dusík.

Měření:

Zařízení na zachycování par nebo průtokové detektory se připojí na výstup z kolony a měří se čas. Na počátku a v pravidelných intervalech během měření se kontroluje průtok počítačem bublinek (nebo kontinuálně průtokoměrem).

Na výstupu ze syticí kolony je nutno měřit tlak. To lze provést:

a) zapojením manometru mezi kolonu a lapače (tento způsob nemusí být zcela uspokojivý, protože se zvyšuje mrtvý objem a zvětšuje se adsorpční plocha); nebo

b) stanovením poklesu tlaků za použitým zachycovacím zařízením jako funkce objemového průtoku v samostatném experimentu (toto nemusí přinášet uspokojivé výsledky pro lapače s absorpčními kapalinami).

Doba potřebná pro zachycení množství látky nezbytného pro jednotlivé metody analýzy se určí předběžnými pokusy nebo odhadem. Jako alternativa zachycení látky pro další analýzu může být užita průtoková kvantitativní analytická technika (např. chromatografie). Před výpočtem tlaku par při dané teplotě se provedou předběžné pokusy pro stanovení maximální průtokové rychlosti, při které je nosný plyn dokonale nasycen parami látky. Za tímto účelem se zavádí nosný plyn do syticí kolony nízkým objemovým průtokem voleným tak, že dalším snižováním průtokové rychlosti již vypočtená hodnota tlaku par neroste.

Specifická analytická metoda závisí na druhu studované látky (např. plynová chromatografie nebo gravimetrie).

Stanoví se množství látky, které je unášeno známým objemem nosného plynu.

1.6.6.3 *Výpočet tlaku par*

Tlak par se počítá z hustoty par, *W*/*V*, podle rovnice:

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

kde

p = tlak par (Pa),

W = hmotnost odpařené zkoušené látky (g),

V = objem nasyceného plynu (m^3),

R = univerzální molární plynová konstanta ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$),

T = termodynamická teplota (K),

M = molární hmotnost ($g \cdot mol^{-1}$).

Naměřené objemy musí být korigovány v důsledku rozdílů tlaků a teplot mezi průtokoměrem a syticí kolonou vyhřívanou termostatem. Je-li průtokoměr zařazen za lapači, může být nezbytné provést korekce s ohledem na podíl složek odpařených z lapače (1).

1.6.7 **Rotující tělísko** (8, 11, 13)

1.6.7.1 *Aparatura*

Metoda rotujícího tělíska může být provedena za použití měřiče viskozity s rotujícím tělískem, znázorněného na obrázku 8. Schematický nákres měřicí soustavy je znázorněn na obrázku 7.

Typické měřicí zařízení má měřicí hlavu s rotujícím tělískem, umístěnou v termostatovaném prostoru (regulovaném s přesností na 0,1 °C). Nádobka se vzorkem je umístěna do termostatovaného prostoru (regulovaného s přesností na 0,01 °C). Všechny ostatní části zařízení jsou udržovány při vyšší teplotě, aby nedocházelo ke kondenzaci. K zařízení se vakuovými ventily připojí vysokovakuová výměva.

Měřicí hlava s rotujícím tělískem se skládá z ocelové kuličky (průměr 4 až 5 mm) umístěné v trubici. Kulička je zavěšena a stabilizována v magnetickém poli obvykle s využitím kombinace permanentních magnetů a regulačních cívek.

Kulička je uváděna do rotačního pohybu rotujícími magnetickými poli produkovanými cívkami. Zvedací cívky měřící nízkou, ale trvalou zbytkovou magnetizaci kuličky, umožňují měření rotační rychlosti.

1.6.7.2 *Postup měření*

Jakmile kulička dosáhne stanovenou rotační rychlost $v_{(0)}$ (obvykle asi 400 otáček za sekundu), zastaví se další napájení a zahájí se zpomalování vyvolané brzdicím účinkem plynu.

Pokles rotační rychlosti je měřen jako funkce času. Vzhledem k tomu, že brzdění způsobené magnetickým závěsem je zanedbatelné ve srovnání s brzděním způsobeným plynem, je tlak par dán vztahem:

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

kde

$\bar{c}$ = průměrná rychlost molekul plynu,

r = poloměr kuličky,

ρ = hustota kuličky,

σ = koeficient tečného přenosového impulsu (σ = 1 pro ideálně kulový povrch kuličky),

t = čas,

$v_{()}$ = rotační rychlost po čase t,

$v_{(0)}$ = počáteční rotační rychlost.

Rovnice může být rovněž napsána ve tvaru:

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

kde t_n, t_{n-1} jsou časy potřebné pro stanovený počet rotací N. Časové intervaly t_n, t_{n-1} následují za sebou a $t_n > t_{n-1}$.

Průměrná rychlost molekul plynu $\bar{c}$ je dána vztahem:

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

kde

T = teplota,

R = univerzální molární plynová konstanta,

M = molární hmotnost.

2. **DATA**

Stanovení tlaku par kteroukoli z výše popsaných metod by se mělo provést nejméně při dvou teplotách. Aby se ověřil lineární průběh křivky tlaku par v oblasti teplot od 0 °C do 50 °C, doporučuje se měření při třech nebo více teplotách.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,

— nejméně dvě hodnoty tlaku par a teploty, pokud možno v oblasti 0 °C až 50 °C,

— všechny původní údaje,

— křivka závislosti log p na $1/T$,

— odhadnutá hodnota tlaku par při 20 °C nebo 25 °C.

Zjistíli se změna stavu (fázový přechod, rozklad), měly by být uvedeny tyto skutečnosti:

— druh změny,

— teplota při atmosférickém tlaku, při které ke změně dochází,

— hodnoty tlaku par při 10 °C a 20 °C pod teplotou přechodu a nad teplotou přechodu (s výjimkou přechodů z pevného do plynného skupenství).

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

4. **LITERATURA**

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

(2) Ambrose, D. *V*: B. Le Neindre, B. Vodar, (*eds.*): Experimental Thermodynamics. Butterworths, London, 1975, II.

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

(4) Knudsen, M. *Ann. Phys. Lpz.*, 1909, 29, 1979; 1911, 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 – Vapour pressure balance method.

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

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

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

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

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

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

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

Doplněk 1

Metoda odhadu

ÚVOD

Vypočtené hodnoty tlaku par lze využít:

— k rozhodnutí, která z experimentálních metod je vhodná,

— k provedení odhadu nebo ke stanovení mezní hodnoty v případech, kdy nelze z technických důvodů použít experimentální metodu (včetně případů, kdy je tlak par velmi nízký),

— jako pomoc při vyhledání případů, kdy je neprovedení experimentálního měření odůvodnitelné, neboť tlak par je při laboratorní teplotě pravděpodobně < 10^{-5} Pa.

METODA ODHADU

Tlak par kapalin a pevných látek může být odhadnut pomocí modifikovaného Watsonova korelačního vztahu (a). Požaduje se pouze jeden experimentální údaj, a to teplota varu za normálního tlaku. Metoda je použitelná pro tlaky od 10^{5} do 10^{-5} Pa.

Podrobná informace o metodě je uvedena v příručce *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (b).

POSTUP VÝPOČTU

Podle příručky (b) se tlak par vypočte podle vzorce:

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

kde

T = teplota, pro kterou je tlak par vypočítáván,

T_b = teplota varu při normálním tlaku,

P_{vp} = tlak par při teplotě T,

ΔH_{vb} = výparné teplo,

ΔZ_b = faktor stlačitelnosti (použije se hodnota 0,97),

m = empirický faktor, jehož hodnota závisí na fyzikálním stavu při teplotě, pro níž je prováděn výpočet

Dále

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

kde K_F je empirický součinitel zohledňující polaritu látky. V příručce b) jsou uvedeny hodnoty faktoru K_F pro několik typů sloučenin.

Velmi často jsou k dispozici data o teplotě varu při sníženém tlaku. V takovém případě se podle příručky (b) vypočte tlak par podle tohoto vztahu:

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

kde T_1 je teplota varu při sníženém tlaku P_1.

ZPRÁVA

Je-li použita metoda odhadu, musí zpráva obsahovat úplný postup výpočtu.

LITERATURA

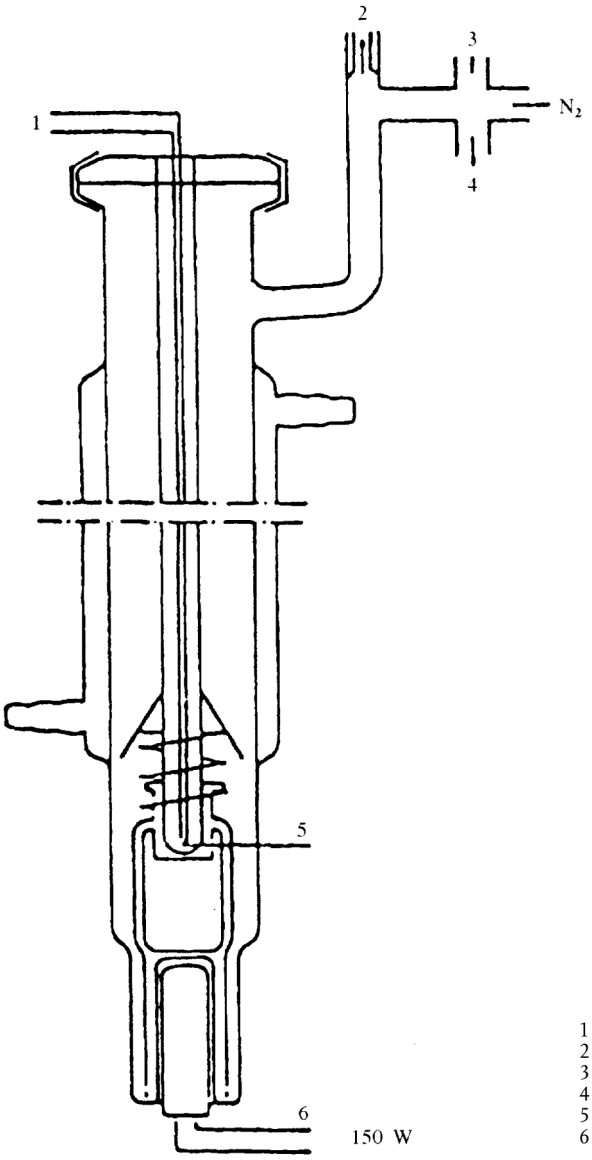
a) K. M. Watson, *Ind. Eng. Chem.* 1943, 35, 398.

b) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt. Handbook of Chemical Estimation Methods. McGrawHill, 1982.

Doplněk 2

Obrázek 1

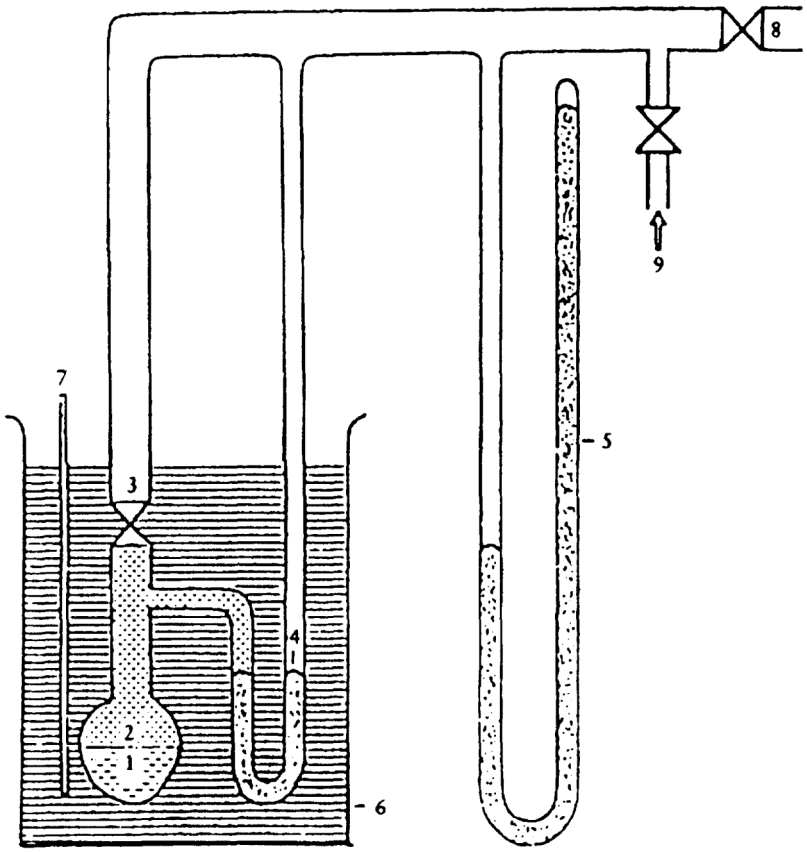
Zařízení pro stanovení křivky tlaku par dynamickou metodou



1 = termočlánek
2 = vyrovnávací prostor vakua
3 = manometr
4 = vakuum
5 = měřicí bod
6 = topný článek asi 150 W

Obrázek 2a

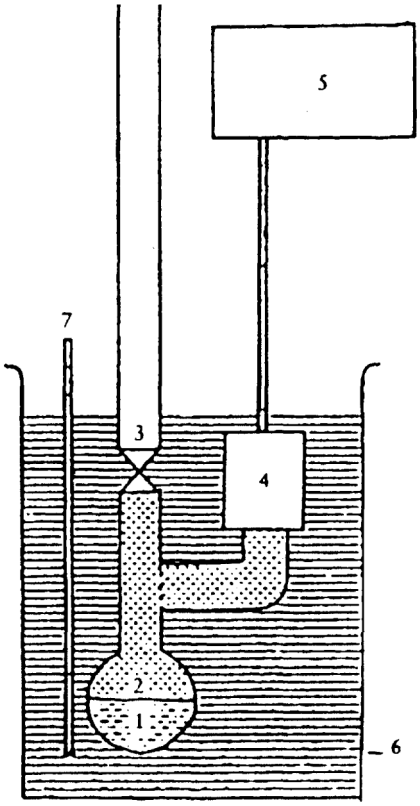
Zařízení pro stanovení křivky tlaku par statickou metodou (s manometrickou Utrubicí)



1. Zkoušená látka
2. Plynná fáze
3. Vysokovakuový kohout
4. U-trubice (pomocný manometr)
5. Manometr
6. Lázeň termostatu
7. Měřidlo teploty
8. K vývěvě
9. Odvzdušnění

Obrázek 2b

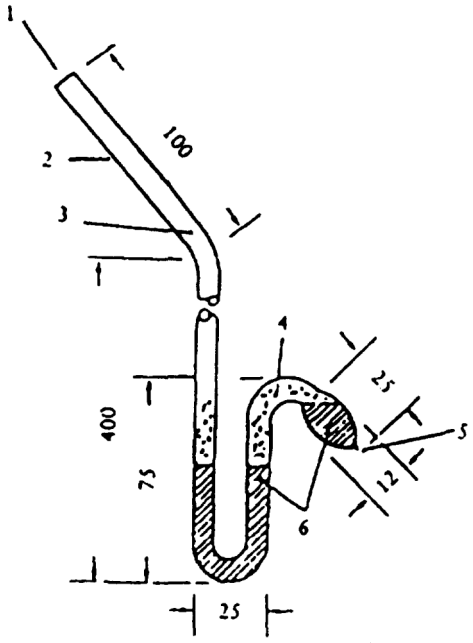
Zařízení pro stanovení křivky tlaku par statickou metodou (s použitím ukazatele tlaku)



1. Zkoušená látka
2. Plynná fáze
3. Vysokovakuový kohout
4. Stupnice tlaku
5. Ukazatel tlaku
6. Lázeň termostatu
7. Měřidlo teploty

Obrázek 3

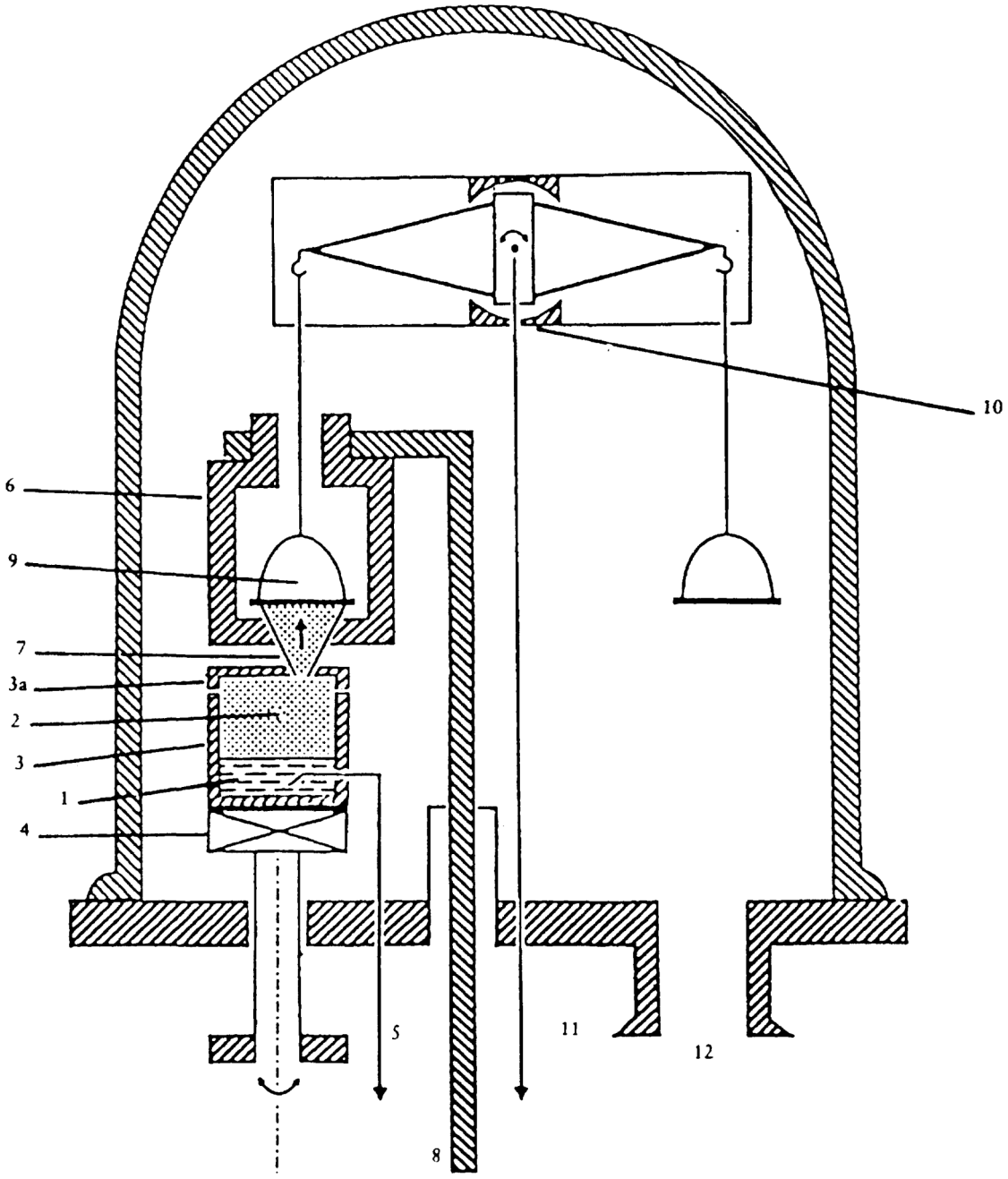
Isoteniskop (viz literatura (7))



1. K systému měření a kontroly tlaku
2. Trubice s vnějším průměrem 8 mm
3. Suchý dusík v tlakovém systému
4. Páry vzorku
5. Špička baňky
6. Kapalný vzorek

Obrázek 4

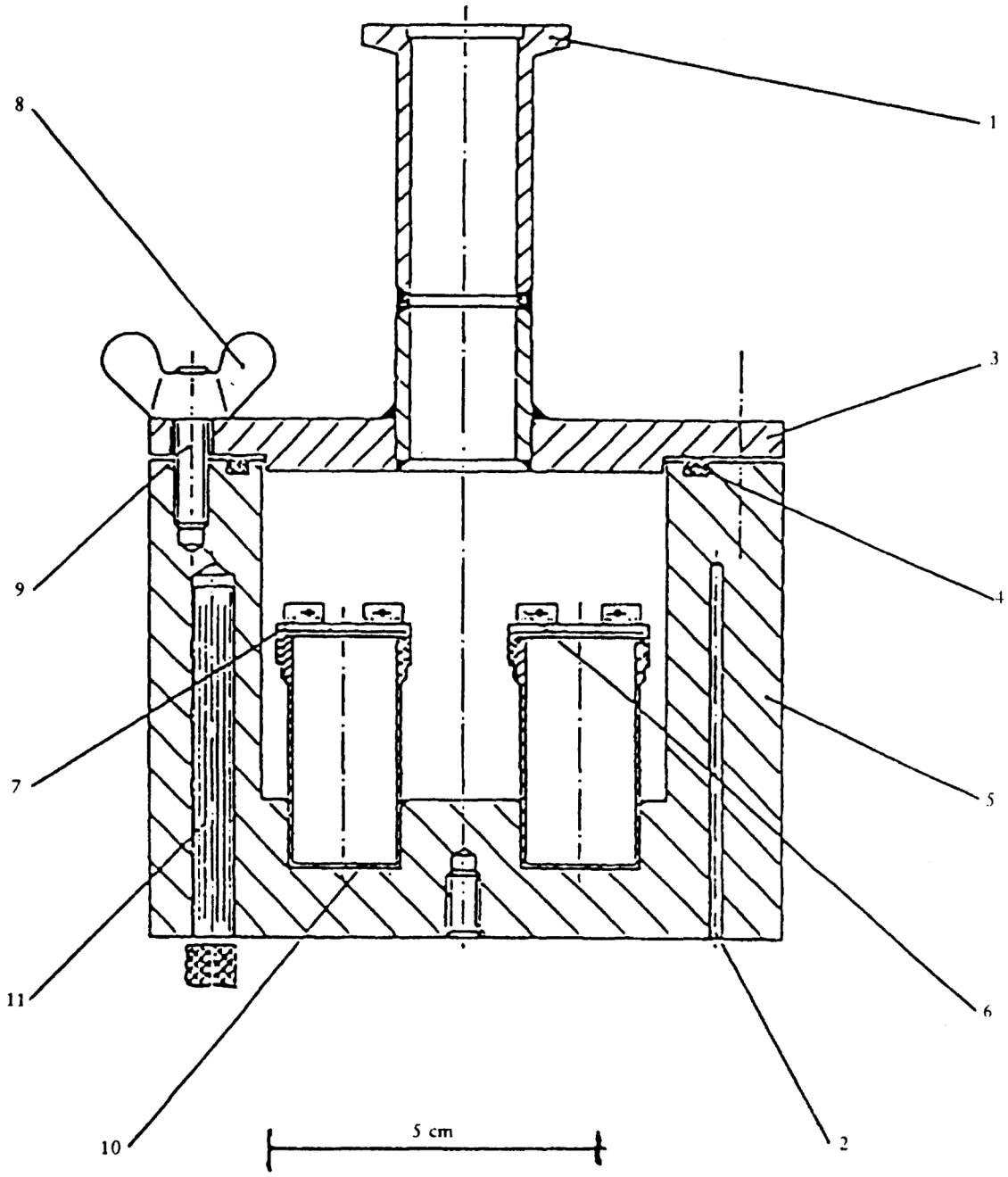
Zařízení pro stanovení křivky tlaku par podle metody stanovení tlaku par pomocí vah



1. Zkoušená látka
2. Plynná fáze s proudem par
3. Odpařovací pícka s otočným vstupem
3a. Víko s otvory
4. Vyhřívání pícky (chlazení)
5. Měření teploty vzorku
6. Chladicí box
7. Clona
8. Tyčka chladicího bloku
9. Miska vah
10. Mikrováhy
11. K zapisovači
12. K vysokovakuové vývěvě

Obrázek 5

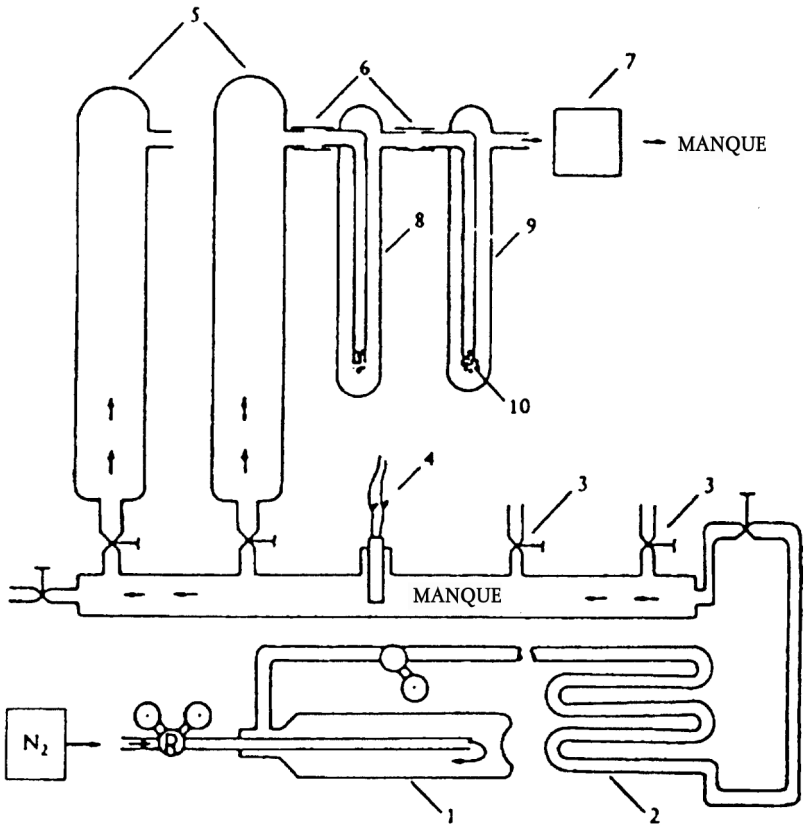
Příklad zařízení pro odpařování za nízkého tlaku při efusní metodě, vybaveného efusní komůrkou o objemu 8 cm^3



1. Přípojka k vakuu
2. Otvory pro platinový odporový teploměr nebo pro systém měření a kontroly teploty (2)
3. Víko vakuového bloku
4. O-kroužek
5. Hliníkový vakuový blok
6. Zařízení pro zasouvání a vytahování efusních komůrek
7. Šroubovací víčko
8. Křídlové matice (6)
9. Šrouby (6)
10. Efusní komůrky z korozivzdorné oceli
11. Topná tělesa (6)

Obrázek 6a

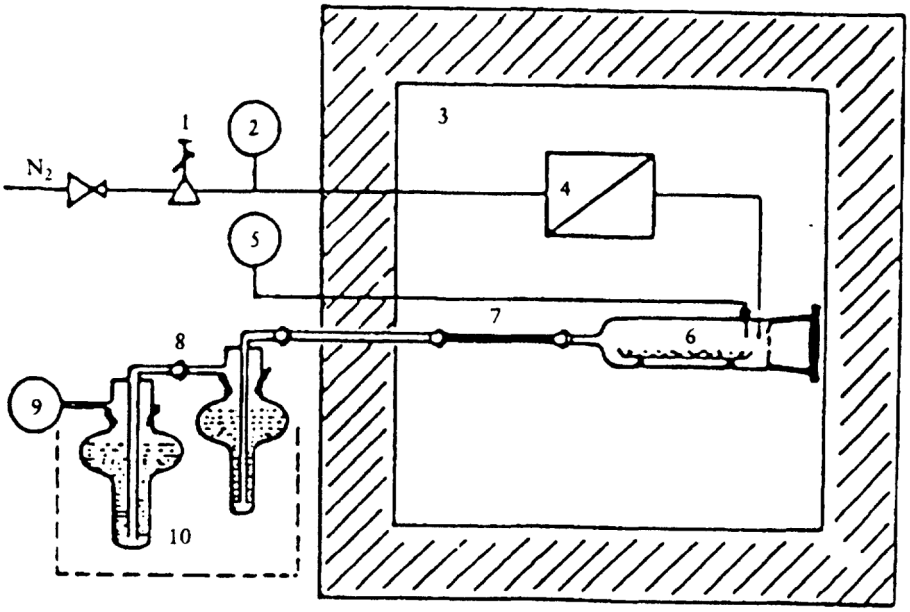
Příklad průtokového systému pro stanovení tlaku par metodou nasycení plynu



1 = regulátor průtoku
2 = výměník tepla
3 = jehlové ventily
4 = čidlo pro měření relativní vlhkosti plynu
5 = saturační kolony
6 = těsnění z PTFE
7 = průtokoměr
8 = lapač (absorbér)
9 = olejový lapač
10 = fritový počítač bublinek

Obrázek 6b

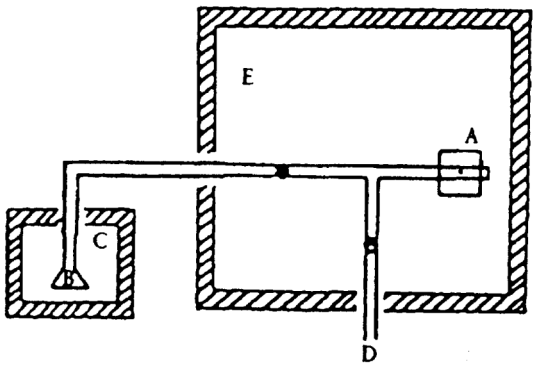
Příklad zařízení pro stanovení tlaku par metodou nasycení plynu s kapilárou zařazenou za syticí kolonu



1. Průtokoměr s vyhřívanou spirálou
2. Manometr
3. Lázeň termostatu
4. Spirála pro termostatování nosného plynu
5. Teploměr (Pt 100)
6. Syticí kolona
7. Kapilára
8. Absorbéry
9. Plynoměr
10. Chlazený lapač

Obrázek 7

Příklad experimentálního uspořádání pro metodu rotujícího tělíska

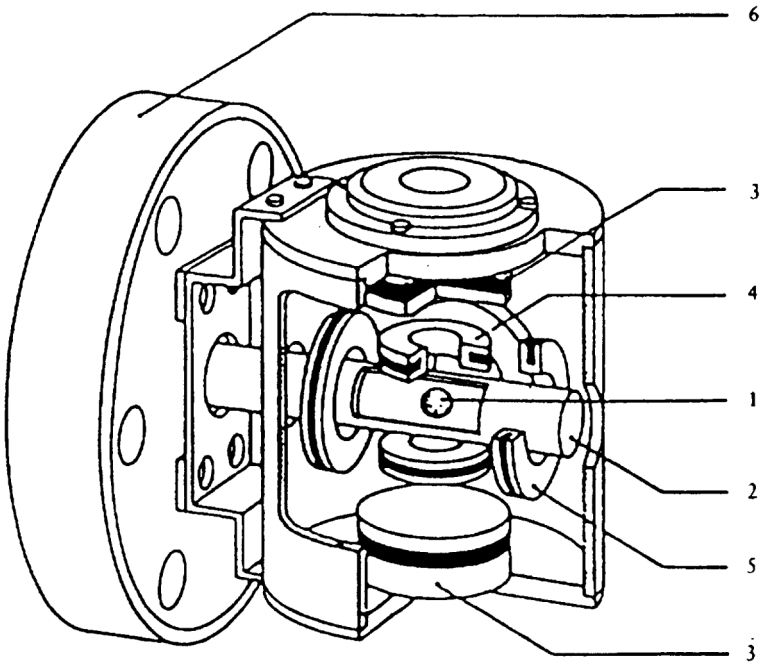


Zařízení pro měření tlaku par

A. Hlava pro snímání otáček rotujícího tělíska
B. Komůrka se vzorkem
C. Termostat
D. Zdroj vakua (turbomolekulární vývěva)
E. Vzduchový termostat

Obrázek 8

Příklad měřicí hlavy s rotujícím tělískem



1. Kulička
2. Evakuovaný trubkový nástavec k 6
3. Permanentní magnety
4. Cívky (2) pro svislou stabilizaci
5. Hnací cívky (4)
6. Připojovací spojka

A.5 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ

1. **METODA**

Popsané metody jsou založeny na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Jejich základní principy jsou uvedeny v literatuře (2).

1.1 ÚVOD

Popsané metody jsou určeny pro měření povrchového napětí vodných roztoků.

Před provedením těchto zkoušek je vhodné mít k dispozici předběžné informace o rozpustnosti látky ve vodě, o její struktuře, o hydrolýze a o kritické koncentraci pro tvorbu micel.

Níže uvedené metody jsou použitelné pro většinu chemických látek bez omezení z hlediska stupně jejich čistoty.

Měření povrchového napětí metodou prstencového tenziometru je omezeno na vodné roztoky s dynamickou viskozitou nižší než přibližně 200 mPa s.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Povrchová volná enthalpie vztažená na jednotku povrchu se nazývá povrchové napětí.

Povrchové napětí se vyjadřuje těchto jednotkách:

N m^{-1} (v soustavě SI) nebo

mN m^{-1} (odvozená jednotka v soustavě SI)

1 $N \cdot m^{-1} = 10^3$ $dyn \cdot cm^{-1}$

1 $mN \cdot m^{-1} = 1$ $dyn \cdot cm^{-1}$ ve staré soustavě CGS

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Referenční látky, které pokrývají široké rozpětí hodnot povrchového napětí, jsou uvedeny v literatuře (1, 3).

1.4 PODSTATA METOD

Metody jsou založeny na měření největší síly, kterou je nutné působit ve svislém směru na třmínek nebo prstenec, který se dotýká povrchu zkoumané kapaliny umístěné v měřicí nádobě, aby se od tohoto povrchu oddělil, nebo na destičku, která se svým okrajem dotýká povrchu, aby se vzniklý film vytáhl nahoru.

Látky, jejichž rozpustnost ve vodě dosahuje hodnoty alespoň 1 mg l^{-1}, se zkoušejí ve vodných roztocích při jedné koncentraci.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Přesnost těchto metod je pravděpodobně vyšší, než je požadováno pro účely hodnocení stavu životního prostředí.

1.6 POPIS METOD

Připraví se roztok látky v destilované vodě. Koncentrace roztoku by měla být 90% koncentrace nasyceného roztoku látky ve vodě; pokud tato koncentrace přesáhne 1 g l^{-1}, použije se k měření roztok o koncentraci 1 g l^{-1}. Látky, jejichž rozpustnost je menší než 1 mg l^{-1}, není nutné zkoušet.

1.6.1 **Destičková metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2 **Třmínková metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3 **Prstencová metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4 **Harmonizovaná prstencová metoda OECD**

1.6.4.1 *Aparatura*

Pro toto měření jsou vhodné komerční tenziometry. Skládají se z těchto částí:

— pohyblivý stolek pro vzorek,

— systém měření síly,

— měřicí tělísko (prstenec),

— měřicí nádoba.

1.6.4.1.1 Pohyblivý stolek pro vzorek

Pohyblivý stolek pro vzorek slouží jako podložka pro termostatovanou měřicí nádobu, ve které je kapalina, která má být zkoušena. Spolu se systémem měření síly je upevněn na stojanu.

1.6.4.1.2 Systém měření síly

Systém měření síly je umístěn nad stolkem pro vzorek (viz obrázek). Chyba měření síly nemá překročit $\pm 10^{-6}$ N, což odpovídá chybě ±0,1 mg při měření hmotnosti. Ve většině případů je měřicí stupnice komerčních tenziometrů dělena v mN m^{-1}, takže je možné povrchové napětí odečítat přímo v mN m^{-1} s přesností na 0,1 mN m^{-1}.

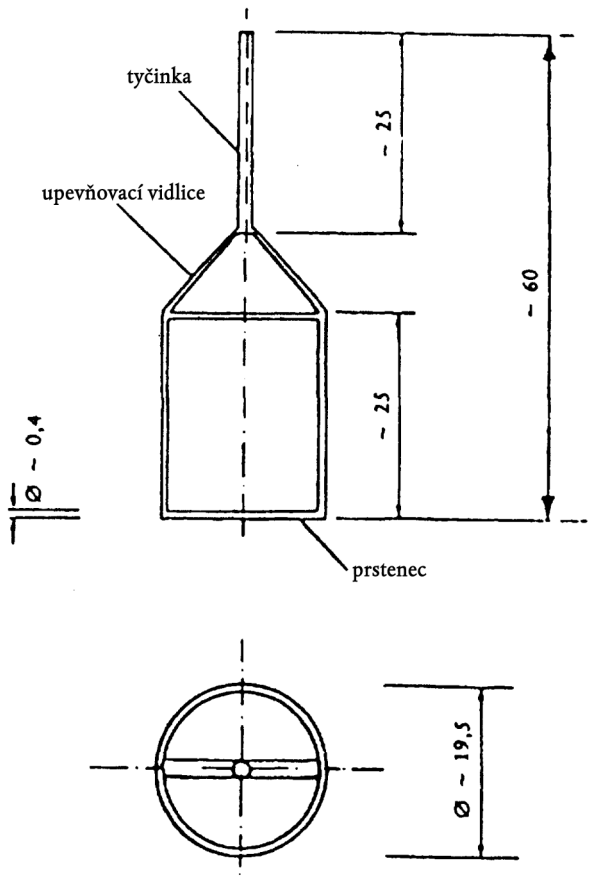
1.6.4.1.3 Měřicí tělísko (prstenec)

Prstenec je obvykle zhotoven z platino-iridiového drátu o průměru asi 0,4 mm a středním obvodu 60 mm. Prstenec z drátu je zavěšen vodorovně na upevňovací vidlici z drátu a na kovové tyčince, která tvoří spojení k systému měření síly (viz obrázek).

Obrázek

Měřicí tělísko

(všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech)



1.6.4.1.4 Měřicí nádoba

Měřicí nádobou pro zkušební roztok je termostatovaná skleněná nádoba. Má být konstruována tak, aby teplota zkoumané kapaliny i plynné fáze nad jejím povrchem zůstala během měření konstantní a aby se vzorek nemohl odpařovat. Vhodná je válcová skleněná nádoba o vnitřním průměru nejméně 45 mm.

1.6.4.2 *Příprava aparatury*

1.6.4.2.1 Čištění

Skleněné nádoby je třeba pečlivě vyčistit. Pokud je to nutné, měly by se vymýt horkou kyselinou chromsírovou a následně koncentrovanou kyselinou fosforečnou (83 až 98% hmot. H_3PO_4), pečlivě vypláchnout tekoucí vodou a nakonec omýt redestilovanou vodou do neutrální reakce a následně vysušit nebo vypláchnout vzorkem kapaliny, která má být měřena.

Prstenec je třeba nejprve pečlivě umýt vodou, aby se odstranily všechny látky rozpustné ve vodě. Poté se krátce ponoří do kyseliny chromsírové, opláchne se v redestilované vodě do neutrální reakce a nakonec se krátce ohřeje nad methanolovým plamenem.

Poznámka:

Znečištění látkami, které se nerozpouštějí ani nerozkládají kyselinou chromsírovou ani kyselinou fosforečnou, jako například silikony, je nutné odstraňovat vhodnými organickými rozpouštědly.

1.6.4.2.2 Kalibrování aparatury

Validace aparatury spočívá v ověření nuly a v nastavení přístroje tak, aby jeho data umožňovaly spolehlivé stanovení v mN m^{-1}.

Poloha:

Přístroj musí být nastaven do vodorovné polohy, např. pomocí libely položené na základovou desku tenziometru a nastavením stavěcích šroubů základnové desky.

Nastavení nuly:

Po upevnění prstence na aparatuře a před ponořením do kapaliny je třeba nastavit nulu ukazatele tenziometru a zkontrolovat rovnoběžnost prstence s hladinou kapaliny. K tomu je možné použít hladiny kapaliny jako zrcadla.

Kalibrace:

Vlastní kalibraci před měřením je možné provést dvěma postupy:

a) Použitím závaží: při tomto postupu se použijí jezdce o známé hmotnosti od 0,1 g do 1,0 g, které se umístí na prstenec. Kalibrační faktor Φ_a, kterým je třeba násobit všechny hodnoty odečtené na přístroji, je možné určit podle rovnice (1):

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

kde:

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

m = hmotnost jezdce (g),

g = tíhové zrychlení (981 $cm \cdot s^{-2}$ na úrovni hladiny moře),

b = střední obvod prstence (cm),

σ_a = odečtená hodnota na tenziometru po umístění jezdců na prstenec (mN m^{-1}).

b) Použitím vody: při tomto postupu se použije čistá voda, jejíž povrchové napětí má při 23 °C hodnotu 72,3 mN m^{-1}. Tento postup lze provést rychleji než kalibraci se závažími, ale existuje vždy nebezpečí, že povrchové napětí vody je zkresleno stopovým znečištěním povrchově aktivními látkami.

Kalibrační faktor Φ_b, kterým je třeba násobit všechny hodnoty odečtené na přístroji, je možné určit podle rovnice (2):

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

kde:

σ_0 = hodnota povrchového napětí vody uvedená v literatuře (mN m^{-1}),

σ_g = naměřená hodnota povrchového napětí vody (mN m^{-1}),

obě při stejné teplotě.

1.6.4.3 *Příprava vzorků*

Připraví se vodné roztoky zkoušených látek o požadované koncentraci, které nesmějí obsahovat nerozpuštěné složky.

Roztoky musí být udržovány při konstantní teplotě (±0,5 °C). Protože se povrchové napětí roztoku v měřicí nádobě v čase mění, provedou se měření v různých časech a sestrojí se křivka závislosti povrchového napětí na čase. Nedocházíli k žádným dalším změnám, bylo dosaženo rovnovážného stavu.

Měření je ovlivňováno znečištěním prachem nebo plynnými látkami. Práce musí být tedy prováděny pod ochranným krytem.

1.6.5 **Zkušební podmínky**

Měření se provádí přibližně při +20 °C a udržuje se tolerance ±0,5 °C.

1.6.6 **Postup zkoušky**

Roztoky, které mají být měřeny, se převedou do pečlivě vyčištěné měřicí nádoby, přičemž je třeba dbát na to, aby nedošlo k pěnění, a nádoba se poté postaví na stolek zkušební aparatury. Horní část stolku s měřicí nádobou se vysune tak vysoko, aby se prstenec ponořil pod povrch roztoku, který má být měřen. Horní část stolku se následně postupně a rovnoměrně sníží (rychlostí přibližně 0,5 cm·min^{-1}), aby došlo k oddělení prstence od povrchu, a to až do dosažení maximální hodnoty síly. Film kapaliny lpící na prstenci se od něho nesmí odtrhnout. Po ukončení měření se prstenec opět ponoří pod povrch a postup se opakuje až do dosažení konstantní hodnoty povrchového napětí. Při každém stanovení se začne zaznamenávat čas v okamžiku plnění roztoku do měřicí nádoby. Odečty se provedou vždy v okamžiku, kdy je dosaženo maximální síly nutné pro oddělení prstence od povrchu kapaliny.

2. **DATA**

Za účelem výpočtu povrchového napětí se hodnota odečtená na přístroji v mN m^{-1} nejprve vynásobí kalibračním faktorem Φ_a nebo Φ_b (podle použitého postupu kalibrace). Získá se tak hodnota, která však platí pouze přibližně, a vyžaduje proto korekci.

Harkins a Jordan (4) empiricky stanovili korekční faktory pro hodnoty povrchového napětí měřeného prstencovou metodou, které závisí na rozměrech prstence, hustotě kapaliny a jejím povrchovém napětí.

Vzhledem k tomu, že je zdlouhavé stanovovat pro každé jednotlivé měření korekční faktor z tabulek Harkinse a Jordana, lze pro výpočet povrchového napětí vodných roztoků použít zjednodušenou metodu, která spočívá v odečtu korigovaných hodnot povrchového napětí přímo z tabulky. (Pro odečtené hodnoty, které leží mezi hodnotami uvedenými v tabulce, se provede interpolace.)

TABULKA: KOREKCE NAMĚŘENÝCH HODNOT POVRCHOVÉHO NAPĚTÍ

Pouze pro vodné roztoky, $\rho \approx 1\ g \cdot cm^{-3}$

R = 9,55 mm (střední poloměr prstence)

r = 0,185 (poloměr drátu prstence)

Experimentální hodnota (mN m^{-1})	Korigovaná hodnota (mN m^{-1})	
	Kalibrace závažími (viz 1.6.4.2.2 písm. a))	Kalibrace vodou (viz 1.6.4.2.2 písm. 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
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
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Tabulka byla sestavena na základě korekcí podle Harkinse a Jordana. Je obdobou tabulky podle normy DIN 53914 pro vodu a vodné roztoky (hustota ρ = 1 $g \cdot cm^{-3}$); platí pro běžný komerční prstenec o rozměrech R = 9,55 mm (střední poloměr prstence) a r = 0,185 mm (poloměr drátu prstence). Tabulka udává korigované hodnoty pro měření povrchového napětí získané po kalibraci závažími nebo vodou.

Jiným řešením je vypočítat povrchové bez předchozí kalibrace podle rovnice:

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

kde

F = síla udaná měřicím systémem při oddělení filmu,

R = poloměr prstence,

f = korekční faktor (1).

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— druh vody nebo použitého roztoku,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— výsledky měření: povrchové napětí (odečtené hodnoty) s uvedením jednotlivých odečtených hodnot a jejich aritmetického průměru a rovněž korigované střední hodnoty (přičemž se bere v úvahu kalibrační faktor a tabulka korekcí),

— koncentrace roztoku,

— zkušební teplota,

— stáří použitého roztoku, zejména časový odstup mezi přípravou roztoku a měřením,

— znázornění časové závislosti povrchového napětí po převedení roztoku do měřicí nádoby,

— uvedou se všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Vzhledem k tomu, že povrchové napětí vody je 72,75 mN m^{-1} při 20 °C, měly by být látky vykazující za podmínek této metody povrchové napětí menší než 60 mN m^{-1} považovány za povrchově aktivní materiály.

4. **LITERATURA**

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

(2) R. Weissberger (*ed.*). Technique of Organic Chemistry, 3rd ed. Interscience Publ., New York, 1959, 1, Part I, Chapter XIV.

(3) *Pure and Applied Chem.*, 1976, 8, 511.

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

A.6 ROZPUSTNOST VE VODĚ

1. **METODA**

Popsané metody jsou založeny na Pokynech OECD pro zkoušení (1).

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o strukturním vzorci látky, o tenzi par, disociační konstantě a o hydrolýze (jako funkci pH).

Neexistuje jediná dostupná metoda pro celý rozsah rozpustností ve vodě.

Dvě níže popsané metody pokrývají celý rozsah rozpustnosti, nejsou však použitelné pro těkavé látky:

— první metoda, použitelná pro v podstatě čisté látky s malou rozpustností (< 10^{-2} g l^{-1}), stálé ve vodě; tato metoda se označuje jako „sloupcová eluční metoda“,

— druhá metoda, použitelná pro v podstatě čisté látky s vyšší rozpustností (> 10^{-2} g l^{-1}), stálé ve vodě; tato metoda se označuje jako „baňková metoda“.

Rozpustnost zkoušené látky ve vodě může být značně ovlivněna přítomností nečistot.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Rozpustnost látky ve vodě je definována hmotnostní koncentrací jejího nasyceného roztoku ve vodě při dané teplotě. Rozpustnost ve vodě se udává v jednotkách hmotnosti na objem roztoku. Jednotkou v soustavě SI je $kg \cdot m^{-3}$ (může se také používat g l^{-1}).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Přibližné množství vzorku a doba nutná pro dosažení hmotnostní koncentrace nasyceného roztoku by měly být stanoveny jednoduchou předběžnou zkouškou.

1.4.1 **Sloupcová eluční metoda**

Tato metoda je založena na vymývání zkoušené látky vodou z mikrokolony, naplněné inertním nosičem, např. skleněnými kuličkami nebo pískem, pokrytým přebytkem zkoušené látky. Rozpustnost ve vodě se stanoví, jsou-li hmotnostní koncentrace eluátu konstantní. To se projeví jako plató závislosti koncentrace na čase.

1.4.2 **Baňková metoda**

V této metodě se látka (pevné látky musí být ve formě prášku) rozpustí ve vodě při teplotě, která je o něco vyšší než teplota měření. Po dosažení nasycení se roztok ochladí a udržuje se při teplotě měření, za stálého míchání, dokud se nedosáhne rovnováhy. Jinou možností je provést měření přímo při zkušební teplotě, pokud je vhodným vzorkováním prokázáno, že je dosaženo rovnovážného nasycení. Hmotnostní koncentrace látky ve vodném roztoku, který nesmí obsahovat žádné nerozpuštěné částice, se následně stanoví vhodnou analytickou metodou.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

1.5.1 **Opakovatelnost**

Při sloupcové eluční metodě je dosažitelná opakovatelnost < 30 %; při baňkové metodě by mělo být dosaženo opakovatelnosti < 15 %.

1.5.2 **Citlivost**

Závisí na analytické metodě, lze však stanovit hmotnostní koncentrace až do 10^{-6} g l^{-1}.

1.6 POPIS METOD

1.6.1 **Zkušební podmínky**

Zkouška se provádí pokud možno při teplotě 20 ±0,5 °C. Předpokládá-li se závislost rozpustnosti ve vodě na teplotě (>3 % na 1 °C), měla by být provedena měření při dvou dalších teplotách, které jsou nejméně o 10 °C vyšší a nižší než původně zvolená teplota. V tomto případě by měla být teplota udržována v toleranci ±0,1 °C. Zvolenou teplotu je třeba udržovat ve všech důležitých částech aparatury konstantní.

1.6.2 **Předběžná zkouška**

K přibližně 0,1 g vzorku (pevné látky musí být v práškové formě) v 10ml odměrném válci uzavíratelném skleněnou zátkou se přidává vzrůstající objem destilované vody o laboratorní teplotě podle kroků uvedených v této tabulce:.

0,1 g rozpuštěno v „x“ ml vody	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Přibližná rozpustnost (g l^{-1})	>1 000	1 000 až 200	200 až 100	100 až 50	50 až 10	10 až 1	< 1

Po každém přidání množství vody uvedeného v tabulce se směsí intenzivně třepe po dobu 10 min a vizuálně se kontroluje obsah nerozpuštěných částic. Zůstaneli vzorek nebo jeho část po přidání 10 ml vody nerozpuštěný, experiment je nutno opakovat ve 100 ml odměrném válci s větším objemem vody. Při nízkých rozpustnostech může být doba potřebná k rozpuštění látky podstatně delší (je vhodné vyčkat alespoň 24 h). Přibližná rozpustnost je uvedena v tabulce pod objemem vody potřebným k úplnému rozpuštění vzorku. Není-li látka ani poté úplně rozpuštěna, je vhodné vyčkat delší dobu než 24 h (maximálně 96 h), nebo ředit dále, aby se zjistilo, zda by měla být použita sloupcová eluční metoda nebo baňková metoda.

1.6.3 **Sloupcová eluční metoda**

1.6.3.1 *Nosič, rozpouštědlo a eluent*

Nosič pro sloupcovou eluční metodu by měl být inertní. Vhodnými materiály, které lze použít, jsou skleněné kuličky a písek. K nanesení zkoušené látky na nosič by mělo být použito vhodné těkavé analyticky čisté rozpouštědlo. Jako eluent by měla být použita voda redestilovaná ve skleněné nebo křemenné aparatuře.

Poznámka:

Nesmí se použít voda získaná přímo z organického měniče iontů.

1.6.3.2 *Nanášení na nosič*

Odváží se přibližně 600 mg nosiče a převede se do 50ml baňky s kulatým dnem.

Přiměřené odvážené množství zkoušené látky se rozpustí ve zvoleném rozpouštědle. Dostatečný podíl tohoto roztoku se přidá k nosiči. Rozpouštědlo musí být dokonale odpařeno, např. v rotační odparce, jinak se nedosáhne úplného nasycení nosiče vodou kvůli rozdělovacím efektům na povrchu nosiče.

Nanášení zkoušené látky na nosič může být problematické (chybné výsledky), sráží-li se zkoušená látka na nosiči jako olej nebo krystalická fáze. Problém by měl být řešen experimentálně a podrobnosti by měly být zaznamenány.

Nosič s nanesenou látkou se nechá dvě hodiny botnat v asi 5 ml vody a suspense se poté naplní do mikrokolony. Je také možné naplnit mikrokolonu, která byla předtím naplněna vodou, suchým nosičem s nanesenou látkou a poté nechat během dvou hodin ustavit rovnováhu.

Zkušební postup:

Vymývání látky z nosiče lze provádět dvěma různými způsoby:

— oběhovým čerpadlem (viz obrázek 1),

— vyrovnávací nádobou (viz obrázek 4).

1.6.3.3 *Vymývání kolony použitím oběhového čerpadla*

Aparatura

Schematické uspořádání typického systému je znázorněno na obrázku 1. Vhodná mikrokolona je znázorněna na obrázku 2, přijatelná je ovšem i kterákoli jiná velikost za předpokladu, že budou splněna kritéria opakovatelnosti a citlivosti. Prostor hlavy kolony by měl mít obsah nejméně pěti objemů sloupce a měl by být schopný pojmout nejméně pět vzorků. Prostor hlavy kolony může být menší, pokud se počátečních pět objemů sloupce eluovaných s nečistotami nahradí čistým rozpouštědlem.

Kolona by měla být připojena k oběhovému čerpadlu, které zajišťuje konstantní průtok asi 25 ml h^{-1}. Čerpadlo se připojí hadičkami z polytetrafluorethylenu (PTFE), a/nebo skleněnými trubičkami. U aparatury složené z kolony a čerpadla musí být možnost odběru eluátu a vyrovnávání tlaku v hlavě kolony s atmosférickým tlakem. Materiál v koloně se fixuje malým (5 mm) smotkem skelné vaty, který současně slouží k odfiltrování částeček. Lze použít např. peristaltické nebo membránové čerpadlo (přitom je třeba dbát na to, aby nedošlo ke znečištění materiálem hadičky a/nebo aby nedošlo k absorpci tímto materiálem).

Postup měření

Zahájí se vymývání kolony. Doporučuje se průtok asi 25 ml h^{-1} (to odpovídá u popsané kolony desetinásobku objemu sloupce za hodinu). Nejméně prvních pět objemů sloupce obsahujících nečistoty rozpustné ve vodě se odstraní. Poté se nechá běžet oběhové čerpadlo až do ustavení rovnováhy, které je dosaženo, neliší-li se koncentrace pěti po sobě následujících vzorků při náhodném výběru o více než ±30 %, přičemž rozdíly jsou nepravidelné. Tyto vzorky by se měly odebírat v intervalech, během kterých kolonou projde objem eluentu rovný nejméně desetinásobku objemu sloupce.

1.6.3.4 *Vymývání kolony pomocí vyrovnávací nádoby*

Aparatura (viz obrázek 3 a 4)

Vyrovnávací nádoba: je připojena zabroušeným spojem, který je spojen hadičkou z PTFE. Doporučuje se použít rychlost průtoku přibližně 25 ml h^{-1}. Podíly eluátu následující po sobě se shromažďují a jejich koncentrace se analyzují zvolenou metodou.

Postup měření:

Pro stanovení rozpustnosti ve vodě se použijí prostřední podíly eluátu, ve kterých zůstávají koncentrace nejméně v pěti po sobě jdoucích vzorcích konstantní (±30 %).

V obou případech (při použití oběhového čerpadla nebo vyrovnávací nádoby) se druhé promytí provede při poloviční průtokové rychlosti. Shodujíli se výsledky obou pokusů, považuje se výsledek za uspokojivý; je-li zdánlivá rozpustnost při nižší průtokové rychlosti vyšší, je nutné průtok snižovat vždy na polovinu tak dlouho, dokud dva po sobě následující měření neposkytnou stejnou hodnotu rozpustnosti.

V obou případech (v případě oběhového čerpadla nebo vyrovnávací nádoby) je nutné vzorky podrobit zkoušce na koloidní částice pomocí Tyndallova jevu (rozptylem světla). Přítomností takových částic je výsledek znehodnocen a zkouška by měla být opakována po zlepšení filtrační funkce kolony.

Mělo by být zaznamenáno pH každého vzorku. Druhé měření je třeba provést při stejné teplotě.

1.6.4 **Baňková metoda**

1.6.4.1 *Zařízení*

Tato metoda vyžaduje toto vybavení:

— běžné laboratorní skleněné nádoby a pomůcky,

— zařízení pro třepání roztoků při regulovaných konstantních teplotách,

— odstředivka (nejlépe termostatovaná), je-li nezbytná v případě emulzí, a

— přístroje pro analytická stanovení.

1.6.4.2 *Postup měření*

Množství materiálu potřebné pro nasycení požadovaného objemu vody se odhadne z předběžného pokusu. Potřebný objem vody závisí na analytické metodě a na rozsahu rozpustnosti. Do tří skleněných nádobek opatřených skleněnými zátkami (např. centrifugačních kyvet, baněk) se naváží asi pětinásobek odhadnutého množství materiálu. Do každé z nádobek se přidá zvolené množství vody a nádobky se těsně uzavřou. Uzavřené nádobky se poté třepou při 30 °C. (K tomuto účelu by měla být použita třepačka nebo míchačka pracující při konstantní teplotě, např. magnetické míchání v termostatované vodní lázni.) Po jednom dnu se jedna z nádobek vyjme a nechá se za občasného míchání 24 h stát, aby se ustálila rovnováha při teplotě měření. Poté se obsah nádobky odstředí při teplotě měření a v čiré vodné fázi se vhodnou analytickou metodou stanoví koncentrace zkoušené látky. Po dvou, resp. třech dnech se zbylé dvě nádobky po předchozím ustavení rovnováhy nasycení při 30 °C zpracují podobným způsobem. Odpovídají-li hodnoty koncentrace alespoň u posledních dvou nádobek požadované reprodukovatelnosti, je stanovení uspokojivé. Pokud hodnoty koncentrací pro nádobky 1, 2 a 3 vykazují stoupající tendenci, mělo by být celé stanovení opakováno s prodloužením doby pro ustavení rovnováhy.

Měření může být provedeno i bez předběžné inkubace při 30 °C. S cílem zjistit rychlost ustavení saturační rovnováhy se odebírají vzorky do té doby, dokud doba míchání ovlivňuje koncentraci měřeného roztoku.

Mělo by být zaznamenáno pH každého vzorku.

1.6.5 **Analýza**

Pro tato stanovení se upřednostňuje analytická metoda specifická pro danou látku, protože malá množství rozpuštěných nečistot mohou způsobit velké chyby při stanovení rozpustnosti ve vodě. Příklady těchto analytických metod jsou plynová nebo kapalinová chromatografie, titrační metody, fotometrické metody, voltametrické metody.

2. **DATA**

2.1 SLOUPCOVÁ ELUČNÍ METODA

Pro každý pokus by měla být vypočtena střední hodnota z nejméně pěti po sobě následujících vzorků vybraných z oblasti po dosažení rovnovážného nasycení a rovněž by měla být vypočtena směrodatná odchylka. Výsledky by měly být uvedeny v jednotkách hmotnosti na jednotku objemu roztoku.

Porovnají se střední hodnoty dvou zkoušek provedených za různých rychlostí průtoku a jejich opakovatelnost by měla být menší než 30 %.

2.2 BAŇKOVÁ METODA

Výsledky pro každou ze tří baněk se uvedou samostatně a jsouli ustálené (opakovatelnost je lepší než 15 %), zprůměrují se a vyjádří se v jednotkách hmotnosti na jednotku objemu roztoku. Je-li rozpustnost velmi vysoká (>100 g l^{-1}), může to vyžadovat přepočet hmotnostních jednotek na objemové jednotky s využitím hustoty roztoku.

3. **ZPRÁVY**

3.1 SLOUPCOVÁ ELUČNÍ METODA

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— výsledky předběžné zkoušky,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— jednotlivé koncentrace, hodnoty rychlosti průtoku a pH pro každý vzorek,

— střední hodnoty a směrodatné odchylky nejméně pro pět vzorků z rovnovážné oblasti křivky nasycení z každého pokusu,

— průměrná hodnota dvou po sobě následujících přijatelných měření,

— teplota vody během procesu tvorby nasyceného roztoku,

— použitá analytická metoda,

— druh použitého materiálu nosiče,

— způsob nanesení studované látky na nosič,

— použité rozpouštědlo,

— poznatky o jakékoli chemické nestálosti látky během zkoušky a při použité analytické metodě,

— všechny informace, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav látky.

3.2 BAŇKOVÁ METODA

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— výsledky předběžné zkoušky,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— výsledky jednotlivých analytických stanovení a průměrné hodnoty, pokud byla pro každou nádobku stanovena více než jedna hodnota,

— hodnota pH každého vzorku,

— průměrná hodnota pro dvě různé nádobky, jejichž výsledky jsou ve shodě,

— teplota při zkoušce,

— použitá analytická metoda,

— poznatky o jakékoli chemické nestálosti látky během zkoušky a při použité analytické metodě,

— všechny informace, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav látky.

4. **LITERATURA**

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

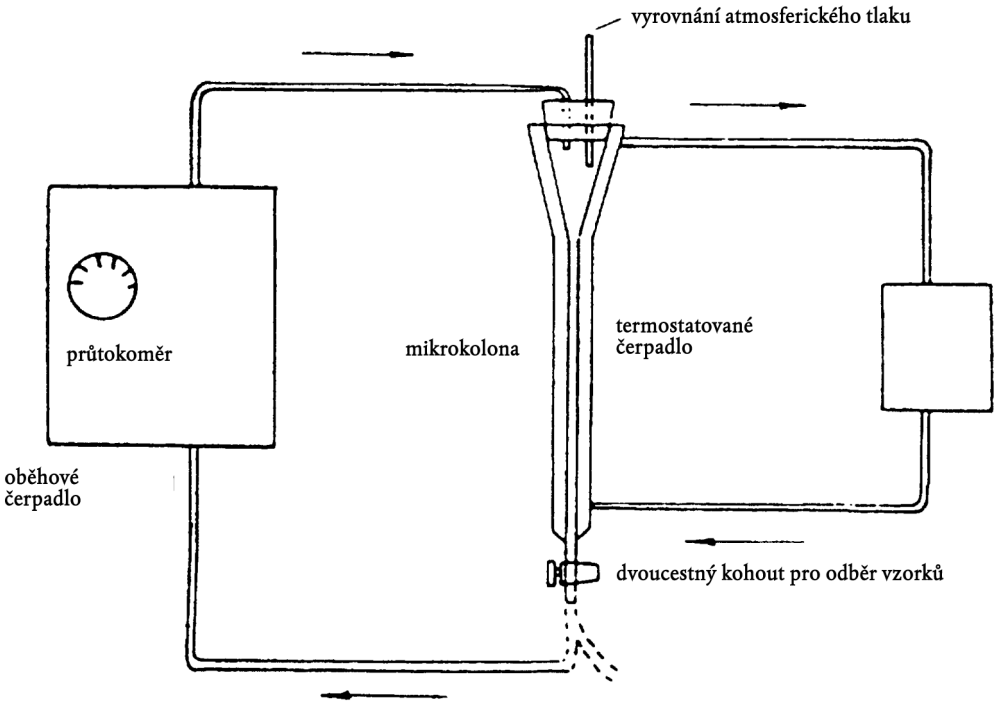
(2) NF T 20045 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.

(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.

Doplněk

Obrázek 1

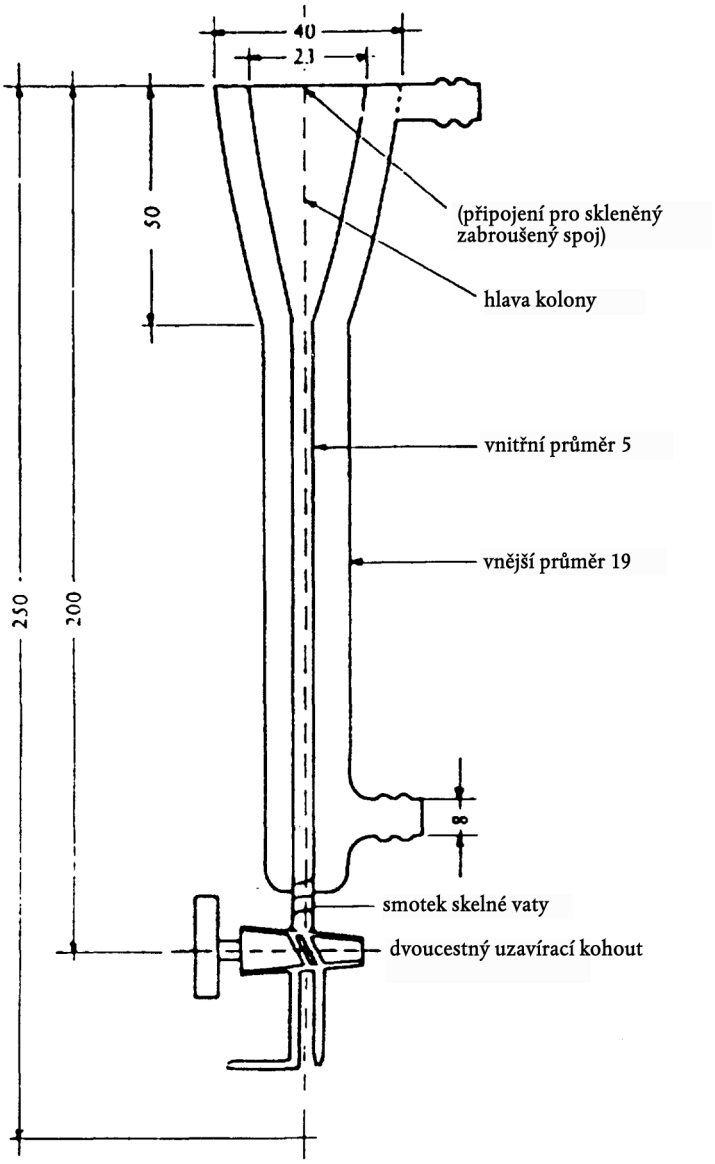
Sloupcová eluční metoda s oběhovým čerpadlem



Obrázek 2

Typická mikrokolona

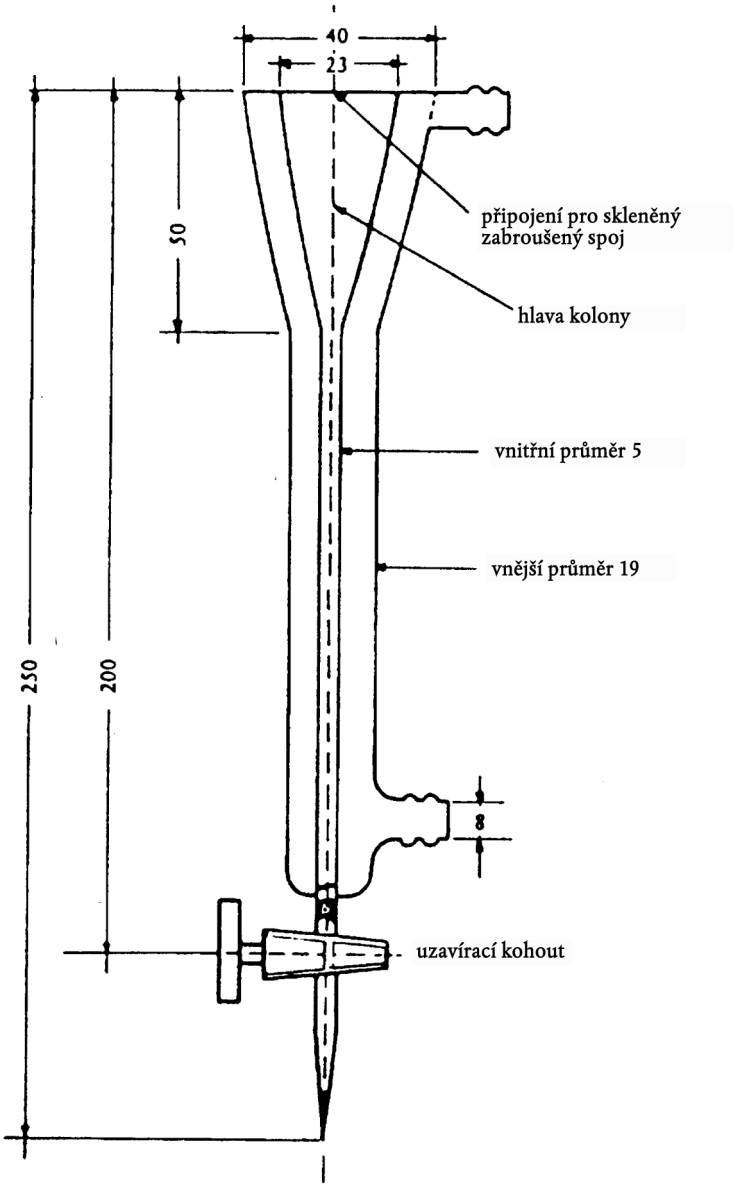
(všechny rozměry v mm)



Obrázek 3

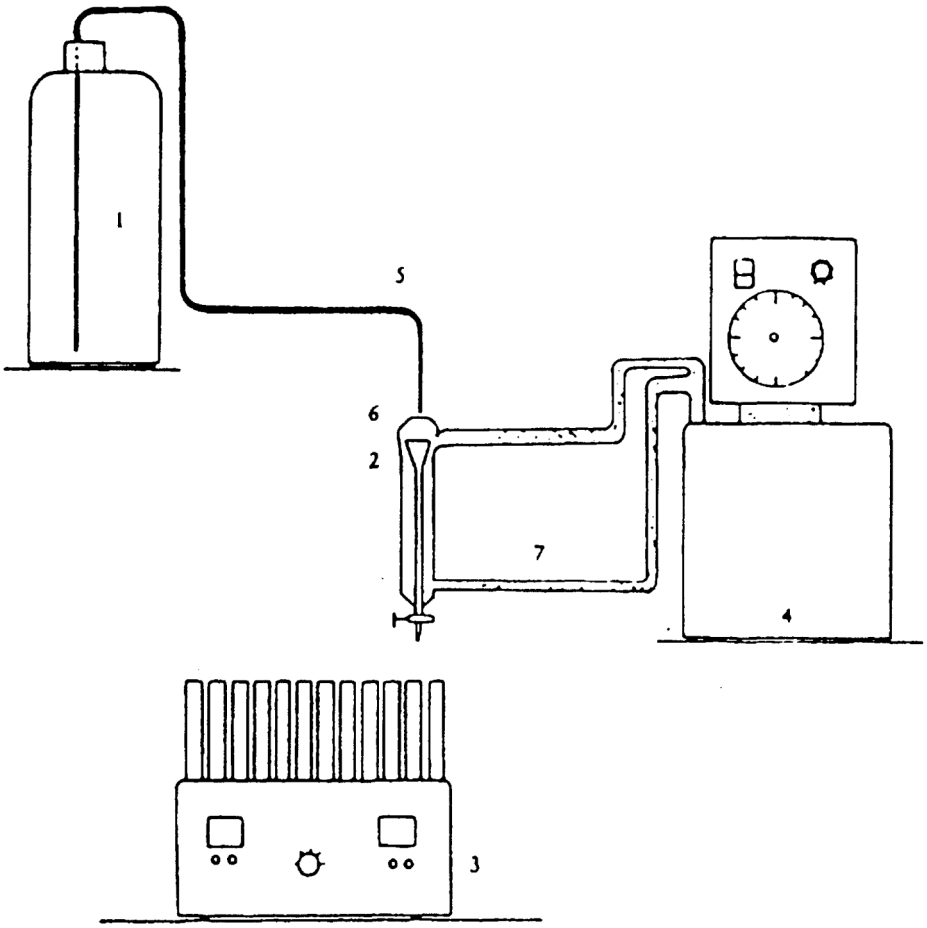
Typická mikrokolona

(všechny rozměry v mm)



Obrázek 4

Sloupcová eluční metoda s vyrovnávací nádobou



1 = vyrovnávací nádoba (např. baňka o obsahu 2,5 l)
2 = kolona (viz obrázek 3)
3 = sběrač frakcí
4 = termostat
5 = teflonová hadička
6 = skleněný zabroušený spoj
7 = hadice na vodu (mezi termostatem a kolonou, vnitřní průměr asi 8 mm)

A.8 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT

1. METODA

Popsaná metoda „třepací lahve“ je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1).

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o strukturním vzorci látky, o disociační konstantě, o rozpustnosti ve vodě, o hydrolýze, o rozpustnosti v noktanolu (oktan1olu) a o povrchovém napětí.

U disociujících látek by měla být měření prováděna pouze s nedisociovanou formou (volná kyselina nebo volná báze), získanou při použití vhodného pufru o pH nejméně o 1 nižším (volná kyselina) nebo vyšším (volná báze) než pK.

Tato zkušební metoda zahrnuje dva samostatné postupy: metodu třepací lahve a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). První metodu lze použít, leží-li hodnota log $P_{o/v}$ (definice viz níže) v rozmezí −2 až 4, a druhou metodu, leží-li hodnota log $P_{o/v}$ v rozmezí 0 až 6. Před provedením kteréhokoli z experimentálních postupů by měl být nejdříve získán předběžný odhad rozdělovacího koeficientu.

Metoda třepací lahve je použitelná pouze pro v podstatě čisté látky, které jsou rozpustné ve vodě a v noktanolu. Nelze ji použít pro povrchově aktivní látky (pro které by měly být uvedeny hodnota získaná výpočtem nebo odhad založený na příslušných rozpustnostech v noktanolu a ve vodě).

Metoda HPLC není použitelná pro silné kyseliny a zásady, komplexní sloučeniny kovů, povrchově aktivní látky a látky, které reagují s eluentem. Pro tyto látky by měly být uvedeny hodnota získaná výpočtem nebo odhad založený na individuálních rozpustnostech v n-oktanolu a vodě.

Metoda HPLC je méně citlivá na přítomnost nečistot ve zkoušené látce než metoda třepací lahve. Někdy však mohou nečistoty ztížit interpretaci výsledků, protože přiřazení píků se stává nejistým. U směsí, které dávají nerozlišitelný pás, by měly být uvedeny spodní a horní mez hodnoty log *P*.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Rozdělovací koeficient (*P*) je definován jako poměr rovnovážných koncentrací (c_i) rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému tvořeném dvěma prakticky nemísitelnými rozpouštědly. V případě n-oktanolu a vody platí:

$$P_{ow} = \frac{C_{Oktan\text{-}1\text{-}ol}}{C_{voda}}$$

Rozdělovací koeficient (*P*) je tedy podílem dvou koncentrací a udává se obvykle ve formě svého dekadického logaritmu (log *P*).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Metoda třepací lahve

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provádění metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Metoda HPLC

Za účelem korelace hodnot naměřených pro danou sloučeninu metodou HPLC s její hodnotou *P* je nutné sestrojit kalibrační graf závislosti log *P* na chromatografických datech tvořený nejméně šesti referenčními body. Vhodné referenční látky zvolí uživatel. Pokud je to možné, měla by mít alespoň jedna referenční látka $P_{o/v}$ vyšší než zkoušená látka a jiná referenční látka $P_{o/v}$ nižší než zkoušená látka. U hodnot log *P* nižších než 4 může být kalibrace založena na datech získaných metodou třepací lahve. U hodnot log *P* vyšších než 4 může být kalibrace založena na ověřených hodnotách z literatury, pokud jsou v souladu s vypočtenými hodnotami. Za účelem dosažení vyšší přesnosti je vhodnější volit látky, které mají podobnou strukturu jako zkoušená látka.

Rozsáhlé seznamy hodnot $P_{o/v}$ pro mnoho skupin chemických látek jsou dostupné v literatuře (2, 3). Nejsou-li k dispozici údaje o rozdělovacích koeficientech látek s podobnou strukturou, lze použít obecnější kalibraci s jinými referenčními látkami.

Seznam doporučených referenčních látek a jejich hodnot $P_{o/v}$ je uveden v doplňku 2.

1.4 PODSTATA METODY

1.4.1 **Metoda třepací lahve**

Pro stanovení rozdělovacího koeficientu musí být dosaženo rovnováhy mezi všemi vzájemně působícími složkami systému a musí být stanoveny koncentrace látek rozpuštěných v obou fázích. Ze studia literatury vztahující se k této otázce vyplývá, že k řešení tohoto problému lze použít několik různých postupů, např. důkladné promíchání obou fází a jejich následné oddělení za účelem stanovení rovnovážných koncentraci vyšetřované látky.

1.4.2 **Metoda HPLC**

HPLC se provádí na analytických kolonách plněných komerčně dostupnou pevnou fází obsahující dlouhé uhlovodíkové řetězce (např. C_8, C_{18}) chemicky vázané na oxid křemičitý. Chemické látky nastříknuté do této kolony se v ní pohybují různou rychlostí v důsledku různých stupňů rozdělení mezi mobilní fázi a uhlovodíkovou stacionární fázi. Směsi chemikálií se eluují v pořadí své hydrofobnosti, přičemž se látky rozpustné ve vodě eluují jako první a látky rozpustné v olejích jako poslední, úměrně svému rozdělovacímu koeficientu uhlovodíkyvoda. To umožňuje určit vztah mezi retenčním časem v této koloně (s reversními fázemi) a rozdělovacím koeficientem noktan/voda. Rozdělovací koeficient se odvodí z *kapacitního faktoru k*, daného výrazem:

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

v němž t_R = retenční čas zkoušené látky, t_o = průměrná doba, kterou molekula rozpouštědla potřebuje k průchodu kolonou (mrtvá doba).

Kvantitativní analytické metody nejsou zapotřebí, nezbytné je pouze stanovení elučních dob.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

1.5.1 **Opakovatelnost**

Metoda třepací lahve

S cílem zaručit správnost hodnoty rozdělovacího koeficientu se provedou opakovaná stanovení při třech různých zkušebních podmínkách, přičemž lze měnit jak množství dané látky, tak poměr objemů obou rozpouštědel. Dekadické logaritmy stanovených hodnot rozdělovacího koeficientu by měly ležet v rozmezí ±0,3.

Metoda HPLC

S cílem zvýšit důvěryhodnost měření musí být provedena opakovaná stanovení. Hodnoty log *P* získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí ±0,1.

1.5.2 **Citlivost**

Metoda třepací lahve

Měřicí rozsah metody je určen mezí detekce analytické metody. Ta by měla umožnit stanovení hodnot log $P_{o/v}$ v oblasti od −2 do 4 (pokud to podmínky dovolí, lze tuto oblast rozšířit až do hodnoty log $P_{o/v}$ rovné 5), není-li koncentrace rozpuštěné látky v žádné z fází vyšší než 0,01 mol·l^{-1}.

Metoda HPLC

Metoda HPLC umožňuje stanovení rozdělovacích koeficientů v rozsahu log $P_{o/v}$ od 0 do 6.

Obvykle je možné určit rozdělovací koeficient dané látky s přesností ±1 řádu vzhledem k hodnotě získané metodou třepací lahve. Typické korelace lze nalézt v literatuře (4, 5, 6, 7, 8). Vyšší přesnosti lze obvykle dosáhnout, je-li korelační závislost založena na referenčních látkách podobné struktury (9).

1.5.3 **Specifičnost**

Metoda třepací lahve

Nernstův rozdělovací zákon platí pro zředěné roztoky jen při konstantní teplotě a konstantním tlaku a pH. Platí pouze pro čistou látku rozdělenou mezi dvě čistá rozpouštědla. Je-li současně v jedné nebo obou fázích přítomno více rozpuštěných látek, může tím být výsledek ovlivněn.

Disociace nebo asociace rozpuštěných molekul vede k odchylkám od Nernstova rozdělovacího zákona. Tyto odchylky se projevují tím, že se rozdělovací koeficient stává závislým na koncentraci roztoku.

V důsledku existujících mnohonásobných rozdělovacích rovnováh by tato metoda neměla být použita bez korekcí na disociovatelné sloučeniny. Pro tyto sloučeniny by mělo být zváženo použití pufračních roztoků namísto vody; pH pufračního roztoku by se mělo lišit od pK_a látky nejméně o 1, přičemž se zohlední význam tohoto pH s ohledem na životní prostředí.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Předběžný odhad rozdělovacího koeficientu**

Hodnotu rozdělovacího koeficientu lze nejlépe odhadnout na základě výpočtu (viz doplněk 1) nebo popřípadě z poměru rozpustností zkoušené látky v čistých rozpouštědlech (10).

1.6.2 **Metoda třepací lahve**

1.6.2.1 *Příprava*

n-Oktanol: Stanovení rozdělovacího koeficientu by mělo být provedeno s n-oktanolem (oktan1olem) čistoty p.a.

Voda: měla by být použita destilovaná voda nebo redestilovaná voda ve skleněné nebo křemenné aparatuře. V případě potřeby by měly být u disociovatelných látek použity místo vody pufrační roztoky.

Poznámka:

Neměla by být použita voda pocházející přímo z měniče iontů.

1.6.2.1.1 Předběžné nasycení rozpouštědel

Před stanovením rozdělovacího koeficientu se fáze rozpouštědlového systému vzájemně nasytí třepáním při teplotě experimentu. K dosažení tohoto cíle je vhodné 24 h třepat na mechanické třepačce ve dvou velkých zásobních lahvích vysoce čistý n-oktanol nebo vysoce čistou vodu, obojí s dostatečným množstvím druhého rozpouštědla, a poté nechat rozpouštědla stát tak dlouho, dokud se obě fáze neoddělí a dokud není dosaženo nasycení.

1.6.2.1.2 Příprava zkoušky

Celkový objem dvoufázového systému by měl téměř naplňovat zkušební nádobu. Tím se zamezí ztrátám látek v důsledku odpařování. Poměry objemů a množství látek, které mají být použity, jsou dány

— předběžným odhadem rozdělovacího koeficientu (viz výše),

— minimálním množstvím zkoušené látky nezbytným pro postup analýzy a

— omezením maximální koncentrace v každé fázi na 0,01 $mol \cdot l^{-1}$.

Provedou se tři zkoušky. Při první se použije vypočtený poměr objemů noktanolu a vody; při druhé se tento poměr dělí dvěma a při třetí se tento poměr násobí dvěma (např. 1: 1, 1: 2, 2: 1).

1.6.2.1.3 Zkoušená látka

Připraví se zásobní roztok v n-oktanolu předem nasyceném vodou. Koncentrace tohoto zásobního roztoku by měla být před jeho použitím ke stanovení rozdělovacího koeficientu přesně stanovena. Tento roztok by měl být uchováván za podmínek, které zajistí jeho stálost.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

Zkušební teplota by měla být konstantní (±1 °C) a měla by ležet v rozmezí 20 a 25 °C.

1.6.2.3 *Postup měření*

1.6.2.3.1 Ustavení rovnováhy rozdělení

Pro každou ze zkušebních podmínek by měly být připraveny dvě zkušební nádoby obsahující potřebná přesně odměřená množství obou rozpouštědel spolu s nezbytným množstvím zásobního roztoku.

Fáze n-oktanolu je nutné odměřit objemově. Zkušební nádoby by měly být umístěny do vhodné třepačky, nebo by měly být třepány ručně. Při použití centrifugační kyvety spočívá doporučený postup v tom, že se kyveta rychle otáčí kolem své příčné osy o 180°, takže případný zachycený vzduch stoupá vzhůru oběma fázemi. Ze zkušenosti vyplývá, že k ustavení rovnovážného rozdělení obvykle stačí 50 takových otočení. Pro jistotu se doporučuje 100 otočení během pěti minut.

1.6.2.3.2 Oddělení fází

V případě potřeby lze oddělení fází provést odstředěním směsi. Odstředění by mělo být provedeno laboratorní odstředivkou udržovanou při laboratorní teplotě, nebo, je-li použita odstředivka bez regulace teploty, by měly být centrifugační kyvety za účelem ustavení rovnováhy udržovány alespoň jednu hodinu před analýzou při zkušební teplotě.

1.6.2.4 *Analýza*

Za účelem stanovení rozdělovacího koeficientu je nutné stanovit koncentrace zkoušené látky v obou fázích. To lze provést odebráním alikvotního podílu každé z obou fází z každé kyvety a pro každou zkušební podmínku a jejich analýzou zvoleným postupem. Celkové množství látky přítomné v obou fázích by mělo být vypočteno a porovnáno s původně dodaným množstvím látky.

Odběr vzorku z vodné fáze je nutné provést postupem minimalizujícím riziko znečištění stopami n-oktanolu: k odběru vzorků vodné fáze lze použít skleněnou injekční stříkačku s vyměnitelnou jehlou. Stříkačka se nejprve částečně naplní vzduchem. Vzduch se při průchodu jehly vrstvou n-oktanolu opatrně vypudí. Do stříkačky se natáhne dostatečný objem vodné fáze. Stříkačka se z roztoku rychle vytáhne a jehla se sejme. Obsah stříkačky lze poté použít jako vzorek vodné fáze. Koncentrace v obou od sebe oddělených fázích by měla být stanovena nejlépe metodou, která je specifická pro danou látku. Příklady možných vhodných analytických metod jsou

— fotometrické metody,

— plynová chromatografie,

— vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

1.6.3 **Metoda HPLC**

1.6.3.1 *Příprava*

Aparatura

Nezbytným vybavením je kapalinový chromatograf vybavený bezpulzním čerpadlem a vhodným detekčním zařízením. Doporučuje se používat nástřikový ventil se vstřikovacími smyčkami. Přítomnost polárních skupin ve stacionární fázi může závažně zhoršit účinnost kolony HPLC. Stacionární fáze by proto měla mít minimální podíl polárních skupin (11). Lze použít komerční mikročásticové náplně s reversními fázemi nebo hotové kolony s náplní. Mezi nástřikem a analytickou kolonou může být umístěna ochranná předkolona.

Mobilní fáze

K přípravě elučního rozpouštědla se použije methanol čistoty pro HPLC a voda čistoty pro HPLC, které se před použitím odplyní. Měla by být provedena isokratická eluce. Doporučuje se použít směsi methanol/-voda s minimálním obsahem vody 25 %. Obvykle vyhovuje pro eluci sloučenin o log P = 6 během jedné hodiny při průtokové rychlosti 1 ml min^{-1} směs methanol/voda 3: 1 (obj.). U sloučenin s vysokou hodnotou log P může být nutné zkrátit eluční dobu (stejně tak u referenčních látek) snížením polarity mobilní fáze nebo délky kolony.

Látky s velmi nízkou rozpustností v noktanolu mají tendenci při použití metody HPLC vykazovat abnormálně nízké hodnoty log $P_{o/v}$; píky těchto sloučenin někdy doprovázejí čelo rozpouštědla. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že proces rozdělení je příliš pomalý, než aby bylo dosaženo rovnováhy za dobu, po kterou obvykle trvá dělení metodou HPLC. Pro dosažení spolehlivé hodnoty může být v takovém případě účinné snížení průtokové rychlosti nebo snížení poměru methanol/voda.

Zkoušená i referenční látka by měly být rozpustné v mobilní fázi v dostatečných koncentracích umožňujících jejich detekci. Pouze ve výjimečných případech mohou být u směsi methanol/voda použita aditiva, neboť aditiva mění vlastnosti kolony. V případě chromatogramů získaných při použití aditiv, musí být použita samostatná kolona téhož typu. Nevyhovuje-li směs methanolvoda, lze použít směsi jiných organických rozpouštědel s vodou, např. ethanolvoda nebo acetonitrilvoda.

Pro disociovatelné látky je kritické pH eluentu. Mělo by ležet v pracovní oblasti pH kolony, která je obvykle 2 až 8. Doporučuje se použití pufračních roztoků. Je nezbytné dbát na to, aby nedošlo ke srážení solí a narušení kolony, ke kterému dochází u některých směsí organické fáze s pufračním roztokem. Měření pomocí HPLC se stacionárními fázemi na bázi oxidu křemičitého při pH vyšším než 8 se nedoporučuje, neboť použití alkalické mobilní fáze může způsobit rychlé narušení činnosti kolony.

Rozpouštěné látky

Referenční sloučeniny by měly mít nejvyšší dostupnou čistotu. Sloučeniny, které se mají používat pro zkoušení nebo kalibraci, se pokud možno rozpustí v mobilní fázi.

Zkušební podmínky

Teplota by během měření neměla kolísat o více než ±2 K.

1.6.3.2 *Měření*

Výpočet mrtvé doby t_0

Mrtvou dobu t_0 je možné stanovit buď pomocí homologické řady (např. *n*alkylmethylketonů) nebo nezadržovaných organických sloučenin (např. thiomočoviny nebo formamidu). Pro výpočet mrtvé doby t_0 s použitím homologické řady se nastříkne sada alespoň sedmi členů homologické řady a stanoví se příslušné retenční časy. Neupravené retenční časy $t_r(n_c + 1)$ se vynesou jako funkce $t_r(n_c)$ a stanoví se absolutní člen *a* a směrnice *b* regresní rovnice:

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

(n_c = počet atomů uhlíku). Mrtvá doba t_0 je dána vztahem:

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

Kalibrační křivka

Následujícím krokem je sestrojení korelační závislosti hodnot log *k* na log *P* pro příslušné referenční sloučeniny. V praxi se současně nastříkne soubor 5 až 10 standardních referenčních sloučenin, jejichž log *P* leží v očekávané oblasti, a stanoví se retenční časy, nejlépe zapisovacím integrátorem napojeným na detekční systém. Vypočtou se příslušné logaritmy kapacitních faktorů, log *k*, a vynesou se jako funkce hodnot log *P* stanovených metodou třepací lahve. Kalibrace se provádí v pravidelných intervalech nejméně jednou denně, aby bylo možné zohlednit případné změny činnosti kolony.

Stanovení kapacitního faktoru zkoušené látky

Zkoušená látka se nastříkne v co nejmenším množství mobilní fáze. Stanoví se retenční čas (dvakrát), umožňující výpočet kapacitního faktoru *k*. Z korelační křivky referenčních sloučenin je možné interpolací získat rozdělovací koeficient zkoušené látky. U velmi nízkých a velmi vysokých rozdělovacích koeficientů je nutná extrapolace. V těchto případech je nutno věnovat zvláštní pozornost intervalům spolehlivosti regresní křivky.

2. **DATA**

Metoda třepací lahve

Spolehlivost stanovených hodnot *P* je možné prověřit srovnáním středních hodnot z opakovaných stanovení s celkovou střední hodnotou.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— nejsou-li metody použitelné (např. u povrchově aktivní látky), měla by být uvedena vypočtená hodnota nebo odhad založený na individuálních rozpustnostech látky v noktanolu a ve vodě,

— všechny informace a poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav látky.

Pro metodu třepací lahve:

— výsledek předběžného odhadu, pokud existuje,

— teplotu stanovení,

— údaje o analytických postupech použitých ke stanovení koncentrací,

— dobu a rychlost odstřeďování, pokud se použilo,

— koncentrace naměřené při každém stanovení v obou fázích (tzn. uvede se celkem 12 koncentrací),

— hmotnost zkoušené látky, objem každé fáze použité v každé zkušební nádobě a vypočtené celkové množství zkoušené látky, obsažené v jednotlivých fázích po dosažení rovnováhy,

— vypočtené hodnoty rozdělovacího koeficientu (*P*) a střední hodnotu je nutné uvést pro každý soubor zkušebních podmínek, stejně tak střední hodnotu ze všech stanovení. Pokud existují náznaky závislosti rozdělovacího koeficientu na koncentraci, mělo by to být uvedeno ve zprávě,

— měla by být uvedena směrodatná odchylka jednotlivých hodnot *P* od střední hodnoty,

— měl by být také uveden dekadický logaritmus střední hodnoty *P* ze všech stanovení,

— vypočtená teoretická hodnota $P_{o/v}$, byla-li stanovena nebo je-li naměřená hodnota $>10^4$,

— pH použité vody a vodné fáze během experimentu,

— pokud byly použity pufry, zdůvodnění jejich použití místo vody, jejich složení, koncentrace a pH, pH vodné fáze před a po experimentu.

Pro metodu HPLC:

— výsledek předběžného odhadu, pokud existuje,

— zkoušená látka a referenční látky, jejich čistota,

— teplotní rozmezí při stanoveních,

— pH, při kterém se prováděla stanovení,

— podrobnosti o analytické a ochranné koloně, o mobilní fázi a o způsobu detekce,

— retenční data a hodnoty log *P* z literatury pro referenční sloučeniny použité ke kalibraci,

— podrobnosti o proložené regresní přímce (log *k versus* log *P*),

— průměrná retenční data a interpolovaná hodnota log *P* pro zkušební sloučeninu,

— popis zařízení a pracovních podmínek,

— eluční křivky,

— množství zkoušené látky a referenčních látek zavedených do kolony,

— mrtvý čas a způsob jeho měření.

4. **LITERATURA**

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

(2) C. Hansch, 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.*): Dostupné: Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström, K. SundhNygärd. *Chemosphere*, 1980, 80, 683.

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

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

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

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

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

(10) O. Jubermann. Verteilen und Extrahieren. *V*: Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumspraxis (*ed.* E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223–339.

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

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

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

(14) NF T 20043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use – Determination of partition coefficient – Flask shaking method.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Doplněk 1

Metody výpočtu nebo odhadu

ÚVOD

Obecný úvod do výpočtových metod, data a příklady jsou uvedeny v příručce *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (a).

Vypočtené hodnoty $P_{o/v}$ lze použít

— k rozhodnutí, která z experimentálních metod je vhodná (rozsah u třepací lahve: log $P_{o/v}$: −2 až 4, rozsah u HPLC: log $P_{o/v}$: 0 až 6),

— k volbě vhodných zkušebních podmínek (např. referenčních látek pro postupy HPLC, poměr objemů noktanol/voda pro metodu třepací lahve),

— jako vnitřní laboratorní kontrolu možných experimentálních chyb,

— k získání odhadu $P_{o/v}$ v případech, kdy zkušební metody nelze z technických důvodů použít.

METODA ODHADU

Předběžný odhad rozdělovacího koeficientu

Hodnotu rozdělovacího koeficientu je možné odhadnout s použitím rozpustnosti zkoušené látky v čistých rozpouštědlech:

Pro tento případ platí:

$$P_{Odhad} = \frac{\text{nasycení}_{\text{oktan-1-ol}}}{\text{nasycení}_{\text{voda}}}$$

VÝPOČTOVÉ METODY

Podstata výpočtových metod

Všechny výpočtové metody jsou založeny na formálním dělení molekul do vhodných podstruktur, pro něž jsou známy spolehlivé hodnoty přírůstků log $P_{o/v}$. Hodnota log $P_{o/v}$ celé molekuly se poté vypočte jako součet hodnot pro příslušné fragmenty plus součet korekčních členů pro intramolekulární interakce.

Existují seznamy konstant fragmentů a korekčních členů (b, c, d, e). Některé se pravidelně aktualizují (b).

Kritéria jakosti

Spolehlivost výpočtové metody obecně klesá s rostoucí složitostí zkoumané sloučeniny. V případě jednoduchých molekul s nízkou molekulovou hmotností a jednou nebo dvěma funkčními skupinami lze očekávat, že odchylky hodnot log $P_{o/v}$ získaných různými fragmentačními metodami od naměřené hodnoty budou v rozmezí od 0,1 do 0,3. U složitějších molekul může být rozpětí chyby větší. Závisí to na spolehlivosti a dostupnosti konstant pro fragmenty a rovněž na schopnosti zjistit intramolekulární interakce (např. vodíkové vazby) a na správném používání korekčních členů (což není obtížné při použití počítačového programu CLOGP3) (b). V případě disociujících látek je důležité správně zohlednit náboj nebo stupeň disociace.

Postupy výpočtu

Hanschova πmetoda

Původní konstanta hydrofobnosti substituentu π zavedená Fujitou *et al.* (f) je definována jako

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

kde $P_{o/v}$ (PhX) je rozdělovací koeficient aromatického derivátu a $P_{o/v}$ (PhH) rozdělovací koeficient výchozí sloučeniny

$$(\text{např. } \pi_{Cl} = \log P_{o/v}\,(C_6H_5Cl) - \log P_{o/v}\,(C_6H_6)$$

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

Ze své definice je πmetoda použitelná především u aromatických substituentů. Hodnoty π byly pro velký počet substituentů uspořádány do tabulek (b, c, d). Používají se k výpočtu log $P_{o/v}$ aromatických molekul nebo substruktur.

Rekkerova metoda

Podle Rekkera (g) se hodnota log $P_{o/v}$ vypočte takto:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_i (\text{interakční člen})$$

kde f_i představuje konstanty různých molekulárních fragmentů a a_i četnost jejich výskytu ve vyšetřované molekule. Korekční členy je možné vyjádřit jako souhrnný násobek jediné konstanty C_m (tzv. „magické konstanty"). Konstanty pro molekulární fragmenty f_i a C_m byly stanoveny ze seznamu 1 054 experimentálních hodnot $P_{o/v}$ (pro 825 sloučenin) pomocí vícenásobné regresní analýzy (c, h). Interakční členy se určí podle stanovených pravidel popsaných v literatuře (e, h, i).

Hanschova-Leova metoda

Podle Hansche a Lea (c) se hodnota log $P_{o/v}$ vypočte z výrazu:

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

kde f_i představuje konstanty různých molekulárních fragmentů, F_j korekční členy a a_i, b_j odpovídající četnosti výskytů. Na základě experimentálních hodnot $P_{o/v}$ byl pokusně sestaven seznam hodnot pro atomové a skupinové fragmenty a seznam korekčních členů F_j (tzv. „faktorů"). Korekční členy byly setříděny do několika různých tříd (a, c). Zohlednění všech pravidel a korekčních členů je poměrně složité a časově náročné. Byly vyvinuty sady softwaru (b).

Kombinovaná metoda

Výpočet log $P_{o/v}$ složitých molekul lze značně zdokonalit, jestliže se molekula rozdělí do větších podstruktur, pro něž existují spolehlivé hodnoty pocházející buď z tabulek (b, c), nebo z vlastních měření. Tyto fragmenty (např. heterocykly, antrachinon, azobenzen) lze poté kombinovat s Hanschovými π-hodnotami nebo s Rekkerovými nebo Leovými konstantami pro fragmenty.

Poznámky

i) Výpočetní metody lze použít pro částečně nebo úplně disociované sloučeniny pouze tehdy, lzeli vzít v úvahu nezbytné korekční faktory.

ii) Pokud lze předpokládat přítomnost intramolekulárních vodíkových vazeb, je nutné přičíst odpovídající korekční členy (přibližně 0,6 až 1,0 logaritmu $P_{o/v}$) (a). O přítomnosti těchto vazeb lze usuzovat z prostorových modelů nebo ze spektroskopických dat molekuly.

iii) Může-li existovat několik tautomerních forem, měla by být jako základ pro výpočet použita nejpravděpodobnější forma.

iv) Pečlivě by měly být sledovány přepracované seznamy konstant fragmentů.

Protokol o zkoušce

Při použití výpočtové metody nebo metody odhadu by měl protokol o zkoušce pokud možno obsahovat tyto údaje:

— popis látky (směs, nečistoty atd.),

— známky přítomnosti intramolekulárních vodíkových vazeb, disociace, nábojů a dalších neobvyklých efektů (např. tautomerie),

— popis výpočtové metody,

— označení nebo uvedení databáze,

— zvláštnosti při volbě fragmentů,

— vyčerpávající dokumentaci výpočtů.

LITERATURA

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

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

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

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

(e) R. F. Rekker, H. M. de Kort. *Eur. S. Med. Chem. – Chim. Ther.* 1979, 14, 479.

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

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

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

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

Doplněk 2

Doporučené referenční látky pro metodu HPLC

Číslo	Referenční látka	log $P_{o/v}$	pK_a
1	butan2on	0,3	
2	4acetylpyridin	0,5	
3	anilin	0,9	
4	acetanilid	1,0	
5	benzylalkohol	1,1	
6	4-methoxyfenol	1,3	pK_a = 10,26
7	kyselina fenoxyoctová	1,4	pK_a = 3,12
8	fenol	1,5	pK_a = 9,92
9	2,4dinitrofenol	1,5	pK_a = 3,96
10	benzonitril	1,6	
11	fenylacetonitril	1,6	
12	4methylbenzylalkohol	1,6	
13	acetofenon	1,7	
14	2nitrofenol	1,8	pK_a = 7,17
15	kyselina 3nitrobenzoová	1,8	pK_a = 3,47
16	4chloranilin	1,8	pK_a = 4,15
17	nitrobenzen	1,9	
18	3fenylpropan2ol	1,9	
19	kyselina benzoová	1,9	pK_a = 4,19
20	*p*kresol	1,9	pK_a = 10,17
21	kyselina skořicová	2,1	pK_a = 3,89 cis 4,44 trans
22	anisol	2,1	
23	methylbenzoát	2,1	
24	benzen	2,1	
25	kyselina 3methylbenzoová	2,4	pK_a = 4,27
26	4chlorfenol	2,4	pK_a = 9,1
27	trichlorethylen	2,4	
28	atrazin	2,6	
29	ethylbenzoát	2,6	
30	2,6dichlorbenzonitril	2,6	
31	kyselina 3chlorbenzoová	2,7	pK_a = 3,82
32	toluen	2,7	
33	naftalen1ol	2,7	pK_a = 9,34
34	2,3dichloranilin	2,8	
35	chlorbenzen	2,8	
36	allylfenylether	2,9	
37	brombenzen	3,0	
38	ethylbenzen	3,2	
39	benzofenon	3,2	
40	4fenylfenol	3,2	pK_a = 9,54
41	thymol	3,3	
42	1,4dichlorbenzen	3,4	
43	difenylamin	3,4	pK_a = 0,79
44	naftalen	3,6	
45	fenylbenzoát	3,6	
46	isopropylbenzen	3,7	
47	2,4,6trichlorfenol	3,7	pK_a = 6
48	bifenyl	4,0	
49	benzylbenzoát	4,0	
50	2,4dinitro6*sek*butylfenol	4,1	
51	1,2,4trichlorbenzen	4,2	
52	kyselina dodekanová	4,2	
53	difenylether	4,2	
54	*n*butylbenzen	4,5	
55	fenanthren	4,5	
56	fluoranthen	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6difenylpyridin	4,9	
59	trifenylamin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Jiné referenční látkys nízkou hodnotou log $P_{o/v}$		
1	kyselina nikotinová	–0,07	

A.9 BOD VZPLANUTÍ

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o hořlavosti látky. Zkušební postup je použitelný pro kapaliny, jejichž páry lze zapálit zdroji zapálení. Zkušební metody uvedené v tomto textu jsou spolehlivé pouze v rozsahu bodu vzplanutí, který je specifikován v jednotlivých metodách.

Při výběru metody, která má být použita, by mělo být zváženo, zda nemůže dojít k chemických reakcím mezi látkou a zkušebním kelímkem.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod vzplanutí je nejnižší teplota přepočtená k tlaku 101,325 kPa, při které kapalina uvolňuje za podmínek definovaných ve zkušební metodě páry v takovém množství, že se z nich ve zkušební nádobce vytvoří hořlavá směs se vzduchem.

Jednotky teploty:

$t = T - 273{,}15$

(*t* je ve °C a *T* je v K).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METODY

Látka se vpraví do zkušební nádobky, ve které je zahřívána nebo chlazena na zkušební teplotu podle postupu popsaného v dané zkušební metodě. Zkoušky vzplanutí se provádějí za účelem zjištění, zda vzorek vzplane či nevzplane při zkušební teplotě.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

1.5.1 **Opakovatelnost**

Opakovatelnost se mění v závislosti na rozpětí bodu vzplanutí a použité zkušební metodě; maximální tolerance je 2 °C.

1.5.2 **Citlivost**

Citlivost závisí na použité zkušební metodě.

1.5.3 **Specifičnost**

Specifičnost některých metod je omezena na určitý rozsah bodu vzplanutí a závisí na vlastnostech látky (např. na vysoké viskozitě).

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

Vzorek zkoušené látky se vloží do zkušebního zařízení podle bodů 1.6.3.1 a/nebo 1.6.3.2.

Kvůli bezpečnosti se doporučuje, aby byla v případě toxických látek nebo látek s vysokým energetickým potenciálem použita metoda, při níž se pracuje s malým množství vzorku, přibližně 2 cm^3.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Je-li to v souladu s podmínkami bezpečnosti, umístí se zkušební zařízení na místo, kde nedochází k nadměrnému proudění vzduchu.

1.6.3 **Provedení zkoušky**

1.6.3.1 *Rovnovážná metoda*

Viz ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2 *Nerovnovážná metoda*

Zkušební zařízení podle Abela:

Viz BS 2000 – část 170, NF M 07-011, NF T 66-009.

Zkušební zařízení podle AbelaPenskyho:

Viz EN 57, DIN 51755 – část 1 (pro teploty od 5 do 65 °C), DIN 51755 – část 2 (pro teploty pod 5 °C), NF M 07-036.

Zkušební zařízení TAG:

Viz ASTM D 56.

Zkušební zařízení podle PenskyhoMartense:

Viz ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 a NF M 07-019.

Poznámky:

Pokud se hodnota bodu vzplanutí stanovená nerovnovážnou metodou podle bodu 1.6.3.2 nachází v rozmezí 0 ±2 °C, 21 ±2 °C nebo 55 ±2 °C, měla by být potvrzena rovnovážnou metodou pomocí stejného zkušebního zařízení.

Pro oznámení mohou být použity pouze ty metody, kterými lze bod vzplanutí stanovit.

Ke stanovení bodu vzplanutí viskózních kapalin obsahujících rozpouštědla (barvy, lepidla apod.) mohou být použity pouze zkušební zařízení a zkušební metody vhodné pro stanovení bodu vzplanutí viskózních kapalin.

Viz ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 a DIN 53213 – část 1.

2. **DATA**

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— odkaz na použitou metodu a na všechny případné odchylky,

— výsledky a všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

Není uvedena.

A.10 HOŘLAVOST (PEVNÉ LÁTKY)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o možných výbušných vlastnostech látky.

Tato zkouška by měla být použita pouze pro práškové, zrnité nebo pastovité látky.

Aby se mezi vysoce hořlavé látky nezahrnovaly všechny látky, které lze zapálit, nýbrž pouze ty, které hoří rychle nebo jejichž chování je při hoření nějakým způsobem zvláště nebezpečné, jsou za vysoce hořlavé považovány jen ty látky, u nichž rychlost hoření překročí určitou mezní hodnotu.

Zvláště nebezpečné může být hoření doutnáním, šíří-li se kovovým prachem, a to pro jeho obtížné hašení. Kovové prachy se považují za vysoce hořlavé, pokud podporují šíření doutnáním celou hmotou za specifikovanou dobu.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Doba hoření se vyjadřuje v sekundách.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Látka se zformuje do tvaru neporušeného pásku nebo prachové housenky o délce přibližně 250 mm a provede se předběžná screeningová zkouška s cílem stanovit, zda nastane po zapálení plamenem plynového hořáku šíření plamenem nebo doutnáním. Pokud se hoření za předepsanou dobu rozšíří na více než 200 mm délky prachové housenky, provede se úplná zkouška pro stanovení rychlosti hoření.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Předběžná screeningová zkouška**

Látka se na nehořlavé, neporézní a málo tepelně vodivé podkladové desce zformuje do tvaru neporušeného pásku nebo prachové housenky o délce přibližně 250 mm, šířce 20 mm a výšce 10 mm.

Na jeden konec prachové housenky se působí plamenem plynového hořáku (o minimálním průměru 5 mm), dokud se prach nevznítí, nebo maximálně 2 min (5 min u prachů kovů nebo kovových slitin). Zjišťuje se, zda se hoření rozšíří na 200 mm délky prachové housenky v průběhu zkušební doby 4 min (nebo 40 min u kovových prachů). Jestliže se látka nevznítí a hoření se buď plamenem, nebo doutnáním nerozšíří na 200 mm délky prachové housenky do zkušební doby 4 min (nebo 40 min u kovových prachů), nepovažuje se látka za vysoce hořlavou a další zkouška se nepožaduje. Jestliže se látka zapálí a hoření se rozšíří plamenem na 200 mm délky prachové housenky za zkušební dobu méně než 4 min nebo 40 min u kovových prachů, provede se postup uvedený níže (bod 1.6.2 dále).

1.6.2 **Zkouška rychlosti hoření**

1.6.2.1 *Příprava*

Práškovité nebo zrnité látky se volně nasypou do formy s trojúhelníkovým příčným průřezem o délce 250 mm o vnitřní výšce 10 mm a šířce 20 mm. Na obě podélné strany formy se upevní 2 kovové desky se základnou jako bočnice, které přečnívají o 2 mm nad horní okraj trojúhelníkové formy (obrázek). Forma se poté třikrát spustí z výšky 2 cm na pevný povrch. Podle potřeby se forma doplní. Bočnice se sejmou a přebytek látky se seškrábne. Na horní část formy se položí nehořlavá, neporézní a málo tepelně vodivá deska, sestava se převrátí a forma se odstraní.

Pastovité látky se rozetřou na nehořlavou, neporézní a málo tepelně vodivou desku do tvaru provazce o délce 250 mm a příčném průřezu přibližně 1 cm^2.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

V případě látky, která je citlivá na vlhkost, se zkouška provede co nejrychleji po vyjmutí látky z nádoby.

1.6.2.3 *Provedení zkoušky*

Zformovaný vzorek se umístí v digestoři kolmo na směr odtahu.

Rychlost proudění odsávaného vzduchu by měla stačit k zamezení úniku dýmu do laboratoře a neměla by se v průběhu zkoušky měnit. Kolem zkušebního zařízení se postaví ochranné clony proti nadměrnému proudění vzduchu.

K zapálení zformovaného zkoušeného vzorku na jeho jednom konci se použije plamen plynového hořáku o průměru minimálně 5 mm. Po vyhoření 80 mm délky zformovaného zkoušeného vzorku se měří rychlost hoření na dalších 100 mm. Zkouška se provede šestkrát, vždy s pomocí čisté a vychladlé desky, pokud není pozorován pozitivní výsledek dříve.

2. **DATA**

Pro vyhodnocení jsou důležité doba hoření z předběžné screeningové zkoušky (1.6.1) a nejkratší doba hoření ze šesti zkoušek (1.6.2.3).

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— popis zkoušené látky, její fyzikální stav, včetně obsahu vlhkosti,

— výsledky předběžné screeningové zkoušky a zkoušky rychlosti hoření, je-li provedena,

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Práškovité, zrnité nebo pastovité látky se považují za vysoce hořlavé, je-li doba hoření v každé zkoušce provedené podle zkušebního postupu popsaného v bodě 1.6.2 menší než 45 s. Prach kovů nebo kovových slitin se považuje za vysoce hořlavý, pokud jej lze zapálit a plamen nebo reakční zóna se rozšíří po celém zkoušeném vzorku za 10 min nebo za kratší dobu.

4. **LITERATURA**

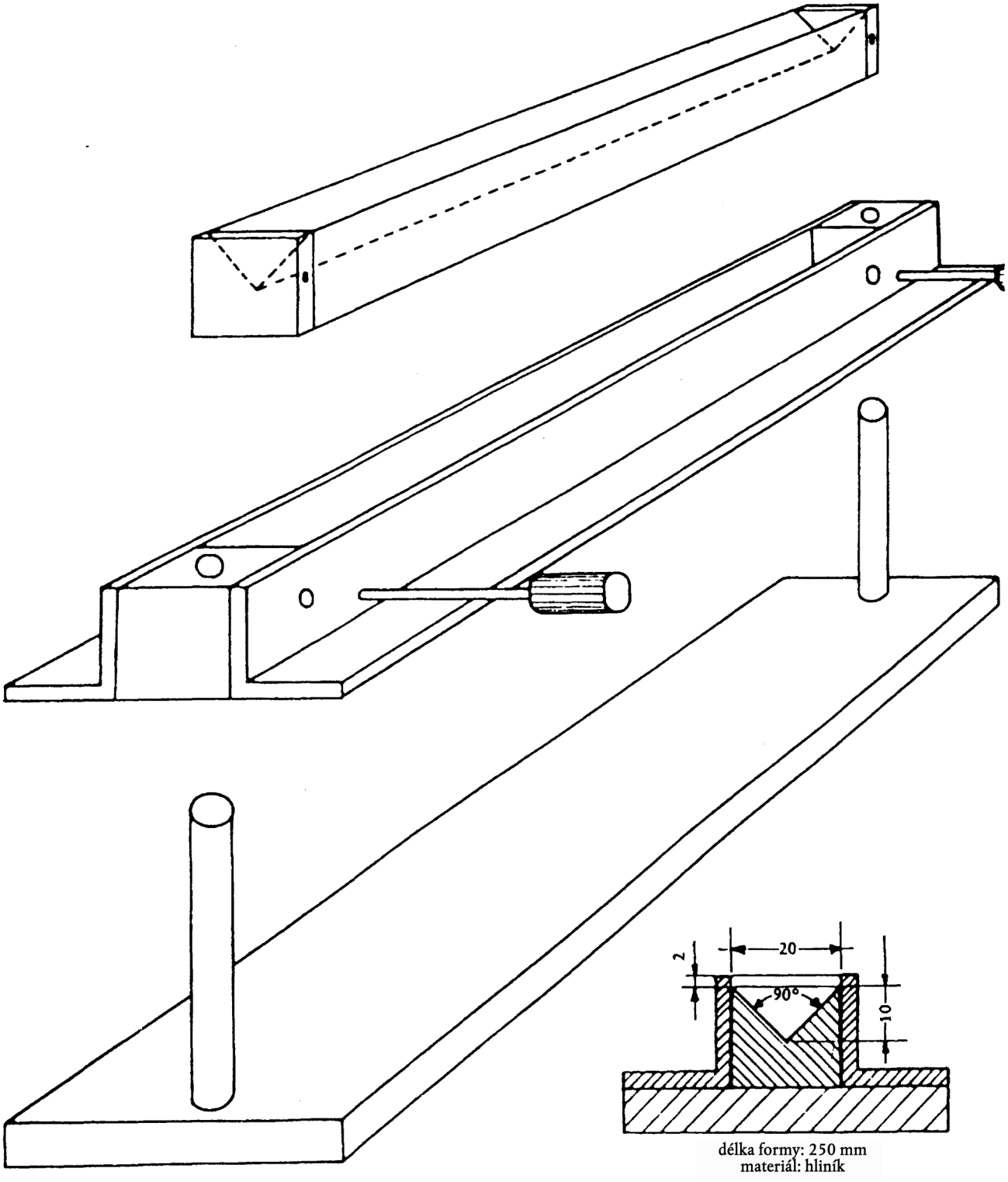
(1) NF T 20042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

Doplněk

Obrázek

Forma a příslušenství pro přípravu zkoušeného vzorku

(Všechny rozměry jsou v milimetrech)



A.11 HOŘLAVOST PLYNŮ

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Tato metoda umožňuje stanovit, zda jsou plyny ve směsi se vzduchem při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) a atmosférickém tlaku hořlavé, a jsouli hořlavé, v jakém rozmezí koncentrací. Směsi se vzduchem, u nichž se postupně zvyšuje koncentrace zkušebního plynu, jsou zapalovány elektrickou jiskrou a sleduje se, zda dojde k zapálení.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Oblast hořlavosti je rozpětí koncentrace mezi dolní a horní mezí výbušnosti. Dolní a horní meze výbušnosti jsou takové mezní koncentrace hořlavého plynu ve směsi se vzduchem, za nimiž nedojde k šíření plamene.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Koncentrace plynu ve vzduchu je postupně zvyšována a v každém stupni se směs zapaluje elektrickou jiskrou.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

Zkušební nádobu tvoří svislý skleněný válec s vnitřním průměrem nejméně 50 mm a výškou nejméně 300 mm. Zapalovací elektrody jsou od sebe vzdáleny 3 až 5 mm a jsou umístěny ve výšce 60 mm nad dnem válce. Válec je opatřen přetlakovou bezpečnostní pojistkou. Aparatura musí být opatřena krytem, aby se zamezilo jakémukoli poškození výbuchem.

Jako zdroj zapálení se používá statický indukční výboj trvající 0,5 s generovaný vysokonapěťovým transformátorem o výstupním napětí od 10 kV do 15 kV (maximální příkon je 300 W). Příklad vhodné aparatury je popsán v literatuře (2).

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Zkouška musí být provedena při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.3 **Provedení zkoušky**

Pomocí dávkovacích čerpadel se do skleněného válce vhání směs plynu se vzduchem o známé koncentraci. Vyvolá se jiskra a sleduje se, zda se plamen oddělí od zdroje zapálení a zda se samovolně šíří. Koncentrace plynu se postupně zvyšuje o 1 %, dokud nedojde k výše popsanému zapálení.

Jestliže z chemické struktury plynu vyplývá, že by mohl být nehořlavý, a lze-li vypočítat stechiometrické složení směsi se vzduchem, postačuje zkoušet směsi pouze v rozmezí od koncentrace o 10 % nižší, než je stechiometrické složení, do koncentrace o 10 % vyšší, než je stechiometrické složení, a to postupně po 1 %.

2. **DATA**

Výskyt šíření plamene je jediná relevantní informace pro stanovení této vlastnosti.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— popis použité aparatury s rozměry,

— teplota, při které byla zkouška provedena,

— zkušební koncentrace a získané výsledky,

— výsledek zkoušky: nehořlavý plyn nebo vysoce hořlavý plyn,

— jestliže byl učiněn závěr, že je plyn nehořlavý, uvede se koncentrační rozpětí, které bylo zkoušeno v krocích po 1 %,

— musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

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

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. GrosseWortmann, T. Redeker, H. Schacke. Entwicklung einer StandardApparatur zur Messung von Explosionsgrenzen. *Chem.Ing.Tech*. 1984, 56, 2, 126–127.

A.12 HOŘLAVOST (PŘI STYKU S VODOU)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Tuto zkušební metodu lze použít pro zjištění, zda reakce látky s vodou nebo vzdušnou vlhkostí vede k vývinu nebezpečného množství plynu nebo plynů, které mohou být vysoce hořlavé.

Tuto zkušební metodu lze použít pro pevné látky a pro kapaliny. Nelze ji použít pro látky, které se spontánně vznítí ve styku se vzduchem.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Vysoce hořlavé látky: látky, které při kontaktu s vodou nebo vzdušnou vlhkostí uvolňují vysoce hořlavé plyny v nebezpečném množství rychlostí nejméně 1 litr na kg látky za hodinu.

1.3 PODSTATA METODY

Látka je zkoušena postupně, jak je uvedeno níže; dojdeli v některém stupni ke vznícení, není další zkoušení potřebné. Je-li známo, že látka s vodou nereaguje prudce, pokračuje se čtvrtým stupněm (bod 1.3.4).

1.3.1 **Stupeň 1**

Zkoušená látka se vnese do vaničky s destilovanou vodou o teplotě 20 °C a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli.

1.3.2 **Stupeň 2**

Zkoušená látka se položí na filtrační papír plovoucí v misce s destilovanou vodou o teplotě 20 °C na vodní hladině a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli. Filtrační papír slouží pouze k tomu, aby byla látka položena na jedno místo a tím se zvýšila možnost vznícení.

1.3.3 **Stupeň 3**

Zkoušená látka se zformuje do tvaru hranice o výšce přibližně 2 cm a průměru 3 cm. Přidá se do ní několik kapek vody a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli.

1.3.4 **Stupeň 4**

Zkoušená látka se smíchá s destilovanou vodou o teplotě 20 °C a v jednohodinových intervalech se měří rychlost vývinu plynu po dobu 7 hodin. Je-li po sedmi hodinách rychlost vývinu plynu nepravidelná nebo narůstá, doba měření by se měla prodloužit na maximálně pět dnů. Zkoušku lze přerušit, jestliže rychlost vývinu plynu v průběhu měření převýší 1 litr na kg látky za hodinu.

1.4 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METOD

1.6.1 **Stupeň 1**

1.6.1.1 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.1.2 *Provedení zkoušky*

Malé množství zkoušené látky (přibližně o průměru 2 mm) se vnese do misky s destilovanou vodou. Sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojdeli ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

1.6.2 **Stupeň 2**

1.6.2.1 *Aparatura*

Ve vhodné nádobě, např. v odpařovací misce o průměru přibližně 100 mm se na hladinu destilované vody umístí filtrační papír.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.2.3 *Provedení zkoušky*

Malé množství zkoušené látky (přibližně o průměru 2 mm) se umístí do středu filtračního papíru. Sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojdeli ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

1.6.3 **Stupeň 3**

1.6.3.1 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.3.2 *Provedení zkoušky*

Zkoušená látka se zformuje do tvaru hranice o výšce přibližně 2 cm a průměru 3 cm s jamkou v horní části. Do jamky se přidá několik kapek vody a sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojdeli ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

1.6.4 **Stupeň 4**

1.6.4.1 *Aparatura*

Aparatura se sestaví způsobem uvedeným na obrázku.

1.6.4.2 *Zkušební podmínky*

Nádoba se zkoušenou látkou se prohlédne, zda neobsahuje prach o velikosti částic <500 μm. Tvoří-li prach více než 1 % hmot. celkového množství nebo drobí-li se vzorek, veškerá látka se před zkoušením rozemele na prach, aby se zmenšila velikost částic během skladování a manipulace; v opačném případě se látka zkouší v původním stavu. Zkouška by měla být provedena při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) a atmosférickém tlaku.

1.6.4.3 *Provedení zkoušky*

Přikapávací nálevka aparatury se naplní 10 až 20 ml vody a do Erlenmeyerovy baňky se vpraví 10 g látky. Objem uvolňovaného plynu se měří jakýmkoli vhodným způsobem. Kohout přikapávací nálevky se otevře, aby voda natekla do Erlenmeyerovy baňky, a současně se spustí stopky. Objem vzniklého plynu se měří každou hodinu po dobu sedmi hodin. Je-li vývin plynu během této doby nepravidelný nebo narůstáli na konci této doby rychlost vývinu, prodlouží se doba měření na maximálně pět dnů. Překročíli rychlost vývinu plynu v průběhu měření 1 litr na kg látky za hodinu, může být zkouška přerušena. Zkouška se provede třikrát.

Není-li chemická identifikace plynu známa, měl by být analyzován. Obsahuje-li plyn vysoce hořlavé složky a není-li známo, zda není celá směs vysoce hořlavá, připraví se směs stejného složení a provede se zkouška podle metody A.11.

2. **DATA**

Látka se považuje za nebezpečnou, jestliže

— na kterémkoli stupni zkušebního postupu dojde k jejímu samovolnému vznícení,

nebo

— dojde-li k vývinu hořlavého plynu rychlostí vyšší než 1 litr na kg látky za hodinu.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— podrobnosti o jakékoli počáteční přípravě látky,

— výsledky zkoušek (stupně 1, 2, 3 a 4),

— chemická identifikace uvolňovaného plynu,

— rychlost vývinu plynu, pokud se provádí stupeň 4 (1.6.4),

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

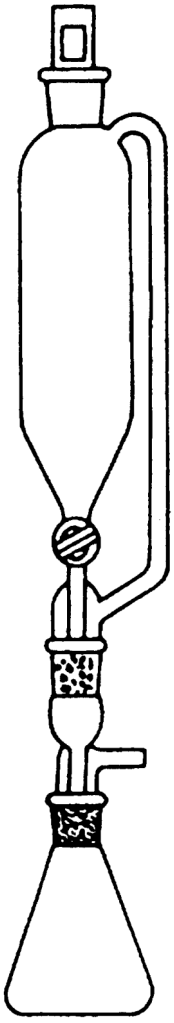
(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) NF T 20040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

Doplněk

Obrázek

Aparatura



A.13 PYROFORICKÉ VLASTNOSTI PEVNÝCH LÁTEK A KAPALIN

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Zkušební postup je použitelný pro pevné látky nebo kapaliny, které se již v malých množstvích samovolně vznítí krátce poté, co při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) přijdou do styku se vzduchem.

Tato metoda se nevztahuje na látky, které se na vzduchu při laboratorní teplotě nebo při zvýšené teplotě vznítí teprve po několika hodinách nebo dnech.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Látky mají pyroforické vlastnosti, pokud se samovolně vznítí nebo vykazují zuhelnatění za podmínek, které jsou popsány v bodě 1.6.

Může být nezbytné provést zkoušku teploty samozápalu podle metody A.15. Bod samozápalu (kapaliny a plyny).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Pevná nebo kapalná látka se nanese na inertní nosič a uvede se při teplotě okolí na dobu pěti minut do styku se vzduchem. Pokud se kapaliny nevznítí, jsou absorbovány do filtračního papíru a vystaví se působení vzduchu po dobu pěti minut při teplotě okolí (přibližně 20 °C). Pokud se pevná látka nebo kapalina vznítí nebo pokud kapalina zapálí či zuhelnatí filtrační papír, považuje se za pyroforickou.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Opakovatelnost: vzhledem k závažnosti z hlediska bezpečnosti stačí jediný pozitivní výsledek k tomu, aby byla látka považována za pyroforickou.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

Porcelánový kelímek o průměru přibližně 10 cm se při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) naplní do výšky asi 5 mm infuzoriovou hlinkou.

Poznámka:

Infuzoriová hlinka nebo jiná srovnatelná běžně dosažitelná inertní látka se považuje za reprezentativní materiál pro zeminu, do které může zkoušená látka proniknout v případě havárie.

Pro zkoušení kapalin, které se při kontaktu se vzduchem na inertním nosiči samovolně nevznítí, se požaduje suchý filtrační papír.

1.6.2 **Provedení zkoušky**

a) *Práškovité pevné látky*

1 až 2 cm^3 práškovité látky, která má být zkoušena, se sype z výšky přibližně 1 m na nehořlavý povrch a sleduje se, zda se látka při pádu nebo v průběhu dalších pěti minut po dopadu vznítí.

Zkouška se provede šestkrát, pokud ke vznícení nedojde dříve.

b) *Kapaliny*

Přibližně 5 cm^3 kapaliny, která má být zkoušena, se nalije do připraveného porcelánového kelímku a sleduje se, zda se v průběhu pěti minut vznítí.

Pokud při 6 zkouškách nedojde ke vznícení, provede se tato zkouška:

0,5 ml zkoušeného vzorku se vpraví pomocí injekční stříkačky na zprohýbaný filtrační papír a sleduje se, zda do 5 min od přidání kapaliny dojde ke vznícení nebo zuhelnatění filtračního papíru. Zkouška se provede třikrát, nedojdeli ke vznícení nebo zuhelnatění dříve.

2. **DATA**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Zkoušky lze přerušit, jakmile je dosaženo pozitivního výsledku v kterékoli zkoušce.

2.2 VYHODNOCENÍ

Jestliže se látka v průběhu 5 min po nanesení na inertní nosič a vystavení působení vzduchu vznítí nebo pokud kapalná látka zuhelnatí či zapálí filtrační papír do pěti minut po nanesení a vystavení vzduchu, považuje se za pyroforickou.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— výsledky zkoušek,

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

(1) NF T 20039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

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

A.14 VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Tato metoda umožňuje stanovit, zda u pevné nebo pastovité látky existuje nebezpečí výbuchu, je-li podrobena působení plamene (citlivost na působení tepla), nárazu nebo tření (citlivost na mechanické podněty), a zda u kapalné látky existuje nebezpečí výbuchu, je-li podrobena působení plamene nebo nárazu.

Metoda sestává ze tří částí:

a) zkouška citlivosti na působení tepla (1);

b) zkouška mechanické citlivosti na náraz (1);

c) zkouška mechanické citlivosti na tření (1).

Metoda poskytuje data pro stanovení pravděpodobnosti vyvolání výbuchu určitými běžnými podněty. Metoda neslouží ke zjištění, zda je látka schopna vybuchnout za jakýchkoli podmínek.

Metoda je vhodná pro zjištění, zda u látky existuje nebezpečí výbuchu (citlivost na působení tepla a mechanická citlivost) za určitých podmínek specifikovaných ve směrnici. Je založena na řadě typů zařízení, která jsou široce používána v mezinárodním měřítku (1) a která obvykle poskytují vypovídající výsledky. Připouští se, že tato metoda není definitivní. Lze použít jiné než specifikované zařízení, za předpokladu, že je mezinárodně uznané a že lze výsledky vhodným způsobem srovnat s výsledky poskytnutými specifikovaným zařízením.

Zkouška nemusí být provedena, jestliže z dostupných termodynamických informací (např. ze slučovacího tepla nebo disociačního tepla) a/nebo z nepřítomnosti určitých reakčních skupin (2) ve struktuře s jistotou vyplývá, že látka nemá schopnost rychle se rozkládat za vývoje plynů nebo za uvolňování tepla (tzn. materiál nepředstavuje žádné riziko výbuchu). Zkouška mechanické citlivosti na tření se nevyžaduje u kapalin.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Výbušná látka:

Látka, která může vybuchnout působením plamene nebo která je citlivá na náraz nebo tření ve specifikovaném zařízení (nebo je mechanicky citlivější než 1,3dinitrobenzen v alternativním zařízení).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

1,3Dinitrobenzen, technický krystalický výrobek, prosátý na sítu o velikosti oka 0,5 mm, pro metody citlivosti na tření a na náraz.

Perhydro1,3,5trinitro1,3,5triazin (označovaný jako RDX nebo hexogen nebo cyklonit – CAS 121824) rekrystalizovaný z vodného cyklohexanonu, prosátý za mokra na sítě 250 μm a zachycený na sítě 150 μm, sušený 4 h při 103 ±2 °C, pro druhou sérii zkoušek citlivosti na tření a na náraz.

1.4 PODSTATA METODY

Pro zjištění bezpečných podmínek pro provedení tří zkoušek citlivosti jsou nezbytné předběžné zkoušky.

1.4.1 **Zkoušky bezpečného zacházení** (3)

Z bezpečnostních důvodů se před provedením hlavních zkoušek podrobí velmi malé neuzavřené vzorky látky (přibližně 10 mg) zahřívání v plameni plynového hořáku, nárazu v jakémkoli vhodném zařízení a tření za použití paličky proti podložce nebo jiného zařízení pro zkoušení citlivosti na tření. Účelem předběžných zkoušek je zjistit, zda je látka tak citlivá a výbušná, že by měly být předepsané zkoušky citlivosti, zvláště zkouška citlivosti na působení tepla, prováděny za zvláštních bezpečnostních opatření, aby nedošlo k poranění osoby provádějící zkoušky.

1.4.2 **Citlivost na působení tepla**

Metoda spočívá v zahřívání látky v ocelové trubce uzavřené clonami s různými průměry otvorů s cílem zjistit, zda může za podmínek intenzivního zahřívání a při definovaném utěsnění vybuchnout.

1.4.3 **Mechanická citlivost (na náraz)**

Metoda spočívá ve vystavení látky nárazu specifikovaným závažím puštěným ze specifikované výšky.

1.4.4 **Mechanická citlivost (na tření)**

Metoda spočívá ve vystavení pevných nebo pastovitých látek tření mezi standardními povrchy za specifikovaných podmínek zatížení a vzájemného pohybu.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METOD

1.6.1 **Citlivost na působení tepla (na působení plamene)**

1.6.1.1 *Zařízení*

Zařízení je tvořeno ocelovou trubkou na jedno použití s opakovaně použitelným uzavíracím zařízením (obrázek 1), instalovanou v ohřívacím a ochranném zařízení. Každá trubka je hlubokotažená z ocelového plechu (viz doplněk) a má vnitřní průměr 24 mm, délku 75 mm a tloušťku stěny 0,5 mm. Na otevřeném konci trubky je příruba sloužící k uzavření trubky sestavou clony. Sestava je tvořena clonou se středovým otvorem odolnou vůči tlaku, připevněnou k trubce pomocí dvoudílného šroubového spoje (matice a závitové příruby). Matice a závitová příruba jsou zhotoveny z chrommanganové oceli (viz doplněk), která je do 800 °C nejiskřivá. Clony mají tloušťku 6 mm, jsou vyrobeny ze žáruvzdorné oceli a tvoří řadu podle velikosti otvorů.

1.6.1.2 *Zkušební podmínky*

Látka se obvykle zkouší ve stavu, v jakém byla obdržena, ačkoliv v některých případech, např. je-li lisovaná, litá nebo jiným způsobem zhutněná, může být nezbytné ji před provedením zkoušky rozdrtit.

U pevných látek se hmotnost látky, která má být použita v každé zkoušce, stanoví zkouškou ve dvou etapách. Zvážená trubka se naplní 9 cm^3 látky a látka se po celém průřezu trubky stlačí silou 80 N. Z bezpečnostních důvodů nebo v případech, kdy může stlačováním dojít ke změně fyzikální formy vzorku, lze použít jiný způsob plnění, například je-li látka velmi citlivá na tření, není vhodné ji stlačovat. Je-li látka stlačitelná, přidá se a stlačuje další množství látky, dokud není trubka zaplněna do úrovně 55 mm od horního okraje. Stanoví se celkové množství látky použité pro naplnění do úrovně 55 mm od horního okraje a přidají se další dva podíly látky, přičemž se každý stlačí silou 80 N. Látka se poté podle potřeby buď přidá a stlačí, nebo se odebere tak, aby byla trubka naplněna do úrovně 15 mm od horního okraje. Provede se druhá zkouška, přičemž se začne s třetinou hmotnosti po stlačení zjištěné v první etapě. Přidají se další dva podíly, stlačí se silou 80 N a podle potřeby se látka přidá nebo odebere do úrovně 15 mm od horního okraje trubky. Množství pevné látky zjištěné ve druhé etapě se použije pro každý pokus; naplnění se provede se třemi stejnými množstvími a každé z nich se stlačí na objem 9 cm^3 bez ohledu na potřebnou sílu (pro usnadnění lze k tomuto účelu použít rozpěrné kroužky).

Kapaliny a gely se naplní do trubky do výšky 60 mm, přičemž je třeba věnovat zvláštní pozornost gelům, aby se v nich netvořily dutiny. Na trubku se zdola navleče závitová příruba, vloží se vhodná clona a po nanesení maziva na bázi disulfidu molybdeničitého se matice utáhne. Je důležité se přesvědčit, zda nějaká látka nezůstala zachycena mezi přírubou a clonou nebo v závitech.

K zahřívání se použije propan odebíraný z průmyslové tlakové lahve s regulátorem tlaku (60 až 70 mbar) přes průtokoměr a rovnoměrně rozdělený rozdělovacím potrubím do čtyř hořáků (ověří se vizuálně pozorováním plamenů hořáků). Hořáky se umístí kolem zkušební komory, jak je znázorněno na obrázku 1. Čtyři hořáky mají celkovou spotřebu přibližně asi 3,2 litru propanu za minutu. Lze použít jiné palivo a hořáky, avšak rychlost ohřevu musí být taková, jak je uvedeno na obrázku 3. Rychlost ohřevu se musí u všech zařízení pravidelně kontrolovat za použití trubek naplněných dibutylftalátem, jak je znázorněno na obrázku 3.

1.6.1.3 *Provedení zkoušek*

Každá zkouška se provádí do roztržení trubky nebo dokud doba ohřevu nedosáhne 5 min. Výsledek zkoušky, při níž došlo k roztržení trubky na tři nebo více úlomků, z nichž některé mohou být vzájemně spojeny úzkými proužky kovu, jak je znázorněno na obrázku 2, se hodnotí jako výbuch. Výsledek zkoušky, při níž vzniklo méně úlomků nebo k roztržení nedošlo, se nehodnotí jako výbuch.

Nejprve se provede série tří zkoušek s clonou o průměru otvoru 6,0 mm, a pokud nedojde k výbuchu, provede se druhá série tří zkoušek s clonou o průměru otvoru 2,0 mm. Dojde-li k výbuchu u kterékoli zkušební série, nevyžadují se další zkoušky.

1.6.1.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, dojdeli k výbuchu při jedné z výše uvedených zkušebních sérií.

1.6.2 **Mechanická citlivost (na náraz)**

1.6.2.1 *Zařízení (obrázek 4)*

Základními částmi typických zařízení s padacím kladivem je blok z lité oceli s podstavcem, kovadlina, sloup, vodicí lišty, padací závaží, uvolňovací zařízení a držák vzorku. Ocelová kovadlina o průměru 100 mm a výšce 70 mm je přišroubována k horní straně bloku z lité oceli o délce 230 mm, šířce 250 mm a výšce 200 mm se základovou litinovou deskou o délce 450 mm, šířce 450 mm a výšce 60 mm. Sloup tvořený bezešvou taženou ocelovou trubkou je připevněn držákem přišroubovaným na zadní stranu bloku z lité oceli. Čtyři šrouby ukotvují zařízení k betonovému bloku o rozměrech 60 × 60 × 60 cm takovým způsobem, že jsou vodicí lišty dokonale svislé a padací závaží padá volně. Používá se závaží o hmotnosti 5 a 10 kg z pevné oceli. Úderová hlava každého závaží je z tvrzené oceli HRC 60 až 63 a má minimální průměr 25 mm.

Zkoušený vzorek se uzavře do zkušebního zařízení tvořeného dvěma plnými souosými válci umístěnými nad sebou a vodicím pouzdrem tvořeným dutým ocelovým válcem. Plné ocelové válce o průměru 10 (–0,003, –0,005) mm a výšce 10 mm mají vyleštěné plochy, zakulacené hrany (s poloměrem zakřivení 0,5 mm) a tvrdost HRC 58 až 65. Dutý válec musí mít vnější průměr 16 mm, vyleštěný vyvrtaný otvor o průměru 10 (+0,005, +0,010) mm a výšku 13 mm. Sestavené zkušební zařízení se umístí na výměnnou ocelovou mezipodložku (o průměru 26 mm a výšce 26 mm), která je vystředěna kroužkem s otvory pro odvod dýmů.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

Objem vzorku by měl být 40 mm^3 nebo by měl být vhodný pro alternativní zařízení. Pevné látky se zkoušejí v suchém stavu a připravují se tímto způsobem:

a) práškové látky se prosejí sítem (o velikosti oka 0,5 mm); ke zkoušení se použije veškerý podíl, který projde sítem;

b) lisované, lité nebo jiným způsobem zhutněné látky se rozdrtí na malé kousky a prosejí; ke zkoušení se použije prosátý podíl o velikosti částic od 0,5 do 1 mm, který by měl být reprezentativní pro původní látku.

Látky dodávané obvykle ve formě pasty se zkoušejí pokud možno v suchém stavu nebo po odstranění maximálního možného množství ředidla. Kapalné látky se zkoušejí při mezeře 1 mm mezi horním a dolním ocelovým válcem.

1.6.2.3 *Provedení zkoušek*

Provede se série šesti zkoušek spuštěním závaží o hmotnosti 10 kg z výšky 0,40 m (40 J). Dojdeli během těchto šesti zkoušek při 40 J k výbuchu, musí se provést další série šesti zkoušek spuštěním závaží o hmotnosti 5 kg z výšky 0,15 m (7,5 J). U jiných zařízení se vzorek porovnává se zvolenou referenční látkou za použití stanoveného postupu (např. technikou *upunddown* atd).

1.6.2.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, jestliže dojde k výbuchu (vzplanutí nebo třesk jsou rovnocenné výbuchu) alespoň jednou při kterékoli zkoušce se specifikovaným zařízením nebo je-li vzorek citlivější než 1,3dinitrobenzen nebo RDX v alternativní zkoušce citlivosti na náraz.

1.6.3 **Mechanická citlivost (na tření)**

1.6.3.1 *Zařízení (obrázek 5)*

Třecí zařízení je tvořeno základovou deskou z lité oceli, na které je upevněno třecí zařízení. To je tvořeno nepohyblivým porcelánovým kolíkem a pohyblivou porcelánovou destičkou. Porcelánová destička je upevněna na saních vedených dvěma vodicími lištami. Saně jsou připojeny k elektromotoru ojnicí, excentrickou vačkou a vhodným ozubeným převodem tak, že porcelánová destička vykonává pod porcelánovým kolíkem pohyb tam a zpět na dráze o délce 10 mm. Porcelánový kolík lze zatížit silou buď 120 N, nebo 360 N.

Rovné porcelánové destičky jsou vyrobeny z bílého technického porcelánu (o drsnosti 9 až 32 μm) a mají délku 25 mm, šířku 25 mm a výšku 5 mm. Válcový porcelánový kolík je rovněž vyroben z bílého technického porcelánu, má délku 15 mm, průměr 10 mm a zdrsněné kulové plochy s poloměrem zakřivení 10 mm.

1.6.3.2 *Zkušební podmínky*

Objem vzorku by měl být 10 mm^3 nebo by měl být vhodný pro alternativní zařízení.

Pevné látky se zkoušejí v suchém stavu a připravují se tímto způsobem:

a) práškové látky se prosejí sítem (o velikosti oka 0,5 mm); ke zkoušení se použije veškerý podíl, který projde sítem;

b) lisované, lité nebo jiným způsobem zhutněné látky se rozdrtí na malé kousky a prosejí; ke zkoušení se použije prosátý podíl o velikosti částic <0,5 mm.

Látky dodávané obvykle ve formě pasty se zkoušejí pokud možno v suchém stavu. Nelzeli látku připravit v suchém stavu, zkouší se pasta (po odstranění maximálního možného množství ředidla) ve formě proužku o tloušťce 0,5 mm, šířce 2 mm a délce 10 mm připraveného v tvarovací formě.

1.6.3.3 *Provedení zkoušek*

Porcelánový kolík se přiloží na zkoušený vzorek a zatíží se. Při provádění zkoušky musí být rýhy v porcelánové destičce orientovány příčně ke směru pohybu. Je nutné dbát na to, aby kolík spočíval na vzorku, aby pod kolíkem leželo dostatečné množství zkoušeného materiálu a také aby se destička pohybovala pod kolíkem správně. U pastovitých látek se pro nanesení látky na destičku používá měrka o tloušťce 0,5 mm s otvorem 2 × 10 mm. Porcelánová destička se musí pohybovat pod porcelánovým kolíkem po dráze 10 mm tam a zpět za 0,44 s. Každá část povrchu destičky a kolíku se smí použít pouze jednou; dva konce každého kolíku slouží pro dva pokusy a každá ze dvou stran destičky slouží pro tři pokusy.

Série šesti zkoušek se provede se zatížením 360 N. Získá-li se během těchto šesti zkoušek pozitivní výsledek, musí se provést další série šesti zkoušek se zatížením 120 N. U jiných zařízení se vzorek porovnává se zvolenou referenční látkou za použití stanoveného postupu (např. technikou *upunddown* atd).

1.6.3.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, jestliže dojde k výbuchu (praskání, třesk nebo vzplanutí jsou rovnocenné výbuchu) alespoň jednou při kterékoli zkoušce se specifikovaným zařízením pro stanovení citlivosti na tření nebo splňuje-li ekvivalentní kritéria alternativní zkoušky citlivosti na tření.

2. DATA

Látka se v zásadě považuje ve smyslu této směrnice za nebezpečnou z hlediska výbuchu, jestliže jsou získány pozitivní výsledky ve zkoušce citlivosti na působení tepla, ve zkoušce citlivosti na náraz nebo na tření.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— identifikace zkoušené látky, její složení, čistota, obsah vlhkosti atd.,

— fyzikální forma vzorku, zda se vzorek drtil, mlel nebo prosíval,

— údaje zjištěné při zkoušce citlivosti na působení tepla (např. hmotnost vzorku a počet úlomků atd.),

— pozorované jevy při zkoušce mechanické citlivosti (např. tvorba značného množství dýmu nebo úplný rozklad bez třesku, plameny, jiskry, třesk, praskání atd.),

— výsledky každého typu zkoušky,

— byloli použito alternativní zařízení, musí být uvedeno vědecké zdůvodnění použití a důkaz srovnatelnosti výsledků získaných se specifikovaným zařízením a výsledků získaných s rovnocenným zařízením,

— všechny užitečné poznámky, například odkaz na zkoušky podobných látek, které by mohly mít význam pro správné hodnocení výsledků,

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

V protokolu o zkoušce by měly být uvedeny všechny výsledky, které jsou považovány za chybné, anomální nebo nereprezentativní. Máli být kterýkoli z těchto výsledků vyloučen, mělo by být uvedeno vysvětlení a výsledky jakéhokoli alternativního nebo doplňkového zkoušení. Pokud nelze anomální výsledek vysvětlit, musí být přijat tak, jak byl dosažen, a musí být použit k odpovídající klasifikaci látky.

4. **LITERATURA**

(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 ed., Butterworths, London, ISBN 0750601035, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K. H., Sward, K. H. *Explosivstoffe*. 1961, 3, 6-13 a 30–42.

(4) NF T 20-083 (Sept 85). Chemical products for industrial use – Determination of explosion risk.

Doplněk

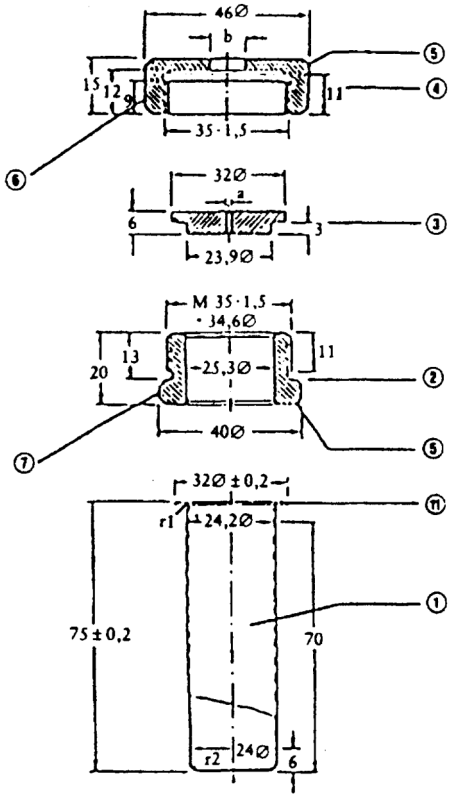
Příklad materiálové specifikace pro zkoušku citlivosti na působení tepla (viz DIN 1623)

1. Trubka: materiálová specifikace č. 1.0336.505 g
2. Clona s otvorem: materiálová specifikace č. 1.4873
3. Závitová příruba a matice: materiálová specifikace č. 1.3817

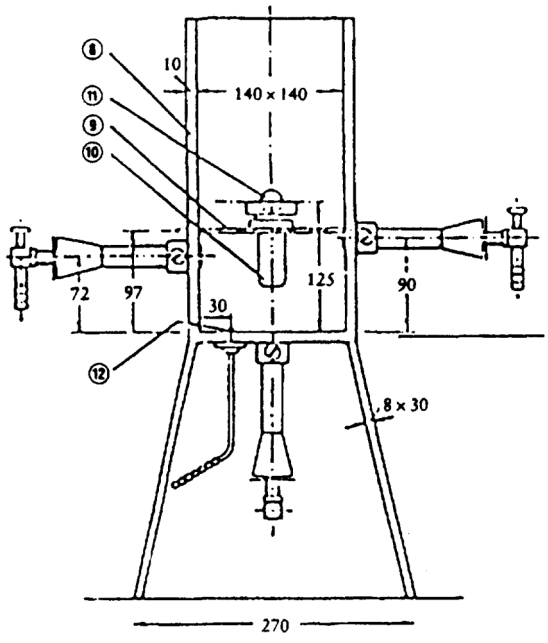
Obrázek 1

Zařízení pro zkoušku citlivosti na působení tepla

(všechny rozměry v mm)



Obr. 1a Ocelová trubka a příslušenství
(1) trubka
(1a) vnější příruba
(2) prstenec se závitem (závit s nízkým třením)
(3) clona s otvorem o průměru a = 2,0 nebo 6,0 mm
(4) matice s otvorem o průměru b = 10 mm
(5) zkosená hrana
(6) 2 rovné plošky pro klíč 41

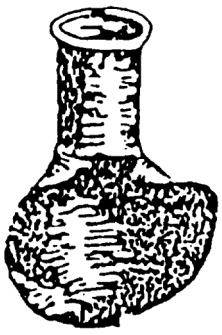


Obr. 1b Ohřívací a ochranné zařízení
(7) 2 rovné plošky pro klíč 36
(8) ochranný kryt odolným vůči střepinám
(9) 2 oporné tyče pro trubku
(10) sestavená trubka
(11) poloha zadního hořáku; ostatní hořáky jsou vidět
(12) zapalovací hořáček

Obrázek 2

Zkouška citlivosti na působení tepla

Příklady roztržení trubky



Nehodnotí se jako výbuch



Nehodnotí se jako výbuch



Výbuch



Výbuch



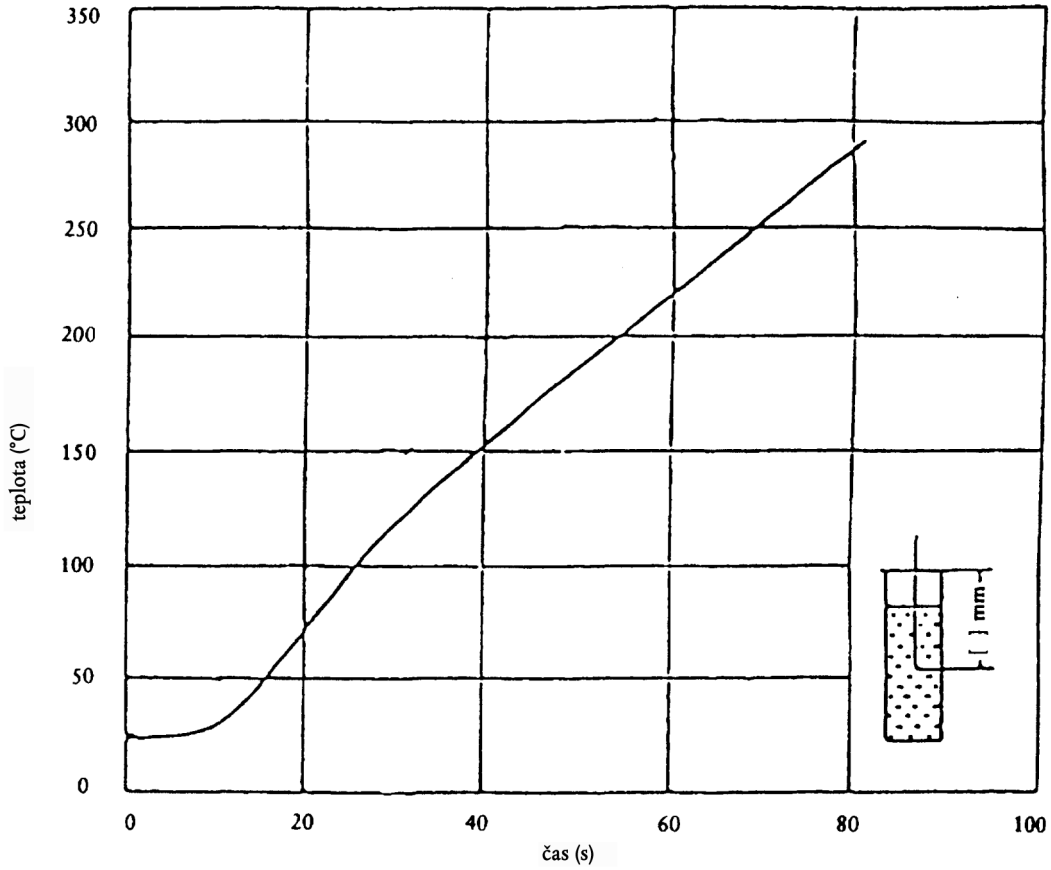
Výbuch



Výbuch

Obrázek 3

Kalibrace rychlosti ohřevu pro zkoušku citlivosti na působení tepla

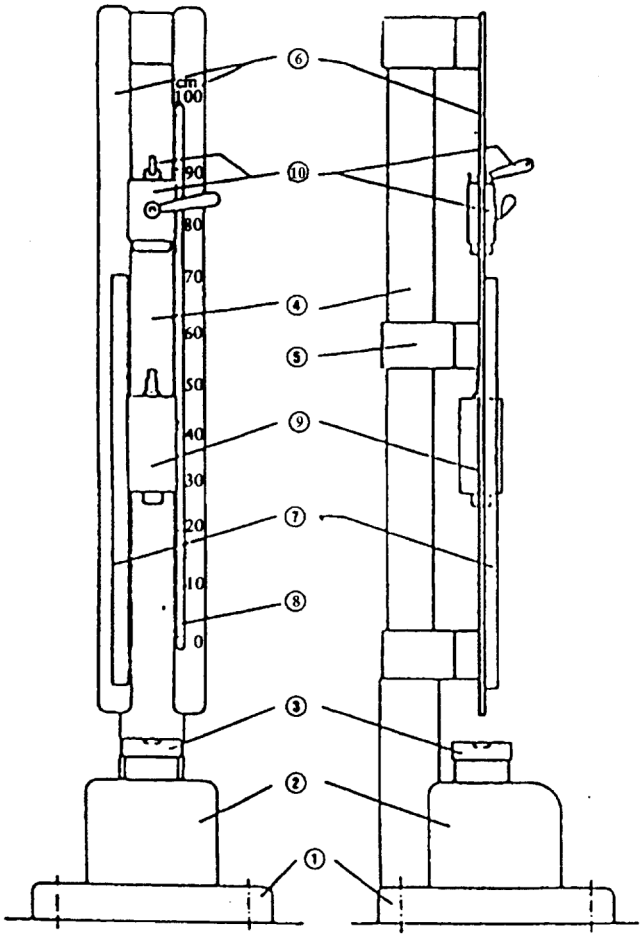


Křivka závislosti teploty na čase získaná při zahřívání dibutyl-ftalátu (27 cm^3) v uzavřené trubce (s clonou 1,5 mm) při průtoku propanu 3,2 litry za minutu. Teplota byla měřena chromel/alumelovým termočlánkem o průměru 1 mm, zapouzdřeným v korozivzdorné oceli a umístěným centrálně 43 mm pod okrajem trubky. Rychlost zahřívání mezi 135 °C a 285 °C by měla být 185 až 215 K/min.

Obrázek 4

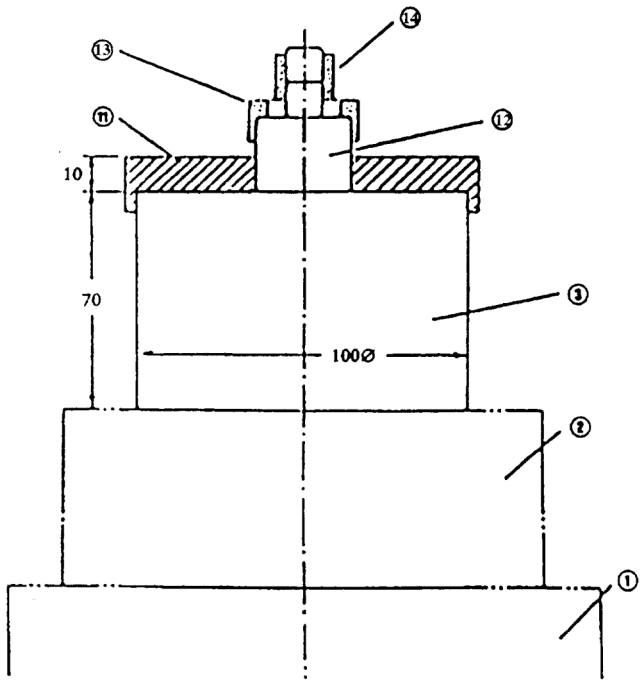
Zařízení pro zkoušku citlivosti na náraz

(všechny rozměry v mm)



Obr. 4a Padací kladivo, čelní a boční celkový pohled

(1) základová deska 450 × 450 × 60
(2) blok z oceli, 230 × 250 × 200
(3) kovadlina, průměr 100 × 70
(4) sloup
(5) střední nosník
(6) dvě vodicí lišty
(7) ozubená tyč

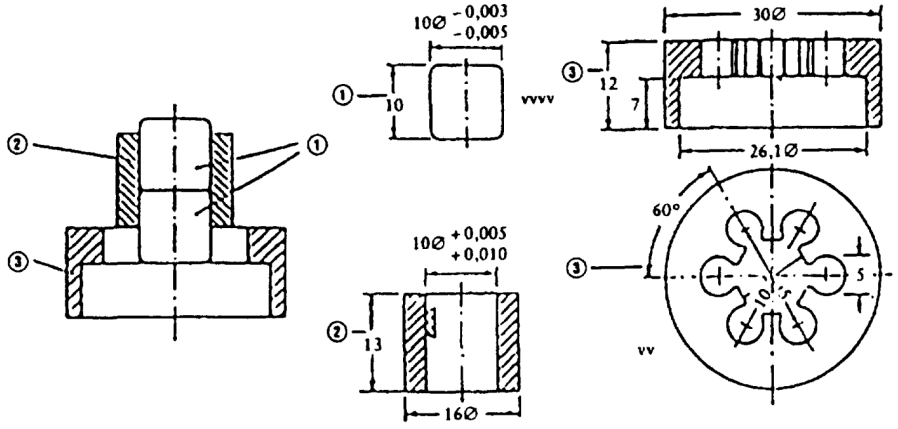


Obr. 4b Padací kladivo, spodní část

(8) měřítko
(9) padací kladivo
(10) zadržovací a uvolňovací zařízení
(11) středicí objímka
(12) (výměnná) mezipodložka o průměru 26 × 26
(13) středicí kroužek s otvory
(14) nárazové zařízení

Obrázek 4

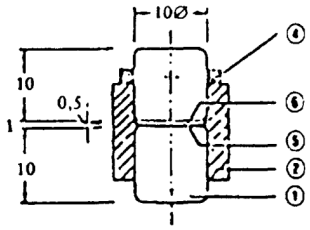
Pokračování

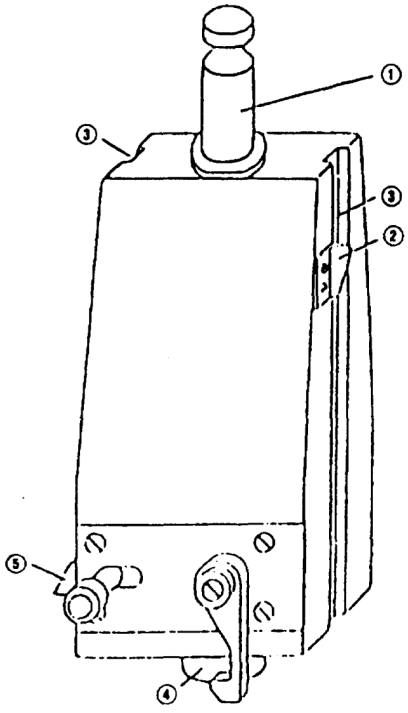


Obr. 4c Zařízení pro zkoušku citlivosti práškových a pastovitých látek na náraz

(1) ocelové válečky
(2) vodicí pouzdro pro ocelové válečky
(3) středicí kroužek s otvory
(a) svislý řez
(b) průmět
(4) pryžový prstenec
(5) kapalná látka (40 mm³)
(6) prostor bez kapaliny

Obr. 4d Zařízení pro zkoušku citlivosti kapalných látek na náraz



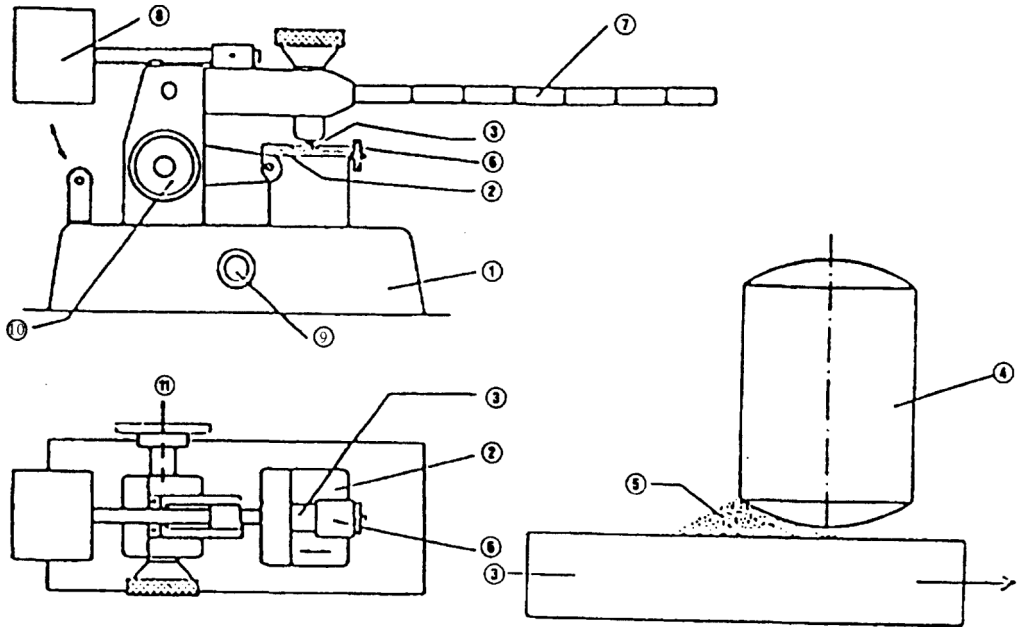


Obr. 4e Kladivo (závaží 5 kg)

(1) upínací čep
(2) polohová značka
(3) vodicí drážky
(4) úderník
(5) aretační zařízení

Obrázek 5

Zařízení pro zkoušku citlivosti na tření



Obr. 5a Třecí zařízení, boční a půdorysný pohled

(1) ocelový podstavec
(2) pohyblivé sáně
(3) porcelánová destička, 25 × 25 × 5 mm upevněná na saních
(4) upevněný porcelánový kolík o průměru 10 × 15 mm
(5) zkoušený vzorek, přibližně 10 mm^3

Obr. 5b Výchozí poloha válečku a vzorku

(6) držák kolíku
(7) zatěžovací rameno
(8) protizávaží
(9) vypínač
(10) kolečko pro nastavení saní do výchozí polohy
(11) směr k elektromotoru

A.15 BOD SAMOZÁPALU (KAPALINY A PLYNY)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Výbušné látky a látky, které se spontánně vznítí při styku se vzduchem při teplotě okolí, by neměly být předmětem této zkoušky. Zkušební postup je použitelný pro plyny, kapaliny a páry, které se mohou za přítomnosti vzduchu vznítit na horkém povrchu.

Bod samozápalu může být značně snížen vlivem katalytických nečistot, materiálu povrchu nebo většího objemu zkušební nádoby.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Míra schopnosti látky samovolně se vznítit se vyjadřuje teplotou samozápalu. Bod samozápalu je nejnižší teplota, při které se zkoušená látka smíchaná se vzduchem za podmínek stanovených v této zkušební metodě vznítí.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky jsou uvedeny v normách (viz 1.6.3). Měly by především sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METODY

Metodou se stanoví minimální teplota vnitřního povrchu uzavřeného prostoru, která způsobí vznícení plynu, páry nebo kapaliny vpravených do tohoto prostoru.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Opakovatelnost se mění v závislosti na rozpětí bodů samozápalu a na použité zkušební metodě.

Citlivost a specifičnost závisejí na použité zkušební metodě.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

Aparatura je popsána v metodě uvedené v bodě 1.6.3.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Vzorek zkoušené látky se zkouší metodou uvedenou v bodě 1.6.3.

1.6.3 **Provedení zkoušky**

Viz IEC 794, DIN 51794, ASTM-E 65978, BS 4056, NF T 20037.

2. **DATA**

Zaznamená se zkušební teplota, atmosférický tlak, množství použitého zkoušeného vzorku a časová prodleva před vznícením.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— použité množství vzorku, atmosférický tlak,

— použitá aparatura,

— výsledky měření (zkušební teploty, výsledky týkající se vznícení, příslušná časová prodleva),

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

Není uvedena.

A.16 RELATIVNÍ TEPLOTA SAMOZÁPALU PEVNÝCH LÁTEK

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Výbušné látky a látky, které se spontánně vznítí při styku se vzduchem při teplotě okolí, by neměly být předmětem této zkoušky.

Účelem této zkoušky je poskytnout předběžnou informaci o schopnosti pevných látek samovolně se vznítit za zvýšených teplot.

Pokud teplo uvolňované buď reakcí látky s kyslíkem, nebo exotermním rozkladem není dostatečně rychle odváděno do okolí, nastává samovolné zahřívání látky, které může vést až k jejímu samozápalu. K samozápalu tedy dojde, je-li rychlost vývinu tepla vyšší než rychlost odvádění tepla.

Zkušební postup je užitečný jako předběžná screeningová zkouška pro pevné látky. Z hlediska složité povahy vznícení a hoření pevných látek by měl být bod samozápalu stanovený touto metodou použit pouze ke srovnávacím účelům.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod samozápalu získaný touto metodou je minimální teplota okolí látky vyjádřená ve °C, při které se určité množství látky za definovaných podmínek vznítí.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Žádná.

1.4 PODSTATA METODY

Určité množství vzorku zkoušené látky se za teploty okolí vloží do pece; zatímco se teplota pece zvyšuje rychlostí 0,5 °C/min na 400 °C nebo do bodu tání vzorku, je-li nižší, zaznamenává se křivka závislosti teploty ve středu zkoušeného vzorku na čase. Pro účely této zkoušky se za bod samozápalu látky považuje teplota pece, při které dosáhne teplota zkoušeného vzorku samovolným zahříváním 400 °C.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Žádná.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

1.6.1.1 *Pec*

Laboratorní pec (o obsahu přibližně 2 litry) vybavená programovatelnou regulací teploty, přirozenou cirkulací vzduchu a pojistným přetlakovým zařízením. Aby se předešlo možnému riziku výbuchu, nesmí přijít rozkladné plyny do styku s elektrickými topnými elementy.

1.6.1.2 *Krychle z drátěného pletiva*

Podle šablony na obrázku 1 se vystřihne kus z drátěného korozivzdorného pletiva o velikosti otvorů 0,045 mm. Vystřižený kus se složí do formy nahoře otevřené krychle a zajistí se drátkem.

1.6.1.3 *Termočlánky*

Vhodné termočlánky.

1.6.1.4 *Zapisovač*

Jakýkoli dvoukanálový zapisovač kalibrovaný pro teploty od 0 °C do 600 °C nebo jim odpovídající napětí.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Látky se zkouší ve stavu, v jakém byly obdrženy.

1.6.3 **Provedení zkoušky**

Drátěná krychle se naplní zkoušenou látkou, jemně se poklepe a přidá se tolik látky, aby byla krychle zcela naplněna. Krychle se poté při laboratorní teplotě zavěsí do středu pece. Jeden termočlánek se umístí do středu krychle a druhý mezi krychli a stěnu pece pro záznam teploty pece.

Teploty pece a vzorku se nepřetržitě zaznamenávají, zatímco se teplota pece plynule zvyšuje rychlostí 0,5 °C/min až do teploty 400 °C nebo do bodu tání vzorku, je-li nižší.

Když se látka vznítí, termočlánky zaznamenají velmi prudký nárůst teploty nad teplotou pece.

2. **DATA**

Pro hodnocení je důležitá teplota pece, při které dosáhla teplota vzorku samovolným zahříváním 400 °C (viz obrázek 2).

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— popis zkoušené látky,

— výsledky měření včetně křivky závislosti teploty na čase,

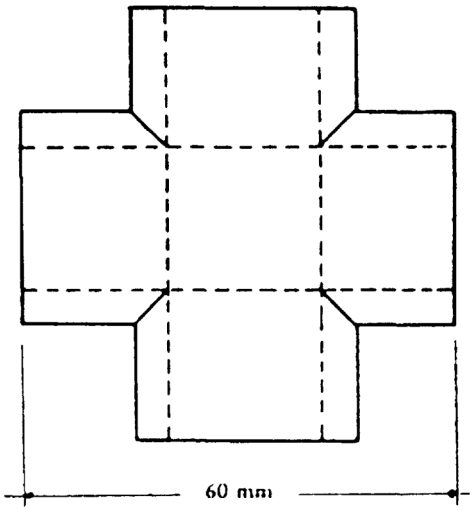
— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

(1) NF T 20036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

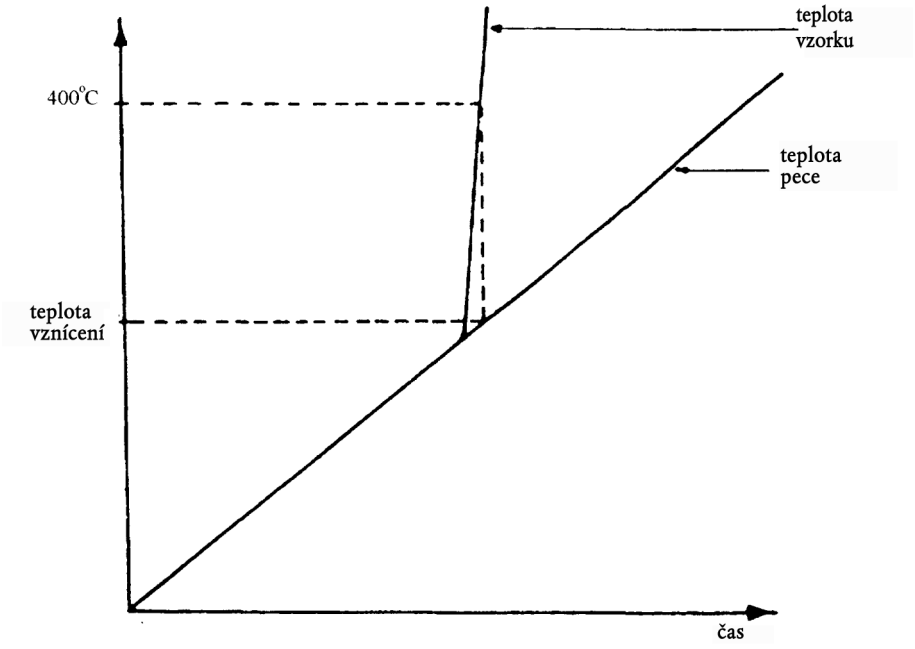
Obrázek 1

Šablona krychle o délce strany 20 mm



Obrázek 2

Typická křivka závislosti teploty na čase



A.17 OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (PEVNÉ LÁTKY)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít předběžné informace o možných výbušných vlastnostech látky.

Tato zkouška není použitelná pro kapaliny, plyny, výbušné nebo vysoce hořlavé látky nebo pro organické peroxidy.

Zkouška se neprovádí, jestliže ze strukturního vzorce bez pochyby vyplývá, že tato látka nemá schopnost exotermně reagovat s hořlavým materiálem.

Ke zjištění, zda by se zkouška neměla provádět za speciálních bezpečnostních opatření, je třeba provést předběžnou zkoušku.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Doba hoření: doba reakce v sekundách potřebná k průchodu reakční zóny prachovou housenkou podle postupu popsaného v bodě 1.6.

Rychlost hoření: vyjadřuje se v mm s^{-1}.

Maximální rychlost hoření: nejvyšší hodnota rychlosti hoření, která byla naměřena pro směsi obsahující 10 až 90 % hmot. oxidující látky.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Pro zkoušku a pro předběžnou zkoušku se jako referenční látka používá dusičnan barnatý čistoty p.a.

Referenční směsí je směs dusičnanu barnatého a práškové celulosy připravená podle bodu 1.6, která má maximální rychlost hoření (obvykle jde o směs obsahující 60 % hmot. dusičnanu barnatého).

1.4 PODSTATA METODY

V zájmu bezpečnosti se provede předběžná zkouška. Jestliže předběžná zkouška jasně prokáže, že látka má oxidační vlastnosti, žádné další zkoušky se nevyžadují. Není-li tomu tak, podrobí se látka úplné zkoušce.

Při úplné zkoušce se látka, která má být zkoušena, a definovaná hořlavá látka smísí v různých poměrech. Každá směs je poté upravena do tvaru prachové housenky a ta se na jednom konci zapálí. Stanovená maximální rychlost hoření se porovná s maximální rychlostí hoření referenční směsi.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Vhodná je každá technika mletí a mísení, pro niž se neliší maximální rychlosti hoření v šesti samostatných zkouškách od aritmetického průměru o více než 10 %.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

1.6.1.1 *Zkoušená látka*

Velikost částic zkoušeného vzorku se sníží na <0,125 mm následujícím postupem: zkoušená látka se proseje, podíl zachycený na sítě se drtí a celý postup se opakuje, dokud celá zkoušená dávka neprojde sítem.

Lze použít jakoukoli techniku mletí a prosévání, která vyhoví kritériím jakosti.

Před přípravou směsi se látka suší při 105 °C do konstantní hmotnosti. Pokud se zkoušená látka rozkládá při teplotě nižší než 105 °C, musí se látka sušit při vhodné nižší teplotě.

1.6.1.2 *Hořlavá látka*

Jako hořlavá látka se používá prášková celulosa. Doporučuje se typ celulosy používaný pro chromatografii na tenké vrstvě nebo pro sloupcovou chromatografii. Jako vhodný se prokázal typ, který má délku více než 85 % vláken od 0,020 mm a 0,075 mm. Celulosový prášek se proseje sítem o velikosti oka 0,125 mm. V průběhu zkoušky se používá tatáž šarže celulosy.

Před přípravou směsi se prášková celulosa suší při 105 °C do konstantní hmotnosti.

Pokud se při předběžné zkoušce použije dřevitá moučka, připraví se z měkkého dřeva shromážděním podílu, který projde sítem o velikosti oka 1,6 mm, důkladným promícháním a následným sušením čtyři hodiny při teplotě 105 °C ve vrstvě o tloušťce nepřesahující 25 mm. Ochladí se a do okamžiku použití, ke kterému by mělo dojít nejlépe do 24 h, se uchovává v co nejvíce naplněné vzduchotěsné nádobě.

1.6.1.3 *Zdroj zapálení*

Jako zdroj zapálení se použije plamen plynového hořáku (o minimálním průměru 5 mm). Použije-li se jiný zdroj zapálení (např. při zkoušce v inertní atmosféře), uvede se popis a zdůvodnění.

1.6.2 **Provedení zkoušky**

Poznámka:

Směsi oxidantů a celulosy nebo dřevité moučky se musí považovat za potenciálně výbušné a musí se s nimi zacházet s náležitou opatrností.

1.6.2.1 *Předběžná zkouška*

Vysušená látka se důkladně promíchá s vysušenou celulosou nebo dřevitou moučkou v poměru 2 hmotnostní díly zkoušené látky a 1 hmotnostní díl celulosy nebo dřevité moučky a směs se upraví do tvaru malého kužele o rozměrech 3,5 cm (průměr základny) × 2,5 cm (výška) naplněním bez pěchování do kuželové formy (např. do laboratorní skleněné nálevky s utěsněným stonkem).

Zkoušený vzorek se položí na chladnou, nehořlavou, neporézní a málo tepelně vodivou podkladovou desku. Zkouška se provede v digestoři podle bodu 1.6.2.2.

Zdroj zapálení se přiloží ke kuželu. Sleduje se a zaznamená se prudkost a doba trvání výsledné reakce.

Látka se považuje za oxidující, je-li reakce prudká.

V případě, že výsledek vzbuzuje pochybnosti, je nezbytné vykonat úplnou níže popsanou zkoušku s prachovou housenkou.

1.6.2.2 *Zkouška s prachovou housenkou*

Připraví se směsi oxidantu s celulosou obsahující 10 až 90 % hmot. oxidantu, po 10% přírůstcích. Přesnější hodnota maximální rychlosti hoření se v mezních případech získá použitím mezilehlé směsi oxidantu s celulosou.

Zkoušený vzorek se upraví pomocí formy. Kovová forma je 250 mm dlouhá a má trojúhelníkový příčný průřez o vnitřní výšce 10 mm a šířce 20 mm. Na obě podélné strany formy se upevní dvě kovové desky se základnou jako bočnice, které přečnívají o 2 mm nad horní okraj trojúhelníkové formy (obrázek). Forma se bez zhutnění naplní mírným přebytkem směsi. Po spuštění formy z výšky 2 cm na pevný povrch se přebytek látky seškrábne stěrkou. Bočnice se odstraní a zbývající prášek se uhladí válečkem. Na horní část formy se položí nehořlavá, neporézní a málo tepelně vodivá deska, sestava se převrátí a forma odstraní.

Zkoušený vzorek se umístí v digestoři kolmo na směr odtahu.

Rychlost proudění odsávaného vzduchu by měla stačit k zamezení úniku dýmu do laboratoře a neměla by se v průběhu zkoušky měnit. Kolem zkušebního zařízení by se měly postavit ochranné clony proti nadměrnému proudění vzduchu.

Zkouška se provede co nejrychleji s ohledem na hygroskopičnost celulosy a některých zkoušených látek.

Jeden konec prachové housenky se zapálí plamenem hořáku.

Poté, co reakční zóna dosáhne vzdálenosti 30 mm, měří se doba, za kterou se reakce rozšíří na vzdálenost 200 mm.

Zkouška se provede s referenční látkou a alespoň jednou s každou z řady směsí zkoušené látky s celulosou.

Pokud se zjistí, že maximální rychlost hoření je značně vyšší, než rychlost hoření referenční směsi, lze zkoušku ukončit; v opačném případě se zkouška opakuje pětkrát s každou ze tří směsí s nejvyššími rychlostmi hoření.

Existuje-li podezření, že je výsledek falešně pozitivní, opakuje se zkouška s inertní látkou se stejnou velikostí částic, např. s křemelinou, namísto celulosy. Směs zkoušené látky s celulosou s nejvyšší rychlostí hoření by měla být eventuálně znovu zkoušena v inertní atmosféře (s obsahem kyslíku <2 % obj.).

2. **DATA**

Z bezpečnostních důvodů se považuje za charakteristickou oxidační vlastnost zkoušené látky maximální rychlost hoření, nikoli průměrná hodnota.

Pro vyhodnocení je důležitá nejvyšší hodnota rychlosti hoření zjištěná v šesti zkouškách dané směsi.

Do grafu se vynesou nejvyšší hodnoty rychlosti hoření pro každou směs proti koncentraci oxidantu. Z grafu se odečte nejvyšší rychlost hoření.

Šest hodnot rychlosti hoření naměřených pro směs s maximální rychlostí hoření se nesmí lišit od aritmetického průměru o více než 10 %; v opačném případě se musí zlepšit technika drcení a mísení.

Naměřená maximální rychlost hoření se porovná s maximální rychlostí hoření referenční směsi (viz 1.3).

Provedouli se zkoušky v inertní atmosféře, porovná se maximální rychlost reakce s rychlostí naměřenou pro referenční směs v inertní atmosféře.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— identifikace zkoušené látky, její složení, čistota, vlhkost atd.,

— jakákoli úprava zkoušeného vzorku (např. drcení, sušení,…),

— zdroj zapálení použitý při zkouškách,

— výsledky měření,

— charakter reakce (např. vzplanutí na povrchu, hoření v celé hmotě, jakékoli informace o produktech hoření,…),

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků, včetně popisu prudkosti reakce (hoření plamenem, jiskření, uvolňování dýmu, pomalé doutnání atd.) a přibližné doby trvání předběžné bezpečnostní/screeningové zkoušky jak pro zkoušenou, tak pro referenční látku,

— výsledky ze zkoušek s inertní látkou, pokud byly prováděny,

— výsledky ze zkoušek v inertní atmosféře, pokud byly prováděny.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Látka je považována za oxidující, je-li

a) při předběžné zkoušce zjištěna prudká reakce;

b) při úplné zkoušce maximální rychlost hoření zkoušených směsí vyšší nebo stejná jako maximální rychlost hoření referenční směsi celulosy a dusičnanu barnatého.

S cílem vyloučit falešně pozitivní výsledky by měly být vzaty v úvahu také výsledky získané při zkoušení látky ve směsi s inertním materiálem a/nebo při zkoušce v inertní atmosféře.

4. **LITERATURA**

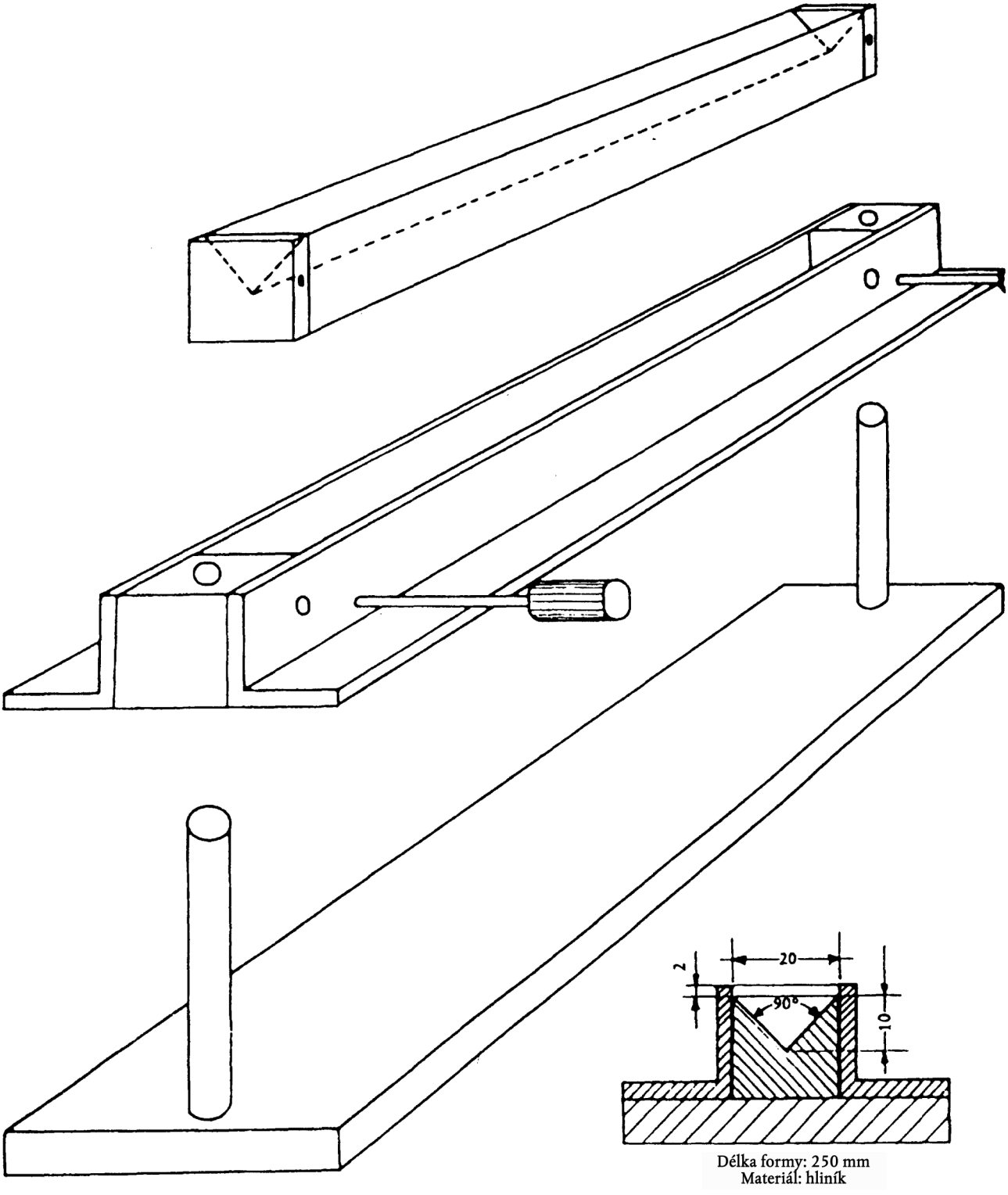
(1) NF T 20035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Doplněk

Obrázek

Forma a příslušenství pro přípravu zkoušeného vzorku ve tvaru prachové housenky

(Všechny rozměry jsou v milimetrech)



ČÁST B: METODY STANOVENÍ TOXICITY

OBECNÝ ÚVOD: ČÁST B

A. ÚVOD

Viz obecný úvod.

B. DEFINICE

i) **Akutní toxicita** zahrnuje nepříznivé účinky, které se projeví v určitém časovém období (obvykle do 14 dnů) po podání jedné dávky látky.

ii) **LD_{50}** (střední letální dávka) je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, u níž lze očekávat, že způsobí úhyn 50 % zvířat, kterým byla podána. Hodnota LD_{50} se vyjadřuje v hmotnosti zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (v $mg \cdot kg^{1}$).

iii) **LC_{50}** (střední letální koncentrace) je statisticky vypočtená koncentrace látky, u níž lze očekávat, že způsobí během definované doby expozice nebo do určité doby po expozici úhyn 50 % exponovaných zvířat. Hodnota LC_{50} se vyjadřuje v hmotnosti zkoušené látky ve standardním objemu vzduchu (mg l^{1}).

iv) **Hodnota dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku** je maximální dávka nebo úroveň expozice použitá ve zkoušce, která nevyvolává žádné zjistitelné známky toxicity.

v) **Subakutní/subchronická toxicita** zahrnuje nepříznivé účinky, které se projeví u pokusných zvířat jako důsledek opakovaného denního podávání chemické látky, nebo jako důsledek expozice chemické látce po dobu představující krátký úsek očekávané délky života pokusných zvířat.

vi) **Maximální tolerovaná dávka** (MTD) je nejvyšší úroveň dávky, která u zvířat vyvolá známky toxicity, aniž by měla během zkoušky, ve které je použita, větší vliv na přežití zvířat.

vii) **Kožní dráždivostí** se rozumí vyvolání vratných zánětlivých změn na kůži po aplikaci zkoušené látky.

viii) **Oční dráždivostí** se rozumí vyvolání vratných změn v oku po aplikaci zkoušené látky na povrch oka.

ix) **Senzibilizace kůže** (alergická kontaktní dermatitida) je imunologicky vyvolaná reakce kůže na látku.

Specifické definice pro inhalační toxicitu

— **Aerosol** je definován jako částice (pevné nebo kapalné) homogenně rozptýlené ve vzduchu.

— **Aerodynamický průměr** je průměr koule jednotkové hustoty (1 $g \cdot cm^{3}$), která má stejnou konečnou sedimentační rychlost jako dotyčná částice.

— **Hmotnostní medián aerodynamického průměru** (MMAD) je vypočítaný aerodynamický průměr, který v případě měření hmotnosti rozděluje distribuci velikosti částic aerosolu na dvě poloviny.

— **Geometrická směrodatná odchylka** (GSD) je poměr odhadnutého 84% percentilu a 50% percentilu a je mírou sklonu křivky kumulativní distribuce velikosti částic, a to za předpokladu, že velikost částic má lognormální distribuci.

Specifické definice pro metody fixní dávky při stanovení akutní orální toxicity

— **Zřejmá toxicita** se vztahuje na toxické účinky, které se projeví po podání zkoušené látky a které jsou tak silné, že podání nejbližší vyšší dávky by mohlo vést k mortalitě.

— **Diskriminující dávka** je nejvyšší ze čtyř fixních úrovní dávek, kterou je možno podat, aniž by došlo k úhynu (včetně případů humánního utracení) vyvolanému látkou.

C. MUTAGENITA (včetně předběžných screeningových zkoušek karcinogenity)

Pro předběžné posouzení mutagenního potenciálu látky je nezbytné získat informace o dvou ukazatelích, jmenovitě o genové mutaci a chromosomových aberacích.

Tyto dva ukazatele se hodnotí následujícími zkouškami:

i) zkouškami na tvorbu genové (bodové) mutace v prokaryotických buňkách, jako je *Salmonella typhimurium*; přijatelné jsou také zkoušky s *Escherichia coli*. Volba mezi těmito dvěma zkušebními organismy může záviset na povaze chemické látky, která je zkoušena;

ii) zkouškami na tvorbu chromosomových aberací v savčích buňkách *in vitro*; přijatelná je také metoda *in vivo* (test mikrojader nebo analýza metafáze buněk kostní dřeně). Neexistujíli však protiargumenty, důrazně se doporučují metody *in vitro*.

D. HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Existují určité meze, nakolik lze výsledky zkoušek na zvířatech a zkoušek *in vitro* přímo extrapolovat na člověka, a tuto skutečnost je třeba vzít v úvahu při hodnocení a interpretaci zkoušek.

Jsouli k dispozici poznatky o nepříznivých účincích na člověka, mohou být důležité pro stanovení potenciálních účinků chemických látek na člověka.

E. ODKAZY NA LITERATURU

Toxikologie je vyvíjející se experimentální vědní obor a ke každému tématu existuje rozsáhlá literatura. Důležité informace lze nalézt v Pokynech OECD pro zkoušení.

Doplňující poznámky

Péče o zvířata

Při zkoušení toxicity jsou důležité přísná kontrola podmínek prostředí a správné péče o zvířata.

i) Podmínky chovu

Podmínky chovu v prostorech nebo klecích pro pokusná zvířata by měly vyhovovat zkušebním druhům. Pro potkany, myši a morčata jsou vhodnými podmínkami teplota místnosti 22 ±3 °C a relativní vlhkost 30 až 70 %; pro králíky se doporučuje teplota 20 ±3 °C a relativní vlhkost 30 až 70 %.

Některé experimentální techniky jsou zvláště citlivé na vliv teploty a v takových případech jsou v popisu zkušební metody uvedeny podrobnosti o vhodných podmínkách. Při všech sledováních toxických účinků by měla být zaznamenávána data o teplotě a vlhkosti a měly by být zahrnuty do závěrečné zprávy o studii.

Při umělém osvětlení by se obvykle mělo střídat 12 h světla a 12 h tmy. Podrobnosti o světelném režimu by měly být zaznamenány a uvedeny v konečné zprávě o studii.

Je důležité uvést ve zprávách o experimentech na zvířatech typ použité klece a počet zvířat chovaných v každé kleci jak během expozice chemické látce, tak během kterékoli další doby pozorování.

ii) Podmínky krmení

Strava by měla splňovat veškeré požadavky výživy pro příslušný testovací druh. Jsouli zkoušené látky podávány zvířatům v potravě, může dojít ke snížení nutriční hodnoty v důsledku vzájemného působení látky a složek potravy.

Možnost takového působení by měla být vzata v úvahu při interpretaci výsledků zkoušek.

Příměsi v potravě, jejichž vliv na toxicitu je znám, nesmí být přítomny v koncentracích, ve kterých by se vliv projevil.

Ochrana zvířat

Při vypracovávání zkušebních metod byla náležitá pozornost věnována ochraně zvířat. Některé příklady jsou ve stručnosti uvedeny níže, tento seznam však není vyčerpávající. Přesné znění a/nebo podmínky je třeba vyhledat v textu metod:

— Pro stanovení akutní orální toxicity se zavádí alternativní „metoda fixní dávky“. V této metodě se nevyužívá uhynutí jako specifického ukazatele. Vyžaduje méně zvířat a vede k menší bolesti a utrpení než při klasickém stanovení akutní orální toxicity.

— Počet použitých zvířat je omezen na vědecky přijatelné minimum: v metodách B.1 a B.3 se ke zkoušení použije pouze 5 zvířat stejného pohlaví pro jednu úroveň dávky; pro stanovení senzibilizace kůže maximalizační zkouškou na morčatech (metoda B.6) se použije pouze 10 zvířat (a pouze 5 pro negativní kontrolní skupinu); počet zvířat potřebných pro pozitivní kontrolu při zkoušení mutagenity *in vivo* se rovněž snižuje (metody B.11 a B.12).

— Bolest a utrpení zvířat během zkoušek jsou minimalizovány. Je třeba humánně utratit zvířata vykazující závažné a přetrvávající známky utrpení; nesmějí se podávat zkoušené látky, o nichž je známo, že způsobují zřetelnou bolest a utrpení v důsledku žíravých a dráždivých vlastností látky (metody B.1, B.2 a B.3).

— Zkoušení s nepřiměřeně vysokými dávkami se omezuje zaváděním limitních zkoušek, a to nikoli pouze při zkouškách akutní toxicity (metody B.1, B.2 a B.3), ale rovněž při zkouškách mutagenity *in vivo* (metody B.11 a B.12).

— Strategie zkoušení dráždivosti nyní umožňuje neprovádět zkoušku, nebo ji omezit na studii s jedním zvířetem, lzeli to dostatečné vědecky zdůvodnit.

Toto vědecké zdůvodnění může být založeno na fyzikálněchemických vlastnostech látky, na výsledcích založených na jiných již provedených zkouškách nebo na výsledcích spolehlivě validovaných zkoušek *in vitro*. Byla-li například studie akutní toxicity nanesením na kůži provedena s dávkou látky odpovídající dávce v limitní zkoušce (metoda B.3) a nebyla pozorována žádná kožní dráždivost, může být další zkoušení kožní dráždivosti (metoda B.4) zbytečné; materiály, které ve studii kožní dráždivosti (metoda B.4) vykazují nepochybné žíravé účinky nebo silné podráždění kůže, neměly být dále zkoušeny na oční dráždivost (metoda B.5).

B.1 AKUTNÍ TOXICITA (ORÁLNÍ)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat orálně sondou, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Zvolené dávky je možno stanovit podle výsledků orientační zkoušky na zjištění rozmezí dávek. Následně se pozorují účinky a uhynutí. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají. Tato metoda se používá především při studiích prováděných na hlodavcích.

Je třeba humánně utratit zvířata vykazující závažné a přetrvávající známky utrpení; nesmějí se podávat zkoušené látky, o nichž je známo, že způsobují zřetelnou bolest a utrpení v důsledku žíravých a dráždivých vlastností látky.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

Nejméně pět dnů před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin. V případě potřeby se látka rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Doporučuje se nejdříve zvážit použití vodných roztoků, dále roztok v rostlinném oleji, poté eventuální roztok v jiných vhodných vehikulech nebo suspense. U nevodných vehikul musí být známy nebo určeny před zkouškou nebo během ní jejich relevantní toxikologické vlastnosti. U hlodavců by neměl objem obvykle překročit 10 ml/kg tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, jichž je možno podávat až 20 ml/kg. Proměnlivost objemů látky podávaných ve zkouškách by se měla minimalizovat úpravou koncentrací, aby se zajistil konstantní objem při všech úrovních dávek.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Nejsou-li důvody proti tomu, je upřednostněným druhem potkan.

Použijí se běžně užívané laboratorní kmeny. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ±20 % příslušné střední hodnoty.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávky se použije nejméně pět hlodavců. Mají být stejného pohlaví. Použijíli se samice, musí být nullipary a nesmí být březí. Jsouli k dispozici informace, že jedno z pohlaví je výrazně citlivější, použijí se zvířata tohoto pohlaví.

Poznámka: Používají-li se v akutních zkouškách toxicity zvířata vyššího řádu, než jsou hlodavci, mělo by se zvážit použití menšího počtu zvířat.

Dávky je třeba pečlivě volit a je třeba zajistit, aby nebyla překročena úroveň středně toxické dávky. V takových zkouškách by neměly být podávány letální dávky zkoušené látky.

1.6.2.3 *Úrovně dávek*

Počet úrovní dávek by měl být dostatečný, nejméně tři, a mají být vhodně odstupňovány, aby vyvolaly u experimentálních skupin toxické účinky a mortalitu v určitém rozsahu. Získaná data by měla být dostatečná pro sestrojení závislosti dávka–odezva, a pokud je to možné, měly by umožnit přijatelné stanovení LD_{50}.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Při použití hlodavců lze provést limitní zkoušku s jednou dávkou nejméně 2 000 $mg \cdot kg^{-1}$ tělesné hmotnosti na skupinách pěti samců a pěti samic, a to za použití výše popsaných postupů. Pokud podaná látka způsobí uhynutí, je třeba uvážit provedení úplné studie.

1.6.2.5 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být nejméně 14 dní. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Měla by být stanovena podle toxické reakce, rychlosti vývoje toxicity a délky fáze zotavení; může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, a doba uhynutí jsou důležité zejména v případě tendence ke zpožděné mortalitě.

1.6.3 **Postup**

Před podáním zkoušené látky nemají zvířata dostávat potravu. Potkanům se potrava odebere večer před zkouškou; u zvířat s vyšší rychlostí látkové výměny postačí kratší období hladovění; přístup k pitné vodě není omezen. Následující den se zvířata zváží a zkoušená látka se podá sondou orálně v jedné dávce. Není-li možno podat dávku najednou, lze dávku podat po menších množstvích během nejvýše 24 h. Po podání dávky se zamezí přístupu k potravě ještě tři až čtyři hodiny. Podáváli se látka po částech v průběhu určité doby, může být podle délky expozice nezbytné poskytnout zvířatům potravu a vodu.

Po podání látky se provádějí a systematicky zaznamenávají pozorování, pro každé zvíře se vedou samostatné záznamy. Během prvního dne se pozorování provádějí často.

Nejméně jednou během každého pracovního dne se provedou pečlivá klinická vyšetření, jiná pozorování se provádějí denně s vhodnými opatřeními k minimalizaci ztrát zvířat pro studii, např. pitva nebo zmrazení uhynulých zvířat a izolace či utracení slabých nebo umírajících zvířat. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tremoru, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Doba uhynutí se zaznamená co nejpřesněji.

Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají. Zaznamenají se všechny makroskopické patologické nálezy. V případě potřeby se odeberou tkáně pro histopatologické vyšetření.

Posouzení toxicity u druhého pohlaví

Po dokončení zkoušky na zvířatech jednoho pohlaví se látka podá nejméně jedné skupině o pěti zvířatech druhého pohlaví s cílem zjistit, zda nejsou zvířata druhého pohlaví na zkoušenou látku výrazně citlivější. V jednotlivých případech může být odůvodněno použití menšího počtu zvířat. Pokud je k dispozici spolehlivá informace, že zvířata pohlaví, které je zkoušeno, jsou výrazně citlivější, je možno zkoušení na zvířatech druhého pohlaví vynechat.

2. **DATA**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu uvede počet zvířat na počátku zkoušky, doba uhynutí jednotlivých zvířat, počet zvířat s jinými příznaky toxicity, popis toxických účinků a pitevní nálezy. Stanovení hmotnosti jednotlivých zvířat se provede bezprostředně před podáním zkoušené látky, poté v týdenních intervalech a v době uhynutí. Změny hmotnosti je třeba vypočítat a zaznamenat, přežívajíli zvířata déle než jeden den. Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na utrpení a bolest vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolaná látkou. LD_{50} se vypočte uznávanou metodou. Vyhodnocení dat by mělo zahrnovat také vztah, pokud existuje, mezi expozicí zvířat zkoušené látce a výskytem a stupněm všech abnormalit, včetně změn chování, klinických symptomů, makroskopických lézí, změn tělesné hmotnosti, mortality a ostatních toxických účinků.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,

— zkušební podmínky,

— úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,

— pohlaví zvířat, jimž byla látka podána,

— údaje o odezvě podle pohlaví a podle úrovně dávky, a to ve formě tabulky (tj. počet uhynulých zvířat nebo počet zvířat, která byla utracena, počet zvířat s příznaky toxicity, počet exponovaných zvířat),

— doba uhynutí po podání zkoušené látky, důvody a kritéria pro humánní utracení zvířat,

— veškerá pozorování,

— hodnota LD_{50} pro pohlaví, u něhož byla provedena úplná studie, a to pro 14denní pozorování (s uvedením metody výpočtu),

— 95% interval spolehlivosti pro LD_{50} (lzeli jej vypočítat),

— křivka závislosti mortality na dávce a její směrnice (pokud to metoda stanovení umožňuje),

— pitevní nálezy,

— všechny histopatologické nálezy,

— výsledky všech zkoušek na druhém pohlaví,

— rozbor výsledků (zvláštní pozornost je třeba věnovat vlivu, který by mohlo mít humánní utracení zvířat během zkoušky na vypočtenou hodnotu LD_{50}),

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

B.1 BIS AKUTNÍ TOXICITA (ORÁLNÍ) – METODA FIXNÍ DÁVKY

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška akutní orální toxicity poskytuje informace o nepříznivých účincích, které mohou následovat během krátké doby po orálním podání jedné dávky zkoušené látky.

Metoda fixní dávky se provádí ve dvou etapách.

V předběžné orientační studii se sledují účinky různých dávek při orální aplikaci sondou u zvířat téhož pohlaví, vždy u jednoho zvířete na dávku. Orientační studie poskytuje informaci o vztahu dávky a toxicity, včetně odhadu minimální letální dávky. Obvykle se v této první etapě nepoužije víc než pět zvířat.

V hlavní studii se látka podává orálně sondou skupinám pěti samců a pěti samic v jedné z těchto fixních dávek: 5, 50, 500 nebo 2 000 $mg \cdot kg^{-1}$. Použitá dávka se odvodí z předběžné orientační studie, a to jako dávka, která pravděpodobně vyvolá „zřejmou toxicitu“ (viz bod 1.2, Definice), ale nikoli uhynutí.

Po podání se pozorují účinky.

Jestliže zvolená výchozí úroveň dávky vyvolá zřejmou toxicitu, ale žádnou mortalitu, není třeba žádné další zkoušení.

Není-li na zvolené úrovni dávky pozorována zřejmá toxicita, látka se opět zkouší s nejbližší vyšší úrovní dávky. Pokud zvířata uhynou, nebo vyžaduje-li závažná toxická reakce humánní utracení zvířat, látka se opět zkouší s nejbližší nižší úrovni dávky.

Tento postup umožňuje zjistit „diskriminující dávku“ (viz bod 1.2, Definice), jež je nejvyšší z předem stanovených úrovní dávky, kterou je možno podat, aniž by došlo k úhynu (včetně případů humánního utracení).

Je třeba humánně utratit zvířata vykazující závažné a přetrvávající známky utrpení; nesmějí se podávat zkoušené látky, o nichž je známo, že způsobují zřetelnou bolest a utrpení v důsledku žíravých a dráždivých vlastností látky. Zvířata se závažnými a přetrvávajícími známkami utrpení a bolesti může být nezbytné humánním způsobem utratit. Zkoušené látky se nesmějí podávat takovým způsobem, o kterém je známo, že vyvolává značnou bolest a stres v důsledku žíravých nebo dráždivých vlastností látek.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava**

1.6.1.1 *Pokusná zvířata*

Nejsou-li důvody proti tomu, je upřednostněným druhem potkan.

Použijí se běžně užívané laboratorní kmeny. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ±20 % příslušné střední hodnoty.

Nejméně pět dnů před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních skupin orientační a hlavní studie. Obvykle stačí pro hlavní studii pouze jedna skupina každého pohlaví.

1.6.1.2 *Příprava a podání dávky*

V případě potřeby se látka rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Doporučuje se nejdříve zvážit použití vodných roztoků, dále roztok v rostlinném oleji, poté eventuální roztok v jiných vhodných vehikulech nebo suspense. U nevodných vehikul musí být známy nebo určeny před zkouškou nebo během ní jejich relevantní toxikologické vlastnosti. U hlodavců by neměl objem obvykle překročit 10 $ml \cdot kg^{-1}$ tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, jichž je možno podávat až 20 $ml \cdot kg^{-1}$. Proměnlivost objemů látky podávaných ve zkouškách by se měla minimalizovat úpravou koncentrací, aby se zajistil konstantní objem při všech úrovních dávek.

Před podáním zkoušené látky nemají zvířata dostávat potravu. Potkanům se potrava odebere večer před zkouškou; přístup k pitné vodě není omezen. Následující den se zvířata zváží a zkoušená látka se podá sondou orálně v jedné dávce. Není-li možno podat dávku najednou, lze dávku podat po menších množstvích v průběhu nejvýše 24 h. Po podání dávky se zamezí přístupu k potravě ještě tři až čtyři hodiny. Podáváli se látka po částech v průběhu určité doby, může být podle délky období nezbytné poskytnout zvířatům potravu a vodu.

1.6.2 **Postup**

1.6.2.1 *Orientační studie*

Vyšetřují se účinky různých dávek na jednotlivá zvířata. Obvykle se používají samice, pokud nejsou k dispozici údaje, že jsou samci citlivějším pohlavím. Dávky se podávají postupně, před podáním dávky dalšímu zvířeti se čeká alespoň 24 h. Všechna zvířata se pečlivě pozorují nejméně po sedm dnů s cílem zjistit příznaky toxicity; pokud přetrvávají příznaky mírné toxicity sedmý den, zvíře se pozoruje ještě dalších sedm dnů. Posuzují se následující výchozí úrovně dávek: 5, 50, 500 a 2 000 $mg \cdot kg^{-1}$. Jestliže zvolená výchozí dávka nevyvolá závažné příznaky toxicity a přitom nejbližší vyšší dávka vyvolá uhynutí, potom je nutné vyšetřit podle potřeby jednu nebo více dávek ležících mezi dvěma předchozími dávkami. Tímto způsobem by mělo být možné získat informace o úrovni dávky (úrovních dávek) vyvolávající (vyvolávajících) příznaky toxicity a o nejmenší dávce, která vyvolává mortalitu.

Je třeba se pokusit vybrat výchozí dávku podle údajů o příbuzných chemických látkách. Nejsou-li takové informace k dispozici, doporučuje se použít jako první dávku 500 $mg \cdot kg^{-1}$. Jestliže po výchozí dávce nejsou pozorovány příznaky toxicity, použije se nejbližší vyšší úroveň dávky. Nedojdeli k uhynutí při 2 000 $mg \cdot kg^{-1}$, orientační studie se ukončí a hlavní studie se provede na této úrovni dávky. Jestliže jsou při použití výchozí dávky (např. 500 $mg \cdot kg^{-1}$) zjištěny těžké účinky vyžadující humánní utracení, podá se dalšímu zvířeti nejbližší nižší dávka (např. 50 $mg \cdot kg^{-1}$). Jestliže toto zvíře přežívá, mohou být použity pro další zvířata vhodné úrovně dávky mezi fixními dávkami. Za normálních podmínek se při tomto postupu neočekává použití více než pěti zvířat.

1.6.2.2 *Hlavní studie*

Pro každou vyšetřovanou úroveň dávky se použije nejméně 10 zvířat (pět samic a pět samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí.

Podstatou metody fixní dávky je použití pouze středně toxických dávek v hlavní studii. Letální dávky zkoušené látky by neměly být podávány.

Dávka, která bude užita ve zkoušce, se zvolí z jedné ze čtyř fixních úrovní dávek, jmenovitě 5, 50, 500 nebo 2 000 $mg \cdot kg^{-1}$ tělesné hmotnosti. Zvolená výchozí úroveň dávky by měla vyvolat zřejmou toxicitu, avšak nikoli mortalitu vyvolanou látkou (včetně utracení z humánních důvodů; náhodná uhynutí nejsou zahrnuta, ale mají být zaznamenána). Jestliže tato dávka vyvolá zřejmou toxicitu, ale nevyvolá mortalitu vyvolanou látkou, není další zkoušení nutné.

Nevyvoláli podání zvolené dávky zřejmou toxicitu, látka se opět zkouší s nejbližší vyšší úrovni dávky. Zvířata by však měla být dále pozorována do konce pozorovacího období. Vyžaduje-li těžká toxická reakce humánní utracení zvířat nebo projevíli se mortalita vyvolaná látkou, látka se opět zkouší s nejbližší nižší úrovní dávek. Zvířata, která není nutné humánně utratit, by měla být opět pozorována po celé pozorovací období.

Po podání látky se provádějí a systematicky zaznamenávají pozorování. Pro každé zvíře se vedou samostatné záznamy.

Doba pozorování by měla být nejméně 14 dní. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Měla by být stanovena podle toxických reakcí, jejich rychlosti vývoje a délky fáze zotavení; může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, a doba uhynutí jsou důležité zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity.

Pečlivá klinická vyšetření se provádějí nejméně dvakrát první den po podání látky a poté nejméně jednou denně. Zvířata, která nepochybně projevují příznaky bolesti a utrpení, se humánně utratí. Během několika prvních dnů po podání látky se provedou častější pozorování, jestliže zvířata dále vykazují příznaky toxicity. Zkouška může být ukončena v případě, kdy je zřejmé, že byla zvolena příliš vysoká dávka.

Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tremoru, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu.

Hmotnost jednotlivých zvířat se stanoví bezprostředně před podáním zkoušené látky, denně po další tři dny a poté jednou týdně. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, a zvířata, která konec zkoušky přežila, se zváží a pitvají. Zaznamenají se všechny makroskopické patologické nálezy. V případě potřeby se odeberou tkáně pro histopatologické vyšetření.

V závislosti na účincích předcházející úrovně dávky může být nezbytné vyšetření druhé nebo výjimečné třetí úrovně dávky.

V případě, že látka vyvolává mortalitu při dávce 5 $mg \cdot kg^{-1}$ (nebo naznačuje-li orientační studie mortalitu při této dávce), je třeba dále vyšetřovat akutní toxicitu zkoušené látky.

2. DATA

Data z orientační i hlavní studie se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou úroveň dávky, která byla zkoušena, uvede počet zvířat na počátku zkoušky, počet zvířat s příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, popis toxických účinků, u hlavní studie informace, zda byl pozorován zřejmý toxický účinek vyvolaný látkou, dále časový průběh všech toxických účinků a pitevní nálezy. V případě, že zvířata přežívají déle než den, se vypočítají a zaznamenají změny hmotnosti.

Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na utrpení a bolest vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolaná látkou.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce by měl jak v případě orientačním studie, tak v případě hlavní studie podle možnosti obsahovat tyto údaje:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,

— zkušební podmínky,

— úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,

— úplné výsledky všech vyšetřovaných úrovní dávek,

— údaje o odezvách podle pohlaví a podle úrovně dávky, a to ve formě tabulky (tj. počet použitých zvířat, změny tělesné hmotnosti, počet uhynulých zvířat nebo počet zvířat, která byla v průběhu zkoušky utracena, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, povaha, stupeň závažnosti a trvání účinků),

— časový průběh nástupu příznaků toxicity a zda byly vratné,

— pokud zvířata uhynula nebo byla utracena, doba uhynutí po podání látky, důvody a kritéria použitá pro humánní utracení zvířat,

— pitevní nálezy,

— všechny histopatologické nálezy,

— rozbor výsledků,

— interpretace výsledků, včetně příznaků zřejmé toxicity a diskriminující úroveň dávky zjištěná ve zkoušce.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

DÁVKA	VÝSLEDKY	INTERPRETACE
5 $mg \cdot kg^{-1}$ tělesné hmotnosti	Přežití nižší než 100 %	Sloučeniny, které jsou VYSOCE TOXICKÉ
	Přežití 100 %; ale zřejmá toxicita	Sloučeniny, které jsou TOXICKÉ
	Přežití 100 %; žádná zřejmá toxicita	Viz výsledky při dávce 50 $mg \cdot kg^{-1}$
50 $mg \cdot kg^{-1}$ tělesné hmotnosti	Přežití nižší než 100 %	Sloučeniny, které mohou být TOXICKÉ nebo VYSOCE TOXICKÉ. Viz výsledky při dávce 5 $mg \cdot kg^{-1}$
	Přežití 100 %; ale zřejmá toxicita	Sloučeniny, které jsou ZDRAVÍ ŠKODLIVÉ
	Přežití 100 %; žádná zřejmá toxicita	Viz výsledky při dávce 500 $mg \cdot kg^{-1}$
500 $mg \cdot kg^{-1}$ tělesné hmotnosti	Přežití nižší než 100 %	Sloučeniny, které mohou být TOXICKÉ nebo ZDRAVÍ ŠKODLIVÉ. Viz výsledky při dávce 50 $mg \cdot kg^{-1}$
	Přežití 100 %; ale zřejmá toxicita	Sloučeniny, o nichž se soudí, že nemají významnou akutní toxicitu
	Přežití 100 %; žádná zřejmá toxicita	Viz výsledky při dávce 2 000 $mg \cdot kg^{-1}$
2 000 mg na kg tělesné hmotnosti	Přežití nižší než 100 %	Viz výsledky při dávce 500 $mg \cdot kg^{-1}$
	Přežití 100 %; se zřejmou toxicitou nebo bez ní	Sloučeniny, které nevykazují významnou akutní toxicitu

Viz také obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz také obecný úvod, část B (E).

B.2 AKUTNÍ TOXICITA (INHALAČNÍ)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Je vhodné mít předběžné informace o distribuci velikosti částic, tenzi par, bodu tání, bodu varu, teplotě vzplanutí a popřípadě výbušnosti látky.

Viz také obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Několik skupin pokusných zvířat se vystaví po určenou dobu zkoušené látce v odstupňovaných koncentracích, a to každá skupina jedné koncentraci. Následně se pozorují účinky a uhynutí. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

Je třeba humánně utratit zvířata vykazující závažné a přetrvávající známky utrpení; nesmějí se podávat zkoušené látky, o nichž je známo, že způsobují zřetelnou bolest a utrpení v důsledku žíravých a dráždivých vlastností látky.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava**

Nejméně pět dnů před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých zvířat, která se přiřadí do požadovaného počtu skupin. Pokud to nevyžaduje typ používaného expozičního zařízení, není třeba podrobit zvířata simulované expozici.

Pevné zkoušené látky může být nezbytné rozmělnit na částice vhodné velikosti.

Je-li to nezbytné, přidá se ke zkoušené látce vhodné vehikulum tak, aby v ovzduší vznikla požadovaná koncentrace zkoušené látky, a v tomto případě se zařadí také kontrolní skupina s vehikulem. Pokud se použijí pro usnadnění dávkování vehikulum nebo jiné přísady, musí být prokázáno, že nemají toxické účinky. Je možno použít stávající údaje, pokud je to potřebné.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Upřednostňuje se potkan, pokud nejsou důvody proti jeho použití. Použijí se běžně používané laboratorní kmeny. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ±20 % příslušné střední hodnoty.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň koncentrace se použije nejméně 10 hlodavců (pět samic a pět samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí.

Poznámka: Používají-li se v akutních zkouškách toxicity zvířata vyšších druhů, než jsou hlodavci, měl by se použít menší počet zvířat.

Dávky je třeba pečlivě volit a je třeba zajistit, aby nebyla překročena úroveň středně toxických dávek. V takových zkouškách by neměly být podávány letální dávky zkoušené látky.

1.6.2.3 *Expoziční koncentrace*

Počet expozičních koncentrací má být dostatečný, nejméně tři, a měly by být vhodně odstupňovány, aby se získaly zkušební skupiny s vhodným rozsahem toxických účinků a mortality. Získaná data by měla postačovat pro sestrojení závislosti koncentrace-mortalita, a pokud je to možné, měla by umožnit přijatelné stanovení LC_{50}.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Nedojde-li po čtyřhodinové expozici pěti samců a pěti samic plynné látce o koncentraci 20 mg l^{-1} nebo aerosolu kapaliny nebo pevné látky o koncentraci 5 mg l^{-1} (nebo o maximální dosažitelné koncentraci, není-li tuto koncentraci možné použít v důsledku fyzikálních nebo chemických vlastností zkoušené látky, včetně rizika výbuchu) během 14 dnů k žádné mortalitě vyvolané látkou, nejsou další experimenty nezbytné.

1.6.2.5 *Doba expozice*

Doba expozice by měla být čtyři hodiny.

1.6.2.6 *Zařízení*

Pro experimenty se zvířaty by mělo být použito inhalační zařízení, které umožňuje dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Použije-li se expoziční komora, měla by její konstrukce minimalizovat shlukování pokusných zvířat a maximalizovat jejich inhalační expozici zkoušené látce. Pro zajištění stability atmosféry v komoře by obecně neměl celkový „objem“ zaplněný pokusnými zvířaty přesáhnout 5 % objemu expoziční komory. Lze použít speciální expoziční komory pro orálně-nasální expozici nebo pro expozici hlavy nebo pro expozici celého těla; první dva způsoby expozice usnadní minimalizaci příjmu látky jinými cestami.

1.6.2.7 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být nejméně 14 dní. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Měla by být stanovena podle toxických reakcí, jejich rychlosti vývoje a délky fáze zotavení; může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, a doba uhynutí jsou důležité zejména v případě tendence ke zpožděnému úhynu.

1.6.3 **Postup**

Zvířata se krátce před expozicí zváží a poté se v určené komoře na dobu čtyř hodin od ustavení rovnováhy koncentrace vystaví zkušební koncentraci. Ustavení rovnováhy by mělo trvat krátce. Teplota, při které má být zkouška provedena, by měla být udržována na 22 ±3 °C. Relativní vlhkost má být udržována nejlépe mezi 30 % a 70 %, ale v určitých případech to nemusí být realizovatelné (např. zkoušky některých aerosolů). Udržování mírného podtlaku v komoře (≤5 mm vodního sloupce) zabrání unikání zkoušené látky do okolí. Během expozice se nepodává potrava ani voda. Pro vytvoření a monitorování zkušební atmosféry se použijí vhodné systémy. Systém musí umožnit dosažení stálých expozičních podmínek co nejrychleji. Konstrukce a provoz komory by měly být takové, aby bylo možné udržovat homogenní distribuci zkušební atmosféry v komoře.

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

— průtok vzduchu (kontinuálně);

— skutečná koncentrace zkoušené látky v dýchací zóně nejméně třikrát během expozice (některá ovzduší, např. aerosoly o vysoké koncentraci mohou vyžadovat častější monitorování). Během doby expozice se nemá koncentrace lišit od střední hodnoty o více než ±15 %. U některých aerosolů však nelze této úrovně regulace dosáhnout a připouští se větší rozsah kolísání. V případě aerosolů se provádí analýza velikosti částic tak často, jak je to nutné (nejméně jednou pro každou experimentální skupinu);

— teplota a vlhkost, pokud možno kontinuálně.

Během expozice a po jejím ukončení se provádějí a systematicky zaznamenávají pozorování; záznamy se vedou pro každé jednotlivé zvíře. Během prvního dne se provádějí pozorování často. Nejméně jednou každý pracovní den se provádějí pečlivá klinická vyšetření, další pozorování se provádějí denně, přičemž se učiní odpovídající opatření pro minimalizaci ztrát zvířat ve studii, např. pitvou nebo zmrazením uhynulých zvířat nebo izolací či utracením slabých nebo umírajících zvířat.

Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tremoru, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Doba uhynutí se zaznamená co nejpřesněji. Hmotnosti jednotlivých zvířat se stanoví jednou týdně po expozici a v době uhynutí.

Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají se zvláštním zřetelem na jakékoli změny horní i dolní části dýchacího traktu. Zaznamenají se všechny makroskopické patologické nálezy. V případě potřeby se odeberou tkáně pro histopatologické vyšetření.

2. DATA

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu uvede počet zvířat na počátku zkoušky, doba uhynutí jednotlivých zvířat, počet zvířat s jinými příznaky toxicity, popis toxických účinků a pitevní nálezy. Změny hmotnosti je třeba vypočítat a zaznamenat, přežívajíli zvířata déle než jeden den. Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na utrpení a bolest vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolaná látkou. LC_{50} se vypočte uznávanou metodou. Vyhodnocení dat by mělo zahrnovat také vztah, pokud existuje, mezi expozicí zvířat zkoušené látce a výskytem a stupněm všech abnormalit, včetně změn chování, klinických symptomů, makroskopických lézí, změn tělesné hmotnosti, mortality a ostatních toxických účinků.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,

— zkušební podmínky: popis expozičního zařízení,

včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy aerosolů, klimatizačního systému a způsobu umístění zvířat v expoziční komoře, je-li použita. Měly by být popsány přístroje pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, koncentrace a distribuce velikosti částic aerosolu.

Údaje o expozici

Měla by být zpracována do tabulky s uvedením středních hodnot a míry rozptylu (např. směrodatné odchylky) a měla by zahrnovat pokud možno tyto informace:

a) průtok inhalačním zařízením;

b) teplota a vlhkost vzduchu;

c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení děleno objemem vzduchu);

d) povaha vehikula, pokud bylo použito;

e) skutečná koncentrace v dýchací zóně;

f) hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka(GSD);

g) doba do ustavení rovnováhy;

h) doba expozice;

— údaje o reakcích podle pohlaví a úrovně expozice ve formě tabulky (tj. počet zvířat, která při experimentu uhynula nebo byla humánně utracena; počet zvířat s příznaky toxicity; počet exponovaných zvířat),

— doba uhynutí v průběhu expozice nebo po jejím ukončení, důvody a kritéria pro humánní utracení zvířat,

— všechna pozorování,

— hodnota LC_{50} pro každé pohlaví stanovená po ukončení doby pozorování (s uvedením metody výpočtu),

— 95% interval spolehlivosti pro LC_{50} (lzeli jej vypočítat),

— křivka závislosti mortality na dávce a její směrnice (pokud to metoda stanovení umožňuje),

— pitevní nálezy,

— všechny histopatologické nálezy,

— rozbor výsledků (zvláštní pozornost je třeba věnovat vlivu, který by mohlo mít humánní utracení zvířat během zkoušky na vypočtenou hodnotu LC_{50}),

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

B.3 AKUTNÍ TOXICITA (DERMÁLNÍ)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Následně se pozorují a zaznamenávají účinky a případy uhynutí. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

Je třeba humánně utratit zvířata vykazující závažné a přetrvávající známky utrpení; nesmějí se podávat zkoušené látky, o nichž je známo, že způsobují zřetelnou bolest a utrpení v důsledku žíravých a dráždivých vlastností látky.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin. Asi 24 hodin před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá nebo oholí srst na zádech. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže, což by mohlo změnit její prostupnost. Pro aplikaci zkoušené látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při zkouškách pevných látek, které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou nebo podle potřeby vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Při výběru vehikula se bere v úvahu jeho vliv na průnik zkoušené látky kůží. Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Mohou být použiti dospělí potkani nebo králíci. Lze použít i jiné živočišné druhy, ale jejich použití musí být zdůvodněno. Používají se běžně používané kmeny pokusných zvířat. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ±20 % příslušné střední hodnoty.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávky se použije nejméně pět zvířat. Mají být stejného pohlaví. Použijíli se samice, musí být nullipary a nesmí být březí. Jsouli k dispozici informace, že jedno z pohlaví je výrazně citlivější, použijí se zvířata tohoto pohlaví.

Poznámka: Používají-li se v akutních zkouškách toxicity zvířata vyšších druhů, než jsou hlodavci, měl by se použít menší počet zvířat. Dávky je třeba pečlivě volit a je třeba zajistit, aby nebyla překročena úroveň středně toxických dávek. V takových zkouškách by neměly být podávány letální dávky zkoušené látky.

1.6.2.3 *Úrovně dávek*

Počet úrovní dávek má být dostatečný, nejméně tři, a mají být vhodně odstupňovány, aby vznikly zkušební skupiny se zřetelným rozsahem toxických účinků a mortality. Při rozhodování o úrovních dávek by měly být vzaty v úvahu všechny dráždivé nebo žíravé účinky zkoušené látky. Získaná data by měla být dostatečná pro sestrojení závislosti dávka-odezva, a pokud je to možné, měla by umožnit přijatelné stanovení LD_{50}.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Lze provést limitní zkoušku s jednou dávkou nejméně 2 000 $mg \cdot kg^{-1}$ tělesné hmotnosti na skupinách pěti samců a pěti samic, a to za použití výše popsaných postupů. Pokud podaná látka způsobí uhynutí, je třeba uvážit provedení úplné studie.

1.6.2.5 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být nejméně 14 dní. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Měla by být stanovena podle toxických reakcí, jejich rychlosti vývoje a délky fáze zotavení; může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, a doba uhynutí jsou důležité zejména v případě tendence ke zpožděné mortalitě.

1.6.3 **Postup**

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zkoušená látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. V případě vysoce toxických látek může být tato plocha menší; co největší část této plochy by se však měla pokrýt co nejslabší a nejstejnoměrnější vrstvou.

Zkoušená látka se po expoziční dobu 24 hodin udržuje ve styku s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Zkušební plocha se dále vhodným způsobem překryje, aby se mulový obvaz a zkoušená látka fixovaly a aby zvířata zkoušenou látku nepožila. K zamezení požití látky je možno použít i prostředků pro omezení volnosti pohybu, úplné znehybnění však nelze doporučit.

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem očištění kůže.

Pozorování by se měla současně systematicky zaznamenávat. Záznamy se vedou pro každé jednotlivé zvíře. Během prvního dne se provádějí pozorování často. Nejméně jednou každý pracovní den se provádějí pečlivá klinická vyšetření, další pozorování se provádějí denně, přičemž se učiní odpovídající opatření pro minimalizaci ztrát zvířat ve studii, např. pitvou nebo zmrazením uhynulých zvířat nebo izolací či utracením slabých nebo umírajících zvířat.

Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tremoru, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Doba uhynutí se zaznamená co nejpřesněji. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají. Zaznamenají se všechny makroskopické patologické nálezy. V případě potřeby se odeberou tkáně pro histopatologické vyšetření.

Posouzení toxicity u druhého pohlaví

Po dokončení zkoušky na jednom pohlaví se látka podá nejméně jedné skupině o pěti zvířatech druhého pohlaví s cílem zjistit, zda nejsou zvířata druhého pohlaví na zkoušenou látku výrazně citlivější. V jednotlivých případech může být odůvodněno použití menšího počtu zvířat. Pokud je k dispozici spolehlivá informace, že zvířata pohlaví, které je zkoušeno, jsou výrazně citlivější, je možno zkoušení na zvířatech druhého pohlaví vynechat.

2. **DATA**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu uvede počet zvířat na počátku zkoušky, doba uhynutí jednotlivých zvířat, počet zvířat s jinými příznaky toxicity, popis toxických účinků a pitevní nálezy. Hmotnost jednotlivých zvířat se stanoví a zaznamená krátce před aplikací zkoušené látky, poté v týdenních intervalech a v době uhynutí. Změny hmotnosti je třeba stanovit a zaznamenat, přežívajíli zvířata déle než jeden den. Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na utrpení a bolest vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolaná látkou. LD_{50} se vypočte pomocí uznávané metody.

Vyhodnocení dat by mělo zahrnovat také vztah, pokud existuje, mezi expozicí zvířat zkoušené látce a výskytem a závažností všech abnormalit, včetně změn chování, klinických symptomů, makroskopických lézí, změn tělesné hmotnosti, mortality a ostatních toxikologických účinků.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,

— zkušební podmínky (včetně způsobu očištění kůže a typu obvazu: okluzivní nebo neokluzivní),

— úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,

— pohlaví zvířat, jimž byla látka podána,

— údaje o odezvě podle pohlaví a podle úrovně dávky, a to ve formě tabulky (tj. počet uhynulých zvířat nebo počet zvířat, která byla v průběhu zkoušky utracena, počet zvířat s příznaky toxicity, počet exponovaných zvířat),

— doba uhynutí po podání zkoušené látky, důvody a kritéria pro humánní utracení zvířat,

— veškerá pozorování,

— hodnota LD_{50} pro pohlaví, u něhož byla provedena úplná studie, a to pro 14denní pozorování (s uvedením metody stanovení),

— 95% interval spolehlivosti pro LD_{50} (lzeli jej vypočítat),

— křivka závislosti mortality na dávce a její směrnice, pokud to metoda stanovení umožňuje,

— pitevní nálezy,

— všechny histopatologické nálezy,

— výsledky všech zkoušek na druhém pohlaví,

— rozbor výsledků (zvláštní pozornost je třeba věnovat vlivu, který by mohlo mít humánní utracení zvířat během zkoušky na vypočtenou hodnotu LD_{50}),

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

B.4 AKUTNÍ TOXICITA (KOŽNÍ DRÁŽDIVOST)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Výchozí úvahy

Je třeba pečlivě zvážit všechny dostupné informace o látce s cílem minimalizovat zkoušení látek za podmínek, které mohou vyvolat závažné reakce. Následující informace mohou být užitečné pro posouzení, zda je vhodná úplná zkouška, studie na jediném zvířeti, nebo zda žádné další zkoušení není nutné.

i) Fyzikálněchemické vlastnosti a chemická reaktivita. Silně kyselé nebo zásadité látky (např. prokázané pH 2 nebo nižší nebo pH 11,5 nebo vyšší) není třeba zkoušet na primární kožní dráždivost, lzeli očekávat žíravé účinky. Je třeba vzít v úvahu také alkalickou nebo kyselou rezervu.

ii) Jsouli dostupné přesvědčivé doklady o závažných účincích látky ze spolehlivě validovaných zkoušek *in vitro*, není vyžadována úplná zkouška.

iii) Výsledky ze studií akutní toxicity. Jestliže byla látka zkoušena na akutní toxicitu dermální aplikací při limitní úrovni dávky (2 000 $mg \cdot kg^{-1}$ tělesné hmotnosti) a nebylo pozorováno podráždění kůže, lze považovat další zkoušení kožní dráždivosti za zbytečné. Rovněž není nezbytné zkoušet látky, které se ukázaly jako vysoce toxické při dermální cestě vstupu.

Látka, která má být zkoušena, se nanese v jedné dávce na kůži několika pokusných zvířat, přičemž každé zvíře slouží jako svoje vlastní kontrola. Po stanovené době se určí, vyhodnotí a následně popíše stupeň podráždění, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba pozorování by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit vratnost pozorovaných účinků.

Zvířata se závažnými a přetrvávajícími známkami utrpení a bolesti může být nezbytné humánním způsobem utratit.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava**

Asi 24 h před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá nebo oholí srst na zádech.

Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže. Smějí se použít pouze zvířata se zdravou, neporaněnou kůží.

Některé kmeny králíka mají ostrůvky husté srsti, které jsou v některých obdobích roku výraznější. Zkoušené látky se nenanášejí na tyto zóny růstu husté srsti.

Při zkouškách pevných látek (které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach) se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou nebo podle potřeby vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Při použití vehikula se bere v úvahu jeho vliv na podráždění kůže zkoušenou látkou. Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Ačkoliv lze použít různé druhy savců, upřednostňuje se albín králíka.

1.6.2.2 *Počet zvířat*

Jestliže se lze ze screeningových zkoušek *in vitro* nebo jiných úvah domnívat, že by látka mohla vyvolávat nekrózu (např. je žíravá), je třeba uvážit provedení zkoušky na jednom zvířeti. Nenaznačujíli výsledky této zkoušky žíravé účinky, měla by být zkouška dokončena nejméně se dvěma dalšími zvířaty.

Pro úplnou zkoušku se použijí nejméně tři zdravá dospělá zvířata. Další zvířata pro neexponovanou kontrolní skupinu nejsou třeba. Pro objasnění nejasných reakcí mohou být potřebná další zvířata.

1.6.2.3 *Úroveň dávky*

Nejsou-li proti tomu důvody, nanese se na testovací místo kůže 0,5 ml kapaliny nebo 0,5 g pevné nebo polopevné látky. Přilehlé oblasti neexponované kůže každého zvířete slouží ve zkoušce jako kontrola.

1.6.2.4 *Doba pozorování*

Doba pozorování by neměla být stanovena pevně. Měla by být dostatečná pro úplné vyhodnocení vratnosti nebo nevratnosti pozorovaných účinků, ale obvykle není třeba, aby překročila 14 dnů po aplikaci.

1.6.3 **Postup**

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zkoušená látka se nanese na malou plochu kůže (asi 6 cm^2) a pokryje se plátkem mulu přidržovaným nedráždivou náplastí. U kapalin a některých past může být nezbytné nanést nejprve zkoušenou látku na mul a poté jej připevnit na kůži. Po dobu trvání expozice je třeba přidržovat plátek volně na kůži vhodným okluzivním nebo částečně okluzivním obvazem. Je třeba zabránit tomu, aby se zvíře dostalo k mulu a zkoušenou látku požilo nebo vdechlo.

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo vhodným rozpouštědlem, aniž by došlo k ovlivnění odezvy nebo celistvosti kůže.

Doba expozice je obvykle čtyři hodiny.

Pokud existuje podezření, že by látka mohla vyvolat nekrózu (např. je žíravá), měla by být délka expozice zkrácena (např. na jednu hodinu nebo na tři minuty). Při takové zkoušce lze nejprve použít jediné zvíře a aplikovat tři plátky mulu současně, pokud to akutní dermální toxicita zkoušené látky nevylučuje. První plátek se odstraní po třech minutách. Pokud není pozorována závažná kožní reakce, odstraní se druhý plátek po jedné hodině. Pokud pozorování v této fázi naznačují, že je nezbytná čtyřhodinová expozice a že neodporuje principu humánního zacházení, odstraní se třetí plátek po čtyřech hodinách a odezva kůže se vyhodnotí.

V tomto případě (tj. pokud byla možná čtyřhodinová expozice) by měla být zkouška dokončena s použitím nejméně dvou dalších zvířat, pokud to není považováno za nehumánní (např. je-li po čtyřhodinové expozici pozorována nekróza kůže).

Jestliže je závažná kožní reakce (např. nekróza) pozorována po třech minutách nebo po jedné hodině, zkouška se okamžitě ukončí.

Za určitých podmínek lze navrhnout delší expozice, například odpovídáli to očekávanému způsobu použití a expozici u člověka.

1.6.3.1 *Pozorování a hodnocení*

Zvířata se pozorují na příznaky erytému a edému a odezva kůže se hodnotí po 60 min a dále po 24, 48 a 72 hodinách po odstranění plátku se zkoušenou látkou. Stupeň podráždění kůže se hodnotí a zaznamenává podle systému uvedeného v tabulce 1. Jestliže nebylo do 72 hodin dosaženo původního stavu, je nezbytné další pozorování. Vedle podráždění kůže se podrobně popíší všechny závažné léze, jako je poleptání (nevratná destrukce kožní tkáně) a jiné toxické účinky.

K objasnění nejasných reakcí nebo odezev maskovaných zabarvením kůže zkoušenou látkou mohou být použity techniky, jako je histopatologické vyšetření nebo měření tloušťky kožní řasy.

2. **DATA**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každé jednotlivé zvíře uvede stupeň podráždění, posouzení erytému a edému po celou dobu pozorování. Uvedou se rovněž všechny závažné léze, popis stupně a povahy podráždění kůže, reversibilita nebo poleptání a všechny další pozorované toxické účinky.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,

— zkušební podmínky (včetně relevantních fyzikálně-chemických vlastností zkoušené látky, technik přípravy a čištění kůže, typ obvazu: okluzivní, semiokluzivní),

— údaje o odezvě kůže u každého jednotlivého zvířete při každém pozorování (za 1, 24, 48 a 72 hodin atd. po odstranění mulu) ve formě tabulky,

— popis všech zjištěných závažných lézí včetně poleptání,

— popis stupně a povahy pozorovaného podráždění a popřípadě histopatologických nálezů,

— popis všech dalších toxických účinků jiných než podráždění kůže,

— rozbor výsledků,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

Doplněk

TABULKA: STUPNICE HODNOCENÍ KOŽNÍ REAKCE

Tvorba erytému a příškvaru

	Hodnota
Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (stěží viditelný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zrudnutí) nebo tvorba příškvaru (hloubkové poškození) znemožňující posouzení erytému	4

Tvorba edému

Žádný edém	0
Velmi lehký edém (stěží viditelný)	1
Lehký edém (okraje jsou zřetelné, plocha je ohraničena zřetelným vyvýšením)	2
Mírný edém (okraje vyvýšeny asi o 1 mm)	3

B.5 AKUTNÍ TOXICITA (OČNÍ DRÁŽDIVOST)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Výchozí úvahy

Je třeba pečlivě zvážit všechny dostupné informace o látce s cílem minimalizovat zkoušení látky za podmínek, které mohou vyvolat závažné reakce. Následující informace mohou být v tomto ohledu užitečné.

i) Fyzikálněchemické vlastnosti a chemická reaktivita. Silně kyselé nebo zásadité látky, u nichž lze očekávat, že způsobí v oku pH 2 nebo nižší nebo pH 11,5 nebo vyšší, není třeba zkoušet, lzeli očekávat závažné léze. Je třeba vzít v úvahu také alkalickou nebo kyselou rezervu.

ii) Výsledky spolehlivě validovaných alternativních studií; látky s prokázanými potenciálně žíravými nebo silně dráždivými vlastnostmi by neměly být dále zkoušeny na oční dráždivost, protože lze předpokládat, že tyto látky budou mít při zkoušení touto metodou závažné účinky na oko.

iii) Výsledky ze studií kožní dráždivosti. Materiály, které vykazovaly zřejmé žíravé nebo výrazné dráždivé účinky na kůži ve studii kožní dráždivosti, není třeba dále zkoušet na oční dráždivost, protože lze předpokládat, že budou mít na oči závažné účinky.

Látka, která má být zkoušena, se nanese v jedné dávce do jednoho oka každého z několika pokusných zvířat; neexponované oko slouží pro získání kontrolních informací. Po stanovené době se určí, vyhodnotí a následně popíše stupeň podráždění, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba pozorování by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit vratnost nebo nevratnost pozorovaných účinků.

Zvířata se závažnými a přetrvávajícími známkami utrpení a bolesti může být nezbytné humánním způsobem utratit.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava**

24 hodin před zkouškou se u každého z předběžně vybraných pokusných zvířat provede vyšetření obou očí. Zvířata, u kterých se zjistí podráždění očí, oční defekt nebo poškození rohovky, se nepoužijí.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Ačkoliv byla použita různá pokusná zvířata, doporučuje se provádět zkoušení na zdravém dospělém albínu králíka.

1.6.2.2 *Počet zvířat*

Jestliže se očekávají výrazné účinky, je třeba zvolit zkoušku na jediném zvířeti. Jestliže výsledky této zkoušky na jednom králíkovi naznačují, že má látka výrazně dráždivé účinky (vratný účinek) nebo žíravé účinky (nevratný účinek) na oko při použití popsaného postupu, není třeba provádět zkoušení oční dráždivosti u dalších zvířat. Pro vyšetření specifických aspektů může být někdy vhodné provádět zkoušení na dalších zvířatech.

V jiných případech než při zkoušení jednoho zvířete se použijí nejméně tři zvířata. Pro objasnění nejasných reakcí mohou být potřebná další zvířata.

1.6.2.3 *Úroveň dávek*

Při zkoušení kapalin se použije dávka 0,1 ml. U pevných látek, past a zrnitých látek se použije objem 0,1 ml nebo hmotnost přibližně 0,1 g (hmotnost musí být vždy uvedena). Jedná-li se o pevnou nebo hrubě zrnitou látku, rozemele se na jemný prášek. Objem homogenní látky se stanoví až po opatrném zhutnění, např. poklepáním odměrné nádobky.

U látek přítomných v aerosolových rozstřikovačích s čerpadlem nebo pod tlakem se kapalina vypudí a 0,1 ml látky se shromáždí a instiluje do oka podle popisu pro kapaliny.

1.6.2.4 *Doba pozorování*

Doba pozorování by neměla být stanovena pevně. Musí být dostatečná pro vyhodnocení vratnosti nebo nevratnosti pozorovaných účinků, ale obvykle není třeba, aby překročila 21 dnů po instilaci.

1.6.3 **Postup**

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zkoušená látka se aplikuje každému zvířeti do spojivkového vaku jednoho oka tak, že se spodní víčko lehce odchlípne od oční bulvy. Víčka se pak asi na jednu sekundu lehce přidrží u sebe, aby nedošlo ke ztrátě látky. Druhé oko, do kterého se látka neaplikuje, slouží jako kontrola.

Jestliže se předpokládá, že látka může vyvolat přílišnou bolest, lze před instilací zkoušené látky použít lokální anestetikum. Typ, koncentraci a dobu aplikace lokálního anestetika je třeba pečlivě zvolit, aby bylo zajištěno, že následkem anestetika nedojde k významným změnám v odezvě na zkoušenou látku. Stejným způsobem se musí znecitlivit i kontrolní oko.

Oči pokusných zvířat by neměly být vypláchnuty do 24 hodin po instilaci zkoušené látky. Po 24 hodinách je možno v případě potřeby oči vypláchnout.

U některých látek, které při této zkušební metodě vykazují dráždivost, mohou být požadovány další zkoušky na králících, kterým se krátce po instilaci látky vymyjí oči. V těchto případech se doporučuje použít tři králíky. Půl minuty po instilaci se oči půl minuty vymývají takovým objemem kapaliny a takovým průtokem, aby nedošlo k poškození.

1.6.3.1 *Pozorování a hodnocení*

Oči se vyšetří po 1, 24, 48 a 72 hodinách. Neprojevíli se po 72 hodinách žádné příznaky očních lézí, lze zkoušku ukončit.

Dobu pozorování je třeba prodloužit, pokud přetrvává postižení rohovky nebo jiné příznaky podráždění oka, aby byl posouzen vývoj změn a jejich vratnost či nevratnost. Vedle pozorování rohovky, duhovky a spojivky se zaznamenají a uvedou i jiné zjištěné léze. Stupeň reakce oka je třeba při každém vyšetření zaznamenat (podle tabulky). (Hodnocení reakce oka připouští různé možnosti interpretace. Jako pomůcku pro zkušební laboratoře a pro ty, kdo provádějí interpretaci pozorování, lze použít ilustrované pokyny pro hodnocení podráždění oka.)

Vyšetřování reakcí lze usnadnit použitím binokulární lupy, ruční štěrbinové lampy, očního mikroskopu nebo jiných vhodných zařízení. Po zaznamenání pozorování po 24 hodinách lze oči některých nebo všech zvířat dále vyšetřit fluoresceinem.

2. **DATA**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každé jednotlivé zvíře uvede stupeň podráždění v určené době pozorování. Uvede se popis stupně a povahy podráždění, přítomnost závažných lézí a všechny mimooční účinky, které byly pozorovány.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— údaje o zvířatech (druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.),

— zkušební podmínky (včetně relevantních fyzikálně-chemických vlastností zkoušené látky),

— údaje o dráždivých nebo žíravých účincích pro jednotlivá zvířata při každém pozorování (např. po 1, 24, 48 a 72 hodinách) ve formě tabulky,

— popis všech pozorovaných závažných lézí,

— podrobný popis stupně, charakteru a vratnosti pozorovaného podráždění nebo poleptání, včetně postižené oblasti rohovky, a vratnosti účinků,

— popis metody hodnocení podráždění po 1, 24, 48 a 72 hodinách (např. štěrbinová lampa, oční mikroskop, fluorescein),

— popis všech zjištěných mimoočních místních účinků,

— rozbor výsledků,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

Doplněk

STUPNICE OČNÍCH LÉZÍ

Rohovka

Neprůhlednost: stupeň neprůhlednosti (vyšetří se nejvíce neprůhledné oblasti)

Neprůhlednost není přítomna	0
Rozptýlené nebo difúzní oblasti neprůhlednosti, (jiné než slabé zastření normálního lesku), detaily duhovky jasně viditelné	1
Snadno identifikovatelná průhledná oblast, detaily duhovky lehce zastřené	2
Přítomnost zóny opalescence, detaily duhovky nejsou viditelné; obrys zornice stěží viditelný	3
Úplná neprůhlednost rohovky, duhovka je zcela neviditelná	4

Duhovka

Normální	0
Nepravidelná struktura duhovky, překrvení, otoky, překrvení nebo městnání cév kolem rohovky, jakákoli kombinace uvedených účinků, reakce na světlo je zachovaná (popřípadě požděná)	1
Reakce na světlo není přítomná, hemorhagie a rozsáhlé poškození (jeden nebo všechny uvedené účinky)	2

Spojivka

Zčervenání (podle nejzávažnější změny pozorované na víčkové nebo bulbární spojivce ve srovnání s kontrolním okem)

Cévní kresba normální	0
Městnání některých cév zřetelně výraznější	1
Rozlišení jednotlivých cév nesnadné, difuznější jasně červená barva	2
Difuzní tmavě červená barva	3
Otok: víčka a/nebo mžurky	
Edém není přítomen	0
Slabý edém zasahující mžurku	1
Výrazný edém s everzí víčka	2
Edém způsobující uzavření víček na polovinu	3
Edém způsobující uzavření víček na více než polovinu	4

B.6 SENZIBILIZACE KŮŽE

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Poznámky:

Citlivost a schopnost zkoušek rozpoznat látky s potenciálním senzibilizačním účinkem na lidskou kůži jsou považovány za významné pro klasifikační systém toxicity v oblasti veřejného zdravotnictví.

Neexistuje žádná jednorázová zkušební metoda, která by dostatečně identifikovala všechny látky s potenciálním senzibilizačním účinkem na lidskou kůži a která by byla vhodná pro všechny látky.

Při výběru zkoušky musí být zváženy faktory jako např. fyzikální charakteristiky látky, včetně schopnosti pronikat kůží.

Zkoušky na morčatech lze rozdělit na zkoušky s adjuvanty, ve kterých je alergický stav umocněn rozpuštěním nebo suspendováním zkoušené látky ve Freundově kompletním adjuvantu (FCA), a na zkoušky bez adjuvantů.

Zkoušky s adjuvanty jsou pravděpodobně přesnější v předpovědi pravděpodobného senzibilizačního účinku látky na lidskou kůži než metody bez použití Freundova kompletního adjuvantu, a proto se jim dává přednost.

Maximalizační zkouška na morčatech (*Guinea-Pig Maximization Test* – GPMT) je velmi rozšířenou zkouškou s adjuvanty. Ačkoli lze použít několik dalších metod pro zjištění schopnosti látky vyvolat senzibilizační reakci kůže, je zkouška GMPT upřednostňovanou technikou s adjuvantem.

U mnoha skupin chemických látek jsou zkoušky bez adjuvantů (dává se přednost Bühlerově zkoušce) považovány za méně citlivé.

V určitých případech lze zdůvodnit Bühlerovu zkoušku s povrchovou aplikací spíše než intradermální injekci používanou v maximalizační zkoušce na morčatech. Je-li použita Bühlerova zkouška, mělo by být uvedeno odborné zdůvodnění.

V této metodě jsou popsány maximalizační zkoušky na morčatech (GPMT) a Bühlerova zkouška. Jiné metody lze použít za předpokladu, že jsou spolehlivě validované a odborně odůvodněné.

Bez ohledu na použité metody musí být citlivost kmenu morčat použitého pro zkoušení senzibilizace kůže v pravidelných (šestiměsíčních) intervalech kontrolována za použití známých mírných až středně silných senzibilizujících látek a musí být získán dostatečný počet pozitivních odezev.

Viz také obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz také obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Doporučeny jsou následující látky, podle potřeby zředěné, a dále jakékoli další senzibilizující látky uvedené v literatuře nebo patřící do skupiny zkoušené látky.

— *p*fenylendiamin	číslo CAS 106503
— 2,4dinitrochlorbenzen	číslo CAS 97-00-7
— dichroman draselný	číslo CAS 7778-50-9
— neomycin-sulfát	číslo CAS 1405-10-3
— síran nikelnatý	číslo CAS 7786-81-4

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Po počáteční expozici zkoušené látce („indukční“ období) jsou zvířata přibližně dva týdny po poslední indukční expozici podrobena provokační dávce zkoušené látky s cílem zjistit, zda byl vyvolán stav přecitlivělosti. Senzibilizace se stanoví zkoumáním kožní reakce na provokační expozici.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍCH METOD

1.6.1 **Maximalizační zkouška na morčatech (GPMT)**

1.6.1.1 *Příprava*

Provede se náhodný výběr zdravých mladých albinotických morčat, která se přiřadí do jednotlivých experimentálních a kontrolních skupin. Před aplikací látky se v lopatkové oblasti odstraní srst stříháním nebo holením. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození kůže.

1.6.1.2 *Zkušební podmínky*

1.6.1.2.1 Pokusná zvířata

Použijí se běžně užívané laboratorní albinotické kmeny morčete o hmotnosti méně než 500 g.

1.6.1.2.2 Počet a pohlaví

Lze použít samce i samice. Jsouli použity samice, musí být nullipary a nesmí být březí. V exponované skupině se použije minimálně 10 zvířat a v kontrolní skupině nejméně 5 zvířat. Použití menšího počtu zvířat musí být odůvodněno. V případě nejasných výsledků může být histopatologickým vyšetřením usnadněno rozhodnutí, zda by měla být zkouška opakována s další sadou zvířat.

Není-li možné dojít ke konečnému závěru, zda látka je či není senzibilizující, doporučuje se provést zkoušení s dalšími zvířaty, tak aby bylo v experimentální skupině celkem 20 zvířat a v kontrolní skupině 10 zvířat.

1.6.1.2.3 Úrovně dávek

Koncentrace zkoušené látky se upraví na úroveň, která vyvolává nějaké známky podráždění kůže, ale kterou zvířata dobře snášejí v každé indukční fázi.

Jako provokační koncentrace se použije maximální koncentrace, která u nesenzibilizovaných zvířat nevyvolává žádné podráždění kůže.

Tyto koncentrace lze stanovit v omezeném předběžném experimentu (na dvou nebo třech zvířatech).

1.6.1.2.4 Doba pozorování

V průběhu indukčního období se provádějí pozorování za účelem zjistit možné dráždivé účinky. Po ukončení provokační expozice se za 24 a za 48 hodin po odstranění náplasti zaznamenává reakce kůže.

1.6.1.3 *Postup*

Zvířata se zváží před zahájením zkoušky a na jejím konci. Z lopatkové oblasti se odstraní srst. Postup má dvě stádia:

1.6.1.3.1 Indukce

Den 0 – exponovaná skupina

Následující dvojice subkutánních injekcí, každá po 0,1 ml, se symetricky podle střední linie podá do lopatkové oblasti zbavené srsti:

Injekce 1:	0,1 ml Freundova kompletního adjuvantu (FCA) smíseného s vodou nebo fyziologickým roztokem v poměru 1: 1.
Injekce 2:	0,1 ml zkoušené látky, podle potřeby ve vhodném vehikulu.
Injekce 3:	0,1 ml zkoušené látky v FCA.

Pro injekci 3 se látky rozpustné ve vodě rozpustí v 0,05 ml vody a 0,05 ml nezředěného FCA. Látky rozpustné v tucích nebo nerozpustné látky se smíchají s nezředěným FCA.

Konečná koncentrace zkoušené látky pro injekci 3 má být stejná jako pro injekci 2.

Injekce 1 a 2 se aplikují blízko sebe a co nejblíže hlavě, zatímco injekce 3 směrem ke kaudální části zkušební plochy.

Den 0 – kontrolní skupina

Následující dvojice subkutánních injekcí se podají do stejných míst jako u exponovaných zvířat:

Injekce 1:	0,1 ml Freundova kompletního adjuvantu (FCA) smíseného s vodou nebo fyziologickým roztokem v poměru 1: 1.
Injekce 2:	0,1 ml samotného vehikula.
Injekce 3:	0,1 ml vehikula v FCA.

Den 6 – kontrolní a exponovaná skupina

Nedráždíli látka kůži, natře se zkušební plocha po ostříhání a/nebo oholení 0,5 ml 10% natriumdodecylsulfátu ve vazelíně za účelem vyvolání místního podráždění.

Den 7 – exponovaná skupina

Zkušební plocha se opět zbaví srsti. Zkoušenou látkou ve vhodném vehikulu (volba vehikula by měla být odůvodněna; pevné látky se jemně rozetřou a vpraví do vhodného vehikula; kapaliny lze aplikovat přímo) se napustí filtrační papír (2 × 4 cm), který se přiloží na zkušební plochu a udržuje se ve styku s kůží pomocí okluzivního obvazu po dobu 48 hodin.

Den 7 – kontrolní skupina

Zkušební plocha se opět zbaví srsti. Samotné vehikulum se podobným způsobem nanese na zkušební plochu a udržuje se na ní pomocí okluzivního obvazu po dobu 48 hodin.

1.6.1.3.2 Provokace

Den 21

Boky exponovaných i kontrolních zvířat se zbaví srsti. Na jeden bok zvířete je aplikována zkoušená látka na náplasti nebo v komůrce a na druhý bok se stejným způsobem aplikuje pouze vehikulum.

Náplasti se udržují ve styku s kůží pomocí okluzivního obvazu po 24 hodinách.

Kontrolní skupina se exponuje stejným způsobem.

Dny 23 a 24

— 21 hodin po odstranění náplastí se provokační plocha vyčistí, podle potřeby se z ní odstraní srst,

— o tři hodiny později (48 hodin od začátku aplikace provokační dávky) se provede pozorování a zaznamená se kožní reakce,

— 24 hodin (po 72 hodinách) po tomto pozorování se provede druhé pozorování a zaznamená se.

Za účelem vyjasnění výsledků získaných při první provokaci by mělo být zváženo provedení druhé provokace, a to přibližně týden poté a podle potřeby s novou kontrolní skupinou exponovanou pouze vehikulu.

1.6.1.3.3 Pozorování a hodnocení

Všechny kožní reakce a neobvyklé nálezy, které jsou důsledkem indukčních a provokačních postupů, se zaznamenají a uvedou ve zprávě.

K objasnění nejasných reakcí nebo odezev maskovaných zabarvením kůže zkoušenou látkou mohou být použity techniky, jako je histopatologické vyšetření nebo měření tloušťky kožní řasy.

1.6.2 **Bühlerova zkouška**

1.6.2.1 *Příprava*

Provede se náhodný výběr zdravých mladých albinotických morčat, která se přiřadí do jednotlivých experimentálních a kontrolních skupin. Před aplikací látky se v lopatkové oblasti odstraní srst stříháním nebo holením. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození kůže.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

1.6.2.2.1 Pokusná zvířata

Použijí se běžně užívané laboratorní albinotické kmeny morčete o hmotnosti méně než 500 g.

1.6.2.2.2 Počet a pohlaví

Lze použít samce i samice. Jsouli použity samice, musí být nullipary a nesmí být březí. V exponované skupině se použije minimálně 20 zvířat a v kontrolní skupině nejméně 10 zvířat. Použití menšího počtu zvířat musí být odůvodněno. V případě nejasných výsledků může být histopatologickým vyšetřením usnadněno rozhodnutí, zda by měla být zkouška opakována s další sadou zvířat.

1.6.2.2.3 Úrovně dávek

Koncentrace zkoušené látky se pro každou indukční fázi upraví na nejvyšší úroveň, kterou zvířata dobře systémově snášejí a která v případě dráždivých látek vyvolává u většiny zvířat mírné až střední podráždění. Jako provokační koncentrace se použije maximální koncentrace, která u nesenzibilizovaných zvířat nevyvolává podráždění kůže. Tyto koncentrace lze stanovit v omezeném předběžném experimentu (na dvou nebo třech zvířatech).

1.6.2.2.4 Doba pozorování

V průběhu indukčního období se provádějí pozorování za účelem zjistit možné dráždivé účinky. Po ukončení provokační expozice se za 24 hodin a za 48 hodin po odstranění náplasti, tj. 30 a 54 hodin po začátku aplikace, zaznamenává reakce kůže.

1.6.2.3 *Postup*

Zvířata se zváží před zahájením zkoušky a na jejím konci.

Postup má dvě stádia:

1.6.2.3.1 Indukce

Den 0 – exponovaná skupina

Jeden bok se zbaví srsti. Plátek mulu se nasytí 0,5 ml zkoušené látky ve vhodném vehikulu (volba vehikula by měla být odůvodněna; je-li to vhodné, lze kapaliny aplikovat přímo). Aplikuje se přímo na zkušební plochu a udržuje se ve styku s kůží okluzivním plátkem nebo komůrkou a vhodným obvazem po dobu 6 hodin.

Den 0 – kontrolní skupina

Jeden bok se zbaví srsti. Samotné vehikulum se podobným způsobem nanese na zkušební plochu. Udržuje se ve styku s kůží okluzivním plátkem nebo komůrkou a vhodným obvazem po dobu 6 hodin.

Dny 7 a 14

Stejná aplikace jako v den 0 se na stejné zkušební ploše (podle potřeby zbavené srsti) provede v den 7 a v den 14.

1.6.2.3.2 Provokace

Den 28

Druhý bok exponovaných a kontrolních zvířat se zbaví srsti. Okluzivní plátek nebo komůrka obsahující 0,5 ml zkoušené látky v maximální nedráždivé koncentraci se aplikuje na zadní část boku exponovaných zvířat. Na přední část boku se také aplikuje okluzní plátek nebo komůrka pouze s vehikulem.

Okluzivní plátky se udržují ve styku s kůží vhodným obvazem po dobu 6 hodin.

Expozice kontrolní skupiny se provede stejným způsobem.

Dny 29 a 30

— 21 hodin po odstranění plátku se exponovaná plocha vyčistí, podle potřeby se z ní odstraní srst,

— o tři hodiny později (30 hodin od začátku aplikace provokační dávky) se provede pozorování kožní odezvy a zaznamená se,

— 24 hodin po tomto pozorování (po 54 hodinách od začátku aplikace provokační dávky) se provede druhé pozorování a zaznamená se.

1.6.2.3.3 Pozorování a hodnocení

Všechny kožní reakce a neobvyklé nálezy, které jsou důsledkem indukčních a provokačních postupů, se zaznamenají a uvedou ve zprávě.

K objasnění nejasných reakcí nebo odezev maskovaných zabarvením kůže zkoušenou látkou mohou být použity techniky, jako je histopatologické vyšetření nebo měření tloušťky kožní řasy.

2. **DATA (zkouška GPMT a Bühlerova zkouška)**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každé zvíře uvede reakce kůže při každém pozorování.

3. **ZPRÁVY (zkouška GPMT a Bühlerova zkouška)**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE (zkouška GPMT a Bühlerova zkouška)

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitý kmen morčat,

— zkušební podmínky, koncentrace vehikula a zkoušené látky použité při indukci a provokaci,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— hmotnosti jednotlivých zvířat na počátku a konci zkoušky,

— každé pozorování provedené na každém zvířeti, včetně systému hodnocení, bylli použit,

— rozbor výsledků,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE (zkouška GPMT a Bühlerova zkouška)

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

B.7 ORÁLNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává orálně, denně po dobu 28 dní v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, a to každé skupině jedna dávka. Během období podávání se zvířata denně pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava**

Nejméně pět dnů před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých zvířat, která se přiřadí do experimentálních skupin. Zkoušenou látku lze podávat potravou, sondou, v kapslích nebo v pitné vodě. Všem zvířatům by měly být dávky podávány během celého experimentálního období stejnou metodou. Jsouli pro usnadnění podávání dávek použity vehikulum nebo jiné přísady, mělo by o nich být známo, že nemají toxické účinky. V případě potřeby lze použít existující data.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Nejsou-li důvody proti tomu, je upřednostněným druhem potkan. Použijí se mladá zdravá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů a podávání látky by mělo nejlépe začít, dokud jsou potkani mladší než šest týdnů a v každém případě nejsou starší než osm týdnů.

Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat překročit ±20 % příslušné střední hodnoty.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 10 zvířat (pět samic a pět samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud se plánuje usmrcování zvířat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před koncem studie. Kromě toho může být satelitní skupině 10 zvířat (pět zvířat každého pohlaví) podávána vysoká úroveň dávky po dobu 28 dní a 14 dní po podávání se pozoruje vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických účinků. Používá se také satelitní skupina 10 kontrolních zvířat (pět zvířat každého pohlaví).

1.6.2.3 *Úrovně dávky*

Měly by být použity nejméně tři úrovně dávek a kontrolní skupina. Se zvířaty v kontrolní skupině se zachází stejně jako se zvířaty v exponované skupině s výjimkou podávání zkoušené látky. Použije-li se pro usnadnění aplikace vehikulum, podá se kontrolní skupině stejné množství vehikula, jaké obdrží skupina, které se podává nejvyšší dávka. Nejvyšší úroveň dávky by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí, nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné známky toxicity. Je-li k dispozici použitelný odhad expozice člověka, měla by jej nejnižší úroveň překračovat. V ideálním případě by měla střední úroveň dávky vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použije-li se více než jedna střední úroveň dávky, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupinách s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolní skupině by měl být výskyt uhynutí nízký, aby bylo možné provést smysluplné hodnocení výsledků.

Podává-li se zkoušená látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm nebo v $mg \cdot kg^{-1}$ potravy), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. Aplikuje-li se látka sondou, mělo by se tak stát každý den přibližně ve stejnou dobu, a dávkování by mělo být pravidelně (týdně nebo každých čtrnáct dnů) přizpůsobeno, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Jestliže 28denní studie provedená níže popsaným způsobem neprokáže žádné toxické účinky při dávce 1 000 $mg \cdot kg^{-1}$ tělesné hmotnosti za den nebo při vyšší úrovni dávky odpovídající možné expozici člověka, je-li známa, není další zkoušení nutné. U látek s nízkou toxicitou je důležité zajistit, aby množství a jiné vlastnosti zkoušené látky při podávání v potravě neovlivňovaly normální nutriční požadavky.

1.6.2.5 *Doba pozorování*

Zvířata se pozorují denně a zaznamenají se příznaky toxicity, včetně doby jejich nástupu, stupně a trvání. Zaznamená se doba uhynutí a doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí.

1.6.3 **Postup**

Zkoušená látka se zvířatům podává nejlépe 7 dní v týdnu po dobu 28 dnů. Zvířata v satelitní skupině určené pro následná pozorování by neměla být dalších 14 dnů exponována, aby se posoudilo zotavení z toxických účinků, nebo jejich přetrvávání.

Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Jednou týdně se provedou měření spotřeby potravy (a vody, je-li zkoušená látka podávána v pitné vodě) a zvířata se jednou týdně zváží.

Pravidelné pozorování zvířat je nezbytné k tomu, aby se zajistilo, že u zvířat pokud možno nedochází ke ztrátám např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Po ukončení studie se všechna přeživší zvířata z jiných než satelitních skupin pitvají. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Na konci zkušebního období se u všech zvířat, včetně kontrolních, provedou tato vyšetření:

1. Hematologické vyšetření: stanovit alespoň hematokrit, koncentraci hemoglobinu, počet erytrocytů, celkový a diferenciální počet leukocytů a srážlivost krve.

2. Biochemické vyšetření krve: stanovení alespoň jednoho parametru funkce jater a ledvin: alaninaminotransferasa v séru (dříve známá jako glutamátpyruváttransaminasa), aspartátaminotransferasa séra (dříve známá jako glutamátoxalacetáttransaminasa), močovinový dusík, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru.

Mezi jiná stanovení, která mohou být potřebná pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glukosy na lačno, analýza lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy.

Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro širší vyšetření pozorovaných účinků.

1.6.3.1 *Pitva*

U všech zvířat použitých ve studii se provede celková pitva. Alespoň játra, ledviny, nadledviny a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání. Orgány a tkáně (játra, ledviny, slezina, varlata, nadledviny, srdce i všechny orgány s lézemi nebo změnami velikosti) je třeba uchovávat ve vhodném médiu s ohledem na pozdější histopatologická vyšetření.

1.6.3.2 *Histopatologické vyšetření*

U skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u kontrolní skupiny se provede histologické vyšetření všech uchovaných orgánů a tkání. Orgány a tkáně, u nichž se ve skupině s nejvyšší dávkou objeví poškození způsobená zkoušenou látkou, se podrobí vyšetření i u všech skupin s nižšími dávkami. U zvířat ze všech satelitních skupin se provede histologické vyšetření se zvláštním důrazem na orgány a tkáně, na kterých byly pozorovány účinky u ostatních exponovaných skupin.

2. **DATA**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou exponovanou skupinu uvede počet zvířat na začátku zkoušky a počet zvířat, která vykazují jednotlivé typy lézí.

Všechny pozorované výsledky se zhodnotí vhodnou statistickou metodou. Lze použít jakoukoli uznanou statistickou metodu.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,
— zkušební podmínky,
— úrovně dávek (včetně vehikula, byloli použito) a koncentrace,
— údaje o toxických odezvách podle pohlaví a úrovně dávky,
— podle možnosti úroveň, při které nedochází k účinkům,
— doba uhynutí během studie, nebo zda zvířata přežila do konce zkoušky,
— toxické a jiné účinky,
— doba pozorování každé neobvyklé známky a její další vývoj,
— údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,
— provedená hematologická vyšetření a všechny výsledky,
— provedená klinická biochemická vyšetření a všechny výsledky,
— pitevní nálezy,
— podrobný popis všech histopatologických nálezů,
— statistické zpracování výsledků, kde je to možné,
— diskuse a výsledky,
— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

B.8 INHALAČNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Je vhodné mít předběžné informace o distribuci velikosti částic, tenzi par, bodu tání, bodu varu, teplotě vzplanutí a popřípadě výbušnosti látky.

Viz také obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Několik skupin pokusných zvířat se denně po 28 dní vystaví po definovanou dobu zkoušené látce v odstupňovaných koncentracích, a to každá skupina jedné koncentraci. Je-li použito pro usnadnění přípravy vhodné koncentrace zkoušené látky v ovzduší vehikulum, použije se kontrolní skupina exponovaná vehikulu. Během expozice se zvířata denně pozorují a zjišťují se toxické účinky. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava**

Nejméně pět dnů před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých zvířat, která se přiřadí do požadovaného počtu skupin. Je-li to nezbytné, přidá se ke zkoušené látce vhodné vehikulum tak, aby v ovzduší vznikla požadovaná koncentrace zkoušené látky. Pokud se užijí pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiné přísady, musí být o nich známo, že nemají toxické účinky. V případě potřeby je možno použít stávající údaje.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Přednostně se používá potkan, pokud nejsou proti tomu důvody. Použijí se mladá zdravá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů.

Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat překročit ±20 % příslušné střední hodnoty.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň koncentrace se použije nejméně 10 zvířat (pět samic a pět samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud se plánuje usmrcování zvířat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před koncem studie. Kromě toho může být satelitní skupině 10 zvířat (pět zvířat každého pohlaví) podávána vysoká úroveň dávky po dobu 28 dní a 14 dní po podávání se pozoruje vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických účinků. Používá se také satelitní skupina 10 kontrolních zvířat (pět zvířat každého pohlaví).

1.6.2.3 *Expoziční koncentrace*

Použijí se nejméně tři koncentrace a kontrolní skupina nebo, v případě použití vehikula, kontrolní skupina s vehikulem (v koncentraci odpovídající koncentraci vehikula při nejvyšší úrovni zkoušené látky). Se zvířaty v kontrolní skupině se zachází stejně jako se zvířaty v exponované skupině s výjimkou aplikace zkoušené látky. Nejvyšší úroveň dávky by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí, nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné známky toxicity. Je-li k dispozici použitelný odhad expozice člověka, měla by jej nejnižší úroveň překračovat. V ideálním případě by měla střední úroveň dávky vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použije-li se více než jedna střední úroveň dávky, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupinách s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolní skupině by měla být četnost uhynutí nízká, aby bylo možné provést smysluplné hodnocení výsledků.

1.6.2.4 *Doba expozice*

Denní expozice má trvat 6 hodin, ale může se použít jiná doba, majíli být splněny specifické požadavky.

1.6.2.5 *Zařízení*

Pro pokusy se zvířaty by měla být použita inhalační zařízení, která umožňují dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Použije-li se expoziční komora, měla by její konstrukce minimalizovat stísněnost pokusných zvířat a maximalizovat inhalační expozici zkoušené látce. Pro zajištění stálosti atmosféry v komoře by obecně neměl celkový „objem“, který zaujímají pokusná zvířata, přesáhnout 5 % objemu expoziční komory. Lze použít jednotlivé expoziční komory pro orálněnasální expozici nebo pro expozici hlavy nebo pro expozici celého těla; první dva způsoby expozice minimalizují příjem látky jinými cestami.

1.6.2.6 *Doba pozorování*

Zvířata se pozorují denně během expozice a zotavení s cílem zaznamenat příznaky toxicity. Zaznamená se doba uhynutí a doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí.

1.6.3 **Postup**

Zvířata se vystaví zkoušené látce denně, pět až sedm dnů v týdnu, po dobu 28 dnů. Zvířata v satelitních skupinách určených pro následná pozorování by neměla být dalších 14 dnů exponována, aby se posoudilo zotavení z toxických účinků, nebo jejich přetrvávání. Teplota, při které má být zkouška provedena, by měla být udržována na 22 ±3 °C.

Relativní vlhkost má být v ideálním případě udržována nejlépe mezi 30 % a 70 %, ale v určitých případech to nemusí být realizovatelné (např. zkoušky některých aerosolů). Udržování mírného podtlaku v komoře (≤5 mm vodního sloupce) zabrání unikání zkoušené látky do okolí. Během expozice se nepodává potrava ani voda.

Použijí se dynamické inhalační systémy s vhodným kontrolním analytickým systémem pro regulaci koncentrace. Aby bylo dosaženo vyhovujících koncentrací, doporučuje se provést předběžný experiment. Průtok by měl být nastaven tak, aby zajistil homogenní podmínky v celé expoziční komoře. Systém by měl zajistit, že bude stálých podmínek expozice dosaženo co nejrychleji.

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

a) průtok vzduchu (kontinuálně);

b) skutečná koncentrace zkoušené látky v dýchací zóně. Během denní expozice se nemá koncentrace lišit od střední hodnoty o více než ±15 %. U některých aerosolů však nelze této úrovně regulace dosáhnout a připouští větší rozsah kolísání. Během celé studie mají být každodenní koncentrace co nejstálejší. V případě aerosolů se provádí nejméně jedna analýza velikosti částic u každé experimentální skupiny jednou týdně;

c) teplota a vlhkost, pokud možno kontinuálně.

Během expozice a po jejím ukončení se provádějí a systematicky zaznamenávají pozorování; záznamy se vedou pro každé jednotlivé zvíře. Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se příznaky toxicity, včetně doby jejich nástupu, stupně a trvání. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Každý týden se zvířata váží. Doporučuje se také, aby byla každý týden zjištěna spotřeba potravy. Pravidelné pozorování zvířat je nezbytné k tomu, aby se zajistilo, že u zvířat nedochází ke ztrátám, např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Po ukončení studie se všechna přeživší zvířata z jiných než satelitních skupin pitvají. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Na konci zkušebního období se u všech zvířat, včetně kontrolních, provedou tato vyšetření:

i) Hematologické vyšetření: stanovit alespoň hematokrit, koncentraci hemoglobinu, počet erytrocytů, celkový a diferenciální počet leukocytů a srážlivost krve.

ii) Klinické biochemické vyšetření krve: stanovení alespoň jednoho parametru funkce jater a ledvin: alaninaminotransferasa v séru (dříve známá jako glutamátpyruváttransaminasa), aspartátaminotransferasa séra (dříve známá jako glutamátoxalacetáttransaminasa), močovinový dusík, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru.

Mezi jiná stanovení, která mohou být potřebná pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glukosy na lačno, analýza lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy.

Další klinické biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro širší vyšetření pozorovaných účinků.

1.6.3.1 *Pitva*

U všech zvířat použitých ve studii se provede celková pitva. Alespoň játra, ledviny, nadledviny, plíce a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání. Orgány a tkáně (dýchací systém, játra, ledviny, slezina, varlata, nadledviny a srdce, i všechny orgány s lézemi nebo změnami velikosti) je třeba uchovávat ve vhodném médiu s ohledem na pozdější histopatologická vyšetření. Plíce je třeba vyjmout bez poškození, zvážit a fixovat vhodným médiem tak, aby se zachovala struktura.

1.6.3.2 *Histopatologické vyšetření*

U skupiny, které byla podána nejvyšší koncentrace, a u kontrolní skupiny se provede histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Orgány a tkáně, u nichž se ve skupině s nejvyšší koncentrací objeví poškození způsobená zkoušenou látkou, se podrobí histologickému vyšetření i u všech skupin s nižšími dávkami. U zvířat ze všech satelitních skupin se provede histologické vyšetření se zvláštním důrazem na orgány a tkáně, na kterých byly pozorovány účinky u ostatních exponovaných skupin.

2. **DATA**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou exponovanou skupinu uvede počet zvířat na začátku zkoušky a počet zvířat, která vykazují jednotlivé typy léze.

Všechny výsledky se zhodnotí vhodnou statistickou metodou. Lze použít jakoukoli uznanou statistickou metodu.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,

— zkušební podmínky:

Popis expozičního zařízení, včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy aerosolů, klimatizačního systému, popis čistění odpadního vzduchu a způsobu umístění zvířat ve zkušební komoře, pokud je použita. Popíší se zařízení pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, popřípadě stálosti koncentrací nebo distribuce velikosti částic aerosolu.

Údaje o expozici

Měly by být zpracovány do tabulky s uvedením středních hodnot a charakteristik variability (např. směrodatné odchylky) a měly by pokud možno zahrnovat tyto informace:

a) průtok vzduchu inhalačním zařízením;

b) teplota a vlhkost vzduchu;

c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení, dělené objemem vzduchu);

d) povaha vehikula, pokud bylo použito;

e) skutečná koncentrace v dýchací zóně;

f) hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (GSD),

— údaje týkající se odezev podle pohlaví a koncentrace,

— doba uhynutí nebo údaj o přežití zvířat do ukončení zkoušky,

— popis toxických nebo jiných účinků, úroveň, při které nedochází k účinkům,

— doba pozorování každého neobvyklého příznaku a jeho další vývoj,

— údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,

— provedená hematologická vyšetření a výsledky,

— provedená klinická biochemická vyšetření a výsledky,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— statistické zpracování výsledků, kde je to možné,

— diskuse a výsledky,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

B.9 DERMÁLNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně po dobu 28 dní nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Během doby aplikace se zvířata denně pozorují s cílem zjistit příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

Nejméně 5 dní před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Krátce před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Vyholení srsti je rovněž možné, mělo by se však provést asi 24 hodin před zkouškou. Ostříhání nebo oholení je potřeba obvykle opakovat přibližně v týdenních intervalech. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže. Pro aplikaci zkoušené látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při rozhodování o velikosti připravované plochy kůže, která má být zbavena srsti, a o velikosti krycího obvazu je třeba vzít v úvahu hmotnost zvířat. Při zkouškách pevných látek, které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou nebo podle potřeby vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné. Aplikace se provádí pět až sedm dnů v týdnu.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Mohou být použiti dospělí potkani, králíci nebo morčata. Lze použít i jiné živočišné druhy, ale jejich použití musí být zdůvodněno.

Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ±20 % příslušné střední hodnoty.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávky se použije nejméně 10 zvířat (pět samic a pět samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud se plánuje usmrcování zvířat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před koncem studie. Mimoto je možné exponovat po dobu 28 dnů satelitní skupinu 10 zvířat (pět zvířat každého pohlaví) vysokou dávkou a během následujících 14 dnů po podávání sledovat vratnost, trvání nebo zpožděný výskyt toxických účinků. Používá se také satelitní skupina 10 kontrolních zvířat (pět zvířat každého pohlaví).

1.6.2.3 *Úrovně dávek*

Použijí se nejméně tři úrovně dávek a kontrolní skupina nebo, je-li použito vehikulum, kontrolní skupina s vehikulem. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně. Zkoušená látka by měla být aplikována každý den přibližně ve stejnou dobu a dávkování by mělo být pravidelně (týdně nebo každých čtrnáct dnů) přizpůsobeno, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. S výjimkou aplikace zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v exponované skupině. Použije-li se pro usnadnění aplikace vehikulum, aplikuje se na kontrolní skupinu stejným způsobem a ve stejném množství, jako ve skupině, které se aplikuje nejvyšší dávka. Nejvyšší úroveň dávky by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí, nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné známky toxicity. Je-li k dispozici použitelný odhad expozice člověka, měla by jej nejnižší úroveň překračovat. V ideálním případě by měla střední úroveň dávky vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použije-li se více než jedna střední úroveň dávky, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupinách s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolní skupině by měla být četnost uhynutí nízká, aby bylo možné provést smysluplné hodnocení výsledků.

Vede-li aplikace zkoušené látky k závažnému podráždění kůže, je třeba snížit koncentraci, což u vysoké úrovně dávky může vést k omezení nebo vyloučení ostatních toxických účinků. Došlo-li navíc k závažnému poškození kůže, je nutné zkoušku ukončit a provést ji znovu s nižšími koncentracemi.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Nevyvolá-li při předběžné studii aplikace dávky 1 000 $mg \cdot kg^{-1}$ nebo vyšší dávky, která odpovídá možné expozici člověka, je-li známa, žádné toxické účinky, není další zkoušení potřebné.

1.6.2.5 *Doba pozorování*

Zvířata se pozorují denně s cílem zaznamenat příznaky toxicity. Zaznamená se doba uhynutí a doba, kdy se známky toxicity objeví a vymizí.

1.6.3 **Postup**

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zvířatům se aplikuje zkoušená látka denně nejlépe 7 dní v týdnu po dobu 28 dnů. Zvířata ve všech satelitních skupinách určených pro následná pozorování by neměla být dalších 14 dnů exponována, aby se posoudilo zotavení z toxických účinků, nebo jejich přetrvávání. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně.

Zkoušená látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. V případě vysoce toxických látek může být tato plocha menší; co největší část této plochy by se však měla pokrýt co nejslabší a nejstejnoměrnější vrstvou.

Během expozice se zkoušená látka udržuje ve styku s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Zkušební plocha se dále vhodným způsobem překryje, aby se mulový obvaz a zkoušená látka fixovaly a aby zvířata zkoušenou látku nepožila. K zamezení požití látky je možno použít i prostředků pro omezení volnosti pohybu, úplné znehybnění však nelze nedoporučit. Jako alternativní metody je možno použít „ochranného límce“.

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem očištění kůže.

Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenají se příznaky toxicity, včetně doby jejich nástupu, stupně a trvání. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Každý týden se zvířata váží. Doporučuje se také, aby byla každý týden zjištěna spotřeba potravy. Pravidelné pozorování zvířat je nezbytné k tomu, aby se zajistilo, že u zvířat nedochází ke ztrátám např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Po ukončení studie se všechna přeživší zvířata z jiných než satelitních skupin pitvají. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Na konci zkušebního období se u všech zvířat, včetně kontrolních, provedou tato vyšetření:

1. Hematologické vyšetření: stanovit alespoň hematokrit, koncentraci hemoglobinu, počet erytrocytů, celkový a diferenciální počet leukocytů a srážlivost krve.

2. Klinické biochemické vyšetření krve, včetně stanovení alespoň jednoho parametru funkce jater a ledvin: alaninaminotransferasa v séru (dříve známá jako glutamátpyruváttransaminasa), aspartátaminotransferasa séra (dříve známá jako glutamátoxalacetáttransaminasa), močovinový dusík, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru.

Mezi jiná stanovení, která mohou být potřebná pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glukosy na lačno, analýza lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy.

Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro širší vyšetření pozorovaných účinků.

1.6.4 **Pitva**

U všech zvířat použitých ve studii se provede celková pitva. Alespoň játra, ledviny, nadledviny a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání. Orgány a tkáně, tj. normální a exponovaná kůže, játra, ledviny, slezina, varlata, nadledviny, srdce a cílové orgány (orgány s lézemi nebo změnami velikosti), je třeba uchovávat ve vhodném médiu s ohledem na pozdější histopatologická vyšetření.

1.6.5 **Histopatologické vyšetření**

U skupiny, které byla aplikována vysoká dávka, a u kontrolní skupiny se provede histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Orgány a tkáně, u nichž se ve skupině s nejvyšší úrovní dávky objeví poškození způsobená zkoušenou látkou, se podrobí histologickému vyšetření i u všech skupin s nižšími dávkami. U zvířat ze satelitní skupiny se provede histologické vyšetření se zvláštním důrazem na orgány a tkáně, na kterých byly pozorovány účinky u ostatních exponovaných skupin.

2. **DATA**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou exponovanou skupinu uvede počet zvířat na začátku zkoušky a počet zvířat, která vykazují jednotlivé typy léze.

Všechny výsledky se zhodnotí vhodnou statistickou metodou. Lze použít jakoukoli uznávanou statistickou metodu.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— údaje o zvířatech (druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.),
— zkušební podmínky (včetně typu obvazu: okluzivní nebo neokluzivní),
— úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
— dávka, při které nedochází k účinkům, pokud je to možné,
— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky,
— doba uhynutí během studie, nebo zda zvířata přežila do konce zkoušky,
— toxické a jiné účinky,
— doba pozorování každého neobvyklého příznaku a jeho další vývoj,
— údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,
— provedená hematologická vyšetření a výsledky,
— provedená klinická biochemická vyšetření a výsledky,
— pitevní nálezy,
— podrobný popis všech histopatologických nálezů,
— statistické zpracování výsledků, kde je to možné,
— diskuse a výsledky,
— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

B.10 MUTAGENITA (CYTOGENETICKÁ ZKOUŠKA NA SAVČÍCH BUŇKÁCH IN VITRO)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (C).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Tato cytogenetická zkouška *in vitro* je krátkodobou zkouškou mutagenity pro detekci strukturních chromosomových aberací v kultivovaných savčích buňkách. Lze použít jak kultur stabilizovaných buněčných linií, tak primárních buněčných kultur. Po expozici zkoušené látce v přítomnosti i nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému se do buněčné kultury aplikuje mitotický jed, např. kolchicin, ke kumulaci buněk ve stádiu mitózy podobném metafázi (metafáze C). Buňky se ve vhodném okamžiku shromáždí a připraví se chromosomové preparáty. Preparáty se obarví a metafáze se analyzují na chromosomové abnormality.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

1.6.1.1 *Buňky*

Používají se stabilizované buněčné linie nebo kultury primárních buněk, např. buňky křečka čínského nebo lidské lymfocyty. Před aplikací na buňky se zkoušená chemická látka rozpustí v kultivačním médiu nebo ve vhodném vehikulu.

1.6.1.2 *Metabolický aktivační systém*

Buňky se exponují zkoušené látce jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců, zpracovaná činidly indukujícími enzymy.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Počet kultur:

Pro každý experimentální bod se používají nejméně dvě kultury.

Použití negativních a pozitivních kontrol:

Jako negativní kontroly se používají rozpouštědlo (jestliže není rozpouštědlem kultivační médium nebo voda), aktivační směs z jaterních enzymů, aktivační směs z jaterních enzymů v rozpouštědle a neupravená kultura.

V každém experimentu se použije pozitivní kontrola; použije-li se k aktivaci zkoušené chemické látky směs pro metabolickou aktivaci z jaterních enzymů, musí být jako pozitivní kontrola použita látka, která prokazatelně vyžaduje metabolickou aktivaci.

Úroveň dávek:

Jsou použity nejméně tři dávky zkoušené látky pokrývající rozpětí nejméně jednoho řádu dávky. Nejvyšší dávka by měla blokovat mitotickou aktivitu asi o 50 %, nebo vykazovat jiné známky cytotoxicity. Není-li látka toxická, měla by být zkoušena až na mez rozpustnosti, nebo do maximální koncentrace 5 mg ml^{-1}.

Kultivační podmínky:

Použije se vhodné kultivační médium a kultivační podmínky (např. teplota, kultivační nádoba, koncentrace CO_2 vlhkost).

1.6.3 **Postup**

1.6.3.1 *Příprava kultur*

Stabilizované buněčné linie: Buňky se získají ze zásobních kultur (např. trypsinací nebo setřepáním), nasadí se ve vhodné hustotě do kultivačních nádob a inkubují při 37 °C.

Lidské lymfocyty: Ke kultivačnímu médiu obsahujícímu fytohemaglutinin, telecí fetální sérum a antibiotika se přidá plně heparinizovaná krev a inkubuje se při 37 °C.

1.6.3.2 *Expozice kultur zkoušené látce*

i) Expozice bez směsi pro metabolickou aktivaci z jaterních enzymů.

Je třeba, aby všechny expozice pokud možno pokrývaly nejméně jeden celý buněčný cyklus, a plány fixace musí zajistit analýzu buněk z první mitózy po expozici v různých stádiích cyklu.

Pokud expozice nepokrývá celý buněčný cyklus, zvolí se různé doby fixace tak, aby se odebraly vzorky buněk, které byly během expozice v různých fázích buněčného cyklu tj. G_1, S a G_2.

Zkoušené chemické látky se přidávají ke kulturám stabilizovaných buněčných linií v exponenciální fázi růstu. Kultury lidských lymfocytů se exponují, když jsou částečně synchronizovány.

ii) Expozice se směsí pro metabolickou aktivaci z jaterních enzymů.

Pro účely expozice by měla být zkoušená látka přítomna spolu s aktivačním systémem co nejdéle, aniž by přitom vyvolávala toxické účinky na buňky. Pokud není možné expozici provést tak, aby pokrývala celé trvání buněčného cyklu, protože přítomnost zkoušené látky by vyvolala v buňkách toxické účinky, zvolí se doby fixace tak, aby byly odebrány vzorky, které byly během expozice v různých fázích buněčného cyklu, tj. G_1, S a G_2.

Sklizení buněk:

Před sklizením se na buněčné kultury po vhodnou dobu aplikuje inhibitor dělicího vřeténka. Každá kultura se k analýze chromosomů sklízí a zpracovává samostatně. Jsou nezbytné alespoň dvě doby sklizení. Doporučuje se, aby k prvnímu sklizení došlo v době odpovídající konci buněčného cyklu a ke druhému později. Tím se pokryjí všechny fáze buněčného cyklu a počítá se s jeho případným zpožděním.

1.6.3.3 *Příprava chromosomových preparátů*

Příprava preparátů pro analýzu chromosomů zahrnuje hypotonizaci buněk, jejich fixaci, nanesení na podložní sklíčko a obarvení buněk.

Analýza:

Nejméně 100 dobře rozprostřených metafází se pro každou kulturu analyzuje na chromosomové aberace. Podložní sklíčka se před analýzou kódují. U lidských lymfocytů se analyzují pouze metafáze se 46 centromerami.

Ve stabilizovaných buněčných liniích se vyhodnocují pouze metafáze, u nichž se počet centromer neliší od modálního počtu o více než ±2 centromery.

Kromě toho je pro každou úroveň dávky třeba vyhodnotit mitotický index nebo případně jiný ukazatel cytotoxicity.

2. **DATA**

Data se zpracují do tabulky. Chromatidové aberace (gapy, zlomy, výměny), chromosomové aberace (např. gapy, zlomy, dvojtečky, prstence, dicentrické a polycentrické chromosomy) a počet aberantních metafází (včetně gapů a bez gapů) se uvedou samostatně pro všechny exponované a kontrolní kultury.

Data se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

Výsledky se musí porovnat se souběžnými negativními kontrolami.

Provedou se nejméně dva nezávislé experimenty. Je-li to vědecky zdůvodnitelné, může stačit jeden experiment. Není nezbytné provádět druhý experiment tímtéž způsobem jako první experiment. K získání výstižnějších dat může být naopak vhodnější některé zkušební podmínky pozměnit.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použité buňky,

— zkušební podmínky: složení média, koncentrace CO_2, teplota při inkubaci, doba inkubace, úrovně dávek, doba expozice, doba působení použitého mitotického jedu a jeho koncentrace, typ metabolického aktivačního systému, pozitivní a negativní kontroly,

— počet buněčných kultur,

— počet analyzovaných metafází (údaje se uvedou jednotlivě pro každou kulturu),

— mitotický index nebo jiné známky cytotoxicity,

— typ a počet aberací jednotlivě pro každou exponovanou a kontrolní kulturu, modální počet chromosomů v použitých stabilizovaných buněčných liniích,

— statistické vyhodnocení,

— rozbor výsledků,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

B.11 MUTAGENITA (CYTOGENETICKÁ ANALÝZA CHROMOSOMŮ V BUŇKÁCH KOSTNÍ DŘENĚ SAVCŮ *IN VIVO*)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (C).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Tato cytogenetická zkouška *in vivo* je krátkodobou zkouškou mutagenity pro zjištění strukturních chromosomových aberací. Obecně se hodnotí chromosomové aberace v prvních mitózách po expozici. V případě chemických mutagenů je většina indukovaných aberací chromatidového typu.

V této metodě se používají buňky kostní dřeně savců, kterým se vhodnou cestou aplikuje zkoušená látka a kteří se v určitých časových intervalech usmrtí. Před usmrcením se zvířatům aplikuje mitotický jed, např. kolchicin, ke kumulaci buněk ve stádiu mitózy podobném metafázi (metafáze C). Z buněk se připraví preparáty chromosomů sušené na vzduchu, ty se obarví a metafáze se vyšetřují pod mikroskopem na chromosomové aberace.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava**

Zkoušené látky se rozpustí ve fyziologickém roztoku. Pokud jsou v něm nerozpustné, rozpustí se nebo suspendují ve vhodných vehikulech.

Použijí se čerstvě připravené roztoky zkoušené látky. Použije-li se pro usnadnění dávkování vehikulum, nesmí interferovat se zkoušenou látkou ani působit toxicky.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Používají se hlodavci, např. potkani, myši nebo křečci čínští. Provede se náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se rozdělí do experimentálních a kontrolních skupin.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

V každé experimentální i kontrolní skupině se použije nejméně pět samic a pět samců. Pokud se v plánu experimentu předpokládá více intervalů sledování po expozici, usmrtí se v každém z nich 10 zvířat na skupinu.

Pro pozitivní kontrolní skupinu postačuje jeden odběr.

1.6.2.3 *Způsob aplikace*

Zkoušené látky se obvykle aplikují jen jednou. Na základě toxikologických informací lze realizovat opakované aplikace. Lze je však použít pouze tehdy, nevykazuje-li zkoušená látka cytotoxické účinky na buňky kostní dřeně. Obvyklými způsoby aplikace jsou orální podání a intraperitoneální injekce. Podle potřeby mohou být vhodné i jiné způsoby aplikace.

1.6.2.4 *Použití negativních a pozitivních kontrol*

Pro pozitivní kontrolu se používá látka, o které je známo, že způsobuje *in vivo* chromosomové aberace; součástí každého experimentu je také negativní kontrolní skupina (s rozpouštědlem).

1.6.2.5 *Úroveň dávek*

V základním kroku se používá jedna dávka zkoušené látky, přičemž se jedná o maximální tolerovanou dávku nebo takovou dávku, která vyvolává určité příznaky cytotoxicity (např. částečnou inhibici mitózy).

Maximální (limitní) dávkou u „netoxických" sloučenin, jejíž účinek po jednorázové aplikaci se má zhodnotit, je 2 000 mg kg^{-1} tělesné hmotnosti.

Jestliže se použije opakované dávkování, je limitní dávkou 1 000 mg kg^{-1} tělesné hmotnosti a den.

Je možno zvolit další dávky, jsouli pro to vědecké důvody.

Pokud zkouška slouží pro ověření, měly by se použít nejméně dvě další úrovně dávek.

1.6.3 **Postup**

Zkouška může být provedena dvěma způsoby:

i) Zvířatům se jednorázově aplikuje maximální tolerovaná dávka. Buňky se poprvé odeberou 24 hodin po aplikaci. Jsouli výsledky v této fázi jasně pozitivní, není další odběr buněk nutný. Jsouli však výsledky negativní nebo dvojznačné vzhledem k tomu, že kinetika buněčného cyklu může být ovlivněna zkoušenou látkou, provedou se další dva odběry, jeden dříve, druhý později, v přiměřené odstupu v rozmezí 6 až 48 hodin.

   Použijíli se další úrovně dávek, provede se odběr v nejcitlivějších okamžicích, nebo, Nejsou-li známy, 24 hodin po aplikaci.

ii) Pokud z informací o farmakokinetice a metabolismu vyplývá, že jsou vhodné opakované aplikace, lze je použít a odběr vzorků by měl být proveden 6 a 24 hodin po poslední aplikaci.

Příprava kostní dřeně:

Před usmrcením se zvířatům intraperitoneálně vstříkne vhodná dávka mitotického jedu, aby se získal dostatečný počet buněk, které jsou v metafázi C. Kostní dřeň se získá z obou stehenních kostí zvířat, a to vypláchnutím izotonickým roztokem bezprostředně po usmrcení zvířat. Po vhodném hypotonickém zpracování se buňky fixují a nanesou na podložní sklíčko. Po vysušení na vzduchu se obarví.

Analýza:

Podložní sklíčka se před mikroskopickou analýzou kódují. Na jedno zvíře se vyšetří nejméně 50 dobře rozprostřených metafází s úplným počtem centromer na strukturní chromosomové aberace. Mimoto lze pro každé zvíře stanovit mitotický index.

2. **DATA**

Data se zpracují do tabulky. Chromatidové aberace a isochromatidové aberace (gapy, zlomy, výměny) a mitotické indexy, pokud byly zjištěny, se uvedou samostatně pro všechna exponovaná i kontrolní zvířata. Uvedou se také střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou experimentální a kontrolní skupinu. Data se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— druh, kmen a stáří použitých zvířat,

— počet zvířat každého pohlaví v experimentálních a kontrolních skupinách,

— zkušební podmínky: podrobný popis expozice a plánu odběru vzorků, úrovně dávek, doba působení použitého mitotického jedu a jeho koncentrace,

— počet analyzovaných metafází na jedno zvíře,

— mitotický index, pokud byl stanoven,

— typ a počet aberací uvedený jednotlivě pro každé exponované a kontrolní zvíře,

— známky toxicity v průběhu studie,

— statistické vyhodnocení,

— rozbor výsledků,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

B.12 MUTAGENITA (TEST MIKROJADER)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (C).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Test mikrojader je krátkodobý test pro zjištění poškození chromosomů nebo poškození mitotického aparátu chemickými látkami *in vivo* u savců. Základem této zkoušky je zvýšený výskyt mikrojader v polychromatických erytrocytech exponovaných zvířat ve srovnání s kontrolními zvířaty.

Mikrojádra se tvoří z fragmentů chromosomů nebo celých chromosomů opožděných v mitóze. Při vývoji erytrocytů z erytroblastů je jádro vytlačeno, zatímco mikrojádro může zůstat v cytoplasmě. V tomto testu se vyhodnocují mladé polychromní erytrocyty z kostní dřeně laboratorních savců, kterým byla vhodnou cestou aplikována zkoušenou látka. Kostní dřeň je extrahována, rozetřením se připraví preparáty a obarví se. Pod mikroskopem se zjistí počet mikrojader v polychromatických erytrocytech a stanoví se poměr polychromatických erytrocytů k normochromatickým erytrocytům.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava**

Zkoušené látky se rozpustí v isotonickém roztoku. Pokud jsou v něm nerozpustné, rozpustí se nebo suspendují ve vhodných vehikulech. Použije-li se vehikulum, nesmí interferovat se zkoušenou látkou ani působit toxicky. Obvykle se použijí čerstvě připravené roztoky zkoušené látky.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Je doporučeno používat myši, lze však používat i jiné savce. Provede se náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do jednotlivých experimentálních a kontrolních skupin.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

V každé experimentální i kontrolní skupině se použije nejméně pět samic a pět samců. Pokud se v plánu experimentu předpokládá více intervalů zpracování po expozici, usmrtí se v každém intervalu zpracování 10 zvířat na skupinu. Pro pozitivní kontrolní skupinu postačuje jeden odběr.

1.6.2.3 *Způsob aplikace*

Zkoušené látky se obvykle aplikují jen jednou. Na základě toxikologických informací lze realizovat opakované aplikace. Lze je však použít pouze tehdy, nevykazuje-li zkoušená látka žádné cytotoxické účinky na buňky kostní dřeně. Obvyklými způsoby aplikace jsou orální podání a intraperitoneální injekce. Podle potřeby mohou být vhodné i jiné způsoby aplikace.

1.6.2.4 *Použití negativních a pozitivních kontrol*

Při každém experimentu se použijí jak pozitivní, tak negativní (s rozpouštědlem) kontroly.

1.6.2.5 *Úroveň dávek*

V základním kroku se používá jedna dávka zkoušené látky, přičemž se jedná o maximální tolerovanou dávku nebo takovou dávku, která vyvolává určité příznaky cytotoxicity (např. změnu v poměru polychromatických a normochromatických erytrocytů).

Maximální (limitní) dávkou u „netoxických“ sloučenin, jejíž účinek po jedné aplikaci má být zhodnocen, je 2 000 mg kg^{-1} tělesné hmotnosti.

Jestliže se použije opakované dávkování, je limitní dávkou 1 000 mg kg^{-1} tělesné hmotnosti a en.

Je možno zvolit další dávky, jsouli pro to vědecké důvody.

Pokud zkouška slouží pro ověření, měly by se použít nejméně dvě další úrovně dávek.

1.6.3 **Postup**

Zkouška může být provedena dvěma způsoby:

i) Zvířatům se v jedné dávce aplikuje zkoušená látka. Odběry by měly být provedeny v okamžiku nejvyšší reakce při zkoušce, který se však může u různých látek lišit. Proto se kostní dřeň odebírá nejméně dvakrát, ne však dříve než 12 h a ne později než 48 h po aplikaci.

   Použijíli se další úrovně dávek, provede se odběr v nejcitlivějších okamžicích, nebo, Nejsou-li známy, 24 hodin po aplikaci.

ii) Pokud z informací o farmakokinetice a metabolismu vyplývá, že jsou vhodné opakované aplikace, lze je použít a odběr vzorků by měl být proveden jednou, ne dříve než 12 hodin po poslední aplikaci.

Příprava kostní dřeně

Kostní dřeň se získá z obou stehenních kostí zvířat, a to vypláchnutím telecím fetálním sérem bezprostředně po usmrcení zvířat. Sedimentace buněk se provádí centrifugováním, supernatant se odstraní. Kapky homogenní buněčné suspense se nanesou na podložní sklíčko, rozetřou se a po vysušení na vzduchu se obarví.

Analýza

Podložní sklíčka se před mikroskopickou analýzou kódují. Pro stanovení výskytu mikrojader se analyzuje nejméně 1 000 polychromatických erytrocytů na jedno zvíře.

Poměr normochromatických erytrocytů a polychromatických erytrocytů se stanoví pro každé zvíře z 1 000 erytrocytů.

2. **DATA**

Data se zpracují do tabulky. Pro všechna exponovaná zvířata i pro kontrolní zvířata se samostatně uvede počet vyhodnocených polychromatických erytrocytů, počet polychromatických erytrocytů s mikrojádry, procento buněk s mikrojádry a poměr normochromatických a polychromatických erytrocytů. Uvedou se také střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou experimentální a kontrolní skupinu. Data se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— druh, kmen a stáří použitých zvířat,

— počet zvířat každého pohlaví v experimentálních a kontrolních skupinách,

— zkušební podmínky: podrobný popis expozice a plánu odběru vzorků, úrovně dávek, údaje o toxicitě, negativní a pozitivní kontroly,

— kritéria pro hodnocení mikrojader,

— podle možnosti vztah dávky a účinku,

— příznaky toxicity v průběhu studie,

— statistické vyhodnocení,

— rozbor výsledků,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

B.13 MUTAGENITA (ZKOUŠKA NA REVERSNÍ MUTACE U BAKTERIÍ ESCHERICHIA COLI)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (C).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Reversní systém kmenů *Escherichia coli* vyžadujících tryptofan (trp) je mikrobiální systém, v němž se měří reverse $trp^- \longrightarrow trp^+$ indukovaná chemickými látkami, které způsobují záměny bází v genomu organismu.

Bakterie se vystaví působení zkoušené látky v přítomnosti systému metabolické aktivace a bez ní. Po přiměřené inkubační době na minimálním médiu se spočítají kolonie revertantů a porovnají se s počtem kolonií spontánních revertantů v neexponované kontrolní kultuře a/nebo v kontrolní kultuře s přídavkem rozpouštědla.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušku lze provést dvěma metodami: 1) metodou s předběžnou inkubací a 2) přímou miskovou zkouškou, při níž se bakterie a zkoušená látka smísí s vrchním agarem a vylije se na povrch misky se selektivním médiem.

1.6.1 **Příprava**

1.6.1.1 *Bakterie*

Bakterie se kultivují při 37 °C do pozdní exponenciální, resp. do časné stacionární fáze. Přibližná hustota buněk má být 10^8–10^9 buněk na 1 ml.

1.6.1.2 *Metabolická aktivace*

Bakterie se exponují zkoušené látce jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce připravená z jater hlodavců, upravená činidly indukujícími enzymy.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Zkušební kmeny*

Používají se tři kmeny – WP2, WP2 uvr A a WP2 uvr A pKM 101. Použijí se uznávané metody přípravy a uchovávání zásobních kultur. Musí být kontrolovány růstové požadavky a genetická identifikace kmenů, jejich citlivost na UV záření a na mitomycin C a rezistence kmene WP2 uvr A pKM 101 vůči ampicilinu. Kmeny by také měly poskytnout spontánní revertanty v očekávaných rozpětích četnosti.

1.6.2.2 *Média*

Pro růst a selekci mutantů se používá vhodné selektivní médium, společně s vhodným vrchním agarem.

1.6.2.3 *Použití negativních a pozitivních kontrol*

Souběžně musí být použity neexponované kontroly a kontroly s rozpouštědlem. Pozitivní kontroly musí být prováděny také za těmito dvěma účely:

i) Potvrzení citlivosti bakteriálních kmenů.

Pro zkoušky bez metabolické aktivace je možno použít jako pozitivní kontroly methylmethansulfonát, 4nitrochinolin1oxid nebo 1ethyl1nitrosomočovinu.

ii) Zajištění aktivity odpovídajícího metabolického aktivačního systému.

Jako pozitivní kontrolní látka pro ověření fungování metabolického aktivačního systému ve všech kmenech je vhodný 2aminoanthracen. Pokud je to možné, měla by být použita pozitivní kontrola, která patří ke stejné třídě chemických látek jako zkoušená látka.

1.6.2.4 *Množství zkoušené látky na jednu misku*

Zkouší se nejméně pět různých množství zkoušené látky s intervaly mezi miskami rovnými přibližně polovině dílku logaritmické stupnice. Látky se zkoušejí až po mez rozpustnosti, resp. toxicity. Toxicita se prokáže snížením počtu spontánních revertantů, sníženým růstem pozadí nebo stupněm přežití v exponovaných kulturách. Netoxické látky se zkoušejí až do koncentrace 5 mg na misku, než je možno považovat je za negativní.

1.6.2.5 *Podmínky inkubace*

Misky se inkubují 48 až 72 hodin při 37 °C.

1.6.3 **Postup**

Při přímé miskové zkoušce bez metabolické aktivace se k 2,0 ml vrchního agaru přidá zkoušená látka a 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury. Při zkouškách s metabolickou aktivací se po přidání zkoušené látky a bakterií přidá k vrchnímu agaru 0,5 ml aktivační směsi s vhodným množstvím postmitochondriální frakce. Obsah každé zkumavky se promísí a vylije na povrch misky se selektivním médiem. Vrchní agar se nechá ztuhnout a misky se inkubují 48 až 72 hodin při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby se zjistí počet revertantních kolonií na misku.

Při metodě s předběžnou inkubací se připraví směs ze zkoušené látky, 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury a vhodného množství aktivační směsi nebo stejného množství pufračního roztoku a určitou dobu se předběžně inkubuje, než se přidá 0,2 ml vrchního agaru. Další postup je stejný jako u miskové metody.

U obou metod se nasadí nejméně tři misky na jednu koncentraci.

2. **DATA**

Uvedou se počty revertantních kolonií na misku jak pro kontrolní série, tak pro exponované série. Jak pro zkoušenou chemickou látku, tak pro kontroly se uvedou jednotlivé hodnoty počtu kolonií na misku, střední hodnota počtu revertantních kolonií na misku a směrodatné odchylky.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

Provedou se nejméně dva nezávislé experimenty. Není nezbytné provádět druhý experiment tímtéž způsobem jako první experiment. K získání výstižnějších dat může být naopak vhodnější některé zkušební podmínky pozměnit.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— bakterie – použitý kmen,

— zkušební podmínky: úrovně dávky, toxicita, složení médií, postupy zpracování (předběžná inkubace, inkubace), metabolický aktivační systém, referenční látky, negativní kontroly,

— jednotlivé počty kolonií na misku, střední hodnota počtu revertantních kolonií na misku, směrodatná odchylka, podle možnosti vztah dávka/účinek,

— rozbor výsledků,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

B.14 MUTAGENITA (ZKOUŠKA NA REVERSNÍ MUTACE U BAKTERIÍ SALMONELLA TYPHIMURIUM)

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (C).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Reversní systém kmenů *Salmonella typhimurium* vyžadujících histidin (his) je mikrobiální systém, v němž se měří reverse $his^- \longrightarrow his^+$ indukovaná chemickými látkami, které způsobují substituce bází nebo posunové mutace v genomu organismu.

Bakterie se vystaví působení zkoušené látky v přítomnosti systému metabolické aktivace a bez ní a nanesou se na minimální médium. Po přiměřené inkubační době se spočítají kolonie revertantů a porovnají se s počtem kolonií spontánních revertantů v neexponované kontrolní kultuře a v kontrolní kultuře s přídavkem rozpouštědla.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava**

1.6.1.1 *Bakterie*

Čerstvé kultury bakterií se kultivují při 37 °C do pozdní exponenciální, resp. do časné stacionární fáze růstu. Přibližná hustota buněk má být 10^8 – 10^9 buněk na 1 ml.

1.6.1.2 *Metabolická aktivace*

Buňky se exponují zkoušené látce jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce připravená z jater hlodavců upravovaná činidly indukujícím enzymy.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Zkušební kmeny*

Použijí se nejméně čtyři kmeny, TA 1535, TA 1537 nebo TA 97, TA 98 a TA 100; navíc lze použít další kmeny, jako TA 1538 a TA 102. Použijí se uznávané metody přípravy a uchovávání zásobních kultur kmenů. Musí být kontrolovány růstové požadavky a genetická identifikace kmenů, jejich citlivost na UV záření a na krystalovou violeť a jejich rezistence vůči ampicilinu. Počet spontánních revertantů má být pro všechny kmeny v očekávaných rozpětích četnosti.

1.6.2.2 *Média*

Používá se vhodné selektivní médium společně s vhodným vrchním agarem.

1.6.2.3 *Použití negativních a pozitivních kontrol*

Souběžně musí být nasazeny neexponované kontroly a kontroly s rozpouštědlem. Pozitivní kontroly musí být prováděny také za těmito dvěma účely:

i) Potvrzení citlivosti bakteriálních kmenů.

Pro zkoušky bez metabolické aktivace lze použít tyto sloučeniny:

Kmeny	Látka používaná pro reversi
TA 1535, TA 100	azid sodný
TA 1538, TA 98, TA 97	2nitrofluoren
TA 1537	9aminoakridin
TA 102	(2-fenylpropan-2-yl)hydroperoxid (kumenhydroperoxid)

ii) Zajištění aktivity odpovídajícího metabolického aktivačního systému.

Jako pozitivní kontrolní látka pro ověření fungování metabolického aktivačního systému ve všech kmenech je vhodný 2aminoanthracen. Pokud je to možné, měla by být použita pozitivní kontrola, která patří ke stejné třídě chemických látek jako zkoušená látka.

1.6.2.4 *Množství zkoušené látky na jednu misku*

Zkouší se nejméně pět různých množství zkoušené látky, které se od sebe liší přibližně o polovinu dílku logaritmické stupnice. Látky se zkoušejí až po mez rozpustnosti, resp. toxicity. Toxicita se prokáže snížením počtu spontánních revertantů, sníženým růstem pozadí nebo stupněm přežití v exponovaných kulturách. Netoxické látky se zkoušejí až do koncentrace 5 mg na misku, než je možno považovat je za negativní.

1.6.2.5 *Podmínky inkubace*

Misky se inkubují 48 až 72 hodin při 37 °C.

1.6.3 **Postup**

Při přímé miskové zkoušce bez metabolické aktivace se k 2,0 ml vrchního agaru přidá zkoušená látka a 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury. Při zkouškách s metabolickou aktivací se po přidání zkoušené látky a bakterií přidá k vrchnímu agaru 0,5 ml aktivační směsi s vhodným množstvím postmitochondriální frakce. Obsah každé zkumavky se promísí a vylije na povrch misky se selektivním médiem. Vrchní agar se nechá ztuhnout a misky se inkubují 48 až 72 hodin při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby se zjistí počet revertantních kolonií na misku. Při metodě s předběžnou inkubací se připraví směs ze zkoušené látky, 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury a vhodného množství aktivační směsi nebo stejného množství pufračního roztoku a určitou dobu se inkubuje, než se přidá 0,2 ml vrchního agaru. Další postup je stejný jako u miskové metody.

U obou metod se nasadí nejméně tři misky na jednu koncentraci.

2. **DATA**

Uvedou se počty revertantních kolonií na misku jak pro kontrolní série, tak pro exponované série.

Jak pro zkoušenou chemickou látku, tak pro kontroly se uvedou jednotlivé hodnoty počtu kolonií na misku, střední hodnota počtu revertantních kolonií na misku a směrodatné odchylky.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

Provedou se nejméně dva nezávislé experimenty. Není nezbytné provádět druhý experiment tímtéž způsobem jako první experiment. K získání výstižnějších dat může být naopak vhodnější některé zkušební podmínky pozměnit.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— bakterie – použitý kmen,

— zkušební podmínky: úrovně dávky, toxicita, složení médií, postupy zpracování (předběžná inkubace, inkubace), metabolický aktivační systém, referenční látky, negativní kontroly,

— jednotlivé hodnoty počtu kolonií na misku, střední hodnota počtu revertantních kolonií na misku, směrodatná odchylka, podle možnosti vztah dávka/účinek,

— rozbor výsledků,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

ČÁST C: METODY PRO STANOVENÍ EKOTOXICITY

C.1 AKUTNÍ TOXICITA PRO RYBY

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Účelem této zkoušky je stanovit akutní letální toxicitu látek pro sladkovodní ryby. Pro usnadnění výběru nejvhodnější zkušební metody (statické, semistatické nebo průtokové) s cílem zajistit dostatečně konstantní koncentrace zkoušené látky po celou dobu experimentu je žádoucí mít pokud možno k dispozici data o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi par, chemické stálosti, disociačních konstantách a o biologické rozložitelnosti látky.

Další informace (např. strukturní vzorec, stupeň čistoty, povaha a podíl významných nečistot v procentech, přítomnost a množství přísad a rozdělovací koeficient noktanol/voda) je třeba vzít v úvahu při plánování zkoušky i při interpretaci výsledků.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Akutní toxicitou se rozumí zřetelný nepříznivý účinek, který je v krátké době (řádově ve dnech) v organismu vyvolán expozicí látce. V této zkoušce se akutní toxicita vyjadřuje prostřednictvím střední letální koncentrace (LC_{50}), tj. takové koncentrace látky ve vodě, která během nepřetržité expozice po určitou dobu způsobí úhyn 50 % jedinců ve zkušební skupině ryb.

Všechny koncentrace zkoušené látky se udávají v hmotnosti na jednotku objemu (mg l^{-1}). Mohou se také vyjádřit v hmotnostních podílech (mg kg^{-1}).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Zkoušky s referenčními látkami mohou být provedeny s cílem prokázat, že se reakce zkušebních druhů za laboratorních zkušebních podmínek podstatně nezměnila.

Referenční látky nejsou pro tuto zkoušku stanoveny.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg l^{-1}, s cílem prokázat, že LC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Ryby se vystaví účinku různým koncentracím zkoušené látky přidané do vody po dobu 96 hodin. Úhyn se zaznamenává nejméně každých 24 hodin a je-li to možné, vypočtou se při každém pozorování koncentrace, které způsobí úhyn 50 % ryb (LC_{50}).

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Kritéria jakosti se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na úplný zkušební postup.

Mortalita v kontrolních skupinách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 % (nebo jednu rybu, pokud se použije méně než deset ryb).

Koncentrace rozpuštěného kyslíku musí být po celou dobu zkoušky vyšší než 60 % hodnoty nasycení vzduchem.

Koncentrace zkoušené látky nesmí po celou zkoušky klesnout pod 80 % původních hodnot koncentrací.

U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají stálé roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy a že kritéria jakosti byla dodržena.

U látek, které

i) jsou ve zkušebním médiu špatně rozpustné, nebo

ii) mohou vytvářet stálé emulze nebo disperse, nebo

iii) jsou ve vodných roztocích nestálé,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená v roztoku (nebo, není-li to technicky možné, ve vodním sloupci) na začátku zkoušky. Koncentrace se stanoví po určité době jejího ustálení, avšak před nasazením zkušebních ryb.

Ve všech uvedených případech musí být během zkoušky provedena další měření s cílem potvrdit skutečné expoziční koncentrace nebo dodržení kritérií jakosti.

pH by se nemělo změnit o více než o 1.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Mohou být použity tři postupy:

Statická zkouška:

Zkouška, při níž zkušební roztok neprotéká. (Roztoky se během celé zkoušky nemění.)

Semistatická metoda:

Zkouška, při níž zkušební roztok neprotéká, ale je pravidelně po delších časových úsecích (např. po 24 hodinách) zcela vyměňován.

Průtoková metoda:

Zkouška toxicity, při níž se voda ve zkušebních nádržích neustále obměňuje, přičemž se zkoušená látka přivádí s vodou, kterou se zkušební médium obnovuje.

1.6.1 **Činidla**

1.6.1.1 *Roztoky zkoušených látek*

Zásobní roztoky o požadované koncentraci se připraví rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo ve vodě podle bodu 1.6.1.2.

Zvolené zkoušená koncentrace se připraví ředěním zásobního roztoku. Jsouli zkoušeny vysoké koncentrace látky, lze látku rozpustit přímo v ředicí vodě.

Látky se obvykle zkouší až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou $P_{o/v}$, nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stálé disperse než pravé roztoky) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stálosti. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícímu okysličení vody atd.).

Pro přípravu zásobních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo pro usnadnění rozptýlení látky ve zkušebním médiu lze použít ultrazvukovou dispergaci, organická rozpouštědla či emulgátory nebo dispergátory. Použijíli se takové pomocné látky, měly by všechny zkušební koncentrace obsahovat stejné množství těchto pomocných látek a stejné koncentraci pomocné látky jako ve zkušebních sériích by měly být exponovány další kontrolní ryby. Koncentrace pomocných látek by měla být minimální a v žádném případě by neměla překročit 100 mg l^{-1} zkušebního média.

Zkouška se provede bez úpravy pH. Existujíli známky toho, že dochází k výrazné změně pH, doporučuje se zkoušku opakovat s úpravou pH a výsledky zaznamenat. V takovém případě se upraví pH zásobního roztoku na pH vody k ředění, pokud proti tomu neexistuji specifické důvody. Při úpravě pH se dává přednost HCl a NaOH. Úprava pH se provede tak, aby nebyla koncentrace zkoušené látky v zásobním roztoku v podstatné míře změněna. Dojdeli úpravou ve zkušebním médiu k chemické reakci nebo ke srážení, skutečnosti se zaznamenají.

1.6.1.2 *Voda pro chov ryb a ředění*

Může být použita pitná voda (nekontaminovaná potenciálně škodlivými koncentracemi chloru, těžkých kovů nebo jiných látek), kvalitní přírodní voda nebo upravená voda (viz doplněk 1). Upřednostňuje se voda o celkové tvrdosti od 10 do 250 mg l^{-1} (vztaženo na $CaCO_3$) a pH od 6,0 do 8,5.

1.6.2 **Přístroje**

Veškeré přístroje musí být vyrobeny z chemicky inertního materiálu:

— systém pro automatické ředění (pro průtokovou metodu),

— přístroj pro měření koncentrace kyslíku,

— vybavení pro stanovení tvrdosti vody,

— vhodný přístroj pro měření teploty,

— pHmetr.

1.6.3 **Testovací ryby**

Ryby by měly být zdravé a bez zjevných malformací.

Použitý druh by měl být zvolen podle praktických kritérií, jako je jejich dostupnost po celý rok, snadný chov, vhodnost pro zkoušení, relativní citlivost k chemickým látkám a jakékoli další významné ekonomické a biologické faktory. Při výběru druhu ryb by měla být také zohledněna potřeba srovnatelnosti získaných dat a mezinárodní harmonizace (1).

Seznam doporučených druhů ryb pro provedení této zkoušky je uveden v doplňku 2; dává se přednost druhům danio pruhované a pstruh duhový.

1.6.3.1 *Chov*

Ryby by měly pocházet pokud možno z jednoho chovu a měly by být stejné délky a stejného stáří. Ryby musí být chovány nejméně 12 dní v těchto podmínkách:

Obsádka:

Vhodná vzhledem k metodě (metoda s recirkulací nebo průtoková metoda) a druhu ryb.

Voda:

Viz 1.6.1.2.

Osvětlení:

Osvětlení 12 až 16 hodin denně.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku:

Nejméně 80 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem.

Krmení:

Třikrát týdně nebo jednou za den; vysazení krmení 24 hodin před začátkem zkoušky.

1.6.3.2 *Mortalita*

Po 48hodinové aklimatizaci se zaznamená mortalita a použijí se tato kritéria:

— mortalita vyšší než 10 % populace za 7 dní:

celá obsádka ryb se vyřadí,

— mortalita 5 až 10 % populace:

v chovu se pokračuje dalších 7 dní. Nedojdeli k dalším případům úhynu, obsádka se použije, v opačném případě musí být vyřazena,

— mortalita menší než 5 % populace:

obsádka je pro zkoušku použitelná.

1.6.4 **Aklimatizace**

Všechny ryby musí být nejméně na 7 dnů před použitím ve zkoušce nasazeny do vody stejné kvality a stejné teploty, jaká se použije při zkoušce.

1.6.5 **Zkušební postup**

Před vlastní zkouškou může být provedena předběžná zkouška s cílem získat informace o rozsahu koncentrací, které mají být použity v hlavní zkoušce.

Kromě sérií zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkoušené látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou.

V závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech zkoušené látky se zvolí statická, semistatická nebo průtoková zkouška, aby byla splněna kritéria jakosti.

Ryby se exponují zkoušené látce za níže uvedených podmínek:

— délka expozice: 96 hodin,

— počet ryb: nejméně 7 na každou koncentraci,

— nádrže: vhodný objem vzhledem k doporučené obsádce,

— obsádka: pro statickou a semistatickou zkoušku se doporučuje 1,0 g l^{-1}; v průtokovém systému je přijatelná vyšší obsádka,

— zkušební koncentrace: nejméně pět koncentrací, které jsou odstupňovány faktorem nepřevyšujícím 2,2 a které pokrývají rozsah mortality od 0 % do 100 %,

— voda: viz 1.6.1.2;

— osvětlení: osvětlení 12 až 16 hodin denně,

— teplota: podle druhu ryb (doplněk 2), avšak v rámci dané zkoušky kolísající v toleranci ±1 °C,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku: ne nižší než 60 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem při dané teplotě,

— krmení: žádné.

Ryby se kontrolují po prvních 2 až 4 hodinách a dále nejméně každých 24 hodin. Ryby se považují za mrtvé, jestliže při dotyku ocasní ploutve nedochází k žádné reakci a nejsou-li patrné žádné dýchací pohyby. Mrtvé ryby se odstraní, jakmile jsou zpozorovány, a úhyn se zaznamená.

Zaznamenají se všechny zjevné abnormality (např. ztráta rovnováhy, změny v plavání, chování, v dýchací funkci, v pigmentaci atd.).

Měření pH, obsahu rozpuštěného kyslíku a teploty se provádí denně.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodě může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mgl[1] s cílem prokázat, že LC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Je-li povaha zkoušené látky taková, že ve vodě nelze dosáhnout koncentrace 100 mg l^{-1}, provede se limitní zkouška při koncentraci odpovídající rozpustnosti této látky v použitém médiu (nebo při maximální koncentraci, kdy látka vytváří stálou disperzi) (viz také bod 1.6.1.1).

Limitní zkouška se provede se 7 až 10 rybami a se stejným počtem ryb v kontrole (kontrolách). (Podle teorie binomického rozdělení je při použití 10 ryb a při nulové mortalitě 99,9% pravděpodobnost, že je LC_{50} větší než 100 mg l^{1}. Při 7, 8 nebo 9 rybách znamená nulová mortalita nejméně 99% pravděpodobnost, že je LC_{50} větší než koncentrace použitá v limitní zkoušce.)

Dojdeli k úhynům, musí se provést celá studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky, zaznamenají se.

2. DATA A HODNOCENÍ

Na pravděpodobnostní logaritmický papír se pro každé období, kdy byla prováděna pozorování (24, 48, 72 a 96 hodin), vynese pro každou dobu expozice mortalita v procentech proti koncentraci.

Pokud je to možné, odhadnou se standardními postupy pro každou délku expozice hodnoty LC_{50} a meze spolehlivosti (p = 0,05); tyto hodnoty se zaokrouhlí na jednu, nebo nejvýše na dvě platné číslice (příklad zaokrouhlení na dvě platné číslice: 173,5 se zaokrouhlí na 170, 0,127 na 0,13, 1,21 na 1,2).

V případech, kdy je sklon křivky závislosti mortality v procentech na koncentraci látky příliš strmý, aby umožnil výpočet hodnoty LC_{50}, postačuje grafický odhad této hodnoty.

Jestliže dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 2,2 vyvolají mortalitu 0 a 100 %, jsou dostatečnou informací o tom, že se LC_{50} nachází mezi těmito hodnotami.

Zjistíli se, že není možné udržet stálost nebo homogenitu zkoušené látky, uvede se to ve zprávě a výsledky se interpretují s opatrností.

3. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— údaje o zkušebních rybách (vědecký název, kmen, dodavatel, veškerá předchozí ošetření, velikost a počet ryb použitých při každé zkušební koncentraci),

— zdroj ředicí vody a hlavní chemické charakteristiky (pH, tvrdost, teplota),

— u látek s malou rozpustností ve vodě údaj o metodě přípravy zásobních a zkušebních roztoků,

— koncentrace všech pomocných látek,

— přehled použitých koncentrací a veškeré dostupné informace o stálosti zkoušené látky ve zkušebním roztoku při použitých koncentracích,

— jestliže byly provedeny chemické analýzy, údaje o použitých metodách a získané výsledky,

— výsledek limitní zkoušky, pokud byla provedena,

— důvody pro volbu použitého zkušebního postupu a podrobnosti o něm (např. statický, semistatický, dávkování, průtoková rychlost, zda byla voda provzdušňována obsádka ryb atd.),

— popis zkušebního zařízení,

— světelný režim,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota zkušebních roztoků každých 24 hodin,

— důkaz, že byla splněna kritéria jakosti,

— tabulka kumulativních hodnot mortality při každé koncentraci a při kontrolní zkoušce (a popřípadě při kontrolní zkoušce s pomocnou látkou) při každé z doporučených dob pozorování,

— graf křivky závislosti účinku, vyjádřeného v procentech, na koncentraci na konci zkoušky,

— podle možnosti hodnoty LC_{50} při každé z doporučených dob pozorování (při 95% intervalu spolehlivosti),

— použité statistické metody stanovení hodnot LC_{50},

— při použití referenční látky a údaj o získaných výsledcích,

— nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky úhyn ryb,

— nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100 % mortalitu.

4. **LITERATURA**

(1) OECD, 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 90303, June 1985.

(3) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to Salmo gairdneri – Static and FlowThrough methods – NFT 90305, June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2,/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: Semi-static method. Part 3: Flowthrough method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 – Water – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA66075009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA600/478012, January 1978.

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th ed., APHAAWWAWPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Interlaboratory 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., Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J. T., Wilcoxon, F. A simplified method for evaluating dose effects experiments. *J. Pharm, Exp. Therap*., 1949, 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, 3, 793–821.

(18) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. *Water Res*. 1970, 4, 3–32.

(19) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC_{50}. *In* Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (F. I. Mayer, J. L. Hamelink (*eds*.)). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65–84.

(20) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J., Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

Doplněk 1

Upravená voda

Příklad vhodné ředicí vody

Všechny chemikálie musí být čistoty p.a.

Voda musí být kvalitní destilovaná nebo deionizovaná s vodivostí menší než 5 $\mu S \cdot cm^{-1}$.

Destilační přístroj nesmí obsahovat žádné měděné části.

Zásobní roztoky:

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (chlorid vápenatý dihydrát)	11,76 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (síran hořečnatý heptahydrát)	4,93 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
$NaHCO_3$ (hydrogenuhličitan sodný)	2,59 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na l litr.	
KCl (chlorid draselný)	0,23 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	

Upravená ředicí voda

Smísí se po 25 ml všech čtyř zásobních roztoků a doplní vodou na 1 litr.

Provzdušňuje se, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neodpovídá koncentraci nasycení vzdušným kyslíkem.

pH musí být 7,8 ±0,2.

Podle potřeby se pH upraví pomocí NaOH (hydroxid sodný) nebo HCl (kyselina chlorovodíková).

Tato ředicí voda se nechá 12 hodin stát a nesmí být dále provzdušňována.

Koncentrace úhrnu iontů Ca a Mg v tomto roztoku je 2,5 mmol·l^{-1}. Poměr množství iontů Ca: Mg je 4: 1 a poměr množství iontů Na: K je 10: 1. Celková koncentrace alkalických kovů v tomto roztoku je 0,8 mmol·l^{-1}.

Jakákoli odchylka v přípravě vody k ředění nesmí změnit složení ani vlastnosti vody.

Doplněk 2

Druhy ryb doporučené pro zkoušení

Doporučený druh	Doporučený rozsah teplot při zkoušce (°C)	Doporučená celková délka ryb (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton - Buchanan), danio pruhované	20 až 24	3,0 ±0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), střevle	20 až 24	5,0 ±2,0
Cyprinus carpio (Teleostei Cyprinidae) (Linneanus 1758), kapr obecný	20 až 24	6,0 ±2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Tomminck a Schlegel 1850), halančík japonský	20 až 24	3,0 ±1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), živorodka duhová	20 až 24	3,0 ±1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque, Linneanus 1758), slunečnice modrá	20 až 24	5,0 ±2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988), pstruh duhový	12 až 17	6,0 ±2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneanus 1758), jelec jesen	20 až 24	6,0 ±2,0

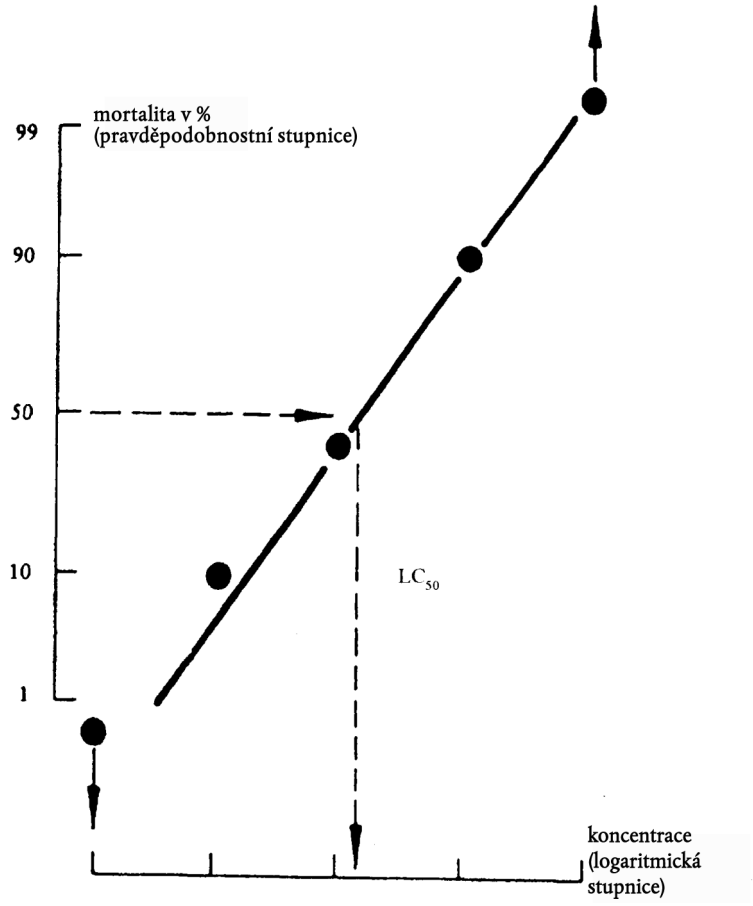
Opatřování ryb

Ryby uvedené v seznamu se snadno chovají nebo jsou dobře dostupné po celý rok. Lze je množit a chovat buď v rybích farmách, nebo v laboratoři za kontrolovaných zdravotních a parazitologických podmínek tak, aby ryby byly zdravé a byly známého původu. Tyto ryby jsou dostupné v mnoha částech světa.

Doplněk 3

Příklad křivky závislosti mortality, vyjádřené v procentech, na koncentraci

Příklad stanovení LC_{50} na pravděpodobnostním logaritmickém papíru



C.2 AKUTNÍ TOXICITA PRO DAFNIE

1. METODA

1.1 ÚVOD

Účelem této zkoušky je stanovit střední účinnou koncentraci látky pro imobilizaci (EC_{50}) dafnií ve sladkovodním prostředí. Před započetím zkoušky je žádoucí mít pokud možno k dispozici data o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi par, chemické stálosti, disociačních konstantách a o biologické rozložitelnosti látky.

Další informace (např. strukturní vzorec, stupeň čistoty, povaha a podíl významných nečistot v procentech, přítomnost a množství přísad a rozdělovací koeficient noktanol/voda) je třeba vzít v úvahu při plánování zkoušky i při interpretaci výsledků.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Požadavek směrnice stanovit LC_{50} pro dafnie se považuje za splněný stanovením EC_{50}, jak je popsáno v této zkušební metodě.

Akutní toxicita se v této zkoušce vyjadřuje střední účinnou koncentrací látky pro imobilizaci (EC_{50}) dafnií. Je to koncentrace (rozumí se výchozí koncentrace), která během nepřetržité expozice po určitou stanovenou dobu imobilizuje 50 % dafnií ve zkušební skupině během doby působení (doby expozice).

Imobilizace:

Dafnie, které nejsou schopné do 15 s po lehkém zatřepání zkušební nádrží začít plavat, se považují za imobilizované.

Všechny koncentrace zkoušené látky se udávají v hmotnosti na jednotku objemu (mg l^{-1}). Mohou se také vyjádřit v hmotnostních podílech (mg kg^{-1}).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Zkoušky s referenčními látkami mohou být provedeny s cílem prokázat, že se reakce zkušebních druhů za laboratorních zkušebních podmínek podstatně nezměnila.

Souhrn výsledků okružního testu laboratoří EHS s použitím čtyř různých látek je uveden v doplňku 2.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg l^{-1}, s cílem prokázat, že EC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Dafnie se 48 hodin exponují zkoušené látce přidané v různých koncentracích do vody. Použije-li se kratší doba, zdůvodní se ve zprávě.

Za jinak stejných experimentálních podmínek a v přiměřeném rozmezí koncentrací zkoušené látky působí různé koncentrace zkoušené látky na schopnost plavání dafnií rozdílně. Různé koncentrace mají za následek skutečnost, že na konci zkoušky ztrácí různý procentuální podíl dafnií schopnost plavat. Koncentrace, které nezpůsobují žádnou imobilizaci nebo způsobují 100% imobilizaci, se zjistí přímo pozorováním, zatímco hodnota 48hodinové EC_{50} se stanoví podle možnosti výpočtem.

Při této metodě se používá statický systém, zkušební roztoky se tedy během doby expozice neobnovují.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Kritéria jakosti se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na úplný zkušební postup.

Imobilizace v kontrolních zkouškách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 %.

Dafnie se v kontrolních zkouškách nesmí trvale zdržovat u hladiny.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve zkušební nádrži musí být po celou dobu zkoušky vyšší než 3 mg l^{1}. Koncentrace kyslíku však nesmí v žádném případě klesnout pod 2 mg l^{1}.

Koncentrace zkoušené látky nesmí po celou zkoušky klesnout pod 80 % původní hodnoty koncentrace.

U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají stálé roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy a že byla dodržena kritéria jakosti.

U látek, které

i) jsou ve zkušebním médiu špatně rozpustné, nebo

ii) mohou vytvářet stálé emulze nebo disperse, nebo

iii) jsou ve vodných roztocích nestálé,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená v roztoku (nebo, není-li to technicky možné, ve vodním sloupci) na začátku zkoušky. Koncentrace se stanoví po určité době jejího ustálení, avšak před nasazením zkušebních organismů.

Ve všech uvedených případech musí být během zkoušky provedena další měření s cílem potvrdit skutečné expoziční koncentrace nebo dodržení kritérií jakosti.

pH by se nemělo změnit o více než o 1.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Činidla**

1.6.1.1 *Roztoky zkoušených látek*

Zásobní roztoky o požadované koncentraci se připraví rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo ve vodě podle bodu 1.6.1.2.

Zvolené zkušební koncentrace se připraví ředěním zásobního roztoku. Jsouli zkoušeny vysoké koncentrace látky, lze látku rozpustit přímo v ředicí vodě.

Látky se obvykle zkoušejí až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou $P_{o/v}$, nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stálé disperse než pravé roztoky), je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stálosti. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícímu okysličení vody atd.).

Pro přípravu zásobních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo pro usnadnění rozptýlení látky ve zkušebním médiu lze použít ultrazvukovou dispergaci, organická rozpouštědla či emulgátory nebo dispergátory. Použijíli se takové pomocné látky, měly by všechny zkušební koncentrace obsahovat stejné množství těchto pomocných látek a stejné koncentraci pomocné látky jako ve zkušebních sériích by měly být exponovány další kontrolní dafnie. Koncentrace pomocných látek by měly být minimální a v žádném případě by neměla překročit 100 mg l^{-1} zkušebního média.

Zkouška se provede bez úpravy pH. Existujíli známky toho, že dochází k výrazné změně pH, doporučuje se zkoušku opakovat s úpravou pH a výsledky zaznamenat. V takovém případě se upraví pH zásobního roztoku na pH vody k ředění, pokud proti tomu neexistuji specifické důvody. Při úpravě pH se dává přednost HCl a NaOH. Úprava pH se provede tak, aby nebyla koncentrace zkoušené látky v zásobním roztoku v podstatné míře změněna. Dojdeli úpravou ve zkušebním médiu k chemické reakci nebo ke srážení, skutečnosti se zaznamenají ve zprávě.

1.6.1.2 *Zkušební voda*

Pro tuto zkoušku se použije upravená voda (viz doplněk 1 a odkaz (2): ISO 6341). Aby nebylo nutné aklimatizovat dafnie před zkouškou, doporučuje se, aby byla voda pro kultivaci podobné jakosti (pH, tvrdost), jako voda pro zkoušku.

1.6.2 **Přístroje**

Použijí se běžné laboratorní přístroje a zařízení. Zařízení, které přijde do styku se zkušebními roztoky, by mělo být nejlépe skleněné:

— přístroj pro měření koncentrace kyslíku (s mikroelektrodou, nebo jiný vhodný přístroj na měření koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vzorcích malého objemu),

— vhodný přístroj pro měření teploty,

— pHmetr,

— vybavení pro stanovení tvrdosti vody.

1.6.3 **Testovací organismy**

Přednost se dává druhu *Daphnia magna*, ačkoliv se připouští také druh *Daphnia pulex*. Zkušební dafnie musí být na začátku zkoušky mladší než 24 hodin, musí být laboratorně odchované, bez zjevných nemocí a musí být známého původu (např. chov, předchozí ošetření atd.).

1.6.4 **Zkušební postup**

Před vlastní zkouškou může být provedena předběžná zkouška s cílem získat informace o rozsahu koncentrací, které mají být použity v hlavní zkoušce.

Kromě sérií zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkoušené látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou.

Dafnie se exponují zkoušené látce tímto způsobem:

— *délka expozice*: 48 hodin,

— *počet dafnií*: nejméně 20 na každou zkušební koncentraci, nejlépe rozdělených na čtyři skupiny po pěti dafniích nebo na dvě skupiny po 10 dafniích,

— *obsádka*: na každou dafnii by měly připadat 2 ml zkušebního roztoku,

— *zkušební koncentrace*: zkušební roztok se připraví bezprostředně před nasazením dafnií, nejlépe bez použití jiného rozpouštědla než vody. Připraví se koncentrace tvořící geometrickou řadu, přičemž poměr mezi koncentracemi nesmí být vyšší než 2,2. Zároveň s kontrolami se zkoušejí koncentrace dostatečné pro to, aby po 48 hodinách vyvolaly nulovou a 100% imobilizaci, a dále mezilehlé koncentrace umožňující výpočet 48hodinové EC_{50},

— *voda*: viz 1.6.1.2,

— *osvětlení*: střídání světla a tmy je libovolné,

— *teplota*: zkušební teplota by měla být 18 až 22 °C, avšak v rámci dané zkoušky kolísající v toleranci ±1 °C,

— *provzdušňování*: zkušební roztok nesmí být provzdušňován probubláváním,

— *krmení*: žádné.

Měření pH a obsahu rozpuštěného kyslíku v kontrolních skupinách a u všech zkušebních koncentrací se provede na konci zkoušky; pH zkušebního roztoku nesmí být měněno.

Těkavé sloučeniny se zkoušejí v hermeticky uzavřených nádobách naplněných po okraj, dostatečně velkých, aby nedošlo k nedostatku kyslíku.

Prohlídka dafnií se provede nejpozději po 24 hodinách a znovu po 48 hodinách.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodě může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg l^{1} s cílem prokázat, že EC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Je-li povaha zkoušené látky taková, že ve vodě nelze dosáhnout koncentrace 100 mg l^{-1}, provede se limitní zkouška při koncentraci odpovídající rozpustnosti této látky v použitém médiu (nebo při maximální koncentraci, kdy látka vytváří stálé disperzi) (viz také bod 1.6.1.1).

Limitní zkouška se provede s 20 dafniemi rozdělenými do dvou nebo čtyř skupin a se stejným počtem v kontrolní skupině (v kontrolních skupinách). Dojdeli k imobilizaci, musí se provést celá studie.

2. DATA A HODNOCENÍ

Na pravděpodobnostní logaritmický papír se pro každé období, kdy byla prováděna pozorování (24 a 48 hodin), vynese mortalita v procentech proti koncentraci.

Pokud je to možné, odhadnou se pro každé pozorovací období EC_{50} a meze spolehlivosti (p = 0,05); tyto hodnoty se zaokrouhlí na jednu, nebo nejvýše na dvě platné číslice (příklad zaokrouhlení na dvě platné číslice: 173,5 se zaokrouhlí na 170, 0,127 na 0,13, 1,21 na 1,2).

V případech, kdy je sklon křivky závislosti mortality v procentech na koncentraci látky příliš strmý, aby umožnil výpočet hodnoty EC_{50}, postačuje grafický odhad této hodnoty.

Jestliže dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 2,2 vyvolají nulovou a 100% imobilizaci, jsou dostatečnou informací o rozpětí, ve kterém EC_{50} leží.

Zjistíli se, že není možné udržet stálost nebo homogenitu zkoušené látky, uvede se to ve zprávě a výsledky se interpretují s opatrností.

3. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— údaje o zkušebním organismu (vědecký název, kmen, dodavatel nebo původ, veškerá předchozí ošetření, metoda chovu – včetně původu, druhu a množství potravy, frekvence krmení),

— zdroj ředicí vody a hlavní chemické charakteristiky (pH, teplota, tvrdost),

— u látek s malou rozpustností ve vodě údaj o metodě přípravy zásobních a zkušebních roztoků,

— koncentrace všech pomocných látek,

— přehled použitých koncentrací a veškeré dostupné informace o stálosti zkoušené látky ve zkušebním roztoku při použitých koncentracích,

— jestliže byly provedeny chemické analýzy, údaje o použitých metodách a získané výsledky,

— výsledek limitní zkoušky, pokud byla provedena,

— popis zkušebního zařízení,

— světelný režim,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota zkušebních roztoků,

— důkaz, že byla splněna kritéria jakosti,

— tabulka kumulativních hodnot imobility při každé koncentraci a při kontrolní zkoušce (a popřípadě při kontrolní zkoušce s pomocnou látkou) při každé z doporučených dob pozorování (24 a 48 hodin),

— graf křivky závislosti účinku, vyjádřeného v procentech, na koncentraci na konci zkoušky,

— podle možnosti hodnoty EC_{50} při každé z doporučených dob pozorování (při 95% intervalu spolehlivosti),

— použité statistické metody stanovení hodnot EC_{50},

— při použití referenční látky údaj o získaných výsledcích,

— nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky imobilizaci,

— nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100% imobilizaci.

4. **LITERATURA**

(1) OECD, 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., Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(5) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).

(6) Finney, D. J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(7) Litchfield, J. T., Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating doseeffect experiments. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 1949, 96, 99–113.

(8) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. *Water Res.*, 1969, 3, 793–821.

(9) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. *Water Res.* 1970, 4, 3–32.

(10) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC_{50}. *In* Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (F. I. Mayer, J. L. Hamelink (eds.)). American Society for Testing and Materials. ASTM, 1977, STP 634, 65–84.

(11) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J., Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

Doplněk 1

Upravená voda

Příklad vhodné ředicí vody (podle ISO 6341)

Všechny chemikálie musí být čistoty p.a.

Voda musí být kvalitní destilovaná nebo deionizovaná s vodivostí menší než 5 $\mu S \cdot cm^{-1}$.

Destilační přístroj nesmí obsahovat žádné měděné části.

Zásobní roztoky:

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (chlorid vápenatý dihydrát)	11,76 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (síran hořečnatý heptahydrát)	4,93 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	
$NaHCO_3$ (hydrogenuhličitan sodný)	2,59 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na l litr.	
KCl (chlorid draselný)	0,23 g
se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.	

Upravená ředicí voda

Smísí se po 25 ml všech čtyř zásobních roztoků a doplní vodou na 1 litr.

Provzdušňuje se, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neodpovídá koncentraci nasycení vzdušným kyslíkem.

pH musí být 7,8 ±0,2.

Podle potřeby se pH upraví pomocí NaOH (hydroxid sodný) nebo HCl (kyselina chlorovodíková).

Tato ředicí voda se nechá 12 hodin stát a nemusí být dále provzdušňována.

Koncentrace úhrnu iontů Ca a Mg v tomto roztoku je 2,5 $mmol \cdot l^{-1}$. Poměr množství iontů Ca: Mg je 4: 1 a poměr množství iontů Na: K je 10: 1. Celková koncentrace alkalických kovů v tomto roztoku je 0,8 $mmol \cdot l^{-1}$.

Jakákoli odchylka v přípravě vody k ředění nesmí změnit složení ani vlastnosti vody.

Doplněk 2

Souhrn výsledků okružního testu EHS provedeného v roce 1978 (citovaného také v (2)).

Upozornění: účelem tohoto okružního testu bylo stanovení *24hodinové* hodnoty EC_{50}.

Použité látky:

1) Dichroman draselný

2) Kyselina tetrapropylbenzensulfonová

3) Kyselina tetrapropylbenzensulfonová, sodná sůl

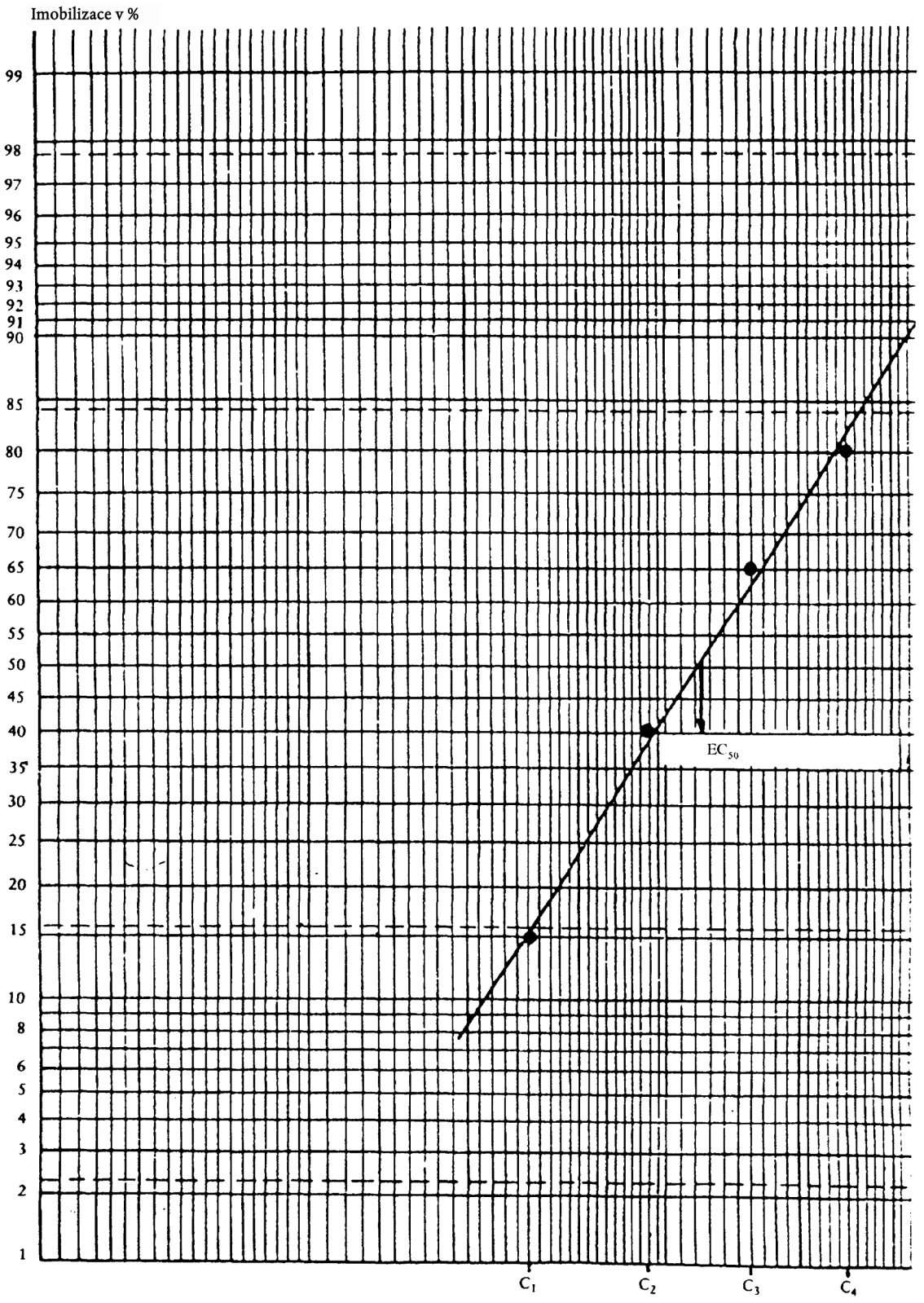
4) Kyselina 2,4,5trichlorfenoxyoctová, draselná sůl

Látka	Počet zúčastněných laboratoří	Počet výsledků pro výpočet	Střední hodnota 24hodinové $EC_{50} mg \cdot l^{-1}$
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

Doplněk 3

Příklad závislosti imobilizace, vyjádřené v procentech, na koncentraci

Příklad stanovení EC_{50} s použitím pravděpodobnostního logaritmického papíru



C.3 ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU ŘAS

1. METODA

1.1 ÚVOD

Účelem této zkoušky je stanovit účinky látky na růst jednobuněčných zelených řas. Relativně krátkodobými zkouškami (72 hodin) lze posoudit účinky na několik generací řas. Tato metoda může být upravena pro použití s několika druhy řas, přičemž musí být v protokolu o zkoušce uveden popis metody.

Použití metody je nejsnadnější v případě látek rozpustných ve vodě, které za podmínek zkoušky pravděpodobně zůstávají ve vodě.

Metodu lze použít pro látky, které přímo neovlivňují měření růstu řas.

Je žádoucí mít před započetím zkoušky k dispozici co nejúplnější data o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi par, chemické stálosti, disociačních konstantách a o biologické rozložitelnosti látky.

Další informace (např. strukturní vzorec, stupeň čistoty, druh a podíl významných nečistot v procentech, přítomnost a množství přísad a rozdělovací koeficient noktanol/voda) je třeba vzít v úvahu při plánování zkoušky i při interpretaci výsledků.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Hustota buněk: počet buněk na jeden mililitr.

Růst: zvyšování hustoty buněk během doby trvání zkoušky.

Růstová rychlost: nárůst hustoty buněk za jednotku času.

EC_{50}: v této metodě jde o koncentraci zkoušené látky, která má za následek 50% snížení růstu (E_bC_{50}) nebo růstové rychlosti (E_rC_{50}) vzhledem ke kontrole.

NOEC (*no observed effect concentration*): v této metodě jde o nejvyšší zkušební koncentraci, při níž není pozorováno žádné významné snížení růstu nebo růstové rychlosti ve srovnání s kontrolou.

Všechny koncentrace zkoušené látky se udávají v hmotnosti na jednotku objemu ($mg \cdot l^{-1}$). Mohou se také vyjádřit v hmotnostních podílech ($mg \cdot kg^{-1}$).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Zkoušky s referenčními látkami mohou být provedeny s cílem prokázat, že se reakce zkušebních druhů za laboratorních zkušebních podmínek podstatně nezměnila.

Při použití referenční látky musí být výsledky uvedeny do protokolu o zkoušce. Jako referenční látka může být použit dichroman draselný, ale jeho barva může ovlivnit kvalitu a intenzitu světla dostupného buňkám a také spektrofotometrická měření, pokud se použijí. Dichroman draselný byl použit v mezinárodních mezilaboratorních testech (viz (3) a doplněk 2).

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg·l[1], s cílem prokázat, že EC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Exponenciálně rostoucí kultury vybraných zelených řas jsou po několik generací vystaveny za definovaných podmínek různým koncentracím zkoušené látky.

Zkušební roztoky se kultivují 72 hodin, během nichž se alespoň každých 24 hodin měří hustota buněk v každém roztoku. Stanoví se snížení růstu ve srovnání s kontrolní kulturou.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Kritéria jakosti se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na celý zkušební postup.

Hustota buněk v kontrolních kulturách by se měla za 3 dny zvýšit alespoň šestnáctkrát.

Koncentrace zkoušené látky nesmí po celou zkoušky klesnout pod 80 % původní hodnoty koncentrace.

U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají stálé roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy a že kritéria jakosti byla dodržena.

U látek, které

i) jsou ve zkušebním médiu špatně rozpustné, nebo

ii) mohou vytvářet stálé emulze nebo disperse, nebo

iii) jsou ve vodných roztocích nestálé,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená v roztoku na začátku zkoušky. Koncentrace se stanoví po určité době jejího ustálení.

Ve všech uvedených případech musí být během zkoušky provedena další měření s cílem potvrdit skutečné expoziční koncentrace nebo dodržení kritérií jakosti.

Je známo, že podstatná část zkoušené látky může být během zkoušky zabudována do biomasy řas. Proto by se za účelem prokázání dodržení kritérií jakosti mělo brát v úvahu jak množství látky zabudované do biomasy řas, tak látka v roztoku (nebo, není-li to technicky možné, ve vodním sloupci). Protože však stanovení koncentrace látky v biomase řas může představovat technické obtíže, může být dodržení kritérií jakosti prokázáno zkouškou s nejvyšší koncentrací látky, ale bez řas, a měřením koncentrací v roztoku (nebo, není-li to technicky možné, ve vodním sloupci) na začátku a na konci zkoušky.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍHO POSTUPU

1.6.1 **Činidla**

1.6.1.1 *Roztoky zkoušených látek*

Zásobní roztoky o požadované koncentraci se připraví rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo ve vodě podle bodu 1.6.1.2.

Zvolené zkušební koncentrace se připraví přidáním vhodného alikvotního podílu k předkulturám řas (viz doplněk 1). Látky se obvykle zkoušejí až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou $P_{o/v}$ nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stálé disperse než pravé roztoky) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stálosti. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícímu okysličení vody atd.).

Pro přípravu zásobních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo pro usnadnění rozptýlení látky ve zkušebním médiu lze použít ultrazvukovou dispergaci, organická rozpouštědla či emulgátory nebo dispergátory. Použijíli se takové pomocné látky, měly by všechny zkušební koncentrace obsahovat stejné množství těchto pomocných látek a stejné koncentraci pomocné látky jako ve zkušebních sériích by měly být exponovány další kontroly. Koncentrace pomocných látek by měla být minimální a v žádném případě by neměla překročit 100 $mg \cdot l^{-1}$ zkušebního média.

Zkouška se provede bez úpravy pH. Existujíli známky toho, že dochází k výrazné změně pH, doporučuje se zkoušku opakovat s úpravou pH a výsledky zaznamenat. V takovém případě se upraví pH zásobního roztoku na pH vody k ředění, pokud proti tomu neexistuji specifické důvody. Při úpravě pH se dává přednost HCl a NaOH. Úprava pH se provede tak, aby nebyla koncentrace zkoušené látky v zásobním roztoku v podstatné míře změněna. Dojdeli úpravou ve zkušebním médiu k chemické reakci nebo ke srážení, skutečnosti se zaznamenají.

1.6.1.2 *Zkušební médium*

Voda musí být kvalitní destilovaná nebo deionizovaná s vodivostí menší než 5 $\mu S \cdot cm^{-1}$. Destilační přístroj nesmí obsahovat žádné měděné části.

Je doporučeno toto médium:

Podle následující tabulky se připraví čtyři zásobní roztoky. Tyto roztoky se sterilizují membránovou filtrací nebo v autoklávu a skladují se v temnu při 4 °C. Zásobní roztok č. 4 by se měl sterilizovat pouze membránovou filtrací. Ředěním těchto roztoků se získají konečné živné koncentrace zkušebních roztoků.

Živina	Koncentrace v zásobním roztoku		Konečná koncentrace ve zkušebním roztoku	
Zásobní roztok č. 1: makroživiny				
NH_4Cl	1,5	$g \cdot l^{-1}$	15	$mg \cdot l^{-1}$
$MgCl_2\ 6H_2O$	1,2	$g \cdot l^{-1}$	12	$mg \cdot l^{-1}$
$CaCl_2\ 2H_2O$	1,8	$g \cdot l^{-1}$	18	$mg \cdot l^{-1}$
$MgSO_4\ 7H_2O$	1,5	$g \cdot l^{-1}$	15	$mg \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16	$g \cdot l^{-1}$	1,6	$mg \cdot l^{-1}$
Zásobní roztok č. 2: Fe - EDTA				
$FeCl_3\ 6H_2O$	80	$mg \cdot l^{-1}$	0,08	$mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA\ 2H_2O$	100	$mg \cdot l^{-1}$	0,1	$mg \cdot l^{-1}$
Zásobní roztok č. 3: stopové prvky				
H_3BO_3	185	$mg \cdot l^{-1}$	0,18	$mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415	$mg \cdot l^{-1}$	0,415	$mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3	$mg \cdot l^{-1}$	3×10^{-3}	$mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5	$mg \cdot l^{-1}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01	$mg \cdot l^{-1}$	1×10^{-5}	$mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7	$mg \cdot l^{-1}$	7×10^{-3}	$mg \cdot l^{-1}$
Zásobní roztok č. 4: $NaHCO_3$				
$NaHCO_3$	50	$g \cdot l^{-1}$	50	$mg \cdot l^{-1}$

Po ustálení a po provzdušnění by mělo mít médium hodnotu pH přibližně 8.

1.6.2 **Přístroje a pomůcky**

— Běžné laboratorní vybavení.

— Kultivační baňky o vhodném objemu (např. Erlenmeyerovy baňky na 250 ml jsou vhodné v případě zkušebního roztoku o objemu 100 ml). Všechny zkušební baňky by měly být identické, pokud jde o materiál a rozměry.

— Kultivační zařízení: místnost nebo komora, v nichž lze udržovat teplotu 21–25 °C ±2 °C a stálé rovnoměrné osvětlení v rozsahu vlnových délek od 400 do 700 nm. Jestliže všechny řasy v kontrolních kulturách dosáhly doporučené růstové rychlosti, lze předpokládat, že podmínky pro jejich růst, včetně intenzity světla, jsou vyhovující.

U zkušebních roztoků s průměrnými koncentracemi se doporučuje použít světelnou intenzitu od 60 do 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ($35–70 \cdot 10^{18}$ fotonů $m^{-2} \cdot s^{-1}$) při měření v rozsahu 400–700 nm vhodným detektorem. Při měření intenzity luxmetry je přijatelný rozsah odpovídající 6 000–10 000 lx.

Této světelné intenzity lze dosáhnout umístěním čtyř až sedmi univerzálních bílých 30W zářivek (teplota chromatičnosti přibližně 4 300 K) ve vzdálenosti 0,35 m od kultury řas.

— Měření hustoty buněk by se mělo provádět přímým počítáním živých buněk, např. pod mikroskopem s počítacími komůrkami. Za předpokladu dostatečné citlivosti a prokázané dobré korelace s buněčnou hustotou mohou být použity i jiné postupy (fotometrie, turbidimetrie,…).

1.6.3 **Testovací organismy**

Je doporučeno použít rychle rostoucí druhy zelených řas vhodné pro kultivaci a zkoušení. Dává se přednost těmto druhům:

— *Selenastrum capricornutum*, např. ATCC 22662 nebo CCAP 278/4,

— *Scenedesmus subspicatus*, např. 86.81 SAG.

Poznámka:

ATCC = American Type Culture Collection (USA)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (VB)

SAG = Collection of algal culture (Göttingen, SRN)

Použití jiného druhu řas musí být uvedeno ve zprávě.

1.6.4 **Zkušební postup**

Koncentrační rozmezí, ve kterém lze očekávat účinky, se určí na základě výsledků orientačních zkoušek.

Dva parametry, jež jsou mírou růstu (biomasa a růstová rychlost), mohou poskytovat zcela rozdílné hodnoty snížení růstu; v orientační zkoušce by měly být použity oba parametry, aby bylo zajištěno, že geometrická řada koncentrací umožní odhadnout jak E_bC_{50}, tak E_rC_{50}.

Počáteční hustota buněk

Doporučuje se, aby byla počáteční hustota buněk řasy *Selenastrum capricornutum* a řasy *Scenedesmus subspicatus* ve zkušebních roztocích přibližně 10^4 buněk·ml^{-1}. Použije-li se jiný druh řasy, měla by být biomasa srovnatelná.

Koncentrace zkoušené látky

Pro zkoušku se připraví geometrická řada nejméně pěti koncentrací lišících se od sebe vždy faktorem nepřekračujícím 2,2. Nejnižší zkušební koncentrace by neměla vykazovat žádný pozorovatelný účinek na růst řas. Nejvyšší zkušební koncentrace by měla omezit růst ve srovnání s kontrolní zkouškou nejméně o 50 %, nejlépe by měla růst zcela zastavit.

Opakování a kontroly

Plán zkoušky by měl zahrnovat tři opakování s každou zkušební koncentrací. Dále se provedou tři kontroly bez zkoušené látky, a je-li použita pomocná látka, též tři kontroly s touto látkou. Je-li pro to důvod, může být plán zkoušky upraven tak, že se použije více koncentračních úrovní a sníží se počet opakování zkoušky s každou koncentrací.

Provedení zkoušky

Zkušební roztoky o požadované koncentraci zkoušené látky a požadovaném množství inokula řas se připraví přidáním alikvotních podílů zásobního roztoku zkoušené látky k vhodnému množství prekultury řas (viz doplněk 1).

Kultivační baňky se protřepou a umístí se do kultivačního zařízení. Buňky řas se udržují v suspensi třepáním, mícháním nebo probubláváním vzduchem, aby se zlepšila výměna plynů a zmenšilo se kolísání pH ve zkušebních roztocích. Kultury se udržují při teplotě 21–25 °C udržované s přesností na ±2 °C.

Hustota buněk v každé bańce se stanoví nejméně po 24, 48 a 72 hodin po zahájení zkoušky. Používá-li se měření hustoty buněk jiná metoda, než je jejich přímé počítání, použije se ke stanovení pozadí filtrované médium pro kultivaci řas obsahující odpovídající koncentraci zkoušené chemické látky.

pH se měří na začátku zkoušky a po 72 hodinách.

Hodnota pH by se neměla během zkoušky změnit víc než o 1,5.

Zkoušení těkavých látek

V současné době neexistuje obecně přijatý způsob zkoušení těkavých látek. Je-li o látce známo, že se snadno vypařuje, mohou být použity uzavřené kultivační nádoby se zvětšeným mrtvým objemem. Při plánování objemu horní části kultivačních baněk se musí zohlednit eventuální nedostatek CO_2. Byly navrženy varianty této metody (4).

Měl by být učiněn pokus stanovit množství zkoušené látky, které v roztoku zůstalo; při interpretaci výsledků zkoušek s těkavými látkami v uzavřených systémech je doporučeno postupovat mimořádně opatrně.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodě může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 $mg \cdot l^{1}$ s cílem prokázat, že EC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Je-li povaha zkoušené látky taková, že nelze ve vodě dosáhnout koncentrace 100 mg^{-1}, provede se limitní zkouška při koncentraci odpovídající rozpustnosti této látky v použitém médiu (nebo při maximální koncentraci, kdy látka vytváří stálou disperzi) (viz také bod 1.6.1.1).

Limitní zkouška se provede alespoň třikrát, se stejným počtem kontrol. V limitní zkoušce se stanoví oba parametry, jež jsou mírou růstu (biomasa a růstová rychlost).

Zjistíli se v limitní zkoušce pokles růstu biomasy nebo růstové rychlosti ve srovnání s kontrolami o 25 % nebo více, provede se úplná zkouška.

2. DATA A HODNOCENÍ

Naměřené hustoty buněk ve zkušební kultuře a v kontrolách se spolu s koncentracemi zkoušené látky a dobami měření shrnou do tabulky. Střední hodnota hustoty buněk pro každou zkušební koncentraci a pro kontroly se vynese proti času (0–72 hodin) a sestrojí se růstová křivka.

Vztah koncentrace/účinek se stanoví dvěma následujícími postupy. Některé látky mohou růst při nízkých koncentracích stimulovat. V úvahu by měla být vzata pouze data udávající potlačení růstu mezi 0 a 100 %.

2.1 POROVNÁNÍ PLOCH POD RŮSTOVÝMI KŘIVKAMI

Plocha mezi růstovou křivkou a vodorovnou linií $N = N_0$ se vypočte podle tohoto vzorce:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \ldots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

kde

A = plocha,

N_0 = počet buněk v ml v čase t_0 (na počátku zkoušky),

N_1 = naměřený počet buněk v 1 ml v čase t_1,

N_n = naměřený počet buněk v 1 ml v čase t_n,

t_1 = doba prvního měření od počátku zkoušky,

t_n = doba n-tého měření od počátku zkoušky,

n = počet měření od počátku zkoušky.

Potlačení růstu vyjádřené v % (I_A) se pro každou koncentraci zkoušené látky vypočte podle vzorce:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

kde

A_c = plocha mezi růstovou křivkou kontrolní zkoušky a horizontální linií $N = N_0$,

A_t = plocha mezi růstovou křivkou při koncentraci t a horizontální linií $N = N_0$.

Hodnoty I_A se nanesou na semilogaritmický nebo na pravděpodobnostní semilogaritmický papír proti odpovídajícím koncentracím. Vynesouli se body na pravděpodobnostní papír, proloží se body přímka, a to ručně nebo regresním výpočtem.

Hodnota EC_{50} se odhadne odečtením z regresní přímky jako koncentrace odpovídající 50% snížení růstu (I_A = 50 %). Pro jednoznačné označení této hodnoty v rámci této metody výpočtu se doporučuje použít symbol E_bC_{50}. Je důležité, aby byla s hodnotou E_bC_{50} uvedena příslušná expoziční doba, např. E_bC_{50} (0–72 hodin).

2.2 POROVNÁNÍ RŮSTOVÝCH RYCHLOSTÍ

Průměrnou specifickou růstovou rychlost (μ) pro exponenciálně rostoucí kultury lze vypočítat jako:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

kde t_0 je čas začátku zkoušky.

Průměrnou specifickou růstovou rychlost lze také odvodit ze sklonu regresní přímky v závislosti ln N na čase.

Snížení specifické růstové rychlosti vyjádřené v procentech pro každou koncentraci zkoušené látky ($I_{\mu t}$) se vypočte podle vzorce:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

kde

μ_c = střední specifická růstová rychlost v kontrole,

μ_t = střední specifická růstová rychlost pro zkušební koncentraci t.

Snížení střední specifické růstové rychlosti v procentech při všech koncentracích zkoušené látky ve srovnání s kontrolní hodnotou se vynese proti logaritmu koncentrace. Hodnotu EC_{50} lze odečíst z výsledného grafu. Pro jednoznačné označení EC_{50} odvozené touto metodou se doporučuje použít symbol E_rC_{50}. Musí být uvedeny okamžiky měření, např. vztahuje-li se hodnota k času 0 a k 72 hodin, označí se symbolem E_rC_{50} (0–72 hodin):

Poznámka: Ve výrazu pro specifickou růstovou rychlost vystupují logaritmy, tzn. malé změny růstové rychlosti mohou odpovídat velkým změnám biomasy. Hodnoty E_bC a E_rC tedy nejsou číselně srovnatelné.

2.3 VÝPOČET NOEC

Hodnota koncentrace nezpůsobující žádné pozorovatelné účinky (NOEC) se stanoví vhodnou statistickou metodou pro srovnávání více vzorků (např. analýza rozptylu a Dunnettův test) s využitím jednotlivých hodnot ploch pod růstovými křivkami *A* (viz bod 2.1) nebo specifických růstových rychlostí μ (viz bod 2.2).

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— zkoušená látka: údaje o chemické identifikaci,

— Testovací organismus: původ, laboratorní kultura, číslo kmene, metoda kultivace,

— zkušební podmínky:

  — datum zahájení a ukončení zkoušky a délka zkoušení,

  — teplota,

  — složení média,

  — kultivační zařízení,

  — hodnoty pH roztoku na počátku a na konci zkoušky (je-li pozorováno kolísání pH o více než 1,5, uvede se vysvětlení),

  — nosič a metoda použitá pro rozpouštění zkoušené látky, koncentrace nosiče ve zkušebních roztocích,

  — intenzita a kvalita světla,

  — zkušební koncentrace (naměřené nebo nominální);

— výsledky:

  — koncentrace buněk v jednotlivých baňkách v každé době měření a metoda měření koncentrace buněk,

  — průměrné hodnoty koncentrace buněk,

  — růstové křivky,

  — grafické znázornění vztahu koncentrace – účinek,

  — hodnoty EC a metoda výpočtu,

  — NOEC,

  — další pozorované účinky.

4. **LITERATURA**

(1) OECD, 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, M. Vighi. *Chemosphere*, 1981, 10, 1123–1126.

Doplněk 1

Příklad postupu kultivace řas

Obecné poznámky

Účelem kultivace následujícím postupem je získání kultur řas pro zkoušky toxicity.

Měly by být použity vhodné metody k tomu, aby bylo zajištěno, že kultury řas nebudou infikovány bakteriemi (ISO 4833). Vhodné mohou být axenické kultury, avšak základem jsou jednodruhové kultury.

Všechny operace se provádějí za sterilních podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci bakteriemi a jinými řasami. Kontaminované kultury se vyřadí.

Postupy při získání kultur řas

Příprava živných roztoků (média):

Médium lze připravit zředěním koncentrovaných základních roztoků živin. K získání pevného média se přidává 0,8 % agaru. Použité médium by mělo být sterilní. Sterilizace v autoklávu může vést ke ztrátě NH_3.

Kmenová kultura:

Kmenové kultury jsou malé kultury řas, které se pravidelně přenášejí do čerstvého média, kde slouží jako výchozí zkušební materiál. Nejsou-li kultury pravidelně používány, vyočkovávají se na šikmý agar. Poté se nejméně jednou za dva měsíce přenášejí do čerstvého média.

Kmenové kultury se pěstují v Erlenmeyerových baňkách obsahujících vhodné medium (objem přibližně 100 ml). Jsou-li řasy kultivovány při teplotě 20 °C a stálém osvětlení, musí se přenášet každý týden.

Při přeočkování se přenese sterilní pipetou do baňky s čerstvým mediem takové množství „staré“ kultury, aby byla výchozí koncentrace u rychle rostoucího druhu řas asi stokrát menší než koncentrace kultury staré.

Růstovou rychlost druhu řas lze odečíst z růstové křivky. Je-li známa, lze z ní odhadnout hustotu, při níž musí být kultura přenesena do čerstvého média. K tomu musí dojít před fází odumírání kultury.

Předkultura:

Účelem předkultur je poskytnout dostatečné množství řas potřebných pro naočkování zkušebních kultur. Předkultura se kultivuje za zkušebních podmínek a použije se ještě během exponenciálního růstu, to znamená obvykle po třídenní inkubační lhůtě. Obsahujíli kultury řas deformované nebo abnormální buňky, musí se odstranit.

Doplněk 2

V normě ISO 8692 – Jakost vody – Růstová inhibiční zkouška na sladkovodních řasách *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* jsou uvedeny výsledky mezilaboratorních zkoušek dichromanu draselného provedených 16 laboratořemi.

	Střední hodnota ($mg \cdot l^{-1}$)	Rozpětí ($mg \cdot l^{-1}$)
E_rC_{50} (0–72 h)	0,84	0,60 až 1,03
E_bC_{50} (0–72 h)	0,53	0,20 až 0,75

C.4 STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI

ČÁST I OBECNÉ ÚVAHY

I.1 ÚVOD

Je popsáno šest metod, které umožňují screeningové posouzení snadné biologické rozložitelnosti chemických látek v aerobním vodním prostředí:

a) Zkouška na úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC) (metoda C.4A)

b) Modifikovaná screeningová zkouška OECD – na úbytek DOC (metoda C.4B)

c) Zkouška na uvolňování oxidu uhličitého (CO_2) (modifikovaná Sturmova zkouška) (metoda C.4C)

d) Zkouška manometrickou respirometrií (metoda C.4D)

e) Zkouška v uzavřených lahvičkách (metoda C.4E)

f) Zkouška MITI (Ministerstvo zahraničního obchodu a průmyslu – Japonsko) (metoda C.4F)

Obecné a společné úvahy pro všech šest zkoušek jsou uvedeny v části I metody. Specifické body jednotlivých metod jsou uvedeny v částech II až VII. Přílohy obsahují definice, vzorce a návody.

Mezilaboratorní srovnávací test OECD provedený v roce 1988 ukázal, že metody poskytují shodné výsledky. V závislosti na fyzikálním charakteru látky, která má být zkoušena, se však může dávat přednost určité metodě.

I.2 VÝBĚR VHODNÉ METODY

Pro volbu nejvhodnější metody jsou nezbytné informace o rozpustnosti, tenzi par a o adsorpčních vlastnostech chemické látky. Pro výpočet teoretických hodnot a/nebo ověření naměřených hodnot parametrů, např. TSK, TCO_2, DOC, TOC, CHSK (viz přílohy I a II) je nutné znát chemickou strukturu nebo vzorec.

Zkoušené chemické látky, jejichž rozpustnost ve vodě je alespoň 100 $mg \cdot l^{-1}$, lze zkoušet všemi metodami za předpokladu, že netěkají a neadsorbují se. Pro látky špatně rozpustné ve vodě, které těkají nebo se adsorbují, jsou vhodné metody uvedené v tabulce 1. Způsob, jakým je třeba zacházet s látkami špatně rozpustnými ve vodě a s látkami těkavými, je popsán v příloze III. Mírně těkavé látky je možno zkoušet metodou úbytku DOC, pokud je ve zkušebních nádobách (které musí být vhodně uzavřeny) dostatečně velký prostor pro plyn. V tomto případě musí být provedena abiotická kontrola pro zohlednění případné fyzikální ztráty.

Tabulka 1: Použitelnost zkušebních metod

Zkouška	Analytická metoda	Vhodnost pro látky		
		špatně rozpustné	těkavé	adsorbující se
na úbytek DOC	rozpuštěný organický uhlík	—	—	+/–
modif. zkouška OECD – na úbytek DOC	rozpuštěný organický uhlík	—	—	+/–
na uvolňování CO_2	respirometrie: uvolňování CO_2	+	—	+
manometrická respirometrie	manometrická respirometrie: spotřeba kyslíku	+	+/–	+
zkouška v uzavřených lahvičkách	respirometrie: rozpuštěný kyslík	+/–	+	+
MITI	respirometrie: spotřeba kyslíku	+	+/–	+

Pro interpretaci získaných výsledků, zejména pokud jsou výsledky nízké nebo marginální, se vyžadují informace o čistotě nebo relativních podílech hlavních složek zkoušeného materiálu.

Pro volbu vhodných zkušebních koncentrací mohou být velmi užitečné informace o toxicitě zkoušené chemické látky pro bakterie (příloha IV); tyto informace mohou být důležité pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu.

I.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Pro ověření postupu se souběžně se zkouškou a ve vlastní bańce zkoušejí referenční chemické látky, které splňují kritéria snadné biologické rozložitelnosti.

Vhodnými chemickými látkami jsou anilin (čerstvě předestilovaný), natriumacetát, natriumbenzoát. Všechny tyto referenční chemické látky se za podmínek v uvedených metodách rozkládají, i když se záměrně nepřidá žádné inokulum.

Byl podán návrh hledat referenční chemickou látku, která by byla snadno rozložitelná, avšak vyžadovala by přidání inokula. Navržen byl kaliumhydrogenftalát. O této látce je třeba ještě získat více údajů, než ji bude možné přijmout jako referenční látku.

V respirometrických zkouškách mohou v důsledku nitrifikace ovlivnit spotřebu kyslíku látky obsahující dusík (viz přílohy II a V).

I.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍCH METOD

Roztok nebo suspense zkoušené látky v minerálním prostředí se inokuluje a kultivuje v aerobních podmínkách v temnu nebo v difuzním světle. Množství DOC ve zkušebním roztoku pocházející z inokula se musí udržovat ve srovnání s DOC pocházejícího ze zkoušené látky co nejnižší. Endogenní aktivita inokula se zohlední na základě souběžné slepé zkoušky s inokulem, avšak bez zkoušené látky, třebaže endogenní aktivita buněk v přítomnosti látky přesně neodpovídá aktivitě v endogenní kontrolní zkoušce. Za účelem kontroly postupu se souběžně provádí zkouška s referenční látkou.

Obecně se rozklad sleduje stanovením parametrů jako DOC, tvorba CO_2 nebo spotřeba kyslíku a měření se provádějí v dostatečně krátkých intervalech, aby bylo možné identifikovat začátek a konec biologického rozkladu. Měření automatickými respirometry je kontinuální. Někdy se doplňkově k jinému parametru měří DOC, avšak obvykle pouze na začátku a na konci zkoušky. Lze rovněž použít specifickou chemickou analýzu, kterou se vyhodnotí primární rozklad zkoušené látky nebo kterou se stanoví koncentrace kteréhokoli vzniklého meziproduktu (ve zkoušce MITI povinné).

Zkouška obvykle trvá 28 dnů. Je však možné ukončit měření před uplynutím 28 dní, tj. jakmile vykazuje křivka biologického rozkladu plató po tři po sobě následující měření. Je také možné měření po 28 dnech prodloužit, jestliže z křivky vyplývá, že biologický rozklad začal, avšak 28. dne ještě nebylo ještě dosaženo plató.

I.5 KRITÉRIA JAKOSTI

I.5.1 **Reprodukovatelnost**

Vzhledem k charakteru biologického rozkladu a směsných populací bakterií používaných jako inokula se stanovení provádějí nejméně duplicitně.

Je obecně známo, že čím vyšší je koncentrace mikroorganismů přidaných na počátku do zkušebního média, tím menší jsou rozdíly mezi vícenásobnými měřeními. Okružní testy rovněž ukázaly, že mezi výsledky získanými různými laboratořemi mohou být velké rozdíly, avšak u snadno biologicky rozložitelných sloučenin se obvykle dosahuje dobré shody.

I.5.2 **Platnost zkoušky**

Zkouška se považuje za platnou, je-li na konci zkoušky nebo popřípadě na konci 10denního období rozkladu rozdíl hodnot krajních výsledků vícenásobných měření rozkladu zkoušené chemické látky v oblasti plató křivky menší než 20 % a dosáhlli stupeň rozkladu referenční látky vyjádřený v procentech úrovně snadné biologické rozložitelnosti do 14 dní. Není-li splněna kterákoli z těchto podmínek, měření se opakuje. Vzhledem k náročnosti metod neznamenají nízké hodnoty nutně skutečnost, že zkoušená látka není v podmínkách životního prostředí biologicky rozložitelná, ale znamenají, že k prokázání biologické rozložitelnosti jsou třeba další studie.

Jestliže ve zkoušce toxicity zahrnující jak zkoušenou látku, tak referenční chemickou látku došlo během 14 dnů k méně než 35% rozkladu (stanoveného podle DOC) nebo k méně než 25% rozkladu (stanoveného podle TSK nebo TCO_2), lze zkoušené chemické látky považovat za inhibující (viz také příloha IV). Série zkoušek by měla být opakována, pokud možno s nižší koncentrací zkoušené chemické látky a/nebo s vyšší koncentrací inokula, avšak ne s koncentrací vyšší než 30 mg pevných látek v litru.

I.6 OBECNÉ POSTUPY A PŘÍPRAVA

Obecné podmínky pro zkoušky jsou shrnuty v tabulce 2. Přístroje a další experimentální podmínky specifické pro jednotlivé metody jsou popsány dále v kapitolách pro tyto příslušné metody.

Tabulka 2: Zkušební podmínky

Zkouška	Zkouška na úbytek DOC	Zkouška na uvolňování CO_2	Manometrická respirometrie	Modif. screeningová zkouška OECD	Zkouška v uzavřených lahvičkách	Zkouška MITI (I)
Koncentrace zkoušené látky $mg \cdot l^{-1}$					2–10	100
mg DOC/l	10–40	10–20	100	10–40		
mg TSK/l			50–100		5–10	
Koncentrace inokula (buňky/l, přibližně)	≤ 30 mg/l SL nebo ≤ 100 ml odpadní vody/l (10^7–10^8)			0,5 ml sekundární odpadní vody/l (10^5)	≤ 5 ml odpadní vody/l (10^4–10^6)	30 mg/l SL (10^7–10^8)
Koncentrace prvků v minerálním médiu (v $mg \cdot l^{-1}$)						
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					nejlépe 7,0
Teplota	22 ±2 °C					25 ±1 °C

DOC = rozpuštěný organický uhlík, TSK = teoretická spotřeba kyslíku, SL = suspendované látky

I.6.1 **Ředicí voda**

Používá se deionizovaná nebo destilovaná voda neobsahující inhibující koncentrace toxických látek (např. ionty Cu^{2+}). Voda smí obsahovat nejvýše 10 % obsahu organického uhlíku vneseného zkoušeným materiálem. Vysoká čistota vody pro zkoušky je nezbytná pro to, aby se nevyskytovaly vysoké hodnoty slepého pokusu. Kontaminace může pocházet z vlastních přítomných nečistot, z materiálu měniče iontů, z rozkladných látek z bakterií a řas. Pro každou sérii měření se použije pouze jedna šarže vody, která byla předem překontrolována analýzou DOC. Tato kontrola není nutná u zkoušky v uzavřených lahvičkách, spotřeba kyslíku vodou však musí být nízká.

I.6.2 **Zásobní roztoky minerálních složek**

Pro přípravu zkušebních roztoků se připraví zásobní roztoky o vhodných koncentracích minerálních složek. Níže uvedené zásobní roztoky je možné použít (při různých zřeďovacích faktorech) pro metodu s úbytkem DOC, modifikovanou screeningovou metodu OECD, metodu s uvolňováním CO_2, pro manometrickou respirometrii a pro metodu s uzavřenými lahvičkami. Zřeďovací faktory a specifická příprava minerálního media pro zkoušku MITI jsou uvedeny v oddílech pro jednotlivé zkoušky.

Zásobní roztoky: Za použití reakčních činidel čistoty p.a. se připraví tyto zásobní roztoky:

a)	Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4	8,50 g
	Hydrogenfosforečnan didraselný, K_2HPO_4	21,75 g
	Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,40 g
	Chlorid amonný, NH_4Cl	0,50 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. pH roztoku musí být 7,4.	
b)	Chlorid vápenatý bezvodý, $CaCl_2$	27,50 g
	nebo chlorid vápenatý dihydrát, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	36,40 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.	
c)	Síran hořečnatý heptahydrát, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.	
d)	Chlorid železitý hexahydrát, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.	

Poznámka: Aby nebylo nutné připravovat tento roztok bezprostředně před použitím, přidá se jedna kapka koncentrované kyseliny chlorovodíkové nebo 0,4 g disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) na 1 litr.

I.6.3 **Zásobní roztoky chemických látek**

Pokud je rozpustnost vyšší než 1 $g \cdot l^{-1}$, rozpustí se například 1–10 g (podle potřeby) zkoušené nebo referenční látky v deionizované vodě a doplní se na 1 litr. Jinak se zásobní roztoky připravují v minerálním médiu, nebo se chemická látka přidá přímo do minerálního média. Pokud jde o postup s méně rozpustnými chemickými látkami, viz příloha III; ve zkoušce MITI (metoda C.4-F) se nepoužívají ani rozpouštědla, ani emulgační činidla.

I.6.4 **Inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod (nechlorovaných), z povrchových vod a půd nebo z jejich směsi. Používáli se aktivovaný kal ve zkoušce na úbytek DOC, na uvolňování CO_2 a ve zkoušce manometrickou respirometrií, měl by být odebrán z čistírny nebo z laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. U inokulí z jiných zdrojů byl zjištěn větší rozptyl výsledků. V modifikované screeningové zkoušce OECD a ve zkoušce v uzavřených lahvičkách je potřebné zředěnější inokulum bez vloček kalu a nejvhodnějším zdrojem je voda z druhého stupně čistírny domovních odpadních vod nebo z laboratorní jednotky. Pro zkoušku MITI se inokulum získává ze směsi zdrojů a je popsáno v oddílu věnovaném této zkoušce.

I.6.4.1 *Inokulum z aktivovaných kalů*

Odebere se čerstvý vzorek aktivovaného kalu z aerační nádrže čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. Podle potřeby se filtrací přes jemné síto odstraní hrubé částice a kal se udržuje v aerobních podmínkách.

Jinou možností je usazení nebo odstředění (např. 10 min při 1 100 g) po odstranění hrubých částic. Voda nad usazeninou se odstraní. Kal se promyje minerálním médiem. Koncentrovaný kal se suspenduje v minerálním médiu na koncentraci 3–5 g suspendovaných pevných látek na litr a až do použití se provzdušňuje.

Kal by měl být odebrán z dobře fungující konvenční čistírny. Je-li nutné odebrat kal z čistírny s vysokým výkonem nebo předpokládáli se, že kal obsahuje inhibitory, je třeba jej promýt. Po důkladném promíchání se kal nechá usadit nebo se odstředí, voda nad usazeninou se odstraní a promytý kal se opět suspenduje v nové dávce minerálního média. Tento postup se opakuje, dokud se kal nepovažuje za prostý přebytečného substrátu nebo inhibitoru.

Po opakovaném suspendování nebo z neupravovaného kalu se těsně před použitím odebere vzorek pro stanovení hmotnosti sušiny suspendovaných pevných látek.

Další možností je homogenizace aktivovaného kalu (3–5 g suspendovaných látek v litru). Kal se 2 min zpracovává v mechanickém mísiči při střední rychlosti. Promíchaný kal se nechá 30 min, popřípadě déle, usazovat a kapalina se dekantuje pro použití jako inokulum v koncentraci 10 $ml \cdot l^{-1}$ minerálního média.

I.6.4.2 *Jiné zdroje inokula*

Inokulum lze získat z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody Odebere se čerstvý vzorek a během přepravy se udržuje v aerobních podmínkách. Nechá se 1 hodinu usadit nebo se zfiltruje přes hrubý filtrační papír a dekantovaná kapalina nebo filtrát se až do použití udržuje v aerobních podmínkách. Na litr média lze použít až 100 ml tohoto typu inokula.

Dalším zdrojem inokula je povrchová voda. V tomto případě se odebere vzorek vhodné povrchové vody, např. říční nebo jezerní vody, a uchovává se až do použití v aerobních podmínkách. V případě potřeby se inokulum zkoncentruje filtrací nebo odstředěním.

I.6.5 **Předběžná úprava inokulí**

Inokula je možné předběžně upravit pro experimentální podmínky, ale nikoli předběžně adaptovat na zkušenou látku. Předběžná úprava spočívá v aeraci aktivovaného kalu v minerálním médiu nebo výstupu z druhého stupně čistírny po dobu 5–7 dnů při zkušební teplotě. Předběžná úprava někdy zlepší přesnost zkušebních metod snížením hodnot ze slepých pokusů. Předúprava inokula pro zkoušku MITI se nepovažuje za nutnou.

I.6.6 **Abiotické kontroly**

V případě potřeby se kontroluje možný abiotický rozklad zkoušené látky stanovením úbytku DOC, přijmu kyslíku nebo uvolňování oxidu uhličitého ve sterilních kontrolách bez inokula. Sterilizace se provádí filtrací přes membránu (0,2–0,45 μm) nebo přidáním vhodné toxické látky v odpovídající koncentraci. Používáli se membránová filtrace, odebírají se vzorky asepticky, aby byla zachována sterilita. Pokud nebyla předem vyloučena adsorpce zkoušené látky, měly by zkoušky, kterými se sleduje biologický rozklad podle úbytku DOC, zejména při použití inokula z aktivovaného kalu, zahrnovat abiotickou kontrolu, která je inokulována a intoxikována.

I.6.7 **Počet nasazených baněk**

Počet nasazených baněk v typické zkoušce je uveden v oddílech věnovaných jednotlivým zkouškám.

Mohou být použity tyto baňky:

Zkušební suspense: obsahující zkoušenou látku a inokulum

Slepá zkouška s inokulem: obsahující pouze inokulum

Kontrolní zkouška postupu: obsahující referenční látku a inokulum

Abiotická sterilní kontrola: sterilní, obsahující zkoušenou látku (viz I.6.6)

Kontrola adsorpce: obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo

Kontrola toxicity: obsahující zkoušenou látku, referenční látku a inokulum

Stanovení ve zkušební suspensi a slepý pokus s inokulem musí být prováděny souběžně. Doporučuje se, aby stanovení v ostatních baňkách bylo prováděno rovněž souběžně.

To však nemusí být vždy možné. Je třeba zajistit, aby se odebíral dostatečný počet vzorků nebo aby se prováděl dostatečný počet odečtů pro vyhodnocení procenta úbytku v 10denním období rozkladu.

I.7 DATA A HODNOCENÍ

Při výpočtu rozkladu v procentech D_t, se použijí střední hodnoty z měření parametru provedených duplicitně v obou zkušebních nádobách a ze slepého pokusu s inokulem. Vzorce jsou uvedeny dále v oddílech pro jednotlivé zkoušky. Průběh rozkladu se znázorní graficky a vyznačí se 10denní období rozkladu. Vypočte se a uvede úbytek v procentech dosažený na konci 10denního období rozkladu a hodnota pro plató křivky nebo popřípadě hodnota odpovídající konci zkoušky.

V respirometrických zkouškách mohou v důsledku nitrifikace ovlivnit spotřebu kyslíku látky obsahující dusík (viz přílohy II a V).

I.7.1 **Měření rozkladu prostřednictvím stanovení DOC**

Za účelem posouzení platnosti zkoušky (viz I.5.2) by se měla hodnota rozkladu D_t v procentech v každém časovém okamžiku, ve kterém se odebral vzorek, vypočítat odděleně pro každou baňku obsahující zkoušenou látku, a to pomocí středních hodnot měření DOC provedených duplicitně. Vypočte se podle této rovnice:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

kde

D_t = rozklad v procentech v čase t,

C_0 = střední počáteční koncentrace DOC v inokulovaném kultivačním médiu obsahujícím zkoušenou látku (v mg DOC na litr),

C_t = střední koncentrace DOC v inokulovaném kultivačním médiu obsahujícím zkoušenou látku v čase t (v mg DOC na litr),

C_{bo} = střední počáteční koncentrace DOC ve slepém inokulovaném minerálním médiu (v mg DOC na litr),

C_{b_t} = střední koncentrace DOC ve slepém inokulovaném minerálním médiu v čase t (v mg DOC na litr).

Všechny koncentrace se stanoví experimentálně.

I.7.2 **Rozklad měřený specifickou analýzou**

Je-li možné získat specifické analytické údaje, vypočte se primární biologický rozklad z rovnice:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kde

D_t = rozklad v procentech v čase *t*, obvykle po 28 dnech,

S_a = zbylé množství zkoušené látky v médiu s inokulem na konci zkoušky (mg),

S_b = zbylé množství zkoušené látky ve slepém pokusu s vodou/médiem, do kterých byla přidána pouze zkoušená látka (mg).

I.7.3 **Abiotický rozklad**

Použije-li se abiotická sterilní kontrola, vypočte se abiotický rozklad v procentech podle rovnice:

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kde:

$C_{s(0)}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrole v den 0,

$C_{s()}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrole v den *t*.

I.8 ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— zkoušené a referenční chemické látky a jejich čistota,

— zkušební podmínky,

— inokulum: charakter a místo (místa) odběru, koncentrace a jakákoli předúprava,

— podíl a charakter průmyslového odpadu obsaženého v odpadní vodě, jsou-li známy,

— délka zkoušky a teplota,

— v případě špatně rozpustných zkoušených látek použitý způsob zpracování,

— použitá zkušební metoda; měly by být uvedeny vědecké důvody a vysvětlení pro veškeré změny postupu,

— přehled dat,

— veškeré pozorované projevy inhibice,

— jakýkoli pozorovaný abiotický rozklad,

— specifická analytická data o chemické látce, pokud existují,

— analytická data o meziproduktech, pokud existují,

— graf závislosti rozkladu v procentech na čase pro zkoušenou a referenční látku; je třeba zřetelně označit fázi iniciace, fázi rozkladu, 10denní období rozkladu a směrnici (příloha I). Vyhovuje-li zkouška kritériím jakosti, je možné v grafu použít střední hodnotu rozkladu v procentech v baňkách obsahujících zkoušenou látku,

— rozklad v procentech po 10denním období rozkladu, v oblasti plató a na konci zkoušky.

ČÁST II ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC (metoda C.4A)

II.1 PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahujícího známou koncentraci zkoušené látky (10–40 mg DOC na litr) jako nominální jediný zdroj organického uhlíku se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle při 22 ±2 °C.

Rozklad se sleduje v krátkých intervalech během 28denního období prostřednictvím analýzy DOC. Stupeň biologického rozkladu se vypočte vyjádřením koncentrace rozloženého DOC (opravené na koncentraci DOC ve slepé zkoušce s inokulem) v procentech koncentrace, která byla přítomna na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu lze rovněž vypočítat z doplňkové chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace.

II.2 POPIS METODY

II.2.1 **Aparatura**

a) Erlenmeyerovy baňky, např. 250 ml až 2 litry, podle objemu potřebného pro analýzu DOC;

b) třepačka upravená pro umístění Erlenmeyerových baněk, buď s automatickou regulací teploty nebo používaná v místnosti s konstantní teplotou, a s dostatečným výkonem pro udržení aerobních podmínek ve všech baňkách;

c) filtrační aparatura s vhodnými membránami;

d) analyzátor DOC;

e) přístroj pro stanovení rozpuštěného kyslíku;

f) odstředivka.

II.2.2 **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

II.2.3 **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

II.2.4 **Příprava baněk**

Do dvoulitrových Erlenmeyerových baněk se například odměří 800 ml minerálního média a do jednotlivých baněk se přidají dostatečná množství zásobních roztoků zkoušené a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10–40 mg DOC na litr. Zkontrolují se hodnoty pH a popřípadě se upraví na 7,4. Baňky se inokulují aktivovaným kalem nebo jiným zdrojem inokula (viz I.6.4), aby se získala výsledná koncentrace nejvýše 30 mg suspendovaných látek na litr. Připraví se rovněž kontroly s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkoušené nebo referenční látky.

Podle potřeby se použije jedna nádoba ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky inokulací roztoku, který obsahuje srovnatelná množství jak zkoušené, tak referenční chemické látky v minerálním médiu.

Podle potřeby se také použije další, sterilní baňka s roztokem chemické látky bez inokula, ato ke kontrole, zda se zkoušená chemická látka rozkládá abioticky (viz I.6.6).

Existuje-li dále podezření, že se zkoušená látka významně adsorbuje na skle, kalu apod., provede se předběžný odhad pravděpodobného rozsahu adsorpce, a tedy vhodnosti zkoušky pro danou látku (viz tabulka 1). Nasadí se baňka obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo.

Obsah všech baněk se doplní minerálním médiem na 1 litr a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz bod 4 přílohy II,). Ústí baněk se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla umožněna volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Baňky se poté umístí do třepačky a zahájí se zkouška.

II.2.5 **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola adsorpce

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

II.2.6 **Provedení zkoušky**

Během zkoušky se ve známých časových intervalech duplicitně stanovuje koncentrace DOC v každé baňce, a to dostatečně často, aby bylo možné určit začátek 10denního období rozkladu a úbytek v procentech na konci 10denního období rozkladu. Pro každé stanovení se odebere pouze minimální nezbytné množství zkušební suspense.

Před každým odběrem vzorků se podle potřeby nahradí ztráty odpařováním z baněk přidáním potřebného množství ředicí vody (1.6.1). Před odběrem vzorků se kultivační médium dobře promíchá a zajistí se, aby látky ulpělé na stěnách nádob přešly do roztoku nebo suspense. Vzorky se ihned po odběru zfiltrují přes membránu nebo odstředí (viz bod 4 přílohy II). Zfiltrované nebo odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 hodin při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než – 18 °C.

II.3 DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

II.3.1 **Zpracování výsledků**

Rozklad v procentech v čase *t* se vypočte podle bodu I.7.1. (stanovení DOC) nebo podle bodu I.7.2 (specifická analýza).

Všechny výsledky se uvedou na příslušných formulářích přehledu dat.

II.3.2 **Platnost výsledků**

Viz bod I.5.2.

II.3.3 **Zprávy**

Viz bod I.8.

II.4 PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku:… $mg \cdot l^{-1}$

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu v čase t_0:… $mg \cdot l^{-1}$

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi:… $mg \cdot l^{1}$

5. **STANOVENÍ UHLÍKU**

Analyzátor uhlíku:

	Baňka č.		DOC po n dnech ($mg \cdot l^{-1}$)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Zkoušená látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, střední hodnota $C_{a()}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, střední hodnota $C_{b()}$					
Slepá zkouška s inokulem bez zkoušené látky	3	c_1					
		c_2					
		c, střední hodnota $C_{c()}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, střední hodnota $C_{d()}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT**

Baňka č.		Rozklad v % po *n* dnech				
		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				
Střední hodnota ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: Podobné formuláře lze použít pro referenční chemickou látku a kontrolu toxicity.

7. **ABIOTICKÁ KONTROLA** (nepovinná)

	Čas (dny)	
	0	t
DOC ($mg \cdot l^{-1}$) ve sterilní kontrole	$C_{s(0)}$	$C_{s()}$

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA** (nepovinná)

	Zbylé množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky ($mg \cdot l^{-1}$)	Primární rozklad v procentech
Sterilní kontrola	S_b	
Inokulované zkušební médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČÁST III MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD (Metoda C.4B)

III.1 PODSTATA METODY

Odměřený objem minerálního média obsahujícího známou koncentraci zkoušené látky (10–40 mg DOC na litr) jako jediný zdroj organického uhlíku se inokuluje 0,5 ml odpadní vody na litr média. Směs se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle při 22 ±2 °C.

Rozklad se sleduje v krátkých intervalech během 28denního období prostřednictvím analýzy DOC. Stupeň biologického rozkladu se vypočte vyjádřením koncentrace rozloženého DOC (opravené na koncentraci DOC ve slepé zkoušce s inokulem) v procentech koncentrace, která byla přítomna na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu lze rovněž vypočítat z doplňkové chemické analýzy provedené na začátku a na konci inkubace.

III.2 POPIS METODY

III.2.1 **Aparatura**

a) Erlenmeyerovy baňky, např. 250 ml až 2 litry, podle objemu potřebného pro analýzu DOC;

b) třepačka pro umístění Erlenmeyerových baněk, buď s automatickou regulací teploty nebo používaná v místnosti s konstantní teplotou, a s dostatečným výkonem pro udržení aerobních podmínek ve všech baňkách;

c) filtrační aparatura s vhodnými membránami;

d) analyzátor DOC;

e) přístroj pro stanovení rozpuštěného kyslíku;

f) odstředivka.

III.2.2 **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsaná v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

V této metodě se používá jako inokulum pouze 0,5 ml odpadní vody na litr, a proto je nutné do média dodat stopové prvky a růstové faktory. Toho se dosáhne přidáním 1 ml každého z dále uvedených roztoků na jeden litr výsledného média:

Roztok stopových prvků:

Síran manganatý tetrahydrát, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	39,9 mg
Kyselina boritá, H_3BO_3	57,2 mg
Síran zinečnatý heptahydrát, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	42,8 mg
Heptamolybdenan hexaamonný, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Chelát Fe ($FeCl_3$ s kyselinou ethylendiamintetraoctovou)	100,0 mg

Rozpustí se v ředicí vodě a doplní se touto vodou na 1 000 ml.

Vitaminový roztok:

Kvasničný extrakt	15,0 mg

Kvasničný extrakt se rozpustí ve 100 ml vody. Sterilizuje se průchodem membránou 0,2 μm, nebo se připraví čerstvě.

III.2.3 **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum se získá z výstupu druhého stupně čistírny nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Viz I.6.4.2 a I 6.5.

Použije se 0,5 ml na litr minerálního média.

III.2.4 **Příprava baněk**

Do dvoulitrových Erlenmeyerových baněk se například odměří 800 ml minerálního média a do jednotlivých baněk se přidají dostatečná množství zásobních roztoků zkoušené a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10–40 mg DOC na litr. Zkontrolují se hodnoty pH a popřípadě se upraví na 7,4. Baňky se inokulují odpadní vodou z druhého stupně čištění odpadních vod (viz I.6.4.2) v objemu 0,5 ml na litr. Připraví se rovněž slepé zkoušky s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkoušené nebo referenční látky.

Podle potřeby se použije jedna nádoba ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky inokulací roztoku, který obsahuje srovnatelná množství jak zkoušené, tak referenční chemické látky v minerálním médiu. Podle potřeby se také použije další, sterilní baňka s roztokem chemické látky bez inokula, a to ke kontrole, zda se zkoušená chemická látka rozkládá abioticky (viz I.6.6).

Existuje-li dále podezření, že se zkoušená látka významně adsorbuje na skle, kalu apod., provede se předběžný odhad pravděpodobného rozsahu adsorpce, a tedy vhodnosti zkoušky pro danou látku (viz tabulka 1). Nasadí se baňka obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo.

Obsah všech baněk se doplní minerálním médiem na 1 litr a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz bod 4 přílohy II,). Ústí baněk se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla umožněna volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Baňky se poté umístí do třepačky a zahájí se zkouška.

III.2.5 **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují se nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola adsorpce

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

III.2.6 **Provedení zkoušky**

Během zkoušky se ve známých časových intervalech duplicitně stanovuje koncentrace DOC v každé baňce, a to dostatečně často, aby bylo možné určit začátek 10denního období rozkladu a úbytek v procentech na konci 10denního období rozkladu. Pro každé stanovení se odebere pouze minimální nezbytné množství zkušební suspense.

Před odběrem vzorků se podle potřeby nahradí ztráty odpařováním z baněk přidáním potřebného množství ředicí vody (1.6.1). Před odběrem vzorků se kultivační médium dobře promíchá a zajistí se, aby látky ulpělé na stěnách nádob přešly do roztoku nebo suspense. Vzorky se ihned po odběru zfiltrují přes membránu nebo odstředí (viz odst. 4 přílohy II,). Zfiltrované resp. odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 hodin při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než −18 °C.

III.3 DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

III.3.1 **Zpracování výsledků**

Rozklad v procentech v čase *t* se vypočte podle bodu I.7.1. (stanovení DOC) nebo podle bodu I.7.2 (specifická analýza).

Všechny výsledky se uvedou na příslušných formulářích přehledů dat.

III.3.2 **Platnost výsledků**

Viz bod I.5.2.

III.3.3 **Zprávy**

Viz bod I.8.

III.4 PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku:… $mg \cdot l^{-1}$

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu v čase t_0:… $mg \cdot l^{-1}$

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi:… $mg \cdot l^{1}$

5 **STANOVENÍ UHLÍKU**

Analyzátor uhlíku:

	Baňka č.		DOC po *n* dnech ($mg \cdot l^{-1}$)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Zkoušená látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, střední hodnota $C_{a()}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, střední hodnota $C_{b()}$					
Slepá zkouška s inokulem bez zkoušené látky	3	c_1					
		c_2					
		c, střední hodnota $C_{c()}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, střední hodnota $C_{d()}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT**

Baňka č.		Rozklad po *n* dnech				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
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				
Střední hodnota ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: Podobné formuláře lze použít pro referenční chemickou látku a kontrolu toxicity.

7. **ABIOTICKÁ KONTROLA** (nepovinná)

	Čas (dny)	
	0	t
DOC ($mg \cdot l^{-1}$) ve sterilní kontrole	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA** (nepovinná)

	Zbylé množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky ($mg \cdot l^{-1}$)	Primární rozklad v procentech
Sterilní kontrola	S_b	
Inokulované zkušební médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČÁST IV ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ CO2 (Metoda C.4C)

IV.1 PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahující známou koncentraci zkoušené látky (10–20 mg DOC nebo TOC na litr), která je jediným zdrojem uhlíku, se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle regulovaným proudem vzduchu bez CO_2. Rozklad se sleduje po dobu 28 dnů prostřednictvím vznikajícího CO_2 jímaného v roztoku hydroxidu barnatého nebo sodného, kde se stanoví titrací zbytkového hydroxidu nebo jako anorganický uhlík. Množství CO_2 vzniklého ze zkoušené látky (po korekci na CO_2 pocházející z čistého inokula) se vyjádří v procentech TCO_2. Stupeň biologického rozkladu může být také vypočten z doplňkového stanovení DOC na začátku a na konci inkubace.

IV.2 POPIS METODY

IV.2.1 **Přístroje a pomůcky**

a) Baňky na 2–5 l vybavené provzdušňovací trubicí dosahující až ke dnu nádoby a výstupnímo tvorem;

b) magnetické míchačky pro zkoušení špatně rozpustných látek;

c) absorpční lahev;

d) Zařízení pro regulaci a měření průtoku vzduchu;

e) zařízení pro odstraňování CO_2 při přípravě vzduchu bez CO_2, popřípadě může být použita směs kyslíku bez CO_2 a dusíku bez CO_2 ve správném poměru (20 % O_2 a 80 % N_2) z lahví se stlačenými plyny;

f) zařízení na stanovení CO_2 buď titračně nebo pomocí analyzátoru anorganického uhlíku;

g) zařízení pro membránovou filtraci (podle volby);

h) analyzátor DOC (podle volby).

IV.2.2 **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v části I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

IV.2.3 **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

IV.2.4 **Příprava baněk**

Jako příklad jsou uvedeny hodnoty pro baňky na 5 litrů obsahující 3 litry suspense. V případě použití menších objemů se hodnoty úměrně upraví, musí být ovšem zajištěno, aby bylo možné přesně měřit vznikající CO_2.

Do každé baňky na 5 litrů se přenese 2 400 ml minerálního média. Přidá se vhodné množství připraveného inokula (viz I.6.4.1 a I.6.5), aby koncentrace suspendovaných látek v konečném objemu 3 l inokulované směsi byla 30 $mg \cdot l^{-1}$.

Eventuálně lze nejdříve zředit připravený kal v minerálním médiu na suspensi o koncentraci 500–1 000 mg·l^{-1} a poté přidat alikvotní části do baňky na 5 litrů, aby byla dosažena koncentrace 30 mg·l^{-1}; zajistí se tím větší přesnost. Mohou být použity i jiné zdroje inokula (viz I.6.4.2).

Inokulovaná směs se přes noc provzdušňuje vzduchem bez CO_2, aby se ze systému odstranil oxid uhličitý.

Odděleně do dvojic baněk se ze zásobních roztoků přidá zkoušená látka a referenční látka tak, aby koncentrace pocházející z chemických látek byla v rozmezí 10 až 20 mg DOC nebo TOC na litr; některé lahve se nasadí jako kontrola inokula bez přidání chemických látek. Špatně rozpustné látky se odváží nebo odměří přímo do baněk, nebo se postupuje podle přílohy III.

Podle potřeby se jedna baňka použije ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky, a to přidáním zkoušené i referenční látky ve stejných koncentracích jako v ostatních baňkách.

Podle potřeby se další baňka použije k ověření, zda se zkoušená látka nerozkládá abioticky, přičemž se použije roztok chemické látky bez inokula (viz I.6.6). Sterilizace se provádí přidáním vhodné koncentrace toxické látky.

Ve všech baňkách se upraví objem na 3 1 přídavkem minerálního média bez CO_2. Podle potřeby lze odebrat vzorky pro stanovení DOC (viz bod 4 přílohy II,) a/nebo pro specifickou analýzu. Poté se na výstup plynů u baněk připojí absorpční lahve.

V případě použití hydroxidu barnatého se za každou baňku na 5 litrů zařadí tři absorpční lahve, každá obsahující 100 ml roztoku $Ba(OH)_2$ o koncentraci 0,0125 mol·l^{-1}. Roztok nesmí obsahovat sraženinu síranů a uhličitanu barnatého a jeho koncentrace musí být stanovena bezprostředně před použitím. Je-li použit hydroxid sodný, spojí se dvě absorpční lahve, z nichž druhá slouží jako kontrola, že byl veškerý CO_2 zachycen v první absorpční lahvi. K tomuto účelu se hodí absorpční lahve opatřené sérovými uzávěry. Do každé absorpční lahve se přidá po 200 ml roztoku NaOH o koncentraci 0,05 mol·l^{-1}, což postačuje k absorpci veškerého oxidu uhličitého, který by se uvolnil při úplném rozkladu látky. Roztok hydroxidu sodného, i když je čerstvě připraven, obsahuje stopy uhličitanů; korekce se provede odečtením množství uhličitanů ve slepém pokusu.

IV.2.5 **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují se nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola toxicity

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

IV.2.6 **Provedení zkoušky**

Zkouška se zahájí probubláváním vzduchu bez CO_2 suspensí při průtoku 30–100 ml·min^{-1}. Za účelem analýzy obsahu CO_2 se pravidelně odebírají vzorky absorbentu. Doporučuje se, aby se v průběhu prvních 10 dnů prováděly analýzy každý druhý až třetí den a dále pak každý pátý den až do 28. dne, což umožní rozpoznat období 10denního období rozkladu.

28. den se (nepovinně) odebere vzorek pro stanovení DOC a/nebo pro specifickou analýzu, změří se pH suspensí a poté se do každé baňky přidá 1 ml koncentrované HCl; provzdušňuje se přes noc, aby se odstranil CO_2 přítomný v suspensi. Poslední analýza uvolněného CO_2 se provede 29. den.

Ve dnech, kdy se provádí stanovení CO_2, se odpojí absorpční lahev s hydroxidem barnatým bližší zkušební baňce a roztok hydroxidu barnatého se titruje 0,05M HCl za přítomnosti fenolftaleinu jako indikátoru. Zbývající dvě absorpční lahve se posunou k baňce a na konec řady se zařadí nová absorpční lahev se 100 ml čerstvě připraveného 0,0125M hydroxidu barnatého. Titrace se provádějí podle potřeby, např. je-li pozorována v první absorpční lahvi zřetelná sraženina a před tím, než vznikne viditelná sraženina ve druhé absorpční lahvi, nebo alespoň jednou týdně. Jinou možností je provést při použití NaOH jako absorbentu odběr malého vzorku hydroxidu sodného pomocí injekční stříkačky (podle použitého analyzátoru uhlíku) z absorpční lahve, která je nejblíž k baňce. Vzorek se nastříkne přímo do IC-části analyzátoru uhlíku pro analýzu anorganického uhlíku.

Obsah druhé absorpční lahve se analyzuje pouze na konci zkoušky s cílem stanovit korekci na možný únik CO_2.

IV.3 DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

IV.3.1 **Zpracování výsledků**

Množství CO_2 zachyceného v absorpční lahvi je v případě titračního stanovení dáno vztahem:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

kde

V = objem HCl spotřebovaný při titraci 100 ml obsahu absorpční lahve (ml),

C_B = koncentrace roztoku hydroxidu barnatého ($mol \cdot l^{-1}$),

C_A = koncentrace roztoku kyseliny chlorovodíkové ($mol \cdot l^{-1}$).

Je-li C_B 0,0125 $mol \cdot l^{-1}$ a C_A 0,05 $mol \cdot l^{-1}$, je spotřeba pro titraci 100 ml roztoku $Ba(OH)_2$ 50 ml a hmotnost CO_2 je dána vztahem:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{počet ml HCl spotřebované pň titraci} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

V tomto případě se tedy k přepočtu objemu HCl spotřebovaného při titraci na hmotnost vzniklého CO_2 použije faktor 1,1.

S použitím příslušných výsledků titrace se vypočte hmotnost CO_2 vzniklého ze samotného inokula a inokula se zkoušenou látkou a jejich rozdíl je hmotnost CO_2 vzniklého ze samotné zkoušené látky.

Je-li např. výsledkem titrace samotného inokula 48 ml a inokula se zkoušenou látkou 45 ml, je množství

CO_2 z inokula = 1,1 × (50 − 48) = 2,2 mg,

CO_2 z inokula a zkoušené látky = 1,1 × (50 − 45) = 5,5 mg,

a tedy hmotnost CO_2 vzniklého ze zkoušené látky 3,3 mg.

Biologický rozklad v procentech se vypočte podle vztahu:

$$\text{rozklad v procentech} = \frac{\text{vzniklý } CO_2 \text{ v mg} \times 100}{\text{TCO2} \times \text{přidaná zkušební látka v mg}}$$

nebo

$$\text{rozklad v procentech} = \frac{\text{vzniklý } CO_2 \text{ v mg} \times 100}{\text{TCO přidaný ve zkoušce v mg} \times 3{,}67}$$

přičemž 3,67 je převodní faktor (44/12) pro uhlík a oxid uhličitý.

Rozklad v procentech se po každém období vypočte dosazením hodnoty TCO_2 vypočítané pro každý den až do doby, kdy byl měřen.

Při zachytávání do NaOH se vypočte hmotnost vzniklého CO_2, vyjádřeného jako anorganický uhlík v mg, vynásobením koncentrace anorganického uhlíku v absorpční lahvi objemem absorpčního roztoku.

Rozklad v procentech se vypočte podle vztahu:

$$\% \ ThCO_2 = \frac{\text{anorg. C ze zkušeb. baňky v mg} - \text{anorg. C ze slep. pokusu v mg}}{\text{TOC přidaný jako zkoušená látka v mg}} \times 100$$

Úbytky DOC se (nepovinně) vypočítají podle bodu I.7. Tento výsledek spolu s ostatními výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

IV.3.2 **Platnost výsledků**

Obsah anorganického uhlíku ve zkušební suspensi v minerálním médiu na začátku zkoušky musí být menší než 5 % TC a celkové množství CO_2 vzniklé na konci slepé zkoušky s inokulem nesmí za normálních okolností překročit 40 mg na litr média. Jsouli hodnoty větší než 70 mg CO_2 na litr, měla by být data i experimentální postup kriticky přehodnoceny.

Viz také I.5.2.

IV.3.3 **Zprávy**

Viz I.8.

IV.4 PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat:

ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ OXIDU UHLIČITÉHO

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM ZAHÁJENÍ ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

   Název:

   Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku:… $mg \cdot l^{-1}$

   Počáteční koncentrace chemické látky v médiu:… $mg \cdot l^{-1}$

   Celkové množství uhlíku přidaného do baňky:… mg C

   TCO_2: mg CO_2

4. **INOKULUM**

   Zdroj:

   Provedená úprava:

   Předběžná úprava, pokud byla provedena:

   Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi:… $mg \cdot l^{1}$

5. **TVORBA OXIDU UHLIČITÉHO A ROZLOŽITELNOST**

Metoda: $Ba(OH)_2$/NaOH/jiná

Čas (dny)	CO_2 uvolněný ve zkoušce (mg)		CO_2 uvolněný ve slepé zkoušce (mg)		Celkové množství CO_2 (průměr ve zkoušce minus průměr ve slepé zkoušce) (mg)		TCO_2 $\frac{\text{kumulativní } CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 2	průměr	3 4	průměr	1	2	1	2	průměr
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Poznámka: podobný formulář lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. **ANALÝZA UHLÍKU** (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Čas (dny)	Slepý pokus ($mg \cdot l^{-1}$)	Zkoušená látka ($mg \cdot l^{-1}$)
0	$C_{b(0)}$	C_0
28 ([1])	$Cb_{(t)}$	C_t
([1]) nebo na konci kultivace		

$$\text{odstraněný DOC v \%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTICKÝ ROZKLAD** (nepovinné)

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{CO_2 - \text{tvorba } CO_2 \text{ ve steril. podm. po 28 dnech v mg}}{TCO_2} \times 100$$

ČÁST V ZKOUŠKA MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ (Metoda C.4D)

V.1 PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahující známou koncentraci zkoušené chemické látky (100 mg zkoušené látky na litr, dávající nejméně 50–100 mg TSK na litr), která je jediným zdrojem organického uhlíku, se míchá v uzavřené nádobě při konstantní teplotě (tolerance ±1 °C nebo menší) po dobu 28 dnů. Spotřeba kyslíku se stanoví buď měřením množství kyslíku (elektrolyticky produkovaného), který je potřebný k udržení konstantního objemu plynu v respirační nádobce, nebo ze změn objemu nebo tlaku (nebo obojího) v aparatuře. Uvolněný CO_2 se jímá v roztoku hydroxidu draselného nebo v jiném vhodném absorbentu. Množství kyslíku, které je zkoušenou látkou spotřebováno (korigované na spotřebu kyslíku inokulem ve slepé zkoušce, která se provádí současně), se vyjádří v procentech TSK nebo CHSK. Popřípadě může být z doplňkové specifické chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace vypočten primární biologický rozklad a z analýzy DOC úplný biologický rozklad.

V.2 POPIS METODY

V.2.1 **Přístroje**

a) vhodný respirometr;

b) regulátor teploty s přesností na ±1 °C nebo lepší;

c) zařízení pro membránovou filtraci (nepovinné);

d) analyzátor uhlíku (nepovinné).

V.2.2 **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v části I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

V.2.3 **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

V.2.4 **Příprava baněk**

S použitím zásobních roztoků se připraví samostatné sady roztoků zkoušené chemické látky a referenční chemické látky v minerálním médiu o koncentraci odpovídající obvykle 100 mg chemické látky na litr (dávající nejméně 50–100 mg TSK na litr).

TSK se vypočte z tvorby amoniových solí, pokud lze vyloučit nitrifikaci, v opačném případě by měl být výpočet založen na tvorbě dusičnanů (viz bod 2 přílohy II).

Změří se pH a v případě potřeby se upraví na 7,4 ±0,2.

Špatně rozpustné látky se přidají v pozdějším stádiu (viz dále).

Má-li se stanovit toxicita zkoušené látky, připraví se další roztok v minerálním médiu, jenž obsahuje referenční i zkoušenou látku, a to ve stejných koncentracích jako v roztocích obsahujících jen jednu látku.

Požaduje-li se stanovení fyzikálněchemické spotřeby kyslíku, připraví se roztok zkoušené látky obvykle o koncentraci 100 mg TSK na litr sterilizovaný přídavkem vhodné toxické látky (viz I.6.6).

Připravené objemy roztoků zkoušené a referenční chemické látky se rozdělí alespoň duplicitně do baněk. Do dalších baněk se přidá pouze minerální médium (pro kontrolu inokula) a podle potřeby směs roztoku zkoušené a referenční chemické látky a sterilní roztok.

Je-li zkoušená chemická látka špatně rozpustná, odváží se nebo odměří v tomto stádiu přímo do baněk, nebo se postupuje podle přílohy III. Do lahví pro absorpci CO_2 se přidá hydroxid draselný, pelety hydroxidu sodného nebo jiný absorbent.

V.2.5 **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují se nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola toxicity

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

V.2.6 **Provedení zkoušky**

V baňkách se nechá ustavit požadovaná teplota a vybrané baňky se inokulují přidáním aktivovaného kalu nebo jiného zdroje inokula, aby nebyla koncentrace suspendovaných látek větší než 30 $mg \cdot l^{-1}$. Zařízení se sestaví, spustí se míchačka, přezkouší se na vzduchotěsnost a zahájí se měření spotřeby kyslíku. Obvykle není třeba věnovat zkoušce žádnou zvláštní pozornost, kromě nezbytných odečtů a denní kontroly teploty a míchání.

Z pravidelných častých odečtů se podle postupu uvedeného výrobcem zařízení vypočte spotřeba kyslíku. Na konci inkubace, obvykle po 28 dnech, se změří pH v baňkách, a to zvláště tehdy, je-li spotřeba kyslíku malá nebo větší než TSK_{NH4} (platí pro látky obsahující dusík).

V případě potřeby se na začátku a na konci odebírá vzorek z respiračních nádobek pro stanovení DOC nebo pro specifickou analýzu (viz bod 4 přílohy II). Při počátečním odběru z baňky se zajistí, aby byl znám objem zkušební suspense, která v baňce zůstala. Je-li kyslík spotřebováván látkami obsahujícími dusík, stanoví se přírůstek koncentrací dusičnanů a dusitanů za 28 dnů a vypočte se korekce na spotřebu kyslíku nitrifikací (příloha V).

V.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

V.3.1. **Zpracování výsledků**

Spotřeba kyslíku (mg) zkoušenou látkou za danou dobu (korigovaná na spotřebu kyslíku inokulem za stejnou dobu ve slepé zkoušce) se podělí hmotností zkoušené látky v baňce. Získá se tak hodnota BSK vyjádřená v mg kyslíku na mg zkoušené látky:

$$\text{BOD} = \frac{\text{spotř. } O_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. } O_2 \text{ ve slep zkoušce v mg}}{\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ na mg zkoušené chemické látky.}$$

Biologický rozklad v procentech se vypočte buď z rovnice:

$$\text{biolog. rozklad v \%} = \%\text{ThOD} = \frac{\text{BOD(mg } O_2\text{/mg BSK (mg O2 na mg chem. látky))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg TSK (mg O2 na mg chem. látky))}} \times 100$$

nebo z rovnice:

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg BSK (mg O2 na mg chem. látky))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg COD (mg O2 na mg chem. látky))}} \times 100$$

Je třeba poznamenat, že tyto dvě metody nemusí poskytovat stejné hodnoty; přednost se dává první metodě.

Pro látky, jež obsahují dusík, se použije vhodná hodnota TSK (pro NH_4 nebo NO_3) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 přílohy II). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (příloha V).

V případě, že se provádí nepovinné stanovení organického uhlíku a/nebo specifické chemické látky, vypočte se stupeň rozkladu podle bodu I.7.

Všechny výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

V.3.2 **Platnost výsledků**

Obvyklá spotřeba kyslíku inokulem je 20–30 mg O_2 na litr a neměla by být větší než 60 $mg \cdot l^{-1}$ za 28 dnů. Hodnoty větší než 60 $mg \cdot l^{-1}$ vyžadují kritické přehodnocení výsledků a experimentální techniky. Je-li pH mimo rozpětí 6 – 8,5 a spotřeba kyslíku zkoušenou látkou je menší než 60 %, měla by být zkouška opakována s nižší koncentrací zkoušené látky.

Viz také I.5.2.

V.3.3 **Zprávy**

Viz I.8.

V.4 PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat:

ZKOUŠKA MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM ZAHÁJENÍ ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace zásobního roztoku:… $mg \cdot l^{-1}$

Počáteční koncentrace v médiu, C_0:… $mg \cdot l^{-1}$

Objem zkušební baňky (V):… ml

TSK nebo CHSK:… v mg O_2 na mg zkoušené látky (NH_4, NO_3):

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi:… $mg \cdot l^{1}$

5. **SPOTŘEBA KYSLÍKU: BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST**

		Čas (dny)											
		0		7		14			21			28	
Spotřeba O_2 (mg) zkoušenou látkou	1												
	2												
	a, průměr												
Spotřeba O_2 (mg) ve slepé zkoušce	3												
	4												
	b, průměr												
Korigovaná BSK (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BSK na mg zkoušené látky	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												
Rozklad v % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	$D_{1\ (a1)}$												
	$D_{2\ (a2)}$												
	Průměr [1]												
V = objem média ve zkušební baňce													

[1] Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

Poznámka: Podobný formulář lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. **KOREKCE NA NITRIFIKACI** (viz příloha V)

Den	0	28	Rozdíl
i) Koncentrace dusičnanů (mg N na litr)			(N)
ii) Kyslíkový ekvivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii) Koncentrace dusitanů (mg N na litr)			(N)
iv) Kyslíkový ekvivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii + iv) Celkový kyslíkový ekvivalent	—	—	

7. **ANALÝZA UHLÍKU** (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Čas (dny)	Slepá zkouška ($mg \cdot l^{-1}$)	Zkoušená látka ($mg \cdot l^{-1}$)
0	$(C_{bl(0)})$	$(C_{0)}$
28 [1]	$(C_{bl(})$	(C_t)
[1] nebo na konci inkubace		

$$\text{odstraněný DOC v \%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFICKÁ ANALÝZA** (nepovinné)

S_b = koncentrace ve fyzikálněchemické kontrole (sterilní) po 28 dnech,

S_a = koncentrace v inokulované baňce po 28 dnech.

$$\text{biologický rozklad v \%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTICKÝ ROZKLAD** (nepovinné)

a = spotřeba kyslíku ve sterilních baňkách po 28 dnech v mg,

$$\text{spotřeba kyslíku na mg zkoušené chemické látky} = \frac{a}{C_o V}$$

(viz oddíl 1 a 3)

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}.$$

ČÁST VI ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH (Metoda C.4E)

VI.1 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Roztok zkoušené látky v minerálním médiu, obvykle o koncentraci 2 až 5 $mg \cdot l^{-1}$, se inokuluje malým množstvím mikroorganismů ze směsné kultury a udržuje se ve zcela naplněných uzavřených lahvičkách, v temnu a při konstantní teplotě. Rozklad se sleduje po dobu 28 dnů prostřednictvím analýzy rozpuštěného kyslíku. Množství spotřebovaného kyslíku po korekci na souběžnou slepou zkoušku s inokulem se vyjádří jako TSK nebo CHSK.

VI.2 POPIS METODY

VI.2.1 **Přístroje a pomůcky**

a) Lahve pro analýzu BSK se skleněnými zátkami, např. na 250 až 300 ml.

b) Vodní lázeň nebo inkubátor pro udržování lahviček při konstantní teplotě (tolerance ±1 °C nebo menší) v temnu.

c) Velké skleněné lahve na 2–5 l pro přípravu média a pro naplnění lahviček pro analýzu BSK.

d) Kyslíková elektroda a oxymetr nebo vybavení a činidla pro Winklerovu titrační metodu.

VI.2.2 **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v části I.6.2.

Smísí se po 1 ml roztoků a) až d) a doplní se vodou na 1 litr.

VI.2.3 **Příprava inokula**

Inokulum se obvykle získává z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Alternativním zdrojem inokula může být povrchová voda. Obvykle se použije jedna kapka (0,05 ml) až 5 ml filtrátu na litr média; k nalezení optimálního objemu dané odpadní vody může být nezbytné provést pokusy (viz I.6.4.2 a I.6.5).

VI.2.4 **Příprava lahviček**

Minerální médium se alespoň 20 min silně provzdušňuje. Všechny série zkoušek se provedou s minerálním médiem ze stejné dávky. Obecně je médium připraveno k použití po 20 hodinách stání při zkušební teplotě. Pro kontrolu se stanoví obsah kyslíku v médiu; jeho obsah by měl být asi 9 $mg \cdot l^{-1}$ při 20 °C. Všechny operace přenosu média nasyceného vzduchem a jeho plnění se provedou tak, aby nevznikaly bublinky, např. pomocí nasávaček.

Připravují se shodné skupiny lahviček pro analýzu BSK pro stanovení se zkoušenou látkou a referenční látkou v souběžných sériích experimentů. Připraví se dostatečný počet lahviček, včetně slepých pokusů, tak, aby v každém zvoleném časovém intervalu, např. 0, 7, 14, 21 a 28 dnů, bylo možné provést alespoň dvě měření spotřeby kyslíku. K tomu, aby bylo možné rozpoznat 10denní období rozkladu, může být potřeba více lahviček.

Velké lahve se přibližně do jedné třetiny naplní provzdušněným médiem. Poté se zvlášť do jednotlivých velkých lahví přidá dostatečný objem zásobního roztoku zkoušené látky a referenční látky, a to obvykle tak, aby nebyla konečná koncentrace chemických látek větší než 10 $mg \cdot l^{-1}$. Ke slepému pokusu v další velké lahvi se nepřidávají žádné chemické látky.

S cílem zajistit, aby aktivita inokula nebyla omezená, nesmí koncentrace kyslíku v lahvičkách pro analýzu BSK klesnout pod 0,5 $mg \cdot l^{-1}$. Toto omezuje koncentraci zkoušené látky na 2 $mg \cdot l^{-1}$. Pro látky, které se špatně rozkládají, a pro látky s nízkou hodnotou TSK lze použít koncentraci 5 – 10 $mg \cdot l^{-1}$. V některých případech se doporučuje provést souběžné série měření při dvou různých koncentracích zkoušené látky, např. při 2 a 5 $mg \cdot l^{-1}$. Obvykle se TSK počítá na základě tvorby amonných solí, ale v případech, kdy se předpokládá nitrifikace nebo kdy dochází k nitrifikaci, se TSK vypočte na základě tvorby dusičnanů (TSK_{NO3}, viz bod 2 přílohy II). V případech, kdy nitrifikace není úplná, se provede korekce na změny analyticky stanovených koncentrací dusitanů a dusičnanů (viz příloha V).

Máli být vyšetřena toxicita zkoušené látky (např. v případě dříve zjištěné nízké biologické rozložitelnosti), je nezbytné nasadit další sérii lahviček.

Připraví se další velká láhev s provzdušněným minerálním médiem (naplněná asi do jedné třetiny objemu), do které se přidá zkoušená a referenční chemická látka o konečné koncentraci obvykle stejné jako v případě ostatních velkých lahví.

Roztoky ve velkých lahvích se inokulují výstupem z druhého stupně čistírny odpadních vod (jedna kapka nebo 0,05 až 5 $ml \cdot l^{-1}$) nebo z jiného zdroje inokula, jako je např. říční voda (viz I.6.4.2). Nakonec se lahve doplní na objem provzdušněným minerálním médiem za použití hadičky, která sahá na dno, aby se dosáhlo dostatečného promíchání.

VI.2.5 **Počet lahviček v typické zkoušce**

V typické zkoušce se použijí tyto lahvičky:

nejméně 10 lahviček se zkoušenou látkou a inokulem (zkušební suspense),

nejméně 10 lahviček pouze s inokulem (slepá zkouška s inokulem),

nejméně 10 lahviček s referenční látkou a inokulem (kontrolní zkouška postupu),

a podle potřeby 6 lahviček se zkoušenou látkou, referenční látkou a inokulem (kontrola toxicity). Pro rozpoznání 10denního období rozkladu je však potřebný dvojnásobný počet lahviček.

VI.2.6 **Provedení zkoušky**

Všechny připravené roztoky se ihned po přípravě rozdělí do příslušné skupiny lahviček pro analýzu BSK, a to pomocí hadičky zavedené do spodní čtvrtiny velké lahve (nikoliv ke dnu) tak, aby se všechny lahvičky pro analýzu BSK zcela naplnily. Jemně se poklepe, aby se odstranily bublinky. V lahvičkách se Winklerovou metodou nebo pomocí oxymetru ihned stanoví obsah rozpuštěného kyslíku k počátku zkoušky (k času nula). Obsah lahviček lze konzervovat pro pozdější analýzu přídavkem síranu manganatého a hydroxidu sodného (prvním Winklerovým činidlem). Před provedením zbývajících kroků Winklerovy metody se pečlivě uzavřené lahvičky obsahující kyslík vázaný ve formě hydratovaného oxidu manganitého skladují v temnu nejdéle 24 hodin při teplotě 10–20 °C. Zbývající souběžně připravené lahvičky se uzavřou tak, aby v nich nezůstaly bublinky vzduchu, a inkubují se v temnu při 20 °C. Každá série musí být doprovázena úplnou sérií slepého pokusu s inokulovaným médiem. Ve všech sériích se během 28 dnů inkubace v pravidelných intervalech (nejméně jednou týdně) stanoví alespoň ve dvou lahvičkách obsah rozpuštěného kyslíku.

Týdenní vzorky umožní stanovení rozkladu v procentech ve 14denním období rozkladu, zatímco vzorky odebírané každé 3–4 dny umožní rozpoznat 10denní období rozkladu, což vyžaduje dvojnásobný počet lahviček.

U látek obsahujících dusík se provede korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci. K tomuto účelu se stanoví koncentrace rozpuštěného kyslíku oxymetrem a poté se z lahvičky pro analýzu BSK odebere vzorek pro stanovení dusitanů a dusičnanů. Z přírůstku koncentrace dusitanů a dusičnanů se vypočte množství spotřebovaného kyslíku (viz příloha V).

VI.3 DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

VI.3.1 **Zpracování výsledků**

Nejprve se vypočte BSK, ke které došlo po každé časové periodě, a to odečtením spotřeby kyslíku (v mg O_2 na litr) ve slepém pokusu s inokulem od spotřeby zkoušenou chemickou látkou. Takto korigovaná spotřeba se vydělí koncentrací zkoušené látky ($mg \cdot l^{-1}$) a získá se specifická BSK v mg kyslíku na mg zkoušené látky. Biologická rozložitelnost v procentech se vypočte jako podíl specifické BSK a specifické TSK (vypočtené podle bodu 2 přílohy II) nebo CHSK (stanovené analyticky, viz bod 3 přílohy II,), tedy:

$$\text{BOD} = \frac{\text{spotř. } O_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. } O_2 \text{ ve slep. pokusu v mg}}{\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ na mg zkoušené chemické látky.}$$

$$\text{rozklad v \%} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg BSK (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg TSK (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky))}} \times 100$$

nebo

$$\text{Rozklad v \%} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg BSK (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky))}}{\text{COD (mg } O_2\text{/mg COD (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky))}} \times 100$$

Je třeba poznamenat, že tyto dvě metody nemusí poskytovat stejné hodnoty; přednost se dává první metodě.

Pro látky, jež obsahují dusík, se použije odpovídající hodnota TSK (pro NH_4 nebo NO_3) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 přílohy II,). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (příloha V).

VI.3.2 **Platnost výsledků**

Spotřeba kyslíku ve slepém pokusu s inokulem by neměla být po 28 dnech vyšší než 1,5 $mg \cdot l^{-1}$. Vyšší hodnoty vyžadují přešetření experimentální techniky. Zbytková koncentrace kyslíku ve zkušebních lahvičkách by neměla nikdy klesnout pod 0,5 $mg \cdot l^{-1}$. Takto nízké úrovně kyslíku jsou platné pouze tehdy, lzeli použitou metodou stanovení rozpuštěného kyslíku tak nízké úrovně přesně změřit.

Viz také I.5.2.

VI.3.3 **Zprávy**

Viz I.8.

VI.4 PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat:

ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM ZAHÁJENÍ ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace zásobního roztoku:… $mg \cdot l^{-1}$

Počáteční koncentrace v lahvičce:… $mg \cdot l^{-1}$

TSK nebo CHSK:… v mg O_2 na mg zkoušené látky

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace v reakční směsi:… $mg \cdot l^{1}$

5. **STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU:**

Metoda: Winklerova metoda/oxymetr

Analýzy lahviček

Doba kultivace (d)			Rozpuštěný kyslík ($mg \cdot l^{-1}$)			
			0	n_1	n_2	
Slepá zkouška (bez chemické látky)	1	C_1				
	2	C_2				
Průměr	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Zkoušená chemická látka	1	a_1				
	2	a_2				
Průměr	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Poznámka: podobný formulář lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. **KOREKCE NA NITRIFIKACI** (viz příloha V)

Doba kultivace	0	n_1	n_2	n_3
i) Koncentrace dusičnanů (mg N na litr)				
ii) Změna koncentrace dusičnanů (mg N na litr)	—			
iii) Kyslíkový ekvivalent ($mg \cdot l^{-1}$)	—			
iv) Koncentrace dusitanů (mg N na litr)				
v) Změna koncentrace dusitanů (mg N na litr)	—			
vi) Kyslíkový ekvivalent ($mg \cdot l^{-1}$)	—			
iii + vi) Celkový kyslíkový ekvivalent ($mg \cdot l^{-1}$)	—			

7. **ÚBYTEK ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU: ROZKLAD V PROCENTECH**

	Úbytek po n dnech ($mg \cdot l^{-1}$)			
	n_1	n_2	n_3	
LAHVIČKA 1: $(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})$				
LAHVIČKA 2: $(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})$				
LAHVIČKA 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. zkuš. chem} \times \text{ThOD látky}}$				
LAHVIČKA 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. zkuš. chem} \times \text{ThOD látky}}$				
průměr([1]) $\%\ D = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

([1]) Hodnoty nelze průměrovat, je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

m_{t0} = hodnota pro zkušební lahvičku v čase 0

m_{tx} = hodnota pro zkušební lahvičku v čase x

m_{b0} = hodnota pro slepý pokus v čase 0

m_{bx} = hodnota pro slepý pokus v čase x

Použijí se rovněž korekce na nitrifikaci z bodu iii + vi v oddílu 6.

8. **ÚBYTEK ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU VE SLEPÉM POKUSU**

Spotřeba kyslíku ve slepém pokusu je $(m_{b0} - m_{b28})$ v $mg \cdot l^{-1}$. Tato spotřeba je důležitá pro platnost zkoušky. Měla by být menší než 1,5 $mg \cdot l^{-1}$.

ČÁST VII ZKOUŠKA MITI (Metoda C.4-F)

VII.1 PODSTATA METODY

Měření spotřeby kyslíku v míchaném roztoku nebo suspensi zkoušené chemické látky v minerálním médiu inokulovaném speciální kulturou neadaptovaných mikroorganismů se provádí automaticky po dobu 28 dnů za tmy v uzavřeném respirometru při 25 ±1 °C. Uvolňovaný oxid uhličitý se jímá v hydroxidu sodném. Biologická rozložitelnost se vyjádří jako spotřeba kyslíku (korigovaná na slepý pokus) vyjádřená v procentech teoretické spotřeby kyslíku (TSK). Primární biologická rozložitelnost vyjádřená v procentech se rovněž vypočte z doplňkové specifické chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace, popřípadě z analýzy DOC.

VII.2 POPIS METODY

VII.2.1 **Přístroje a pomůcky**

a) Automatický elektrolytický měřič BSK nebo respirometr standardně vybavený 6 baňkami na 300 ml opatřenými uzávěry obsahujícími absorbent CO_2;

b) místnost s konstantní teplotou nebo vodní lázeň nastavená na 25 ±1 °C;

c) zařízení pro membránovou filtraci (nepovinné);

d) analyzátor uhlíku (nepovinné).

VII.2.2 **Příprava minerálního média**

Za použití reakčních činidel čistoty p.a. se připraví tyto zásobní roztoky (I.6.1.):

a)	Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4	8,50
	Hydrogenfosforečnan didraselný, K_2HPO_4	21,75 g
	Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	44,60 g
	Chlorid amonný, NH_4Cl	1,70 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.	
	pH roztoku musí být 7,2.	
b)	Síran hořečnatý heptahydrát, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.	
c)	Chlorid vápenatý bezvodý, $CaCl_2$	27,50 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.	
d)	Chlorid železitý hexahydrát, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.	

Spojí se po 3 ml roztoků a), b), c), a d) a doplní se na 1 litr.

VII.2.3 **Příprava inokula**

Odeberou se čerstvé vzorky nejméně z deseti lokalit, kde se používají a vypouštějí různé chemické látky. Z míst, jako jsou čistírny městských a průmyslových odpadních vod, řeky, jezera a moře se odeberou litrové vzorky kalu, povrchových půd, vody atd., které se pečlivě smíchají. Po odstranění vyplavených látek a ustálení se pH supernatantu upraví na 7 ±1 hydroxidem sodným nebo kyselinou fosforečnou.

Vhodným objemem filtrovaného supernatantu se naplní nádoba na aktivaci kalu a kapalina se 23½ h provzdušňuje. Třicet minut po ukončení provzdušňování se odlije přibližně jedna třetina celkového objemu supernatantu a k usazenému materiálu se přidá stejný objem roztoku (pH 7), který obsahuje vždy po 0,1 % glukosy, peptonu a dihydrogenfosforečnanu draselného, a obnoví se provzdušňování. Tento postup se opakuje jednou denně. Kalová jednotka musí být provozovaná podle zásad správné laboratorní praxe: odtok má být čirý, teplota má být udržována při 25 ±2 °C, pH má být 7 ±l, kal se má dobře usazovat, provzdušňování musí být za všech okolností dostatečné, mají být přítomni prvoci a aktivita kalu se má kontrolovat pomocí referenční látky nejméně každé tři měsíce. Inokulum se nepoužívá dříve než po 1 měsíci kultivace, ale ne později než po čtyřech měsících. Proto se v pravidelných intervalech jednou za tři měsíce odebírají vzorky z 10 míst.

K udržení stejné aktivity čerstvého a starého kalu se filtrovaný supernatant aktivovaného použitého kalu mísí se stejným objemem filtrovaného supernatantu čerstvě odebraného kalu pocházejícího z deseti zdrojů a směs se kultivuje podle výše uvedeného postupu. Kal se použije jako inokulum až 18 – 24 h po uvedeném zpracování.

VII.2.4 **Příprava baněk**

Připraví se těchto 6 baněk:

Baňka č. 1: zkoušená chemická látka v ředicí vodě, 100 $mg \cdot l^{-1}$

Baňky č. 2, 3, 4: zkoušená chemická látka v minerálním médiu, 100 $mg \cdot l^{-1}$

Baňka č. 5: referenční látka (např. anilin) v minerálním médiu, 100 $mg \cdot l^{-1}$

Baňka č. 6: pouze minerální médium

Špatně rozpustné chemické látky se odváží nebo odměří, nebo se zpracují podle přílohy III, s výjimkou těch, u nichž nesmějí být použita rozpouštědla ani emulgátory. Do speciálních uzávěrů všech lahví se přidá absorbent oxidu uhličitého. pH v baňkách č. 2, 3 a 4 se upraví na 7,0.

VII.2.5 **Provedení zkoušky**

Baňky č. 2, 3, 4 (zkušební suspense), č. 5 (kontrola aktivity), č. 6 (slepý pokus s inokulem) se inokulují malým množstvím inokula tak, aby byla výsledná koncentrace kalu 30 $mg \cdot l^{-1}$. Do lahve č. 1 se inokulum nepřidává, slouží jako abiotická kontrola. Zařízení se sestaví, přezkouší se na vzduchotěsnost, spustí se míchačka a v temnu se zahájí měření spotřeby kyslíku. Denně se kontroluje teplota, míchání, coulometrický zapisovač spotřeby kyslíku a zaznamenají se všechny změny barvy obsahu baněk. Spotřeba kyslíku pro 6 baněk se odečítá přímo, např. šestikanálovým zapisovačem, čímž se získá křivka BSK. Na konci kultivace, obvykle po 28 dnech, se změří pH v baňkách a stanoví se zbytková koncentrace zkoušené chemické látky a jejích produktů rozkladu a v případě zkoušení látek rozpustných ve vodě také koncentrace DOC (postup podle bodu 4 přílohy II). Zvláštní pozornost je třeba věnovat těkavým látkám. Pokud se předpokládá nitrifikace, stanoví se podle možnosti koncentrace dusičnanů a dusitanů.

VII.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

VII.3.1 **Zpracování výsledků**

Spotřeba kyslíku (mg) zkoušenou látkou za danou dobu (korigovaná na spotřebu inokulem za stejnou dobu ve slepém pokusu) se podělí hmotností použité zkoušené látky. Získá se tak hodnota BSK vyjádřená v mg kyslíku na mg zkoušené látky:

$$BOD = \frac{\text{spotř. } O_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. } O_2 \text{ ve slepé zkoušce v mg}}{\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ na mg zkoušené chemické látky.}$$

Biologický rozklad v procentech se potom vypočte z rovnice:

$$\text{biolog. rozklad v \%} = \text{\% ThOD} = \frac{\text{BOD(mg } O_2\text{BSK (mg O2 na mg chem. látky))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{TSK (mg O2 na mg chem. látky))}} \times 100$$

Pro směsi se TSK vypočte z elementární analýzy, tak jako pro jednoduché sloučeniny. Použije se odpovídající hodnota TSK (TSK_{NH4} nebo TSK_{NO3}) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 přílohy II). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (příloha V).

Vypočte se primární biologický rozklad v procentech z úbytku specifické (výchozí) chemické látky (viz I.7.2):

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\,\%$$

Zjistíli se při měření fyzikálně-chemického úbytku ztráta zkoušené chemické látky v baňce č. 1, zaznamená se to a jako koncentrace zkoušené látky (S_b) po 28 dnech se pro výpočet biologické rozložitelnosti dosadí tato koncentrace.

Stanovuje-li se koncentrace DOC (nepovinné), vypočte se konečná hodnota biologického rozkladu v procentech podle vztahu:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\,\%$$

jak je uvedeno v bodě I.7.1. Zjistíli se při měření fyzikálně-chemického úbytku ztráta DOC v baňce č. 1, použije se při výpočtu biologického rozkladu v procentech tato koncentrace DOC.

Všechny výsledky se zaznamenají do přehledu dat.

VII.3.2 **Platnost výsledků**

Obvyklá spotřeba kyslíku inokulem je 20–30 mg O_2 na litr a neměla by být větší než 60 $mg \cdot l^{-1}$ za 28 dnů. Hodnoty větší než 60 $mg \cdot l^{-1}$ vyžadují kritické přehodnocení výsledků a experimentální techniky. Je-li pH mimo rozpětí 6–8,5 a spotřeba kyslíku zkoušenou látkou je menší než 60 %, měla by být zkouška opakována s nižší koncentrací zkoušené látky.

Viz také I.5.2.

V případě, že rozklad anilinu vypočtený ze spotřeby kyslíku nepřekročí po 7 dnech 40 % a po 14 dnech 65 %, považuje se zkouška za neplatnou.

VII.3.3 **Zprávy**

Viz I.8.

VII.4 PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat:

ZKOUŠKA MITI (I)

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM ZAHÁJENÍ ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku:… $mg \cdot l^{-1}$

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu, C_0:… $mg \cdot l^{-1}$

Objem reakční směsi, *V*:… ml

TSK:… mg O_2 na litr

4. **INOKULUM**

Místa odběru kalu:

1) …
2) …
3) …
4) …
5) …
6) …
7) …
8) …
9) …
10) …

Koncentrace suspendovaných látek v aktivovaném kalu po aklimatizaci se syntetickými splašky =… $mg \cdot l^{-1}$.

Objem aktivovaného kalu v litru konečného média =… ml

Koncentrace kalu v konečném médiu =… $mg \cdot l^{-1}$

5. **SPOTŘEBA KYSLÍKU: BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST**

Typ použitého respirometru:

			Čas (dny)				
			0	7	14	21	28
Spotřeba O_2 (mg) zkoušenou látkou	a_1						
	a_2						
	a_3						
Spotřeba O_2 (mg) ve slepé zkoušce	b						
Korigovaná spotřeba O_2 (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
BSK na mg zkoušené látky	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	Baňka 1					
		Baňka 2					
		Baňka 3					
Rozklad v % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Průměr [1]					

Poznámka: podobný formulář lze použít i pro referenční látku.

[1] Hodnoty nelze průměrovat, je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

6. **ANALÝZA UHLÍKU** (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Baňka	DOC				úbytek DOC v %	Průměr
	Naměřená hodnota		Korigovaná hodnota			
Voda + zkoušená látka	a				—	—
Kal + zkoušená látka	b_1		$b_1 - c$			
Kal + zkoušená látka	b_2		$b_2 - c$			
Kal + zkoušená látka	b_3		$b_3 - c$			
Kontrolní slepá zkouška	c		—		—	—

$$\text{odstraněný DOC v \%} : \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATA ZE SPECIFICKÉ CHEMICKÉ ANALÝZY**

	Zbytkové množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky	Rozklad v %
Slepá zkouška s vodou	S_b	
Inokulované médium	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\text{rozklad v \%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Rozklad v % se vypočte pro baňky *a1*, *a2*, *a3*.

8. **POZNÁMKY**

Připojí se křivka závislosti BSK na čase, je-li k dispozici.

Příloha I

ZKRATKY A DEFINICE

DO: Rozpuštěný kyslík (*dissolved oxygen*) ($mg \cdot l^{-1}$) je koncentrace kyslíku, který je rozpuštěn ve vodném vzorku.

BSK: Biochemická spotřeba kyslíku (*biochemical oxygen demand, BOD*) (g) je množství kyslíku, jež je v průběhu metabolizace zkoušené látky spotřebováno mikroorganismy; vyjadřuje se také jako spotřeba kyslíku v gramech na gram zkoušené látky. (Viz metoda C.5).

CHSK: Chemická spotřeba kyslíku (*chemical oxygen demand, COD*) (g) je množství kyslíku, jež je spotřebováno v průběhu oxidace zkoušené látky horkým kyselým dichromanem; je měřítkem množství přítomných oxidovatelných látek; vyjadřuje se také v gramech kyslíku spotřebovaného na gram zkoušené látky. (Viz metoda C.6).

DOC: Rozpuštěný organický uhlík (*dissolved organic carbon*) je celkový organický uhlík, který je přítomný v roztoku nebo projde přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm nebo zůstane v supernatantu po odstřeďování po dobu 15 min při zrychlení 40 000 $m \cdot s^{-2}$ (asi 4 000 g).

TSK: Teoretická spotřeba kyslíku (*theoretical oxygen demand, ThOD*) (mg) je celkové množství kyslíku nezbytné pro úplnou oxidaci chemické látky; vypočte se z molekulového vzorce látky (viz bod 2 přílohy II,) a vyjadřuje se také jako množství kyslíku v mg nezbytné na mg zkoušené látky.

TCO_2: Teoretický oxid uhličitý (*theoretical carbon dioxide, $ThCO_2$*) je množství oxidu uhličitého, které by mělo vzniknout ze známého nebo změřeného obsahu uhlíku ve zkoušené látce za předpokladu její úplné mineralizace; vyjadřuje se v mg oxidu uhličitého uvolněného z 1 mg zkoušené látky.

TOC: Celkový organický uhlík (*total organic carbon*) ve vzorku je součtem organického uhlíku v roztoku a v suspensi.

IC: Anorganický uhlík (*inorganic carbon*).

TC: Celkový uhlík (*total carbon*) je součtem organického a anorganického uhlíku ve vzorku.

Primární biologický rozklad:

jsou změny chemické struktury látky způsobené biologickým působením, vedoucí ke ztrátě specifických vlastností látky.

Úplný biologický rozklad (aerobní):

je stupeň rozkladu látky dosažený po jejím úplném zužitkování mikroorganismy, vedoucí k produkci oxidu uhličitého, vody, minerálních solí a nové mikrobiální buněčné hmoty (biomasy).

Snadno biologicky rozložitelná:

je dohodnutá klasifikace chemických látek, které prošly screeningovými zkouškami úplné biologické rozložitelnosti; tyto zkoušky jsou tak přísné, že lze předpokládat, že se látky budou ve vodném prostředí za aerobních podmínek rychle a úplně biologicky rozkládat.

Biologicky rozložitelná:

je klasifikace chemických látek, pro něž existuje nepochybný důkaz o jejich biologické rozložitelnosti (primární nebo konečné) v kterékoli uznávané zkoušce biologické rozložitelnosti.

Odstranitelnost:

je náklonnost látek k jejich odstranění při biologickém čištění odpadních vod, aniž by byl nepříznivě ovlivněn normální průběh čisticích pochodů. Látky snadno biologicky rozložitelné jsou obecně odstranitelné, avšak ne všechny rozložitelné látky jsou odstranitelné. Mohou zde působit také abiotické procesy.

Fáze iniciace:

je doba, ve zkoušce na úbytek rozpuštěného organického uhlíku, od inokulace do dosažení alespoň 10% biologického rozkladu. Fáze iniciace je často různě dlouhá a špatně reprodukovatelná.

Doba rozkladu:

je doba od konce fáze zdržení do dosažení 90 % maximální dosažitelné úrovně rozkladu.

10denní období rozkladu:

je 10 dnů, které následují bezprostředně po dosažení 10% rozkladu.

PŘÍLOHA II

VÝPOČET A STANOVENÍ NĚKTERÝCH SOUHRNNÝCH PARAMETRŮ

V závislosti na zvolené zkušební metodě se vyžaduje určení některých souhrnných parametrů. V následujícím oddíle je popsán výpočet těchto hodnot. Využití těchto parametrů je popsáno u jednotlivých metod.

1. **Obsah uhlíku**

Obsah uhlíku se počítá ze známého elementárního složení nebo se stanoví analýzou prvků ve zkoušené látce.

2. **Teoretická spotřeba kyslíku (TSK)**

Teoretickou spotřebu kyslíku (TSK) lze vypočítat ze znalosti elementárního složení nebo z výsledků analýzy prvků. Pro látku

$$C_c H_h Cl_{cl} N_n Na_{na} O_o P_p S_s$$

bez nitrifikace,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16[2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

nebo s nitrifikací,

$$ThOD_{NH3} = \frac{16[2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Chemická spotřeba kyslíku (CHSK)**

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) se stanoví metodou C.6.

4. **Rozpuštěný organický uhlík (DOC)**

Rozpuštěným organickým uhlíkem je podle definice organický uhlík přítomný ve vodném roztoku chemické látky nebo směsi, který projde přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm.

Odeberou se vzorky ze zkušebních nádob a ihned se filtrují pomocí filtračního zařízení s vhodným membránovým filtrem. Prvních 20 ml (toto množství může být při použití malých filtrů zmenšeno) se odstraní. 10–20 ml, nebo v případě nástřiku menší objem (objem závisí na množství potřebném pro analýzu), se uschová pro analýzu uhlíku. Koncentrace DOC se stanoví pomocí analyzátoru organického uhlíku, který umožňuje přesné stanovení koncentrace uhlíku, která je menší nebo rovna 10 % počáteční koncentrace DOC použité ve zkoušce.

Zfiltrované vzorky, které není možné analyzovat ve stejný pracovní den, se uchovávají v ledničce 48 h při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

Poznámky:

Membránové filtry jsou často impregnovány povrchově aktivními látkami za účelem jejich hydrofilizace. Filtr tedy může obsahovat až několik mg rozpustného organického uhlíku, který může ovlivnit stanovení biologické rozložitelnosti. Povrchově aktivní látky a jiné rozpustné organické látky se z filtrů odstraňují vyvařením třikrát jednu hodinu v deionizované vodě. Filtry lze poté skladovat 1 týden ve vodě. Při použití filtračních patron pro jedno použití se musí u každé šarže ověřit, zda neobsahuje rozpustný organický uhlík.

V závislosti na typu membránového filtru může docházet k adsorpci zkoušené látky na filtru. Doporučuje se ověřit, zda k adsorpci zkoušené chemické látky na filtru nedochází.

Místo filtrace lze použít k rozlišení TOC od DOC odstřeďování při 40 000 $m \cdot s^{-1}$ (4 000 g) po dobu 15 min. Tato metoda však není spolehlivá při počáteční koncentraci DOC < 10 $mg \cdot l^{-1}$, protože buď nelze odstranit všechny bakterie, nebo se zpětně rozpouští uhlík, který je součástí bakteriální plasmy.

LITERATURA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 12th ed., Am. Publ. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.

— Wagner, *R. von Wasser*, 1976, 46, 139.

— DINEntwurf 38 409, Teil 41 – Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrössen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuss Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere*, 1984, 13(1), 169.

PŘÍLOHA III

VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ŠPATNĚ ROZPUSTNÝCH LÁTEK

Při zkouškách biologické rozložitelnosti špatně rozpustných látek si zaslouží zvláštní pozornost následující aspekty.

Zatímco odběr vzorků homogenních kapalin je problémem jen zřídka, u pevných látek se doporučuje provést homogenizaci vhodnými prostředky, aby v důsledku nehomogenity nedošlo k chybám. Zvláštní pozornost musí být věnována odběrům reprezentativních vzorků o několika miligramech ze směsí látek, které obsahují velké množství nečistot.

V průběhu zkoušek lze použít různé způsoby míchání. Je třeba věnovat pozornost tomu, aby míchání bylo přiměřené právě pro udržení látky v disperzi a nedocházelo k přehřívání, nadměrnému pěnění a nadměrným třecím silám.

Může se použít emulgátor vytvářející stálé disperzi chemické látky. Nesmí být toxický pro bakterie a nesmí se biologicky rozkládat nebo pěnit za zkušebních podmínek.

Stejná kritéria jako pro emulgátory platí i pro rozpouštědla.

U pevných zkoušených látek se nedoporučuje používat pevné nosiče, mohou však být vhodné v případě olejovitých látek.

Použijíli se pomocné látky, jako jsou emulgátory, rozpouštědla a nosiče, musí být proveden slepý pokus s pomocnou látkou.

Pro studium biologické rozložitelnosti špatně rozpustných látek lze použít kteroukoli ze tří respirometrických zkoušek (zkouška na úbytek CO_2, na BSK, zkouška MITI).

LITERATURA

— De Morsier, A. *et al.* Biodegradation tests for poorly soluble compounds. *Chemosphere*, 1987, 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere*, 1984, 13, 169.

PŘÍLOHA IV

VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI LÁTEK POTENCIÁLNĚ TOXICKÝCH PRO INOKULUM

Je-li chemická látka podrobena zkoušení snadné biologické rozložitelnosti a jeví se jako biologicky nerozložitelná, doporučuje se postupovat při požadavku rozlišit inhibiční působení od odolnosti látky vůči rozkladu následujícím způsobem (Reynolds *et al.*, 1987).

Ve zkouškách toxicity i ve zkouškách biologické rozložitelnosti se použijí podobná nebo stejná inokula.

K posouzení toxicity chemických látek zkoušených ve zkouškách snadné biologické rozložitelnosti se doporučuje použít zkoušku inhibice dýchání aktivovaného kalu (směrnice 88/302/EHS), stanovení BSK nebo metodu inhibice růstu nebo kombinaci těchto metod.

Nemáli dojít k inhibici z důvodu toxicity, měla by být koncentrace zkoušené látky použitá ve zkouškách snadné biologické rozložitelnosti menší než 1/10 hodnoty EC_{50} (nebo menší než EC_{20}) zjištěné zkouškou toxicity. Látky s $EC_{50} > 300\ mg \cdot l^{-1}$ pravděpodobně nemají při zkouškách snadné biologické rozložitelnosti toxické účinky.

Hodnoty $EC_{50} < 20\ mg \cdot l^{-1}$ mohou při následném zkoušení působit potíže. Měly by být použity nízké koncentrace, což vyžaduje použít přísné a citlivé zkoušky v uzavřených lahvičkách nebo materiál značený ^{14}C. Použití vyšších koncentrací zkoušené látky může být popřípadě umožněno nasazením aklimatizovaného inokula. V tomto případě se však ztrácí specifické kritérium zkoušky snadné biologické rozložitelnosti.

LITERATURA

Reynolds, L. *et al.*, Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere*, 1987, 16, 2259.

PŘÍLOHA V

KOREKCE NA SPOTŘEBU KYSLÍKU PŘI NITRIFIKACI

Chyby způsobené tím, že při stanovení spotřeby kyslíku ve zkouškách látek, které neobsahují dusík, není vzata v úvahu nitrifikace, nejsou významné (nejsou větší než 5 %), i když je oxidace amoniakálního dusíku ve zkušebních nádobách a ve slepém pokusu nepravidelná. U zkoušených látek obsahujících dusík může dojít ke značným chybám.

Docházíli k nitrifikaci, avšak nikoli úplné, musí být spotřeba kyslíku reakční směsí korigována na množství kyslíku spotřebovaného na oxidaci amoniaku a amonných iontů na dusitany a dusičnany, jsouli změny koncentrace dusitanů a dusičnanů během kultivace stanoveny pomocí těchto rovnic:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Celkově:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Podle rovnice 1 je spotřeba kyslíku při oxidaci 28 g dusíku obsaženého v NH_4Cl na dusitan 96 g, tzn., že přepočítávací faktor je 3,43 (96/28). Stejně tak je podle rovnice 3 spotřeba kyslíku při oxidaci na dusičnan 128 g, tzn. přepočítávací faktor je 4,57 (128/28).

Protože popsané reakce *následují po sobě*, přičemž jsou realizovány odlišnými druhy bakterií, může koncentrace dusitanů stoupat i klesat; při poklesu roste odpovídajícím způsobem koncentrace dusičnanů. Spotřeba kyslíku při tvorbě dusičnanů se tedy vypočte vynásobením přírůstku koncentrace dusičnanů faktorem 4,57, zatímco spotřeba kyslíku při tvorbě dusitanů se vypočte vynásobením přírůstku koncentrace dusitanů faktorem 3,43, nebo při poklesu obsahu dusitanů se ztráty kyslíku vypočtou vynásobením poklesu koncentrace faktorem −3,43.

To znamená:

O_2 spotřebovaný při tvorbě dusičnanů = 4,57 × přírůstek koncentrace dusičnanů (4)

a

O_2 spotřebovaný při tvorbě dusitanů = 3,43 × přírůstek koncentrace dusitanů (5)

a

ztráta O_2 při úbytku dusitanů: = −3,43 × pokles koncentrace dusitanů (6)

Tedy

spotřeba O_2 při nitrifikaci = ±3,43 × změna koncentrace dusitanů + 4,57 × změna koncentrace dusičnanů (7)

a tedy

spotřeba O_2 při oxidaci uhlíku = celková zjištěná spotřeba − spotřeba při nitrifikaci (8)

Jestliže se stanoví pouze celkový oxidovaný dusík, bude se v prvním přiblížení rovnat spotřeba kyslíku při nitrifikaci hodnotě 4,57 × přírůstek koncentrace oxidovaného dusíku.

Korigovaná hodnota spotřeby kyslíku při oxidaci uhlíku se poté porovná s TSK_{NH3} vypočtenou podle přílohy II.

C.5 ROZKLAD – BIOCHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU

1. METODA

1.1 ÚVOD

Metoda je určena pro měření biochemické spotřeby kyslíku (BSK) pevných nebo kapalných organických látek.

Data získaná při této zkoušce platí pro látky rozpustné ve vodě; těkavé látky a látky s nízkou rozpustností ve vodě lze touto metodou alespoň v zásadě rovněž zkoušet.

Metodu lze použít pouze pro organické látky, které nemají v koncentracích používaných při zkoušce inhibiční účinek na bakterie. Není-li daná látka při koncentracích používaných ve zkoušce rozpustná, může být nezbytné použít pro dosažení dobré dispergace zkoušeného materiálu zvláštní postupy, např. dispergaci ultrazvukem.

Informace o toxicitě chemické látky mohou být užitečné při interpretaci nízkých hodnot výsledku zkoušky a při volbě vhodných zkoušených koncentrací.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Biochemická spotřeba kyslíku (BSK) je definována jako množství rozpuštěného kyslíku, které je nutné k biochemické oxidaci určitého objemu roztoku látky za předepsaných podmínek.

Výsledky se vyjadřují v gramech spotřeby kyslíku (BSK) na 1 g zkoušené látky.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Je žádoucí použít vhodnou referenční látku pro kontrolu aktivity inokula.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Předem stanovené množství látky rozpuštěné nebo dispergované ve vhodném, dobře provzdušněném médiu se inokuluje mikroorganismy a kultivuje se v temnu za stálé, definované teploty.

BSK se stanoví z rozdílu mezi obsahem rozpuštěného kyslíku na začátku a na konci zkoušky. Zkouška musí trvat nejméně pět dní a nejdéle 28 dní.

Souběžně musí být provedena slepá zkouška bez obsahu zkoušené látky.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Stanovení BSK nelze považovat za ověřené stanovení biologické rozložitelnosti látky. Tuto zkoušku lze považovat pouze za screenigovou zkoušku.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Připraví se předběžný roztok nebo disperse zkoušené látky o koncentraci vhodné pro použitou metodu. Poté se stanoví BSK některou vhodnou národní nebo mezinárodní standardizovanou metodou.

2. **DATA A HODNOCENÍ**

BSK předběžného roztoku se vypočte vybranou normalizovanou metodou a přepočte se na BSK vyjádřenou v gramech na 1 g zkoušené látky.

3. **ZPRÁVY**

Uvede se použitá metoda.

Biochemická spotřeba kyslíku se vypočte jako průměr výsledků alespoň tří platných měření.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků a které by mohly ovlivnit výsledek, zejména pokud jde o nečistoty, fyzikální stav, toxické účinky a vlastní složení zkoušené látky.

Použití přísad pro inhibici biologické nitrifikace musí být uvedeno.

4. **LITERATURA**

Seznam příkladů standardizovaných metod:

NF T 90103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6 ROZKLAD - CHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Metoda je určena pro měření chemické spotřeby kyslíku (CHSK) pevných nebo kapalných organických látek prováděné standardním dohodnutým způsobem za pevně stanovených laboratorních podmínek.

Pro provedení této zkoušky a pro interpretaci výsledků jsou užitečné informace o chemickém vzorci látky (např. zda jde o soli halogenů, železnaté soli organických sloučenin, organické sloučeniny chloru).

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) je mírou oxidovatelnosti látky, která se vyjadřuje jako ekvivalentní množství kyslíku oxidačního činidla spotřebovaného látkou za pevně stanovených laboratorních podmínek.

Výsledek se vyjadřuje jako množství spotřebovaného kyslíku (COD) v gramech na 1 g zkoušené látky.

1. 3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Předem stanovené množství látky rozpuštěné nebo dispergované ve vodě se za přítomnosti síranu stříbrného jako katalyzátoru oxiduje dichromanem draselným v prostředí koncentrované kyseliny sírové pod zpětným chladičem. Přebytečný dichroman se stanoví titrací odměrným roztokem síranu amonno-železnatého.

U látek obsahujících chlór se pro omezení rušení chloridy přidává síran rtuťnatý (*).

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Vzhledem k dohodnutým podmínkám stanovení je CHSK „ukazatelem oxidovatelnosti“ a jako takový se používá pro hodnocení organických látek.

Ve zkoušce mohou rušit chloridy; na stanovení CHSK mohou mít rovněž vliv anorganické redukční a oxidační látky.

U některých cyklických sloučenin a u řady těkavých sloučenin (např. u nižších mastných kyselin) nedochází v této zkoušce k úplné oxidaci.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Připraví se počáteční roztok nebo disperse látky tak, aby bylo dosaženo CHSK od 250 do 600 $mg \cdot l^{-1}$.

Poznámky:

U špatně rozpustných nebo nedispergovatelných látek lze jemně rozmělněnou látku nebo kapalinu v množství odpovídajícím 5 mg CHSK odvážit a vpravit přímo do experimentální aparatury s vodou.

Často je výhodné, zejména v případě špatně rozpustných látek, stanovit CHSK upravenou metodou, tj. v uzavřeném systému s vyrovnávačem tlaku (H. Kelkenberg, 1975). Touto upravenou metodou lze často úspěšně kvantifikovat i látky, u nichž je stanovení konvenční metodou obtížné – např. kyselinu octovou. Metoda však také selhává v případě pyridinu. Zvýšíli se koncentrace dichromanu draselného předepsaná v (1), na 0,25 N (0,0416 M), usnadní se přímé navažování 5–10 mg látky, což je důležité pro stanovení CHSK látek obtížně rozpustných ve vodě (2).

Jinak se CHSK stanoví vhodnou národní nebo mezinárodní metodou.

2. **DATA A HODNOCENÍ**

CHSK obsahu experimentální baňky se vypočte vybranou normalizovanou metodou a přepočte se na CHSK vyjádřenou v gramech na 1 g zkoušené látky.

(*) S roztoky obsahujícími rtuť se po použití nakládá tak, aby nedošlo k průniku rtuti do životního prostředí.

3. **ZPRÁVY**

Uvede se odkaz na použitou metodu.

Chemická spotřeba kyslíku se vypočte jako průměr výsledků alespoň tří měření. Jsouli známy, musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků a které by mohly ovlivnit výsledek, zejména pokud jde o nečistoty, fyzikální stav a základní vlastnosti zkoušené látky.

Uvede se použití síranu rtuťnatého za účelem omezení rušení chloridy.

4. **LITERATURA**

(1) Kelkenberg, H. Z. *von Wasser und Abwasserforschung*, 1975, 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere*, 1984, 13, 169.

Seznam příkladů normovaných metod:

NBN T 91201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromat value) of polluted and waste waters.

NF T 90101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 – Water analysis –Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409H41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van bet chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water Quality: Chemical oxygen demand dichromate methods.

C.7 ABIOTICKÝ ROZKLAD – HYDROLÝZA JAKO FUNKCE pH

1. **METODA**

Metoda je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1).

1.1 ÚVOD

Hydrolýza je důležitá reakce ovlivňující abiotický rozklad. Tato reakce má zvláštní význam u látek, které jsou málo biologicky rozložitelné; může ovlivnit stálost látky v životním prostředí.

Většina reakcí hydrolýzy probíhá jako reakce pseudoprvního řádu, a poločasy jsou tedy nezávislé na koncentraci. To zpravidla dovoluje extrapolaci výsledků získaných s laboratorními koncentracemi na podmínky v životním prostředí.

Mimoto byly u několika typů chemických sloučenin publikovány příklady uspokojivé shody výsledků naměřených v čisté vodě a v přírodních vodách (2).

Při provádění této zkoušky je užitečné znát hodnotu tlaku par dané látky.

Metoda je použitelná pouze pro látky rozpustné ve vodě. Nečistoty mohou ovlivnit výsledky.

Chování látek při hydrolýze by mělo být zkoumáno při hodnotách pH, které se obvykle vyskytují v životním prostředí (pH 4 – 9).

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Hydrolýzou se rozumí reakce látky RX s vodou. Tuto reakci lze znázornit prostou výměnou skupiny X za skupinu OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \quad (1)$$

Rychlost, kterou klesá koncentrace látky RX, je dána vztahem:

$$\text{rychlost} = k\,[H_2O]\cdot[RX] \quad (2)$$

Protože je voda přítomna vůči zkoušené látce ve velkém přebytku, označuje se obvykle tento typ reakce jako reakce pseudoprvního řádu, ve které je pozorovaná rychlostní konstanta dána vztahem:

$$k_{obs} = k \times [H_2O] \quad (3)$$

Tuto konstantu lze určit pro danou hodnotu pH a teplotu *T* z výrazu:

$$k_{obs}\ \frac{2{,}303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad (4)$$

kde

t = čas,

C_0 = koncentrace látky v čase 0,

C_t = koncentrace látky v čase t,

2,303 = přepočítací faktor mezi přirozeným logaritmem a dekadickým logaritmem.

Koncentrace se vyjádří v $g\cdot l^{-1}$ nebo v $mol\cdot l^{-1}$.

Konstanta $k_{pozorov.}$ má rozměr $[čas]^{-1}$.

„Poločas“ $t_{½}$ je definován jako doba potřebná pro snížení koncentrace látky o 50 %,

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad (5)$$

Z rovnic (4) a (5) plyne, že

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{obs} \quad (6)$$

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Jako referenční látky byly použity tyto látky (1):

Kyselina acetylsalicylová (aspirin),

O,*O*-diethyl-*O*-(2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl)fosforothioát (dimpylát, diazinon).

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Látka se rozpustí ve vodě v nízké koncentraci; pH a teplota se regulují.

Vhodnou analytickou metodou se sleduje pokles koncentrace látky v závislosti na čase.

Sestrojí se graf závislosti logaritmů koncentrací na čase, a je-li závislost lineární, lze zjistit rychlostní konstantu reakce prvního řádu ze směrnice přímky (viz bod 2).

Není-li možné stanovit rychlostní konstantu pro danou teplotu přímo, je obvykle možné odhadnout ji pomocí Arrheniovy rovnice, která udává teplotní závislost rychlostních konstant. Z průběhu lineární závislosti logaritmů rychlostních konstant, získaných při vhodných teplotách, na převrácené hodnotě absolutní teploty (K) lze extrapolací získat hodnotu rychlostní konstanty, kterou nebylo možné stanovit přímo.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

V odkazu (2) se uvádí, že měření rychlostních konstant hydrolýzy lze u 13 tříd organických sloučenin provádět s vysokou přesností.

Reprodukovatelnost závisí zejména na regulaci pH a teploty a může být ovlivněna přítomností mikroorganismů a ve speciálních případech koncentrací rozpuštěného kyslíku.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Reakční činidla**

1.6.1.1 *Pufrační roztoky*

Zkouška se provádí při třech hodnotách pH: 4,0, 7,0 a 9,0.

K tomuto účelu se za použití chemikálií čistoty p.a. a destilované nebo deionizované vody připraví pufrační roztoky. Některé příklady pufračních roztoků jsou uvedeny v doplňku.

Použitý pufrační roztok může mít vliv na rychlost hydrolýzy; je-li tomu tak, je třeba zvolit jiný pufrační roztok. V odkazu (2) se doporučuje použít namísto fosforečnanových pufračních roztoků boritanové a acetátové pufrační roztoky.

Není-li známa hodnota pH pufračních roztoků při zkušební teplotě, lze ji stanovit s přesností na ±0,1 pH-metrem kalibrovaným při zvolené teplotě.

1.6.1.2 *Zkušební roztoky*

Zkoušená látka se rozpustí ve zvoleném pufračním roztoku a koncentrace by neměla překročit 0,01 $mol \cdot l^{-1}$ nebo polovinu koncentrace nasyceného roztoku, podle toho, která z těchto hodnot je nižší.

Použití organických rozpouštědel mísitelných s vodou se doporučuje jen u látek s nízkou rozpustností ve vodě.

Množství tohoto rozpouštědla by mělo být menší než 1 % a nemělo by mít vliv na proces hydrolýzy.

1.6.2 **Aparatura**

Použijí se skleněné baňky se zabroušenými zátkami, pro něž není vhodné používat mazací tuk.

Pokud jsou chemická látka nebo pufrační roztok těkavé, nebo prováděli se zkouška při zvýšené teplotě, upřednostňují se baňky zatavené nebo jinak uzavřené a s omezeným prostorem nad roztokem.

1.6.3 **Analytická metoda**

Použitá metoda musí být specifická pro stanovení zkoušené látky při zkušebních koncentracích a může být i kombinací vhodných analytických technik.

Použitá analytická metoda bude záviset na povaze látky a musí být dostatečně přesná a citlivá pro zjištění úbytku počáteční koncentrace o 10 %.

1.6.4 **Zkušební podmínky**

Zkoušky se provádí v termostatovaném prostoru nebo za použití termostatované lázně nastavené na zvolenou teplotu s tolerancí ±0,5 °C. Teplota se udržuje a měří s přesností na ±0,1 °C. Vhodnými opatřeními je třeba zabránit fotolýze.

U snadno oxidovatelných látek je nezbytné odstranit rozpuštěný kyslík (např. 5minutovým probubláváním roztoku dusíkem nebo argonem před přípravou roztoku).

1.6.5 **Zkušební postup**

1.6.5.1 *Předběžná zkouška*

U všech látek se provede předběžná zkouška při teplotě 50 ±0,5 °C pro tři hodnoty pH: 4,0, 7,0 a 9,0. Provede se dostatečný počet měření, aby bylo možné pro každé pH odhadnout, zda je při 50 °C poločas ($t_{½}$) menší než 2,4 hodiny nebo zda po 5 dnech dojde k hydrolýze méně než 10 %. (Lze odvodit, že tyto hodnoty odpovídají za podmínek, které se nejčastěji vyskytují v životním prostředí (25 °C), poločasu kratšímu než jeden den, resp. delšímu než 1 rok).

Jestliže se v předběžném experimentu ukáže, že při 50 °C dojde při všech třech hodnotách pH (4, 7, 9) za 2,4 hodiny k hydrolýze 50 nebo více procent zkoušené látky, nebo že po 5 dnech dojde k hydrolýze méně než 10 % zkoušené látky, nejsou další experimenty nezbytné.

V ostatních případech a pro hodnoty pH, u nichž výše uvedené podmínky nenastanou, se provede zkouška 1.

1.6.5.2 *Zkouška 1*

Zkouška 1 se provede při jedné teplotě, nejlépe při 50 ±0,5 °C, a pokud možno za sterilních podmínek při pH, pro něž se v předběžné zkoušce ukázala nutnost dalších zkoušek.

Zvolí se dostatečný počet vzorků, aby byl pokryt stupeň hydrolýzy 20 až 70 % a bylo tak možné ověřit, že jde při specifikovaném pH o reakci pseudoprvního řádu.

Pro každé pH, při němž se zkouška 1 provede, se stanoví řád reakce.

Odhad rychlostní konstanty při 25 °C:

Rozhodnutí o dalším experimentálním postupu závisí na tom, zda lze ze zkoušky 1 usuzovat na reakci pseudoprvního řádu, či nikoliv.

Pokud nelze ze zkoušky 1 s jistotou usuzovat na reakci pseudoprvního řádu, je třeba provést další experimenty podle zkoušky 2.

Vyplývá-li s jistotou ze zkoušky 1, že jde o reakci pseudoprvního řádu, provedou se další experimenty podle zkoušky 3. (Za speciálních okolností lze vypočítat rychlostní konstanty při 25 °C z konstant při 50 °C vypočtených s použitím výsledků zkoušky 1, viz bod 3.2).

1.6.5.3 *Zkouška 2*

Tato zkouška se provede při každém pH, pro něž se její provedení ukázalo na základě výsledků zkoušky 1 nezbytným, a to:

— buď při teplotě nižší než 40 °C,

— nebo při dvou teplotách nad 50 °C, které se od sebe liší nejméně o 10 °C.

Při každém pH a při každé teplotě, při nichž se má provést zkouška 2, se v přiměřených intervalech zvolí nejméně 6 bodů tak, že stupeň hydrolýzy je v oblasti 20 až 70 %.

Pro jedno pH a pro jednu teplotu se provede měření dvakrát. Pokud se zkouška 2 provádí při dvou teplotách nad 50 °C, provede se měření dvakrát nejlépe při nižší z těchto dvou teplot.

Při každém pH a při každé teplotě, při nichž se provede zkouška 2, se podle možnosti uvede grafický odhad poločasu ($t_{½}$).

1.6.5.4 *Zkouška 3*

Tato zkouška se provede při každém pH, pro něž se její provedení ukázalo na základě výsledků zkoušky 1 nezbytným, a to:

— buď při teplotě nižší než 40 °C,

— nebo při dvou teplotách nad 50 °C, které se od sebe liší nejméně o 10 °C.

Při každém pH a při každé teplotě, při nichž se má provést zkouška 3, se zvolí tři body, první v čase 0, druhý a třetí při stupni hydrolýzy vyšším než 30 %; vypočte se konstanta $k_{pozorov.}$ a poločas $t_{½}$.

2. **DATA**

Jdeli o reakci pseudoprvního řádu, lze vypočítat hodnoty konstanty $k_{pozorov.}$ pro každé pH a každou zkušební teplotu z grafu závislosti hodnot logaritmů koncentrací na čase pomocí rovnice:

$$k_{obs} = - \text{směrnice} \times 2{,}303 \quad (7)$$

Dále je možné z rovnice (6) vypočítat $t_{½}$.

Podle potřeby se s použitím Arrheniovy rovnice stanoví $k_{25\ °C}$.

Pokud chování neodpovídá reakci pseudoprvního řádu, viz bod 3.1.

3. **ZPRÁVA**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— specifikaci látky,

— všechny výsledky získané s referenčními látkami,

— podstatu a podrobnosti použité analytické metody,

— pro každou zkoušku: teplotu, pH, složení pufračního roztoku, tabulku se všemi daty o koncentraci a čase,

— u reakcí pseudoprvního řádu hodnoty $k_{pozorov}$ a $t_{½}$, včetně metody jejich výpočtu,

— u reakce, která neodpovídá pseudoprvnímu řádu, graf průběhu závislosti logaritmu koncentrace na čase,

— všechny informace a pozorování nezbytné pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Může existovat možnost vypočítat přijatelné hodnoty rychlostních konstant (při 25 °C) zkoušených látek za předpokladu, že pro homology chemické látky již existují experimentální údaje pro aktivační energii a za předpokladu, že lze rozumně očekávat, že aktivační energie zkoušené látky je stejného řádu.

4. **LITERATURA**

(1) OECD, Paris 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) W. Mabey, T. Mill.: Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions. *J. Phys, Chem. Ref. Data*, 1978, 7 (2), 383–415.

Doplněk

PUFRAČNÍ ROZTOKY

A. **CLARK A LUBS**

Hodnoty pH uvedené v následujících tabulkách byly vypočteny na základě měření potenciálu za použití Sörensenových standardních rovnic. Skutečné hodnoty pH jsou o 0,04 vyšší než hodnoty v tabulce.

Složení	pH
kaliumhydrogenftalát (0,1 mol·l^{-1}) a HCl (0,1 mol·l^{-1}) při 20 °C	
2,63 ml HCl + 50 ml ftalátu doplnit do 100 ml	3,8
kaliumhydrogenftalát (0,1 mol·l^{-1}) a NaOH (0,1 mol·l^{-1}) při 20 °C	
0,40 ml NaOH + 50 ml ftalátu doplnit do 100 ml	4,0
3,70 ml NaOH + 50 ml ftalátu doplnit do 100 ml	4,2
dihydrogenfosforečnan draselný (0,1 mol·l^{-1}) a NaOH (0,1 mol·l^{-1}) při 20 °C	
23,45 ml NaOH + 50 ml fosforečnanu doplnit do 100 ml	6,8
29,63 ml NaOH + 50 ml fosforečnanu doplnit do 100 ml	7,0
35,00 ml NaOH + 50 ml fosforečnanu doplnit do 100 ml	7,2

H_3BO_3 (0,1 mol·l^{-1}) v KCl (0,1 mol·l^{-1}) a NaOH (0,1 mol·l^{-1}) při 20 °C

16,30 ml NaOH + 50 ml kyseliny borité doplnit do 100 ml	8,8
21,30 ml NaOH + 50 ml kyseliny borité doplnit do 100 ml	9,0
26,70 ml NaOH + 50 ml kyseliny borité doplnit do 100 ml	9,2

B. **KOLTHOFF A VLEESHOUWER**

Složení	pH
Monokaliumcitrát (0,1 mol·l^{-1}) a NaOH (0,1 mol·l^{-1}) při 18 °C (je třeba přidat malý krystalek thymolu, aby nevznikaly plísně)	
2,0 ml NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,8
9,0 ml NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,0
16,3 ml NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,2

C. **SÖRENSEN**

Borax (0,05 mol·l^{-1}) a HCl (0,1 mol·l^{-1})

Složení		pH			
ml boraxu	ml HCl	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

Borax (0,05 mol·l^{-1}) a NaOH (0,1 mol·l^{-1})

Složení		pH			
ml boraxu	ml HCl	Sörensen18 °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