31992L0069

1992.12.29. *AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA* L 383/113

A BIZOTTSÁG 92/69/EGK IRÁNYELVE

(1992. július 31.)

a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő tizenhetedik hozzáigazításáról

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉG BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Gazdasági Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a legutóbb a 92/32/EGK irányelvvel [1] módosított, a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló, 1967. június 27-i 67/548/EGK tanácsi irányelvre [2] és különösen annak 28. és 29. cikkére,

mivel a 67/548/EGK irányelv 3. cikkének (1) bekezdése és legutóbb a 90/492/EGK bizottsági irányelvvel [3] módosított, a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló, 1988. június 7-i 88/379/EGK tanácsi irányelv [4] 3. cikke arról rendelkezik, hogy az anyagok és készítmények fizikai-kémiai tulajdonságait, toxicitását és ökotoxicitását a 67/548/EGK irányelv V. mellékletében leírt módszereknek megfelelően határozzák meg;

mivel a 67/548/EGK irányelv V. mellékletét két részletben hozzák nyilvánosságra, minthogy ezek külön-külön a 84/449/EGK bizottsági irányelvnek [5] és a 88/302/EGK bizottsági irányelvnek [6] a mellékletei;

mivel a műszaki fejlődés figyelembevétele érdekében szükségképpen felül kell vizsgálni a 84/449/EGK bizottsági irányelv mellékletében szereplő vizsgálati módszereket;

mivel a műszaki fejlődés figyelembevétele érdekében szükségképpen felül kell vizsgálni a 88/302/EGK bizottsági irányelv mellékletében jelenleg található, a növekedés gátlását algákon vizsgáló módszereket, és ezt a módszert a 84/449/EGK irányelv mellékletében is nyilvánosságra kell hozni;

mivel helyénvaló minimumra csökkenteni a kísérleti célokra használt állatok számát, összhangban a kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 86/609/EGK tanácsi irányelvvel [7];

mivel ezen irányelv rendelkezései összhangban vannak a veszélyes anyagok és készítmények kereskedelme technikai akadályainak eltörléséről szóló irányelveknek a műszaki fejlődéshez történő hozzáigazításával foglalkozó bizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

A 84/449/EGK irányelv melléklete helyébe ezen irányelv melléklete lép.

(1) HL L 154., 1992.6.5., 1. o.
(2) HL 196., 1967.8.16., 1. o.
(3) HL L 275., 1990.10.5., 35. o.
(4) HL L 187., 1988.7.16., 14. o.
(5) HL L 251., 1984. 9.19., 1. o.
(6) HL L 133., 1988.5.30., 1. o., és HL L 136., 1988.6.2., 20. o.
(7) HL L 358., 1986.12.18., 1. o.

2. cikk

A 88/302/EGK irányelv mellékletében leírt, a növekedés gátlását algákon vizsgáló módszert el kell hagyni.

3. cikk

A tagállamok hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek legkésőbb 1993. október 30-ig megfeleljenek. Erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

Amikor a tagállamok elfogadják ezeket az intézkedéseket, azokban hivatkozni kell erre az irányelvre vagy azokhoz hivatalos kihirdetésük alkalmával ilyen hivatkozást kell fűzni.

A hivatkozás módját a tagállamok határozzák meg.

4. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 1992. július 31-én.

a Bizottság részéről

Karel VAN MIERT

a Bizottság tagja

MELLÉKLET

A veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló, 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő tizenhetedik hozzáigazításáról szóló, 1992. július 31-i 92/69/EGK bizottsági irányelv melléklete [1]

TARTALOMJEGYZÉK

[1] HL L 383., 1992.12.29., 113. o.

BEVEZETÉS

A. RÉSZ: FIZIKAI–KÉMIAI TULAJDONSÁGOK MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI..... 262

A.1. Olvadáspont/fagyáspont..... 262
A.2. Forráspont..... 272
A.3. Relatív sűrűség..... 278
A.4. Gőznyomás..... 283
A.5. Felületi feszültség..... 304
A.6. Oldhatóság vízben..... 311
A.8. Megoszlási hányados..... 320
A.9. Lobbanáspont..... 331
A.10. Tűzveszélyesség (szilárd anyagok)..... 333
A.11. Tűzveszélyesség (gázok)..... 336
A.12. Tűzveszélyesség (érintkezés vízzel)..... 338
A.13. Szilárd anyagok és folyadékok öngyulladási képessége..... 342
A.14. Robbanási tulajdonságok..... 344
A.15. Öngyulladási hőmérséklet (folyadékok és gázok)..... 355
A.16. Szilárd anyagok relatív öngyulladási hőmérséklete..... 356
A.17. Oxidáló tulajdonságok (szilárd anyagok)..... 359

B. RÉSZ: A TOXICITÁS MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI..... 364

Általános bevezetés..... 364
B.1. Akut toxicitás (orális)..... 367
B.1b. Akut toxicitás (orális) – rögzített dózisú módszer..... 370
B.2. Akut toxicitás (inhaláció)..... 374
B.3. Akut toxicitás (dermális)..... 378
B.4. Akut toxicitás (bőrirritáció)..... 381
B.5. Akut toxicitás (szemirritáció)..... 384
B.6. Bőrszenzibilizáció..... 388
B.7. Ismételt adagolású (28 napos) toxicitás (orális)..... 393
B.8. Ismételt adagolású (28 napos) toxicitás (inhaláció)..... 397
B.9. Ismételt adagolású (28 napos) toxicitás (dermális)..... 401
B.10. Mutagenitás (emlősök *in vitro* citogenetikai vizsgálata)..... 405
B.11. Mutagenitás (emlősök *in vivo* csontvelő-sejtképződés vizsgálata, kromoszóma elemzés)..... 408
B.12. Mutagenitás (mikronukleusz vizsgálat)..... 411
B.13. Mutagenitás (*Escherichia coli* – reverz mutáció vizsgálat)..... 414
B.14. Mutagenitás (*Salmonella typhimurium* – reverz mutáció vizsgálat)..... 417

C. RÉSZ: AZ ÖKOTOXICITÁS MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI..... 420

C.1. Akut toxicitás hal esetében..... 420
C.2. Akut toxicitás *Daphnia* esetében..... 429
C.3. Algaszanövekedés-gátlási vizsgálat..... 436
C.4. Biológiai lebonthatóság – A „gyors" biológiai lebonthatóság meghatározása..... 444
C.4-A: DOC (oldott szerves szén) csökkenésének vizsgálata..... 451
C.4-B: Módosított OECD vizsgálat (DOC csökkenés)..... 454
C.4-C: CO_2-fejlődésvizsgálat..... 459
C.4-D: Manometrikus respirometriás mérés..... 464
C.4-E: Zártpalack-módszer..... 468
C.4-F: MITI-vizsgálat..... 473
Mellékletek..... 478
C.5. Lebomlás – biokémiai oxigénigény..... 483
C.6. Lebomlás – kémiai oxigénigény..... 484
C.7. Lebomlás – abiotikus lebomlás, hidrolízis a pH függvényében..... 486

BEVEZETÉS

A melléklet a 79/831/EGK irányelv VII. és VIII. mellékletében felsorolt fizikai-kémiai, toxikológiai és ökotoxikológiai tulajdonságok meghatározásához szükséges vizsgálati módszereket tartalmazza. A módszerek az illetékes nemzetközi szervezetek (különösen az OECD – Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet) által elismert és ajánlott módszereken alapulnak.

Amennyiben ilyen módszerek nem álltak rendelkezésre, nemzeti szabványokat vagy tudományos megállapodáson alapuló módszereket alkalmaztak. Általában az irányelv által meghatározott anyaggal kell a vizsgálatokat végrehajtani. Figyelni kell a szennyező anyagoknak a vizsgálati eredményekre gyakorolt esetleges hatására is.

Amennyiben e melléklet módszerei nem alkalmasak bizonyos tulajdonság vizsgálatához, a bejelentőnek indokolnia kell az alkalmazott alternatív módszert.

Az állatkísérleteket és vizsgálatokat a nemzeti szabályoknak megfelelően kell elvégezni, és figyelembe kell venni a humánum elveit és az állatjólét területén elért nemzetközi fejlődést.

Az egyenértékű vizsgálati módszerek közül a legkevesebb állatot használó módszert kell kiválasztani.

A. RÉSZ: A FIZIKAI–KÉMIAI TULAJDONSÁGOK MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI

A.1. OLVADÁSPONT/FAGYÁSPONT

1. MÓDSZER

A leírt módszerek többsége az 1. OECD-vizsgálati irányelven. Az alapelveket a (2) és (3) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

Az anyagok olvadáspontjának meghatározásához a leírt módszereket és eszközöket kell alkalmazni az anyagok tisztasági fokára vonatkozó mindenfajta korlátozás nélkül.

A módszer kiválasztása a vizsgálni kívánt anyag természetétől függ. Ennek következtében a korlátozó tényező attól függ, hogy könnyen, nehezen vagy egyáltalán nem porítható az anyag.

Néhány anyag esetében a fagyáspont vagy dermedési pont meghatározása a megfelelőbb, és az ezek meghatározására vonatkozó szabványok is szerepelnek ebben a módszerben.

Ahol az anyag különleges tulajdonságai miatt a fenti paraméterek közül egyik sem mérhető nehézség nélkül, a dermedéspont lehet megfelelő.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az olvadáspont az a hőmérséklet, amelynél légköri nyomáson létrejön a fázisátmenet a szilárd halmazállapotból folyékony halmazállapotba, és ez a hőmérséklet ideális esetben megegyezik a fagyásponttal.

Mivel sok anyag fázisátmenete bizonyos hőmérséklet-tartományban jön létre, ezért ezt gyakran olvadási tartományként írják le.

Mértékegységek átszámítása (K-ről °C-ra)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius-skála szerinti hőmérséklet, Celsius-fok (°C)

T: termodinamikai hőmérséklet,Kelvin (K)

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

Néhány kalibrációs anyagot a 4) szakirodalom sorol fel.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Meghatározza a szilárd halmazállapotból folyékony halmazállapotba vagy folyékony halmazállapotból szilárd halmazállapotba történő fázisátmenet hőmérsékletét (hőmérséklet-tartományát). A gyakorlatban a vizsgált anyag mintájának légköri nyomáson végrehajtott melegítése/hűtése során az olvadás/fagyás kezdetének és az olvadás/fagyás befejezésének hőmérsékletét határozzák meg. A leírás öt módszert ismertet, nevezetesen a kapilláris módszert, a fűtőasztalos módszereket, a fagyáspont-meghatározásokat, a termikus analízis módszerét és a dermedéspont meghatározását (ahogyan ezt az ásványolajokhoz kifejlesztették).

Bizonyos esetekben megfelelő lehet a fagyáspont mérése az olvadáspont mérése helyett.

1.4.1. **Kapilláris módszer**

1.4.1.1. *Olvadáspontmérő készülékek folyadékfürdővel*

Kis mennyiségű, finomra őrölt anyagot helyeznek el egy kapilláris csőben, és szorosan tömörítik. Ezután felmelegítik a csövet egy hőmérővel együtt, és a hőmérséklet-emelkedést 1 K/perc körüli értéknél kisebbre állítják be a tényleges olvasztás során. Meghatározzák az olvadás kezdő és végső hőmérsékletét.

1.4.1.2. *Olvadáspontmérő készülékek fémblokkos eszközzel*

Megegyezik az 1.4.1.1. pontban ismertetett eljárással, azzal a kivétellel, hogy melegített fémblokkban helyezik el a kapilláris csövet és a hőmérőt, és ezek a blokkban kialakított nyílásokon keresztül figyelhetők.

1.4.1.3. *Fotocellás meghatározás*

A kapilláris csőben elhelyezett mintát automatikusan melegítik egy fémhengerben. Fénysugarat irányítanak az anyagon keresztül a hengerben kialakított nyílás segítségével egy pontosan kalibrált fotocellához. A legtöbb anyag optikai tulajdonságai opálosról átlátszóra változnak a hevítés során. A fotocellát elérő fény intenzitása megnövekszik, és stop jelet küld a digitális jelzőkészüléknek, amely a fűtőkamrában elhelyezett platina ellenállás-hőmérő hőmérsékletét jelzi. Ez a módszer nem alkalmas néhány, erősen színezett anyaghoz.

1.4.2. **Fűtőasztalok**

1.4.2.1. *Kofler-féle fűtőasztal*

A Kofler-féle fűtőasztal két, különböző hővezető képességű, elektromosan melegített fémből áll, ahol a fűtőasztalt úgy tervezték, hogy a hosszúsága mentén a hőmérséklet-gradiens majdnem lineáris legyen. A fűtőasztal hőmérséklete 283-tól 573 K-ig változhat. A fűtőasztalt egy, a fűtőasztalhoz tervezett skálával és mutatót tartalmazó különleges hőmérsékletjelző-készülékkel látták el. Az olvadáspont meghatározására az anyagot vékony rétegben közvetlenül a fűtőasztal felületére helyezik. Néhány másodpercen belül éles elválasztó vonal alakul ki a folyékony és szilárd fázis között. Ekkor a mutatót a vonal hátralévő részéhez állítva leolvassák az elválasztó vonalnál kapott hőmérsékletet.

1.4.2.2. *Olvadásvizsgáló mikroszkóp*

Többféle, mikroszkóppal végrehajtott fűtőasztal-vizsgálat alkalmas a kis mennyiségű anyag olvadáspontjának meghatározására. A fűtőasztalok többségében a hőmérsékletet érzékeny termoelemmel mérik, de esetenként higanyhőmérőt használnak. Egy jellegzetes mikroszkópos, fűtőasztalos olvadáspontvizsgáló-készülék olyan, fémlemezt tartalmazó hevítőkamrával rendelkezik, amelyre a mintát egy tárgylemezen helyezik el. A fémlemez közepén lévő nyílás lehetővé teszi, hogy bejusson a fény a mikroszkóp megvilágító tükréről. Használat közben üveglappal fedik le a kamrát annak érdekében, hogy a vizsgált területről kizárják a levegőt.

A minta hevítését reosztát szabályozza. Optikailag anizotrop anyagokon történő nagyon pontos mérések végrehajtásához polarizált fény használható.

1.4.2.3. *Meniszkusz-módszer*

Ezt a módszert kifejezetten poliamidokhoz használják.

Vizuálisan meghatározzák azt a hőmérsékletet, amelynél egy fűtőasztal és egy, a poliamid próbadarab által tartott üvegfedél közé zárt szilikonolaj meniszkusza elmozdul.

1.4.3. **Fagyáspont meghatározásának módszere**

A mintát speciális kémcsőbe helyezik a fagyáspont meghatározására szolgáló készülékbe. A mintát óvatosan és folyamatosan keverik a hűtés során, és megfelelő időközönként megmérik a hőmérsékletét. Amikor a hőmérséklet néhány leolvasás során állandó marad, ezt a hőmérsékletet jegyzik fel (a hőmérő hibájának figyelembevételével) fagyáspontként.

A túlhűtést a szilárd és a folyékony fázisok közötti egyensúly fenntartásával kell elkerülni.

1.4.4. **Termikus analízis**

1.4.4.1. *Differenciál-termoanalízis (DTA)*

Ez a módszer az anyag és egy referenciaanyag közötti hőmérséklet-különbséget a hőmérséklet függvényében regisztrálja, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanazzal az irányított hőmérsékletprogrammal vizsgálják. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy keresztül, ezt a változást a hőáramlási görbe alapvonalától való endoterm (olvadás) vagy exoterm (fagyás) eltérés jelzi.

1.4.4.2. *Differenciál scanning kalorimetria (DSC)*

Ez a módszer egy anyagba és a referenciaanyagba történő energiabevitelek közötti különbséget a hőmérséklet függvényében regisztrálja, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanolyan irányított hőmérsékletprogrammal vizsgálják. Ez az energia az anyag és a referenciaanyag közötti nulla hőmérséklet-különbség létrehozásához szükséges energia. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy keresztül, ezt a változást a hőáramlási görbe alapvonalától való endoterm (olvadás) vagy exoterm (fagyás) eltérés jelzi.

1.4.5. **Dermedéspont**

Ezt a módszert ásványolajoknál történő használatra fejlesztették ki, és minden alacsony olvadáspontú, olajtartalmú anyaghoz használható.

Előzetes melegítés után a mintát meghatározott ütemben hűtik, és 3 K hőfok-intervallumonként megvizsgálják a folyási jellemzőit. Dermedéspontként azt a legalacsonyabb hőmérsékletet jegyzik fel, amelynél még megfigyelhető az anyag mozgása.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A következő táblázat sorolja fel az olvadáspont/olvadási tartomány meghatározásához használt különböző módszerek alkalmazhatóságát és pontosságát:

TÁBLÁZAT: A MÓDSZEREK ALKALMAZHATÓSÁGA

A. Kapilláris módszerek

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek poríthatók	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság (1)	Meglévő szabvány
Olvadáspontmérő készülékek folyadék-fürdővel	igen	csak néhányhoz	273-tól 573 K-ig	± 0,3 K	JIS K 0064
Olvadáspontmérő készülékek fémblokkal	igen	csak néhányhoz	293-tól > 573 K-ig	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Fotocellás meghatározás	igen	többféle készülékkel, eszközzel	253-tól 573 K-ig	± 0,5 K	

(1) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

B. Fűtőasztalok és fagyasztási módszerek

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek poríthatók	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság (1)	Meglévő szabvány
Kofler-féle fűtőasztal rúd	igen	nem	283-tól > 573 K-ig	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Olvadást vizsgáló mikroszkóp	igen	csak néhányhoz	273-tól > 573 K-ig	± 0,5 K	DIN 53736
Meniszkuszmódszer	nem	Különösen poliamidokhoz	293-tól > 573 K-ig	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Fagyáspont meghatározási módszer	igen	igen	223-tól 573 K-ig	± 0,5 K	pl. BS 4695

(1) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

C. Termoanalízis

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság (1)	Meglévő szabvány
Differenciáltermoanalízis	igen	igen	173-tól 1 273 K-ig	600 K-ig ± 0,5 K, 1273 K-ig ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differenciál scanning kalorimetria	igen	igen	173-tól 1 273 K-ig	600 K-ig ± 0,5 K, 1273 K-ig ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

D. Dermedéspont

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság (1)	Meglévő szabvány
Dermedéspont	Ásványolajokhoz és olajtartalmú anyagokhoz	Ásványolajokhoz és olajtartalmú anyagokhoz	223-tól 323 K-ig	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

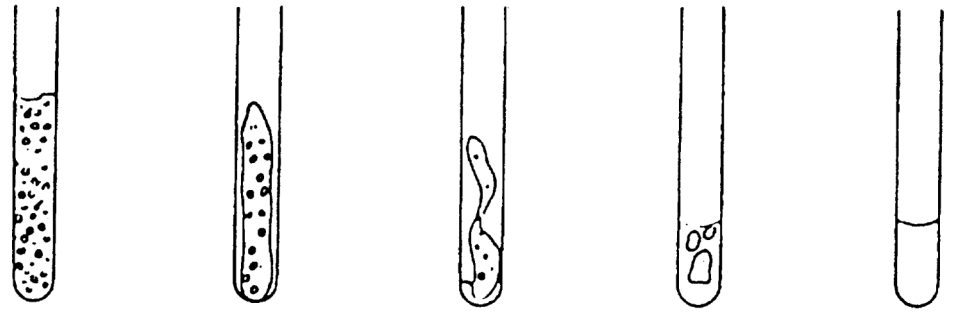
1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

A nemzetközi és nemzeti szabványok csaknem minden vizsgálati módszert leírnak (lásd az 1. függeléket).

1.6.1. **Módszerek kapilláris csővel**

Lassú hőmérsékletnövelés esetén a finom porrá őrölt anyagok rendszerint az 1. ábrán látható olvadási szakaszokat mutatják.

1. ábra



A. szakasz (Az olvadás kezdete): Finom cseppecskék egyenletesen tapadnak a kapilláris cső belső falához.

B. szakasz Térköz jelenik meg a minta és a belső fal között az olvadt anyag zsugorodása miatt.

C. szakasz Az összezsugorodott minta kezd összeesni és cseppfolyósodni.

D. szakasz Teljes meniszkusz jön létre a felületen, de a minta észlelhető mennyisége szilárd marad.

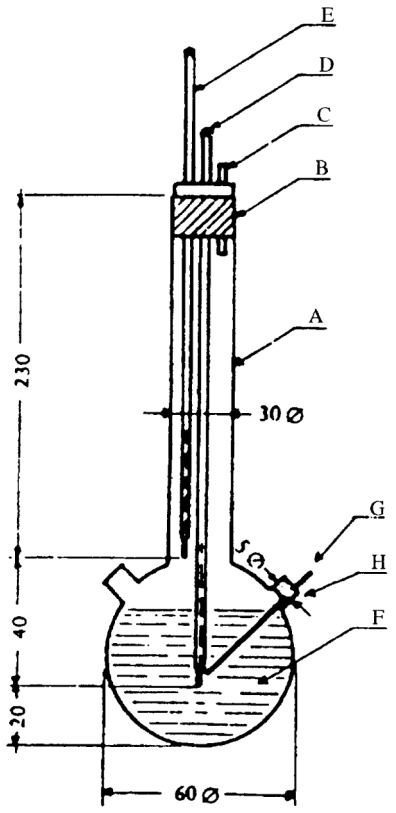
E. szakasz (Az olvadás végső szakasza): Nincsenek szilárd részecskék.

Az olvadáspont meghatározása során az olvadás kezdeti és véghőmérsékletét jegyzik fel.

1.6.1.1. *Olvadáspontmérő folyadékfürdő készülék*

A 2. ábra egy szabványosított, üvegből készített olvadáspontmérő-készüléktípust (JIS K 0064) mutat; minden méret milliméterben van megadva.

2. ábra



A: Mérőedény
B: Dugó
C: Szellőzőnyílás
D: Hőmérő
E: Segédhőmérő
F: Fürdőfolyadék
G: 80–100 mm hosszúságú, 1,0 0,2 mm belső átmérőjű, 0,2–0,3 mm falvastagságú, üvegből készült kapilláris cső
H: Oldalcső

Fürdőfolyadék:

Megfelelő folyadékot kell választani. A folyadék kiválasztása a meghatározni kívánt olvadásponttól függ, például 473 K-nél nem magasabb olvadáspontokhoz folyékony paraffin, 573 K-nél nem magasabb olvadáspontokhoz szilikonolaj alkalmas.

523 K feletti olvadáspontokhoz három tömegrész kénsavból és két tömegrész kálium-szulfátból álló keverék használható. Ennek használata esetén megfelelő óvintézkedéseket kell tenni.

Hőmérő:

Csak azok a hőmérők használhatók, amelyek megfelelnek az alábbi vagy ezzel egyenértékű szabványok követelményeinek:

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

Eljárás:

A száraz anyagot dörzscsészében finom porrá őrlik, és behelyezik az egyik végén leforrasztott kapilláris csőbe úgy, hogy a töltési szint körülbelül 3 mm legyen szoros összetömörítés után. Az egységes tömörített minta eléréséhez a kapilláris csövet függőlegesen, üvegcsövön keresztül óraüvegre kell ejteni körülbelül 700 mm magasságból.

A megtöltött kapilláris csövet úgy kell a fürdőbe helyezni, hogy a hőmérő higanygömbjének középső része azon a helyen érintkezzen a kapilláris csővel, ahol az anyag található. A kapilláris csövet általában az olvadási hőmérsékletnél 10 K-nel alacsonyabb hőmérséklet mellett helyezik a készülékbe.

A folyadékfürdőt úgy melegítik, hogy a hőmérséklet-növekedés mértéke körülbelül 3 K/perc legyen. A folyadékot keverni kell. Körülbelül 10 K-nel a várt olvadáspont előtt a hőmérséklet-növekedési ütemet maximum 1 K/perc értékre kell módosítani.

Számítás:

Az olvadáspont számítása a következőképpen történik:

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

Ahol:

T = korrigált olvadáspont K-ben

T_D = a D hőmérő által mutatott hőmérséklet-érték K-ben

T_E = az E hőmérő által mutatott hőmérséklet-érték K-ben

n = a D hőmérőn a folyadékfürdőből kiemelkedő részen a higanyoszlop fokbeosztásainak száma

1.6.1.2. *Olvadáspontmérő készülékek fémblokkal*

Készülék:

A következőkből áll:

– hengeres fémblokk, amelynek a belső része üreges és kamrát alkot (lásd a 3. ábrát),

– fémdugó, két vagy több furattal, amelynek segítségével csövek vezethetők a fémblokkba,

– egy, a fémblokkhoz létrehozott fűtőrendszer, amelyet például a fémblokkhoz csatolt, zárt elektromos ellenállás biztosít,

– reosztát az energia-bevitel szabályozásához, elektromos fűtés használatakor,

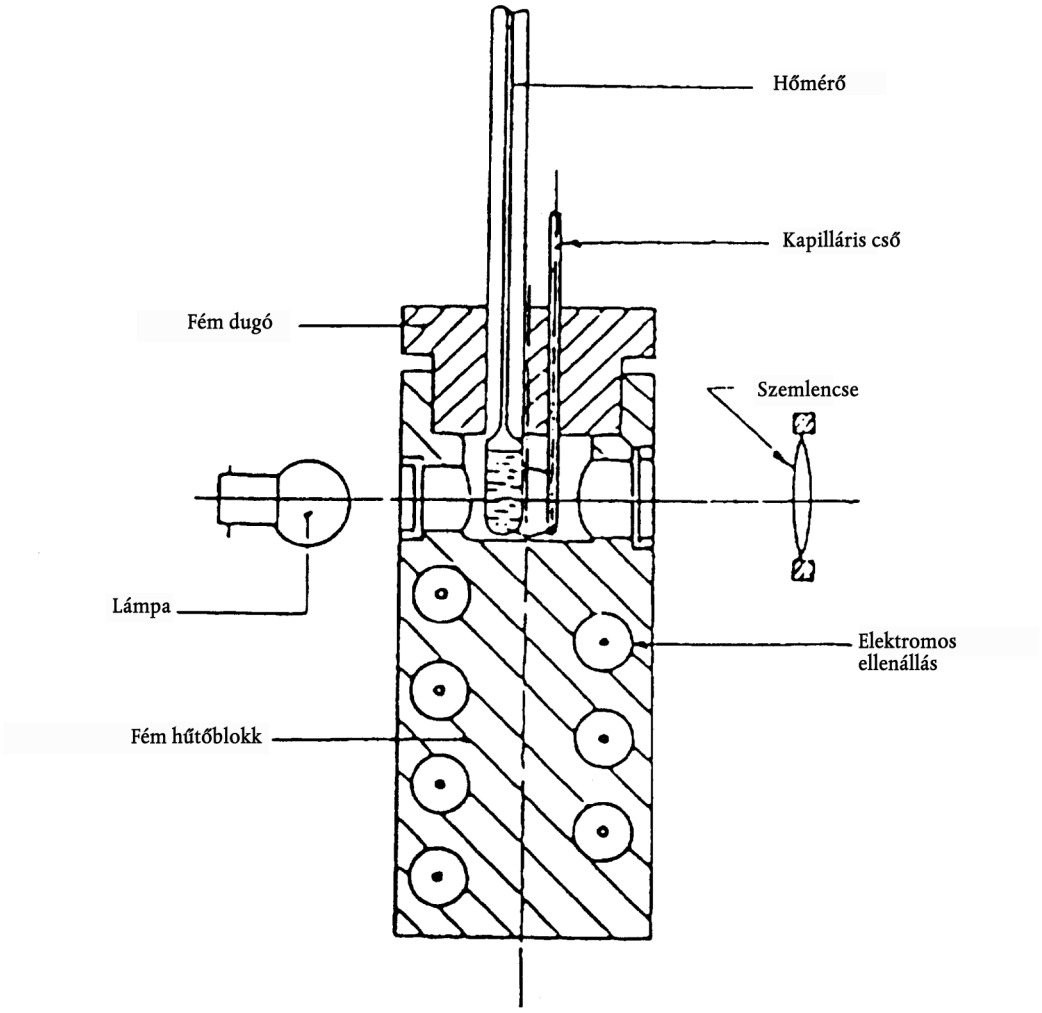
– a kamra oldalfalain négy, hőálló üvegből készült ablak, egymással szemben, derékszögben elhelyezve. Az egyik ablak elé nézőkét szereltek fel a kapilláris cső megfigyeléséhez. A többi három ablakot lámpák segítségével a burkolat belsejének megvilágítására használják,

– egyik végén zárt, hőálló üvegből készült kapilláris cső (lásd az 1.6.1.1 pontot).

Hőmérő:

Lásd az 1.6.1.1 pontban említett szabványokat. Hasonló pontosságú termoelektromos mérőkészülékek is alkalmazhatók.

3. ábra



1.6.1.3. *Fotocellás meghatározás*

Készülék és eljárás:

A készülék egy automatikus hűtőrendszerrel ellátott fémkamrából áll. Három kapilláris csövet töltenek meg az 1.6.1.1. pontnak megfelelően, és helyeznek a kemencébe.

Különböző lineáris hőmérséklet-növelési lehetőségek állnak rendelkezésre a készülék kalibrálásához, az alkalmas hőmérsékletnövekedés beállítása elektromosan történik egy előre kiválasztott konstans és lineáris értékre. Regisztráló készülékek mutatják a kemence tényleges hőmérsékletét és a kapilláris csövekben lévő anyag hőmérsékletét.

1.6.2. **Fűtőasztalok**

1.6.2.1. *Kofler-féle fűtőasztal*

Lásd a függeléket.

1.6.2.2. *Olvadásvizsgáló mikroszkóp*

Lásd a függeléket.

1.6.2.3. *Meniszkusz-módszer (poliamidok)*

Lásd a függeléket.

Az olvadásponton a hevítés sebességének 1 K/perc értéknél kisebbnek kell lennie.

1.6.3. **A fagyáspont meghatározásának módszerei**

Lásd a függeléket.

1.6.4. **Termikus analízis**

1.6.4.1. *Differenciál-termoanalízis*

Lásd a függeléket.

1.6.4.2. *Differenciál scanning kalorimetria*

Lásd a függeléket.

1.6.5. **Dermedéspont meghatározása**

Lásd a függeléket.

2. **ADATOK**

Néhány esetben a hőmérő helyesbítése szükséges.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges a következő információkat kell tartalmaznia:

– az alkalmazott módszert,

– az anyag pontos leírását (azonosság és szennyeződések), és amennyiben volt ilyen, előzetes tisztítási fokának pontos ismertetése,

– a pontosság becslését.

Legalább két, a becsült pontossági tartományban lévő mért érték (lásd a táblázatokat) középértékét adják meg olvadáspontként.

Amennyiben az olvadás kezdetén és végső szakaszában mért hőmérséklet közötti különbség a módszer pontossági határai között van, az olvadás végső szakaszában mért hőmérsékletet kell olvadáspontnak tekinteni; egyébként meg kell adni mind a két hőmérsékletet.

Amennyiben az anyag elbomlik vagy szublimál az olvadáspont elérése előtt, meg kell adni azt a hőmérsékletet, amelynél ez a hatás megfigyelhető.

A vizsgálati jelentésben közölni kell minden, az eredmények értelmezése szempontjából lényeges információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 102. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges

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

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

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

Függelék

További technikai információt például a következő szabványok nyújthatnak.

1. **Kapilláris módszerek**

1.1. Olvadáspontmérő készülékek folyadékfürdővel

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

1.2. Olvadáspontmérő-készülékek fémblokkal

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

2. **Fűtőasztal**

2.1. Kofler-féle fűtőasztal

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

2.2. Olvadáspont-vizsgáló mikroszkóp

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Meniszkusz-módszer (poliamidok)

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

3.	**Módszerek a fagyáspont meghatározására**	
	BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
	BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
	DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
	ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
	DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
	NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
	NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
	ISO 1392	Method for the determination of the freezing point
4.	**Termikus analízis**	
4.1.	Differenciál termoanalízis	
	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.	Differenciál scanning kalorimetria	
	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.	**Dermedéspont meghatározása**	
	NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
	ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
	ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point

A.2. FORRÁSPONT

1. **MÓDSZER**

A leírt módszerek többsége az OECD vizsgálati irányelveken (1) alapul. Az alapelveket a (2) és (3) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

Az itt leírt módszerek és eszközök folyadékokhoz és alacsony olvadáspontú anyagokhoz alkalmazhatók, feltéve hogy azok a forráspont alatt nem mennek keresztül kémiai reakción (például autooxidáció, átrendeződés, bomlás stb.). A módszerek tiszta és szennyezett folyékony anyagokhoz alkalmazhatók.

A hangsúly a fotocellás meghatározást és a termikus analízist használó módszereken van, mivel ezek a módszerek lehetővé teszik az olvadás-, valamint a forráspontok meghatározását. Ezenkívül a mérések automatikusan hajthatók végre.

A „dinamikus módszernek" megvan az az előnye, hogy a gőznyomás meghatározásához is alkalmazható, és nincs szükség a forráspontnak a normál nyomásra (105,325 kPa) történő átszámítására, mivel a normál nyomás a mérés során manosztát segítségével beállítható.

Megjegyzések:

A szennyeződéseknek a forráspont meghatározására gyakorolt hatása nagymértékben függ a szennyezés természetétől. Amennyiben olyan illékony szennyezések vannak a mintában, amelyek befolyásolhatják az eredményt, az anyag még tisztítható lehet.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A normál forráspont az a hőmérséklet, amelynél valamely folyadék gőznyomása 101,325 kPa.

Amennyiben a forráspontot nem normál légköri nyomáson mérik, a gőznyomásnak a hőmérséklettől való függése a Clausius-Clapeyron egyenlet segítségével írható le:

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

ahol:

p = az anyag gőznyomása Pascal-ban

ΔH_V = az anyag párolgási hője J mol^{-1} mértékegységben

R = általános moláris gázállandó = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = termodinamikus hőmérséklet K-ben

A forráspontot a mérés során észlelhető környezeti nyomás figyelembevételével adják meg.

Átszámítások

Nyomás (mértékegysége: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(a „bar" még mindig megengedhető, de nem ajánlott)

133 Pa = 1 Hgmm = 1 Torr

(a „Hgmm" és „Torr" mértékegységek nem megengedettek)

1 atm = normál atmoszféra = 101 325 Pa

(az „atm" mértékegység nem megengedett)

Hőmérséklet (mértékegység: K)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius hőmérséklet, Celsius fok (°C)

T: termodinamikus hőmérséklet, Kelvin (K)

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

Néhány kalibrációs anyag a függelékben felsorolt módszerek leírásában található.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A forráspont (forrásponttartomány) meghatározására szolgáló öt módszer a forráspont mérésén, míg két további módszer termikus analízisen alapul.

1.4.1. **Meghatározás ebulliométer segítségével**

Az ebulliométereket eredetileg a forráspont-növekedés alapján történő molekulasúly-meghatározáshoz fejlesztették ki, de pontos forráspontmérésekhez is alkalmasak. Az ASTM D 1120-72-es szabvány egy nagyon egyszerű készüléket ismertet (lásd a függeléket). A folyadékot ebben a készülékben egyensúlyi körülmények között, légköri nyomáson forrásig hevítik.

1.4.2. **Dinamikus módszer**

E módszerrel a gőz újrakondenzálódási hőmérsékletét mérik forráskor, megfelelő hőmérővel a refluxban. A módszerben a nyomás változtatható.

1.4.3. **Desztillációs módszer forráspont meghatározására**

Ez a módszer a folyadék desztillálását, a gőz kondenzációs hőmérsékletének mérését és a desztillátum mennyiségének meghatározását foglalja magában.

1.4.4. **Siwoloboff-módszer**

A mintát folyadékfürdőbe merített mintacsőben melegítik. A mintacsőbe bemerítenek egy, az alsó részében levegőbuborékot tartalmazó, az alján összeolvasztott hajszálcsövet.

1.4.5. **Fotocellás meghatározás**

A Siwoloboff-alapelvet követve automatikus fotoelektromos mérést hajtanak végre felszálló buborékok segítségével.

1.4.6. **Differenciál-termoanalízis**

Ez a módszer az anyag és egy referenciaanyag közötti hőmérséklet-különbséget a hőmérséklet függvényében regisztrálja, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanazzal az irányított hőmérséklet-programmal vizsgálják. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy át, ezt a változást a regisztrált hőmérsékleti görbe alapvonalától való endoterm eltérés (forrás) jelzi.

1.4.7. **Differenciál scanning kalorimetria**

Ez a módszer az anyagba és a referenciaanyagba történő energia-bevitelek közötti különbséget regisztrálja a hőmérséklet függvényében, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanazzal az irányított hőmérséklet-programmal vizsgálják. Ez az energia az anyag és a referenciaanyag közötti nulla hőmérséklet-különbség létrehozásához szükséges energia. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy át, ezt a változást a hőáramlási görbe alapvonalától való endoterm eltérés (forrás) jelzi.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az 1. táblázat sorolja fel a forráspont/forrástartomány meghatározásához használt különböző módszerek alkalmazhatóságát és pontosságát.

1. TÁBLÁZAT: A MÓDSZEREK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Mérési módszer	Becsült pontosság	Meglévő szabvány
Ebulliométer	± 1,4 K (373 K-ig) (1) (2) ± 2,5 K (600 K-ig) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dinamikus módszer	± 0,5 K (600 K-ig) (2)	
Desztillációs folyamat (forrási tartomány)	± 0,5 K (600 K-ig)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboff szerint	± 2 K (600 K-ig) (2)	
Fotocellás meghatározás	± 0,3 K (373 K-nál) (2)	
Differenciál-termokalorimetria	+ 0,5 K (600 K-ig) ± 2,0 K (1 273 K-ig)	ASTM E 537-76
Differenciál scanning kalorimetria	± 0,5 K (600 K-ig) ± 2,0 K (1 273 K-ig)	ASTM E 537-76

(1) Ez a pontosság csak az olyan egyszerű készülékhez érvényes, mint amelyet például az ASTM D 1120-70 ír le; a pontosság növelhető korszerű ebulliométerrel.
(2) Csak tiszta anyagokra érvényes. Más körülmények közötti használatát indokolni kell.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

A nemzetközi és nemzeti szabványok (lásd a függeléket) csaknem minden vizsgálati módszert tartalmaznak.

1.6.1. **Ebulliométer**

Lásd a függeléket.

1.6.2. **Dinamikus módszer**

Lásd a gőznyomás meghatározására szolgáló A.4-es vizsgálati módszert.

Az észlelt forráspontot 101,325 kPa alkalmazott nyomás mellett adják meg.

1.6.3. **Desztillációs folyamat (forrási tartomány)**

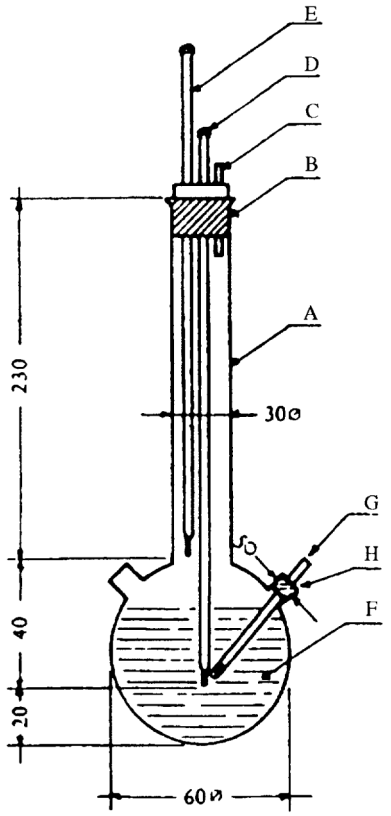
Lásd a függeléket.

1.6.4. **Siwoloboff-módszer**

A mintát egy olvadáspontmérő készülékben, egy körülbelül 5 mm átmérőjű mintacsőben melegítik (1. ábra).

Az 1. ábra a szabványosított olvadás- és forráspontmérő készülékek egyik típusát (JIS K 0064) mutatja be (üvegből készült, minden méret milliméterben van megadva).

1. ábra



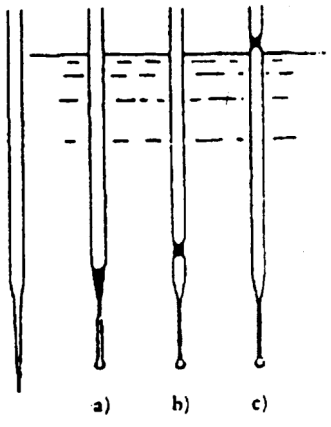
A: Mérőedény
B: Dugó
C: Szellőzőnyílás
D: Hőmérő
E: Segédhőmérő
F: Folyadékfürdő
G: Mintacső, maximum 5 mm-es külső átmérőjű; egy körülbelül 100 mm hosszú, körülbelül 1 mm belső átmérőjű és körülbelül 0,2–0,3 mm falvastagságú kapilláris csövet tartalmaz
H: Oldalcső

A mintacsőbe egy, az alsó vége fölött körülbelül 1 cm-rel leforrasztott kapilláris csövet helyeznek be (forrási kapilláris). A vizsgált anyagot addig töltik be, hogy a kapilláris leforrasztott szakasza a folyadék felszíne alatt legyen. A forrási kapillárist tartalmazó mintacsövet a hőmérőhöz rögzítik egy gumiszalaggal, vagy oldalról egy tartóval rögzítik (lásd a 2. ábrát):

2. ábra
Működési alapelv Siwoloboff szerint



3. ábra
Módosított alapelv



A folyadékfürdőt a forráspontnak megfelelően választják ki. 573 K hőmérsékletig szilikonolaj használható. Paraffinolaj csak legfeljebb 473 K-ig használható. A fürdőben lévő folyadék melegítését először 3 K/perc hőmérsékletnövekedésre kell beállítani. A folyadékfürdőt keverni kell. A várt forráspont alatt körülbelül 10 K-nel csökkenteni kell a melegítést úgy, hogy a hőmérsékletnövekedés üteme 1 K/perc értéknél kisebb legyen. A forráspont megközelítésekor gyors ütemben buborékok kezdenek megjelenni a forraló kapillárisból.

A forráspont az a hőmérséklet, amelynél további hűtéskor, megáll a buboréklánc, és hirtelen növekedni kezd a folyadékszint a kapillárisban. Az ennek megfelelő, a hőmérőn látható érték az anyag forráspontja.

A módosított alapelv esetében (3. ábra) a forráspontot egy olvadáspont mérésére szolgáló kapillárisban határozzák meg. Ezt a kapillárist megnyújtották hegyes csúcsúra körülbelül 2 cm hosszúságban (a), és ezzel kis mennyiségű mintát szívnak fel. A hegyes kapilláris cső nyitott végét összeolvasztással lezárják úgy, hogy a végén legyen egy kis légbuborék. Az olvadáspont meghatározására szolgáló készülék melegítésekor (b) kitágul a légbuborék. A forráspont annak a hőmérsékletnek felel meg, amelynél az anyagból álló dugó eléri a folyadékfürdő felületének szintjét (c).

1.6.5. **Fotocellás meghatározás**

A mintát egy fűtött fémblokkba helyezett kapilláris csőben melegítik.

A blokkban lévő alkalmas nyílásokon keresztül egy fénysugarat irányítanak az anyagon át egy pontosan kalibrált fotocellára.

A minta hőmérsékletnövekedése során egyenként légbuborékok jelennek meg a forrásban lévő anyagot tartalmazó kapillárisból. A forráspont elérésekor nagymértékben megnövekszik a buborékok száma. Ez változást hoz létre a fényerőben, amelyet egy fotocella regisztrál, és stopjelet ad a blokkban elhelyezett platina ellenállás-hőmérő hőmérsékletét jelző készüléknek.

A módszer különösen hasznos, mivel lehetővé teszi a szobahőmérséklet alatti meghatározásokat egészen 253,15 K-ig (–20 °C) anélkül, hogy bármilyen változtatást kellene végrehajtani a készülékben. A készüléket egyszerűen el kell helyezni egy hűtőfürdőben.

1.6.6. **Termikus analízis**

1.6.6.1. *Differenciál-termoanalízis*

Lásd a függeléket.

1.6.6.2. *Differenciál scanning kalorimetria*

Lásd a függeléket.

2. **ADATOK**

A normál nyomástól való kis eltéréseknél (max. ± 5 kPa) a forráspontokat T_n-re normalizálják az alábbi, Sidney Young-féle számértékegyenlet segítségével:

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

ahol:

Δp = (101,325 – p) [figyeljen az előjelre]

p = mért nyomás kPa mértékegységben

f_T = forráspontváltozás üteme a nyomás függvényében, K/kPa mértékegységben

T = mért forráspont K-ben

T_n = normál nyomásra korrigált forráspont K-ben

Számos anyagra a hőmérséklet-korrekciós tényezőket, az f_T-t, és a közelítő meghatározásokra szolgáló egyenleteket a fent említett nemzetközi és nemzeti szabványok tartalmazzák.

Például a DIN 53171-es módszer a festékekben lévő oldószerekhez a következő közelítő korrekciókat említi meg:

2. TÁBLÁZAT: HŐMÉRSÉKLET–KORREKCIÓS TÉNYEZŐK, f_T

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

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az alkalmazott módszert,

– az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyezések), és amennyiben van ilyen, az előzetes tisztítási fok pontos ismertetését,

– a pontosság becslését.

Legalább két, a becsült pontossági tartományban lévő mért érték (lásd az 1. táblázatot) középértékét adják meg olvadáspontként.

Meg kell adni a mért forráspontokat és azok középértékét, továbbá kPa-ban azt (azokat) a nyomást (nyomásokat), amelyeknél a méréseket végrehajtották. A nyomásnak lehetőleg a normál légköri nyomáshoz kell közel lennie.

Meg kell adni az eredmények értelmezéséhez lényeges valamennyi információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, a 103. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges.

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

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

Függelék

További technikai információt például a következő szabványok nyújthatnak:

1. **Ebulliométer**

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

2. **Desztillációs folyamat (forrási tartomány)**

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

3. **Differenciál-termoanalízis és differenciál scanning kalorimetria**

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

A.3. RELATÍV SŰRŰSÉG

1. **MÓDSZER**

A leírt módszerek az OECD-vizsgálati irányelveken (1) alapulnak. Az alapelveket a (2) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

Az itt leírt, a relatív sűrűség meghatározására szolgáló módszerek szilárd és folyékony anyagokhoz alkalmazhatók, a tisztasági fokukra vonatkozó korlátozás nélkül. Az 1. táblázat sorolja fel a különböző alkalmazandó módszereket.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A szilárd anyagok vagy folyadékok D_4^{20} relatív sűrűsége a vizsgált anyag 20 °C hőmérsékleten meghatározott térfogatának tömege és a 4 °C hőmérsékleten meghatározott ugyanolyan térfogatú víz tömege közötti arány. A relatív sűrűség dimenzió nélküli szám.

Valamely anyag ρ sűrűsége az m tömegének és v térfogatának a hányadosa.

A ρ sűrűség SI mértékegységben kg/m^3-ben van megadva.

1.3. REFERENCIAANYAGOK (1) (3)

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

1.4. A MÓDSZEREK ALAPELVE

Négy különböző osztályba sorolt módszer használatos.

1.4.1. **Felhajtóerőn alapuló módszer**

1.4.1.1. *Hidrométer* (folyékony anyagokhoz)

Megfelelően pontos és gyors sűrűségmeghatározások érhetők el úszó hidrométerekkel, amelyek lehetővé teszik valamely folyadék sűrűségének meghatározását a merülési mélysége alapján, egy skála leolvasásával.

1.4.1.2. *Hidrosztatikus mérleg* (folyékony és szilárd anyagokhoz)

A levegőben és egy alkalmas folyadékban (például vízben) mért vizsgálati minta tömege közötti különbség használható a minta sűrűségének meghatározására.

Szilárd anyagok esetében a mért sűrűség csak az adott, méréshez használt minta sűrűségét reprezentálja. Folyadékok sűrűségének meghatározásához megmérik egy ismert v térfogatú test tömegét levegőben, majd a folyadékban.

1.4.1.3. *Merülő test módszer* (folyékony anyagokhoz) (4)

E módszerben valamely folyadék sűrűségét a vizsgált folyadékba ismert térfogatú test bemerítése előtt és után a folyadék tömegéből határozzák meg.

1.4.2. **Piknométeres módszerek**

Szilárd anyagokhoz vagy folyadékokhoz különböző alakú és ismert térfogatú piknométerek használhatók. A sűrűséget a megtöltött és üres piknométer tömege közötti különbségből és annak ismert térfogatából számítják ki.

1.4.3. **Levegő-összehasonlítású piknométer** (szilárd anyagokhoz)

A szilárd test sűrűsége, alakjától függetlenül, szobahőmérsékleten, gáz összehasonlítású piknométerrel mérhető meg. Ehhez az anyag térfogatát levegőben vagy inert gázban egy állítható, kalibrált térfogatú hengerben mérik meg. A sűrűség számításához a térfogatmérés befejezését követően tömegmérést végeznek.

1.4.4. **Oszcillációs sűrűségmérő (5) (6) (7)**

Valamely folyadék sűrűsége megmérhető oszcillációs sűrűségmérővel. Egy U-cső alakban gyártott mechanikus oszcillátort rezegtetnek az oszcillátor tömegétől függő oszcillátor rezonanciafrekvenciáján, amely ennek tömegétől függ. A minta bevitele megváltoztatja az oszcillátor rezonanciafrekvenciáját. A készüléket két, ismert sűrűségű folyékony anyag segítségével kell kalibrálni. Ezeket az anyagokat lehetőleg úgy kell kiválasztani, hogy a sűrűségük lefedje a mérni kívánt tartományt.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A relatív sűrűség meghatározására használt különböző módszerek alkalmazhatóságát a táblázat sorolja fel.

1.6. A MÓDSZEREK LEÍRÁSA

A függelék ismerteti azokat a példaként megadott szabványokat, amelyeket a további technikai részletek megismeréséhez tanulmányozni kell.

A vizsgálatokat 20 °C hőmérsékleten kell végrehajtani, és legalább két mérést kell elvégezni.

2. **ADATOK**

Lásd a szabványokat.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– az alkalmazott módszert,

– az anyag pontos leírását (azonosság és szennyeződések) és előzetes tisztítási foka, amennyiben van ilyen.

A D_4^{20} relatív sűrűséget az 1.2. pontban meghatározott módon kell megadni a mért anyag fizikai állapotával együtt.

Meg kell adni az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

TÁBLÁZAT: MÓDSZEREK ALKALMAZHATÓSÁGA

Mérési módszer	Sűrűség		A leginkább lehetséges dinamikus viszkozitás	Meglévő szabványok
	Szilárd anyag	Folyadék		
1.4.1.1. Hidrométer		igen	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Hidrosztatikus mérleg				
a) szilárd anyagok	igen			ISO 1183 (A)
b) folyadékok		igen	5 Pa s	ISO 901 és 758
1.4.1.3. Merülőtest-módszer		igen	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknométer				ISO 3507
a) szilárd anyagok	igen			ISO 1183(B), NF T 20-053
b) folyadékok		igen	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Levegő összehasonlítós piknométer	igen			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Oszcillációs sűrűségmérő		igen	5 Pa s	

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 102. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges.

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

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

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

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

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

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

Függelék

További technikai információt például a következő szabványok nyújtanak:

1. **FELHAJTÓERŐN ALAPULÓ MÓDSZER**

1.1. Hidrométer

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

1.2. Hidrosztatikus mérleg

Szilárd anyagokhoz	
ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use – Determination of the density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density
Folyékony anyagokhoz	
ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 és 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. Merítetttest-módszer

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

2. **PIKNOMÉTERES MÓDSZEREK**

2.1. Folyékony anyagokhoz

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

DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6}$ m^2 s^{-1} at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)
DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol- water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products – chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary- stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method

2.2. Szilárd anyagokhoz

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

3. **LEVEGŐ ÖSSZEHASONLÍTÁSÚ PIKNOMÉTER**

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

A.4. GŐZNYOMÁS

1. MÓDSZER

A leírt módszerek többsége az OECD-vizsgálati irányelveken (1) alapul. Az alapelveket a (2) és (3) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag szerkezetéről, olvadáspontjáról és forráspontjáról.

Nincs olyan mérési eljárás, amely a gőznyomások teljes tartományához alkalmazható. Ezért több módszer ajánlott a gőznyomás méréséhez < 10^{-4}-től 10^{5} Pa-ig.

A szennyeződések rendszerint befolyásolják a gőznyomást, amely nagymértékben függ a szennyeződés fajtájától.

Tisztítható az anyag, ahol illékony szennyeződések vannak jelen a mintában, amelyek hatással lehetnek az eredményre. Szükség lehet a technikai tisztaságú anyag gőznyomásának megadására.

Az itt leírt néhány módszer fém alkatrészekkel ellátott készüléket használ; ezt figyelembe kell venni a maró anyagok vizsgálatakor.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Valamely anyag gőznyomása a szilárd vagy folyékony anyag feletti telítettségi nyomás. Termodinamikai egyensúlyban valamely tiszta anyag gőznyomása kizárólag a hőmérséklet függvénye.

A nyomás alkalmazandó SI mértékegysége a pascal (Pa).

A korábban használt mértékegységek, átszámítási tényezőjükkel együtt, a következők:

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

A hőmérséklet SI mértékegysége a kelvin (K).

Az R általános moláris gázállandó értéke 8,314 J mol^{-1} K^{-1}.

A gőznyomás hőmérséklet-függését a Clausius-Clapeyron egyenlet írja le:

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

ahol:

p = az anyag gőznyomása Pascal-ban

ΔH_v = a párolgási hője J mol^{-1}-ben

R = általános moláris gázállandó J mol^{-1} K^{-1}-ben

T = termodinamikai hőmérséklet K-ben

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A gőznyomás meghatározására hét, különböző gőznyomástartományokban alkalmazható módszert javasolt. Minden módszernél a gőznyomást különböző hőmérsékleteken határozzák meg. Korlátozott hőmérséklet-tartományban valamely tiszta anyag gőznyomásának logaritmusa a hőmérséklet inverzének lineáris függvénye.

1.4.1. **Dinamikus módszer**

A dinamikus módszer alkalmazásakor mérik az adott nyomáshoz tartozó forráspontot.

Ajánlott tartomány:

10^3-tól 10^5 Pa-ig

E módszer a normál forráspont meghatározására is ajánlott, és e célra egészen 600 K-ig használható.

1.4.2. **Statikus módszer**

A statikus eljárásban, termodinamikai egyensúlynál meghatároznak egy zárt rendszerben létrejött gőznyomást adott hőmérsékleten. A módszer egykomponensű és többkomponensű szilárd anyagokhoz és folyadékokhoz alkalmas.

Ajánlott tartomány:

10-től 10^5 Pa-ig.

Ez a módszer 1–10 Pa tartományban is használható, feltéve hogy gondosan járnak el.

1.4.3. **Izoteniszkóp**

Ez a szabvány is statikus módszer, de rendszerint nem alkalmas többkomponensű rendszerekhez. További információt az ASTM módszer D-2879-86 leírása tartalmaz.

Ajánlott tartomány:

100-tól 10^5 Pa-ig.

1.4.4. **Effúziós módszer: Gőznyomás mérésére szolgáló mérleg**

Vákuum alatt, egy cellából annak ismert méretű nyílásán keresztül, egységnyi idő alatt távozó anyag mennyisége úgy határozható meg, hogy elhanyagolható az anyag visszatérése a cellába (például egy érzékeny mérlegen a gőzlökéssel létrehozott impulzus mérésével, vagy a tömegveszteség mérésével).

Ajánlott tartomány:

10^{-3}-tól 1 Pa-ig.

1.4.5. **Effúziós módszer: Tömegveszteséggel vagy az elpárolgott anyag leválasztásával**

A módszer egy Knudsen cellából (4), ultravákuum alatt, egy mikronyíláson keresztül, gőz formájában, egységnyi idő alatt kiáramló vizsgált anyag tömegének becslésén alapul. A kiáramló gőz tömege a cella tömegveszteségének meghatározásával, vagy a gőznek alacsony hőmérsékleten végrehajtott kondenzálásával és kromatográfiás analízis segítségével az elpárolgott anyag mennyiségének meghatározásával kapható meg. A gőznyomás a Hertz-Knudsen-féle összefüggés alkalmazásával számítható ki.

Ajánlott tartomány:

10^{-3}-tól 1 Pa-ig.

1.4.6. **Gázszaturációs módszer**

Inert vivőgázáramot vezetnek az anyagon, hogy az telítetté váljon a gőzével. Valamely ismert mennyiségű vivőgáz által szállított anyagmennyiség egy alkalmas kondenzedényben való összegyűjtéssel, vagy „in-train" analitikai módszerrel mérhető. Ezután a módszer segítségével számítják ki a gőznyomást az adott hőmérsékleten.

Ajánlott tartomány:

10^{-4}-től 1 Pa-ig.

Ez a módszer 1-től 10 Pa-ig terjedő tartományban is használható, feltéve hogy gondosan járnak el.

1.4.7. **Forgó rotor**

A forgó rotoros mérőeszközben a tényleges mérőelem egy mágneses térben felfüggesztett és nagyon gyorsan forgó kis acélgolyó. A gáznyomás az acélgolyó nyomástól függő lassulásából határozható meg.

Ajánlott tartomány:

10^{-4}-től 0,5 Pa-ig.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A gőznyomást meghatározó különböző módszerek az alkalmazás, ismételhetőség, reprodukálhatóság, mérési tartomány, meglévő szabvány tekintetében kerülnek összehasonlításra. Ezt az összehasonlítást a következő táblázat mutatja be.

MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Mérési módszer	Anyagok		Becsült ismételhetőség (1)	Becsült reprodukálhatóság (1)	Ajánlott tartomány	Meglévő szabvány
	Szilárd	Folyékony				
1.4.1. Dinamikus módszer	alacsony olvadáspontú	igen	25 %-ig	25 %-ig	10^3 Pa-tól 2×10^3 Pa-ig	–
			1-től 5 %-ig	1-től 5 %-ig	2×10^3 Pa-tól 10^5 Pa-ig	–
1.4.2. Statikus módszer	igen	igen	5-től 10 %-ig	5-től 10%-ig	10 Pa-tól 10^5 Pa-ig (2)	NFT 20-048 (5)
1.4.3. Izoteniszkóp	igen	igen	5-től 10 %-ig	5-től 10 %-ig	10^2 Pa-tól 10^5 Pa-ig	ASTM-D 2879-86
1.4.4. Effúziós módszer, gőznyomás mérésére szolgáló mérleg	igen	igen	5-től 20%-ig	50 %-ig	10^{-3} Pa-tól 1 Pa-ig	NFT 20-047 (6)
1.4.5. Effúziós módszer, súlyvesztés	igen	igen	10-től 30 %-ig	–	10^{-3} Pa-tól 1 Pa-ig	–
1.4.6. Gázszaturáció módszere	igen	igen	10-től 30%-ig	50 %-ig	10^{-4} Pa-tól 1 Pa-ig (2)	–
1.4.7. Forgó rotoros módszer	igen	igen	10-től 20%-ig	–	10^{-4} Pa-tól 0,5 Pa-ig	–

(1) A tisztaság mértékétől függ.
(2) Ezek a módszerek 1 és 10 Pa közötti tartományban is használhatók, feltéve hogy gondosan járnak el.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Dinamikus mérés**

1.6.1.1. *Készülék*

A mérőkészülék jellemzően egy csatlakoztatott, üvegből vagy fémből készült hűtővel ellátott forraló edényből (1. ábra), a hőmérséklet mérésére szolgáló eszközből és a nyomás szabályozására és mérésére használt berendezésből áll. A rajzon látható jellegzetes mérőkészülék hőálló üvegből készült, és öt részből tevődik össze:

A részben kettősfalú, nagy cső egy csiszolt köpenycsatlakozóból, hűtőből, hűtő edényből és egy bemeneti nyílásból áll.

Egy Cottrell-féle „szivattyúval" felszerelt üveghengert szereltek be a cső forraló szakaszába, amelynek zúzott üveggel létrehozott érdes felülete a forralási folyamat során a lökésszerű gőzképződés elkerülésére szolgál.

A hőmérsékletet egy alkalmas bevezető csőcsatlakozón (például csiszolt belső felületű csatlakozón) keresztül, a készülékbe a mérés helyéig bemerített alkalmas hőmérséklet-érzékelővel (például ellenállás-hőmérő, köpeny-termoelem) (5. számú tétel az 1. ábrán) mérik.

A nyomásszabályozóhoz és a mérőeszközhöz létre kell hozni a szükséges csatlakozásokat.

A gömblombikot, amely térfogat-kiegyenlítőként szolgál, egy kapilláris cső segítségével csatlakoztatják a mérőkészülékhez.

A forraló edényt az alulról az üvegkészülékbe behelyezett fűtőelem (például fűtőrúd) melegíti. A szükséges fűtőáram beállítása és szabályozása termoelem segítségével történik.

A szükséges, 10^2 Pa és körülbelül 10^5 Pa közötti vákuumot vákuumszivattyúval hozzák létre.

Egy alkalmas szelepet használnak nyomásszabályozáshoz a levegő vagy a nitrogén mérésére (mérési tartomány körülbelül 10^2–10^5 Pa) és légcserére.

A nyomást manométer méri.

1.6.1.2. *Mérési eljárás*

A gőznyomást közelítőleg 10^3 és 10^5 Pa között meghatározott nyomásérték mellett, a minta forráspontjának meghatározásával mérik. Állandó nyomás alatti, állandósult hőmérséklet azt jelzi, hogy elérték a forráspontot. Habzó anyagok nem mérhetők ennek a módszernek a segítségével.

Az anyagot a tiszta, száraz mintaedénybe helyezik. Problémák merülhetnek fel a nem por állagú szilárd anyagok esetében, de ezek esetenként megoldhatók a hűtőköpeny fűtésével. Az edény megtöltése után a készüléket a peremnél lezárják, és gázmentesítik az anyagot. Ezután beállítják a legalacsonyabb kívánt nyomást, és bekapcsolják a fűtést. Ezzel egyidejűleg regisztráló készülékhez csatlakoztatják a hőmérséklet-érzékelőt.

Egyensúlyi állapot akkor jön létre, amikor a regisztráló készülék állandó nyomáson állandó forráspontot mutat. Különös gonddal kell eljárni a forralás során a lökésszerű gőzképződés elkerülése érdekében. Ezenkívül teljes kondenzációnak kell létrejönnie a hűtőben. Alacsony olvadáspontú szilárd anyagok gőznyomásának meghatározásakor gondosan kell eljárni, ügyelve a kondenzátor eldugulásának elkerülésére.

Az egyensúlyi pont regisztrálása után magasabb nyomást állítanak be. Ez a folyamat az elmondottak szerint folytatódik 10^5 Pa eléréséig (összesen körülbelül 5–10 mérési pont). Ellenőrzésképpen meg kell ismételni az egyensúlyi pontokat csökkenő nyomások mellett.

1.6.2. **Statikus mérés**

1.6.2.1. *Készülék*

A készülék a minta hőmérsékletének szabályozására és a hőmérséklet mérésére egy mintatároló tartályból, valamint egy fűtő- és hűtőrendszerből áll. A készülék a nyomás beállítására és mérésére szolgáló eszközt is tartalmaz. A működési alapelveket a 2a. és 2b. ábra mutatja be.

A mintakamrát (2a. ábra) egyik oldalon vákuumszivattyú határolja. A másik oldalhoz manométer-folyadékot tartalmazó U-csövet csatlakoztattak. Az U-cső egyik vége a vákuumszivattyúhoz, a nitrogénpalackhoz vagy szellőztető szelephez és egy manométerhez ágazik el.

Az U-cső helyett nyomásjelzővel ellátott nyomásmérő is használható (2b. ábra).

A minta hőmérsékletének szabályozása érdekében a mintatartályt a vákuumcsővel és U-csővel vagy nyomásmérővel együtt állandó hőmérsékleten, ± 0,2 K, tartott fürdőbe helyezik. A hőmérsékletméréseket a mintát tartalmazó tartály külső falán vagy magában a tartályban hajtják végre.

A készülék kiürítésére egy felszálló hűtött csapdával ellátott vákuumszivattyút használnak.

A 2a. módszer esetében közvetve, nullajelző segítségével mérik az anyag gőznyomását. E módszer figyelembe veszi azt a tényt, hogy a hőmérsékletváltozás következtében változik a folyadék sűrűsége az U-csőben.

Az alábbi folyadékok alkalmasak az U-csőhöz nullajelzésként való használatra, a vizsgált anyag nyomástartományától és kémiai viselkedésétől függően: szilikon folyadékok, ftalátok. A vizsgált anyagnak nem szabad észrevehetően feloldódnia az U-csőben lévő folyadékban vagy ezzel reakcióba lépnie.

A manométerhez higany használható a normál légnyomástól 10^2 Pa-ig terjedő mérési tartományban, míg szilikonfolyadék és ftalát a 10^2 Pa-tól 10 Pa-ig terjedő tartományban. Fűthető membrán manométerek 10^{-1} Pa alatt is használhatók. Léteznek más nyomásmérők is, amelyek 10^2 Pa alatt használhatók.

1.6.2.2. *Mérési eljárás*

Mérés előtt a 2. ábrán látható készülék valamennyi komponensét alaposan meg kell tisztítani, és meg kell szárítani.

A 2a. módszer esetében meg kell tölteni az U-csövet a választott folyadékkal, amelyet magas hőmérsékleten gázmentesíteni kell az értékek leolvasása előtt.

A vizsgált anyagot a készülékbe helyezik, amit ezután lezárnak, és megfelelő mértékben csökkentik a hőmérsékletet a gáztalanításhoz. A hőmérsékletnek elegendően alacsonynak kell lennie a levegő eltávolításához, de – többkomponensű rendszer esetében – nem szabad megváltoztatnia az anyag összetételét. Szükség esetén keveréssel hozható létre gyorsabban az egyensúly.

A minta túlhűthető például folyékony hidrogénnel (ügyelve a levegő vagy hajtóközeg kondenzációjának elkerülésére), vagy etanol és szárazjég keverékével. Alacsony hőmérsékleten végzett méréshez ultra-kriomathoz csatlakoztatott, szabályozott hőmérsékletű fürdőt kell használni.

Miközben nyitva van a mintatartály fölötti szelep, szívással eltávolítják a levegőt. Ezután lezárják a szelepet, és lecsökkentik a minta hőmérsékletét a kívánt legalacsonyabb szintre. Ha szükséges, többször meg kell ismételni a gáztalanítást.

A minta melegítésekor növekszik a gőznyomás. Ez megváltoztatja a folyadék egyensúlyát az U-csőben. Ennek kiegyenlítésére nitrogént vagy levegőt engednek a készülékbe egy szelepen keresztül mindaddig, amíg a nyomásjelző folyadék nullát nem mutat. Az ehhez szükséges nyomás szobahőmérsékleten precíziós manométerről olvasható le. E nyomás az anyag gőznyomásának felel meg ezen a mérési hőmérsékleten.

A 2b. módszer ehhez hasonló, de a gőznyomást közvetlenül olvassák le.

A gőznyomás hőmérséklettől való függését megfelelően kis intervallumonként (körülbelül 5–10 mérési pont) határozzák meg egészen a kívánt maximumig. Ellenőrzésképpen meg kell ismételni az alacsony hőmérsékleten kapott értékek mérését.

Amennyiben az ismételt mérésekből kapott értékek nem esnek egybe a hőmérséklet növelése során kapott értékkel, ennek a következők valamelyike lehet az oka:

1. A minta még mindig tartalmaz levegőt (például nagy viszkozitású anyagok) vagy alacsony forráspontú anyagokat, amely(ek) a melegítés során szabadul(nak) fel, és további túlhűtést követően szívással eltávolítható(k).

2. Nem elegendően alacsony a hűtési hőmérséklet. Ilyen esetben folyékony nitrogént használnak hűtőközegként.

   Amennyiben az 1. vagy a 2. esetről van szó, meg kell ismételni a méréseket.

3. Az anyag kémiai reakción megy keresztül a vizsgált hőmérséklet-tartományban (például bomlás, polimerizáció).

1.6.3. **Izoteniszkóp**

A módszer teljes leírása a 7. szakirodalomban található. A mérőkészülék működési elve a 3. ábrán látható. Az 1.6.2. pontban leírt statikus módszerhez hasonlóan az izoteniszkóp is megfelelő szilárd anyagok vagy folyadékok vizsgálatához.

Folyadékok esetében maga az anyag szolgál közegként a segédmanométerben. Az izoteniszkópba annyi folyadékot visznek be, amennyi elegendő a gömb és a manométer szakasz rövid ágának megtöltéséhez. Az izoteniszkópot vákuum-rendszerhez csatlakoztatják és evakuálják, majd megtöltik nitrogénnel. A rendszer evakuálását és tisztítását kétszer ismétlik a maradék oxigén eltávolítására. A megtöltött izoteniszkópot vízszintes helyzetbe állítják úgy, hogy a minta vékony rétegben terjedjen szét a mintagömbben és a manométerszakaszban (U-rész). A rendszer nyomását 133 Pa-ra csökkentik, és óvatosan, lassan melegítik a mintát, amíg éppen forrni kezd (oldott, kötött gázok eltávolítása). Az izoteniszkópot ezután úgy helyezik el, hogy a minta visszatérjen a manométer rövid ágába és a gömbbe, úgy, hogy mind a kettő teljesen meg legyen töltve folyadékkal. A nyomást ugyanúgy tartják fenn, mint a gáztalanításkor; a mintagömb megnyújtott csúcsát kis lánggal melegítik, amíg a mintából felszabadult gőz elegendően ki nem tágul a minta egy részének kiszorítására a gömb és a manométer kar felső részéből az izoteniszkóp manométerszakaszába, gőzzel telt, nitrogénmentes teret létrehozva.

Az izoteniszkópot ezután állandó hőmérsékletű fürdőbe helyezik, és úgy állítják be a nitrogén nyomását, hogy az egyenlő legyen a minta nyomásával. A nyomás-egyensúlyt az izoteniszkóp manométerszakasza jelzi. Egyensúlyi állapotban a nitrogén gőznyomása egyenlő az anyag gőznyomásával.

Szilárd anyagok esetében, a nyomás- és hőmérséklettartománytól függően, az 1.6.2.1. pontban felsorolt manométer-folyadékokat használják. A gáztalanított manométer-folyadékot az izoteniszkóp hosszú ágában lévő kiszélesedő részbe öntik. Ezután a gömbbe helyezik a vizsgálni kívánt szilárd anyagot, és magas hőmérsékleten gáztalanítják. Gáztalanítás után megdöntik az izoteniszkópot úgy, hogy a manométer-folyadék az U-csőbe folyhasson. A hőmérséklet függvényében a gőznyomás mérését az 1.6.2. pontnak megfelelően végzik el.

1.6.4. **Effúziós módszer: Gőznyomásmérő mérleg**

1.6.4.1. *Készülék*

Az (1) szakirodalomban megtalálható a készülék különböző típusainak leírása. Az itt leírt készülék az általános működési elvet mutatja be (4. ábra). A 4. ábra a készülék fő részeit mutatja, amelyek a következők: rozsdamentes acélból vagy üvegből készült vákuumtartály, a vákuum létrehozására és mérésére szolgáló berendezés, és a gőznyomás mérlegen történő mérésére szolgáló beépített komponensek. A készülék a következő beépített komponenseket tartalmazza:

– párologtató kemence peremmel és forgó bevezetőcsatlakozással. Az elpárologtató kemence például rézből vagy jó hővezető-képességű, kémiailag ellenálló ötvözetből készült hengeres tartály. Rézfalú üvegedény is használható. A kemence átmérője körülbelül 3–5 cm, magassága 2–5 cm. A gőzáram számára 1–3 különböző méretű nyílást készítettek. A kemencét vagy egy alul elhelyezett fűtőlap, vagy a kívülre szerelt fűtőspirál segítségével fűtik. Annak megakadályozására, hogy a hő az alaplemezhez disszipálódjon, a fűtőkészüléket alacsony hővezető-képességű fémmel (nikkel-ezüst vagy króm-nikkel acéllal) csatlakoztatják az alaplaphoz, ilyen például egy, a forgó bevezetőcsatlakozáshoz csatlakoztatott nikkel-ezüst cső többnyílású kemence esetében. Az elrendezésnek megvan az előnye, hogy lehetővé teszi egy rézrúd bevezetését. E megoldás lehetővé teszi a kívülről, hűtőfürdő segítségével történő hűtést,

– amennyiben a réz kemencefedélnek három különböző átmérőjű nyílása van, és az átmérők egymással 90°-ot zárnak be, a teljes mérési tartományon belül különböző gőznyomás-tartományok mérhetők (körülbelül 0,30 és 4,50 mm átmérő közötti nyílások). A nagy nyílásokat alacsony gőznyomáshoz használják, és fordítva. A kemence forgatásával beállítható a kívánt nyílás vagy egy közbenső állás a gőzáramban (kemencenyílás – védőburok – mérlegserpenyő), és a molekulák áramlása szabaddá válik vagy eltérítésre kerül a kemence nyíláson keresztül a mérlegserpenyőhöz. Az anyag hőmérsékletének mérésére termoelemet vagy ellenálláshőmérőt helyeznek el egy erre alkalmas helyen,

– a védőburok fölött helyezkedik el egy precíziós mikromérleghez tartozó mérlegserpenyő (lásd lejjebb). A mérlegserpenyő körülbelül 30 mm átmérőjű. Ehhez aranybevonatú alumínium az alkalmas anyag,

– a mérlegserpenyőt henger alakú sárgaréz vagy vörösréz hűtőtartály veszi körül. A hűtőtartály a mérleg típusától függően nyílásokat tartalmaz a mérlegrúd számára és egy védőburkolat-nyílást a molekulák áramlásához, továbbá biztosítja a gőz teljes kondenzációját a mérlegserpenyőn. A kifelé történő hődisszipációt például egy, a hűtőtartályhoz csatlakoztatott rézrúd biztosítja. A rudat az alaplemezen vezetik keresztül, és például egy króm-nikkel acélcsővel hőszigetelik. A rudat egy, az alaplemez alatt elhelyezett, folyékony nitrogént tartalmazó Dewar-edénybe merítik, vagy folyékony nitrogént keringtetnek a rúdon át. A hűtőtartályt így körülbelül −120 °C hőmérsékleten tartják. A mérlegserpenyőt kizárólag sugárzással hűtik, és ez megfelelő a vizsgálat alatt álló nyomástartományhoz (a mérés kezdete előtt körülbelül egy órával hűteni kell),

– a mérleg a hűtőtartály fölött helyezkedik el. Alkalmas mérleg például egy nagy érzékenységű, kétkarú elektronikus mikromérleg (8), vagy nagy érzékenységű forgótekercses műszer (lásd az OECD 104. vizsgálati irányelvét 1981.5.12.),

– az alaplemez elektromos csatlakozásokat is tartalmaz termoelemek (vagy ellenállás-hőmérők) és fűtőtekercsek csatlakoztatására,

– a tartályban vákuumot hoznak létre egy részleges vákuumot biztosító szivattyú vagy nagyteljesítményű vákuumszivattyú segítségével (szükséges vákuum körülbelül $1–2 \times 10^{-3}$ Pa, amelyet körülbelül 2 órás szivattyúzás után érnek el). A nyomást alkalmas ionizációs manométerrel szabályozzák.

1.6.4.2. *Mérési eljárás*

A tartályt megtöltik a vizsgált anyaggal, és lezárják a fedelet. A védőburkolatot és a hűtőtartályt keresztülcsúsztatják a kemencén. A készüléket lezárják, és bekapcsolják a vákuumszivattyúkat. A mérések kezdete előtti névleges nyomásnak körülbelül 10^{-4} Pa-nak kell lennie. A hűtőtartály hűtése 10^{-2} Pa-nál kezdődik.

Amikor már elérték a szükséges vákuumot, elkezdik a kalibrációs műveletsorozatot a szükséges legalacsonyabb hőmérsékletnél. Beállítják a megfelelő nyílást a fedélen, a gőzáram keresztülhalad a védőburkolaton, közvetlenül a nyílás fölött, és a lehűtött mérlegserpenyőhöz ütközik. A mérlegserpenyőnek elegendően nagynak kell lennie annak biztosítására, hogy a védőburkolaton keresztülvezetett teljes gőzáram hozzáütközhessen. A gőzáram mozgásmennyisége erőként hat a mérlegserpenyőre, és a molekulák kondenzálódnak annak hideg felületén.

A mozgásmennyiség és az egyidejű kondenzáció jelet hoz létre a regisztráló készüléken. A jelek értékelése kétféle információt biztosít:

1. Az itt leírt készülékben a gőznyomást közvetlenül a mérlegserpenyőre ható mozgásmennyiségből határozzák meg [ehhez nem kell ismerni a molekulasúlyt (2)]. A geometriai tényezőket, ilyenek például a kemencenyílás és a molekula áramlási szöge, figyelembe kell venni a mért értékek értékelésénél.

2. Ezzel egyidejűleg mérhető a kondenzátum tömege, és ebből kiszámítható a párolgási sebesség. A gőznyomás a párolgási sebességből és a molekulatömegből is kiszámítható a Hertz-féle egyenlet (2) segítségével.

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

ahol:

G = párolgási sebesség (kg s^{-1} m^{-2})

M = molekulatömeg (g mol^{-1})

T = hőmérséklet (K)

R = általános moláris gázállandó (J mol^{-1} K^{-1})

p = gőznyomás (Pa)

A szükséges vákuum elérése után elkezdődik a méréssorozat a legalacsonyabb kívánt mérési hőmérsékleten.

További mérések végrehajtásához a hőmérsékletet kis intervallumokban növelik a maximális kívánt hőmérséklet eléréséig. A mintát ezután újra lehűtik, és regisztrálható egy második gőznyomásgörbe. Amennyiben a második mérési sorozat nincs összhangban az első sorozat eredményeivel, lehetséges, hogy az anyag lebomlott a mért hőmérséklet-tartományban.

1.6.5. **Effúziós módszer – tömegveszteséggel**

1.6.5.1. *Készülék*

Az effúziós készülék a következő alapalkatrészekből áll:

– szabályozható hőmérsékletű, légüres tartály, amelyben az effúziós cellákat elhelyezik,

– nagyvákuumszivattyú (például diffúziós szivattyú vagy turbomolekuláris szivattyú) vákuum-manométerrel,

– kondenzedény folyékony nitrogénnel vagy szárazjéggel.

Az 5. ábrán példaként egy elektromosan fűtött, négy, rozsdamentes acél effúziós kamrával ellátott, alumínium vákuumtartály látható. A körülbelül 0,3 mm vastagságú rozsdamentes acél fóliának 0,2–1,0 mm átmérőjű effúziós nyílása van, és menetes fedéllel csatlakozik az effúziós cellához.

1.6.5.2. *Mérési eljárás*

Minden egyes effúziós cellába betöltik a referencia- és vizsgálati anyagokat, a menetes fedéllel rögzítik az átfolyó nyílással ellátott fémfóliát, majd megmérik minden egyes cella tömegét 0,1 mg-n belüli pontossággal. A kamrát elhelyezik a szabályozott hőmérsékletű készülékbe, amelyet ezután evakuálnak a várt nyomás egytizedénél kisebb nyomásig. 5-től 30 óráig terjedő meghatározott időközönként levegőt engednek be a készülékbe, és a tömege újbóli megmérésével meghatározzák az effúziós kamra tömegveszteségét.

Meghatározott időközönként újra megmérik a kamra tömegét, annak érdekében, hogy az eredményeket ne befolyásolják az illékony szennyeződések, legalább két ilyen időintervallumban ellenőrizve, hogy állandó-e a párolgási sebesség.

Az effúziós cellában a p gőznyomást a következő összefüggés adja meg:

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

ahol:

p = gőznyomás (Pa)

m = a cellát t idő alatt elhagyó anyag tömege (kg)

t = idő (s)

A = a furat területe (m^2)

K = korrekciós tényező

R = általános gázállandó (J mol^{-1} K^{-1})

T = hőmérséklet (K)

M = molekulatömeg (kg mol^{-1})

A K korrekciós tényező a hengeres átfolyó nyíláshosszúságától és a sugár arányától függ:

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

A fenti egyenlet átírható:

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

ahol $E = \frac{1}{KA}\sqrt{2\,\pi\,R}$ az effúziós cellaállandó.

Ez az E effúziós cellaállandó referenciaanyagokkal (2,9) határozható meg a következő egyenlet segítségével:

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

ahol

p(r) = a referenciaanyag gőznyomása (Pa)

M(r) = a referenciaanyag molekulatömege ($kg.mol^{-1}$)

1.6.6. **Gázszaturációs módszer**

1.6.6.1. *Készülék*

A vizsgálat végrehajtásához használt jellegzetes készülék a 6a. ábrán bemutatott és az alábbiakban leírt komponensből áll (1).

Inert gáz:

A vivőgáznak nem szabad kémiai reakcióba lépnie a vizsgált anyaggal. Erre a célra rendszerint megfelelő a nitrogén, de esetenként más gázokra lehet szükség (10). A használt gáznak száraznak kell lennie (lásd a 6a. ábrán a 4. tételt: a relatívpáratartalom-érzékelőt).

Áramlásszabályozás:

Alkalmas gázszabályozó rendszer szükséges egy telítő oszlopon keresztül az állandó és kiválasztott áramlás biztosítására.

Kondenzedények gőz lecsapódásához:

Ezek az adott minta jellemzőitől és a kiválasztott analitikai módszertől függnek. A párát kvantitatív módon és olyan formában kell leválasztani, amely lehetővé teszi az ezt követő elemzést. Néhány vizsgálati anyag esetében folyadékokat, például hexánt vagy etilénglikolt tartalmazó kondenzedények megfelelőek. Mások esetében szilárd abszorbensek lehetnek alkalmasak.

A gőzelválasztás és az ezt követő elemzés alternatívájaként „in-train" analitikai módszerek, például a kromatográfia használható ismert mennyiségű vivőgáz által szállított anyag mennyiségének kvantitatív meghatározására. Ezenkívül mérhető a minta tömegvesztesége is.

Hőcserélő:

A különböző hőmérsékleteken végrehajtott mérésekhez szükség lehet hőcserélő beépítésére a berendezésbe.

Szaturátoroszlop:

A vizsgálati anyag oldatát valamilyen alkalmas inert hordozóanyaghoz adagolják. Az átitatott hordozóanyagot a szaturátoroszlopba helyezik, amely méreteinek és átfolyási sebességének olyannak kell lennie, hogy biztosítva legyen a vivőgáz teljes szaturációja. A szaturátoroszlopnak szabályozott hőmérsékletűnek kell lennie. Szobahőmérséklet feletti mérésekhez a szaturátoroszlop és a kondenzedények közötti területet fűteni kell a vizsgált anyag kondenzációjának megakadályozására.

A diffúzióval létrejövő tömegtranszport csökkentésére kapilláris helyezhető el a szaturátoroszlop után (6b. ábra).

1.6.6.2. *Mérési eljárás*

A szaturátoroszlop előkészítése:

A vizsgált anyagnak erősen illékony oldószerben lévő oldatát megfelelő hordozóanyag-mennyiséghez adják hozzá. Elegendő vizsgált anyagot kell hozzáadni, hogy a vizsgálat során fennmaradjon a szaturáció. Az oldószert levegőben vagy forgó párologtatóban teljes mértékben elpárologtatják, és az alaposan megkevert anyagot hozzáadják a szaturátoroszlophoz. A minta hőmérsékletének szabályozása után száraz nitrogént vezetnek át a készüléken.

Mérés:

A kondenzedényeket vagy az „in-train" érzékelőt az oszlop kifolyó vezetékéhez csatlakoztatják, és feljegyzik ennek időpontját. A kísérlet kezdetén és a kísérlet során az áramlási sebességet gázbuborékos áramlásmérő segítségével (vagy folyamatosan egy tömegáramlás-mérővel) rendszeres időközönként ellenőrzik.

A szaturátoroszlop kilépő nyílásánál mérni kell a nyomást. Ez megtehető vagy:

a) a nyomásmérő beépítésével a szaturátoroszlop és a kondenzedények közé (ez elégtelen is lehet, mivel megnöveli a holtteret és az adszorpciós felületet); vagy

b) egy külön kísérletben az adott, alkalmazott leválasztórendszeren keresztül a nyomásesések meghatározásával az átfolyási sebesség függvényében, (ez elégtelen is lehet folyadékleválasztókhoz).

A különböző analitikai módszerekhez szükséges vizsgált anyagmennyiség összegyűjtéséhez szükséges időt előzetes mérésekkel vagy becslésekkel határozzák meg. Az anyagnak további elemzéshez történő összegyűjtése alternatívájaként folyamatos („in-train") kvantitatív analitikai módszer használható (például kromatográfia). Valamely adott hőmérséklet melletti gőznyomás kiszámítása előtt előzetes méréseket kell végrehajtani annak a maximális áramlási sebességnek a meghatározására, amely teljesen telíteni fogja a vivőgázt a vizsgált anyag gőzével. Ez biztosítva van, ha elegendően lassan vezetik keresztül a vivőgázt a szaturátoron úgy, hogy egy kisebb áramlási sebesség ne adjon nagyobb számított gőznyomást.

Az adott esetben alkalmazandó analitikai módszert (ilyen például a gázkromatográfia vagy a gravimetria) a vizsgált anyag természete határozza meg.

Az ismert térfogatú vivőgáz által szállított anyagmennyiség meghatározott.

1.6.6.3. *A gőznyomás kiszámítása*

A gőznyomást a W/V gőzsűrűségből számítják ki a következő egyenlettel:

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

ahol:

p = gőznyomás (Pa)

W = az elpárolgott vizsgált anyag tömege (g)

V = szaturált gáz térfogata (m^3)

R = általános moláris gázállandó (J mol^{-1} K^{-1})

T = hőmérséklet (K)

M = vizsgált anyag molekulatömege (g mol^{-1})

A mért térfogatokat helyesbíteni kell az áramlásmérő és a szabályozott hőmérsékletű szaturátor közötti nyomás- és hőmérsékletkülönbségek figyelembevételével. Amennyiben az áramlásmérő a kondenzedény utáni szakaszban van, helyesbítések szükségesek a kondenzedényben lévő minden elpárolgott alkotó anyag figyelembevételével (1).

1.6.7. **Forgó rotor (8, 11, 13)**

1.6.7.1. *Készülék*

A forgó rotoros módszer a 8. ábrán bemutatott forgó rotoros viszkozitásmérő segítségével hajtható végre. A 7. ábrán látható a kísérleti berendezés vázlatos rajza.

A mérőkészülék általában egy szabályozott hőmérsékletű (0,1 °C-n belül szabályozott) tartályba helyezett forgó rotoros mérőfejből áll. A mintatartályt egy szabályozott hőmérsékletű (0,01 °C-on belül szabályozott) tartályba helyezik, és a berendezés minden további részét magasabb hőmérsékleten tartják a kondenzáció megakadályozására. A rendszerhez vákuumcsövek segítségével nagyvákuumszivattyút csatlakoztatnak.

A forgó rotoros mérőfej egy csőben elhelyezett (4–5 mm átmérőjű) acélgolyóból áll. A golyót mágneses térben függesztik fel és stabilizálják, általában állandó mágnesek és vezérlőtekercsek segítségével.

A golyót a tekercsek által létrehozott forgómágneses térrel pörgetik. A golyónak a mindig jelen lévő alacsony oldalirányú mágnesessége mérésére szolgáló felvevőtekercsek lehetővé teszik a golyó pörgési sebességének a mérését.

1.6.7.2. *Mérési eljárás*

Amikor a golyó már elért egy adott v(o) fordulatszámot (rendszerint körülbelül 400 fordulat/másodperc), a további energiaátadás megáll, és a gázok okozta súrlódás miatt lassulás jön létre.

A fordulatszám-csökkenést az idő függvényében mérik. Mivel a mágneses felfüggesztés okozta súrlódás elhanyagolható a gázok okozta súrlódással összehasonlítva, a p gáznyomást a következő egyenlet adja meg:

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

ahol:

$\bar{c}$ = a gázmolekulák átlagos sebessége

r = a golyó sugara

ρ = a golyó tömegsűrűsége

σ = a tangenciális impulzusátvitel együtthatója (ε = 1, ha a golyó ideális gömbfelületű)

t = idő

v(t) = fordulatszám t idő után

v(o) = kezdeti fordulatszám

Ez az egyenlet a következőképpen is írható:

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

ahol t_n, t_{n-1} adott N-számú fordulathoz szükséges idő. Ezek a t_n és t_{n-1} időintervallumok egymás után következnek, és $t_n > t_{n-1}$.

A gázmolekula átlagos c sebességét az alábbi egyenlet adja meg:

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

ahol:

T = hőmérséklet

R = általános moláris gázállandó

M = molekulatömeg

2. **ADATOK**

Az előző módszerek bármelyikéből kapott gőznyomást legalább két hőmérsékleten kell meghatározni. 0 és 50 °C közötti tartományban kedvezőbb, ha három vagy több mérést végeznek a gőznyomásgörbe linearitásának ellenőrzésére.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az alkalmazott módszert,

– az anyag pontos leírását (azonosság és szennyeződések), és amennyiben vannak ilyenek, az előzetes tisztítási fok pontos ismertetését,

– legalább két gőznyomás- és hőmérsékletértéket, lehetőleg 0 és 50 °C közötti tartományban,

– valamennyi alapadatot,

– 1/T függvényében ábrázolt log p görbét,

– a gőznyomás becsült értékét 20 vagy 25 °C-on.

Amennyiben változás (állapotváltozás, bomlás) figyelhető meg, fel kell jegyezni a következő információkat:

– a változás jellege,

– az a hőmérséklet, amelynél a változás légköri nyomáson bekövetkezik,

– gőznyomás az átmeneti hőmérséklet alatt 10 és 20 °C-kal és efelett 10 és 20 °-kal (kivéve, ha szilárdból gázra történt a halmazállapot-változás).

A jelentésben szerepelnie kell az eredmények értelmezéséhez lényeges valamennyi információnak és megjegyzésnek, különösen azoknak, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 104. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges

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

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

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

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

(6) NF T 20-047 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – 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 and W. Jitschin. J. Vas. Sci. Technol.(A), 1987, 5(4) kötet, 2440.oldal

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

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

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

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

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

1. függelék

Becslési módszer

BEVEZETÉS

A gőznyomás számított értékei a következőkhöz használhatók:

– annak eldöntésére, hogy melyik a megfelelő kísérleti módszer,

– becslés vagy határérték biztosítására olyan esetben, ahol a kísérleti módszer nem alkalmazható technikai okok miatt (azt az esetet is beleértve, ahol nagyon alacsony a gőznyomás),

– az olyan esetek meghatározására, ahol indokolt a kísérleti mérés elhagyása, mert környezeti hőmérsékleten a gőznyomás valószínűleg < 10^{-5} Pa.

BECSLÉSI MÓDSZER

Folyadékok és szilárd anyagok gőznyomása a módosított Watson-korreláció (a) segítségével becsülhető meg. Az egyetlen kísérleti adat, amelyre szükség van, a normál forráspont. A módszer 10^{5} Pa-tól 10^{-5} Pa-ig terjedő tartományban alkalmazható.

A módszerre vonatkozó részletes információkat a „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (b) című kiadvány ismerteti.

SZÁMÍTÁSI ELJÁRÁS

A b)-nek megfelelően a következőképpen számítják a gőznyomást:

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

ahol:

T = az adott hőmérséklet

T_b = normál forráspont

P_{vp} = gőznyomás T hőmérsékleten

ΔH_{vb} = párolgáshő

ΔZ_b = kompresszibilitási tényező (becslés szerint 0,97)

m = az adott hőmérsékleten a fizikai állapottól függő empirikus tényező

Ezenkívül

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

ahol K_F az anyag polaritását figyelembe vevő empirikus tényező. A (b) szakirodalom néhány vegyülettípushoz felsorolja a hozzá tartozó K_F tényezőt.

Nagyon gyakran előfordulhat, hogy valamilyen csökkentett nyomáshoz tartozó forráspont van megadva. Ilyen esetben, a (b) szakirodalomnak megfelelően, a gőznyomás a következőképpen számítható ki:

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

ahol T_1 a forráspont a P_1 csökkentett nyomáson.

JELENTÉS

A becslési módszer használatakor a jelentésnek tartalmaznia kell a számítás részletes dokumentálását.

SZAKIRODALOM

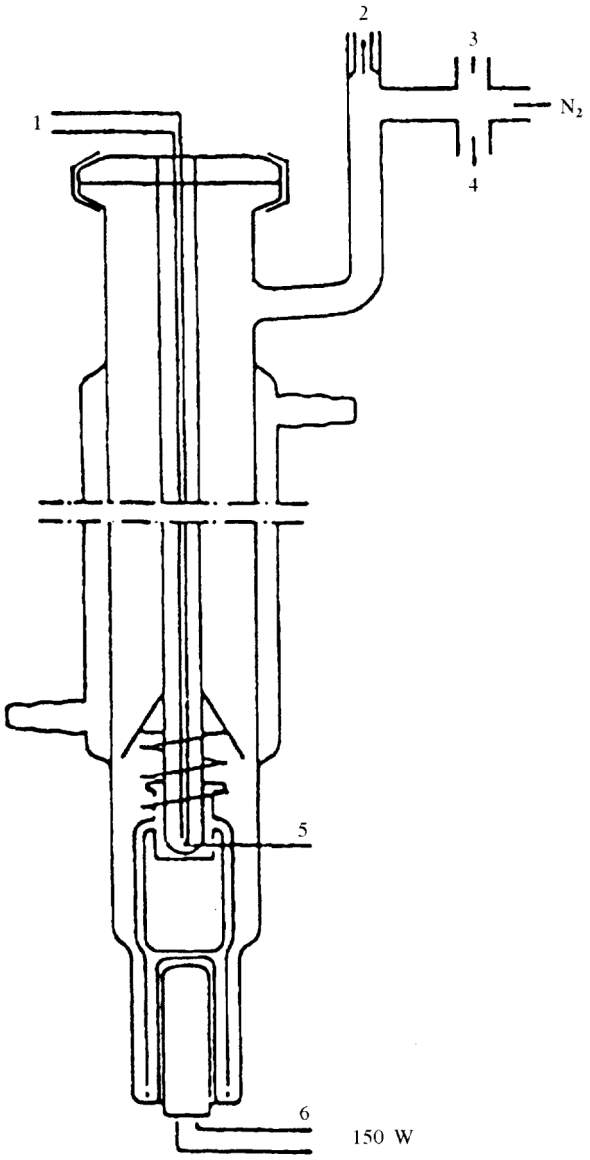
(a) K.M. Watson, Ind. Eng. Chem; 1943, vol. 35, 398.

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

2. függelék

1. ábra

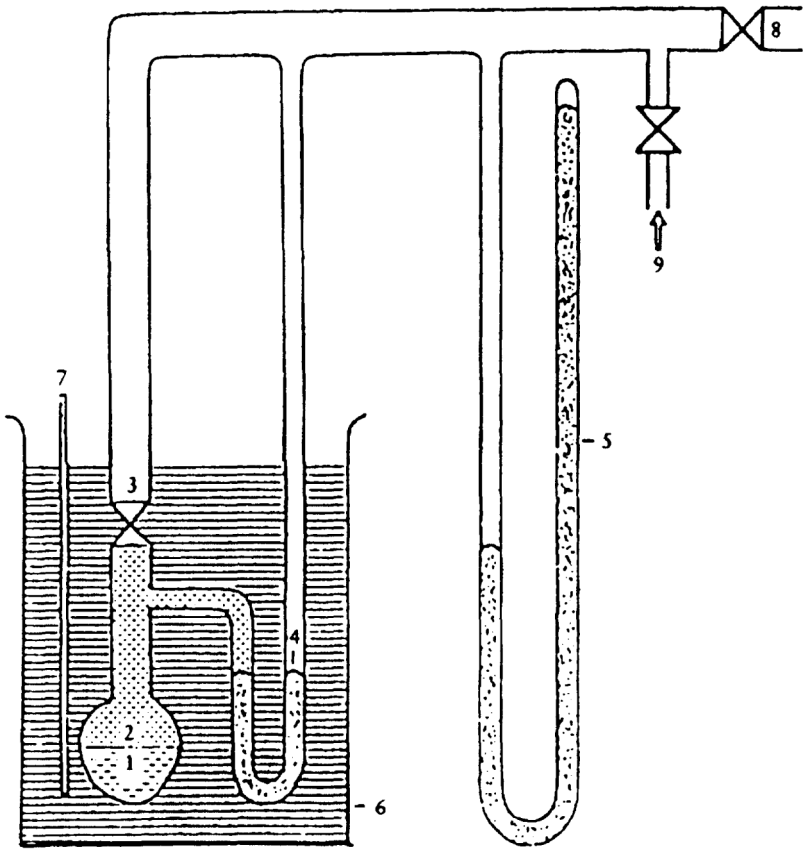
Készülék a gőznyomás görbe meghatározására a dinamikus módszer szerint



1 = Termoelem
2 = Vákuumkiegyenlítő térfogat
3 = Nyomásmérő
4 = Vákuum
5 = Mérési pont
6 = Fűtőelem, körülbelül 150 W

2a. ábra

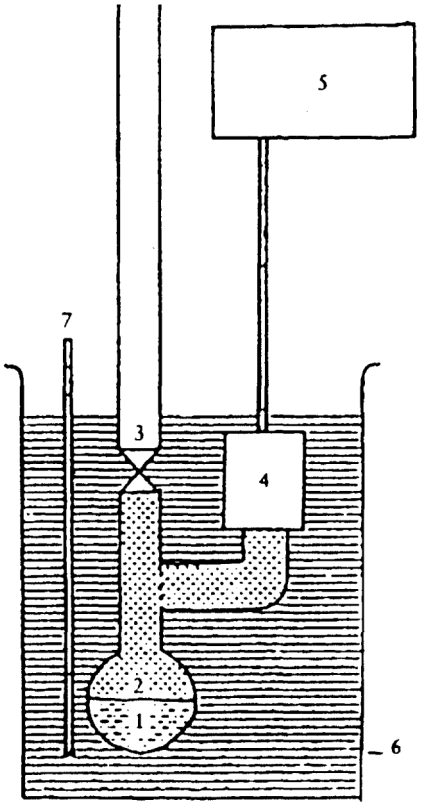
Készülék gőznyomásgörbe meghatározására a statikus módszer szerint (U-csöves manométer segítségével)



1. Vizsgált anyag
2. Gőzfázis
3. Vákuumcső
4. U-cső (segédmanométer)
5. Manométer
6. Hőmérsékletfürdő
7. Hőmérsékletmérő eszköz
8. Vákuum szivattyúhoz
9. Szellőztetés

2b. ábra

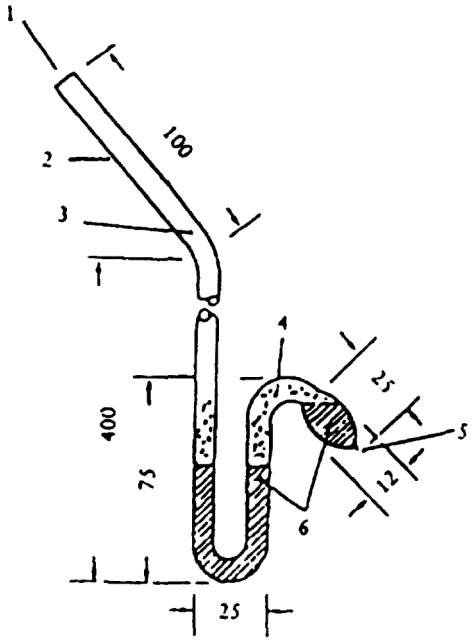
Készülék gőznyomásgörbe meghatározására statikus módszer szerint (nyomásjelző műszer segítségével)



1. Vizsgált anyag
2. Gőzfázis
3. Vákuumcső
4. Nyomásmérő
5. Nyomásjelző műszer
6. Hőmérsékletfürdő
7. Hőmérsékletmérő eszköz

3. ábra

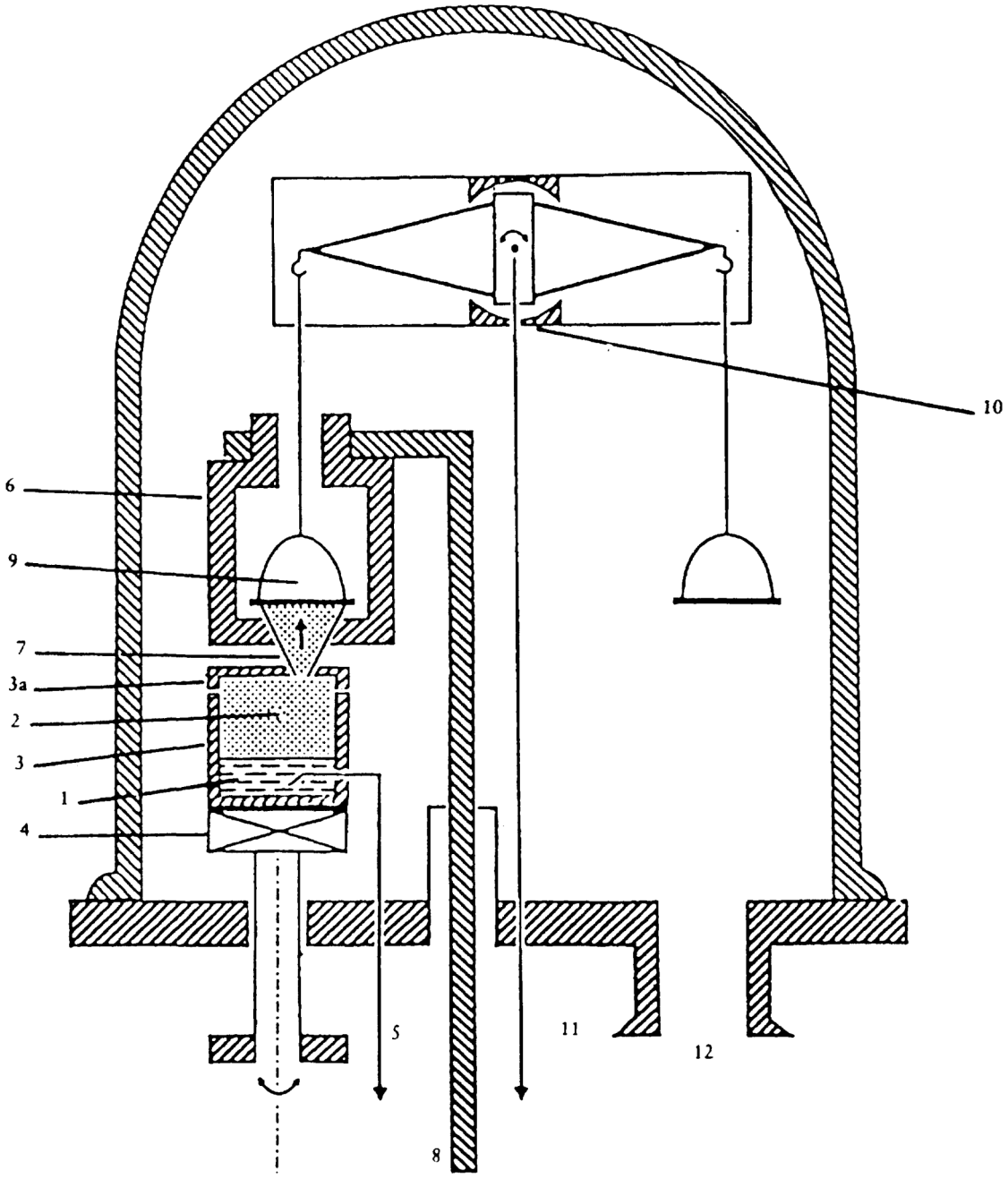
Izoteniszkóp (lásd a 7. felhasznált irodalmat)



1. A nyomásszabályozó- és mérőrendszerhez
2. 8 mm-es külső átmérőjű cső
3. Száraz nitrogén a nyomástartó rendszerben
4. Gőzminta
5. Kis csővég
6. Folyadékminta

4. ábra

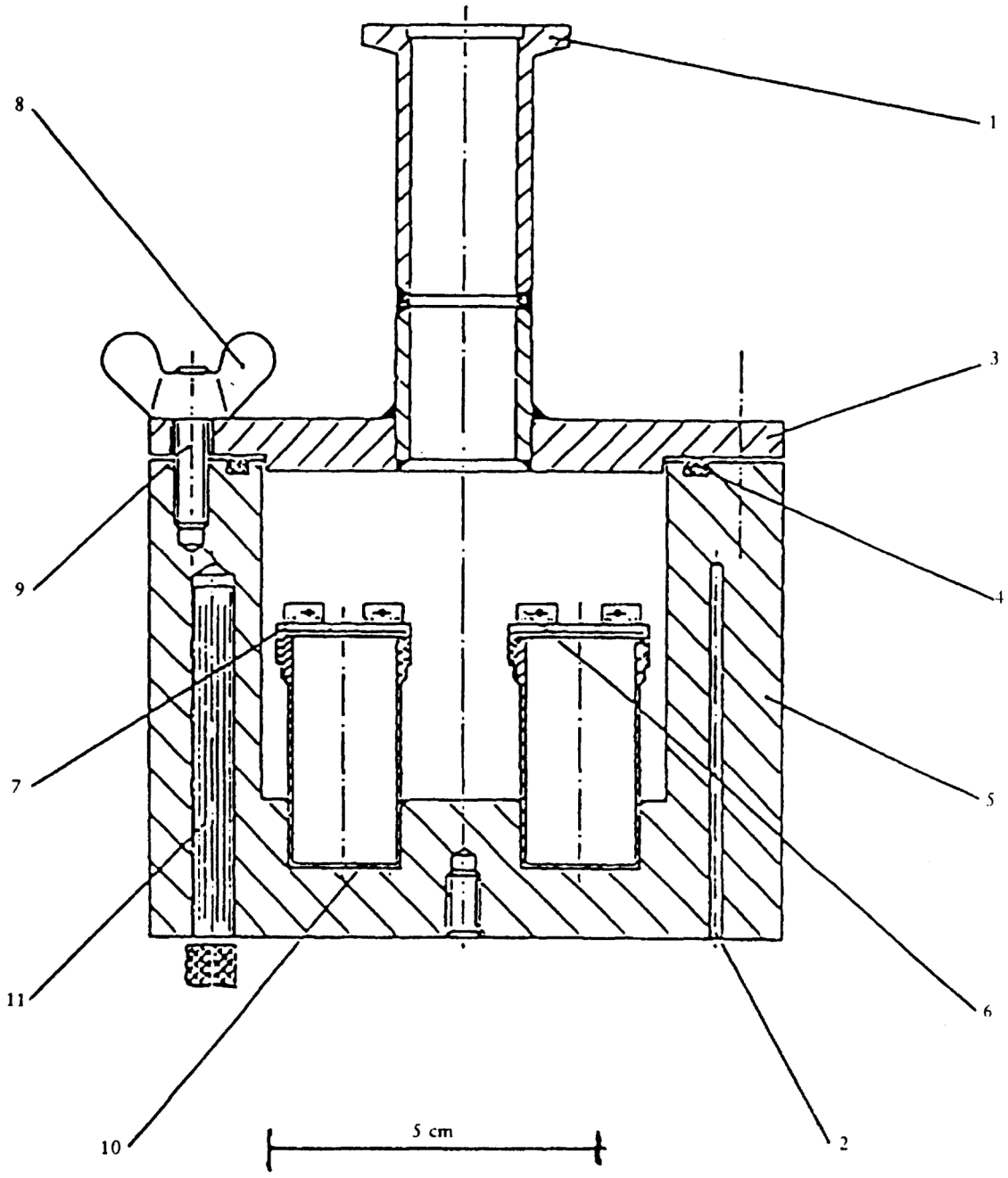
Készülék a gőznyomásgörbe meghatározására a gőznyomásmérő mérleg módszer szerint



1. Vizsgált anyag
2. Gőzfázis gőzáramlással
3. Párologtató kemence forgó bevezető-csőcsatlakozással
3a. Kemencefedél nyílással
4. Kemencefűtés (hűtés)
5. A minta hőmérsékletének mérése
6. Hűtőkamra
7. Védőburkolat
8. Hűtőrúd a hűtőkamrához
9. Mérlegserpenyő
10. Mikromérleg
11. A regisztráló készülékhez
12. A nagyvákuum-szivattyúhoz

5. ábra

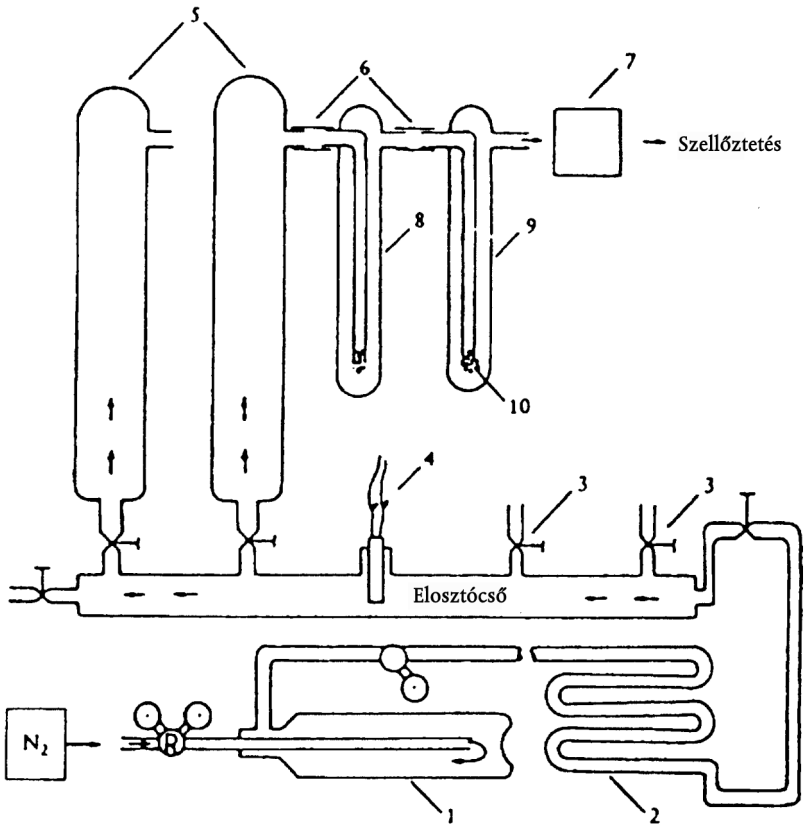
Példa alacsony nyomáson, effúziós módszerrel végrehajtott párologtatásra szolgáló készülékre, 8 cm^3-es effúziós cellatérfogattal



1. Összeköttetés a vákuummal
2. Furat platina ellenállás-hőmérőhöz vagy hőmérsékletméréshez és szabályozáshoz (2)
3. Vákuumtartály fedele
4. O-gyűrű
5. Alumínium vákuumtartály
6. Effúziós cellák behelyezésére és eltávolítására szolgáló eszköz
7. Menetes fedél
8. Szárnyas anyák (6)
9. Csavarok (6)
10. Rozsdamentes acél effúziós cellák
11. Fűtőpatronok (6)

6a. ábra

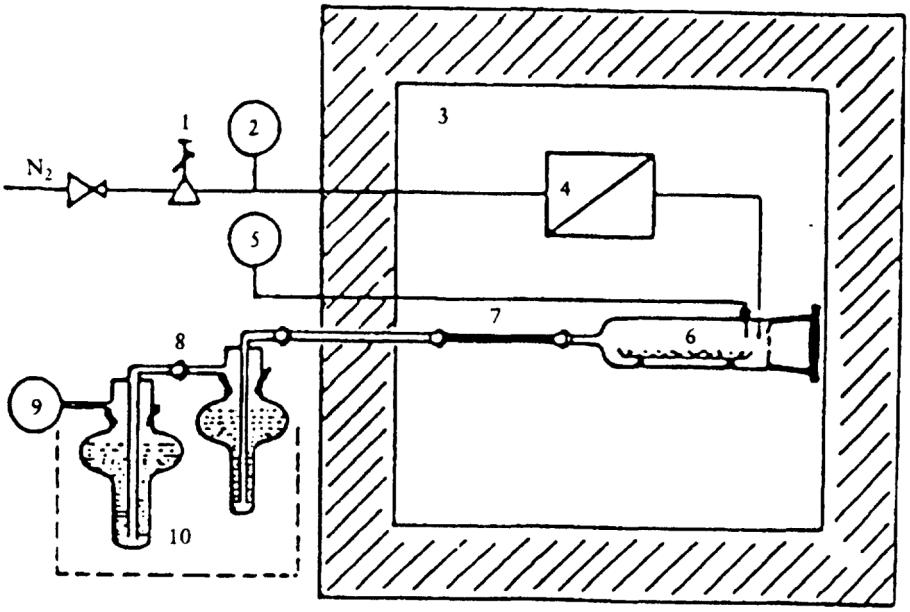
Példa a gázszaturációs módszerrel a gőznyomás meghatározására szolgáló áramlási rendszerre



1 = Áramlásszabályozó
2 = Hőcserélő
3 = Tűszelepek
4 = Relatív páratartalom-érzékelő
5 = Szaturáló oszlopok
6 = PTFE-csatlakozás
7 = Áramlásmérő
8 = Kondenzedény (abszorber)
9 = Olajcsapda
10 = Fritt buborékoltató

6b. ábra

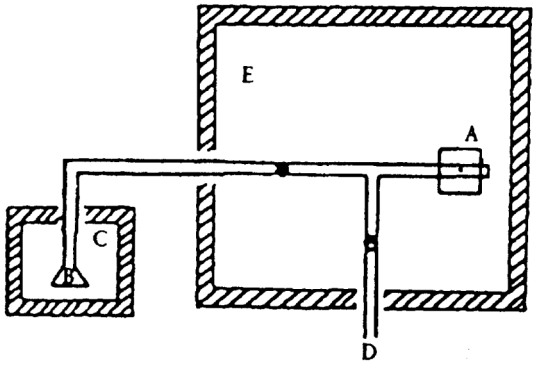
Példa a gázszaturációs módszerrel a gőznyomás meghatározására szolgáló rendszerre, amelynél egy kapillárist helyeztek el a szaturációs kamra után



1. Termikus tömegáramlás-mérő
2. Manométer
3. Szabályozott hőmérsékletű kamra
4. Vivőgáz hőfokszabályozó tekercse
5. Hőmérő (Pt 100)
6. Gázszaturációs kamra
7. Kapilláris
8. Abszorpciós tartályok
9. Gázmennyiség mérő
10. Hideg kondenzedény

7. ábra

Példa a forgó rotoros módszerhez használt kísérleti berendezésre

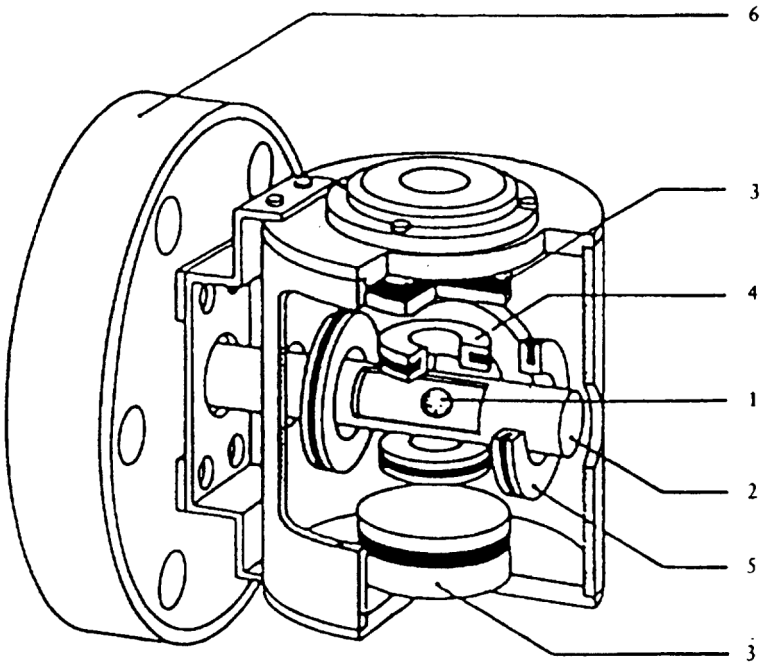


Gőznyomást mérő készülék

A. forgó rotor érzékelőfej;
B. mintacella;
C. termosztát;
D. vákuumvezeték (turbó szivattyú);
E. levegőtermosztát.

8. ábra

Példa forgó rotor érzékelőfejre



1. Golyó;
2. A 6-os komponens evakuált csöves toldata;
3. Állandó mágnesek (2);
4. Tekercsek (2) függőleges stabilizáláshoz;
5. Hajtótekercsek (4);
6. Csatlakozó perem.

A.5. FELÜLETI FESZÜLTSÉG

1. **MÓDSZER**

Az itt leírt módszerek az OECD vizsgálati irányelvén (1) alapulnak. Az alapelveket a (2) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

A leírt módszerek vizes oldatok felületi feszültségének méréséhez alkalmazhatók.

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag vízben oldhatóságáról, szerkezetéről, hidrolízáló tulajdonságairól és a micellák képződése szempontjából kritikus koncentrációjáról.

A következő módszerek a legtöbb vegyi anyaghoz alkalmazhatók, tisztasági fokuktól függetlenül mindenfajta korlátozás nélkül.

A gyűrűs felületifeszültség-mérő módszerrel végrehajtott felületifeszültség-mérés körülbelül 200 mPa s-nél kisebb, dinamikus viszkozitású vizes oldatokra korlátozódik.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az egységnyi területre vonatkoztatott szabad felületi entalpiát felületi feszültségnek nevezzük.

A felületi feszültséget a következőképpen adják meg:

N/m (SI mértékegység); vagy

mN/m (SI almértékegység);

1 N/m = 10^3 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm az elavult CGS-rendszerben

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

Az 1. és 3. szakirodalom a felületi feszültségek széles tartományát felölelő referenciaanyagokat ismertet.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A módszerek annak a maximális erőnek a mérésén alapulnak, amelyet függőlegesen kell kifejteni egy mérőcsészébe elhelyezett vizsgálandó folyadék felületével érintkező mérőkengyelre vagy gyűrűre, annak e felülettől történő elválasztása érdekében, vagy egy lemezre, amelynek egyik széle érintkezik a felülettel, a kialakult film kiemelése érdekében.

Azokat az anyagokat, amelyek legalább 1 mg/l koncentrációban oldhatók vízben, vizes oldatban vizsgálják egyetlen koncentráció mellett.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

E módszerek nagyobb pontosságra képesek, mint amelyre a környezeti értékeléshez valószínűleg szükség van.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Elkészítik az anyag oldatát desztillált vízben. Az oldat koncentrációjának az anyag telített vizes oldatához tartozó koncentrációérték 90 %-ának kell lennie; ha ez a koncentráció meghaladja az 1 g/l értéket, 1 g/l koncentrációt használnak vizsgálathoz. Nem kell megvizsgálni azokat az anyagokat, amelyek oldhatósága a vízben 1 mg/l-nél kisebb.

1.6.1. **Lemezes módszer**

Lásd az ISO 304 és NF T 73-060 szabványokat (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Kengyeles módszer**

Lásd az ISO 304 és NF T 73-060 szabványokat (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Gyűrűs módszer**

Lásd az ISO 304 és NF T 73-060 szabványokat (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **Az OECD által harmonizált gyűrűs módszer**

1.6.4.1. *Készülék*

E méréshez megfelelőek a kereskedelemben kapható felületifeszültség-mérők. Ezek a következő részekből állnak:

– mobil mintaasztal,

– erőmérőrendszer,

– mérőtest (gyűrű),

– mérőtartály.

1.6.4.1.1. Mobil mintaasztal

A mobil mintaasztalt a vizsgálandó folyadékot tartalmazó, szabályozott hőmérsékletű mérőtartály tartójaként használják. Az erőmérőrendszerrel együtt egy talpazatra kell felszerelni.

1.6.4.1.2. Erőmérőrendszer

Az erőmérőrendszer (lásd az ábrát) a mintaasztal fölött helyezkedik el. Az erőmérés hibájának nem szabad ± 10^{-6} N-nál nagyobbnak lennie, a tömegmérés ± 0,1 mg hibahatárának megfelelően. A kereskedelemben kapható felületifeszültség-mérő mérőskálája legtöbbször mN/m-ben lett kalibrálva azért, hogy a felületi feszültség közvetlenül mN/m-ben legyen leolvasható 0,1 mN/m pontossággal.

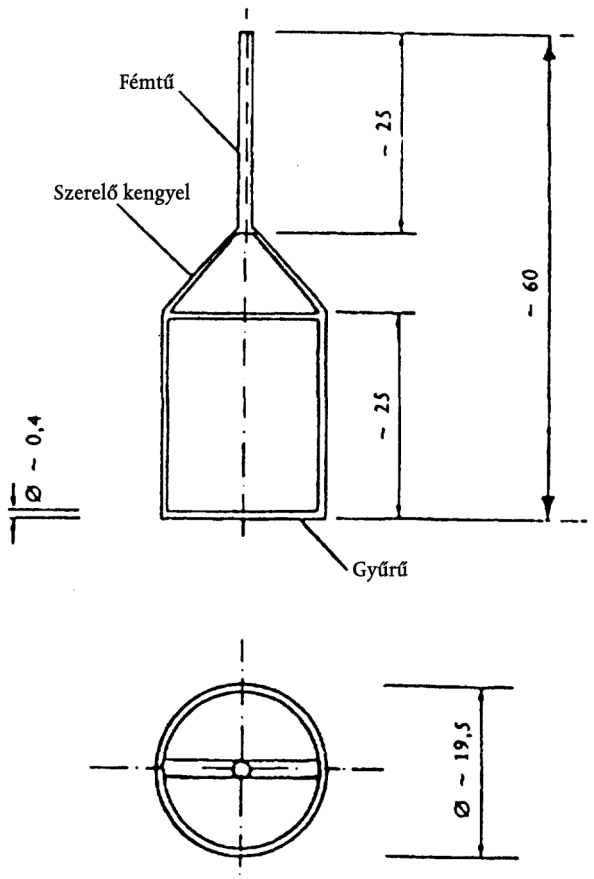
1.6.4.1.3. Mérőtest (gyűrű)

A gyűrű rendszerint körülbelül 0,4 mm vastagságú és 60 mm átlagos átmérőjű, platina-irídium huzalból készül. A huzalgyűrűt vízszintesen függesztik le egy fémtűről és egy huzal-szerelőkengyelről az erőmérőrendszerhez történő csatlakozás létrehozása érdekében (lásd az ábrát).

Ábra

Mérőtest

(Minden méret mm-ben van megadva)



1.6.4.1.4. Mérőtartály

A vizsgált oldatot tartalmazó mérőtartálynak szabályozott hőmérsékletű üvegtartálynak kell lennie. Úgy kell tervezni, hogy a mérés során a vizsgálandó oldat folyadékfázisának és a felszín feletti gázfázisnak a hőmérséklete állandó maradjon, és a minta ne párologhasson el. 45 mm-nél nem kisebb belső átmérőjű hengeres üvegtartályok elfogadhatók.

1.6.4.2. *A készülék előkészítése*

1.6.4.2.1. Tisztítás

Az üvegtartályokat gondosan meg kell tisztítani. Amennyiben szükséges, azokat forró króm-kénsavval és ezt követően tömény (83–98 tömegszázalékos H_3PO_4) foszforsavval kell mosni, alaposan le kell öblíteni csapvízben, és végül kétszer desztillált vízben kell mosni mindaddig, amíg semleges nem lesz, majd meg kell szárítani, és ki kell öblíteni a vizsgált folyadék egy részével.

A gyűrűt először minden vízben oldható anyag eltávolítása érdekében alaposan le kell öblíteni vízben, rövid időre be kell meríteni króm-kénsavba, le kell mosni kétszer desztillált vízzel, amíg semleges nem lesz, és végül rövid ideig melegíteni kell metanol láng fölött.

Megjegyzés:

Az olyan anyagokkal történő szennyezést, amelyek a króm-kénsavban vagy a foszforsavban nem oldódnak fel vagy nem bomlanak el – ilyenek például a szilikonok – alkalmas szerves oldószer segítségével kell eltávolítani.

1.6.4.2.2. A készülék kalibrálása

A készülék hitelesítése a nullapont ellenőrzéséből és ennek beállításából áll úgy, hogy a műszer jelzése mindig megbízható legyen mN/m-ben.

Összeszerelés:

A készüléket vízszintbe kell állítani, például a felületifeszültség-mérő alaptestére elhelyezett vízszintező segítségével, az alaplapon elhelyezett vízszintező csavarok állításával.

A nullapont beállítása:

A gyűrűnek a készülékre történő felszerelése után és a folyadékba bemerítés előtt a felületifeszültség-mérő által jelzett értéket nullára kell állítani, és ellenőrizni kell, hogy a gyűrű párhuzamos-e a folyadék felülettel. Ehhez a folyadékfelszín tükörként használható.

Kalibráció:

A tényleges vizsgálati kalibrálás a következő két eljárás valamelyikének a segítségével hajtható végre:

a) Egy tömeg segítségével: ehhez az eljáráshoz 0,1 és 1,0 gramm közötti, ismert tömegű súlyokat helyeznek a gyűrűre. Ezt a Φ_a kalibrálási tényezőt, amellyel minden, a műszer által megadott értéket meg kell szorozni, a következő egyenletnek (1) megfelelően kell meghatározni:

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

ahol:

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

m = a súly tömege (g)

g = gravitációs gyorsulás (981 cm s^{-2} tengerszinten)

b = a gyűrű átlagos kerülete (cm)

σ_a = a felületifeszültség-mérő által mutatott érték a gyűrűn a súly elhelyezése után (mN/m).

b) Víz segítségével: az eljárásnál tiszta vizet használnak, amelynek a felületi feszültsége, például 23 °C hőmérsékleten 72,3 mN/m. Az eljárás gyorsabb a súllyal történő kalibrációnál, de mindig fennáll az a veszély, hogy a víz felületi feszültségét meghamisítják a felületaktív anyagokkal történő szennyeződési nyomok.

A Φ_b kalibrálási tényezőt, amellyel a műszer által mutatott minden értéket meg kell szorozni, a következő egyenletnek (2) megfelelően kell meghatározni:

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

ahol:

σ_o = a szakirodalomban a víz felületi feszültségére megadott érték (mN/m)

σ_g = a víz felületi feszültségének mért értéke (mN/m)

mindkettő ugyanazon a hőmérsékleten.

1.6.4.3. *Minták előkészítése*

A vizsgált anyagokból vizes oldatot kell készíteni a szükséges koncentrációk használatával, és ezeknek nem szabad tartalmazniuk nem oldott anyagot.

Az oldatot állandó hőmérsékleten (± 0,5 °C) kell tartani. Mivel a mérőtartályban lévő oldat felületi feszültsége változik idővel, több mérést kell végrehajtani különböző időpontokban, és fel kell rajzolni egy görbét, amely a felületi feszültséget mutatja az idő függvényében. Amennyiben további változás nem jön létre, beáll az egyensúlyi állapot.

A mérést zavarják más anyagok por és gáznemű szennyeződései. Ezért a munkát védőburkolat alatt kell végrehajtani.

1.6.5. **Vizsgálati körülmények**

A mérést körülbelül 20 °C hőmérsékleten kell végrehajtani, és a hőmérsékletet ± 0,5 °C-on belül kell szabályozni.

1.6.6. **A vizsgálat végrehajtása**

A mérendő oldatokat be kell vinni a gondosan megtisztított mérőtartályba, ügyelve a habosodás elkerülésére, és ezután a mérőtartályt rá kell helyezni a vizsgálókészülék asztalára. Az asztallapot a mérőtartállyal együtt meg kell emelni, amíg a gyűrű bele nem merül az oldatba. Ezután az asztallapot fokozatosan és egyenletesen süllyeszteni kell (körülbelül 0,5 cm/perc sebességgel) a gyűrűnek a felülettől történő elválasztása érdekében, egészen a maximális erő eléréséig. A gyűrűhöz tapadt folyadékrétegnek nem szabad leválnia a gyűrűről. A mérések elvégzése után a gyűrűt újra az oldatba kell meríteni, és a mérést meg kell ismételni, amíg a kapott felületi feszültség értéke állandó nem lesz. Az oldatnak a mérőtartályba helyezéséig eltelt időt fel kell jegyezni minden egyes meghatározáshoz. Az értékek leolvasását annál a maximális erőnél kell végrehajtani, amely ahhoz szükséges, hogy elválassza a gyűrűt a folyadékfelülettől.

2. **ADATOK**

A felületi feszültség kiszámításához a készüléken mN/m-ben leolvasott értéket először meg kell szorozni (az alkalmazott kalibrálási eljárástól függően) Φ_a vagy Φ_b kalibrálási tényezővel. Az így kapott érték csak közelítőleg érvényes, és ezért helyesbíteni kell.

Harkins és Jordan (4) kísérletileg helyesbítési tényezőket határoztak meg a gyűrű méreteitől, a folyadék sűrűségétől és ennek felületi feszültségétől függő gyűrűs módszer által mért felületifeszültség-értékekhez.

Mivel munkaigényes feladat a Harkins- és Jordan-táblázatokból minden egyes méréshez a helyesbítési tényező meghatározása, vizes oldatok felületi feszültségének kiszámításához használható az egyszerűsített eljárás, nevezetesen a helyesbített felületifeszültség-értékek közvetlen kiolvasása a táblázatból (interpolálni kell a táblázatban közölt értékek közé eső értékekhez).

TÁBLÁZAT: A MÉRT FELÜLETI FESZÜLTSÉG HELYESBÍTÉSE

Csak vizes oldatokhoz, $\rho \approx 1$ g/cm³

R = 9,55 mm (gyűrű átlagos sugara)

r = 0,185 mm (gyűrű huzalának sugara)

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

Ezt a táblázatot a Harkins-Jordan helyesbítés alapján állították össze. Hasonlít a DIN-szabványban (DIN 53914) lévő, vízre és vizes oldatokra (sűrűség, $\rho = 1$ g/cm³) vonatkozó táblázathoz, és az R = 9,55 mm (gyűrű átlagos sugara) és r = 0,185 mm (gyűrű huzalának sugara) méretekkel rendelkező, kereskedelmi forgalomban kapható gyűrűre érvényes. A táblázat tömeggel vagy vízzel végrehajtott kalibrálás után mért felületi feszültség értékek helyesbített értékeit adja meg.

Más lehetőségként, az előző kalibrálás nélkül, a felületi feszültség a következő képletnek megfelelően számítható ki:

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

ahol:

F = a film elszakadásakor a dinamométeren mért erő

R = a gyűrű sugara

f = a helyesbítési tényező (1)

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– alkalmazott módszert,

– a vizsgálathoz használt víz vagy oldat típusát,

– az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

– a mérési eredményeket: felületi feszültség (leolvasott érték), megadva mind az egyes leolvasott értékeket, mind az adott számbeli középértékét, valamint a helyesbített középértéket (a berendezés tényezőjének és a helyesbítési táblázat figyelembevételével),

– az oldat koncentrációját,

– a vizsgálati hőmérsékletet,

– a felhasznált oldat életkorát; különösen az oldat elkészítése és mérése közötti időt,

– az oldatnak a mérőtartályba helyezése után a felületi feszültség időfüggésének leírását,

– az eredmények értelmezéséhez szükséges minden információt és megjegyzést közölni kell, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Figyelembe véve, hogy a desztillált víz felületi feszültsége 72,75 mN/m 20 °C hőmérsékleten, azokat az anyagokat, amelyek 60 mN/m-nél kisebb felületi feszültséget mutatnak e módszer feltételei mellett, felületaktív anyagoknak kell tekinteni.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 104. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges

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

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

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

A.6. OLDHATÓSÁG VÍZBEN

1. **MÓDSZER**

A leírt módszerek az OECD-vizsgálati irányelven (1) alapulnak.

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag szerkezeti képletéről, gőznyomásáról, disszociációs állandójáról és hidrolíziséről (a pH függvényében).

Nincs olyan módszer, amely a vízoldékonyság teljes tartományát lefedné.

A következő leírásban ismertetett két vizsgálati módszer lefedi az oldhatóság teljes tartományát, de nem alkalmazható illékony anyagokhoz:

– az egyiket, amely kis oldhatóságú (< 10^{-2} gramm/liter) és vízben stabil, lényegében tiszta anyagokra alkalmazható, „oszlopelúciós módszernek" nevezik,

– a másikat, amely nagyobb oldhatóságú (>10^{-2} gramm/liter) és vízben stabil, lényegében tiszta anyagokra alkalmazható, „lombikmódszernek" nevezik.

A vizsgált anyag vízoldékonyságára jelentős hatással lehet a szennyeződések jelenléte.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Valamely anyag vízoldékonyságát az adott hőmérsékleten, az anyag vízben történő telítettségi tömegkoncentrációjával adják meg. A vízoldékonyságot tömeg/oldat térfogat egységekben fejezik ki. Az SI mértékegység a kg/m^3 (gramm/liter is használható).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A minta mennyiségét közelítőleg, továbbá a telítési tömegkoncentráció eléréshez szükséges időt egyszerű elővizsgálattal kell meghatározni.

1.4.1. **Oszlopelúciós módszer**

Ez a módszer valamely vizsgált anyagnak vízzel, mikro-oszlopból végrehajtott elúcióján alapul; az oszlop a vizsgált anyag feleslegével bevont inert hordozóanyaggal – mint például üveggyöngy vagy homok – van megtöltve. A vízoldékonyságot akkor határozzák meg, amikor az eluátum tömeg-koncentrációja konstans. Ezt egy koncentrációplató mutatja az idő függvényében.

1.4.2. **Lombikmódszer**

E módszernél az anyagot (a szilárd anyagokat porítani kell) feloldják a vizsgálati hőmérsékletnél magasabb hőmérsékletű vízben. A telítés elérésekor lehűtik a keveréket, és a vizsgálati hőmérsékleten tartják, addig keverve, amíg az egyensúly be nem áll. Más megoldásként a mérés végrehajtható közvetlenül a vizsgálati hőmérsékleten, ha megfelelő mintavételezéssel meggyőződtek a telítettségi egyensúly eléréséről. Ezt követően alkalmas analitikai módszerrel meghatározzák az anyag tömegkoncentrációját olyan vizes oldatban, amely nem tartalmaz fel nem oldott részecskét.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

1.5.1. **Ismételhetőség**

Oszlopelúciós módszer esetében < 30 % érhető el; lombikmódszer esetén, < 15 %-nak kell megfigyelhetőnek lennie.

1.5.2. **Érzékenység**

Ez az elemzés módszerétől függ, de egészen 10^{-6} gramm/liter tömegkoncentráció meghatározások is végrehajthatók.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Vizsgálati körülmények**

A vizsgálatot lehetőleg 20 ± 0,5 °C hőmérsékleten kell végrehajtani. Amennyiben feltételezhető, hogy az oldhatóság függ a hőmérséklettől (> 3 % /°C), két további hőmérsékletet, legalább 10 °C-kal az először kiválasztott hőmérséklet fölött és alatt, is használni kell. Ebben az esetben a hőmérsékletszabályozásnak ± 0,1 °C pontosságúnak kell lennie. A kiválasztott hőmérsékletet állandó értéken kell tartani a berendezés minden lényeges részében.

1.6.2. **Előzetes vizsgálat**

Egy csiszolt üvegdugójú, 10 ml-es mérőhengerben lévő körülbelül 0,1 gramm mintához (szilárd anyagokat porítani kell) szobahőmérsékletű, egyre nagyobb térfogatú desztillált vizet adnak hozzá az alábbi táblázatban látható lépéseknek megfelelően:

0,1 g oldható „x” ml vízben	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Oldhatóság közelítőleg (gramm/liter)	> 1 000	1 000-től 200-ig	200-tól 100-ig	100-tól 50-ig	50-től 10-ig	10-től 1-ig	< 1

A jelzett vízmennyiség minden egyes hozzáadása után a keveréket erőteljesen rázzák 10 percig, és szemrevételezéssel ellenőrzik, hogy vannak-e a mintának fel nem oldott részei. Amennyiben 10 ml víz hozzáadása után a minta vagy annak részei nem oldódtak fel, a kísérletet nagyobb vízmennyiséggel meg kell ismételni egy 100 ml-es mérőhengerben. Alacsonyabb oldhatóságok esetében lényegesen hosszabb lehet az anyag feloldásához szükséges idő (legalább 24 órát kell engedélyezni). A közelítő oldhatóságot a táblázat mutatja az alatt a hozzáadott vízmennyiség alatt, amelyben létrejön a minta teljes feloldása. Amennyiben az anyag még mindig látszólag oldhatatlan, több mint 24 órát kell engedélyezni (maximum 96 órát), vagy további hígítást kell végrehajtani, hogy meggyőződjenek arról, hogy az oszlopelúciós vagy a lombikos oldhatósági módszert kell-e alkalmazni.

1.6.3. **Oszlopelúciós módszer**

1.6.3.1. *Hordozóanyag, oldószer és eluáló anyag*

Az oszlopelúciós módszerhez használt hordozóanyagnak inertnek kell lennie. Az alkalmazható lehetséges anyagok az üveggyöngy és a homok. Analitikai tisztaságú illékony oldószert kell használni a vizsgált anyag felvitelére a hordozóelemre. Üveg- vagy kvarckészülékben eluáló folyadékként kétszer desztillált vizet kell alkalmazni.

Megjegyzés:

Nem szabad közvetlenül valamilyen szerves ioncserélőből származó vizet használni.

1.6.3.2. *A hordozóanyag telítése*

Körülbelül 600 mg hordozóanyagot mérnek ki, és azt egy 50 ml-es gömblombikba töltik.

Alkalmas, kimért vizsgálati anyagot feloldanak a kiválasztott oldószerben. Ebből az oldatból megfelelő mennyiséget hozzáadnak a hordozóanyaghoz. Az oldószert teljesen el kell párologtatni, például forgó párologtatóval; egyébként nem érhető el a hordozóanyag vízzel történő telítése a hordozóanyag felületén a megoszlási hatások miatt.

A hordozóanyag megtöltése problémákat okozhat (hibás eredmények), ha a vizsgált anyag olajos vagy más kristályos fázisként leülepszik. A problémát kísérletileg kell megvizsgálni, és meg kell adni a részleteket.

Engedni kell, hogy a megtöltött hordozóanyag körülbelül két órán át álljon körülbelül 5 ml vízben, és ezután a szuszpenziót hozzá kell adni a mikro-oszlophoz. Más megoldásként száraz megtöltött hordozóanyag önthető a mikro-oszlopba, amelyet előzőleg vízzel feltöltöttek, és ezután körülbelül 2 óra alatt hozható egyensúlyba.

Vizsgálati eljárás:

A hordozóanyagból az anyag eluálása két különböző mód valamelyikével hajtható végre:

– újrakeringtető szivattyú (lásd az 1. ábrát),

– kiegyenlítő tartály (lásd a 4. ábrát).

1.6.3.3. *Oszlopelúciós módszer újrakeringtető szivattyúval*

Készülék

Az 1. ábra mutatja egy jellegzetes rendszer vázlatos elrendezését. A 2. ábrán egy alkalmas mikro-oszlop látható, jóllehet bármilyen méret elfogadható, feltéve hogy megfelel a reprodukálhatósági és érzékenységi követelménynek. Az oszlopnak biztosítania kell legalább öt víztartály-térfogatnyi töltőteret, és legalább öt mintát kell tárolnia. Más megoldásként a méret csökkenthető, ha utántöltő oldószert alkalmaznak a szennyeződésekkel eltávolított, kezdeti öt tartálytérfogat pótlására.

Az oszlopot körülbelül 25 ml/óra áramlás szabályozására képes újrakeringtető szivattyúhoz kell csatlakoztatni. A szivattyút politetra-fluoretilén (P.T.F.E.) és/vagy üvegvezetékekkel csatlakoztatják. Az oszlopnak és a szivattyúnak, összeszerelt állapotban, biztosítania kell a mintavételt és a felső tér egyensúlyba hozását légköri nyomáson. Az oszlopanyagot egy kis (5 mm-es) üveggyapotdugó tartja, amely a részecskék kiszűrésére is szolgál. Az újrakeringtető szivattyú lehet például egy perisztaltikus szivattyú vagy membránszivattyú (biztosítani kell, hogy semmilyen szennyeződés és/vagy abszorpció ne jöjjön létre a cső anyagával).

Mérési eljárás

Elkezdődik az áramlás az oszlopon keresztül. Az áramlási sebesség 25ml/óra legyen (ez a leírt oszlop esetében 10 tartálytérfogat/órának felel meg). Az első öt tartálytérfogatot (minimum) nem használják fel annak érdekében, hogy eltávolítsák a vízben oldható szennyeződéseket. Ezt követően az egyensúlyi állapot létrejöttéig engedik működtetni az újrakeringtető szivattyút, öt olyan, egymást követő, véletlenül választott minta felhasználásával, amelyek koncentrációja nem tér el egymástól ± 30 %-nál nagyobb mértékben. Ezeket a mintákat legalább 10 tartálytérfogatnyi eluáló folyadék áthaladásának megfelelő időintervallummal kell elválasztani egymástól.

1.6.3.4. *Oszlopelúciós módszer kiegyenlítő tartállyal*

Készülék (lásd a 4. és 3. ábrát)

Kiegyenlítő tartály: A kiegyenlítő tartályhoz az összeköttetést egy csiszolt üvegből készült csatlakozó biztosítja, amelyet PTFE-csővezeték csatlakoztat. Körülbelül 25 ml/óra átfolyási sebesség használata ajánlott. Össze kell gyűjteni, és elemezni kell a kiválasztott módszerrel az egymást követő eluátumfrakciókat.

Mérési eljárás

Azokat a középső eluátumtartományból származó frakciókat használják a vízben oldhatóság meghatározására, ahol a koncentrációk állandóak (± 30 %) legalább öt egymást követő frakcióban.

Mindkét esetben (újrakeringtető szivattyút vagy kiegyenlítő tartályt használva) egy második méréssorozatot is végre kell hajtani az első áramlási sebességének felével. Amennyiben a két méréssorozat eredményei megegyeznek egymással, a vizsgálat kielégítő; ha a kisebb áramlási sebességgel nagyobb a látszólagos oldhatóság, akkor az áramlási sebesség felezését folytatni kell, amíg a két egymást követő méréssorozat azonos oldhatóságot nem ad.

Mindkét esetben (újrakeringtető szivattyú vagy kiegyenlítő tartály használatakor) ellenőrizni kell a frakciókat kolloidanyag jelenlétét keresve a Tyndall-jelenség (fényszóródás) előfordulásának vizsgálatával. Az ilyen részecskék jelenléte meghamisítja az eredményeket, és a vizsgálatot meg kell ismételni az oszlop szűrési hatásának javításaival.

Fel kell jegyezni minden egyes minta pH-ját. Végre kell hajtani egy másik méréssorozatot ugyanazon a hőmérsékleten.

1.6.4. **Lombikmódszer**

1.6.4.1. *Készülék*

A lombikmódszerhez a következő felszerelés szükséges:

– szokásos laboratóriumi üvegeszközök és műszerek,

– oldatok szabályozott, állandó hőmérséklet melletti keverésére alkalmas készülék,

– centrifuga (lehetőleg szabályozott hőmérsékletű), ha szükséges, emulziókkal, és

– analitikai meghatározáshoz szükséges eszköz.

1.6.4.2. *Mérési eljárás*

Becsléssel meghatározzák a kívánt vízmennyiség telítéséhez szükséges anyagmennyiséget az előzetes vizsgálat alapján. A szükséges vízmennyiség az analitikai módszertől és az oldhatósági tartománytól függ. A fent meghatározott anyagmennyiségnek körülbelül ötszörösét bemérik a három, becsiszolt üvegdugóval felszerelt üvegedénybe (például centrifuga-kémcsövek, lombikok). A kiválasztott vízmennyiséget betöltik az edényekbe, és szorosan ledugózzák. A lezárt edényeket ezután 30 °C hőmérsékleten összerázzák. (Olyan rázó- vagy keverőkészüléket kell használni, amely képes arra, hogy állandó hőmérsékleten működjön, ilyen például a mágneses keverőberendezés egy szabályozott hőmérsékletű vízfürdőben.) Egy nap eltelte után az egyik tartályt eltávolítják, és vizsgálati hőmérsékleten újra egyensúlyba hozzák 24 órára, esetenkénti rázással. A tartály tartalmát ezután vizsgálati hőmérsékleten centrifugálják, és valamilyen alkalmas analitikai módszerrel meghatározzák a vizsgált anyag koncentrációját a tiszta, átlátszó vizes fázisban. A másik két lombikot hasonlóan kezelik a kezdeti, 30 °C hőmérsékleten két, illetve három napon át végrehajtott egyensúlyba hozás után. Amennyiben legalább az utolsó két tartály vizsgálatából kapott koncentráció-eredmények megegyeznek a szükséges reprodukálhatósággal, a vizsgálat kielégítő. A teljes vizsgálatot meg kell ismételni, hosszabb egyensúly-beállási idő alkalmazásával, ha az 1., 2. és 3. tartályokból kapott eredmények növekvő tendenciájúak.

A mérési eljárás 30 °C-on végrehajtott előzetes inkubáció nélkül is végrehajtható. A telítési egyensúly beállítása sebességének becsléséhez mintákat vesznek, amíg a keverési idő már nincs hatással a vizsgálandó oldat koncentrációjára.

Fel kell jegyezni minden egyes minta pH-ját.

1.6.5. **Elemzés**

Ezekhez a meghatározásokhoz előnyben részesítendő az anyagspecifikus analitikai módszer, mivel kis mennyiségekben jelen lévő oldható szennyeződések jelentős hibákat okozhatnak a mért oldhatóságban. Ilyen módszerekre példák: gáz vagy folyadékkromatográfia, titrálási módszerek, fotometrikus módszerek, voltametrikus módszerek.

2. **ADATOK**

2.1. OSZLOPELÚCIÓS MÓDSZER

Ki kell számítani minden egyes méréssorozatból a telítési plató legalább öt egymást követő mintájának középértékét, valamint a standard deviációt. Az eredményeket tömeg/oldattérfogat egységben kell megadni.

Összehasonlítják a különböző áramlási sebességgel végrehajtott két vizsgálatban kapott középértékeket, és ezek ismételhetőségének 30 %-nál kisebbnek kell lennie.

2.2. LOMBIKMÓDSZER

Az egyes eredményeket meg kell adni mindhárom lombik esetében, és a konstansnak tekintett eredményeket (15 %-nál kisebb ismételhetőség) átlagolni kell és tömeg/oldattérfogat egységekben kell megadni. Ez szükségessé teheti a tömegegységek újbóli átszámítását térfogategységekre annak a sűrűségnek a használatával, amikor az oldhatóság nagyon nagy (> 100 gramm/liter).

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. OSZLOPELÚCIÓS MÓDSZER

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az előzetes vizsgálat eredményeit,

– az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

– minden egyes minta koncentrációját, áramlási sebességét és pH-ját,

– minden egyes vizsgálatsorozat telítettségi platója legalább öt mintájának középértékeit és standard deviációját,

– két egymást követő, elfogadható méréssorozat átlagát,

– a víz hőmérsékletét a szaturációs folyamat során,

– az alkalmazott elemzési módszert,

– az alkalmazott hordozóanyag sajátosságát,

– a hordozóanyag betöltését,

– a felhasznált oldószert,

– a vizsgálat során az anyag minden kémiai instabilitásának bizonyítékát és az alkalmazott módszert,

– az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden információt, különösen az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosakat.

3.2. LOMBIKMÓDSZER

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az elővizsgálat eredményeit,

– az anyag pontos leírását (azonosság és szennyeződések),

– a jellegzetes analitikai meghatározásokat és azok átlagait, ha egynél több értéket határoztak meg az egyes lombikokhoz,

– minden minta pH-ját,

– az egymással egyező, különböző lombikokból kapott értékek átlagát,

– a vizsgálati hőmérsékletet,

– az alkalmazott analitikai módszert,

– a vizsgálat és az alkalmazott módszer során az anyag mindenfajta kémiai instabilitásának bizonyítékát,

– az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden információt, különösen az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosakat.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 105. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges

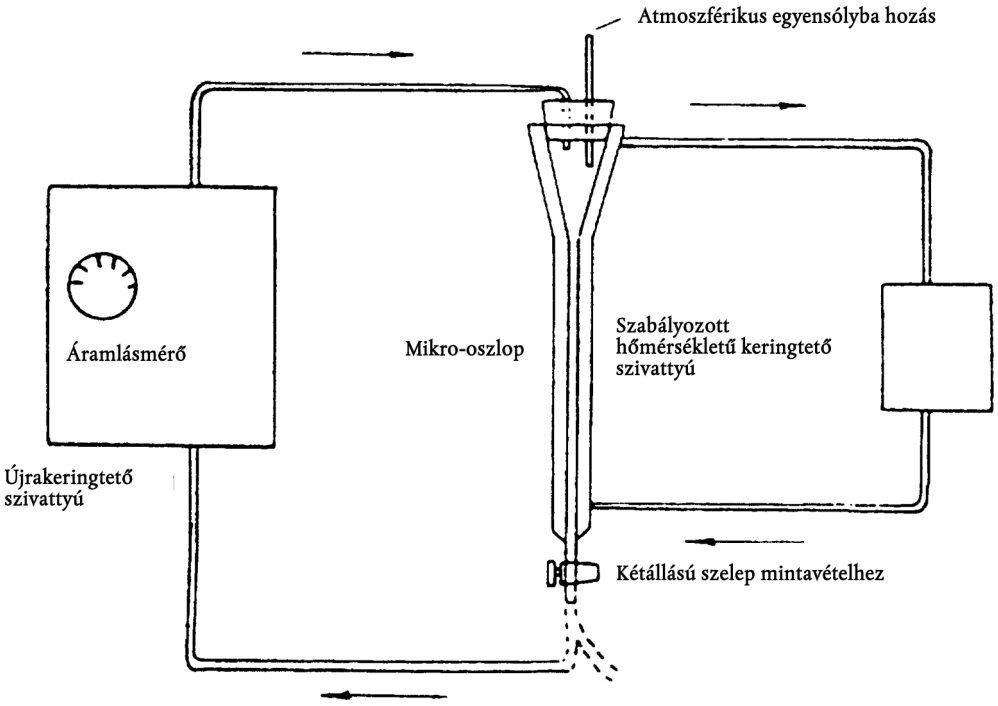
(2) NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method

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

Függelék

1. ábra

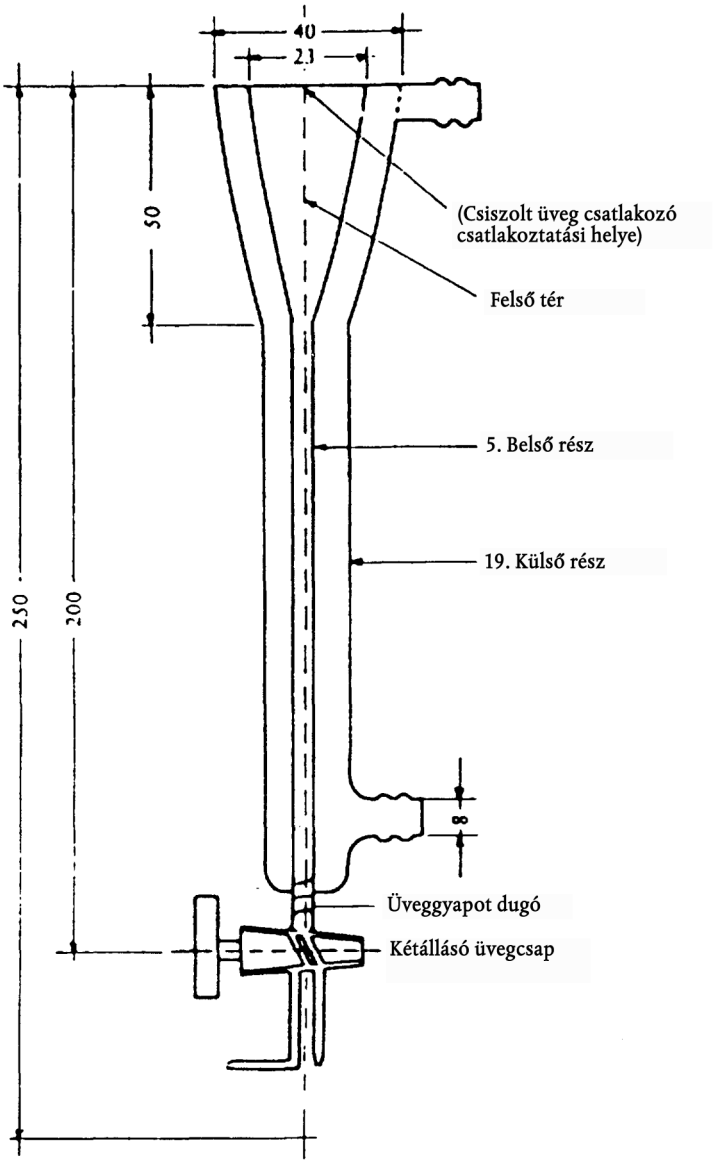
Oszlopelúciós módszer újrakeringtető szivattyúval



2. ábra

Jellegzetes mikro-oszlop

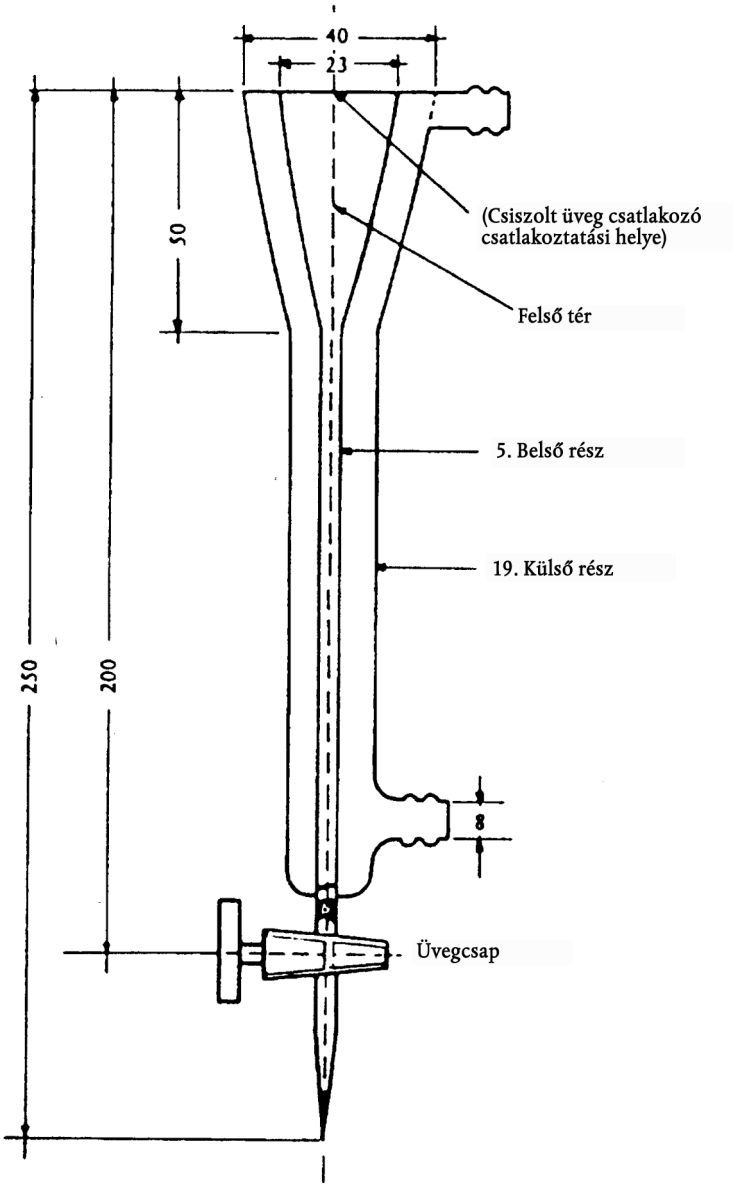
(Minden méret mm-ben van megadva)



3. ábra

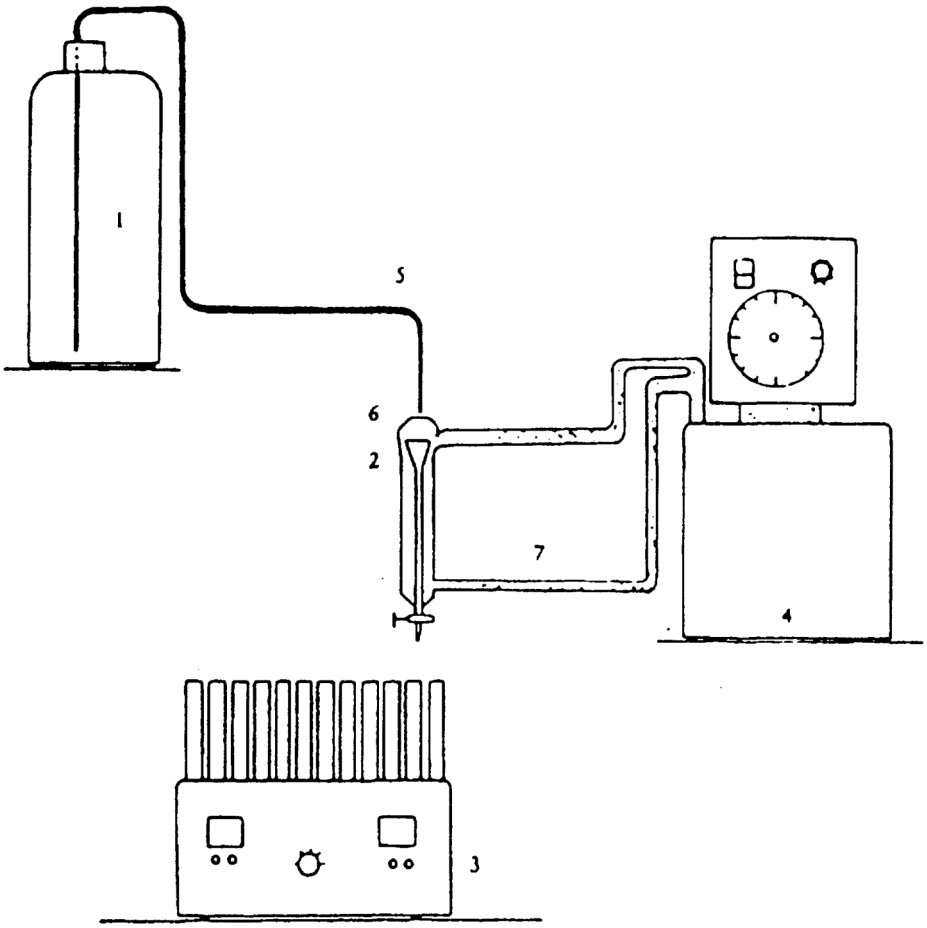
Jellegzetes mikro-oszlop

(Minden méret mm-ben van megadva)



4. ábra

Oszlopelúciós módszer kiegyenlítő tartállyal



1 = Kiegyenlítő tartály (például 2,5 literes lombik)
2 = Oszlop (lásd a 3. ábrát)
3 = Frakciógyűjtő
4 = Termosztát
5 = Tefloncső
6 = Csiszoltüveg-csatlakozó
7 = Vízvezeték (termosztát és oszlop között, belső átmérője: körülbelül 8 mm)

A.8. MEGOSZLÁSI HÁNYADOS

1. MÓDSZER

Az itt leírt „lombikrázásos” módszer az OECD-vizsgálati irányelven (1) alapul.

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag szerkezeti képletéről, disszociációs állandójáról, vízben oldhatóságáról, hidrolíziséről, n-oktanol oldhatóságáról és felületi feszültségéről.

Ionizálható anyagokon a méréseket csak nem ionos formájukban (szabad sav vagy szabad bázis) szabad végrehajtani, amelyet legalább egy pH-egységgel a pK alatti (szabad sav) vagy feletti (szabad bázis) pH-jú, megfelelő puffer használatával hoznak létre.

Ez a vizsgálati módszer két különálló eljárást foglal magában: a lombikrázásos módszert és a nagynyomású folyadékkromatográfiát („high performance liquid chromatography”, HPLC). Az előbbi akkor alkalmazható, amikor a P_{ow}-érték (a meghatározásokat lásd lejjebb) a −2 és +4 közötti tartományba, és az utóbbi a 0 és 6 közötti tartományba esik. A kísérleti eljárások közül bármelyik végrehajtása előtt először a megoszlási hányados előzetesen becsült értékét kell megállapítani.

A lombikrázásos módszer csak vízben és n-oktanolban oldható, lényegében tiszta anyagokhoz alkalmazható. Nem alkalmazható felületaktív anyagok esetében (amelyekhez biztosítani kell az egyedi n-oktanol- és vízoldékonyságon alapuló becsült vagy számított értéket).

A HLPC-módszer nem alkalmazható erős savak és lúgok, komplex fémvegyületek, felületaktív anyagok és olyan anyagok esetében, amelyek az eluáló anyagokkal reakcióba lépnek. Ezen anyagok esetében egyedi n-oktanol- és vízoldékonyságon alapuló, becsült vagy számított értéket kell biztosítani.

A HPLC módszer kevésbé érzékeny a vizsgálandó vegyületben lévő szennyeződések jelenlétére, mint a lombikrázásos módszer. Ennek ellenére bizonyos esetekben a szennyeződések megnehezíthetik az eredmények értelmezését, mivel bizonytalanná válik a csúcs kijelölése. Olyan keverékek esetében, amelyek határozatlan sávot eredményeznek, meg kell adni a log P felső és alsó határát.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁS ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A megoszlási hányados (P) két, egymással nem elegyedő oldószerből álló, kétfázisú rendszerben feloldott anyag egyensúlyi koncentrációinak (c_i) aránya. N-oktanol és víz esetében:

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{n-oktanol}}}{C_{\text{víz}}}$$

A megoszlási hányados (P) két koncentráció hányadosa, és rendszerint 10-es alapú logaritmus (log P) alakjában adják meg.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

A lombikrázásos módszer

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

A HPLC-módszer

Valamely vegyület mért HPLC adata és annak P-értéke korrelációba állításához létre kell hozni a kromatográfiai adatok függvényében a log P kalibrációs görbéjét legalább 6 referenciapontot használva. A felhasználó feladata a megfelelő referenciaanyagok kiválasztása. Amikor csak lehetséges, legalább egy referenciavegyületnek a vizsgált anyag P_{ow}-je fölötti, és egy másiknak a vizsgált anyag P_{ow}-je alatti P_{ow}-vel kell rendelkeznie. Négynél kisebb log P-értékek esetében a kalibráció a lombikrázásos módszerrel kapott adatokon alapulhat. Négynél nagyobb log P-értékekhez a kalibráció szakirodalmi értékeken alapulhat, amennyiben ezek összhangban vannak a számított értékekkel. Nagyobb pontosság elérésére előnyben kell részesíteni az olyan referenciavegyületeket, amelyek szerkezetileg kapcsolatban vannak a vizsgált anyaggal.

Sok vegyi anyagcsoport esetében a log P_{ow}-értékek terjedelmes jegyzékei állnak rendelkezésre (2)(3). Amennyiben a szerkezetileg egymással összefüggésben lévő vegyületek megoszlási hányadosairól nem állnak rendelkezésre adatok, más referenciavegyületekkel végrehajtott általánosabb kalibrálás használható.

A javasolt referenciaanyagok és azok P_{ow}-értékeinek jegyzékét a 2. függelék tartalmazza.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

1.4.1. **A lombikrázásos módszer**

A megoszlási hányados meghatározásához egyensúlyt kell teremteni a rendszer valamennyi, egymással kölcsönhatásban lévő komponense között, és meg kell határozni a két fázisban feloldott anyagok koncentrációit. Az ezzel a témakörrel foglalkozó szakirodalom vizsgálata azt jelzi, hogy többféle különböző módszer használható ennek a problémának a megoldására, azaz a két fázis alapos keverésére, amelyet a szétválasztásuk követ a vizsgált anyag egyensúlyi koncentrációjának meghatározására.

1.4.2. **A HPLC-módszer**

A HPLC-t olyan, a kereskedelemben kapható szilárd fázissal megtöltött analitikai oszlopokon hajtják végre, amely kémiailag kovasavhoz kötött hosszú szénhidrogén láncokat (például C_8, C_{18}) tartalmaz. Az oszlopba befecskendezett vegyi anyagok különböző sebességekkel mozognak az oszlop mentén a mozgó fázis és az álló szénhidrogénfázis közötti, különböző mértékű megoszlásuk miatt. A vegyi anyagok keverékei a víztaszító képességük sorrendjében eluálódnak, úgy, hogy először a vízben oldható vegyi anyagok eluálódnak, és utoljára az olajban oldható vegyi anyagok, a szénhidrogén-víz megoszlási hányadosukkal arányosan. Ez lehetővé teszi az ilyen (fordított fázisú) oszlopon a retenciós idő és az n-oktanol/víz megoszlási hányados közötti összefüggés meghatározását. A megoszlási hányados a következő kifejezés által megadott k *kapacitási faktor* segítségével határozható meg.

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

amelyben t_R = a vizsgált anyag retenciós ideje, és t_o = az az átlagos idő, amelyre egy oldószer-molekulának szüksége van ahhoz, hogy keresztül haladjon az oszlopon (holtidő).

Kvantitatív analitikai módszerek nem szükségesek, és csak az elúciós időket kell meghatározni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

1.5.1. **Ismételhetőség**

A lombikrázásos módszer

A megoszlási hányados pontosságának biztosítása érdekében két meghatározást kell végrehajtani három különböző vizsgálati körülmény között, amelyek során változtatható az előírt anyagmennyiség, valamint az oldószertérfogatok aránya. A megoszlási hányados 10-es alapú logaritmusban kifejezett értékeinek ± 0,3 logegységtartományon belül kell lennie.

A HPLC-módszer

A mérés megbízhatóságának növelésére két meghatározást kell végrehajtani. Az egyes mérésekből meghatározott log P értékeknek ± 0,1 logegységtartományon belül kell lenniük.

1.5.2. **Érzékenység**

A lombikrázásos módszer

A módszer mérési tartományát az analitikai eljárás detektálási határa határozza meg. Ennek lehetővé kell tennie a –2 és +4 (esetenként, amikor teljesülnek ennek a feltételei, ez a tartomány egészen 5-ös log P_{ow}-re is kibővíthető) közötti tartományban lévő log P_{ow} értékek kiértékelését, amennyiben az oldatban lévő anyag koncentrációja egyik fázisban sem több 0,01 mol/liternél.

A HPLC-módszer

A HPLC-módszer 0 és 6 közötti log P_{ow} tartományban teszi lehetővé a megoszlási hányadosok becslését.

Általában valamely vegyület megoszlási hányadosa a lombikrázásos értéktől számított ± 1 logegységen belül becsülhető meg. A jellegzetes korrelációk megtalálhatók a szakirodalomban (4)(5)(6)(7)(8). Nagyobb pontosság rendszerint akkor érhető el, amikor a korrelációs görbék egymással szerkezetileg kapcsolatban lévő referenciavegyületeken alapulnak (9).

1.5.3. **Alkalmazhatóság**

A lombikrázásos módszer

A Nernst-féle megoszlási törvény csak állandó hőmérsékleten, nyomáson és pH mellett érvényes híg oldatokra. Szigorúan két tiszta oldószer között diszpergálódott tiszta anyagra érvényes. Amennyiben egyidejűleg több különböző oldott anyag van jelen egy vagy több fázisban, ez hatással lesz az eredményekre.

Az oldott molekulák disszociációja vagy asszociációja eltéréseket eredményez a Nernst-féle megoszlási törvénytől. Az ilyen eltéréseket az a tény jelzi, hogy a megoszlási hányados függővé válik az oldat koncentrációjától.

Mivel többszörös egyensúlyról van szó, ezt a módszert nem szabad alkalmazni ionizálható vegyületekre helyesbítés alkalmazása nélkül. Ilyen vegyületek esetében meg kell fontolni pufferoldatok használatát víz helyett; a puffer pH-jának legalább 1 pH-egységgel el kell térnie az anyag pKa-értékétől, és figyelembe kell venni ennek a pH-nak az összefüggését a környezettel.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **A megoszlási hányados előzetes becslése**

A megoszlási hányados becslését lehetőleg számítási módszer (lásd az 1. függeléket) segítségével, vagy adott esetben a tiszta oldószerekben lévő vizsgált anyag oldhatóságainak arányából (10) kell végrehajtani.

1.6.2. **A lombikrázásos módszer**

1.6.2.1. *Előkészület*

n-oktanol: A megoszlási hányados meghatározását nagy tisztaságú, analitikai minőségű reagenssel kell végrehajtani.

Víz: üveg- vagy kvarckészülékben lévő desztillált vagy kétszer desztillált vizet kell használni. Ionizálható vegyületekhez víz helyett pufferoldatokat kell használni, amennyiben indokolt.

Megjegyzés:

Nem szabad közvetlenül valamilyen ioncserélőből vett vizet használni.

1.6.2.1.1. Az oldószerek előzetes telítése

Valamely megoszlási hányados meghatározása előtt kölcsönösen telítik az oldószerrendszer fázisait a kísérleti hőmérsékleten végrehajtott rázással. Ennek végrehajtásához célszerű 24 órán át egy mechanikus rázókészülékben nagy tisztaságú, analitikai minőségű n-oktanolt vagy vizet tartalmazó két olyan, nagy tárolópalackot rázni, amelyek közül mindkettő elegendő mennyiséget tartalmaz a másik oldószerből, és ezután ezeket addig kell alkalmazni, amíg a fázisok szétválnak, és bekövetkezik a telítettségi állapot.

1.6.2.1.2. Előkészület a vizsgálathoz

A kétfázisú rendszer teljes mennyiségének majdnem meg kell töltenie a vizsgálati tartályt. Ez segíteni fog az elillanás miatti anyagveszteség megakadályozásában. Az alkalmazandó térfogatarányt és anyagmennyiségeket a következők határozzák meg:

– a megoszlási hányados előzetes értékelése (lásd fent),

– az analitikai eljáráshoz szükséges vizsgált anyag minimális mennyisége, és

– a mindkét fázisban 0,01 mol/literes maximáliskoncentráció-korlátozás.

Három vizsgálatot kell végezni. Az elsőben az n-oktanol és víz számított térfogatarányát használják; a másodikban ezt az arányt kettővel elosztják; és a harmadikban ezt az arányt kettővel megszorozzák (például, 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Vizsgált anyag

Törzsoldatot készítenek vízzel előre telített n-oktanolban. Ennek a törzsoldatnak a koncentrációját pontosan meg kell határozni, mielőtt a megoszlási hányados meghatározásához használnánk. Ezt az oldatot olyan körülmények között kell tárolni, amely biztosítja annak stabilitását.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálati hőmérsékletet állandó értéken (± 1 °C) kell tartani, és ennek a 20 és 25 °C közötti tartományban kell lennie.

1.6.2.3. *Mérési eljárás*

1.6.2.3.1. A megoszlási egyensúly létrehozása

Minden vizsgálati körülményhez elő kell készíteni a pontosan megmért két oldószer mennyiséget, valamint a szükséges törzsoldat mennyiséget tartalmazó vizsgálati tartályt.

Az n-oktanol fázisokat térfogat alapján kell mérni. A vizsgálati tartályokat vagy alkalmas rázókészülékbe kell helyezni, vagy kézzel kell keverni. Centrifugakémcső használatakor javasolt módszer a kémcső gyors forgatása 180 fokban a főtengelye mentén úgy, hogy minden oldott levegő távozzék a két fázisból. A tapasztalat azt mutatja, hogy 50 ilyen forgatás rendszerint elegendő a megoszlási egyensúly létrehozásához. Azért, hogy bizonyosan létrejöjjön az egyensúly, öt perc alatt 100 forgatás ajánlott.

1.6.2.3.2. Fáziselkülönítés

Adott esetben a fázisok elkülönítéséhez a keveréket centrifugálni kell. Ezt a műveletet szobahőmérsékleten, laboratóriumi centrifugában kell elvégezni, vagy ha nem szabályozott hőmérsékletű centrifugát használnak, a centrifugakémcsöveket az elemzés előtt legalább egy óra hosszat egyensúlyban kell tartani a vizsgálati hőmérsékleten.

1.6.2.4. *Elemzés*

A megoszlási hányados meghatározásához meg kell határozni a vizsgált anyag koncentrációját mindkét fázisban. Ez úgy tehető meg, hogy ki kell venni minden egyes vizsgálati körülményhez tartozó minden egyes kémcsőből mindkét fázis aliquot részét, és elemezni kell azokat a kiválasztott eljárással. Ezután ki kell számítani a mindkét fázisban jelen lévő teljes anyagmennyiséget, és ezt össze kell hasonlítani az eredetileg bevitt anyagmennyiséggel.

A vizes fázisból olyan eljárással kell mintát venni, amely minimálissá teszi az n-oktanol maradéka bevitelének veszélyét: a vizes fázisból a mintavételhez egy eltávolítható tűvel ellátott üvegfecskendő használható. A fecskendőt kiinduláskor részben meg kell tölteni levegővel. A levegőt óvatosan ki kell tolni, miközben a tűt behelyezik az n-oktanol rétegen keresztül. Ezután megfelelő mennyiségű vizes fázist kell beszívni a fecskendőbe. A fecskendőt gyorsan el kell távolítani az oldatból, és le kell venni a tűt. A fecskendő tartalma ezután vizes mintaként használható. A két elkülönített fázisban a koncentrációt lehetőleg valamilyen, anyagra jellemző módszerrel kell meghatározni. A következő felsorolás példákat ad azokra az analitikai módszerekre, amelyek megfelelőnek bizonyulhatnak:

– fotometrikus módszerek,

– gázkromatográfia,

– nagy nyomású folyadékkromatográfia.

1.6.3. **A HPLC-módszer**

1.6.3.1. *Előkészület*

Készülék

Impulzusmentes szivattyúval és alkalmas detektáló készülékkel felszerelt folyadékkromatográf szükséges. Injektáló hurkokkal rendelkező injektor használata ajánlatos. Álló fázisban poláros csoportok jelenléte nagymértékben károsíthatja a HPLC-oszlop megfelelő működését. Ezért az álló fázisnak minimális százalékban szabad csak tartalmaznia poláros csoportokat (11). A kereskedelemben kapható mikroszemcsés, reverzfázisú töltetek vagy előretöltött oszlopok is használhatók. Az injektáló rendszer és az analitikai oszlop közé védőoszlop helyezhető el.

Mobil fázis

Eluáló oldószer elkészítésére HPLC minőségű metanolt és HPLC minőségű vizet használnak, amelyet gáztalanítanak használat előtt. Izokratikus eluálást kell alkalmazni. Minimum 25 % víztartalmú metanol/víz arányt kell használni. Általában 3:1 (térfogat/térfogat) metanol–víz keverék megfelelő log P=6 vegyületek 1 órán belüli eluálásához 1 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Ha a vegyület log P-je nagy, szükségessé válik az elúciós idő lerövidítése (referenciavegyületeknél is) a mobil fázis polaritásának vagy az oszlop hosszúságának csökkentésével.

A n-oktanolban nagyon kis mértékben oldható anyagok hajlamosak arra, hogy rendkívül alacsony log P_{ow}-értékeket adjanak a HPLC-módszerrel; az ilyen vegyületek csúcsai esetenként az oldószerfronttal együtt jelentkeznek. Ez valószínűleg annak tulajdonítható, hogy túl lassú a megoszlási folyamat ahhoz, hogy létrejöhessen az egyensúly az alatt az idő alatt, amíg általában egy HPLC- elválasztás tart. Az áramlási sebesség csökkentése vagy a metanol/víz arány csökkentése hatásos lehet abban, hogy reális értéket kapjanak.

A vizsgált, és a referenciavegyületeknek elegendő koncentrációkban oldhatóaknak kell lenniük a mobil fázisban ahhoz, hogy kimutathatók legyenek. Csak kivételes esetekben használhatók adalékanyagok a metanol/víz keverékhez, mivel az adalékanyagok megváltoztatják az oszlop tulajdonságait. Adalékanyagokkal rendelkező kromatogrammokhoz kötelező az ugyanolyan típusú, külön oszlop használata. Amennyiben nem megfelelő a metanol–víz, más szerves oldószer–víz keverékek használhatók, például etanol–víz vagy acetonitril–víz.

Az eluáló folyadék pH-ja döntő fontosságú ionizálható vegyületek esetében. Ennek belül kell lennie az oszlop üzemi pH-tartományán, ami rendszerint 2 és 8 között van. Ajánlatos a pufferolás. El kell kerülni a só kicsapódását és az oszlop minőségromlását, amely bizonyos szerves fázis/puffer keverékek esetében megvalósulhat. Nem ajánlatos kovasav alapú, álló fázisú HPLC-berendezéssel pH 8 felett méréseket végrehajtani, mivel a lúgos mobil fázis használata gyors romlást okozhat az oszlop teljesítőképességében.

Oldott anyagok

A referenciavegyületeknek a lehető legtisztább vegyületeknek kell lenniük. A vizsgálathoz vagy kalibrálásra szánt vegyületeket, amennyiben lehetséges feloldják a mobil fázisban.

Vizsgálati körülmények

A mérések során a hőmérsékletnek nem szabad ± 2 K-nél nagyobb értékkel változnia.

1.6.3.2. *Mérés*

A t_o holtidő számítása

A t_o holtidő valamely homológ sor (például n-alkil-metil-ketonok) vagy kromatográffal nem késleltetett szerves vegyületek (például tiokarbamid vagy formamid) segítségével határozható meg. A t_o holtidőnek homológ sor segítségével végrehajtott számításához valamely homológ sornak legalább hét tagját fecskendezik be, és meghatározzák a megfelelő holtidőt. Felrajzolják a $t_r(n_c + 1)$ alapretenciós időt a $t_r(n_c)$függvényében, és meghatározzák a következő regressziós egyenletet:

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

„a" metszéspontját és „b" meredekségét (n_c = szénatomok száma). A t_o holtidőt ekkor a következő összefüggés adja meg:

$$t_o = a/(1–b)$$

Kalibrációs görbe

A következő lépés a log P függvényében a log k-értékek korrelációjának megállapítása megfelelő referenciaanyagok esetében. A gyakorlatban egyidejűleg fecskendeznek be 5–10 tagból álló standard referenciavegyületet, amelyek log P-értéke a várt tartomány körül van, és lehetőleg a detektáló rendszerhez kapcsolt regisztráló integrátoron meghatározzák a retenciós időket. Kiszámítják a kapacitástényezők megfelelő – k – logaritmusait, és felrajzolják a lombikrázásos módszerrel meghatározott log P függvényében. A kalibrálást rendszeres időközönként, naponta legalább egyszer elvégzik azért, hogy felismerjék az esetleges változásokat az oszlop viselkedésében.

A vizsgált anyag kapacitási tényezőjének meghatározása

A vizsgált anyagot a mobil fázis lehető legkisebb mennyiségében fecskendezik be. Meghatározzák (kétszer) a retenciós időt, amely lehetővé teszi a k kapacitástényező kiszámítását. A referenciavegyületek korrelációs görbéjéből interpolálható a vizsgált anyag megoszlási hányadosa. Nagyon kicsi és nagyon nagy megoszlási hányadosok esetében extrapoláció szükséges. Ilyen esetekben gondosan kell figyelembe venni a regressziós egyenes konfidenciahatárait.

2. **ADATOK**

Lombikrázásos módszer

A P meghatározott értékeinek megbízhatósága a párhuzamos meghatározások középértékeinek az általános középértékkel való összehasonlításával vizsgálható.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az anyag pontos leírását (azonosság és szennyeződések),

– amikor a módszerek nem alkalmazhatóak (például felületaktív anyag), az egyes n-oktanol- és vízoldékonyságon alapuló valamilyen számított értéket vagy becslést kell megadni,

– az eredmények értelmezése szempontjából lényeges valamennyi információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

Lombikrázásos módszer esetében:

– adott esetben az előzetes becslés eredményeit,

– azt a hőmérsékletet, amelyen a meghatározást mérték,

– a koncentrációk meghatározásához használt analitikai eljárások adatait,

– adott esetben a centrifugálás idejét és sebességét,

– mindkét fázisban a mért koncentrációkat, minden egyes meghatározáshoz (ez azt jelenti, hogy összesen 12 koncentrációnak kell szerepelnie a jelentésben),

– a vizsgált anyag súlyát, az egyes vizsgálati tartályokban alkalmazott minden egyes fázis térfogatát és egyensúlyba hozás után az egyes fázisokban jelen lévő vizsgált anyag teljes, számított mennyiségét,

– a megoszlási hányados (P) számított értékeit és minden vizsgálati körülmény esetében meg kell adni a középértéket, vagyis minden meghatározáshoz meg kell adni a középértéket. Amennyiben létezik javaslat a megoszlási hányados koncentrációfüggőségére, ezt is szerepeltetni kell a jelentésben,

– meg kell adni az egyes P értékeknek a középérték körüli standard deviációját,

– az összes meghatározásból megállapított átlagos P értéket 10-es alapú logaritmusaként is ki kell kifejezni,

– a számított elméleti P_{ow}-t, amikor ilyen értéket meghatároznak, vagy amikor a mért érték > 10^4,

– a kísérlet során felhasznált víz és vizes fázis pH-ját,

– víz helyett puffer használata esetén a pufferek használatának indoklását, a pufferek összetételét, koncentrációját és pH-ját, és a vizes fázis pH-ját a kísérlet előtt és után.

A HPLC-módszer esetében:

– adott esetben az előzetes becslés eredményét,

– a vizsgált- és referenciaanyagokat és azok tisztaságát,

– azt a hőmérséklettartományt, amelyben a meghatározások történtek,

– azt a pH-t, amelyben a meghatározások történtek,

– az analitikai és védőoszlop, a mobil fázis és a detektálásra szolgáló eszközök adatait,

– a kalibrálás során használt referenciaanyagok regressziós adatait és a szakirodalomban közölt log P-értékeit,

– az illesztett regressziós egyenes részleteit (log k a log P függvényében),

– a vizsgált vegyület átlagos retenciós adatait és interpolált log P értékét,

– a berendezés és a működési állapot leírását,

– az elúciós profilokat,

– az oszlopba bevitt vizsgált és referenciaanyagok mennyiségét,

– a holtidőt, és mérésének módját.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 107. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. függelék

Számítási/becslési módszerek

BEVEZETÉS

A *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (a) című mű ismerteti a számítási módszerek, adatok és példák általános bevezetését.

A P_{ow} számított értékei használhatók:

– annak eldöntésére, hogy a kísérleti módszerek közül melyik megfelelő (lombikrázási tartomány: log P_{ow}: – 2-től 4-ig, HPLC-tartomány: log P_{ow}: 0-tól 6-ig),

– a megfelelő vizsgálati körülmények kiválasztásához (például referenciaanyagok HPLC-eljárásokhoz, n-oktanol/víz térfogatarány lombikrázásos módszerhez),

– a lehetséges kísérleti hibák belső laboratóriumi ellenőrzéséhez,

– P_{ow} becslés biztosítására, ahol a kísérleti módszerek technikai okok miatt nem alkalmazhatók.

BECSLÉSI MÓDSZER

A megoszlási hányados előzetes becslése

A megoszlási hányados értéke a tiszta oldószerekben a vizsgálati anyag oldhatóságának segítségével becsülhető meg:

Ehhez:

$$P_{becsült} = \frac{\text{telítési } c_{n\text{-oktanol}}}{\text{telíési } c_{víz}}$$

SZÁMÍTÁSI MÓDSZEREK

A számítási módszerek alapelve

Minden számítási módszer a molekulának olyan elemekre való formális lebomlásán alapul, amelyekhez ismertek megbízható log P_{ow}-értékek. Ekkor a teljes molekula log P_{ow}-értékét a megfelelő fragmentum összege plusz az intermolekuláris kölcsönhatásokhoz tartozó korrekciós kifejezések összege adja.

A fragmentumkonstansok és korrekciós kifejezések jegyzékei rendelkezésre állnak (b)(c)(d)(e). Néhányat közülük rendszeresen frissítenek (b).

Minőségi követelmények

Általában a számítási módszer megbízhatósága csökken a vizsgált vegyület növekvő bonyolultságával. Kis molekulasúlyú és egy- vagy kétfunkciós csoportú, egyszerű molekulák esetében a különböző fragmentálási módszerek eredményei és a mért érték között 0,1–0,3 log P_{ow} eltérés várható. Összetettebb molekulák esetében a hibahatár nagyobb lehet. Ez a fragmentumkonstansok megbízhatóságától és rendelkezésre állásától, valamint az intramolekuláris kölcsönhatások (például hidrogénkötések) felismerhetőségétől és a korrekciós kifejezések pontos használatától függ (kisebb a probléma a CLOGP-3-as szoftverrel) (b). Ionizálható vegyületek esetében fontos a töltés vagy az ionizáció mértékének megfelelő figyelembevétele.

Számítási eljárások

Hansch-féle π-módszer

A Fujita és munkatársai (f) által bevezetett eredeti π hidrofób helyettesítő konstanst a következőképpen definiálták:

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

ahol P_{ow} (PhX) egy aromás származék megoszlási hányadosa és P_{ow} (PhH) a kiindulási vegyület megoszlási hányadosa.

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

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

A definíció alapján a π-módszer általában aromás szubsztitúcióra alkalmazható. Nagy számú szubstituens π-értékeit (b)(c)(d) már táblázatba foglalták. Ezeket aromás molekulák vagy szubstruktúrák log P_{ow}-értékének kiszámításához használják.

A Rekker-féle módszer

Rekker szerint (g) a log P_{ow} érték kiszámítása a következőképpen történik:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_i \text{interakciós kifejezés}$$

ahol f_i a különböző molekuláris fragmentumkonstansok és a_i ezeknek a vizsgált molekulában való előfordulási gyakorisága. A korrekciós kifejezések egyetlen C_m konstans (egy úgynevezett „magic constant") egész számú többszöröseként fejezhetők ki. Az f_i és C_m fragmentumkonstansokat egy 1 054 kísérleti P_{ow}-értéket (825 vegyület) tartalmazó jegyzékből határozták meg többszörös regresszióanalízis (c)(h) segítségével. A interakciós kifejezések meghatározását az (e)(h)(i) szakirodalomban leírt szabályoknak megfelelően hajtották végre.

A Hansch-Leo-féle módszer

Hansch és Leo (c) szerint a log P_{ow} érték a következő összefüggésből számítható ki:

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

ahol f_i a különböző molekularész állandói, F_j a korrekciós kifejezések és a_i, b_j a megfelelő előfordulási gyakoriság. Kísérleti P_{ow} értékekből atomos és csoportfragmentálási értékek jegyzékét és F_j korrekciós kifejezések (úgynevezett „tényezők") jegyzékét határozták meg a fokozatos megközelítés módszerével. A korrekciós kifejezéseket több különböző osztályba sorolták be (a)(c). Viszonylag bonyolult és időigényes minden szabály és korrekciós kifejezés figyelembevétele. Szoftvercsomagokat fejlesztettek ki (b).

Összetett módszer

Összetett molekulák log P_{ow}-értékének számítása lényegesen javítható, ha a molekula nagyobb szerkezeti elemekre bontható, amelyekhez rendelkezésre állnak megbízható log P_{ow}-értékek táblázatokból (b)(c), vagy saját mérésekből. Az ilyen részek (például heterociklusok, antrakinon, azobenzol) ezután kombinálhatók a Hansch-féle π-értékekkel, vagy a Rekker- vagy Leo-féle rész állandókkal.

Megjegyzések

i. A számítási módszerek csak akkor alkalmazhatók részben vagy teljesen ionizált vegyületekhez, amikor lehetőség van a szükséges korrekciós tényező figyelembevételére.

ii. Amennyiben intramolekuláris hidrogénkötések feltételezhetők, hozzá kell adni a megfelelő korrekciós tagot (körülbelül + 0,6 és + 1,0 közötti log P_{ow} egységek) (a). Az ilyen kötések jelenlétét a molekula sztereomodelljei vagy spektroszkópikus adatai jelezhetik.

iii. Amennyiben több tautomeralak lehetséges, a legvalószínűbb alakot kell használni számítási alapként.

iv. A részkonstansok jegyzékeinek módosítását körültekintően kell végrehajtani.

Vizsgálati jelentés

A számítási/becslési módszerek használatakor a vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az anyag leírását (keverék, szennyeződések stb.),

– minden lehetséges intramolekuláris hidrogénkötés, disszociáció, töltés és minden egyéb szokatlan hatás (például tautoméria) jelzését,

– a számítási módszer leírását,

– az adatbázis azonosítását vagy a készlet ismertetését,

– a részek kiválasztásának sajátosságait,

– a számítás átfogó dokumentálását.

SZAKIRODALOM

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. függelék

HPLC-módszerhez javasolt referenciaanyagok

Száma	Referenciaanyag	log P_{ow}	pKa
1	2-butanon	0,3	
2	4-Acetilpiridin	0,5	
3	Anilin	0,9	
4	Acetanilid	1,0	
5	Benzilalkohol	1,1	
6	p-Metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoxiecetsav	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitril	1,6	
11	Fenilacetonitril	1,6	
12	4-Metilbenzil-alkohol	1,6	
13	Acetofenon	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-Nitrobenzoesav	1,8	pKa = 3,47
16	4-Klóranilin	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzol	1,9	
18	Fahéj alkohol	1,9	
19	Benzoesav	1,9	pKa = 4,19
20	p-Krezol	1,9	pKa = 10,17
21	Fahéjsav	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anizol	2,1	
23	Metilbenzoát	2,1	
24	Benzol	2,1	
25	3-Metilbenzoesav	2,4	pKa = 4,27
26	4-Klórfenol	2,4	pKa = 9,1
27	Triklóretilén	2,4	
28	Atrazin	2,6	
29	Etilbenzoát	2,6	
30	2,6-Diklórbenzonitril	2,6	
31	3-Klórbenzoesav	2,7	pKa = 3,82
32	Toluol	2,7	
33	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Diklóranilin	2,8	
35	Klórbenzol	2,8	
36	Allil-feniléter	2,9	
37	Brómbenzol	3,0	
38	Etilbenzol	3,2	
39	Benzofenon	3,2	
40	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Timol	3,3	
42	1,4-Diklórbenzol	3,4	
43	Difenilamin	3,4	pKa = 0,79
44	Naftalin	3,6	
45	Fenilbenzoát	3,6	
46	Izopropilbenzol	3,7	
47	2,4,6-Triklórfenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenil	4,0	
49	Benzil-benzoát	4,0	
50	2,4-Dinitro-6-szekunder butilfenol	4,1	
51	1,2,4-Triklórbenzol	4,2	
52	Dedekánsav	4,2	
53	Difeniléter	4,2	
54	n-Butilbenzol	4,5	
55	Fenantrin	4,5	
56	Fluorantén	4,7	
57	Dibenzil	4,8	
58	2,6-Difenilpiridin	4,9	
59	Trifenil-amin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Egyéb, alacsony log P_{ow}-értékű referenciaanyagok		
1	Nikotinsav	–0,07	

A.9. LOBBANÁSPONT

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag lobbanékonyságáról. A vizsgálati eljárás olyan folyékony anyagokhoz alkalmazható, amelyek gőzeit meggyújthatják gyújtóforrások. A leírásban felsorolt vizsgálati módszerek csak az egyes módszereknél megadott lobbanáspont-tartományoknál megbízhatóak.

A használni kívánt módszer kiválasztásakor vizsgálni kell az anyag és a mintatartó közötti kémiai reakciók lehetőségét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A lobbanáspont az a 101,325 kPa nyomásra korrigált legalacsonyabb hőmérséklet, amelyen a vizsgálati módszerben meghatározott feltételek mellett valamely folyadék olyan mennyiségben fejleszt gőzt, hogy a vizsgálati tartályban meggyújtható gőz/levegő keverék jön létre.

Mértékegységek: °C

$t = T - 273{,}15$

(t °C-ban és T K-ben)

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az anyagot vizsgálati tartályban helyezik el, és felmelegítik vagy lehűtik az egyes vizsgálati módszerekben leírt eljárásnak megfelelő vizsgálati hőmérsékletre. Gyújtási kísérleteket végeznek azért, hogy meggyőződjenek arról, fellobban-e vagy sem a minta a vizsgálati hőmérsékleten.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

1.5.1. **Ismételhetőség**

Az ismételhetőség a lobbanáspont-tartománynak és az alkalmazott vizsgálati módszernek megfelelően változik; maximum 2 °C.

1.5.2. **Érzékenység**

Az érzékenység az alkalmazott vizsgálati módszertől függ.

1.5.3. **Alkalmazhatóság**

Néhány vizsgálati módszer alkalmazhatósága bizonyos lobbanáspont-tartományokra korlátozódik, és az anyaggal kapcsolatos adatoktól (például magas viszkozitás) függ.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

A vizsgált anyagból vett mintát valamilyen vizsgáló készülékben helyezik el az 1.6.3.1. és/vagy 1.6.3.2. pontnak megfelelően.

Energiadús vagy toxikus anyagokhoz biztonsági okok miatt ajánlatos kis, körülbelül 2 cm^3 mintaméretet használó módszert alkalmazni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

A készüléket, amennyiben ez biztonsági szempontból megfelel, huzatmentes helyre kell helyezni.

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

1.6.3.1. *Egyensúlyi módszer*

Lásd az ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679-es szabványt.

1.6.3.2. *Nem egyensúlyi módszer*

Ábel-féle készülék:

Lásd a BS 2000 170. részét, az NF M07-011, NF T66-009 szabványt.

Ábel-Pensky-féle készülék:

Lásd az EN 57, DIN 51755 1. részét (5-től 65 °C-ig terjedő hőmérsékletekhez), a DIN 51755 2. részét (5 °C alatti hőmérsékletekhez), az NF M07-036 szabványt.

Tag-féle készülék:

Lásd az ASTM D 56 szabványt.

Pensky-Martens-féle készülék:

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

Megjegyzések:

Amennyiben az 1.6.3.2. pontban szereplő, nem egyensúlyi módszerrel meghatározott lobbanáspontról megállapítják, hogy az értéke 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C vagy 55 ± 2 °C, ezt az eredményt meg kell erősíteni az ugyanezt a készüléket használó valamilyen egyensúlyi módszerrel.

Bejelentéshez csak azok a módszerek használhatók, amelyek megadják a lobbanáspont hőmérsékletét.

Oldószereket tartalmazó, viszkózus folyadékok (festékek, ragasztó anyagok és ehhez hasonlóak) lobbanáspontjának meghatározásához csak viszkózus folyadékok lobbanáspontjának meghatározására alkalmas készülékek és vizsgálati módszerek használhatók.

Lásd az ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 1. részét.

2. **ADATOK**

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

– meg kell adni az alkalmazott módszert, valamint minden esetleges eltérést,

– az eredményeket és az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

Nincs.

A.10. TŰZVESZÉLYESSÉG (SZILÁRD ANYAGOK)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag lehetséges robbanási tulajdonságairól.

Ezt a vizsgálatot csak porszerű, szemcsés vagy pasztaszerű anyagokhoz szabad alkalmazni.

Ahhoz, hogy ne vizsgáljanak minden meggyújtható anyagot, hanem csak azokat, amelyek hevesen égnek, vagy égési tulajdonságai valamilyen ok miatt különösen veszélyesek, csak azok az anyagok tekinthetők tűzveszélyesnek, amelyek égési sebessége meghalad egy bizonyos határértéket.

A tűz eloltásakor jelentkező nehézségek miatt különösen veszélyes lehet, ha a fémporban izzás terjed. A fémporokat tűzveszélyesnek kell tekinteni, ha az anyagban az izzás terjedése egy előírt időtartamon belül van.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Égési idő, másodpercben kifejezve.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az anyagot megszakítás nélküli, körülbelül 250 mm hosszú csíkba vagy porsávba rendezik, és előzetes vizsgálatot hajtanak végre annak meghatározására, hogy gázlánggal meggyújtva lánggal terjed-e vagy parázslik-e. Amennyiben az előírt időtartamon belül a porcsík 200 mm-es szakasza mentén bekövetkezik a terjedés, teljes vizsgálati programot hajtanak végre az égési sebesség meghatározása érdekében.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előzetes screening vizsgálat**

Az anyagot körülbelül 250 mm hosszú, 20 mm széles és 10 mm magas, megszakítás nélküli csíkba vagy porsávba rendezik egy nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető-képességű alaplemezen.

Egy (legalább 5 mm átmérőjű) gázégőből forró lángot bocsátanak a porcsík egyik végére mindaddig, amíg a por meg nem gyullad, vagy maximum 2 percig (fémek vagy fémötvözetek porai esetében 5 percig). Figyelni kell, hogy az égés tovaterjed-e a csík 200 mm-es szakasza mentén a 4 perces vizsgálati időtartamon belül (vagy fémporok esetében 40 perc alatt). Amennyiben az anyag nem gyullad meg, és lángolva vagy parázszsal nem továbbítja az égést a porcsík 200 mm-es szakasza mentén a 4 perces (vagy 40 perces) vizsgálati időtartamon belül, akkor az anyagot nem szabad tűzveszélyesnek tekinteni, és további vizsgálat nem szükséges. Amennyiben az anyag kevesebb, mint 4 perc alatt vagy fémporok esetében kevesebb, mint 40 perc alatt továbbítja az égést a porcsík 200 mm-es szakasza mentén, az alábbiakban (az 1.6.2. pontban és azt követően) leírt eljárást végre kell hajtani.

1.6.2. **Égési sebesség vizsgálata**

1.6.2.1. *Előkészület*

Egy 250 mm hosszú, háromszög keresztmetszetű, 10 mm belső magasságú és 20 mm szélességű formába lazán betöltik a porszerű vagy szemcsés anyagokat. A forma mindkét oldalán, hosszirányban, két fémlemezt helyeznek el oldalsó határoló felületként, amelyek 2 mm-rel túlnyúlnak a háromszög keresztmetszetű alakzat felső szélén (lásd az ábrát). A formát ezután háromszor leejtik 2 cm magasságból valamilyen szilárd felületre. Amennyiben szükséges, a formát újból feltöltik vizsgálati anyaggal. Az oldalhatárolókat ezután eltávolítják, és a felesleges anyagot lekaparják. Valamilyen nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető-képességű alaplemezt helyeznek a forma tetejére, a készüléket megfordítják és a formát eltávolítják.

A pasztaszerű anyagokat nem éghető, nem porózus és kis hővezető-képességű alaplemezen terítik el 250 mm hosszúságú és körülbelül 1 cm^2 keresztmetszetű kötél alakjában.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

Nedvszívó anyag esetében a vizsgálatot az anyagnak a tartályból történt eltávolítása után a lehető leggyorsabban kell végrehajtani.

1.6.2.3. *A vizsgálat végrehajtása*

A halmot a elszívószekrény huzatába kell elhelyezni.

A levegősebességnek elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy megakadályozza az égéstermékeknek a laboratóriumba szökését, és ezt nem szabad változtatni a vizsgálat során. Huzaternyőt kell felszerelni a készülék köré.

Gázégőből (legalább 5 mm átmérőjű) kibocsátott forró lángot használnak az anyaghalom egyik végén történő meggyújtására. Amikor a halom már 80 mm távolságig égett, megmérik az égési sebességet a következő 100 mm mentén. A vizsgálatot hatszor hajtják végre, minden alkalommal tiszta, hideg lemezt használva, kivéve ha korábban pozitív eredményt kaptak.

2. **ADATOK**

Az értékeléshez az előzetes szűrővizsgálat (1.6.1.) során nyert égési idő és a legfeljebb hat vizsgálatban (1.6.2.3.) nyert legrövidebb égési idő kell.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

– a vizsgált anyag leírását, ennek fizikai állapotát, beleértve a nedvességtartalmat,

– az előzetes screening-vizsgálat és az égési sebesség vizsgálata során nyert eredményeket, amennyiben végeztek ilyen vizsgálatokat,

– az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A porszerű, szemcsés vagy pasztaszerű anyagokat tűzveszélyesnek kell tekinteni, amennyiben az 1.6.2. pontban leírt vizsgálati eljárásnak megfelelően végrehajtott bármely vizsgálat során az égési idő kevesebb, mint 45 másodperc. Fémek vagy fémötvözetek porait tűzveszélyesnek kell tekinteni, amennyiben meggyújthatók, és a láng vagy a reakciózóna 10 perc vagy ennél rövidebb idő alatt halad keresztül a teljes mintán.

4. **FELHASZNÁLT IRODALOM**

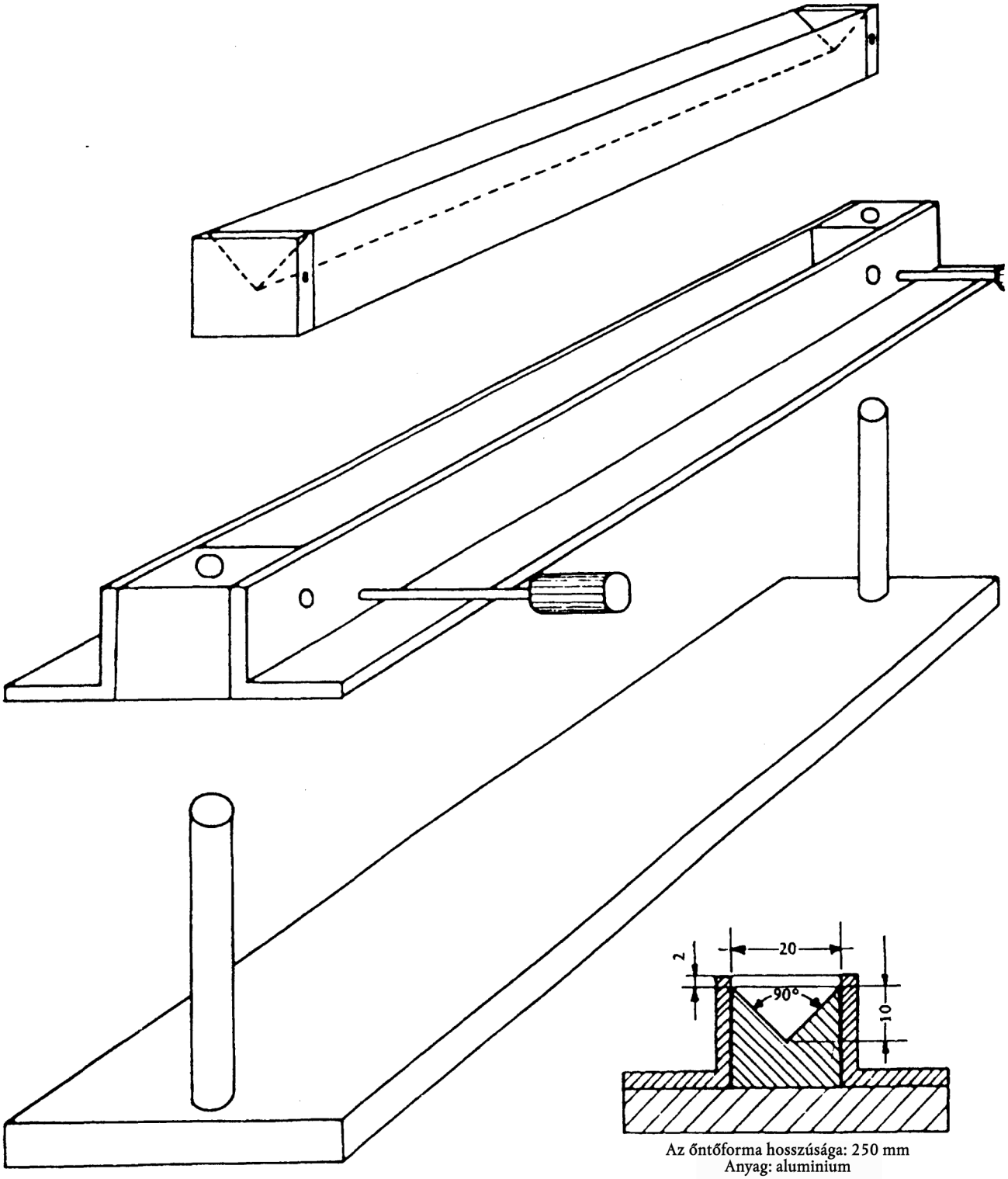
(1) NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

Függelék

Ábra

Forma és tartozékok a halom elkészítéséhez

(Minden méret mm-ben van megadva)



Az öntőforma hosszúsága: 250 mm
Anyag: aluminium

A.11. TŰZVESZÉLYESSÉG (GÁZOK)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

A módszer lehetővé teszi annak meghatározását, hogy levegővel kevert, szobahőmérsékletű (körülbelül 20 °C-os) és légköri nyomású gázok tűzveszélyesek-e, és ha igen, milyen koncentrációtartományban. A vizsgálati gáz levegővel alkotott, egyre növekvő gázkoncentrációjú keverékeit elektromos szikra hatásának teszik ki, és figyelik, hogy előfordul-e gyulladás.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A tűzveszélyességi tartomány az alsó és felső robbanási határ közötti koncentrációtartomány. Az alsó és felső robbanási határ a levegővel kevert, kismértékben tűzveszélyes gáznak azon koncentrációhatárai, amelyeknél nem jön létre lángterjedés.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Lépésenként növelik a gázkoncentrációt a levegőben, és a keveréket minden egyes szakaszban elektromos szikra hatásának teszik ki.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

A vizsgálati tartály egy függőleges, 50 mm minimális belső átmérőjű és 300 mm minimális magasságú üveghenger. A gyújtóelektródákat 3–5 mm távolságra vannak egymástól, és a henger aljától 60 mm-re helyezkednek el. A hengert nyomásmentesítő nyílással szerelték fel. A készüléket védőburkolattal kell ellátni mindenféle robbanásveszély korlátozására.

Gyújtóforrásként 0,5 szekundum időtartamú, álló, indukciós szikrát használnak, amelyet 10–15 kV kimeneti feszültségű (bemeneti teljesítmény maximum 300 W), nagyfeszültségű transzformátor hoz létre. A (2) szakirodalom az alkalmas készülék egy példáját írja le.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C) kell végrehajtani.

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

Adagoló szivattyúk segítségével ismert koncentrációjú, levegőbe kevert gázt visznek be az üveghengerbe. Szikrát vezetnek a keveréken keresztül, és megfigyelik, hogy elválik-e a láng a gyújtóforrástól és terjed-e önállóan. A gázkoncentrációt 1 térfogatszázalékos lépésekben változtatják, amíg be nem következik a gyulladás a fentieknek megfelelően.

Amennyiben a gáz kémiai szerkezete azt jelzi, hogy az valószínűleg nem tűzveszélyes, és kiszámítható a levegővel alkotott sztöchiometrikus keveréke, akkor csak a sztöchiometriai összetételnél 10 %-kal kisebb értékűtől a 10 %-kal nagyobb összetételig terjedő tartományban lévő keverékeket kell megvizsgálni 1 %-os lépésekben.

2. **ADATOK**

E tulajdonság meghatározásához a lángterjedés előfordulása az egyetlen lényeges információ.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

– a vizsgálathoz használt készülék leírását, a méreteivel együtt,

– azt a hőmérsékletet, amelyen a vizsgálatot végrehajtották,

– a vizsgált koncentrációkat és a kapott eredményeket,

– a vizsgálat eredményét: nem tűzveszélyes gáz vagy tűzveszélyes gáz,

– amennyiben arra a következtetésre jutottak, hogy a gáz nem tűzveszélyes, meg kell adni azt a koncentrációtartományt, amely felett 1 %-os lépésekben vizsgálták meg,

– az eredmények értelmezéséhez szükséges minden információt és megjegyzést közölni kell.

4. **SZAKIRODALOM**

(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.Crosse-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. „Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen”. Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol. 56, 2, 126–127.

A.12. TŰZVESZÉLYESSÉG (ÉRINTKEZÉS VÍZZEL)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálati módszer annak meghatározására használható, hogy valamely anyag vízzel vagy nedves levegővel létrejött reakciója olyan gáz vagy gázok fejlődéséhez vezet-e, amelyek tűzveszélyesek.

A vizsgálati módszer mind szilárd, mind folyékony anyagokhoz alkalmazható. E módszer nem alkalmazható olyan anyagoknál, amelyeknél öngyulladás lép fel, amikor levegővel érintkeznek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Tűzveszélyesek: azok az anyagok, amelyek vízzel vagy nedves levegővel érintkezve veszélyes mennyiségben, minimum 1 liter/kg/óra ütemben fejlesztenek tűzveszélyes gázokat.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az anyagot az alábbi lépések sorrendjének megfelelően vizsgálják; amennyiben valamely lépésnél gyulladás következik be, további vizsgálat nem szükséges. Amennyiben ismert, hogy az anyag nem lép erőteljes reakcióba vízzel, tovább kell haladni a 4. lépéshez (1.3.4.).

1.3.1. **1. lépés**

A vizsgált anyagot elhelyezik egy 20 °C hőmérsékletű desztillált vizet tartalmazó tálba, és figyelik, hogy a fejlődő gáz meggyullad-e.

1.3.2. **2. lépés**

A vizsgált anyagot egy 20 °C hőmérsékletű desztillált vizet tartalmazó edény felületén lebegő szűrőpapírra helyezik, és figyelik, hogy a fejlődő gáz meggyullad-e. A szűrőpapír arra szolgál, hogy egy helyen tartsa az anyagot a gyulladás lehetőségének növelésére.

1.3.3. **3. lépés**

A vizsgált anyagot egy körülbelül 2 cm magas és 3 cm átmérőjű halomba helyezik. Néhány csepp vizet adnak hozzá a halomhoz, és figyelik, hogy a fejlődő gáz meggyullad-e.

1.3.4. **4. lépés**

A vizsgált anyagot 20 °C hőmérsékletű desztillált vízzel keverik, és a gázfejlődés sebességét 7 órán keresztül mérik, 1 órás időközönként. Amennyiben a gázfejlődés sebessége egyenetlen vagy növekszik, 7 óra után a mérési időt meg kell növelni maximum 5 napra. A vizsgálat megállítható, ha a sebesség bármikor az 1 liter/kg/órát meghaladja.

1.4. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK LEÍRÁSA

1.6.1. **1. lépés**

1.6.1.1. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) hajtják végre.

1.6.1.2. *A vizsgálat végrehajtása*

Desztillált vizet tartalmazó tálba kismennyiségű (körülbelül 2 mm átmérőjű) vizsgált anyagot kell helyezni. Figyelni kell, hogy (i) fejlődik-e gáz, és hogy (ii) meggyullad-e a gáz. Amennyiben a gáz meggyullad, nincs szükség az anyag további vizsgálatára, mivel az anyagot veszélyesnek kell tekinteni.

1.6.2. **2. lépés**

1.6.2.1. *Készülék*

Valamilyen alkalmas tartályban, például egy 100 mm átmérőjű lepárlóedényben lévő desztillált víz felszínén szűrőpapírt lebegtetnek.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) hajtják végre.

1.6.2.3. *A vizsgálat végrehajtása*

A szűrőpapír közepére kismennyiségű (körülbelül 2 mm átmérőjű) vizsgált anyagot helyeznek. Figyelni kell, hogy (i) fejlődik-e gáz, és hogy (ii) meggyullad-e. Amennyiben a gáz meggyullad, nincs szükség az anyag további vizsgálatára, mivel az anyagot veszélyesnek kell tekinteni.

1.6.3. **3. lépés**

1.6.3.1. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) hajtják végre.

1.6.3.2. *A vizsgálat végrehajtása*

A vizsgált anyagot körülbelül 2 cm magasságú és 3 cm átmérőjű, a tetején mélyedéssel ellátott halomba helyezik. Néhány csepp vizet adnak a bemélyedt részhez, és figyelik, hogy (i) fejlődik-e gáz, és hogy (ii) meggyullad-e. Amennyiben a gáz meggyullad, az anyag további vizsgálatára nincs szükség, mivel az anyagot veszélyesnek kell tekinteni.

1.6.4. **4. lépés**

1.6.4.1. *Készülék*

A készülék felépítését az ábra mutatja.

1.6.4.2. *Vizsgálati körülmények*

Vizsgálni kell a vizsgált anyagot tartalmazó tartályt, hogy van-e benne 500 μm-nél kisebb (részecskeméretű) por. Amennyiben a por a teljes anyag több mint 1 tömegszázaléka, vagy ha a minta morzsálódik, akkor a teljes anyagot porrá kell őrölni vizsgálat előtt a tárolás és kezelés alatti részecskeméret csökkenésének figyelembevétele érdekében; egyébként az anyagot olyan állapotban kell megvizsgálni, ahogyan átvették. A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) és légköri nyomáson kell végrehajtani.

1.6.4.3. *A vizsgálat végrehajtása*

10–20 ml vizet öntenek a készülék csepegtetőtölcsérébe, és 10 gramm anyagot helyeznek a kúp alakú lombikba. A fejlődő gáz térfogata bármilyen, erre alkalmas eszközzel mérhető. Kinyitják a csepegtetőtölcsér elzárócsapját, hogy beengedjék a vizet a kúp alakú lombikba, és elindítanak egy stopperórát. A gázfejlődést óránként mérik a 7 órás időtartam során. Amennyiben ez alatt az időtartam alatt a gázfejlődés egyenetlen, vagy ha az időtartam végén növekszik a gázfejlődés sebessége, a méréseket folytatni kell, legfeljebb öt napig. Amennyiben a mérés során bármikor a gázfejlődés sebessége meghaladja az 1 liter/kg/órát, a vizsgálat megszakítható. Ezt a vizsgálatot háromszor kell elvégezni.

Amennyiben ismeretlen a gáz kémiai összetétele, elemezni kell a gázt. Amennyiben a gáz tűzveszélyes komponenseket tartalmaz, és nem ismert, hogy a teljes keverék tűzveszélyes-e, vagy sem, ugyanolyan összetételű keveréket kell készíteni, és megvizsgálni az A.11. módszernek megfelelően.

2. **ADATOK**

Az anyagot veszélyesnek kell tekinteni, ha:

– öngyulladás jön létre a vizsgálati eljárás bármelyik lépésében,

vagy

– 1 liter/kg anyag/óránál nagyobb sebességgel fejlődik kismértékben tűzveszélyes gáz.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

– a vizsgált anyag minden előkészítésének részleteit,

– a vizsgálatok eredményeit (1., 2., 3. és 4. lépés),

– a fejlődő gáz kémiai összetételét,

– a gázfejlődés sebességét, ha a 4. lépést (1.6.4.) végrehajtják,

– az eredmények értelmezéséhez lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

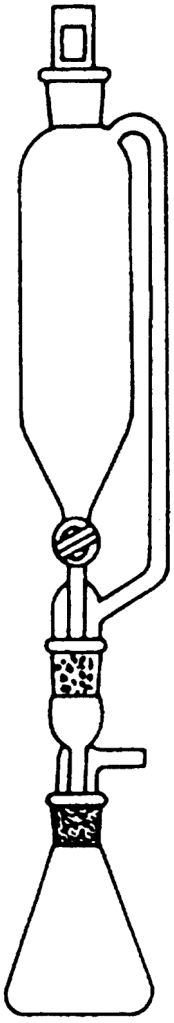
(1) Recommendation on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

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

Függelék

Ábra

Készülék



A.13. SZILÁRD ANYAGOK ÉS FOLYADÉKOK ÖNGYULLADÁSI KÉPESSÉGE

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

A vizsgálati eljárás olyan szilárd vagy folyékony anyagoknál alkalmazható, amelyek kis mennyiségekben öngyulladással meggyulladnak rövid idővel azután, hogy érintkezésbe lépnek a szobahőmérsékletű (körülbelül 20 °C-os) levegővel.

Azokra az anyagokra, amelyeket a gyulladás bekövetkezése előtt órákon vagy napokon át szobahőmérséklet vagy magas hőmérséklet hatásának kell kitenni, e vizsgálati módszer nem vonatkozik.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Azok az anyagok tekinthetők pirofórosnak, amelyek meggyulladnak vagy az 1.6. pontban leírt feltételek mellett szenesedést okoznak.

Folyadékoknál lehet, hogy az öngyulladást is meg kell vizsgálni az öngyulladási hőmérséklet (folyadékok és gázok) című A.15. módszer segítségével.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A szilárd vagy folyékony anyagot hozzáadják egy inert hordozóanyaghoz, és környezeti hőmérsékleten érintkezésbe hozzák a levegővel 5 perces időtartamig. Amennyiben a folyékony anyagok nem gyulladnak meg ilyen körülmények között, azokat szűrőpapírral felitatják, és környezeti hőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) levegő hatásának teszik ki 5 percre. Amennyiben a szilárd vagy folyékony anyag meggyullad vagy a folyékony anyag meggyújtja vagy elszenesíti a szűrőpapírt, akkor az anyagot pirofórosnak tekintik.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Ismételhetőség: a biztonsággal kapcsolatos jelentősége miatt egyetlen pozitív eredmény elegendő ahhoz, hogy az anyagot pirofórosnak tekintsék.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

Egy körülbelül 10 cm átmérőjű porceláncsészét szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) megtöltenek kovafölddel körülbelül 5 mm magasságig.

Megjegyzés:

A kovaföldet vagy bármilyen más, ehhez hasonló inert anyagot, amely könnyen beszerezhető, úgy kell kiválasztani, hogy olyan talajra legyen reprezentatív, amelyre a vizsgált anyag baleset esetén kifolyhat.

Száraz szűrőpapír szükséges olyan folyadékok vizsgálatához, amelyek levegővel érintkezve nem gyulladnak meg inert hordozóanyaggal történő érintkezéskor.

1.6.2. **A vizsgálat végrehajtása**

a) *Porszerű szilárd anyagok*

A vizsgálandó porszerű anyagból 1–2 cm^3-t kiöntenek körülbelül 1 méter magasságról egy nem éghető felületre, és figyelik, hogy meggyullad-e az anyag a leejtés során vagy az öntéstől számított 5 percen belül.

A vizsgálatot hat alkalommal hajtják végre, kivéve ha meggyullad az anyag.

b) *Folyadékok*

Körülbelül 5 cm^3 vizsgált folyadékot öntenek az előkészített porceláncsészébe, és figyelik, hogy 5 percen belül meggyullad-e az anyag.

Amennyiben nem gyullad meg a hatszor elvégzett vizsgálat során, a következő vizsgálatokat hajtják végre:

Fecskendőből 0,5 ml vizsgált anyagot helyeznek egy bevagdosott szűrőpapírra, és figyelik, hogy meggyullad-e, illetve elszenesedik-e a szűrőpapír a folyadék hozzáadásától számított 5 percen belül. A vizsgálatot háromszor hajtják végre, kivéve ha meggyullad vagy elszenesedik a szűrőpapír.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

A vizsgálat abbahagyható, amennyiben valamelyik vizsgálat eredménye pozitív.

2.2. ÉRTÉKELÉS

Amennyiben valamely inert hordozóanyaghoz való hozzáadás és levegő hatásának való expozíció után az anyag 5 percen belül meggyullad, vagy valamely folyékony anyag a levegő hatásának való expozíció után 5 percen belül elszenesít vagy meggyújt egy szűrőpapírt, az anyagot pirofórosnak tekintik.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

– a vizsgálatok eredményeit,

– az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

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

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

A.14. ROBBANÁSI TULAJDONSÁGOK

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

A módszer egy vizsgálatvázlatot ismertet annak meghatározására, hogy robbanásveszélyes-e valamely szilárd vagy pépes anyag, amikor láng (hőérzékenység), illetve ütés vagy súrlódás (mechanikai hatással szembeni érzékenység) hatásának van kitéve, és hogy robbanásveszélyes-e valamely folyékony anyag, amikor láng vagy ütés hatásának van kitéve.

A módszer három részből áll:

a) hőérzékenység vizsgálata (1);

b) ütéssel kapcsolatos mechanikai hatással szembeni érzékenység vizsgálata (1);

c) súrlódással kapcsolatos mechanikai hatással szembeni érzékenység vizsgálata (1).

A módszer bizonyos általános határ segítségével adatokat ad meg a robbanás bekövetkezése valószínűségének meghatározására. A módszert nem annak megállapítására tervezték, hogy bizonyos körülmények között képes-e az anyag robbanásra.

A módszer alkalmas annak meghatározására, hogy az anyag robbanásveszélyes-e (hő- és mechanikai hatással szembeni érzékenység) az irányelvben előírt különleges körülmények között. A módszer alapja számos, nemzetközileg széles körben használt készüléktípus (1), amelyek rendszerint kielégítő eredményeket adnak. Ismert, hogy a módszer nem ad végleges eredményt. A megadott készülék helyett használható más készülék, feltéve hogy az nemzetközileg elismert, és hogy az eredmények összeegyeztethetők a megadott készülékkel kapott eredményekkel.

A vizsgálatokat nem kell végrehajtani, amikor a rendelkezésre álló termodinamikai információk (például képződéshő, bomláshő) és/vagy a szerkezeti képletben egyes reakcióképes csoportok hiánya (2) vitathatatlanul bizonyossá teszi, hogy az anyag nem képes gázképződéssel vagy hőfelszabadulással járó gyors bomlásra (vagyis az anyag nem jelent semmilyen robbanásveszélyt). Folyadékoknál nincs szükség súrlódással kapcsolatos mechanikai hatással szembeni érzékenység vizsgálatra.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Robbanásveszélyes:

Azok az anyagok, amelyek láng hatására robbanhatnak, vagy amelyek a megadott készülékben az ütésre vagy rázásra érzékenyek (vagy mechanikai hatással szemben érzékenyebbek, mint az 1,3-dinitro-benzol az alternatív készülékben).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

1,3-dinitro-benzol, 0,5 mm-es szitán átszitált, rostált, kristályos technikai termék, a súrlódást és ütést vizsgáló módszerekhez.

Vizes ciklohexánonból átkristályosított, nedvesen szitált, 250 μm nyíláson átmenő és 150 μm nyílásméretű szitán visszamaradó, 103 ± 2 °C hőmérsékleten (4 órán át) szárított Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, hexogén, ciklonit – CAS 121-82-4) a második súrlódás- és ütésvizsgálat-sorozathoz.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Előzetes vizsgálatok szükségesek a három érzékenységvizsgálat végrehajtása érdekében a biztonságos körülmények létrehozásához.

1.4.1. **Biztonság a kezelés során – vizsgálatok (3)**

Biztonsági okok miatt a fő vizsgálatok végrehajtása előtt kismennyiségű (körülbelül 10 mg) anyagmintát – anélkül, hogy gázlángba beleérne – hevítenek, alkalmas formájú készülékben ütéssel, és egy üllőn fakalapács használatával vagy súrlódást létrehozó géppel súrlódás hatásának teszik ki. E vizsgálat célja meggyőződni arról, hogy érzékeny-e és robbanásveszélyes-e annyira az anyag, hogy az előírt érzékenységi vizsgálatokat, különösen a hőhatással szembeni érzékenységvizsgálatot, különleges óvintézkedések mellett kell-e végrehajtani a vizsgálatot végző személy sérülésének elkerülésére.

1.4.2. **Hőérzékenység**

A módszer magában foglalja az anyagnak a különböző nyílásátmérőjű mérőperemek által lezárt acélcsőben történő melegítését annak meghatározására, hogy hajlamos-e robbanásra az anyag erős hevítés és meghatározott mértékű fojtás mellett.

1.4.3. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (ütés)**

A módszer magában foglalja az anyag expozícióját olyan ütés hatásának, amelyet egy megadott magasságról leejtett, megadott tömeg hoz létre.

1.4.4. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (súrlódás)**

A módszer magában foglalja a szilárd vagy pépes anyagok expozícióját súrlódás hatásának, szabványosított felületek között, előírt terheléssel és relatív elmozdulással.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Hőérzékenység (láng hatása)**

1.6.1.1. *Készülék*

A készülék egy fűtő- és védőkészülékbe szerelt, újra fel nem használható acélcsőből, valamint annak újrahasználható zárószerkezetéből áll (1. ábra). Valamennyi cső acéllemezből, mélyhúzással készült (lásd a függeléket), 24 mm belső átmérőjű, 75 mm hosszúságú és 0,5 mm falvastagságú. A csövek a nyitott végükön peremmel vannak ellátva azért, hogy lezárhatók legyenek a zárólemez-szerkezettel. Ez egy központi furattal rendelkező, a csőhöz kétrészes csatlakozással (anya és menetes gyűrű) szorosan rögzített, nyomásálló zárólemezből áll. Az anya és a menetes gyűrű króm-mangán acélból készült (lásd a függeléket), amely egészen 800 °C hőmérsékletig szikramentes. A zárólemezek 6 mm vastagságú, hőálló acélból készültek (lásd a függeléket), és különböző nyílásátmérővel rendelkeznek.

1.6.1.2. *Vizsgálati körülmények*

Az anyagot az átvételkor rendszerint megvizsgálják, bizonyos esetekben, például ha préselt, öntött, vagy más módon tömörített anyagok esetében, szükség lehet az anyag aprítás utáni vizsgálatára.

Szilárd anyagok esetében az egyes vizsgálatok során használandó anyag mennyiségét kétszakaszos száraz futtatási eljárás segítségével határozzák meg. Egy kitáralt csövet, amelynek előzőleg megmérték az önsúlyát, megtöltenek 9 cm^3 anyaggal, és az anyagot tömörítik a cső teljes keresztmetszetére ható 80 N erővel. Biztonsági okokból vagy olyan esetekben, ahol összenyomással változtatható a minta fizikai alakja, más töltési eljárások is használhatók; például ha az anyag nagyon érzékeny a súrlódásra, a tömörítés nem megfelelő. Amennyiben az anyag összenyomható, addig folytatják a további anyagbevitelt és tömörítést, amíg a cső felső vége alatt 55 mm-re van feltöltve. Meghatározzák a cső 55 mm-es szintjéig a feltöltéshez használt össztömeget, és hozzáadnak két további adagot, mindkettőt 80 N erővel tömörítve. Ezután szükség szerint, tömörítéssel hozzáadnak vagy kivesznek anyagot úgy, hogy a töltési szint a cső felső végétől 15 mm-re legyen. A második száraz futtatást, az első száraz futtatásban megállapított teljes tömeg egyharmadának tömörített mennyiségével kezdik el. Hozzáadnak két további ilyen adagot 80 N tömörítéssel, és a csőben az anyagszintet a cső felső végétől 15 mm-re állítják be, szükség szerint anyag hozzáadásával vagy elvételével. A második száraz futtatásban meghatározott anyagmennyiséget használják minden egyes vizsgálathoz; a megtöltést három egyenlő mennyiségben hajtják végre, mindegyiket 9 cm^3-re sürítik össze olyan erővel, amely ehhez szükséges. (Ez megkönnyíthető menetes gyűrűk segítségével.)

Folyadékokat és géleket 60 mm-es magasságig töltenek be a csőbe, a gélek esetében különös gondossággal kell eljárni annak megakadályozása érdekében, hogy üregek alakuljanak ki. A menetes gyűrűt alulról a csőre csúsztatják, behelyezik a megfelelő zárólemezt, és meghúzzák az anyát valamennyi molibdén-diszulfid bázisú kenőanyag felvitele után. Lényeges annak ellenőrzése, hogy nem került anyag a karima és a lemez közé vagy a menetekbe.

A hevítést nyomásszabályozóval (60–70 mbar) felszerelt ipari palackból egy áramlásmérőn átvezetett és a négy égőhöz elosztócsövön keresztül egyenletesen elosztott (amelyet az égőkből a lángok vizuális megfigyelése jelez) propán biztosítja. Az égőket az 1. ábrának megfelelően a vizsgálati kamra köré helyezték el. A négy gázégő együttes fogyasztása körülbelül 3,2 liter propán/perc. Használhatók más éghető gázok és égők, de a hevítési sebességnek a 3. ábrán megadottnak kell lennie. Minden készülék esetében a hevítési sebességet rendszeres időközönként ellenőrizni kell dibutil-ftaláttal megtöltött csövek segítségével a 3. ábrának megfelelően.

1.6.1.3. *A vizsgálatok végrehajtása*

Minden egyes vizsgálatot addig kell végezni, amíg a cső szét nem esik vagy már 5 percig nem hevítették. Amennyiben a cső három vagy több darabra törik szét, amelyek néhány esetben a 2. ábrának megfelelően keskeny fémcsíkokkal összekapcsolhatók, ezt úgy értékelik, hogy robbanás történt. Az olyan vizsgálatokat, amelyeknél kevesebb töredék jön létre, vagy egyáltalán nem törik szét a cső, úgy tekintik, hogy nem eredményeznek robbanást.

Először egy három vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot hajtanak végre 6,0 mm átmérőjű zárólemezzel, és ha nem történik robbanás, egy második, három vizsgálatból álló vizsgálatsorozat hajtanak végre 2,0 mm átmérőjű mérőperemmel. Amennyiben a két vizsgálatsorozat végrehajtása során valamelyiknél robbanás történik, nincs szükség további vizsgálatokra.

1.6.1.4. *Kiértékelés*

A vizsgálat eredményét pozitívnak tekintik, ha a fenti vizsgálatsorozatok valamelyikében robbanás történt.

1.6.2. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (ütés)**

1.6.2.1. *Készülék (4. ábra)*

Egy jellegzetes ejtőkalapácsos készülék lényeges részei egy alaplappal ellátott öntöttacéltömb, üllő, oszlop, vezetők, ejtősúlyok, kioldó készülék és egy mintatartó. A 100 mm (átmérőjű) × 70 mm (magasságú) acéllüllőt a 450 mm (hosszúságú) × 450 mm (szélességű) × 60 mm (magasságú) öntött alaplappal ellátott, 230 mm (hosszúságú) × 250 mm (szélességű) × 200 mm (magasságú) acéltömb tetejéhez csavarozzák. Egy varratmentes húzott acélcsőből készült oszlopot rögzítettek az acéltömb hátsó részéhez csavarozott tartóba. Négy csavar rögzíti a készüléket egy tömör, 60 × 60 × 60 cm-es betontömbhöz úgy, hogy a vezető sínek tökéletesen függőlegesek, és az ejtősúly szabadon esik. A vizsgálathoz 5 és 10 kg-os, tömör acélból készült súlyokat alkalmaznak. Minden egyes súly ütőfeje HRC 60–63 keménységű és 25 mm-es minimális átmérőjű edzett acél.

A vizsgált mintát két koaxiális, egymás fölött elhelyezett, tömör acélhengerből álló ütőkészülékbe zárják egy hengeres acél vezetőgyűrű bemélyedésében. A tömör acélhengerek 10 (–0,003, –0,005) mm átmérőjűek és 2 mm magasságúak, és felületük csiszolt, szélük lekerekített (0,5 mm-es görbületi sugár), és HRC 58–65 keménységűek. A hengermélyedés külső átmérője 16 mm, magassága 13 mm, és egy 10 (+0,005, +0,010) mm-es csiszolt furattal kell rendelkeznie. Az ütőkészüléket acélból készült (26 mm átmérőjű és 26 mm magasságú), közbeeső üllőre szerelték, és egy, a füstgázok távozását lehetővé tevő, perforált gyűrűvel állítják középpontba.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

A minta térfogata 40 mm^3 vagy valamilyen alternatív készülékhez megfelelő térfogatú legyen. A szilárd anyagokat száraz állapotban kell vizsgálni, és a következőképpen kell előkészíteni:

a) a por alakú anyagokat szitálják (0,5 mm-es szitaméret); a szitán átjutó anyagot használják a vizsgálathoz;

b) a préselt, öntött vagy más módon tömörített anyagokat kis darabokra törik és szitálják; a 0,5 és 1 mm közötti átmérőjű szitált frakciót használják a vizsgálathoz, a szitált frakciónak az eredeti anyagra reprezentatívnak kell lennie.

Az általában pép formájában szállított anyagokat, amennyiben lehetséges, száraz állapotban, vagy minden esetben a lehető legnagyobb mennyiségű oldószer eltávolítását követően kell vizsgálni. A folyékony anyagokat a felső és alsó acélhengerek között 1 mm-es réssel vizsgálják.

1.6.2.3. *A vizsgálatok végrehajtása*

Hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot hajtanak végre, a 10 kg-os tömeget 0,40 méterről (40 J) ejtik le. Amennyiben robbanás következik be a 40 J-vel végrehajtott hat vizsgálat valamelyike során, további hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot kell végrehajtani, ahol 5 kg-os tömeg kell leejteni 0,15 méterről (7,5 J). Más készülékekben a mintát összehasonlítják a kiválasztott referenciaanyaggal egy meghatározott eljárás (például fel-le módszer stb.) segítségével.

1.6.2.4. *Értékelés*

A vizsgálat eredményét pozitívnak tekintik, ha az előírt ütőkészülékkel végrehajtott vizsgálatok bármelyikében legalább egyszer robbanás következik be (ezzel egyenértékű a lángba borulás és/vagy durranás), vagy a minta érzékenyebbnek bizonyul, mint az 1,3-dinitro-benzol vagy az RDX valamelyik alternatív ütésvizsgálatban.

1.6.3. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (súrlódás)**

1.6.3.1. *Készülék (5. ábra)*

A súrlódásérzékenységet vizsgáló berendezés egy öntöttacél alaplemezből áll, amelyre a súrlódási érzékenységet vizsgáló készüléket felszerelték. Ez a készülék egy rögzített porcelánhengerből és egy mozgó porcelánlapból áll. A porcelánlapot egy kocsin tartják, amely két csúszópályán fut. A kocsit hajtórúd, hüvelyvonó karom és alkalmas hajtómű csatlakoztatja a villamos motorhoz úgy, hogy a porcelánlap csak egyszer mozdul előre és hátra 10 mm-t a porcelánhenger alatt. A porcelánhenger terhelhető, például 120 vagy 360 newtonnal.

A porcelánlapok fehér ipari porcelánból (9–32 μm érdesség) készültek, és 25 mm (hosszúság) × 25 mm (szélesség) × 5 mm (magasság) méretűek. A porcelánhenger ugyancsak fehér ipari porcelánból készült, és ez 15 mm hosszú, 10 mm átmérőjű és 10 mm görbületi sugarú, érdesített gömbszeletekkel rendelkezik.

1.6.3.2. *Vizsgálati körülmények*

A minta térfogata 10 mm^3 vagy az adott alternatív berendezésnek megfelelő térfogatú legyen.

A szilárd anyagokat száraz állapotban vizsgálják, és a következőképpen készítik elő:

a) a por alakú anyagokat szitálják (0,5 mm-es szitaméret); a szitán átjutó anyagot használják a vizsgálathoz;

b) a préselt, öntött vagy más módon tömörített anyagokat darabokra törik és szitálják; a < 0,5 mm átmérőjű szitált frakciót használják vizsgálathoz.

Az általában pép formában szállított anyagokat, amennyiben lehetséges, száraz állapotban kell megvizsgálni. Amennyiben az anyag száraz állapotban nem készíthető el, a pépet (a lehető legnagyobb oldószermennyiség eltávolítása után) egy formával készített, 0,5 mm vastag, 2 mm széles, 10 mm hosszú filmként vizsgálják.

1.6.3.3. *A vizsgálatok végrehajtása*

A porcelánhengert a vizsgált mintára helyezik, és ráadják a terhelést. A vizsgálat végrehajtásakor a porcelánlap porozitási jelzésének harántirányban kell állnia a mozgás irányával. Ügyelni kell arra, hogy amikor a hengert a mintára helyezik, elegendő vizsgált anyag legyen a henger alatt, és a lap megfelelően mozogjon a henger alatt. Pépes anyagokhoz egy 2 × 10 mm-es nyílású, 0,5 mm vastag mérőeszközt használnak az anyag lapra történő felvitelére. A porcelánlapnak 10 mm-t kell előre és visszafelé mozognia a porcelánhenger alatt 0,44 másodpercen belül. A lap és henger felületének minden részét csak egyszer szabad használni; a henger két vége két vizsgálathoz, a lap két felülete felületenként három vizsgálathoz használható.

Hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot hajtanak végre 360 N terheléssel. Amennyiben pozitív eredményt kapnak ez alatt a hat vizsgálat alatt, további hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot kell végrehajtani 120 N terheléssel. Egy másik készülékben a mintát összehasonlítják a kiválasztott referenciaanyaggal egy erre meghatározott eljárás (például fel-le módszer) segítségével.

1.6.3.4. *Értékelés*

A vizsgálati eredmény akkor tekinthető pozitívnak, ha az előírt súrlódási érzékenységet vizsgáló berendezéssel végrehajtott vizsgálatok valamelyikében legalább egyszer robbanás jön létre (a robbanással egyenértékű a sercegés és/vagy a csattanás vagy lángba borulás), vagy egy alternatív súrlódásvizsgálat során teljesül az ezzel egyenértékű követelmény.

2. **ADATOK**

Elvben az anyagot az irányelv értelmében robbanásveszélyesnek kell tekinteni, ha a hő, ütés vagy súrlódási érzékenység vizsgálata során pozitív eredményt kapnak.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– a vizsgált anyag azonosítását, összetételét, tisztaságát, nedvességtartalmát stb.,

– a minta fizikai jellemzőit, és annak feltüntetését, hogy őrölték, aprították és/vagy szitálták-e az anyagot,

– a hőérzékenységi vizsgálatok során tett megfigyeléseket (például a minta tömege, száma stb.),

– a mechanikai hatással szembeni érzékenység vizsgálatok során tett megfigyeléseket (például jelentős mennyiségű füst képződése vagy teljes elbomlás csattanás nélkül, lángok, szikra, csattanás, sistergés, ropogás stb.),

– minden egyes típusú vizsgálat eredményét,

– ha alternatív készüléket használtak, meg kell adni az adott készülékkel kapott eredmények és az egyenértékű készülékkel kapott eredmények közötti korreláció tudományos indoklását, valamint prioritását,

– minden hasznos megjegyzést, ilyen például a hivatkozás a hasonló termékekkel végrehajtott vizsgálatokra, amely lényeges lehet az eredmények megfelelő értelmezéséhez,

– az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE

A vizsgálati jelentésnek tartalmaznia kell minden hamis, rendellenes, illetve nem jellemző eredményt. Amennyiben a vizsgálatok közül bármelyiket figyelmen kívül kell hagyni, meg kell adni annak magyarázatát és minden alternatív vagy kiegészítő vizsgálat eredményeit. A rendellenes eredményt el kell fogadni névértéken, és az anyagot ennek megfelelően osztályozni kell, kivéve ha az eredmény megmagyarázható.

4. **SZAKIRODALOM**

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

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

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

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

Függelék

Példa az anyag meghatározására a hőérzékenység-vizsgálathoz (lásd a DIN 1623 szabványt)

(1) Cső: 1.0336.5056 g számú anyagmeghatározás

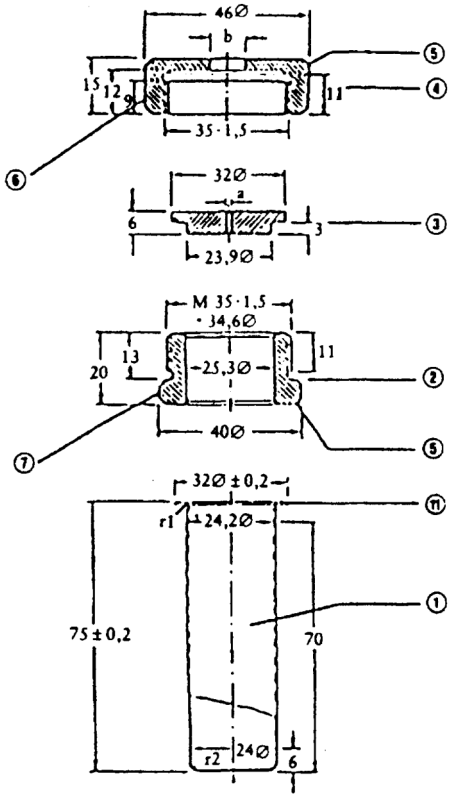
(2) Zárólemez: 1.4873 számú anyagmeghatározás

(3) Menetes gyűrű és anya: 1.3817 számú anyagmeghatározás

1. ábra

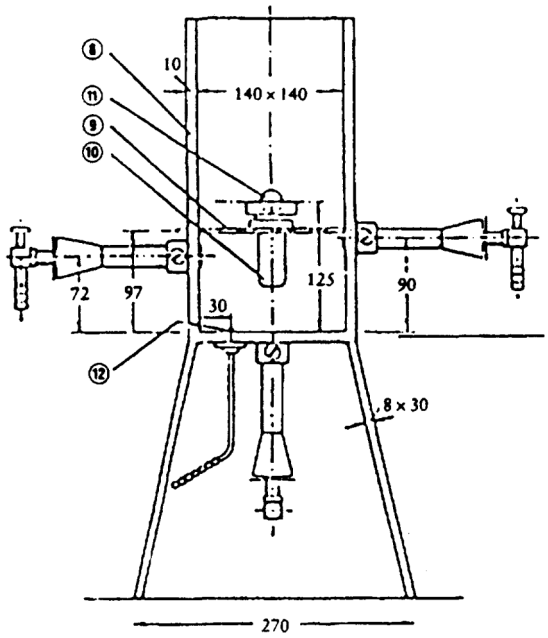
Hőérzékenységet vizsgáló készülék

(minden méret mm-ben van megadva)



1a. ábra. Acélcső és tartozékok

(1) cső
(1a) külső perem
(2) menetes gyűrű; kis súrlódású menet
(3) blende, a = 2,0 vagy 6,0 mm átmérő
(4) anya, b = 10 mm átmérő
(5) lekerekített felület
(6) 2 lemezfedél 41-es méretű villáskulcshoz



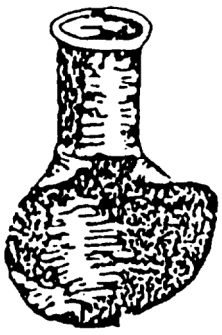
1b. ábra. Fűtő- és védőkészülék

(7) 2 lemezfedél 36-os méretű villáskulcshoz
(8) repeszálló kamra
(9) 2 csőtartó rúd
(10) felszerelt cső
(11) hátsó égő helye; a többi égő látható
(12) gyújtócső

2. ábra

Hőérzékenység-vizsgálat

Példák a széttörésre



Nincs robbanás



Nincs robbanás



Robbanás



Robbanás



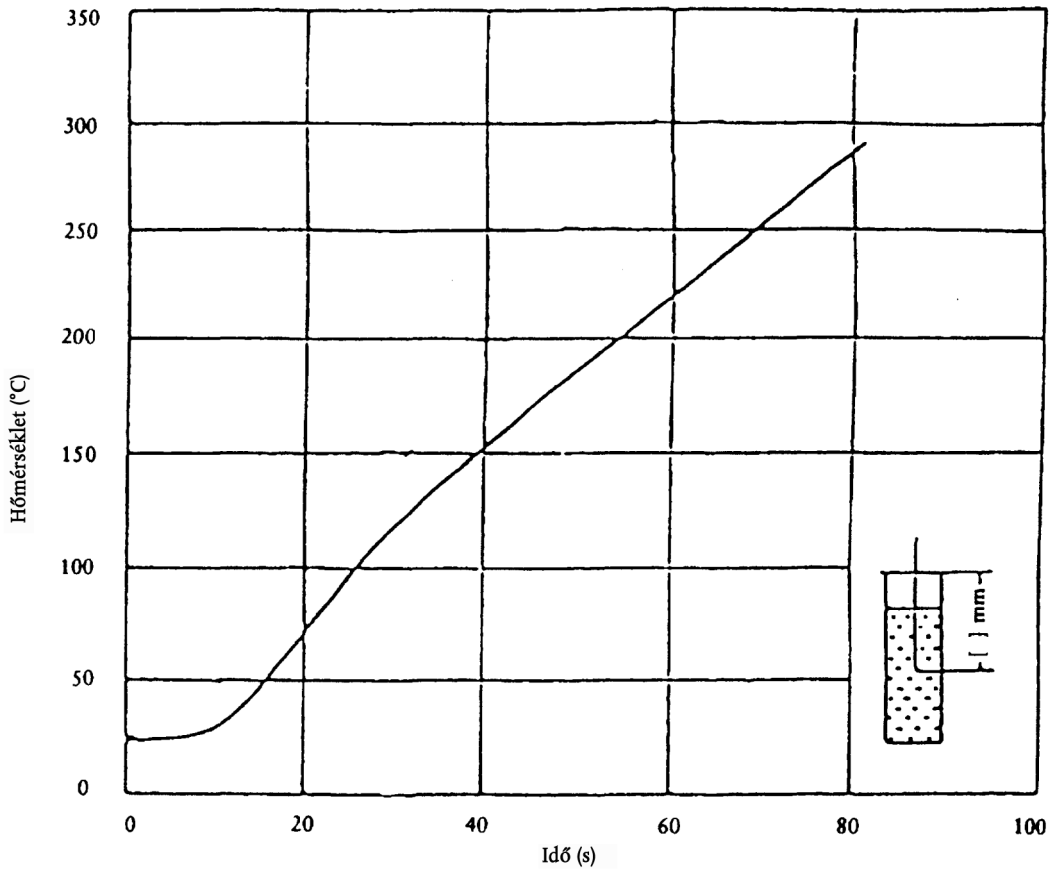
Robbanás



Robbanás

3. ábra

Hevítési sebesség kalibrációja a hőérzékenység-vizsgálathoz

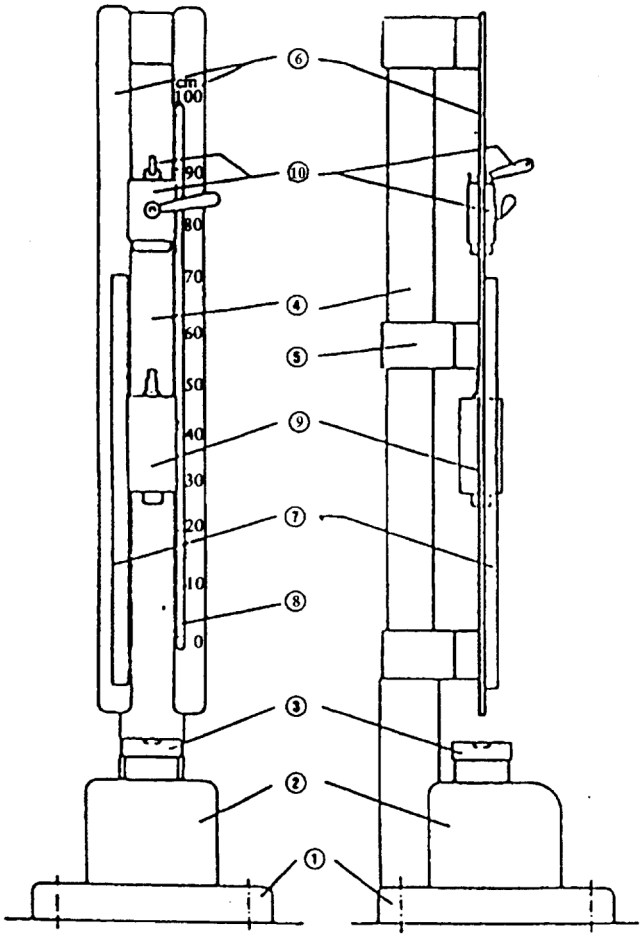


Egy zárt (1,5 mm-es zárólemez) csőben 3,2 liter/perces áramlási sebességű propán segítségével dibutil-ftalát (27 cm^3) melegítésekor kapott hőmérséklet/idő görbe. A hőmérsékletet egy 1 mm átmérőjű, középre, 43 mm-rel a cső pereme alá helyezett rozsdamentes acéllal bevont kromel/alumel termoelemmel mérik. 135 °C és 285 °C között a hevítési sebességnek 185 és 215 K/perc között kell lennie.

4. ábra

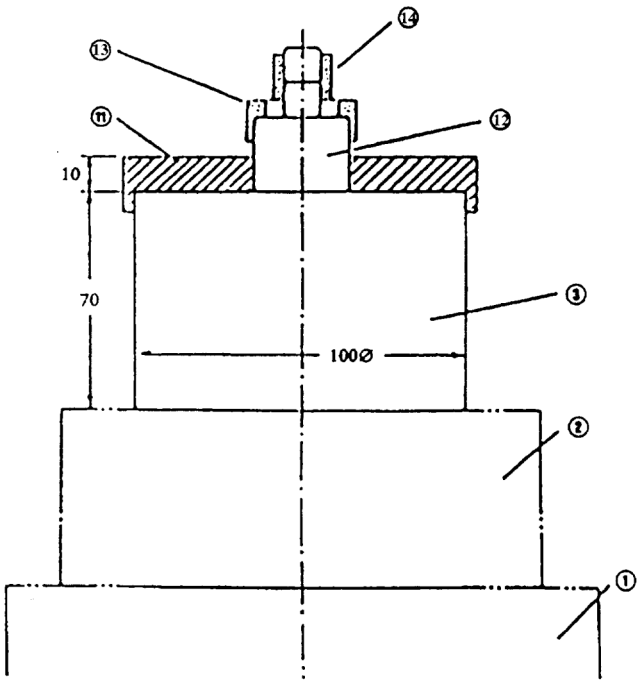
Ütési érzékenységet vizsgáló készülék

(minden méret mm-ben van megadva)



4a. ábra: Ejtőkalapács, elölnézet és oldalnézet, általános nézet

(1) alaptest, 450 × 450 × 60
(2) acéltömb, 230 × 250 × 200
(3) üllő, 100 átmérő × 70
(4) oszlop
(5) középső keretelem
(6) 2 vezetősín
(7) fogazott tartó

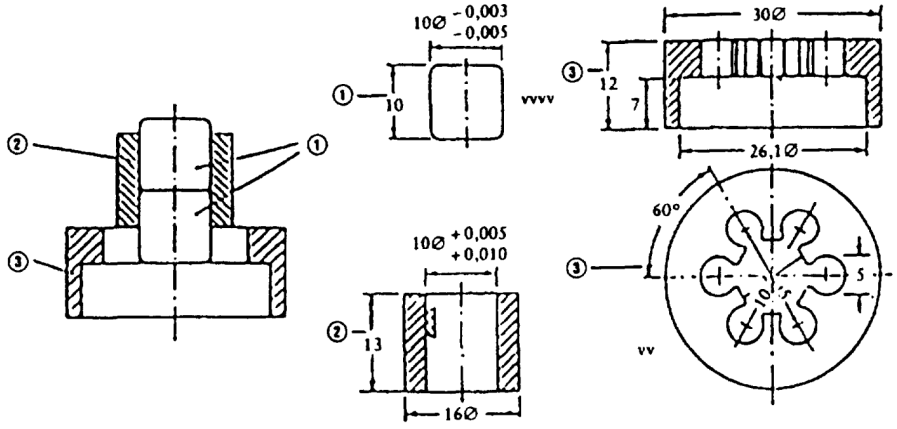


4b. ábra: Ejtőkalapács, alsó rész

(8) skála
(9) ejtőkalapács (leeső tömeg)
(10) tartó és kioldó készülék
(11) rögzítő lemez
(12) közbenső üllő (cserélhető), 26 átmérő × 26
(13) centírozó gyűrű átfolyónyílásokkal
(14) ütőkészülék

4. ábra

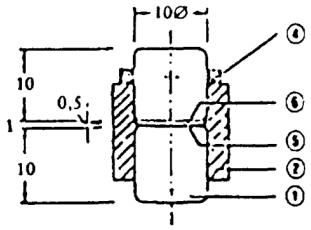
Folytatás

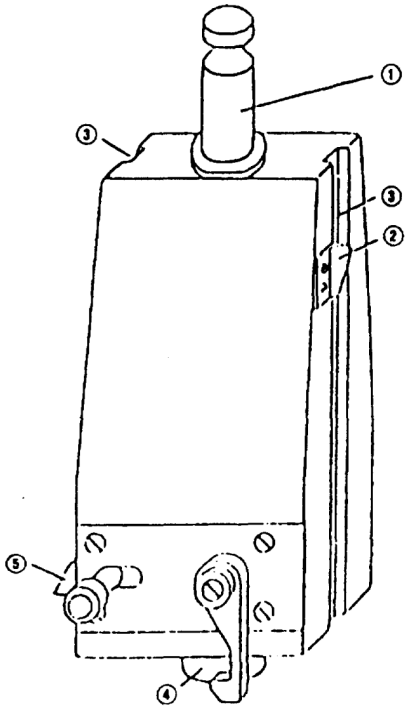


4c. ábra: Ütőkészülék por alakú vagy pépszerű anyagokhoz

(1) acélhengerek
(2) vezetőgyűrű acélhengerekhez
(3) centírozó gyűrű áramlásnyílásokkal
a) függőleges metszet
b) felülnézet
(4) gumigyűrű
(5) folyékony anyag (40 mm³)
(6) folyadékmentes tér

4d. ábra: Ütőkészülék folyékony anyagokhoz



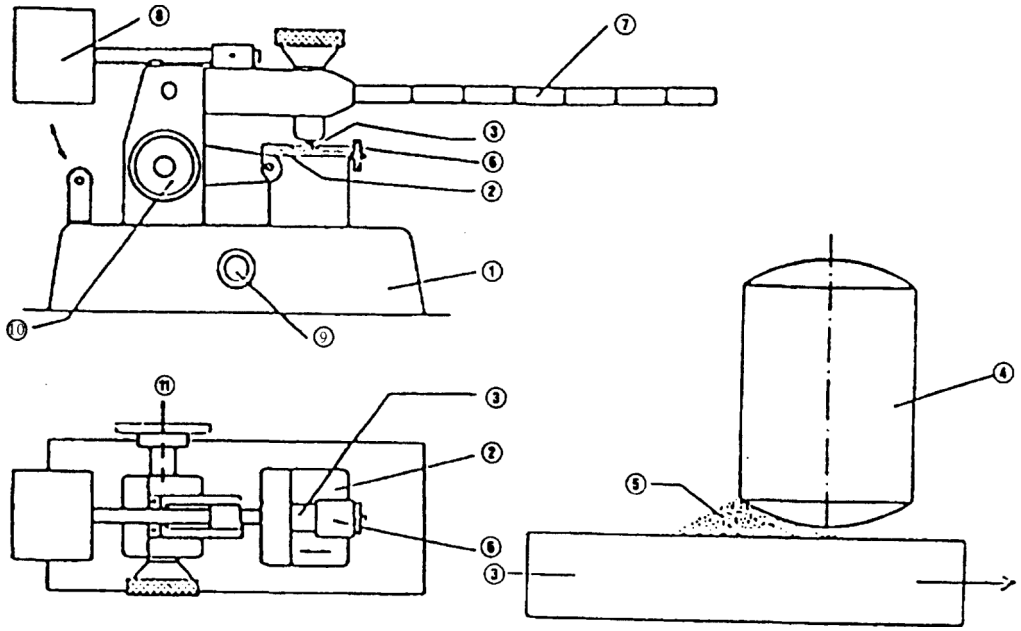


4e. ábra: Kalapács (5 kg-os leeső tömeg)

(1) felfüggesztő csap
(2) magasságjelző
(3) beállító vájat
(4) hengeres ütőfej
(5) visszaugró befogás

5. ábra

Súrlódási érzékenységet vizsgáló készülék



5a. ábra: Súrlódási érzékenységet vizsgáló készülék: függőleges nézet és felülnézet

(1) acélalap
(2) mozgatható kocsi
(3) porcelánlap, 25 × 25 × 5 mm, a kocsira rögzítve
(4) rögzített porcelánhenger, 10 mm átmérőjű × 15 mm
(5) vizsgált minta, körülbelül 10 mm^3

5b. ábra: A mintán a henger kezdőhelyzete

(6) hengertartó
(7) terhelő kar
(8) ellensúly
(9) kapcsoló
(10) kerék a kocsi kiindulási helyzetbe állításához
(11) a villanymotor felé mutató irány

A.15. ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLET (FOLYADÉKOK ÉS GÁZOK)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Robbanásveszélyes és környezeti hőmérsékleten levegővel érintkezve öngyulladó anyagokat nem lehet ezen eljárással vizsgálni. A vizsgálati eljárás olyan gázokhoz, folyadékokhoz és gőzökhöz alkalmazható, amelyek forró felülettel érintkezve meggyulladhatnak.

Az öngyulladási hőmérsékletet jelentős mértékben csökkentheti a katalitikus szennyeződések jelenléte, a felület anyaga vagy a vizsgálati tartály nagyobb térfogata.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az öngyulladási képesség mértéke az öngyulladási hőmérséklet segítségével fejezhető ki. Az öngyulladási hőmérséklet az a legalacsonyabb hőmérséklet, amelyen a vizsgált anyag levegővel keverve meggyullad a vizsgálati módszerben meghatározott körülmények között.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

A szabványok tartalmazzák a referenciaanyagokat (lásd az 1.6.3. pontot). Ezeknek elsősorban a módszer megfelelőségének időnkénti ellenőrzésére és a más módszerekkel kapott eredményekkel való összehasonlítás lehetővé tételére kell szolgálniuk.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A módszer meghatározza valamely körülkerített tér belső felületének azt a minimális hőmérsékletét, amelynél meggyullad az e térbe fecskendezett gáz, gőz vagy folyadék.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az ismételhetőség az öngyulladási hőmérsékletek tartományának és az alkalmazott vizsgálati módszernek megfelelően változik.

Az érzékenység és specifikusság az alkalmazott vizsgálati módszertől függ.

1.6. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

A készüléket az 1.6.3. pontban említett módszer írja le.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

A vizsgált anyagmintát az 1.6.3. pontban említett módszernek megfelelően vizsgálják.

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

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

2. **ADATOK**

Regisztrálni kell a vizsgálati hőmérsékletet, a légköri nyomást, a felhasznált minta mennyiségét és a gyulladás bekövetkezéséig eltelt holtidőt.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

– a felhasznált minta mennyiségét, a légköri nyomást,

– a vizsgálathoz használt készüléket,

– a mérések eredményeit (vizsgálati hőmérsékletek, gyulladással kapcsolatos eredmények, megfelelő holtidők),

– az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

Nincs.

A.16. SZILÁRD ANYAGOK RELATÍV ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLETE

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Robbanásveszélyes és környezeti hőmérsékleten levegővel érintkezve öngyulladó anyagokat nem szabad alávetni ennek a vizsgálatnak.

A vizsgálat célja előzetes információk biztosítása szilárd anyagok magas hőmérsékleteken bekövetkező öngyulladásáról.

Amennyiben az anyagnak oxigénnel történő reakciója, vagy az exoterm bomlás során fejlődő hő nem elég gyorsan áramlik a környezetbe, öngyulladáshoz vezető önmelegedés jön létre. Az öngyulladás tehát akkor következik be, amikor a hőtermelés üteme meghaladja a hőveszteség ütemét.

A vizsgálati eljárás hasznos mint előzetes szűrővizsgálat szilárd anyagoknál. Tekintettel a szilárd anyagok gyulladásának és égésének bonyolult természetére, e vizsgálati módszernek megfelelően meghatározott öngyulladási hőmérsékletet csak összehasonlítási célokra szabad használni.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az e módszerrel kapott öngyulladási hőmérséklet az a °C-ban kifejezett minimális környezeti hőmérséklet, amelynél meghatározott körülmények között meghatározott mennyiségű anyag meggyullad.

1.3. REFERENCIAANYAG

Nincs.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Meghatározott térfogatú vizsgált anyagot szobahőmérsékletű kemencébe helyeznek; majd regisztrálják a minta közepére vonatkozó hőmérséklet/idő görbét, miközben a kemence hőmérsékletét 0,5 °C/perc sebességgel 400 °C-ra vagy olvadáspontra emelik, amennyiben az kisebb 400 °C-nál. E vizsgálat alkalmazásában öngyulladási hőmérséklet a kemencének az a hőmérséklete, amelynél a minta hőmérséklete önmelegedéssel eléri a 400 °C-t.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs.

1.6. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

1.6.1.1. *Kemence*

Természetes levegőkeringtetéssel és robbanás elleni szeleppel ellátott, hőmérséklet-programozott laboratóriumi kemence (körülbelül 2 liter térfogatú). A lehetséges robbanásveszély elkerülése érdekében nem szabad engedni, hogy bármilyen gázhalmazállapotú bomlástermék kapcsolatba lépjen az elektromos fűtőelemekkel.

1.6.1.2. *Dróthálókocka*

Az 1. ábrán látható mintának megfelelő 0,045 mm-es nyílásokkal rendelkező, rozsdamentes acél dróthálót kell kivágni. A hálót össze kell hajtogatni nyitott tetejű kockává, és huzallal rögzíteni kell.

1.6.1.3. *Termoelemek*

Alkalmas termoelemek.

1.6.1.4. *Regisztráló készülék*

Bármely, 0-tól 600 °C-ig vagy ennek megfelelő feszültségre kalibrált, kétcsatornás regisztráló készülék.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

Az anyagokat az átvételüknek megfelelő állapotukban vizsgálják.

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

A kockát megtöltik a vizsgált anyaggal, és gyenge ütögetéssel tömörítik, majd további anyagot adnak hozzá, amíg teljesen meg nem telik a kocka. A kockát ezután szobahőmérsékleten felfüggesztik a kemence közepén. Az egyik termoelemet a kocka közepére helyezik, a másikat a kocka és a kemence fala közé a kemence hőmérsékletének regisztrálására.

A kemence és a minta hőmérsékletét folyamatosan regisztrálják, miközben 0,5 °C/perc sebességgel 400 °C-ra, vagy ha az olvadási pont ennél alacsonyabb, akkor az olvadási pontra növelik a kemence hőmérsékletét.

Amennyiben az anyag meggyullad, a mintában lévő termoelem nagyon hirtelen hőmérsékletnövekedést fog mutatni a kemence hőmérsékletéhez képest.

2. **ADATOK**

Az értékeléshez lényeges a kemencének az a hőmérséklete, amelynél a minta hőmérséklete önmelegedéssel eléri a 400 °C-t (lásd a 2. ábrát).

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– a vizsgált anyag leírását,

– a mérés eredményeit, a hőmérséklet/idő görbét is ideértve,

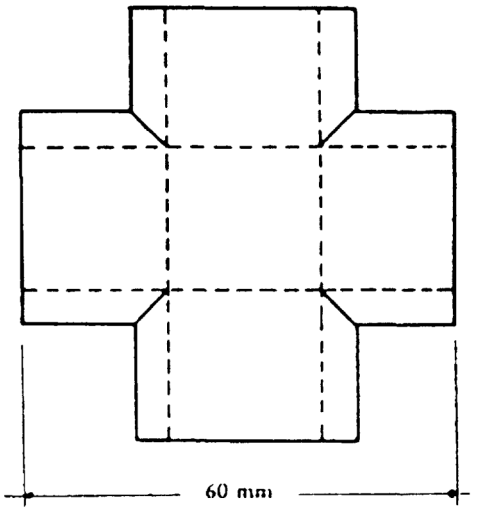
– az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

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

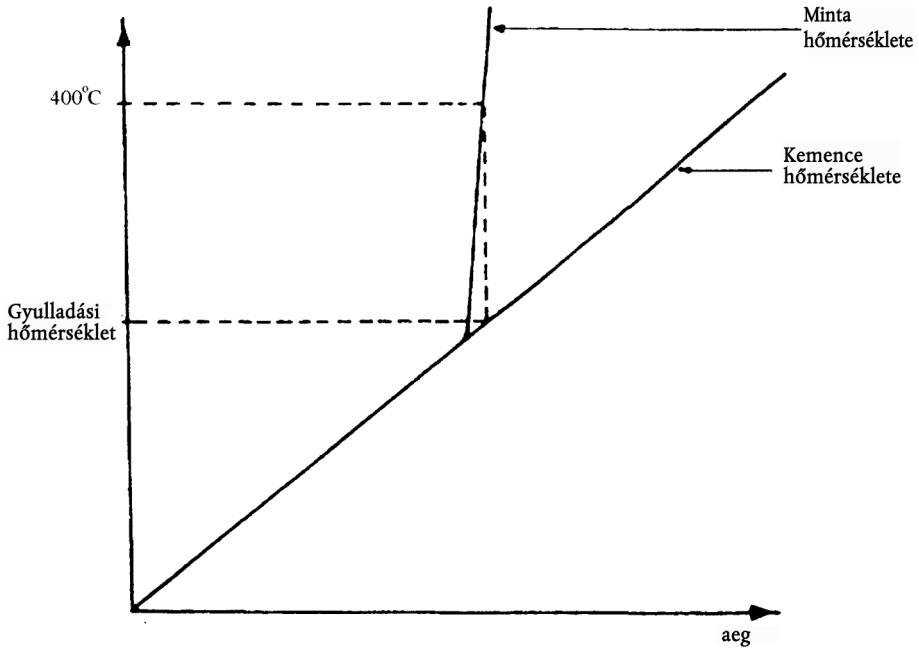
1. ábra

20 mm-es vizsgálati kocka sémája



2. ábra

Jellegzetes hőmérséklet/idő görbe



A.17. OXIDÁLÓ TULAJDONSÁGOK (SZILÁRD ANYAGOK)

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag minden lehetséges robbanási tulajdonságáról.

Ez a vizsgálat nem alkalmazható folyadékokhoz, gázokhoz, robbanásveszélyes vagy tűzveszélyes anyagokhoz vagy szerves peroxidokhoz.

A vizsgálatot nem kell végrehajtani, ha a szerkezeti képlet vizsgálata minden kétség nélkül kimutatja, hogy az anyag nem képes exoterm reakcióba lépni éghető anyaggal.

Előzetes vizsgálatot kell végrehajtani annak megállapítására, hogy különleges óvintézkedésekkel kell-e végrehajtani a vizsgálatot.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁS ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Égési idő: az 1.6. pontban leírt eljárást követve, az a másodpercben meghatározott reakcióidő, amely alatt a reakciózónában az égés az anyagnyaláb mentén szétterjed.

Égési sebesség: milliméter/szekundumban kifejezve.

Maximális égési sebesség: 10–90 súlyszázalékban oxidálószert tartalmazó keverékekkel kapott égési sebességek közül a legnagyobb érték.

1.3. REFERENCIAANYAG

A vizsgálathoz és az előzetes vizsgálathoz referenciaanyagként (analitikai tisztaságú) bárium-nitrátot használnak.

A referenciakeverék az a bárium-nitrátnak cellulózporral alkotott, az 1.6. pontnak megfelelően elkészített (rendszerint 60 tömegszázalékos bárium-nitrátot tartalmazó) keveréke, amelynek maximális az égési sebessége.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Biztonsági okokból előzetes vizsgálatot hajtanak végre. Nincs szükség további vizsgálatra, amennyiben az előzetes vizsgálat világosan jelzi, hogy a vizsgált anyagnak oxidáló tulajdonságai vannak. Ellenkező esetben az anyagot teljes vizsgálatnak kell alávetni.

A teljes vizsgálat során a vizsgált anyag és valamilyen meghatározott éghető anyag különböző arányú keverékét kell alkalmazni. Ezután minden egyes keverékből kialakítanak egy halmot, és a halmot az egyik végén meggyújtják. A meghatározott maximális égési sebességet összehasonlítják a referenciakeverék maximális égési sebességével.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Amennyiben szükséges, az őrlés és keverés bármilyen módszere megfelel, feltéve hogy a hat különálló vizsgálatban a maximális égési sebesség 10 %-nál nem nagyobb mértékben tér el a számtani középértéktől.

1.6. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészítés**

1.6.1.1. *A vizsgált anyag*

A vizsgált anyagot < 0,125 mm-es részecskeméretűre őrlik a következő eljárás segítségével: a vizsgált anyag szitálása, a visszamaradó anyag őrlése, az eljárás megismétlése, amíg a teljes vizsgált anyag keresztül nem halad a szitán.

A minőségi követelménynek megfelelő bármilyen őrlési és szitálási módszer használható.

A keverék előkészítése előtt az anyagot 105 °C hőmérsékleten súlyállandóságig szárítják. Amennyiben a vizsgált anyag bomlási hőmérséklete 105 °C alatt van, az anyagot alacsonyabb hőmérsékleten kell megszárítani.

1.6.1.2. *Éghető anyag*

Éghető anyagként por alakú cellulózt használnak. A cellulóznak vékonyfilm- vagy oszlopkromatográfiához használt típusúnak kell lennie. A szálhosszúság több mint 85 %-a 0,020 és 0,075 mm között legyen. A cellulózport egy 0,125 mm nyílásméretű szitán áttörik. Ugyanabból a gyártási sorozatból származó cellulózt kell használni a teljes vizsgálat során.

A keverék előkészítése előtt a porított cellulózt 105 °C-on súlyállandóságig szárítják.

Amennyiben falisztet használnak az előzetes vizsgálatnál, akkor puha falisztet kell készíteni, amely átmegy egy 1,6 mm nyílásméretű szitán, ezt alaposan meg kell keverni, majd 105 °C hőmérsékleten 4 órán át kell szárítani 25 mm-nél nem vastagabb rétegben. Ezután le kell hűteni, és amíg szükséges – legfeljebb a szárítástól számított 24 órán keresztül – légmentes tartályban kell tárolni, amelyet a lehető legjobban meg kell tölteni.

1.6.1.3. *Gyújtóforrás*

Gyújtóforrásként gázégőből (minimális átmérője 5 mm) kiáramló forró lángot kell használni. Amennyiben más gyújtóforrást használnak (például inert légkörben végrehajtott vizsgálatkor), a jelentésben meg kell adni annak leírását és indoklását.

1.6.2. **A vizsgálat végrehajtása**

Megjegyzés:

Az oxidálószereknek cellulózzal vagy falisztel alkotott keverékeit robbanásveszélyesnek kell tekinteni, és kellő gondossággal kell kezelni.

1.6.2.1. *Előzetes vizsgálat*

A szárított anyagot alaposan összekeverik szárított cellulózzal vagy falisztel 2 vizsgáltanyag-tömegrész – 1 cellulóz- vagy faliszt-tömegrész arányban, és a keveréket kis, kúp alakú, 3,5 cm (az alap átmérője) × 2,5 cm-es (magasság) halomba formálják egy kúp alakú forma (például lezárt szárú laboratóriumi üvegtölcsér) tömörítés nélküli megtöltésével.

A halmot egy hideg, nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető-képességű alaplemezre helyezik. A vizsgálatot a 1.6.2.2. pontnak megfelelően füstszekrényben kell végrehajtani.

A gyújtóforrást érintkezésbe hozzák a kúppal. Megfigyelik és regisztrálják az ennek eredményeként létrejövő reakció erőteljességét és időtartamát.

Az anyagot oxidálónak kell tekinteni, ha erőteljes a reakció.

Minden esetben, ahol kételyek merülnek fel az eredménnyel kapcsolatban, végre kell hajtani az alábbiakban leírt teljes vizsgálatsorozatot.

1.6.2.2. *Vizsgálatsorozat*

10 %-os intervallumokban, 10–90 tömegszázalékban oxidálószert tartalmazó oxidálószer/cellulózkeverékeket készítenek. Határesetekhez közbenső oxidáló szer/cellulózkeverékeket kell használni azért, hogy pontosabb legyen a kapott maximális égési sebesség.

A halmot forma segítségével alakítják ki. A háromszög keresztmetszetű forma fémből készült, hossza 250 mm, belső magassága 10 mm és belső szélessége 20 mm. A forma mindkét oldalán hosszirányban két fémlemezt szereltek fel oldallapként, amelyek 2 mm-rel túlnyúlnak a háromszög alakú keresztmetszet felső szélén (lásd az ábrát). Ezt az eszközt lazán megtöltik a szükségesnél kissé több keverékkel. Miután a formát egyszer 2 cm-es magasságból szilárd felületre ejtették, a megmaradó felesleges anyagot lekaparják egy ferdén elhelyezett lappal. Az oldallapokat eltávolítják, és a megmaradt por felületét kisimítják egy henger segítségével. Ezután a forma tetejére nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető-képességű alaplemezt helyeznek, a készüléket megfordítják, és eltávolítják a formát.

A halmot a füstszekrény huzatába helyezik.

A levegő sebességének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy megakadályozza az égéstermékek laboratóriumba szökését, és azt a vizsgálat során megváltoztatni nem szabad. A berendezés köré huzatellenzőt kell szerelni.

A cellulóz és néhány vizsgált anyag vízfelvevő képessége miatt a vizsgálatot a lehető leggyorsabban kell végrehajtani.

Meggyújtják a halom egyik végét úgy, hogy hozzáérintik a lángot.

A reakcióidőt 200 mm-es távolság mentén mérik, miután a reakciózóna már 30 mm távolságra terjedt.

A vizsgálatot a referenciaanyaggal és a vizsgált anyagnak a cellulózzal alkotott keverékei mindegyikével legalább egyszer végrehajtják.

Amennyiben megállapítják, hogy a maximális égési sebesség lényegesen nagyobb, mint amelyet a referenciakeverékből kaptak, a vizsgálat megszakítható; egyébként a vizsgálatot ötször meg kell ismételni a legnagyobb égési sebességet adó három keverék mindegyikével.

Amennyiben az eredmény gyaníthatóan hamis pozitív, a vizsgálatot meg kell ismételni cellulóz helyett ehhez hasonló részecskeméretű inert anyag, például kovaföld segítségével. Más megoldásként a legnagyobb égési sebességű vizsgált anyag/cellulózkeveréket újra meg kell vizsgálni inert légkörben (< 2 térfogatszázalék oxigéntartalom).

2. **ADATOK**

Biztonsági okokból a maximális égési sebességet – és nem a középértéket – kell a vizsgált anyag jellemző oxidáló tulajdonságának tekinteni.

Az értékeléshez adott keverék hat vizsgálatából álló vizsgálatsorozatán belül az égési sebesség legnagyobb értéke a fontos.

Fel kell rajzolni minden egyes keverék legnagyobb égési sebességének görbéjét az oxidálószer koncentrációja függvényében. A görbéből kell megállapítani a maximális égési sebességet.

A maximális égési sebességű keverék vizsgálatából kapott hat mért égési sebesség értéknek nem szabad 10 %-nál nagyobb mértékben eltérnie a számtani középértéktől; ellenkező esetben javítani kell az őrlési és keverési módszereken.

Össze kell hasonlítani a kapott maximális égési sebességet a referenciaanyag maximális égési sebességével (lásd az 1.3. pontot).

Amennyiben a vizsgálatokat inert légkörben hajtják végre, a maximális reakciósebességet összehasonlítják a referenciakeverék inert légkörben kapott maximális reakciósebességével.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– a vizsgált anyag azonosságát, összetételét, tisztaságát, nedvességtartalmát stb.,

– a vizsgált minta minden kezelését (például őrlés, szárítás,…),

– a vizsgálatok során használt gyújtóforrást,

– a mérések eredményeit,

– a reakció módját (például felvillanással égés a felületen, a teljes tömegen keresztüli égés, az égéstermékekre vonatkozó minden információ,…),

– az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést, ilyen például a hevesség (lángolás, szikrázás, füstölgés, lassú izzás stb.) leírása, és mind a vizsgált, mind a referenciaanyag előzetes biztonsági/szűrési vizsgálata során kapott közelítő időtartam,

– inert anyaggal végrehajtott vizsgálatokból kapott eredményeket, amennyiben van ilyen,

– inert légkörben végrehajtott vizsgálatokból kapott eredményeket, amennyiben van ilyen.

3.2. AZ EREDMÉNY ÉRTELMEZÉSE

Valamely anyagot oxidáló anyagnak kell tekinteni, amikor:

a) az előzetes vizsgálat során erőteljes reakció jön létre;

b) a teljes vizsgálat során a vizsgált keverékek maximális égési sebessége nagyobb vagy egyenlő, mint a cellulóz és a bárium-nitrát alkotta referenciakeverék maximális égési sebessége.

A hamis pozitív eredmény elkerülése érdekében az inert anyaggal kevert anyag vizsgálatakor és/vagy inert légkörben végrehajtott vizsgálatkor kapott eredményeket figyelembe kell venni az eredmények értelmezésekor.

4. **SZAKIRODALOM**

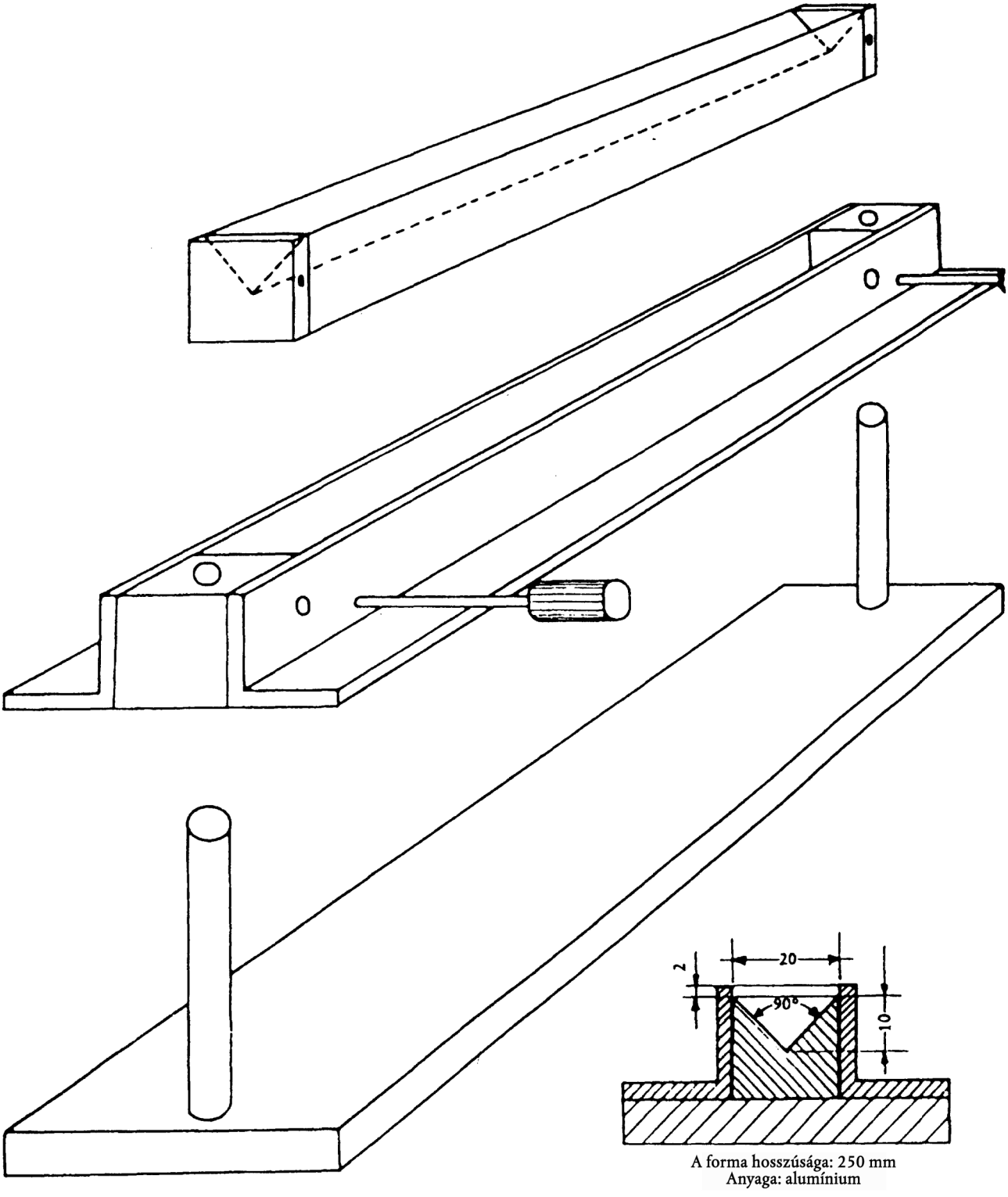
(1) NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Függelék

Ábra

Forma és tartozékok a halom elkészítéséhez

(Minden méret mm-ben van megadva)



B. RÉSZ: A TOXICITÁS MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS: B. RÉSZ

A. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetést.

B. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

i. Az **akut toxicitás** az anyag egyetlen adagjának alkalmazása után, adott időtartamon (rendszerint 14 nap) belül előforduló káros hatásokat foglalja magában.

ii. **LD_{50}** (közepes letális dózis) valamely anyag statisztikailag meghatározott egyetlen olyan adagja, amely várhatóan halált okoz azon állatok 50 %-ánál, amelyek megkapják az adagot. Az LD_{50}-es értéket a vizsgált anyag tömege/a kísérleti állat tömege (mg/kg) segítségével kell kifejezni.

iii. **LC_{50}** (közepes letális koncentráció): valamely anyag statisztikailag megállapított olyan koncentrációja, amely várhatóan halált okoz a meghatározott expozíciós időtartam során vagy az expozíciót követően meghatározott időn belül a kísérleti állatok 50 %-ánál. Az LC_{50}-es értéket a vizsgált anyag tömege/standard levegő térfogat hányadosaként (mg/l) kell kifejezni.

iv. A **nem káros hatású szint**: az a vizsgálat során alkalmazott maximális dózis vagy expozíciós koncentráció, amely nem hoz létre észlelhető toxicitási jeleket.

v. A **szubakut/szubkrónikus toxicitás** azon káros hatásokat foglalja magában, amelyek a kísérleti állatoknál előfordulnak, valamely kémiai anyag ismételt napi adagolásának vagy ilyen anyag expozíciójának eredményeként. A kísérlet az állatok élettartamának kis részére terjed ki.

vi. **Maximális tolerálható dózis (MTD)**: az a legnagyobb dózis, amely kiváltja a toxicitás tüneteit az állatokon, de nem befolyásolja jelentősen a túlélést a vizsgálat során.

vii. **Bőrirritáció**: gyulladásos elváltozások a bőrön a vizsgált anyag alkalmazását követően.

viii. **Szemirritáció**: elváltozások a szemben a vizsgált anyagnak a szem felületén való alkalmazása után.

ix. **Bőrszenzibiláció** (allergiás kontakt dermatitis): a vizsgált anyagra adott, az immunrendszer által irányított bőrreakció.

Specifikus fogalommeghatározások az inhalációs toxicitáshoz

– az **aeroszol** levegőben lévő, homogén eloszlású (szilárd és/vagy folyékony) részecskéket jelent,

– az **aerodinamikai átmérő** azon egységnyi sűrűségű (1 g cm^{-3}) gömbnek az átmérője, amelynek ugyanaz az ülepedési végsebessége, mint a kérdéses részecskéé,

– a **tömegfelező aerodinamikai átmérő** („Mass Median Aerodynamic Diameter" – MMAD) az a számított aerodinamikai átmérő, amely felére osztja az aeroszol méret-eloszlását, tömeg segítségével mérve,

– a **geometrikus standard deviáció** („Geometric Standard Deviation", GSD) a becsült 84 % osztály és 50 % osztály aránya és a részecskeméret-eloszlási görbe meredekségét jelzi, feltételezve, hogy a méreteloszlás logaritmikus-normális eloszlás.

Az akut orális toxicitás meghatározásában használt rögzített adagos eljárás fogalommeghatározásai

– A **nyilvánvaló toxicitás** valamely vizsgált anyag alkalmazását követően látható toxikus hatásokat jelenti, amelyek olyan súlyosak, hogy az anyagnak a következő magasabb dózisban való alkalmazása halálozást eredményezhet,

– A **megkülönböztető dózis** a legnagyobb azon négy, rögzített dózis közül, amelyek anélkül alkalmazhatók, hogy a vizsgált anyaggal kapcsolatos elhalálozás bekövetkezne (az állatvédelmi okokból való elpusztítást is ideértve).

C. MUTAGENITÁS (a rákkeltő képesség előzetes szűrővizsgálatát is ideértve)

Valamely anyag mutagén potenciáljának előzetes kiértékeléséhez információkat kell beszerezni a végpont két kategóriájáról, nevezetesen a génmutációról és a kromoszóma-rendellenességekről.

E két végpont kiértékelése a következő vizsgálatokkal történik:

i. Gén-(pont-)mutációk létrejöttének vizsgálata olyan prokariotikus sejtekben, mint például a *Salmonella typhimurium*; *Escherichia coli* használatával végrehajtott vizsgálatok is elfogadhatók. A vizsgált anyag természete határozza meg, hogy melyik organizmust kell adott esetben alkalmazni;

ii. Tenyésztettemlősállat-sejtekben a kromoszóma-rendellenességek létrejöttének *in vitro* vizsgálata; *in vivo* eljárás (sejtmagvacska vizsgálat vagy a magosztódási fázis elemzése csontvelősejteken) is elfogadható. Ellenjavallatok hiányában azonban az *in vitro* módszereket kell döntően előnyben részesíteni.

D. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Az állaton végzett és az *in vitro* vizsgálatok eredményei nem értelmezhetőek korlátozás nélkül közvetlenül az emberekre, ezt szem előtt kell tartani a vizsgálatok kiértékelésekor és értelmezésekor.

Ahol ilyen rendelkezésre áll, az embereken jelentkező káros hatások bizonyítéka fontos lehet a kémiai anyagoknak az emberi populációra gyakorolt potenciális hatásai meghatározásában.

E. SZAKIRODALOM

A toxikológia fejlődő kísérleti tudomány, és bőséges szakirodalom létezik minden egyes témakörhöz. A megfelelő információk az OECD vizsgálati irányelveiben találhatók.

Kiegészítő megjegyzések

Állatgondozás

A környezeti állapotok szigorú ellenőrzése és a megfelelő állatgondozási módszerek lényegesek a toxicitásvizsgálatoknál.

i. Állattartási körülmények

Azon helyiségekben vagy körbekerített területeken, ahol a kísérleti állatokat elhelyezzük, a környezeti állapotoknak megfelelőeknek kell lenniük a kísérleti állattartáshoz. Patkányokhoz, egerekhez és tengerimalacokhoz 22 ± 3 °C szobahőmérséklet, és a 30–70 % relatív nedvességtartalom a megfelelő; nyulak esetében a hőmérsékletnek 20 ± 3 °C-nak kell lennie 30-70 % relatív páratartalom mellett.

Néhány kísérleti módszer különösen érzékeny a hőmérsékleti hatásokra, ezen esetekben a megfelelő feltételek részletezése a vizsgálati módszer leírásában szerepel. A toxicitásra vonatkozó minden vizsgálatban folyamatosan ellenőrizni kell, és a vizsgálati jelentésben szerepeltetni kell a hőmérsékletre és a nedvességtartalomra vonatkozó adatokat.

Mesterséges világítás esetén általában 12 óra világosságnak és 12 óra sötétségnek kell lennie. A világításra vonatkozó adatokat fel kell jegyezni a vizsgálati jelentésben.

Az állatkísérletekről készült jelentésekben fontos jelezni a ketrecben tartás alkalmazott típusát és az egyes ketrecekben elhelyezett állatok számát, mind az expozíció, mind pedig minden ezt követő megfigyelési időszak alatt.

ii. Etetési körülmények

Az alkalmazott tápláléknak meg kell felelnie a vizsgált fajnak megfelelő, a táplálkozástudomány által meghatározott követelményeknek. Amikor a vizsgált anyagokat az állatok a táplálékban kapják, akkor a tápértéket az anyag és a táplálék összetevőinek kölcsönhatása csökkentheti.

Egy ilyen kölcsönhatás lehetőségét figyelembe kell venni a vizsgálat eredményeinek értelmezése során.

A táplálék olyan szennyeződései, amelyekről ismert, hogy befolyásolják a toxicitást, nem lehetnek jelen zavaró nagyságú koncentrációban.

Állatvédelem

A vizsgálati módszer kidolgozása során megfelelő figyelmet kell fordítani az állatok védelmére. Néhány példa a következőkben röviden le van írva, de a lista nem teljes. A pontos megfogalmazást és/vagy körülményeket az egyes módszerek leírásában lehet megtalálni.

– Az akut orális toxicitás meghatározására alternatív módszer áll rendelkezésre: a „rögzített dózisú módszer”. E módszer nem alkalmazza a halált mint különös végpontot. Kevesebb állatra van szükség hozzá, és a módszer kevesebb szenvedést és fájdalmat okoz, mint az akut orális toxicitás megállapításához alkalmazott hagyományos eljárások.

– A vizsgálathoz felhasznált állatok száma a tudományosan elfogadható minimumra csökkentett: a B.1. és B.3. módszerek alkalmazása során csak 5 azonos nemű állatot kell vizsgálni dózisszintenként; csak 10 állatot (valamint a negatív ellenőrző csoportban csak 5 állatot) a bőr érzékennyé tételének meghatározásához a B.6. módszer szerinti legerősebb tengerimalac-ingerlési vizsgálatban; a pozitív ellenőrző csoporthoz szükséges állatok száma ugyancsak csökkentett az *in vivo* mutagenitás vizsgálatokban (B.11. és B.12. módszer).

– Az állatok fájdalmát és szenvedését a vizsgálatok során a minimálisra csökkentik: a súlyos és tartós fájdalom jeleit mutató állatokat az állatvédelem szabályainak megfelelő módon a vizsgálat befejezése előtt el lehet pusztítani; a vizsgált anyagok olyan dózisaival, amelyek közismerten jelentős szenvedést és fájdalmat okoznak maró vagy irritatív tulajdonságuk miatt, nem szükséges vizsgálatot végrehajtani (B.1., B.2. és B.3. módszer).

– E kísérletek szempontjából nézve túlzottan nagy dózissal történő kísérletezés elkerülhető határérték-vizsgálatok elvégzésével, ez nemcsak az akut toxicitás vizsgálatokra vonatkozik (B.1., B.2. és B.3. módszer), hanem az *in vivo* mutagenitás vizsgálatokra is (B.11. és B.12. módszer).

– Amennyiben elegendő tudományos bizonyíték áll rendelkezésre, lehetséges az, hogy az irritatív hatásokat kutató vizsgálatot egyáltalán nem folytatják le, vagy azt egyetlen kísérleti állatra korlátozzák.

Ilyen tudományos bizonyítékok alapjául szolgálhatnak a vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságai, más, már elvégzett vizsgálatok eredményei és a jóváhagyott *in vitro* vizsgálatok eredményei. Például, ha a dermális adagolással elvégzett akuttoxicitás-vizsgálat végrehajtása az anyag határérték-vizsgálati adagolásával történik (B.3. módszer), és nem észlelhető bőrirritáció, akkor e terület további vizsgálata (B.4. módszer) szükségtelen lehet; azon anyagokat, amelyek a bőrvizsgálatok tanúsága szerint maró hatásúak, vagy erősen irritatívak (B.4. módszer) nem kell a szemet ingerlő hatás tekintetében vizsgálni (B.5. módszer).

B.1. AKUT TOXICITÁS (ORÁLIS)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot orálisan kell beadni gyomorszondával fokozatosan változó adagokban több kísérleti állatcsoportnak, csoportonként egyetlen adagot használva. A kiválasztott adagok valamilyen dózisbehatároló vizsgálat eredményein alapulhatnak. Ezt követően meg kell figyelni a toxikus hatásokat és a haláleseteket fel kell jegyezni. A vizsgálat során elhullott és a vizsgálat végéig életben maradt állatokat is fel kell boncolni. E módszer elsősorban rágcsáló fajták vizsgálatára alkalmas.

A súlyos és tartós betegség, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat humánusan el lehet pusztítani. A vizsgált anyagokat nem szabad olyan módon adagolni, amelyről ismert, hogy jelentős fájdalmat és szenvedést okoz maró vagy irritatív tulajdonsága miatt.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napig a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal, felnőtt állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással csoportokba kell osztani. Ha szükséges, akkor a vizsgált anyagot valamely alkalmas oldószerben fel kell oldani vagy szuszpendálni. Ha lehetséges, elsősorban a vizes oldat/szuszpenzió használata javasolt, másodikként a növényi olajos oldat használata javasolt, és ezt követheti a másfajta oldószerekben történő feloldás. Ha az oldószer nem vizes, akkor az oldószer releváns toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük, vagy ha azok nem ismertek, akkor a toxikus tulajdonságokat a vizsgálat előtt meg kell határozni. Rágcsálók esetében az adagolt térfogatnak nem szabad 10 ml/kg testsúlynál nagyobbnak lennie, kivéve vizes oldatok esetében, ahol 20 ml/kg használható. A vizsgált térfogat változását minimálissá kell tenni a koncentráció megfelelő beállításával azért, hogy állandó térfogat legyen biztosítható minden dózisszinten.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Ellenjavallat hiányában a patkány az előnyben részesítendő állatfajta.

Kísérleti célokra tenyésztett, laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, és az a nemenkénti átlagértéktől maximum ±20%-al különbözhet.

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Legalább öt rágcsálót kell vizsgálni minden dózisnál. Az állatoknak azonos neműnek kell lenniük. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek és vemhesek. Amennyiben rendelkezésre áll olyan információ, mely szerint valamelyik nem lényegesen érzékenyebben reagál, akkor ilyen nemű állatokat kell alkalmazni.

Megjegyzés: A rágcsálóknál magasabb rendű állatokkal végrehajtott akuttoxicitás-vizsgálatokban meg kell fontolni kisebb számú állat használatának lehetőségét.

A dózisokat gondosan kell kiválasztani, és minden erőfeszítést meg kell tenni arra, hogy azok ne lépjék túl a közepesen toxikus dózisokat. Ilyen vizsgálatoknál el kell kerülni a vizsgált anyag letális dózisának beadását.

1.6.2.3. *Dózisok*

E szinteknek elegendő számúaknak (legalább háromnak) és megfelelően elosztottaknak kell lenniük ahhoz, hogy a vizsgált csoportokban toxikus hatások és halálozási arányok egész sorát hozzák létre. Az adagoknak elegendőeknek kell lenniük a dózis/reakció görbe létrehozására, és ahol lehetséges, lehetővé kell tenniük az LD_{50} elfogadható meghatározását.

1.6.2.4. *Határérték-vizsgálat*

Amikor rágcsálókat használnak, végrehajtható a határérték-vizsgálat egyetlen, legalább 2 000 mg/kg dózissal adagolt, öt hím és öt nőstény rágcsálóból álló csoporttal a fent leírt eljárás végrehajtásával. Ha a vizsgált anyaggal kapcsolatos halálozás figyelhető meg, akkor szükség lehet a teljes körű vizsgálat elvégzésére.

1.6.2.5. *Megfigyelési időszak*

A megfigyelési időszaknak legalább 14 napnak kell lennie. Azonban a megfigyelés időtartamát nem kell szigorúan értelmezni. Ezen időtartamot a toxikus reakciók megjelenésének módja, a tünetek megjelenésének időpontja és a felépülési időtartam hosszúsága alapján kell meghatározni; ebből következően szükség esetén ezen időtartam meghosszabbítható. Fontos az az időpont, amikor megjelennek és eltűnnek a toxicitás jelei, valamint a halál bekövetkezésének ideje, különösen ha tendencia figyelhető meg a halál késedelmes bekövetkezésére.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat koplaltatni kell a vizsgált anyag beadása előtt. A patkányoknak egy éjszakán át nem szabad táplálékot adni; gyorsabb anyagcseréjű állatok esetében rövidebb koplalási időtartam is megfelelő; a vízfogyasztást nem kell korlátozni. Másnap meg kell mérni az állatokat, és be kell adni a vizsgált anyagot gyomorszonda segítségével, egyetlen adagban. Ha egyetlen dózisban nem adható be a vizsgált anyag, akkor az adag kisebb részekben adagolható 24 órát meg nem haladó időtartam során. Miután már megtörtént az anyag beadása, a táplálékfelvétel további három-négy órára visszatartható. Ha valamely dózist részekben kell beadni hosszabb időtartam alatt, lehet, hogy el kell látni az állatokat táplálékkal és vízzel, az expozíciós időtartam hosszúságától függően.

A beadást követően megfigyeléseket kell végezni, külön feljegyzést kell vezetni minden egyes állatról. Az első nap során gyakran kell megfigyeléseket végezni.

Minden egyes munkanapon legalább egyszer gondos klinikai vizsgálatot kell végrehajtani, az egyéb megfigyeléseket naponta kell elvégezni azon megfelelő tevékenységekkel együtt, amelyek célja a kísérleti állatok elhullásának minimalizálása, ilyen például a holtan talált állatok boncolása vagy lehűtése, és a gyenge vagy haldokló állatok elkülönítése vagy elpusztítása. A megfigyeléseknek ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légző-, keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomatomotoros aktivitás és viselkedési minta változásaira. Külön figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A halál időpontját a lehető legpontosabban kell feljegyezni.

A vizsgálat során elpusztult és a vizsgálat befejezéséig életben maradt állatokat fel kell boncolni. Minden patológiás elváltozást fel kell jegyezni. Amennyiben szükséges, szövetmintákat kell venni a kórszövettani vizsgálathoz.

Toxicitás kiértékelése a másik nemnél

Az egyik nemmel végzett vizsgálat befejezése után a másik nemből kiválasztott legalább öt állatból álló csoport számára kell adagolni az anyagot annak megállapítására, hogy az e nemhez tartozó állatok nem érzékenyebbek-e jelentősebb mértékben a vizsgált anyagra. Bizonyos esetekben indokolható lehet kevesebb állat használata. Ahol megfelelő információ áll rendelkezésre annak bizonyítására, hogy a vizsgált nemhez tartozó állatok jelentősen érzékenyebbek, elhagyható a másik nemhez tartozó állatokkal végzett vizsgálat.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, megadva minden egyes csoportnál az állatok számát a vizsgálat kezdetekor, az egyes állatok halálának időpontját, a toxicitás más jeleit mutató állatok számát, a toxikus hatások leírását és a boncolási leleteket. Egyenként meg kell határozni az állatok tömegét, és fel kell ezt jegyezni röviddel a vizsgált anyag beadása előtt, ezután minden héten és a halál bekövetkezésekor. Ki kell számítani és fel kell jegyezni a tömegváltozásokat, ha az állat egy napnál tovább maradt életben. A vizsgált anyaggal összefüggő szenvedés és fájdalom miatt humánusan elpusztított állatok halálát az anyaggal kapcsolatos halálként kell feljegyezni. Az LD_{50} valamely elismert módszer segítségével határozható meg. Az értékelésnek tartalmaznia kell – amennyiben ez lehetséges – a dózis és a rendellenességek fellépése és súlyossága közötti kapcsolatot, ideértve a magatartási rendellenességeket, a klinikai tüneteket, a jelentős sérüléseket, testsúlyváltozásokat, az elhalálozást és minden más toxikológiai hatást is.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– használt állatfajtákat, a törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet,

– a vizsgálati körülményeket,

– a dózisokat (oldószerrel együtt, ha az használatra került, és koncentráció),

– a kezelt állatok nemét,

– az adatok táblázatos összefoglalását nem és dózis szerint (vagyis a vizsgálat során elpusztult vagy megölt állatok száma, a toxicitás jeleit mutató állatok száma, az anyag hatásának kitett állatok száma),

– a kezelés után a halál bekövetkeztének idejét, az állatok humánus elpusztításának okait és kritériumait,

– minden megfigyelést,

– a 14 napban meghatározott teljes vizsgálat alá vont nemnél kapott LD_{50}-es értéket (a meghatározás módszerét meg kell adni),

– az LD_{50}-hez tartozó 95 %-os konfidencia intervallumot (ahol ez megadható),

– dózis/halálozási görbét és meredekséget (ahol ezt a meghatározás módszere lehetővé teszi),

– a boncolási leleteket,

– a kórszövettani vizsgálatok eredményeit,

– a másik nemmel végrehajtott vizsgálatok eredményei,

– az eredmények kiértékelését (külön figyelmet kell szentelni annak a hatásnak, amelyet a vizsgálat során az állatok humánus megölése a kiszámított LD_{50}-es értékre gyakorolhat),

– az eredmények értelmezését.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd az Általános bevezetés B. részét. (D)

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét. (E)

B.1b. AKUT TOXICITÁS (ORÁLIS) – RÖGZÍTETT DÓZISÚ MÓDSZER

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az akut orális toxicitás vizsgálat információt adhat azon káros hatásokról, amelyek rövid időtartamon belül követhetik a vizsgált anyag egyetlen adagjának elfogyasztását.

A rögzített dózissal végzett kísérletet két szakaszban kell végrehajtani.

Előzetes dózis-behatároló vizsgálat során egymás után megvizsgálják az azonos nemű állatoknak egyenként, gyomorszonda segítségével orálisan beadott különböző dózisok hatásait. A dózis-behatároló vizsgálat információkkal szolgál a dózis-toxicitás összefüggés, illetve a minimális letális dózis vonatkozásában is. Általában ötnél nem több állatot használnak az első szakaszban.

A vizsgálat fő fázisában az anyagot gyomorszonda segítségével orálisan adják be valamelyik előre meghatározott dózisban (5, 50, 500 vagy 2 000 mg/kg) az öt hím és öt nőstény kísérleti állatból álló csoportoknak. A használt dózist a dózis-behatároló vizsgálat alapján kell meghatározni, és ez olyan dózis, amely valószínűleg nyilvánvaló toxicitást idéz elő (lásd 1.2. fogalommeghatározások), de nem okoz halált.

Az adagolást követően az állatokat meg kell figyelni.

Ha a kezdésként kiválasztott dózis nyilvánvaló toxicitást hoz létre, de nem okoz a vegyülettel kapcsolatos halálozást, további vizsgálatra nincs szükség.

Ha nyilvánvaló toxicitás nem tapasztalható a kiválasztott dózisnál, akkor az anyagot újra meg kell vizsgálni a következő, magasabb dózis adagolásával. Ha az állatok elpusztulnak, vagy ha valamilyen súlyos toxikus reakció szükségessé teszi az állatok humánus elpusztítását, az anyagot újra meg kell vizsgálni a következő alacsonyabb dózis adagolásával.

Ez az eljárás lehetővé teszi a megkülönböztető dózis (lásd 1.2. fogalommeghatározások) meghatározását, vagyis az előre meghatározott dózisok közül azon legnagyobb meghatározását, amely adagolható anélkül, hogy haláleseteket okozna (humánus megöléseket is ideértve).

A súlyos és tartós betegség, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat humánusan el lehet pusztítani. A vizsgált anyagokat nem szabad olyan módon adagolni, amelyről ismert, hogy jelentős fájdalmat és szenvedést okoz maró vagy irritatív tulajdonsága miatt.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

1.6.1.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Ellenjavallat hiányában a patkány az előnyben részesítendő állatfajta.

Kísérleti célokra tenyésztett, laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. Mindkét nem esetében a vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan, az átlagértéktől maximum ± 20%-kal térhet el egymástól.

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással dózis-behatároló vizsgálati és fő vizsgálati csoportokba kell osztani. A gyakorlatban mindkét nemből csak egyetlen csoportra lehet szükség a fő vizsgálatban.

1.6.1.2. *A dózis előkészítése és adagolása*

Ha szükséges, akkor a vizsgált anyagot fel kell oldani vagy szuszpendálni kell valamilyen alkalmas vivőanyagban. Ha lehetséges, elsősorban a vizes oldat használata javasolt, másodikként a növényi olajos oldat használata javasolt, és ezt követheti a másfajta vivőanyag alkalmazása. Ha a vivőanyag nem vizes, akkor a vivőanyag releváns toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük; ha azok nem ismertek, akkor a toxikus tulajdonságokat a vizsgálat előtt vagy közben kell meghatározni. Rágcsálók esetében a térfogatnak nem szabad 10 ml/testsúly kg-nál nagyobbnak lennie, kivéve vizes vivőanyagok esetében, ahol 20 ml/kg használható. A vizsgált térfogat változását minimálissá kell tenni a koncentráció beállításával azért, hogy állandó térfogat legyen biztosítható minden dózisszinten.

Az állatokat koplaltatni kell a vizsgált anyag beadása előtt. A patkányoknak egy éjszakán át nem szabad táplálékot adni, a vízfogyasztást nem kell korlátozni. Másnap meg kell mérni az állatokat, és be kell adni a vizsgált anyagot gyomorszonda segítségével, egyetlen adagban. Ha egyetlen dózisban nem adható be a vizsgált anyag, akkor az adag kisebb részekben adagolható 24 órát meg nem haladó időtartam során. Miután megtörtént az anyag beadása, a táplálékfelvétel további három-négy órára visszatartható. Ha valamely dózist részekben kell beadni bizonyos időtartam alatt, lehet, hogy el kell látni az állatokat táplálékkal és vízzel, az expozíciós időtartam hosszúságától függően.

1.6.2. **A kísérlet végrehajtása**

1.6.2.1. *Dózis-behatároló vizsgálat*

A különböző adagok hatásait egyenként vizsgálják meg az állatokban. Általában nőstény állatokat használnak, ha nincs olyan információ, amely azt jelezné, hogy a hímek érzékenyebbek. Az alkalmazás szekvenciális, legalább 24 órának el kell telnie mielőtt a következő állatot kezelnék. Minden állatot gondosan meg kell figyelni legalább hét napig a toxicitás jeleit keresve; ha hét napon át fennmaradnak a mérsékelt toxicitás jelei, az állatokat legfeljebb további hét napig kell figyelni. A következő kezdő dózisok közül lehet választani: 5, 50, 500 és 2 000 mg/kg. Ha a kiválasztott kezdő dózis nem hoz létre súlyos toxicitást, és a következő magasabb dózis halálozást okoz, szükség lesz egy vagy több megfelelő közbenső dózis vizsgálatára. E módon lehetséges információkat gyűjteni azon dózis(ok)ról, amely(ek) bizonyos toxicitási tüneteket váltanak ki, illetve a halált okozó legalacsonyabb dózisról is.

Törekedni kell a kezdő dózisnak a rokon kémiai anyagokból szerzett bizonyítékok segítségével történő kiválasztására. Ilyen információ hiányában elsőként ajánlatos az 500 mg/kg-os dózis használata. Ha az első dózis alkalmazásakor semmilyen toxicitási jel nem látható, a következő magasabb dózist kell megvizsgálni. Ha nem történik elhalálozás a 2 000 mg/kg beadásakor, akkor a dózis-behatároló vizsgálat befejeződött, és a fő vizsgálatot ezzel a dózissal kell elvégezni. Ha a kezdő dózisnál (pl. 500 mg/kg) súlyos hatások észlelhetők, amelyek szükségessé teszik a humánus elpusztítást, a következő alacsonyabb adagot (például 50 mg/kg) kell beadni egy másik állatnak. Ha ez az állat életben marad, további állatok kezelhetők a meghatározott adagok közötti megfelelő közbenső dózisokkal. Általában nem szükséges ötnél több állatot használni ezen eljárásban.

1.6.2.2. *Fő vizsgálati fázis*

Minden adagolási szinthez legalább 10 állatot (5 hímet és 5 nőstényt) kell felhasználni. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek.

A rögzített adagolású módszer alapelve, hogy csak közepesen toxikus adagokat használnak a fő vizsgálatban. El kell kerülni a vizsgált anyag letális dózisának adagolását.

A vizsgálat során használandó dózist a négy rögzített szint, nevezetesen 5, 50, 500 és 2 000 mg/kg testsúly, közül kell kiválasztani. A kiválasztott kezdő dózisnak olyannak kell lennie, amely valószínűleg nyilvánvaló toxicitást okoz, de nem jár a vegyülettel kapcsolatos halálozással (humánus elpusztításokat is ideértve; a véletlen halálesetek nem tartoznak ide, de ezeket is fel kell jegyezni). Ha e dózis létrehoz nyilvánvaló toxicitást, de nem okoz a vizsgált anyaggal kapcsolatos halálozást, további vizsgálatra nincs szükség.

Amennyiben a kiválasztott dózis nem okoz nyilvánvaló toxicitást, az anyagot újra meg kell vizsgálni a következő magasabb dózis adagolásával. Az állatokat azonban továbbra is megfigyelés alatt kell tartani, amíg le nem telik a megfigyelési időtartam. Ha valamilyen súlyos toxikus reakció megköveteli az állatok humánus elpusztítását, vagy ha a vizsgált anyaggal kapcsolatos halálozás fordul elő, az anyagot újra meg kell vizsgálni a következő alacsonyabb dózis adagolásával. Itt is érvényes, hogy azon állatokat, amelyeket nem kell humánusan elpusztítani, megfigyelés alatt kell tartani a teljes megfigyelési időtartam során.

Az adagolást követően szisztematikus megfigyeléseket kell végezni, és fel kell jegyezni a megfigyelés eredményeit. Külön feljegyzést kell vezetni minden egyes állatról.

A megfigyelési időszaknak legalább 14 napnak kell lennie. Azonban a megfigyelés időtartamát nem kell szigorúan értelmezni. Ezen időtartamot a toxikus reakciók megjelenésének módja, a tünetek megjelenésének időpontja és a felépülési időtartam hosszúsága alapján kell meghatározni; ebből következően szükség esetén ezen időtartam meghosszabbítható. Fontos az az időpont, amikor a toxicitás jelei megjelennek és eltűnnek, valamint a halál bekövetkezésének ideje, különösen, ha fennáll a toxikus tünetek késedelmes megjelenésének tendenciája.

Az adagolás napján legalább kétszer és ezután legalább naponta egyszer gondos klinikai vizsgálatot kell végrehajtani. Humánusan el kell pusztítani azon állatokat, amelyeknek nyilvánvalóan fájdalmai vannak, vagy amelyek a súlyos szenvedés jeleit mutatják. További megfigyelésekre lesz szükség a beadás után az első néhány nap során, ha az állatok továbbra is a toxicitás jeleit mutatják. A vizsgálat befejezhető, ha nyilvánvalóvá válik, hogy túl magas volt a kiválasztott kezdő dózis.

A megfigyeléseknek ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légző-, keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomatomotoros aktivitás és viselkedési minta változásaira. Külön figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére.

Meg kell határozni az egyes állatok tömegét röviddel a vizsgált anyag beadása előtt, a következő három nap során naponta és ezután hetente. Meg kell mérni a tömegüket és fel kell boncolni azon állatokat, amelyek a vizsgálat során elpusztulnak, és azokat, amelyek életben maradnak a vizsgálat végéig. Fel kell jegyezni minden jelentős patológiás elváltozást. Amennyiben indokolt, szövetmintákat kell venni a kórszövettani vizsgálathoz.

Szükség lehet egy második, vagy kivételes körülmények között egy harmadik dózis vizsgálatára, az előző dózis eredményeitől függően.

Amennyiben valamely anyag halált okoz 5 mg/testsúlykilogramm adagolásnál (vagy ahol a dózis-behatároló vizsgálatból erre lehet következtetni) lehet, hogy tovább kell vizsgálni az anyag akut toxicitását.

2. ADATOK

Mind a dózis-behatároló, mind pedig a fő vizsgálatból kapott adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, minden egyes vizsgált dózisnál bemutatva az állatok számát a vizsgálat kezdetén; a toxicitás jeleit mutató állatok számát; a vizsgálat során holtan talált vagy humánus okok miatt elpusztított állatok számát; a toxikus hatások leírását, és a fő vizsgálat esetében, hogy megfigyeltek-e vegyülettel kapcsolatos nyilvánvaló toxicitást; minden toxikus hatás időtartamát és a boncolási leleteket. Ki kell számítani a tömegváltozást, és fel kell jegyezni, ha az állat egy napnál tovább maradt életben.

A vizsgált anyaggal összefüggő szenvedés és fájdalom miatt humánusan elpusztított állatok halálát az anyaggal kapcsolatos halálként kell feljegyezni.

3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint mind a dózis-behatároló, mind a fő vizsgálat tekintetében az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a használt fajt, törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet,

– a vizsgálati körülményeket,

– a dózisokat (beleértve a vivőanyagot is és koncentrációk),

– minden dózissal kapott összes eredményt,

– az adatok összefoglalását nemenként és dózisonként (azaz a vizsgálathoz használt állatok száma; a testsúly változásai; a vizsgálat során elhullott vagy elpusztított állatok száma; a toxicitás jeleit mutató állatok száma; a tünetek természete, súlyossága és időtartama),

– a toxicitási tünetek megjelenését és a folyamat időbeli lefolyását, és az hogy ezek visszafordíthatóak-e (reverzibilitás),

– az elhullott vagy elpusztított állatoknál az adagolást követően bekövetkezett halál időpontját, az állatok humánus megölésének okait és kritériumait,

– a boncolási leleteket,

– a kórszövettani vizsgálatok eredményeit,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értelmezését, a nyilvánvaló toxicitás jeleit és a vizsgálat során meghatározott megkülönböztető dózist is ideértve.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

DÓZIS	EREDMÉNYEK	ÉRTELMEZÉS
5 mg/kg testsúly	kevesebb, mint 100 %-os túlélés	NAGYON TOXIKUS anyagok
	100 %-os túlélés; de nyilvánvaló toxicitás	TOXIKUS anyagok
	100 %-os túlélés; nincs nyilvánvaló toxicitás	Lásd az 50 mg/kg-nál közölt eredményeket.
50 mg/kg testsúly	kevesebb, mint 100 %-os túlélés	TOXIKUS vagy NAGYON TOXIKUS anyagok. Lásd az 5 mg/kg-nál közölt eredményeket.
	100 %-os túlélés; de nyilvánvaló toxicitás	KÁROS anyagok
	100 %-os túlélés; nincs nyilvánvaló toxicitás	Lásd az 500 mg/kg-nál közölt eredményeket.
500 mg/kg testsúly	kevesebb, mint 100 %-os túlélés	TOXIKUS vagy KÁROS anyagok. Lásd az 50 mg/kg-nál közölt eredményeket.
	100 %-os túlélés; de nyilvánvaló toxicitás	Olyan vegyületek, amelyek úgy tekinthetők, hogy nincs jelentős akut toxicitásuk.
	100 %-os túlélés; nincs nyilvánvaló toxicitás	Lásd a 2 000 mg/kg-nál közölt eredményeket.
2 000 mg/kg testsúly	kevesebb, mint 100 %-os túlélés	Lásd az 500 mg/kg-nál közölt eredményeket.
	100 %-os túlélés; nyilvánvaló toxicitással vagy enélkül	Olyan vegyületek, amelyeknek nincs jelentős akut toxicitásuk.

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

B.2. AKUT TOXICITÁS (INHALÁCIÓ)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Hasznos, ha előzetes információk állnak rendelkezésre az anyag részecskeméret-eloszlásáról, gőznyomásáról, olvadáspontjáról, forráspontjáról és robbanásveszélyességéről (ha van ilyen).

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Több kísérleti állatcsoportot tesznek ki a vizsgált anyag hatásának meghatározott időtartamig, fokozatosan változó koncentrációkban úgy, hogy csoportonként egyetlen koncentrációt használnak. Ezt követően megfigyelik a hatások és a halálesetek előfordulását. A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat végéig életben maradó állatokat is fel kell boncolni.

A súlyos és tartós betegség, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat kíméletes módon el lehet pusztítani. A vizsgált anyagokat nem szabad olyan módon adagolni, amelyről ismert, hogy jelentős szenvedést és fájdalmat okoz maró vagy irritatív tulajdonsága miatt.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napig a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással csoportokba kell osztani. A szimulált expozíció csak akkor szükséges, ha ezt az alkalmazott expozíciós berendezés típusa indokolja.

A szilárd vizsgált anyagokat lehet, hogy mikronizálni kell azért, hogy megfelelő méretű részecskék álljanak rendelkezésre.

Szükség esetén vivőanyag alkalmazható a vizsgált anyag megfelelő koncentrációjának kialakítására a levegőben, ebben az esetben használni kell egy vivőanyag-kontrollcsoportot. Ha az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot vagy más segédanyagot használnak, meg kell bizonyosodni arról, hogy azok nem rendelkeznek toxikus hatással. Ehhez szükség szerint korábbi vizsgálatokból származó adatokat is fel lehet használni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Ellenjavallat hiányában a patkány az előnyben részesítendő állatfajta. Kísérleti célokra tenyésztett, laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. A vizsgálat kezdetén mindkét nem esetében az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan, az átlagértéktől maximum ± 20%-kal térhet el egymástól.

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Minden koncentrációhoz legalább 10 rágcsálót (5 hímet és 5 nőstényt) kell felhasználni. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek.

Megjegyzés: A rágcsálóknál magasabb rendű állatokkal végrehajtott akuttoxicitás-vizsgálatokban meg kell fontolni kisebb számú állat használatának lehetőségét.

A dózisokat gondosan kell kiválasztani, és minden erőfeszítést meg kell tenni arra, hogy azok ne lépjék túl a közepesen toxikus dózisokat. Ilyen vizsgálatoknál el kell kerülni a vizsgált anyag letális dózisának beadását.

1.6.2.3. *Expozíciós koncentrációk*

E szinteknek elegendő számúnak, legalább háromnak, és megfelelően elosztottnak kell lenniük ahhoz, hogy a vizsgált csoportokban toxikus hatások és halálozási arányok egész sorát hozzák létre. Az adagoknak elegendőnek kell lenniük a koncentráció-halálozás görbe létrehozására, és ahol lehetséges, lehetővé kell tenniük az LC_{50} elfogadható meghatározását.

1.6.2.4. *Határérték-vizsgálat*

Ha öt hím és öt nőstény kísérleti állat 5 mg/l gáz vagy folyadékaeroszol vagy szilárd anyag (vagy ahol ez nem lehetséges, a vizsgált anyag fizikai vagy kémiai tulajdonságai miatt, beleértve a robbanásveszélyt is, a maximálisan elérhető koncentráció) hatásának való négyórás kitettség után 14 napon belül nem észlelnek a vizsgált anyaggal kapcsolatos halálozást, akkor nincs szükség további vizsgálatra.

1.6.2.5. *Expozíciós időtartam*

Az expozíció időtartamának négy órának kell lennie.

1.6.2.6. *Berendezés*

A kísérlethez olyan inhalációs berendezést kell használni, amely óránként legalább tizenkét alkalommal légcserét tesz lehetővé a dinamikus légmozgás fenntartása érdekében, azért hogy megfelelő oxigéntartalmat és egyenletesen eloszlatott expozíciós atmoszférát lehessen biztosítani. Ha kamrát használnak, annak kialakítása révén a lehető legkisebbre kell csökkenteni a kísérleti állatok zsúfoltságát, és lehetővé kell tenni a lehető legnagyobb mértékű expozíciót a vizsgált anyag belégzése útján. Általános szabályként a kamrai atmoszféra stabilitásának biztosítása érdekében a kísérleti állatok teljes térfogata nem haladhatja meg a vizsgálati kamra térfogatának 5%-át. Végezhetők csak az orron és szájon át, vagy csak a fejen át, illetve az egész testen keresztül megvalósuló egyedi expozíciós kamrai vizsgálatok; az első két módszer előnye, hogy minimalizálja a vizsgált anyag egyéb úton történő felvételének lehetőségét.

1.6.2.7. *Megfigyelési időszak*

A megfigyelési időszaknak legalább 14 napnak kell lennie. Azonban a megfigyelés időtartamát nem kell szigorúan értelmezni. Ezt a toxikus reakciók megjelenésének módja, a tünetek megjelenésének időpontja és a felépülési időtartam hosszúsága alapján kell meghatározni; ebből következően szükség esetén ezen időszak meghosszabbítható. Fontos az az időpont, amikor a toxicitás jelei megjelennek és eltűnnek, valamint a halál bekövetkezésének ideje, különösen, ha tendencia figyelhető meg a halál késedelmes bekövetkezésére.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Közvetlenül az expozíciót megelőzően meg kell mérni az állatok tömegét, majd az egyenletes kamrai koncentráció beállása után az állatokat ki kell tenni a kijelölt készülékben a vizsgált koncentráció hatásának négy órán át. A kiegyenlítődési időnek rövidnek kell lennie. A vizsgálatokat 22 ± 3 °C állandó hőmérsékleten kell végezni. Ideális esetben a relatív páratartalmat 30 és 70% között kell tartani, de bizonyos körülmények között (például aeroszolok vizsgálatakor) ez a gyakorlatban nem mindig kivitelezhető. A kamrán belül enyhe negatív nyomás (például ≤ 5 víz mm) fenntartása megakadályozza a vizsgált anyag kiszivárgását a környezetbe. Az állatok nem kaphatnak sem takarmányt, sem vizet az expozíció folyamán. A vizsgálati légkör létrehozásához és figyeléséhez megfelelő rendszereket kell használni. A rendszernek biztosítania kell, hogy a lehető leggyorsabban létrejöjjenek a stabil expozíciós körülményeké. A kamrát úgy kell tervezni és működtetni, hogy fennmaradjon a kamrán belül a vizsgálati légkör homogén eloszlása.

A következő paramétereket kell mérni, illetve figyelemmel kísérni:

– a légáramlás sebessége (folyamatosan);

– az anyag tényleges koncentrációja, amit az expozíció során a belégzési zónában legalább háromszor meg kell mérni (egyes légkörök esetében pl. ha aeroszolok magas koncentrációban vannak jelen, gyakoribb megfigyelésre is szükség lehet). Az expozíciós időszak folyamán a koncentráció nem változhat a középérték ± 15%-át meghaladó mértékben. Aeroszolok esetében azonban ez az érték nem biztos, hogy elérhető, ekkor elfogadható lehet egy ennél szélesebb tartomány. Aeroszolok esetében, amilyen gyakran csak szükséges (vizsgált csoportonként legalább egyszer) részecskeméret-elemzést kell végrehajtani.

– a hőmérséklet és a páratartalom, ha lehetséges, folyamatosan.

Az expozíció ideje alatt és azt követően az állatokat rendszeresen meg kell figyelni és a leleteket rögzíteni kell; külön feljegyzést kell vezetni minden egyes állatról. Az első nap során gyakran kell végrehajtani a megfigyeléseket. Minden munkanapon legalább egyszer gondos klinikai vizsgálatot kell végrehajtani, más megfigyeléseket naponta kell végezni, azon megfelelő tevékenységek végrehajtása mellett, amelyek célja a vizsgálatban részt vevő állatok elvesztésének minimálissá tétele, ilyen például a holtan talált állatok boncolása vagy lehűtése, vagy a gyenge, illetve haldokló állatok elkülönítése és elpusztítása.

A megfigyeléseknek ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légző- és keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomatomotoros aktivitás és viselkedési minta változásaira. Külön figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A halál időpontját a lehető legpontosabban kell feljegyezni. Az állatok súlyát egyenként, az expozíció után hetente és halálozáskor meg kell állapítani.

A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat befejezéséig életben maradt állatokat fel kell boncolni, különös figyelmet szentelve a felső és alsó légútban bekövetkező minden változásnak. Fel kell jegyezni minden jelentős patológiás elváltozást. Amennyiben szükséges, szövetmintákat kell venni a kórszövettani vizsgálathoz.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, megadva minden egyes csoporthoz az állatok számát a vizsgálat kezdetekor, az egyes állatok halálának időpontját, a toxicitás más jeleit mutató állatok számát, a toxikus hatások leírását és a boncolási leleteket. Ki kell számítani és fel kell jegyezni a tömegváltozásokat, ha az állat egy napnál tovább maradt életben. A vizsgált anyaggal összefüggő szenvedés és fájdalom miatt humánusan elpusztított állatok halálát az anyaggal kapcsolatos halálként kell feljegyezni. Az LC_{50} valamely elismert módszer segítségével határozható meg. Az értékelésnek tartalmaznia kell – amennyiben ez lehetséges – a dózis és a rendellenességek fellépése és súlyossága közötti kapcsolatot, ideértve a magatartási rendellenességeket, a klinikai tüneteket, a jelentős sérüléseket, testsúlyváltozásokat, halálozást és minden más toxikológiai hatást is.

3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– használt fajt, törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet,

– a vizsgálati körülményeket: az expozíciós készülék leírását,

beleértve a készülék konstrukcióját, típusát, méreteit, a levegőforrást, az aeroszolok előállítására szolgáló rendszert, a légkondicionálás módszerét, az állatoknak a vizsgálati kamrában való elhelyezését. A hőmérsékletet, a levegő páratartalmát, és adott esetben az aeroszol koncentráció stabilitását, illetve részecskeméret-eloszlás meghatározására használt berendezéseket szintén le kell írni.

Expozíciós adatok:

Ezen adatokat táblázatos formában kell közölni, az átlagértékek és az azoktól való eltérés megjelölésével. A következő adatokra van szükség:

a) légáram sebessége az inhalációs készülékben;

b) hőmérséklet és a levegő páratartalma;

c) névleges koncentráció (az inhalációs készülékbe helyezett vizsgált anyag összmennyisége osztva a levegő térfogatával);

d) vivőanyag jellege (ha van);

e) tényleges koncentráció a belégzési zónában;

f) a tömegfelező aerodinamikai átmérő („Mass Median Aerodynamic Diameter" MMAD) és a geometrikus standard deviáció („Geometric Standard Deviation" GSD);

g) a kiegyenlítődés időtartama;

h) az expozíciós időtartam;

– az adatok táblázatos összefoglalása nem és koncentráció szerint (azaz a vizsgálat során elhullott vagy elpusztított állatok száma; a toxicitás jeleit mutató állatok száma; az exponált állatok száma),

– az anyag adagolása során vagy azt követően bekövetkező halál időpontja, az állatok humánus elpusztításának okai és kritériumai,

– minden megfigyelés,

– a megfigyelési időszak végén (az alkalmazott számítási módszer megadásával) meghatározott LC_{50}-érték mindkét nemnél,

– az LC_{50}-hez tartozó 95 %-os konfidencia-intervallum (ahol ez megadható),

– dózis/mortalitás görbe és ennek meredeksége (ahol ezt megengedi a meghatározás módszere),

– boncolási leletek,

– a kórszövettani vizsgálatok eredményei,

– az eredmények kiértékelése (különleges figyelmet kell szentelni annak a hatásnak, amelyet a vizsgálat során az állatok humánus megölése gyakorolhat a kiszámított LC_{50}-értékre),

– az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

B.3. AKUT TOXICITÁS (DERMÁLIS)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta, a bőrre kell adagolni fokozatos adagokban több kísérleti állatcsoportnak, csoportonként egy adagot használva. Ezt követően megfigyelik a hatásokat és a halálesetek előfordulását. A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat végéig életben maradó állatokat is fel kell boncolni.

A súlyos és tartós betegség, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat humánus módon el lehet pusztítani. A vizsgált anyagokat nem szabad olyan módon adagolni, amelyről ismert, hogy jelentős szenvedést és fájdalmat okoz maró vagy irritatív tulajdonsága miatt.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napig a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással csoportokba kell osztani. A vizsgálat előtt körülbelül 24 órával el kell távolítani a szőrzetet az állatok törzsének hátulsó területéről nyírással vagy borotválással. A szőrzet nyírásakor vagy borotválásakor óvatosan kell eljárni, nehogy olyan bőrsérülést okozzanak, ami a felszívódást befolyásolhatja. A testfelület legalább 10%-át szabaddá kell tenni a vizsgált anyag alkalmazásához. Ha szilárd anyagot vizsgálnak, amelyet adott esetben porítani is lehet, az anyagot vízzel kellően át kell nedvesíteni, vagy szükség esetén vivőanyagot kell alkalmazni annak biztosítására, hogy jól tapadjon a bőrhöz. Vivőanyag használatakor figyelembe kell venni a vivőanyag hatását a vizsgált anyag bőrbe való behatolására. A folyékony vizsgált anyagokat rendszerint hígítás nélkül kell adagolni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Kifejlett patkány vagy nyúl használható. Más faj is használható, de azok használatát meg kell indokolni. Kísérleti célokra tenyésztett, laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya minimálisan, az átlagértéktől maximum ± 20%-kal térhet el egymástól.

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Minden koncentrációnál legalább öt állatot kell vizsgálni. Az állatoknak azonos neműnek kell lenniük. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Amennyiben rendelkezésre áll olyan információ, amely szerint valamelyik nem lényegesen érzékenyebben reagál, akkor ilyen nemű állatokat kell alkalmazni.

Megjegyzés: A rágcsálóknál magasabb rendű állatokkal végrehajtott akuttoxicitás-vizsgálatokban meg kell fontolni kisebb számú állat használatának lehetőségét. A dózisokat gondosan kell kiválasztani, és minden erőfeszítést meg kell tenni arra, hogy azok ne lépjék túl a közepesen toxikus dózisokat. Ilyen vizsgálatoknál el kell kerülni a vizsgált anyag letális dózisának beadását.

1.6.2.3. *Dózisok*

E szinteknek elegendő számúaknak, legalább háromnak, és megfelelően elosztottnak kell lenniük ahhoz, hogy a vizsgált csoportokban toxikus hatások és halálozási arányok egész sorát hozzák létre. Minden irritatív vagy maró hatást figyelembe kell venni a dózisok megállapításakor. Az adatoknak elegendőnek kell lenniük a koncentráció/hatás görbe létrehozására, és ahol lehetséges, lehetővé kell tenniük az LD_{50} elfogadható meghatározását.

1.6.2.4. *Határérték-vizsgálat*

A határérték-vizsgálatot el lehet végezni egyetlen, legalább 2 000 mg/testsúly kg dózissal adagolt 5 hím és 5 nőstény rágcsálóból álló csoporttal a fent leírt eljárások végrehajtásával. Ha a vizsgált anyaggal kapcsolatos halálozás figyelhető meg, akkor szükség lehet a teljes körű vizsgálat elvégzésére.

1.6.2.5. *Megfigyelési időszak*

A megfigyelési időszaknak legalább 14 napnak kell lennie. Azonban a megfigyelés időtartamát nem kell szigorúan értelmezni. Ezt a toxikus reakciók megjelenésének módja, a tünetek megjelenésének időpontja és a felépülési időtartam hosszúsága alapján kell meghatározni; ebből következően ezen időtartam szükség esetén meghosszabbítható. Fontos az az időpont, amikor a toxicitás jelei megjelennek és eltűnnek, valamint a halál bekövetkezésének ideje, különösen, ha tendencia figyelhető meg a halál késedelmes bekövetkezésére.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat egyesével kell a ketrecekben elhelyezni. A vizsgált anyagot a testfelület megközelítőleg 10%-át kitevő felületen egyenletesen elosztva kell felvinni az állat bőrére. Erősen mérgező anyagoknál a felület lehet ennél kisebb, de a felület lehető legnagyobb részét a lehető legvékonyabb és legegyenletesebb bevonattal kell ellátni.

A 24 órás expozíció ideje alatt a vizsgált anyagot a bőrrel porózus gézkötés és nem irritáló ragtapasszal kell érintkezésben tartani. A vizsgált területet megfelelő módon be kell fedni, azért hogy megmaradjon rajta a vizsgált anyag és a gézkötés, és az állatok ne nyalhassák le a vizsgált anyagot. Mozgásgátló szerkezeteket lehet használni annak megakadályozására, hogy az állat a vizsgált anyagot lenyelje, de a teljes immobilizáció mint módszer nem javasolt.

Az expozíciós idő leteltével a maradék vizsgált anyagot lehetőség szerint el kell távolítani a bőr felületének vízzel vagy más megfelelő módon történő megtisztítása útján.

A megfigyeléseket szisztematikusan fel kell jegyezni. Külön feljegyzést kell vezetni minden egyes állatról. Az első nap során gyakran kell végrehajtani a megfigyeléseket. Minden munkanapon legalább egyszer gondos klinikai vizsgálatot kell végrehajtani, más megfigyeléseket naponta kell végezni, azon megfelelő tevékenységek végrehajtása mellett, amelyek célja a vizsgálatban részt vevő állatok elhullásának minimalizálása, ilyen például a holtan talált állatok boncolása vagy lehűtése, vagy a gyenge vagy haldokló állatok elkülönítése vagy elpusztítása.

A megfigyeléseknek ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a kezelt bőrfelület, a szem és a nyálkahártya, valamint a légző- és keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomatomotoros aktivitás és viselkedési minta változásaira. Külön figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A halál időpontját a lehető legpontosabban kell feljegyezni. A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat befejezéséig életben maradt állatokat fel kell boncolni. Fel kell jegyezni minden jelentős patológiás elváltozást. Amennyiben szükséges, szövetmintákat kell venni a kórszövettani vizsgálathoz.

Toxicitás meghatározása a másik nemnél

Az egyik nemmel végzett vizsgálat befejezése után a másik nemből kiválasztott, legalább öt állatból álló csoport számára kell adagolni az anyagot annak megállapítására, hogy az e nemhez tartozó állatok nem érzékenyebbek-e jelentősebb mértékben a vizsgált anyagra. Bizonyos esetekben indokolható lehet kevesebb állat használata. Ahol megfelelő információ áll rendelkezésre annak bizonyítására, hogy a vizsgált nemhez tartozó állatok jelentősen érzékenyebbek, elhagyható a másik nemhez tartozó állatokkal végzett vizsgálat.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, megadva minden egyes csoportnál az állatok számát a vizsgálat kezdetekor, az egyes állatok halálának időpontját, a toxicitás más jeleit mutató állatok számát, a toxikus hatások leírását és a boncolási leleteket. Egyenként meg kell határozni az állatok tömegét, és fel kell ezt jegyezni röviddel a vizsgált anyag beadása előtt, ezután minden héten és a halál bekövetkeztekor; ki kell számítani és fel kell jegyezni a tömegváltozásokat, ha az állat egy napnál tovább maradt életben. A vizsgált anyaggal összefüggő szenvedés és fájdalom miatt humánusan elpusztított állatok halálát az anyaggal kapcsolatos halálként kell feljegyezni. Az LD_{50} valamely elismert módszer segítségével határozható meg.

Az értékelésnek tartalmaznia kell – amennyiben ez lehetséges – a dózis és a rendellenességek fellépése és súlyossága közötti kapcsolatot, ideértve a magatartási rendellenességeket, a klinikai tüneteket, a jelentős sérüléseket, testsúlyváltozásokat, a halálozást és minden más toxikus tünetet is.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a használt fajt, törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet stb.,

– a vizsgálati körülményeket (beleértve a bőrtisztítás módszerét és a kötszer típusát: zárt vagy nem zárt),

– a dózisokat (beleértve a vivőanyagot is, ha van és koncentrációk),

– a kezelt állatok nemét,

– az adatok táblázatos összefoglalását nem és koncentráció szerint (azaz a vizsgálat során elhullott vagy elpusztított állatok száma; a toxicitás jeleit mutató állatok száma; az exponált állatok száma),

– az anyag adagolása során vagy azt követően bekövetkező halál időpontját, az állatok humánus elpusztításának okait és kritériumait,

– minden megfigyelést,

– a 14 napban meghatározott teljes vizsgálat alá vont nemnél kapott LD_{50}- érték (az alkalmazott számítási módszer megadásával),

– az LD_{50}-hez tartozó 95 %-os konfidenciaintervallumot (ahol ez megadható),

– a dózis/mortalitás görbét és ennek meredekségét (ahol ezt megengedi a meghatározás módszere),

– a boncolási leleteket,

– a kórszövettani vizsgálatok eredményeit,

– a másik nemmel végrehajtott vizsgálatok eredményeit,

– az eredmények kiértékelését (külön figyelmet kell szentelni annak a hatásnak, amelyet a vizsgálat során az állatok humánus leölése gyakorolhat a kiszámított LD_{50}-értékre),

– az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

B.4. AKUT TOXICITÁS (BŐRIRRITÁCIÓ)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Előzetes megfontolások

Gondosan meg kell vizsgálni az anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló információkat, hogy minimálisra csökkentsék az anyagok olyan állapotok melletti vizsgálatát, amelyek valószínűleg súlyos reakciókhoz vezetnek. A következő információk hasznosnak bizonyulhatnak annak mérlegelésekor, hogy teljes vizsgálatot végezzenek-e, egyetlen állatot vizsgáljanak-e vagy semmilyen további vizsgálatra nem lesz szükség.

i. Fizikai-kémiai tulajdonságok és kémiai reakcióképesség. Erősen savas vagy lúgos kémhatású anyagokat (amelyek például 2-nél kisebb vagy 11,5-nél nagyobb pH-értéket mutatnak) nem kell megvizsgálni a primer bőrirritáció szempontjából, ha maró hatások várhatók. Az alkáli vagy savtartalékot is figyelembe kell venni.

ii. Ha súlyos tüneteket alátámasztó információk állnak rendelkezésre hitelesített *in vitro* vizsgálatokból, akkor nincs szükség a teljes vizsgálatra.

iii. Akuttoxicitás-vizsgálatokból kapott eredmények. Ha már végrehajtották akuttoxicitás-vizsgálatot az anyaggal dermális adagolással a határérték-vizsgálat dózisával (2 000 mg/testsúly kg) és semmilyen bőrirritáció nem figyelhető meg, szükségtelen lehet a bőrirritáció további vizsgálata. Ezenkívül szükségtelen azon anyagok vizsgálata, amelyekről már bebizonyosodott, hogy bőrön felszívódva nagymértékben toxikusak.

A vizsgált anyagot egyetlen adagban adagolják több kísérleti állat bőrére, úgy, hogy minden egyes állat a saját kontrolljaként szolgál. Meghatározott időtartam után megállapítják és kategóriába sorolják az irritáció mértékét, és megadják annak további leírását a hatások teljes kiértékelésének biztosítására. A megfigyelések időtartamának elegendőnek kell lennie a megfigyelt hatások visszafordíthatóságának teljes kiértékeléséhez.

A súlyos és tartós betegség, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat humánusan el lehet pusztítani.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Körülbelül 24 órával a vizsgálat előtt el kell távolítani a szőrzetet, nyírással vagy borotválással, az állatok háti oldaláról.

A nyírás vagy borotválás során gondosan ügyelni kell arra, hogy a bőrt ne sértsék meg. Csak egészséges, sértetlen bőrű állatokat szabad használni.

Egyes nyúltörzseken sűrű szőrzetből álló szigetecskék vannak, amelyek feltűnőbbek az év bizonyos szakaszaiban. A vizsgált anyagokat nem szabad e sűrű szőrnövekedési zónáknál alkalmazni.

Ha szilárd anyagot vizsgálnak, amelyet adott esetben porítani is lehet, az anyagot vízzel kellően át kell nedvesíteni, vagy szükség esetén vivőanyagot kell alkalmazni annak biztosítására, hogy jobban tapadjon a bőrre. Vivőanyag használatakor figyelembe kell venni a vivőanyag hatását a vizsgált anyag bőrirritatív hatására. A folyékony vizsgált anyagokat rendszerint hígítás nélkül kell alkalmazni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Bár többféle emlős állatfajta használható, az albínó nyúl az előnyben részesített fajta.

1.6.2.2. *Az állatok száma*

Ha az *in vitro* szűrési vizsgálatokból vagy más megfontolásokból gyanítható, hogy az anyag nekrózist okozhat (vagyis maró hatású), meg kell fontolni az egyetlen állattal végzett vizsgálat lehetőségét. Ha e vizsgálat eredményei nem jeleznek maró hatást, a vizsgálatot legalább két további állat vizsgálatával kell befejezni.

A teljes vizsgálathoz legalább három egészséges, ivarérett állatot kell használni. Nem szükséges nem kezelt kontrollcsoportot létrehozni. További állatokra lehet szükség a többféleképpen magyarázható leletek tisztázásához.

1.6.2.3. *Dózis*

Ellenjavallat hiányában 0,5 ml folyadékot vagy 0,5 g szilárd anyagot, vagy félszilárd anyagot visznek fel a vizsgált területre. Az egyes állatok szomszédos, nem kezelt bőrfelületei szolgálnak kontrollfelületekként a vizsgálathoz.

1.6.2.4. *Megfigyelési időszak*

A megfigyelés időtartamát nem kell szigorúan értelmezni. Ezen időtartamnak elegendőnek kell lennie a megfigyelt hatások visszafordíthatóságának vagy vissza nem fordíthatóságának teljes kiértékelésére, de általában nem kell, hogy túllépje az anyag felvitele utáni 14 napot.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat egyesével kell a ketrecekben elhelyezni. A vizsgált anyagot fel kell vinni egy kis bőrfelületre (körülbelül 6 cm^2), és ezt be kell fedni egy gézdarabbal, amelyet nem irritáló ragtapasszal kell a helyén tartani. Folyadékok vagy bizonyos paszták esetében lehet, hogy a gézdarabra kell felvinni a vizsgált anyagot, és ezután kell a bőrhöz rögzíteni. A gézdarabot lazán érintkezésben kell tartani a bőrrel megfelelő zárt vagy félzárt kötéssel az expozíció során. Meg kell akadályozni, hogy az állat hozzáférhessen a gézdarabhoz, és ezt követően lenyelhesse/belélegezhesse a vizsgált anyagot.

Az expozíciós időtartam végén el kell távolítani a maradék vizsgált anyagot, ahol ez lehetséges, víz vagy megfelelő oldószer segítségével a kiváltott reakció megváltoztatása vagy a felhám sérelme nélkül.

Az expozíció időtartamának négy órának kell lennie.

Ha gyanítható, hogy az anyag nekrózist okozhat (vagyis maró hatású), csökkenteni kell az expozíció időtartamát (például egy órára vagy három percre). Az ilyen vizsgálathoz az első esetben egyetlen állat is alkalmazható; ha a vizsgált vegyület akut dermális toxicitása ezt nem zárja ki eleve, egyidejűleg három gézdarabot kell felhelyezni az állatra. Az első gézdarabot három perc után kell eltávolítani. Ha semmilyen súlyos bőrreakció nem figyelhető meg, a második gézdarabot egy óra után kell eltávolítani. Ha az e szakaszban végrehajtott megfigyelések azt jelzik, hogy négyórás expozíció szükséges, és ez humánusan végrehajtható, a harmadik gézdarabot négy óra után kell eltávolítani, és a reakciókat értékelni.

Ebben az esetben (azaz, amikor lehetségessé vált a négyórás expozíció), a vizsgálatot legalább két további állat használatával kell befejezni, kivéve, ha etikai aggályok merülnek fel (például ha a négyórás expozíció halált okoz).

Ha súlyos bőrreakciót (például elhalást) figyelnek meg vagy három perc vagy egy óra alatt, a vizsgálatot azonnal be kell fejezni.

Hosszabb expozíció is szükséges lehet, például várt emberi felhasználástól vagy expozíciótól függően.

1.6.3.1. *Megfigyelés és értékelés*

Figyelni kell az állatokat eritéma és ödéma jeleit keresve, és a tapasztalt reakciókat kategóriába kell sorolni a hatvanadik percben, majd 24, 48 és 72 órával a géz eltávolítása után. A bőrirritációt az 1. táblázatban bemutatott rendszer szerint kell kategóriába sorolni, és regisztrálni. További megfigyelésekre lehet szükség, ha 72 órán belül teljes mértékben nem állapítottuk meg a visszafordíthatóságot. Az irritáció megfigyelésén kívül részletesen le kell írni minden olyan súlyos sérülést, mint a felmaródás (bőrszövet visszafordíthatatlan elpusztulása, necrozis) és egyéb toxikus hatások.

Nem egyértelmű reakciók tisztázására, amelyek nem láthatók a bőrnek a vizsgált anyag okozta elszíneződése miatt, olyan módszerek használhatók, mint például a kórszövettani vizsgálat vagy a bőrredővastagságmérés.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, minden egyes állathoz megadva az eritémára és ödémára az irritáció fokát a megfigyelési időszak során. Fel kell jegyezni minden súlyos sérülést, az irritáció mértékének és természetének leírását, a visszafordíthatóságot vagy necrozist és minden más megfigyelt toxikus hatást.

3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a használt fajt, törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet stb.,

– a vizsgálati körülményeket (ideértve a kémiai anyag lényeges fizikai-kémiai tulajdonságait, a bőrelőkészítés és tisztítás módszerét, és a kötszer típusát: zárt vagy nem zárt),

– minden egyes állatnál és minden egyes megfigyelési időpontnál (például 1, 24, 48 és 72 óra stb. a géz eltávolítása után) az irritáció fajtájára vonatkozó adatok összefoglalását,

– minden megfigyelt súlyos sérülés leírását, ideértve a korróziót is,

– a megfigyelt ingerlés mértékét és természetét, és minden kórszövettani megállapítás leírását,

– bőrirritációtól eltérő minden egyéb toxikus hatás leírását,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értékelését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. SZAKIRODALOM

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

Függelék

TÁBLÁZAT: BŐRREAKCIÓK KATEGÓRIÁBA SOROLÁSA

Eritéma és pörkképződés

	Érték
Nincs eritéma	0
Nagyon enyhe eritéma (alig észrevehető)	1
Jól meghatározható eritéma	2
Közepes vagy súlyos eritéma	3
Súlyos eritéma (céklavörös szín) vagy pörkképződés (mély sérülések), amely megakadályozza az eritéma mértékének megállapítását	4

Ödémaképződés

Nincs ödéma	0
Nagyon enyhe ödéma (alig észrevehető)	1
Enyhe ödéma (a terület szélei a tapintható kiemelkedések miatt jól meghatározottak)	2
Közepes ödéma (a szélek körülbelül 1 mm-re kiemelkednek)	3

B.5. AKUT TOXICITÁS (SZEMIRRITÁCIÓ)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Előzetes megfontolások

Gondosan meg kell vizsgálni az anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló információkat, hogy minimálisra csökkentsék az anyagok olyan állapotok melletti vizsgálatát, amelyek valószínűleg súlyos reakciókhoz vezetnek. A következő információk lehetnek hasznosak ebből a szempontból.

i. Fizikai-kémiai tulajdonságok és kémiai reakcióképesség. Nincs szükség olyan erősen savas vagy lúgos kémhatású anyagok vizsgálatára, amelyek például várhatóan 2 vagy ennél kevesebb, vagy 11,5 vagy ennél nagyobb pH-értéket hoznak létre a szemben, amennyiben súlyos sérülések várhatók. Az alkáli vagy savtartalékot is figyelembe kell venni.

ii. Hitelesített alternatív vizsgálatokból kapott eredmények; azon anyagokat, amelyekről már kimutatták, hogy potenciálisan maró vagy súlyosan irritatív tulajdonságokkal rendelkeznek, nem kell vizsgálni szemirritáció szempontjából, mivel feltételezhető, hogy az ilyen anyagok súlyos hatásokat fognak létrehozni a szemben az e módszer használatával végrehajtott vizsgálat során.

iii. Bőrirritációs vizsgálatokból kapott eredmények. Azon anyagokat, amelyekről a bőrirritációs vizsgálat során már bebizonyosodott, hogy maró vagy súlyosan irritatív hatásúak, nem kell tovább vizsgálni szemirritáció szempontjából, mivel feltételezhető, hogy az ilyen anyagok súlyos tüneteket okoznának a szemen is.

A vizsgált anyagot egyetlen adagban kell adagolni több kísérleti állatnál, mindegyiknek az egyik szeménél; a nem kezelt szem kontrollként szolgál. Ki kell értékelni, és meghatározott időközönként kategóriába sorolni az irritáció mértékét a hatások teljesebb megítélése érdekében. A megfigyelések időtartamának elegendőnek kell lennie a megfigyelt hatások visszafordíthatóságának teljes kiértékeléséhez.

A súlyos és tartós szenvedés, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat humánusan el lehet pusztítani.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

A vizsgálathoz kiválasztott minden egyes kísérleti állat mindkét szemét meg kell vizsgálni 24 órával a vizsgálatot megelőzően. Szemirritációt, szemelégtelenségeket vagy szaruhártyasérülést mutató állatokat nem szabad használni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Különféle kísérleti állatokat lehet használni, az egészséges, ivarértett albínó nyúl az előnyben részesített fajta.

1.6.2.2. *Az állatok száma*

Egyetlen állat vizsgálatát kell mérlegelni, ha jelentős hatások várhatók. Ha ennek az egy nyúlnál elvégzett vizsgálatnak az eredményei azt sugallják, hogy az anyag súlyosan irritálja (visszafordítható hatás) vagy marja (visszafordíthatatlan hatás) a szemet a leírt eljárás használatakor, lehet, hogy nem kell végrehajtani további szemirritációs vizsgálatot további állatokon. Esetenként azonban specifikus szempontok vizsgálatára szükség lehet további állatokon végrehajtott további kísérletekre.

Egyetlen állat vizsgálatától eltérő esetekben legalább három állatot kell használni. További állatokra lehet szükség a nem egyértelmű leletek tisztázására.

1.6.2.3. *Dózis*

Folyadékok vizsgálatához 0,1 ml-es dózist kell használni. Szilárd anyagok, paszták és szemcsés anyagok vizsgálatához a felhasznált mennyiségnek 0,1 ml térfogatnak vagy körülbelül 0,1 gramm tömegnek kell lennie (a tömeget mindig fel kell jegyezni). Ha a vizsgált anyag szilárd vagy szemcsézett, finom porrá kell őrölni. Finom tömörítés után, amely például a mérőtartály ütögetésével végezhető, meg kell mérni a részecskék térfogatát.

Pumpás spray vagy túlnyomásos aeroszolos palackokban lévő anyagok esetében a folyadékot ki kell hajtani, és össze kell gyűjteni 0,1 ml-t, majd ezt a szembe kell csepegtetni úgy, ahogyan a folyadékokhoz közölt leírás ismerteti.

1.6.2.4. *Megfigyelési időszak*

A megfigyelés időtartamát nem kell szigorúan értelmezni. Ezen időtartamnak elegendőnek kell lennie a megfigyelt hatások visszafordíthatóságának vagy vissza nem fordíthatóságának teljes kiértékelésére, de általában nem kell, hogy meghaladja az anyag felvitele utáni 21 napot.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat egyesével kell a ketrecekben elhelyezni. A vizsgált anyagot minden egyes állat egyik szemének kötőhártyazsákjába kell adagolni, miután az alsó szemhéjat óvatosan elhúztuk a szemgolyótól. A szemhéjakat ezután óvatosan össze kell fogni körülbelül egy másodpercig, azért hogy az anyag kiszivárgását megakadályozzuk. A másik szem, amely kezeletlen marad, kontrollként szolgál.

Ha feltételezhető, hogy az anyag túlságosan nagy fájdalmat okozhat, helyi érzéstelenítés alkalmazható a vizsgált anyag becsepegtetése előtt. A helyi érzéstelenítő típusát, koncentrációját és alkalmazásának idejét gondosan kell kiválasztani annak biztosítására, hogy használatából ne származzanak semmilyen jelentős eltérések a vizsgált anyagra adott reakciók között. A kontrollként kezeletlenül maradt szemet hasonlóan érzéstelenníteni kell.

A vizsgált állatok szemét nem szabad kiöblíteni a vizsgált anyag becsepegtetését követő 24 órán át. 24 óra elteltével szemöblítés alkalmazható, ha szükséges.

Néhány olyan anyag esetében, amelyekről ezen vizsgálattal már kiderült, hogy irritatív hatásúak, szükségesnek mutatkozhatnak további vizsgálatok olyan nyulak használatával, amelyek szemét az anyag becsepegtetése után hamarosan kiöblítik. Ezen esetekben ajánlatos három nyulat használni. A cseppentés után fél perccel a nyulak szemét fél percen át kell öblíteni, olyan mennyiségű vízzel és áramlási sebességgel, amely nem okoz sérülést.

1.6.3.1. *Megfigyelés és kategóriába sorolás*

A szemeket az 1., 24., 48. és 72. órában kell megvizsgálni. Ha 72 óra elteltével sincs bizonyíték szemsérülésekre, a vizsgálat befejezhető.

A szaruhártyára kiterjedő vagy egyéb szemképleteken tartósan fennálló irritációnál meghosszabbított idejű megfigyelésre lehet szükség a változások előrehaladásának és visszafordíthatóságának vagy vissza nem fordíthatóságának meghatározására. A szaruhártya, a szivárványhártya és a kötőhártya megfigyelésein kívül minden más megfigyelt elváltozást is fel kell jegyezni. Minden egyes vizsgálatkor fel kell jegyezni a szemreakció súlyosságát a függelékben közölt táblázat alapján. (A szemreakciók kategóriába sorolása különféle értelmezéseket tesz lehetővé. A vizsgáló laboratóriumokban és az egyéb helyeken végrehajtott megfigyelések értelmezésének megkönnyítésére összehasonlításként illusztrált szemirritációs útmutató használható.)

A reakciók vizsgálata megkönnyíthető binokuláris nagyító, kézi réslámpa, biomikroszkóp vagy más alkalmas készülék használatával. A 24. órában végzett megfigyelések feljegyzése után tovább vizsgálható bármelyik vagy minden nyúl szeme a fluorescein segítségével.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, bemutatva minden egyes állathoz az irritációs kategóriába sorolást a kijelölt megfigyelési időpontban. A jelentésben meg kell adni az irritáció mértékének és természetének leírását, a súlyos sérülések jelenlétét és minden más olyan hatást is, amely nem a megfigyelt szemmel kapcsolatos.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– állatokkal kapcsolatos adatokat (használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend stb.),

– a vizsgálati körülményeket (ideértve a kémiai anyag lényeges fizikai-kémiai tulajdonságait),

– minden egyes állatnál és minden egyes megfigyelési időpontnál (például 1, 24, 48 és 72 óra) az irritációra/maró hatásra vonatkozó adatok táblázatos összefoglalását,

– minden megfigyelt súlyos sérülés leírását,

– a megfigyelt irritáció vagy maró hatás mértékének és természetének beszámoló jellegű leírását, ideértve az érintett szaruhártya érintett területének leírását és a visszafordíthatóságot is,

– az 1., 24., 48. és 72. órában az irritációs kategóriába soroláshoz használt módszer (például kézi réslámpa, biomikroszkóp, fluorescein festés) leírását,

– nem a szemet érintő helyi hatások ismertetését,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

Függelék

A SZEMELVÁLTOZÁSOK KATEGÓRIÁBA SOROLÁSA

Szaruhártya

Homályosság: a homály mértéke (a legsűrűbb területet kell venni az érték megállapításához)

Fekélyesedés vagy homály nem észlelhető 0

Szórványos vagy diffúz homályos területek (a megszokott csillogás enyhe tompulásán kívül), a szivárványhártya részletei tisztán láthatók 1

Könnyen kivehető áttetsző terület, a szivárványhártya részletei kissé elhomályosodtak 2

Gyöngyházfényű terület, a szivárványhártya semmilyen részlete nem látható, a pupilla mérete alig észlelhető 3

Nem átlátszó szaruhártya, szivárványhártya egyátalán nem látható 4

Szivárványhártya

Normális 0

Kifejezetten mélyebb redők, vérbőség, duzzanat, mérsékelt vérbőség vagy belövelltség a szaruhártya körül, ezek közül bármelyik vagy ezek bármilyen kombinációja, a szivárványhártya még reagál a fényre (lassú reagálás pozitív) 1

Nincs reagálás a fényre, vérzés, jelentős roncsolódás (ezek közül bármelyik vagy mindegyik) 2

Kötőhártya

Vörösödés (a kontrollszemmel összehasonlítva a szemhéj vagy a szemgolyó kötőhártyájának legsúlyosabb mértékű elváltozására utal)

Normális véredények 0

Egyes vérerek egyértelműen vérteltek (belövelltek) 1

Diffúz, bíborvörös szín, az egyes vérerek nehezen kivehetők 2

Diffúz, erőteljes vörös 3

Kemózis: szemhéjak és/vagy pislogóhártyák

Nincs duzzanat 0

Bármilyen, normálnál nagyobb duzzanat (pislogóhártyákat is ideértve) 1

Nyilvánvaló duzzanat a szemhéjak részleges kifordulásával 2

Duzzanat, amikor a szemhéjak körülbelül félig zárva vannak 3

B.6. BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Megjegyzések:

Az érzékenységnek, illetve a vizsgálatok azon képességének, amely felderíti azon anyagokat, amelyeknek az embereken potenciális bőrszenzibilizáló hatásuk van, nagy jelentősége van a toxicitás közegészségügyi osztályozási rendszerében.

Nincs olyan vizsgálati eljárás, amelyikkel valamennyi, az emberi bőrre potenciálisan bőrszenzibilizáló hatással bíró anyagot megfelelően meg lehet határozni, illetve amely az összes anyag tekintetében jelentőséggel bír.

Az anyag fizikai tulajdonságait, beleértve a bőrön való áthatolás képességét és egyéb tényezőket is meg kell fontolni a vizsgálat kiválasztása során.

Kétféle tengerimalacokkal végzett vizsgálat létezik: az egyik az adjuvánst használó vizsgálat, amelyikben az allergiás állapot esetleges előidézése a Freund-komplett adjuvánsban (FCA = „Freunds Complete Adjuvant") való feloldás vagy szuszpendálás segítségével történik; a másik vizsgálathoz nem kell adjuváns.

Az adjuvánst használó vizsgálatok valószínűleg pontosabbak egyes anyagok emberek bőrén érzékenységet előidéző hatásának előrejelzésére, mint azon módszerek, amelyek nem alkalmazzák az FCA-t, ezért e módszerek előnyben részesülnek.

A tengerimalac maximizációs módszer („Guinea-Pig Maximisation Test", GMPT) széles körben alkalmazott adjuvánst használó vizsgálati módszer. Bár számos másik módszer is alkalmazható a szenzibilizáló hatás megállapítására, a GPMT a leginkább javasolt adjuváns típusú módszer.

Sok vegyianyagosztály esetében az adjuvánst nem alkalmazó vizsgálatok (amelyek közül a leginkább javasolt a Bühler-vizsgálat) az általános vélemény szerint kevésbé érzékenyek.

Egyes esetekben megfelelő érvek szólnak a külsőleg történő adagolással végzett Bühler-vizsgálat választása mellett, a bőrbe befecskendezéses GPMT-vizsgálat alkalmazása helyett. A Bühler-vizsgálat alkalmazását tudományosan indokolni kell.

Az alábbi módszer ismerteti a GPMT- és a Bühler-vizsgálatot. Más módszerek is alkalmazhatók, ha alkalmazásuk jóváhagyott és tudományosan alátámasztottak.

Tekintet nélkül a használt módszerekre, rendszeres időközönként (6 hónaponként) ellenőrizni kell a bőrszenzibilizációs vizsgálathoz alkalmazásra kerülő tengerimalactörzs érzékenységét ismert enyhe–mérsékelt érzékenyítő anyag segítségével; a kapott pozitív reagálásoknak elegendő számúaknak kell lenniük.

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

A következő anyagokat javasoltak szükség szerinti hígításban, valamint ajánlott minden más olyan érzékenyítő anyag használata, amely vagy a szakirodalomból ismert, vagy a vizsgált anyag csoportjához tartozik.

- p-fenilén-diamin	CAS szám 106-50-3
- 2,4-dinitro-klór-benzol	CAS szám 97-00-7
- kálium-dikromát	CAS szám 7778-50-9
- neomicin-szulfát	CAS szám 1405-10-3
- nikkel-szulfát	CAS szám 7786-81-4

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A kezdeti expozíciót követően (indukciós fázis) az állatokat az utolsó kezelés után körülbelül két héttel kiváltó expozíciónak („challenge exposure") kell kitenni a vizsgálati anyag alkalmazásával annak megállapítására, hogy létrejött-e a hiperérzékeny állapot. Az érzékenyítést annak vizsgálatával lehet meghatározni, hogy hogyan reagál a bőr a kiváltó expozícióra.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK LEÍRÁSA

1.6.1. **Tengerimalac maximizációs módszer („Guinea-Pig Maximization Test", GPMT)**

1.6.1.1. *Előkészületek*

Az egészséges, fiatal felnőtt albinó tengerimalacokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerűen, kezelt és kontrollcsoportokba kell osztani. Az anyag alkalmazása előtt nyírással vagy borotválással el kell távolítani a szőrzetet a váll környékéről. Óvatosan kell eljárni, vigyázva arra, hogy a bőr ne sérüljön meg.

1.6.1.2. *Vizsgálati körülmények*

1.6.1.2.1. A kísérlethez használt állatok

Kísérleti célokra általánosan használt, laboratóriumban szaporított, albinó, 500 grammnál kisebb tömegű tengerimalacokat kell használni.

1.6.1.2.2. Az állatok száma és neme

Hím és nőstény egyedek egyaránt használhatók. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Legalább 10 állatot kell alkalmazni a kezelt és 5-öt a kontrollcsoportban. Ha kevesebb állatot használnak, azt indokolni kell. Többféleképpen magyarázható eredmények esetében kórszövettani vizsgálat segíthet eldönteni, hogy meg kell-e ismételni a vizsgálatot egy másik állatcsoport segítségével.

Ha nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy a vizsgált anyag szenzibilizáló hatású-e, ajánlatos vizsgálatot végrehajtani további állatokkal úgy, hogy legalább 20 legyen a kezelt és 10 a kontrollcsoportban lévő állatok száma.

1.6.1.2.3. Dózisok

A vizsgált anyag koncentrációját olyan szintre kell beállítani, amely valamilyen bizonyítékot hoz létre a bőrirritációról, de amelyet még jól tűrnek az állatok az egyes indukciós fázisokban.

A kiváltó koncentráció az a maximális koncentráció, amely nem hoz létre bőrirritációs bizonyítékot a nem érzékenyített állatoknál.

E koncentrációk kisméretű (két vagy három állatra kiterjedő) ellenőrző vizsgálattal határozhatók meg.

1.6.1.2.4. Megfigyelési időszak

Az indukciós fázis során megfigyeléseket kell végezni az esetleges irritatív hatások ellenőrzésére. A kiváltásos expozíció után fel kell jegyezni a bőrreakciókat a tapasz eltávolítása után 24 és 48 órával.

1.6.1.3. *A kísérlet végrehajtása*

A vizsgálat kezdete előtt és a vizsgálat végén meg kell mérni az állatok súlyát. A váll környékéről el kell távolítani a szőrzetet. Az eljárás két szakaszból áll:

1.6.1.3.1. Indukció

0. nap – kezelt csoport

A következő injekciókat kell intradermálisan, 0,1ml térfogattal, a váll környékére beadni, olyan módon, hogy minden párból egy a középvonal egyik, egy a másik oldalára essen:

1. injekció:	0,1 ml FCA 1:1 arányban vízzel vagy fiziológiás sóoldattal keverve,
2. injekció:	0,1 ml vizsgált anyag, ha szükséges, megfelelő oldószerben feloldva,
3. injekció:	0,1 ml vizsgált anyag FCA-ban.

A 3. injekcióban a vízben oldható anyagokat 0,05 ml vízben és 0,05 ml nem hígított FCA-ban kell feloldani. Ha zsírban oldható vagy oldhatatlan anyagokat kell vizsgálni, azokat nem hígított FCA-val kell kezelni.

A 3. injekcióban a vizsgált anyag végleges koncentrációjának egyenlőnek kell lennie a 2. injekcióban bevitt anyag koncentrációjával.

Az 1. és 2. injekciókat egymáshoz közel és a fejhez a legközelebbi helyen kell beadni, míg a 3. beadása a vizsgált terület fejtől távoli része felé történik.

0. nap – kontrollcsoport

A következő intradermális adagpárokat kell befecskendezni a fent leírtakkal azonos helyeken:

1. injekció:	0,1 ml FCA 1:1 arányban vízzel vagy fiziológiás sóoldattal keverve,
2. injekció:	0,1 ml oldószer (önmagában),
3. injekció:	0,1 ml oldószer FCA-ban.

6. nap – kontroll és kezelt csoport

Ha az anyag nem bőringerlő hatású, a vizsgált területet, lenyírás és/vagy borotválás után, 0,5 ml 10 százalékos nátrium-lauril-szulfát vazelines elegyével kell kezelni a helyi irritáció kiváltása érdekében.

7. nap – kezelt csoport

A vizsgált területet újra szőrteleníteni kell. A valamilyen alkalmas vivőanyagban (a vivőanyag kiválasztását indokolni kell; a szilárd anyagokat finom porrá kell őrölni és beépíteni valamilyen alkalmas vivőanyagba; a folyadékok, ha ehhez megfelelőek, közvetlenül alkalmazhatók) feloldott vizsgált anyagot el kell teríteni egy szűrőpapíron (2 × 4 cm), majd a vizsgált felületre helyezni és azzal elnyelő kötszer segítségével 48 órán át érintkezésben tartani.

7. nap – kontrollcsoport

A vizsgált területet újra szőrteleníteni kell. Csak vivőanyagot kell felvinni megfelelő módon a vizsgált területre, és ezzel elnyelő kötszerrel érintkezésben tartani 48 órán át.

1.6.1.3.2. Kiváltás

21. nap

A kezelt és kontrollállatok horpaszait meg kell tisztítani a szőrtől. Fel kell helyezni a vizsgált anyagot tartalmazó tapaszt vagy tokot a vizsgált állatok egyik horpaszára, és a csak oldószert tartalmazó tapaszt vagy tokot a másik horpaszára.

A tapaszt elnyelő kötszer segítségével 24 órán át érintkezésben kell tartani a bőrrel.

A kontrollcsoportot ugyanilyen módon kell kezelni.

23. és 24. nap

– a tapasz eltávolítása után 21 órával a kezelt területet meg kell tisztítani és, ha szükséges, szőrteleníteni,

– három órával később (48 órával a kiváltás kezdetétől számítva) értékelni kell a bőrreakciót,

– e megfigyelés után 24 órával egy második megfigyelést (72. órában) is végre kell hajtani és feljegyezni az eredményt.

Ha szükséges az első kiváltás eredményeinek pontosítása, akkor – szükség esetén – egy második kiváltás (azaz újbóli kiváltás) alkalmazása megfontolandó egy új kontrollcsoporton, hozzávetőleg egy héttel az első után.

1.6.1.3.3. Megfigyelés és kategóriába sorolás

Fel kell jegyezni, és a jelentésben szerepeltetni kell az indukciós és a kiváltásos eljárásokból származó minden bőrreakciót és minden szokatlan észrevételt.

Nem egyértelmű reakciók tisztázására, amelyek nem láthatók a bőrnek a vizsgált anyag okozta elszíneződése miatt, olyan módszerek használhatók, mint például a kórszövettani vizsgálat vagy a bőrredővastagságmérés.

1.6.2. **Bühler-vizsgálat**

1.6.2.1. *Előkészületek*

Az egészséges, fiatal felnőtt albinó tengerimalacokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerűen, kezelt és kontrollcsoportokba kell osztani. Az anyag alkalmazása előtt nyírással vagy borotválással el kell távolítani a szőrzetet az egyik horpaszról. Óvatosan kell eljárni, vigyázva arra, hogy ne sérüljön meg a bőr.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

1.6.2.2.1. A kísérlethez felhasznált állatok

Kísérleti célokra általánosan használt, laboratóriumban szaporított, albinó, 500 grammnál kisebb tömegű tengerimalacokat kell használni.

1.6.2.2.2. Az állatok száma és neme

Hím és nőstény egyedek egyaránt használhatók. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Legalább 10 állatot kell alkalmazni a kezelt és 5-öt a kontrollcsoportban. Ha kevesebb állatot használnak, azt indokolni kell. Többféleképpen magyarázható eredmények esetében kórszövettani vizsgálat segíthet eldönteni, hogy meg kell-e ismételni a vizsgálatot egy másik állatcsoport segítségével.

1.6.2.2.3. Dózisok

Minden egyes indukciós fázishoz a vizsgált anyag koncentrációját a legmagasabb olyan szintre kell állítani, amely szisztematikusan jól elviselhető, és amely, irritatív anyagok esetében, enyhe-mérsékelt irritációt hoz létre a kísérleti állatok többségénél. A kiváltási koncentráció az a maximális koncentráció, amely nem hoz létre bőrirritációt a nem érzékenyített állatoknál. E koncentrációk kisméretű (két vagy három állattal végrehajtott) ellenőrző vizsgálattal határozhatók meg.

1.6.2.2.4. Megfigyelési időszak

Az indukciós fázis során megfigyeléseket kell végezni az esetleges irritatív hatások ellenőrzésére. A kiváltásos expozíció után fel kell jegyezni a bőrreakciókat a tapasz eltávolítása után 24 és 48 órával.

1.6.2.3. *A kísérlet végrehajtása*

A vizsgálat kezdete előtt és a vizsgálat végén meg kell mérni az állatok súlyát.

Az eljárás két szakaszból áll:

1.6.2.3.1. Indukció

0. nap – kezelt csoport

Az egyik horpaszról el kell távolítani a szőrzetet. Egy vattapamacson el kell teríteni valamely alkalmas vivőanyagban (a vivőanyag kiválasztását indokolni kell; folyadékok, ha ehhez megfelelőek, közvetlenül alkalmazhatók) feloldott 0,5 ml vizsgált anyagot. Ezt rá kell helyezni a vizsgált területre, és egy elnyelő tapasz vagy tok és valamilyen alkalmas kötszer segítségével a bőrrel érintkezésben kell tartani 6 órán át.

0. nap – kontrollcsoport

Az egyik horpaszról el kell távolítani a szőrzetet. Csak vivőanyagot kell felvinni megfelelő módon a vizsgált felületre. Ezt egy elnyelő tapasz vagy tok és valamilyen alkalmas kötszer segítségével kell a bőrrel érintkezésben tartani 6 órán át.

7. és 14. nap

Ugyanazon vizsgált területen (ha szükséges, szőrtől megtisztítva) ugyanazon alkalmazást kell végrehajtani a 7. napon és 14. napon, mint a 0. napon.

1.6.2.3.2. Kiváltás

28. nap

A kezelt és kontrollállatok másik horpaszát is meg kell tisztítani a szőrtől. Fel kell helyezni egy, 0,5 ml vizsgált anyagot tartalmazó elnyelő tapaszt vagy tokot, a maximális nem ingerlő koncentráció mellett, a kezelt állatok horpaszának hátsó részére. Csak vivőanyagot tartalmazó tapaszt vagy tokot is fel kell helyezni a horpasz elülső részére.

Az elnyelő tapaszokat alkalmas kötszer segítségével 6 órán át kell a bőrrel érintkezésben tartani.

A kontrollcsoportot ugyanilyen módon kell kezelni.

29. és 30. nap

– a tapasz eltávolítása után 21 órával a kezelt területet meg kell tisztítani és, ha szükséges, szőrteleníteni,

– három órával később (30 órával a kiváltás kezdetétől számítva) értékelni kell a bőrreakciót,

– e megfigyelés után 24 órával egy második megfigyelést (az 54. órában) is végre kell hajtani, és fel kell jegyezni az eredményt.

1.6.2.3.3. Megfigyelés és kategóriába sorolás

Fel kell jegyezni és a jelentésben szerepeltetni kell az indukciós és a kiváltásos eljárásokból származó minden bőrreakciót és minden szokatlan észrevételt.

Nem egyértelmű reakciók tisztázására, amelyek nem láthatók a bőrnek a vizsgált anyag okozta elszíneződése miatt, olyan módszerek használhatók, mint például a kórszövettani vizsgálat vagy a bőrredővastagságmérés.

2. **ADATOK (GPMT és Bühler-féle vizsgálat)**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, minden egyes állathoz minden egyes megfigyeléskor megadva a bőrreakciókat.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS (GPMT és Bühler-féle vizsgálat)**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS (GPMT és Bühler-féle vizsgálat)

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– az alkalmazott tengerimalac törzset,

– a vizsgálati körülményeket, az indukcióhoz és a kiváltáshoz használt oldószert és a vizsgáltanyag-koncentrációkat,

– az állatok számát, korát és nemét,

– az egyes állatok testsúlyát a vizsgálat kezdetekor és végén,

– az egyes állatokon megfigyelt reakciókat, az értékelő rendszert is ideértve, ha használtak ilyet,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS (GPMT és Bühler-féle vizsgálat)

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

B.7. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ (28 NAPOS) TOXICITÁS (ORÁLIS)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta, orálisan (szájon át) fokozatosan emelkedő dózisokban adják be több kísérleti állatcsoportnak, 28 napon keresztül. A vizsgálati időszak alatt az állatokat naponta kell vizsgálni a toxicitás jeleinek észlelése érdekében. A vizsgálat során elhullott és a vizsgálat végéig életben maradt állatokat is fel kell boncolni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napig a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt csoportokba kell osztani. A vizsgált anyagot a táplálékkal, gyomorszondán át, kapszulában vagy ivóvízben lehet beadni. A vizsgált anyagot valamennyi állatnak azonos módszerrel kell adagolni a vizsgálat teljes időtartama alatt. Ha az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot vagy más segédanyagot használnak, meg kell bizonyosodni arról, hogy azok nem okoznak toxikus hatást. Ehhez szükség szerint korábbi vizsgálatokból származó adatokat is fel lehet használni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Ellenjavallat hiányában a patkány az előnyben részesítendő állatfajta. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni, az állatok a vizsgálat kezdetekor lehetőleg hathetesnél fiatalabbak legyenek, de nyolchetesnél semmiképpen sem idősebbek.

A vizsgálat kezdetén az állatok súlya csak minimálisan, az átlagértéktől maximum ± 20%-kal térhet el.

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Minden adagolási szinthez legalább 10 állatot (öt hímet és öt nőstényt) kell felhasználni. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást terveznek, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékoznak pusztítani. Ezenkívül még egy 10 fős (nemenként öt állat) ún. kísérő állatcsoportot is kezelhetnek a legnagyobb dózissal 28 napon át, amelyen a kezelés után 14 nappal megfigyelhetik a toxikus hatás visszafordíthatóságát, elhúzódó vagy késve fellépő voltát. Egy 10 állatból (nemenként öt állat) álló kísérő csoportot is használnak.

1.6.2.3. *Dózisok*

Legalább három dózist és egy kontrollt kell használni. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a kezelt csoportok állataival. Olyan esetekben, amikor az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportot ugyanúgy kell a vivőanyaggal megetetni, mint a kezelt csoportokat, és ugyanannyi vivőanyagot kell kapniuk, mint a legnagyobb adaggal kezelt csoportnak. A legnagyobb adagot úgy kell kiválasztani, hogy annak hatására jelentkezzenek a toxicitás jelei, de elhullás lehetőleg ne, vagy csak minimális mértékben jelentkezzen. A legkisebb adagot úgy kell kiválasztani, hogy ne okozzon toxikus tüneteket. Ha használható becslés áll rendelkezésre az emberi expozícióra vonatkozóan, a legkisebb adagnak ennél nagyobbnak kell lennie. Kedvező esetben a középső adaggal kezelt csoportnál minimális toxikus hatás észlelhető. Ha egynél több közbeeső dózist alkalmaznak, akkor azokat úgy kell kiválasztani, hogy fokozódó toxikus hatást váltsanak ki. Az alacsony és közbeeső dózissal kezelt csoportban, illetve a kontrollcsoportban az elpusztult állatok száma minimális legyen, hogy az eredmények értelmezhető értékelése lehetséges legyen.

Ha a vizsgált anyagot a táplálékkal adják be, annak vagy állandó legyen a koncentrációja a tápban (ppm vagy mg/kg, a takarmányra számítva), vagy az állat testsúlyára számított állandó adagot használjanak; az e módszertől való eltérést meg kell indokolni. A gyomorszondán át beadott anyag napi adagját minden nap ugyanabban az időben kell beadni, és az adagokat rendszeres időközönként (hetente vagy hetente kétszer) ismételten be kell állítani, hogy az állatok testsúlyához viszonyított mennyiséget fenn lehessen tartani.

1.6.2.4. *Határérték-vizsgálat*

Ha a fentebb ismertetett módszer szerint elvégzett 28 napos vizsgálat napi 1 000 mg/testsúlykilogramm vagy – ha a lehetséges emberi expozíció mértéke ismert – ennél magasabb dózisban semmilyen toxikus hatást nem vált ki, a további vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők. Alacsony toxicitású anyagoknál fontos biztosítani, hogy – ha azokat a takarmánnyal adagolják – sem a vizsgált anyag adagolt mennyisége, sem más tulajdonságai nem befolyásolják a rendes táplálkozási feltételeket.

1.6.2.5. *Megfigyelési időszak*

Az összes állatot naponta meg kell vizsgálni és a toxikus hatások megjelenését, súlyosságát és időtartamát rögzíteni kell. Fel kell jegyezni az elpusztulás időpontját és azt az időpontot, amikor a toxikus hatások jelei mutatkozni kezdenek, illetve elmúlnak.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Ideális esetben a vizsgált anyagot heti hét alkalommal kell az állatoknak beadni, 28 napon keresztül. A kísérő csoportokban a nyomon követő megfigyelésekre kiválasztott állatokat további 14 napig kell tartani kezelés nélkül, hogy a toxikus hatás visszafordíthatóságát, illetve elhúzódását ki lehessen mutatni.

A megfigyeléseknek ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légző és a keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomatomotoros aktivitás és viselkedési minta változásaira. Hetente mérni kell a takarmányfogyasztást (és a vízfogyasztást is, ha a vizsgált anyagot az ivóvízzel adagolják), valamint az állatok súlyát.

Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzzék a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullását. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A haldokló állatokat és a nagy fájdalom vagy szenvedés jeleit mutató állatokat el kell különíteni, humánusan elpusztítani, és fel kell boncolni.

A következő vizsgálatokat kell végrehajtani a vizsgálat végén minden állaton, a kontrollállatokat is ideértve:

1. vérkép, amely magában foglalja legalább a hematokrit értéket, a hemoglobin koncentrációt, a vörösvértest-számot, a teljes és a fehérvérsejtszámot, a minőségi vérképet, az alvadási képességet, beleértve az alvadási időt;

2. a vér klinikai-kémiai vizsgálata, amely magában foglalja a máj- és vesefunkció legalább egy paraméterét: szérum alanin-aminotranszferáz (korábban glutamát-piruvát-transzaminázként volt ismert), szérum aszpartát-aminotranszferáz (korábban glutamát oxálecetsav transzaminázként volt ismert), karbamid-nitrogén, az albumin, a kreatinin, az összbilirubin és szérum összfehérje szintjének mérését.

További meghatározások, amelyekre a pontos toxicitás értékeléséhez még szükség lehet: kalcium-, foszfor-, klorid-, nátrium-, káliumszint, éhgyomorra mért glükózszint, lipidek, hormonok, savbázisegyensúly, methemoglobin- és kolineszterázaktivitás.

Ahol a megfigyelt hatások vizsgálatának kiterjesztéséhez szükséges, további klinikai-kémiai vizsgálatokat is lehet végezni.

1.6.3.1. *Autopszia*

A vizsgálatban részt vett minden állatot teljes boncolásnak kell alávetni. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a kimetszés után minél előbb, még nedvesen le kell mérni a kiszáradás elkerülése miatt. A szerveket és szöveteket (máj, vese, lép, herék, mellékvesék, szív és minden jelentős sérülést vagy méretváltozást mutató szerv) alkalmas fixálószerben tartósítani kell az esetleges jövőbeni kórszövettani vizsgálathoz.

1.6.3.2. *Kórszövettani vizsgálat*

A nagy adaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportban szövettani vizsgálatot kell végrehajtani a tartósított szerveken és szöveteken. Azon szerveket és szöveteket, amelyek a legnagyobb dózisnál a vizsgált anyagnak tulajdonítható károsodásokat mutatnak, minden alacsonyabb dózissal kezelt csoportban meg kell vizsgálni. Minden, a kísérő csoportba tartozó állatnál szövettani vizsgálatot kell végezni, külön hangsúlyt helyezve azon szervekre és szövetekre, amelyekről megállapítást nyert, hogy más kezelt csoportokban toxikus hatásokat mutatnak.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva az állatok számát a vizsgálat kezdetén és az egyes sérüléstípusokat mutató állatok számát.

Minden megfigyelt eredményt megfelelő statisztikai módszerrel ki kell értékelni. Bármilyen elismert statisztikai módszer használható.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a használt fajt, törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet,

– a vizsgálati körülményeket,

– az adagolást (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és a koncentrációkat,

– a toxikus reakciókat nemenként és dózisonként,

– lehetőség szerint azt a szintet, amikor még nincs toxikus hatás,

– az elpusztulás idejét a vizsgálat során, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

– a toxikus és más hatások leírását,

– az egyes toxikus tünetek megfigyelésének időpontját és a megfigyelést követő változásukat,

– a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatokat,

– az elvégzett hematológiai vizsgálatokat és azok valamennyi eredményét,

– az elvégzett klinikai-kémiai vizsgálatokat és azok valamennyi eredményét (beleértve az esetleges vizelet elemzés eredményeit is),

– a boncolási leleteket,

– a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetését,

– az eredmények statisztikai feldolgozását, ahol lehetséges,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

B.8. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ (28 NAPOS) TOXICITÁS (INHALÁCIÓ)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Hasznos, ha előzetes információk állnak rendelkezésre az anyag részecskeméret-eloszlásáról, gőznyomásáról, olvadáspontjáról, forráspontjáról és robbanásveszélyességéről (ha van ilyen).

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Több kísérleti állatcsoportot naponta, meghatározott ideig kezelnek a vizsgált anyaggal, fokozatosan növelt koncentrációkban, csoportonként egy koncentráció felhasználásával, 28 napon keresztül. Ha vivőanyagot alkalmaznak a vizsgált anyag megfelelő koncentrációjának kialakításához a levegőben, a vivőanyaghoz is kell kontrollcsoportot beállítani. A vizsgálati időszak alatt az állatokat naponta vizsgálni kell a toxicitás tüneteinek észlelése érdekében. A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat végéig életben maradó állatokat is fel kell boncolni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napig a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással megfelelő számú csoportba kell osztani. Szükség esetén vivőanyag alkalmazható a vizsgált anyag megfelelő koncentrációjának kialakítására a levegőben. Ha az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot vagy más segédanyagot használnak, meg kell bizonyosodni arról, hogy azok nem rendelkeznek toxikus hatással. Ehhez szükség szerint korábbi vizsgálatokból származó adatokat is fel lehet használni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Ellenjavallat hiányában a patkány az előnyben részesítendő állatfajta. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni.

A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan, az átlagértéktől maximum ± 20%-kal térhet el.

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Valamennyi expozíciós koncentrációszinthez legalább 10 állatot kell felhasználni (öt hímet és öt nőstényt). A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást terveznek, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékoznak pusztítani. Ezenkívül még egy 10 fős (nemenként öt állat) kísérő állatcsoportot is kezelhetnek a legnagyobb adaggal 28 napon át, amelyen a kezelés után 14 nappal megfigyelhetik a toxikus hatás visszafordíthatóságát, elhúzódó vagy késve fellépő voltát. 10 kontrollállatból (nemenként öt állat) álló kísérő csoportot is használni kell.

1.6.2.3. *Expozíciós koncentráció*

Legalább három koncentrációt és egy kontrollt, illetve vivőanyagkontrollt kell használni (a legnagyobb koncentrációhoz tartozó vivőanyag-koncentrációval), ha vivőanyagot is alkalmaznak. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a kezelt csoport állataival. A legnagyobb koncentrációt úgy kell kiválasztani, hogy annak hatására az azzal kezelt csoportban jelentkezzenek a toxicitás jelei, de elhullás lehetőleg ne, vagy csak minimális mértékben jelentkezzen. A legkisebb adagot úgy kell kiválasztani, hogy az ne okozzon toxikus tüneteket. Ha használható becslés áll rendelkezésre az emberi expozícióra vonatkozóan, a legkisebb adagnak ennél nagyobbnak kell lennie. Kedvező esetben a középső adaggal kezelt csoportnál minimális toxikus hatás észlelhető. Ha egynél több közbeeső dózist alkalmaznak, akkor azokat úgy kell kiválasztani, hogy fokozódó toxikus hatást váltsanak ki. Az alacsony és közbeeső dózissal kezelt csoportokban, illetve a kontrollcsoportban az elpusztult állatok száma minimális legyen, hogy az eredmények értelmezhető értékelése lehetséges legyen.

1.6.2.4. *Expozíciós idő*

Az expozíció napi időtartama hat óra; különleges követelmények esetén ettől eltérő expozíciós idők is alkalmazhatók.

1.6.2.5. *Berendezés*

A kísérlethez olyan inhalációs berendezést kell használni, amely óránként legalább tizenkét alkalommal légcserét tesz lehetővé a dinamikus légmozgás fenntartása érdekében, azért hogy megfelelő oxigéntartalmat és egyenletesen eloszlatott expozíciós atmoszférát lehessen biztosítani. Ha kamrát használnak, annak kialakítása révén a lehető legkisebbre kell csökkenteni a kísérleti állatok zsúfoltságát, és lehetővé kell tenni a lehető legnagyobb mértékű expozíciót a vizsgált anyag belégzése útján. Általános szabályként a kamrai atmoszféra stabilitásának biztosítása érdekében a kísérleti állatok teljes térfogata nem haladhatja meg a vizsgálati kamra térfogatának 5%-át. Végezhetők csak az orron és szájon át, vagy csak a fejen át, illetve az egész testen keresztül megvalósuló egyedi expozíciós kamrai vizsgálatok; az első két módszer előnye, hogy minimalizálja a vizsgált anyag egyéb úton történő felvételének lehetőségét.

1.6.2.6. *Megfigyelési időszak*

A kísérleti állatokat a teljes kezelési és felépülési időszak alatt naponta meg kell figyelni a toxicitás jeleinek észlelése érdekében. Fel kell jegyezni az elpusztulás időpontját és azt az időpontot, amikor a toxikus hatások jelei mutatkozni kezdenek, illetve elmúlnak.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat heti öt-hét alkalommal teszik ki a vizsgált anyag hatásának, 28 napon keresztül. A kísérő csoportokban a nyomon követő megfigyelésekre kiválasztott állatokat további 14 napig kell tartani kezelés nélkül, hogy a toxikus hatás visszafordíthatóságát, illetve elhúzódását ki lehessen mutatni. A vizsgálatokat 22 ± 3 °C állandó hőmérsékleten kell végezni.

Ideális esetben a relatív páratartalmat 30 és 70% között kell tartani, de bizonyos körülmények között (például aeroszolok vizsgálatakor) ez a gyakorlatban nem mindig kivitelezhető. A kamrán belül kismértékű negatív nyomás (≤ 5 víz-mm) fenntartása megakadályozza a vizsgált anyag kiszivárgását a környező területre. Az állatok nem kaphatnak sem takarmányt, sem vizet az expozíció folyamán.

Megfelelő analitikai koncentrációszabályozási rendszerrel kiegészített, dinamikus inhalációs rendszert kell alkalmazni. A megfelelő inhalációs koncentráció kialakításához javasolt a próbavizsgálat elvégzése. A légáramlást úgy kell beállítani, hogy az egész kamrában azonos expozíciós körülményeket biztosítson. A rendszernek biztosítania kell, hogy a kívánt expozíciós körülmények a lehető leggyorsabban kialakíthatók legyenek.

A következő paramétereket kell mérni, illetve figyelemmel kísérni:

a) a légáramlás sebessége (folyamatosan);

b) az anyag tényleges koncentrációja a belégzési zónában. A napi expozíciós időszak folyamán a koncentráció nem változhat a középérték ± 15%-át meghaladó mértékben. Aeroszolok esetében azonban ez az érték nem biztos, hogy elérhető, ezért itt szélesebb tartomány is elfogadható. A napi koncentrációt a vizsgálat teljes időtartama alatt lehetőség szerint állandó értéken kell tartani. Aeroszolok esetében hetenként legalább egy részecskeméret-elemzést kell végrehajtani csoportonként;

c) hőmérséklet és páratartalom;

Az expozíció ideje alatt és azt követően az állatokat rendszeresen meg kell figyelni, és a leleteket rögzíteni kell; külön feljegyzést kell vezetni minden egyes állatról. Az összes állatot meg kell vizsgálni naponta, és a toxikus hatások megjelenését, súlyosságát és időtartamát rögzíteni kell. A megfigyeléseknek ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légző- és keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomatomotoros aktivitás és viselkedési minta változásaira. Heti gyakorisággal mérni kell az állatok súlyát. Ajánlott a takarmányfogyasztást is hetente mérni. Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzzük a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullását. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A súlyos és tartós betegség, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat el kell eltávolítani, elpusztítani és felboncolni.

A következő vizsgálatokat kell végrehajtani a vizsgálat végén minden állaton, a kontrollállatokat is ideértve:

i. vérkép, amely magában foglalja legalább a hematokritértéket, a hemoglobin-koncentrációt, a vörösvértestszámot, a teljes- és a fehérvérsejtszámot, a minőségi vérképet, az alvadási képességet, beleértve az alvadási időt;

ii. a vér klinikai-kémiai vizsgálata, amely magában foglalja a máj- és vesefunkció legalább egy paraméterét: szérum alanin-aminotranszferáz (korábban glutamát-piruvát-transzaminázként volt ismert), szérum aszpartát-aminotranszferáz (korábban glutamát-oxálecetsav-transzaminázként volt ismert), karbamid-nitrogén, az albumin, a kreatinin, az összbilirubin és szérum összfehérje szintjének mérését.

További meghatározások, amelyekre a pontos toxicitás értékeléséhez még szükség lehet: kalcium-, foszfor-, klorid-, nátrium-, káliumszint, éhgyomorra mért glükózszint, lipidek, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin- és kolineszterázaktivitás.

Ahol a megfigyelt hatások vizsgálatának kiterjesztéséhez szükséges, további klinikai-biokémiai vizsgálatokat is lehet végezni.

1.6.3.1. *Autopszia*

A vizsgálatban részt vett minden állatot teljes boncolásnak kell alávetni. A májat, a veséket, a mellékveséket a tüdőt és a heréket a kimetszés után minél előbb, még nedvesen le kell mérni a kiszáradás elkerülése miatt. A szerveket és szöveteket (légzőszervek, máj, vese, lép, herék, mellékvesék, szív és minden jelentős sérülést vagy méretváltozást mutató szerv) alkalmas fixálószerben tartósítani kell az esetleges jövőbeni kórszövettani vizsgálathoz. A tüdőt sértetlenül kell eltávolítani, meg kell mérni a tömegét, és alkalmas fixálószerrel kell kezelni a tüdőszerkezet fennmaradásának biztosítására.

1.6.3.2. *Kórszövettani vizsgálat*

A nagy adaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportban szövettani vizsgálatot kell végrehajtani a tartósított szerveken és szöveteken. Azon szerveket és szöveteket, amelyek a legnagyobb dózisnál a vizsgált anyagnak tulajdonítható károsodásokat mutatnak, minden alacsonyabb dózissal kezelt csoportban meg kell vizsgálni. Minden, a kísérő csoportba tartozó állatnál szövettani vizsgálatot kell végezni, külön hangsúlyt helyezve azon szervekre és szövetekre, amelyekről megállapítotást nyert, hogy más kezelt csoportokban toxikus hatásokat mutatnak.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva az állatok számát a vizsgálat kezdetén és az egyes sérüléstípusokat mutató állatok számát.

Minden megfigyelt eredményt megfelelő statisztikai módszerrel ki kell értékelni. Bármilyen elismert statisztikai módszer használható.

3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a használt fajt, törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet,

– a vizsgálati körülményeket,

Az expozíciós készülék leírása: beleértve a készülék konstrukcióját, típusát, méreteit, a levegőforrást, az aeroszolok előállítására szolgáló rendszert, a légkondicionálás módszerét, a fáradt levegő kezelését, az állatoknak a vizsgálati kamrában való elhelyezését, ha ilyet alkalmaznak. A hőmérsékletet, a levegő páratartalmát, és adott esetben az aeroszolkoncentráció stabilitását, illetve a részecskeméret-eloszlás meghatározására használt berendezéseket szintén le kell írni.

Expozíciós adatok:

Ezen adatokat táblázatos formában kell közölni, az átalagértékek és az azoktól való eltérés megjelölésével. A következő adatokra van szükség:

a) légáram sebessége az inhalációs készülékben;

b) hőmérséklet és a levegő páratartalma;

c) névleges koncentráció (az inhalációs készülékbe helyezett vizsgált anyag összmennyisége osztva a levegő térfogatával);

d) vivőanyag jellege (ha van);

e) tényleges koncentráció a belégzési zónában;

f) a tömegfelező aerodinamikai átmérő („Mass Median Aerodynamic Diameter” – MMAD) és a geometrikus standard deviáció („Geometric Standard Deviation” – GSD),

– a toxikus reakciókat nemenként és dózisonként,

– az elhullás idejét a vizsgálat során, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

– a toxikus, illetve egyéb hatások leírását, a „no-effect level” (NEL) szintet,

– az egyes abnormális tünetek megfigyelésének időpontját és a megfigyelést követő változásukat,

– a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatokat,

– az elvégzett hematológiai vizsgálatokat és azok valamennyi eredményét,

– az elvégzett klinikai-kémiai vizsgálatokat és azok valamennyi eredményét,

– a boncolási leleteket,

– a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetését,

– az eredmények statisztikai feldolgozását, ahol lehetséges,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. SZAKIRODALOM

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

B.9. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ (28 NAPOS) TOXICITÁS (DERMÁLIS)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta adagolják a bőrre, fokozatosan növekvő dózisokban több kísérleti állatcsoportnak, 28 napon keresztül. A vizsgálati időszak alatt az állatokat naponta kell vizsgálni a toxicitás tüneteinek észlelése érdekében. A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat végéig életben maradó állatokat is fel kell boncolni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napig a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell osztani. A vizsgálat megkezdése előtt nem sokkal le kell nyírni a szőrt a törzs háti oldaláról. Borotválni is lehet, de azt a vizsgálat megkezdése előtt megközelítőleg 24 órával kell elvégezni. A vizsgálat során általában ismételt nyírás és borotválás szükséges, rendszerint heti időközönként. A nyírás vagy borotválás során gondosan ügyelni kell arra, hogy a bőr ne sérüljön meg. A testfelület legalább 10%-át szabaddá kell tenni a vizsgált anyag alkalmazásához. Az állat súlyát is tekintetbe kell venni, amikor a lecsupaszítandó felületről, illetve a kezelt felület nagyságáról döntenek. Ha szilárd anyagot vizsgálnak, amelyet adott esetben porítani is lehet, az anyagot vízzel kellően át kell nedvesíteni, vagy szükség esetén vivőanyagot kell alkalmazni annak biztosítására, hogy az minél jobban tapadjon a bőrhöz. A folyékony vizsgált anyagokat rendszerint hígítás nélkül kell adagolni. Az adagolás heti öt-hét alkalommal történik.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez használt állatok*

Kifejlett patkány, nyúl vagy tengerimalac használható. Más faj is használható, de azok használatát meg kell indokolni.

A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan, az átlagértéktől maximum ± 20%-kal térhet el.

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Minden adagolási szinthez legalább 10 egészséges bőrű állatot (öt hímet és öt nőstényt) kell felhasználni. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást terveznek, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékoznak pusztítani. Ezenkívül még egy 10 fős (nemenként öt állat) kísérő állatcsoportot is kezelhetnek a legnagyobb adaggal 28 napon át a toxikus hatás visszafordíthatóságának, elhúzódó vagy késve fellépő voltának megfigyelésére 14 nappal a kezelés után. 10 kontrollállatból (nemenként öt állat) álló kísérő csoportot is használni kell.

1.6.2.3. *Dózisok*

Legalább három dózist és egy kontrollt kell használni, illetve egy vivőanyag kontrollt, ha van vivőanyag. Az expozíciós idő legalább napi hat óra legyen. A vizsgált anyagot minden nap hasonló időpontban kell alkalmazni, az alkalmazott mennyiséget pedig meghatározott időközönként (hetente vagy hetente kétszer) hozzá kell igazítani az állatok növekedéséhez, hogy az állatok testsúlyához viszonyított mennyiséget fenn lehessen tartani. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a vizsgálati csoportok állataival. Olyan esetekben, amikor az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportot ugyanúgy kell a vivőanyaggal kezelni, mint a kezelt csoportokat, és ugyanannyi vivőanyagot kell kapniuk, mint a legnagyobb adaggal kezelt csoportnak. A legnagyobb dózist úgy kell kiválasztani, hogy annak hatására az azzal kezelt csoportban jelentkezzenek a toxicitás jelei, de elhullás lehetőleg ne, vagy csak minimális mértékben jelentkezzen. A legkisebb adagot úgy kell kiválasztani, hogy az ne okozzon toxikus tüneteket. Ha használható becslés áll rendelkezésre az emberi expozícióra vonatkozóan, a legkisebb adagnak ennél nagyobbnak kell lennie. Kedvező esetben a középső adaggal kezelt csoportnál minimális toxikus hatás észlelhető. Ha egynél több közbeeső dózist alkalmaznak, akkor azokat úgy kell kiválasztani, hogy fokozódó toxikus hatást váltsanak ki. Az alacsony és közbeeső dózissal kezelt csopotokban, illetve a kontrollcsoportban az elpusztult állatok száma minimális legyen, hogy az eredmények értelmezhető értékelése lehetséges legyen.

Ha a vizsgált anyag alkalmazása súlyos bőrirritációt okoz, a koncentrációt csökkenteni kell, ami az egyéb toxikus hatások mértékének csökkenésével vagy eltűnésével járhat a legnagyobb adaggal kezelt csoportban. Ha a bőr súlyosan károsodott, szükségessé válhat a vizsgálat leállítása és egy új vizsgálat megkezdése kisebb koncentrációk mellett.

1.6.2.4. *Határérték-vizsgálat*

Ha az előzetes vizsgálat során napi 1 000 mg/testsúlykilogrammal adagolt vizsgált anyag vagy – ha a lehetséges emberi expozíció mértéke ismert – ennél magasabb dózis semmilyen toxikus hatást nem vált ki, a további vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők.

1.6.2.5. *Megfigyelési időszak*

Az összes állatot meg kell vizsgálni naponta a toxikus hatások megjelenésének észlelése érdekében. Fel kell jegyezni az elpusztulás időpontját, valamint azt az időpontot, amikor a toxikus hatás jelei mutatkozni kezdenek, illetve elmúlnak.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat egyesével kell a ketrecekben elhelyezni. Ideális esetben a vizsgált anyagot heti hét alkalommal kell az állatoknak beadni, 28 napon keresztül. A kísérő csoportokban a nyomon követő megfigyelésekre kiválasztott állatokat további 14 napig kell tartani kezelés nélkül, hogy a toxikus hatás visszafordíthatóságát, illetve elhúzódását ki lehessen mutatni. Az expozíció időtartama napi hat óra.

A vizsgált anyagot a testfelület megközelítőleg 10%-át kitevő felületen egyenletesen elosztva kell felvinni az állat bőrére. Erősen mérgező anyagoknál a felület lehet ennél kisebb, de a felület lehető legnagyobb részét a lehető legvékonyabb és legegyenletesebb bevonattal kell ellátni.

Az expozíció ideje alatt a vizsgált anyagot a bőrrel porózus gézkötéssel és nem irritáló ragtapasszal kell érintkezésben tartani. A vizsgált területet megfelelő módon be kell fedni, azért hogy megmaradjon rajta a vizsgált anyag és a gézkötés, és az állatok ne nyalhassák le a vizsgált anyagot. Mozgásgátló szerkezeteket lehet használni annak megakadályozására, hogy az állat a vizsgált anyagot lenyelje, de a teljes immobilizáció mint módszer nem javasolt. Alternatív megoldás lehet az ún. nyakörv védelmi eszköz használata.

Az expozíciós idő leteltével a maradék vizsgált anyagot lehetőség szerint el kell távolítani a bőr felületének vízzel vagy más megfelelő módon történő megtisztítása útján.

Az összes állatot meg kell vizsgálni naponta, és a toxikus hatások megjelenését, súlyosságát és időtartamát rögzíteni kell. A megfigyelésnek ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légző-, keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszer, valamint a szomatomotoros tevékenység és viselkedési minta változásaira. Hetente mérni kell az állatok súlyát. Ajánlott a takarmányfogyasztást is hetente mérni. Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzzük a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullását. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A súlyos és tartós betegség, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat el kell távolítani, kíméletes módon leölni, és felboncolni.

A következő vizsgálatokat kell végrehajtani a vizsgálat végén minden állaton, a kontrollállatokat is ideértve:

1) vérkép, amely magában foglalja legalább a hematokrit-értéket, a hemoglobin-koncentrációt, a vörösvértestszámot, a teljes és a fehérvérsejtszámot, a minőségi vérképet, az alvadási képességet, beleértve az alvadási időt;

2) a vér klinikai-kémiai vizsgálata, amely magában foglalja a máj- és vesefunkció legalább egy paraméterét: szérum alanin-aminotranszferáz (korábban glutamát-piruvát-transzaminázként volt ismert), szérum aszpartát-aminotranszferáz (korábban glutamát-oxálecetsav-transzaminázként volt ismert), karbamid-nitrogén, az albumin, a kreatinin, az össz-bilirubin és szérum összfehérje szintjének mérését.

További meghatározások, amelyekre a pontos toxicitás értékeléséhez még szükség lehet: kalcium-, foszfor-, klorid-, nátrium-, káliumszint, éhgyomorra mért glükózszint, lipidek, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin és a kolineszterázaktivitás.

Ahol a megfigyelt hatások vizsgálatának kiterjesztéséhez szükséges, további klinikai-kémiai vizsgálatokat is lehet végezni.

1.6.4. **Autopszia**

A vizsgálatban részt vett minden állatot teljes boncolásnak kell alávetni. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a kimetszés után minél előbb, még nedvesen le kell mérni a kiszáradás elkerülése miatt. A szerveket és szöveteket (máj, vese, lép, herék, mellékvesék, szív és minden jelentős sérülést vagy méretváltozást mutató szerv) alkalmas közegben fixálni kell az esetleges jövőbeni kórszövettani vizsgálathoz.

1.6.5. **Kórszövettani vizsgálat**

A nagy adaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportban szövettani vizsgálatot kell végrehajtani a tartósított szerveken és szöveteken. Azon szerveket és szöveteket, amelyek a legnagyobb dózisnál vizsgált a anyagnak tulajdonítható károsodásokat mutatnak, minden alacsonyabb dózissal kezelt csoportban meg kell vizsgálni. Minden, a kísérő csoportba tartozó állatnál szövettani vizsgálatot kell végezni, külön hangsúlyt helyezve azon szervekre és szövetekre, amelyekről megállapítást nyert, hogy más kezelt csoportokban toxikus hatásokat mutatnak.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva az állatok számát a vizsgálat kezdetén és az egyes sérüléstípusokat mutató állatok számát.

Minden megfigyelt eredményt megfelelő statisztikai módszerrel ki kell értékelni. Bármilyen elismert statisztikai módszer használható.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a használt fajt, törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet,

– a vizsgálati körülményeket (ideértve a kötszer típusát is: zárt vagy nem zárt),

– az adagolást (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és a koncentrációkat,

– azt a szintet, amikor még nincs toxikus hatás (NEL),

– az elpusztulás idejét a vizsgálat során, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

– a toxikus és más hatások leírását,

– az egyes toxikus tünetek megfigyelésének időpontját és a megfigyelést követő változásukat,

– a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatokat,

– az elvégzett hematológiai vizsgálatokat és azok valamennyi eredményét,

– az elvégzett klinikai-kémiai vizsgálatokat és azok valamennyi eredményét (beleértve az esetleges vizelet-elemzés eredményeit is),

– a boncolási leleteket,

– a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetését,

– az eredmények statisztikai feldolgozását, ahol lehetséges,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

B.10. MUTAGENITÁS (EMLŐSÖK „*IN VITRO*” CITOGENETIKAI VIZSGÁLATA)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (C).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az *in vitro* citogenitásvizsgálat a rövid távú mutációt előidéző képesség vizsgálata tenyésztett emlősállatsejtekben, strukturális kromoszóma-rendellenességek észlelésére. Már bevezetett sejtvonalak, valamint elsődleges sejttenyészetek használhatók fel. Megfelelő anyagcsereaktiváló-rendszerrel vagy a nélkül, a vizsgált anyag hatásának való kitétel után a sejttenyészeteket metafázisblokkoló-szerrel kell kezelni, pl. kolchicin a sejtek felszaporítása (c-metafázis) érdekében. A sejteket a megfelelő időpontokban össze kell gyűjteni, és kromoszóma-készítményeket kell előállítani. A készítményeket meg kell festeni, és a magosztódási fázisú sejteket elemezni kell a kromoszóma-rendellenességek megállapítása érdekében.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

1.6.1.1. *Sejtek*

Már bevezetett törzseket, vagy primer sejtek tenyészeteit, ilyenek például a kínaihörcsög-sejtek és az emberi lymphocyták, kell használni. A vizsgált anyagokat táptalajban kell előkészíteni vagy megfelelő oldószerekben feloldani a sejtek kezelése előtt.

1.6.1.2. *Anyagcsere aktiváló rendszer*

A sejteket a vizsgált vegyület hatásának megfelelő anyagcsere aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában is ki kell tenni. A leggyakrabban használt rendszer az enzimindukáló-szerrel előkezelt rágcsáló májszövetből készített poszt-mitokondriális frakció ko-faktorral kiegészítve.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

Tenyészetek száma:

Legalább két tenyészetet kell használni minden egyes kísérleti ponthoz.

Negatív és pozitív kontrollok használata:

Negatív kontrollként oldószert (amikor az oldószer nem a táptalaj vagy víz), májenzim-aktiváló keveréket, oldószert májenzim-aktiváló keverékkel és nem kezelt kontrollanyagokat kell használni.

Minden egyes kísérletben használni kell pozitív kontrollt; amikor májenzim-aktiváló keveréket alkalmaznak a vizsgált kémiai anyag aktiválására, akkor pozitív kontrollként olyan vegyületet kell használni, amelyről ismert, hogy anyagcsere-aktiválást igényel.

Adagolás:

A vizsgált vegyületnek legalább három, legalább egy-log tartományban lévő adagját kell alkalmazni. A legnagyobb dózisnak körülbelül 50 %-kal kell gátolnia a mitózisos aktivitást, vagy a citotoxicitás valamilyen más jelét kell kiváltania. Ha a vizsgált anyag nem toxikus, akkor azt az oldhatósági határig vagy legfeljebb 5 mg/ml maximális koncentrációig kell vizsgálni.

Tenyésztési körülmények:

Megfelelő táptalajt, inkubációs feltételeket (például hőmérséklet, tenyésztő edények, CO_2-koncentrációk és nedvességtartalom) kell használni.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

1.6.3.1. *A sejtkultúrák elkészítése*

Már bevezetett törzsek: a sejteket törzstenyészetekből kell létrehozni (például tripszines emésztéssel vagy rázással), ezeket megfelelő sűrűségben tenyésztőedényekbe teszik át, és 37 °C-on inkubálják.

Emberi limfociták: heparinnal kezelt teljes vért kell hozzáadni a növényi haemaglutinint, magzatiborjú-szérumot és antibiotikumokat tartalmazó táptalajhoz, és ezt 37 °C-on inkubálni kell.

1.6.3.2. *A sejttenyészetek kezelése a vizsgált anyaggal*

i. Kezelés májenzim-aktiváló keverék nélkül

Minden kezelésnek, amennyiben lehetséges, legalább egy teljes sejtciklus időtartamára ki kell terjednie, a fixálási rendszereknek biztosítaniuk kell a ciklus különböző szakaszaiban kezelt sejtek első kezelés utáni közvetett sejtmagosztódásának elemzését.

Amikor a kezelés nem terjed ki egy teljes sejtciklusra, a fixálási időpontokat úgy kell kiválasztani, hogy a kezelés során a sejtciklus különböző, azaz G_1, S és G_2 szakaszaiban lévő sejtek kerüljenek mintavételre.

A vizsgált anyagot akkor kell hozzáadni a már bevezetett sejtvonalakhoz, amikor azok a növekedés exponenciális szakaszában vannak. Az emberi limfocita tenyészeteket akkor kell kezelni, amikor azok félszinkron állapotban vannak.

ii. Kezelés májenzim-aktiváló keverékkel

A kezeléshez a vizsgált anyagnak, az aktiváló rendszerrel vegyülve, a lehető leghosszabb ideig kell jelen lennie anélkül, hogy toxikus hatást fejtene ki a sejtekre. Ha toxicitási okok miatt e kezelés nem terjed ki a teljes sejtciklus időtartamára, fixálási időket kell kiválasztani a kezelés során a sejtciklus különböző, azaz G_1, S és G_2 szakaszaiban lévő sejtek mintavételére.

A sejtek összegyűjtése:

A tenyészeteket a sejtek összegyűjtése előtt metafázisblokkoló-szerrel kezelik. Valamennyi tenyészetet külön-külön gyűjtik be, és dolgozzák fel a kromoszóma-preparáláshoz. Legalább két összegyűjtési idő szükséges. Ajánlatos, hogy az egyik körülbelül megegyezzen egy sejtciklussal, és a másik ennél később legyen. Ennek célja biztosítani azt, hogy le legyen fedve a sejtciklus minden szakasza, és figyelembevételre kerüljön a késedelem a sejtciklusban.

1.6.3.3. *Kromoszóma előkészítés*

A kromoszóma előkészítés magában foglalja a sejtek hipotón kezelését, fixálását, elterítését a tárgylemezeken és megfestését.

Elemzés:

Tenyészetenként legalább 100, jól szétterített metafázist kell elemezni a kromoszóma-rendellenességeket vizsgálva. A tárgylemezeket kódolni kell az elemzés előtt. Az emberi limfocitákban csak a 46 centromert tartalmazó metafázisokat elemezzük.

Stabil sejtvonalak esetében csak a modális szám ± 2 centromert tartalmazó metafázisokat elemezzük.

Ezenkívül a vizsgálat során minden egyes dózisnál ki kell értékelni a mitotikus indexet vagy, amikor szükséges, a citotoxicitás valamilyen más jelét.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell megadni. Minden kezelt és kontroll tenyészethez külön-külön fel kell sorolni a kromatid-típusú rendellenességeket (folytonossági hiányok („gap"), törések, felcserélődések), a kromoszóma-típusú rendellenességeket (például folytonossági hiányok („gap"), törések, kismértékű elváltozások, gyűrűk, dicentrikusságok, policentrikusságok) és a rendellenes metafázisok számát (folytonossági hiányokkal együtt és a nélkül).

Az adatokat a megfelelő statisztikai módszerekkel kell kiértékelni.

A vizsgálati eredményeket össze kell hasonlítani az egyidejű negatív kontrollok eredményeivel.

Legalább két független kísérletet kell végrehajtani. Azonban, ha ez tudományosan indokolható, elegendő lehet egyetlen kísérlet. A második kísérletet nem kell az első kísérlettel azonos módon végrehajtani. Bizonyos vizsgálati körülmények megváltoztatása előnyben részesíthető azért, hogy a kísérlet hasznosabb adatokat adjon.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a használt sejteket,

– a vizsgálati körülményeket: táptalaj összetétele, CO_2-koncentráció, inkubálási hőmérséklet, inkubálási idő, dózisok, kezelési idő, a kezelés időtartama a használt metafázisblokkoló-szer és annak koncentrációja, a használt májenzim-aktiváló keverék típusa, pozitív és negatív kontrollok,

– sejttenyészetek számát,

– az elemzett metafázisok számát (az adatokat külön-külön kell megadni minden egyes tenyészethez),

– a mitotikus indexet vagy a citotoxicitás egyéb jelét,

– a rendellenességek típusait és számát, külön megadva minden egyes kezelt és kontrolltenyészethez a felhasznált, már bevezetett törzsekben a kromoszómák modális számát,

– az eredmények statisztikai feldolgozását,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

B.11. MUTAGENITÁS (EMLŐSÖK „*IN VIVO*” CSONTVELŐ-SEJTKÉPZŐDÉS VIZSGÁLATA, KROMOSZÓMA-ELEMZÉS)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (C).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Ez az *in vivo* sejtgenetikai vizsgálat rövid távú mutagenitás vizsgálat a strukturális kromoszóma-rendellenességek meghatározására. A kromoszóma-rendellenességeket általában az első, kezelés utáni mitózisokban kell kiértékelni. Mutagén hatású vegyi anyagok esetében az előidézett rendellenességek többsége kromatid típusú.

A módszer emlősök csontvelősejtjeit alkalmazza, amelyeket megfelelő módon ki kell tenni a vizsgált anyag hatásának, és egymást követő időközönként le kell ölni azokat. Leölés előtt az állatokat tovább kell kezelni olyan metafázis blokkoló szerrel, mint például a kolchicin, a metafázis (ún. c-magosztódási fázis) felszaporítása érdekében. Levegőn szárított kromoszóma-készítményeket kell készíteni a sejtekből, megfesteni azokat, majd mikroszkóp segítségével elemezni kell a metafázisokat a kromoszóma-rendellenességek kiderítése érdekében.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

A vizsgált anyagokat fiziológiás sóoldatban kell feloldani. A vízben oldhatatlan vegyi anyagokat a megfelelő vivőanyagban lehet feloldani vagy szuszpendálni.

A vizsgált vegyi anyag friss készítményeit kell használni. Az alkalmazott vivőanyag nem lehet hatással a vizsgált anyagra, és nem okozhat toxikus hatást.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Rágcsálókat kell alkalmazni kísérleti állatként, pl. patkányt, egeret vagy kínai hörcsögöt. Az egészséges, ivarérett állatokat véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell osztani.

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Vizsgálati és kontrollcsoportonként legalább öt hímet és öt nőstényt kell használni. Így tehát 10 állatot kell feláldozni időtartamonként és csoportonként, ha a kezelés után több vizsgálati idő szerepel a kísérlet ütemtervében.

A pozitív kontrollcsoporthoz elegendő egyetlen mintavételi idő.

1.6.2.3. *Az adagolás módja*

A vizsgált vegyületet rendszerint csak egyszer kell beadni. Toxikológiai információkra alapozva ismételt kezelési ütemterv is alkalmazható. Az ismételt kezelés azonban csak akkor alkalmazható, ha a vizsgált vegyület nem gyakorol jelentősebb citotoxikus hatást a csontvelő sejtjeire. A szokásos adagolási módok a szájon keresztül történő beadás és a hasüregbe adott injekció. Egyéb adagolási módok is megfelelőek lehetnek.

1.6.2.4. *Pozitív és negatív kontrollok használata*

Minden egyes kísérlet tervében szerepel egy pozitív kontrollvegyület, amely az *in vivo* kromoszóma-rendellenességeket okozó hatásáról ismert, negatív (oldószer) kontrollcsoportot is alkalmazni kell.

1.6.2.5. *Dózisok*

Kezdésként a vizsgált vegyület egyetlen adagját kell használni, amely a maximálisan elviselhető adag, vagy olyan adag, amely létrehozza a citotoxicitás valamilyen jelét (például részleges mitózisgátlás).

„Nem-toxikus" vegyületek esetében 2 000 mg/testsúlykilogramm az a maximális (határ) adag, amelyet egy adagban beadva kell vizsgálni.

Ha a kezeléseket megismétlik, a határadag 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap.

További dózisok használhatók, amennyiben ezt tudományos okok indokolják.

Ha a vizsgálatot ellenőrzési módszerként használják, legalább két további dózist kell használni.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

A vizsgálat kétféle módon hajtható végre:

i. Az állatokat egyszer kell kezelni a vizsgált vegyülettel, a maximális elviselhető dózissal. A kezelés után 24 órával kell mintákat venni. Ha e szakaszban az eredmények egyértelműen pozitívak, nincs szükség további mintavételre. Ha azonban az eredmények negatívak vagy többféleképpen értelmezhetők, mivel a sejtciklus-kinetikára hatással lehet a vizsgált anyag, egy korábbi és egy későbbi mintavételi időpont is alkalmazható, megfelelően felosztva a 6–48 órás tartományon belül.

   Amikor további dózisokat használnak, mintákat kell venni a különösen érzékeny intervallumokban, vagy ha ezek nem ismertek, 24 órával a kezelés után.

ii. Ha a gyógyszerkinetikai vagy az anyagcsere-információk ismételt kezelés szükségességét jelzik, akkor lehet ismételten adagolni; mintákat kell venni az utolsó kezelés után 6 és 24 órával.

Csontvelő-preparáció:

Mielőtt az állatokat elpusztítanák, a hasüregükbe adott injekcióval megfelelő dózisban metafázisblokkoló-szert visznek be azért, hogy elegendő számú c-metafázisban lévő sejtet kapjanak. A frissen leölt állatok mindkét combcsontjából csontvelőt kell nyerni izotóniás oldattal végrehajtott öblítéssel. Megfelelő hipotón kezelés után a sejteket fixálni kell, majd tárgylemezeken szétteríteni. Levegőn végrehajtott szárítás után a tárgylemezeket meg kell festeni.

Elemzés:

A tárgylemezeket kódolni kell a mikroszkópos elemzés előtt. Legalább 50, a centromerek teljes számát tartalmazó, jól elterített metafázist kell elemezni állatonként a strukturális kromoszóma-rendellenességek megállapítására. Ezenkívül minden egyes állathoz meghatározhatók a mitotikus indexek is.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell megadni. Minden kezelt és kontrollállathoz külön-külön fel kell sorolni a kromatid- és izo-kromatid-típusú rendellenességeket (folytonosság hiányok („gap”), törések, felcserélődések) és a mitotikus indexet, ahol ilyeneket megállapítottak. Fel kell sorolni az egyes kísérleti és kontrollcsoportokhoz megállapított középértékeket és a standard eltéréseket is. Az adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel kell kiértékelni.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a felhasznált állatok fajtáját, törzsét és korát,

– a kísérleti és kontrollcsoportokban az állatok számát nemenként,

– a vizsgálati körülményeket: a kezelés és mintavétel ütemezésének részletes leírása, dózisok, a metafázisblokkoló-szerrel való kezelés időtartama és az anyag koncentrációját,

– az állatokként elemzett metafázisok számát,

– a mitotikus indexeket, ahol megállapításra kerültek,

– a rendellenességek típusát és számát, külön megadva minden egyes kezelt és kontrollállathoz,

– a toxicitás jeleit a vizsgálat végrehajtása során,

– az eredmények statisztikai feldolgozását,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

B.12. MUTAGENITÁS (MIKRONUKLEUSZ-VIZSGÁLAT)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (C).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A mikronukleusz-vizsgálat emlősállatok rövid idejű *in vivo* vizsgálata a vegyi anyagok okozta kromoszóma-károsodás vagy a mitotikus szervcsoport károsodásának észlelésére. E vizsgálat alapja az, hogy a kontrollállatokhoz képest a kezelt állatok mikronukleuszaiban a polikromáziás eritrociták gyakorisága megnő.

A mikronukleuszok kromoszóma-töredékekből vagy teljes kromoszómákból jönnek létre. Amikor az eritroblasztból kifejlődik a polikromáziás eritrocita, a fő sejtmag kilökődik, de a mikronukleusz visszamarad a már sejtmagmentes citoplazmában. E vizsgálatban olyan laboratóriumi emlősállatok csontvelőjében lévő fiatal, polikromáziás vörösvértesteket használnak, amelyeket a megfelelő módon előzőleg kitettek a vizsgált anyagok hatásának. Kivonják a csontvelőt, és kenet-készítményeket hoznak létre és festenek meg. Mikroszkóp alatt meg kell határozni a polikromáziás eritrocitákban a mikronukleuszok mennyiségét, és meg kell állapítani a polikromáziás és a normokromáziás eritrociták arányát.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

A vizsgált anyagokat izotóniás sóoldatban kell feloldani. A vízben oldhatatlan vegyi anyagokat a megfelelő vivőanyagban lehet feloldani vagy szuszpendálni. Ha vivőanyagot használnak az adagolás megkönnyítésére, az nem lehet hatással a vizsgált vegyületre és nem hozhat létre toxikus hatásokat. A vizsgált vegyi anyag friss készítményeit kell használni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Az ajánlott fajta az egér, de más emlősállatok is használhatók. Az egészséges, ivarérett állatokat véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell osztani.

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Vizsgálati és kontrollcsoportonként legalább öt hímet és öt nőstényt kell használni. Így tehát 10 állatot kell feláldozni időtartamonként és csoportonként, ha a kezelés után több vizsgálati idő szerepel a kísérlet ütemtervében. A pozitív kontrollcsoporthoz elegendő egyetlen mintavételi idő.

1.6.2.3. *Az adagolás módja*

A vizsgált vegyületet rendszerint csak egyszer kell beadni. Toxikológiai információkra alapozva ismételt kezelési ütemterv is alkalmazható. Az ismételt kezelés azonban csak akkor alkalmazható, ha a vizsgált vegyület nem gyakorol jelentősebb citotoxikus hatást a csontvelő sejtjeire. A szokásos adagolási mód a szájon keresztül történő beadás és a hasüregbe adott injekció. Egyéb adagolási módok is megfelelőek lehetnek.

1.6.2.4. *Negatív és pozitív kontrollok használata*

Mind pozitív, mind negatív (oldószer) kontrollokat használni kell minden egyes kísérletben.

1.6.2.5. *Dózisok*

Kezdésként a vizsgált vegyület egyetlen adagját kell használni, amely a maximálisan elviselhető adag, vagy olyan adag, amely létrehozza a citotoxicitás valamilyen jelét, például a polikromáziás és normokromáziás eritrociták aránya megváltozik.

„Nem-toxikus" vegyületek esetében 2 000 mg/testsúlykilogramm az a maximális (határ) adag, amelyet egy adagban beadva kell vizsgálni.

Ha a kezeléseket megismétlik, a határadag 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap.

További dózisok használhatók, amennyiben ezt tudományos okok indokolják.

Ha a vizsgálatot ellenőrzési módszerként használják, legalább két további dózist kell használni.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

A vizsgálat kétféle módon hajtható végre:

i. Az állatokat egyszer kell kezelni a vizsgált anyaggal. A mintavételi időknek egybe kell esniük a vizsgálat alatti maximális reagálás idejével, amely a vizsgált vegyülettől függően változik. Ezért legalább kétszer kell csontvelőmintákat venni, kezdve a kezelést követő min. 12 órával és ezt 48 órával meg nem haladva.

   Ha további dózisokat is használnak, mintákat kell venni a maximális érzékenységű időtartamban vagy, ha ez nem ismert, a kezelés után 24 órával.

ii. Ha a gyógyszerkinetikai vagy az anyagcsere információk ismételt kezelés szükségességét jelzik, akkor lehet ismételten adagolni; mintákat kell venni az utolsó kezelés után 12 óránál nem korábbi időpontban.

Csontvelő-preparáció

Csontvelőt frissen elpusztított állatok mindkét combcsontjából kell nyerni magzati borjúszérummal való öblítéssel. A sejteket centrifugálással kell ülepíteni, és a szupernatánst nem kell felhasználni. A homogén sejtszuszpenzió cseppjeit tárgylemezekre kell helyezni, és szétteríteni. A levegőn végrehajtott szárítás után a tárgylemezeket meg kell festeni.

Elemzés:

A tárgylemezeket kódolni kell a mikroszkópos elemzés előtt. Állatonként legalább 1 000 polikromáziás eritrocitát kell megvizsgálni a mikronukleuszok előfordulása szempontjából.

Minden egyes állathoz meg kell határozni a normokromáziás és polikromáziás eritrociták arányát összesen 1 000 eritrocita megszámlálásával.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell megadni. Így tehát minden egyes kísérleti és kontrollállathoz különkülön fel kell sorolni a megszámolt polikromáziás eritrociták számát, a mikronukleusszal rendelkező polikromáziás eritrociták számát és a mikronukleusszal rendelkező sejtek százalékát, valamint a normokromáziás és polikromáziás eritrociták arányát. Minden egyes kísérleti és kontrollcsoporthoz fel kell sorolni a középértékeket és a standard eltéréseket is. A felsorolt adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel kell kiértékelni.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a felhasznált állatok fajtáját, törzsét és korát,

– a kísérleti és kontrollcsoportokban az állatok számát, nemenként,

– a vizsgálati körülményeket: a kezelés és mintavétel ütemezésének részletes leírása, dózisok, toxicitási adatok, negatív és pozitív kontrollok,

– a mikronukleuszok osztályozásának kritériumait,

– a dózis/hatás összefüggést, amennyiben ez lehetséges,

– a toxicitás jeleit a vizsgálat végrehajtása során,

– az eredmények statisztikai feldolgozását,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

B.13. MUTAGENITÁS (ESCHERICHIA COLI – REVERZMUTÁCIÓ-VIZSGÁLAT)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (C).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az *Escherichia coli* triptofán (trp) reverz rendszer a szervezet génállományában alapvető változásokat okozó vegyi anyagok által létrehozott trp^- – trp^+ reverzió mérésén alapuló mikrobás vizsgálat.

Baktériumokat kell kitenni a vizsgált anyag hatásának anyagcsere aktiválással és a nélkül. Minimális táptalajon, alkalmas inkubálási időtartam után meg kell számolni a revertáns telepeket, és össze kell hasonlítani azt a nem kezelt és/vagy az oldószeres kontrolltenyészetben megszámlált spontán revertánsok számával.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

A következő módszerek használhatók a vizsgálat végrehajtására: (1) az előinkubációs módszer; és (2) a közvetlen elegyítéses módszer, amelyben baktériumot és vizsgált anyagot felülöntő agarban kell összekeverni, és ezt egy szelektív agarlemez felületére önteni.

1.6.1. **Előkészületek**

1.6.1.1. *Baktériumok*

A baktériumokat 37 °C hőmérsékleten kell tenyészteni, a tenyésztés késői exponenciális vagy korai állandó fázisáig. A sejtsűrűségnek közelítőleg 10^8–10^9 sejt/milliliternek kell lennie.

1.6.1.2. *Anyagcsere-aktiválás*

A baktériumokat ki kell tenni a vizsgált anyag hatásainak mind megfelelő anyagcsere aktiválással, mind a nélkül. A leggyakrabban használt rendszer az enzimindukáló szerrel előkezelt rágcsálómáj-szövetből készített poszt-mitokondriális frakció ko-faktorral kiegészítve.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *Vizsgált törzsek*

Három, éspedig a WP2, a WP2 uvr A és a WP2 uvr A pKM 101 törzset kell használni. Elismert törzstenyészet-készítési és -tárolási módszereket kell használni. Ellenőrizni kell a törzsek szaporodási követelményeit és genetikai tulajdonságait, érzékenységüket az UV-sugárzásra vagy mitomicin C-re, és a WP2 uvr A pKM 101-es törzsben az ellenállásukat az ampicillin hatásának. A spontán revertánsok számának minden törzsnél a várt gyakoriságtartományon belül kell lennie.

1.6.2.2. *Táptalaj*

A mutánsok kimutatásához és kiválasztásához megfelelő táptalajt kell használni, megfelelő felülöntő agarral.

1.6.2.3. *Negatív és pozitív kontrollok használata*

Egyidejűleg nem kezelt és oldószer kontrollvizsgálatokat kell végrehajtani. Pozitív kontrollvizsgálatokat is kell végezni kétféle céllal:

i. A baktériumtörzsek érzékenységének megerősítésére.

Metil-metánszulfonát, 4-nitro-chinolinoxid vagy etil-nitro-karbamid használható pozitív kontrollanyagként anyagcsere-aktiválás nélküli vizsgálatokhoz.

ii. A megfelelő anyagcsere-aktiváló rendszerek aktivitásának biztosítására.

Minden törzs esetében a metabolizáló rendszer aktivitásának felülvizsgálatához a 2-amino-antracén a megfelelő pozitív kontrollanyag. Amikor ilyen rendelkezésre áll, a vizsgált anyag osztályával azonos kémiai osztályba tartozó anyagokat kell pozitív kontrollként használni.

1.6.2.4. *A vizsgált anyag koncentrációja lemezenként*

A vizsgált anyag legalább öt különböző koncentrációját kell vizsgálni, a lemezek közötti fél-logaritmus intervallumokkal. Az anyagokat az oldhatóság vagy a toxicitás határáig kell vizsgálni. A toxicitást a spontán revertáns telepek számának csökkenése, a háttér kitisztulása vagy a kezelt tenyészetek életben maradásának mértéke mutatja. A nem toxikus kémiai anyagokat 5 mg/lemezig kell vizsgálni, mielőtt a vizsgált anyagot negatívnak tekintenénk.

1.6.2.5. *Inkubálási körülmények*

A lemezeket 48–72 óra időtartamig, 37 °C hőmérsékleten kell inkubálni.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az enzimaktiválás nélküli, közvetlen lemezelegyítéses módszer esetében hozzáadják a kémiai anyagot és a 0,1 ml friss baktérium tenyészetet 2 ml felülöntő agarhoz. Anyagcsere-aktiválási vizsgálatok esetében a vizsgált anyag és a baktérium hozzáadása után hozzá kell adni a felülöntő agarhoz 0,5 ml, megfelelő mennyiségű poszt-mitokondriális frakciót tartalmazó, májenzim-aktiváló keveréket. Össze kell keverni minden egyes kémcső tartalmát, és egy szelektív agarlemez felületére önteni. Az agar megszilárdulása után a lemezeket 37 °C hőmérsékleten kell inkubálni 48–72 órán át. Az inkubálási időtartam végén lemezenként meg kell számolni a revertáns telepek számát.

Az előinkubációs módszer esetében a vizsgált kémiai anyagból, 0,1 ml friss baktériumtenyészetből és megfelelő mennyiségű májenzim-aktiváló keverékből vagy ugyanolyan mennyiségű pufferből álló keveréket kell előinkubálni a 2 ml felülöntő agar hozzáadása előtt. Minden más eljárás ugyanaz, mint az elegyítéses módszernél.

Mindkét módszer esetében minden lemeztenyészetből legalább hármat kell készíteni.

2. **ADATOK**

Mind a kontroll, mind a kezelt sorozatokhoz meg kell adni a revertáns telepek számát lemezenként. Mind a vizsgált anyaghoz, mind a kontrollanyagokhoz meg kell adni az egyes lemezszámokat, a lemezenként visszafejlődött telepek középértékét és a standard eltérést.

Az adatokat megfelelő statisztikai módszerek segítségével kell kiértékelni.

Legalább két független kísérletet kell végrehajtani. A második kísérletet nem kell az első kísérlettel azonos módon végrehajtani. Bizonyos vizsgálati körülmények megváltoztatása előnyben részesíthető azért, hogy a kísérlet hasznosabb adatokat adjon.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a baktériumot, felhasznált törzset,

– a vizsgálati körülményeket: dózisok, toxicitás, táptalaj összetétele; kezelési eljárások (előinkubálás, inkubálás); anyagcsere-aktiváló rendszer; referenciaanyagok, negatív kontrollanyagok,

– az egyedi lemez számot, a revertáns telepek középértékét lemezenként, a standard eltérést, a dózis/hatás összefüggést, amikor lehetséges,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

B.14. MUTAGENITÁS (SALMONELLA TYPHIMURIUM – REVERZMUTÁCIÓ-VIZSGÁLAT)

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (C).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A *Salmonella typhimurium* hisztidin (his) reverzrendszer olyan mikrobás vizsgálat, amely olyan kémiai anyagok által létrehozott his^- – his^+ reverziót méri, amelyek ezen organizmus génállományában közönséges szubsztitúciókat vagy a frameshift- mutációkat okoznak.

A baktériumokat ki kell tenni a vizsgált anyag hatásának anyagcsere-aktiválással és a nélkül, majd el kell teríteni azokat minimális táptalajon. Alkalmas inkubálási időtartam után meg kell számolni a revertáns telepeket, és össze kell hasonlítani azt a nem kezelt és/vagy az oldószeres kontrolltenyészetben megszámlált spontán revertánsok számával.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

1.6.1.1. *Baktériumok*

A frissen előállított baktériumokat 37 °C hőmérsékleten kell tenyészteni, a tenyésztés késői exponenciális vagy korai állandó fázisáig. A sejtsűrűségnek közelítőleg 10^8–10^9 sejt/milliliternek kell lennie.

1.6.1.2. *Anyagcsere-aktiválás*

A baktériumokat ki kell tenni a vizsgált anyag hatásainak mind megfelelő anyagcsere aktiválással, mind a nélkül. A leggyakrabban használt rendszer az enzimindukáló szerrel előkezelt rágcsálómáj-szövetből készített poszt-mitokondriális frakció ko-faktorral kiegészítve.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *Vizsgált törzsek*

Legalább négy, a TA 1535, TA 1537 vagy TA 97, TA 98 és TA 100 törzset kell felhasználni; ezenkívül más törzsek, ilyen például a TA 1538 és TA 102 is használhatók. Elismert törzstenyészet-készítési és -tárolási módszereket kell használni. Ellenőrizni kell a törzsek szaporodási követelményeit és genetikai tulajdonságait, érzékenységüket az UV-sugárzásra és kristályibolyára, és az ellenállásukat az ampicillin hatásának. A spontán revertánsok számának minden törzsnél a várt gyakoriságtartományon belül kell lennie.

1.6.2.2. *Táptalaj*

Megfelelő szelektív táptalajt kell használni megfelelő felülöntő agarral kombinálva.

1.6.2.3. *Negatív és pozitív kontrollok használata*

Egyidejűleg nem kezelt- és oldószer-kontrollvizsgálatokat kell végrehajtani. Pozitív kontrollvizsgálatokat is kell végezni kétféle céllal:

i. A baktériumtörzsek érzékenységének megerősítésére.

A következő vegyületek használhatók az anyagcsere-aktiválás nélküli vizsgálatokhoz:

Törzsek	revertálva
TA 1535, TA 100	nátrium-azid
TA 1538, TA 98, TA 97	2-nitro-fluorén
TA 1537	9-amino-akridin
TA 102	kumol-hidroperoxid

ii. A megfelelő anyagcsere-aktiváló rendszerek aktivitásának biztosítására.

Minden törzs esetében a metabolizáló rendszer aktivitásának felülvizsgálatához a 2-amino-antracén a megfelelő pozitív kontrollanyag. Amikor ilyen rendelkezésre áll, a vizsgált anyag osztályával azonos kémiai osztályba tartozó anyagokat kell pozitív kontrollként használni.

1.6.2.4. *A vizsgált anyag koncentrációja lemezenként*

A vizsgált anyag legalább öt különböző koncentrációját kell vizsgálni, a lemezek közötti fél-logaritmus intervallumokkal. Az anyagokat az oldhatóság vagy a toxicitás határáig kell vizsgálni. A toxicitást a spontán revertánstelepek számának csökkenése, a háttér kitisztulása vagy a kezelt tenyészetek életben maradásának mértéke mutatja. A nem toxikus kémiai anyagokat 5 mg/lemezig kell vizsgálni, mielőtt a vizsgált anyagot negatívnak tekintenénk.

1.6.2.5. *Inkubálási körülmények*

A lemezeket 48–72 óra időtartamig, 37 °C hőmérsékleten kell inkubálni.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az enzimaktiválás nélküli, közvetlen lemezelegyítéses módszer esetében hozzáadják a kémiai anyagot és a 0,1 ml friss baktériumtenyészetet 2 ml felülöntő agarhoz. Anyagcsere-aktiválási vizsgálatok esetében a vizsgált anyag és a baktérium hozzáadása után hozzá kell adni a felülöntő agarhoz 0,5 ml, megfelelő mennyiségű poszt-mitokondriális frakciót tartalmazó, májenzim-aktiváló keveréket. Össze kell keverni minden egyes kémcső tartalmát, és egy szelektív agarlemez felületére önteni. Az agar megszilárdulása után a lemezeket 37 °C hőmérsékleten kell inkubálni 48–72 órán át. Az inkubálási időtartam végén lemezenként meg kell számolni a revertánstelepek számát. Az előinkubációs módszer esetében a vizsgált anyagból 0,1 ml friss baktériumtenyészetből és megfelelő mennyiségű májenzim-aktiváló keverékből vagy ugyanolyan mennyiségű pufferből álló keveréket kell előinkubálni a 2 ml felülöntő agar hozzáadása előtt. Minden más eljárás ugyanaz, mint az elegyítéses módszernél.

Mindkét módszer esetében minden lemeztenyészetből legalább hármat kell készíteni.

2. **ADATOK**

Mind a kontroll, mind a kezelt sorozatokhoz meg kell adni a revertánstelepek számát lemezenként.

Mind a vizsgált anyaghoz, mind a kontrollanyagokhoz meg kell adni az egyes lemezszámokat, a lemezenként visszafejlődött telepek középértékét és a standard eltérést.

Az adatokat megfelelő statisztikai módszerek segítségével kell kiértékelni.

Legalább két független kísérletet kell végrehajtani. A második kísérletet nem kell az első kísérlettel azonos módon végrehajtani. Bizonyos vizsgálati körülmények megváltoztatása előnyben részesíthető azért, hogy a kísérlet hasznosabb adatokat adjon.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS KÉSZÍTÉSE**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a baktériumot, a felhasznált törzset,

– a vizsgálati körülményeket: dózisok, toxicitás, táptalaj összetétele; kezelési eljárások (előinkubálás, inkubálás); anyagcsere-aktiváló rendszer; referenciaanyagok, negatív kontrollanyagok,

– az egyedi lemezszámot, a revertánstelepek középértékét lemezenként, a standard eltérést, a dózis/hatás összefüggést, amikor lehetséges,

– az eredmények megvitatását,

– az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

C. RÉSZ: AZ ÖKOTOXICITÁS MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI

C.1. AKUT TOXICITÁS HAL ESETÉBEN

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat célja valamely anyag akut letális toxicitásának meghatározása édesvízi halak esetében. Hasznosnak bizonyul, ha rendelkezésre állnak információk az anyag vízoldékonyságáról, gőznyomásáról, kémiai stabilitásáról, disszociációs állandóiról és biológiai lebonthatóságáról annak érdekében, hogy a legmegfelelőbb vizsgálati módszert lehessen kiválasztani (statikus, félstatikus vagy átfolyásos) a vizsgálat időtartama alatt a vizsgált anyag kielégítően állandó koncentrációinak biztosításához.

Mind a vizsgálat tervezéséhez, mind az eredmények értelmezéséhez figyelembe kell venni további információkat is (ilyenek például a szerkezeti képlet, a tisztasági fok, szennyeződések jellege és százalékos aránya, adalékanyagok jelenléte és mennyisége, az n-oktanol/víz megoszlási koefficiens).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az akut toxicitás valamely anyag hatásának való kitételkor (expozíció) rövid időn (napokon) belül, valamely szervezetben előidézett, észlelhető káros hatás. E vizsgálatban az akut toxicitást a közepes letális koncentrációval (LC_{50}) kell kifejezni, vagyis azzal a vízben mért koncentrációval, amely a kísérleti halak csoportjának 50 %-ánál halált okoz valamilyen folyamatos expozíciós időtartamon belül, amelyet meg kell adni.

A vizsgált anyag minden koncentrációját tömeg/térfogat (milligramm/liter) mértékegységben kell megadni. E koncentrációk tömeg/tömeg mértékegységben ($mg.kg^{-1}$) is megadhatók.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Vizsgálható referenciaanyag annak bemutatására, hogy a laboratóriumi vizsgálati körülmények között nem változott-e meg jelentős mértékben a vizsgált fajok reakciója.

E vizsgálathoz nincs előírva referenciaanyag.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Végrehajtható határérték-vizsgálat 100 mg/liter koncentrációban annak bemutatására, hogy az LC_{50} nagyobb, mint e koncentráció.

A halakat a vízhez adott vizsgált anyag hatásának kell kitenni, koncentrációk egész tartományában, 96 órás időtartamon át. A pusztulást legalább 24 órás időközönként fel kell jegyezni, és ahol lehetséges, ki kell számítani az egyes megfigyelési időpontokban a halak 50 %-át elpusztító koncentrációkat (LC_{50}).

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A minőségi követelmények mind a határérték-vizsgálati, mind a teljes vizsgálati módszerre érvényesek.

A kontrollcsoportban a kísérlet végéig a halpusztulásnak nem szabad 10 %-nál nagyobbnak lennie (vagy maximum egy hal pusztulhat el, ha tíznél kevesebb halat használnak).

Az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig nagyobbnak kell lennie, mint a levegőtelítettségi érték 60 %-a.

A vizsgált anyag koncentrációit a kísérlet során mindvégig a kezdeti koncentráció 80 %-án belüli értéken kell tartani.

Az olyan anyagok esetében, amelyek stabil oldatokat képezve könnyen oldódnak a vizsgált közegben, tehát azok, amelyek jelentős mértékben nem fognak párologni, lebomlani, hidrolizálni vagy abszorbeálódni, a kezdeti koncentráció a névleges koncentrációval egyenlőnek tekinthető. Bizonyítani kell, hogy a koncentrációk a vizsgálat során mindvégig megmaradnak, és a minőségi követelmények teljesülnek.

Azon anyagok esetében, amelyek:

i. a vizsgált közegben kevéssé oldhatók; vagy

ii. stabil emulziók vagy diszperziók létrehozására képesek; vagy

iii. vizes oldatokban nem stabilak,

abból kell kiindulni, hogy a kezdeti koncentráció a vizsgálat kezdetén az oldatban mért (vagy ha ez technikailag nem lehetséges, a vízoszlopban mért) koncentráció. A koncentrációt az egyensúlyba hozatal után, de a kísérleti halak behelyezése előtt kell meghatározni.

Ezen esetek közül mindegyikben további méréseket kell végrehajtani a vizsgálat során a tényleges expozíciós koncentrációk megerősítésére, vagy annak megerősítésére, hogy teljesülnek-e a minőségi követelmények.

A pH-nak nem szabad 1 egységnél nagyobb mértékben változnia.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Típusát tekintve háromféle eljárás használható:

Statikus vizsgálat:

Ez olyan toxicitásvizsgálat, amelyben a vizsgált oldat nem áramlik. (Az oldatok mindvégig változatlanok maradnak a vizsgálat végrehajtása során.)

Félstatikus vizsgálat:

Olyan, a vizsgált oldat áramlása nélküli vizsgálat, amelynél rendszeresen, adagonként ki kell cserélni a vizsgált oldatokat hosszabb időtartamok (például 24 óra) eltelte után.

Átfolyásos vizsgálat:

Olyan toxicitás vizsgálat, amelyben a vizet állandóan cserélik a vizsgálati kamrákban, a már használt vízzel együtt elszállítva a vizsgált kémiai anyagot a vizsgált közeg kicserélése érdekében.

1.6.1. **Reagensek**

1.6.1.1. *A vizsgált anyagok oldatai*

El kell készíteni a szükséges erősségű törzsoldatokat az anyagnak ionmentesített vízben vagy az 1.6.1.2. pontnak megfelelő vízben történő feloldásával.

A kiválasztott vizsgált koncentrációkat a törzsoldat hígításával kell elkészíteni. Ha nagy koncentrációkat vizsgálnak, az anyag közvetlenül a hígítóvízben feloldható.

Az anyagokat általában csak az oldhatóság határáig kell vizsgálni. Néhány anyagnál (például olyan anyagok esetében, amelyeknek kicsi a vízoldékonysága, nagy a P_{ow} értéke, vagy azok esetében, amelyek stabil diszperziót alkotnak, nem pedig valódi oldatot hoznak létre vízben) elfogadható az anyag oldhatósági határa fölötti vizsgált koncentráció használata a maximális oldható/stabil koncentráció elérésének biztosítására. Fontos azonban, hogy e koncentráció ne zavarja meg a vizsgált rendszert valamilyen más módon (például az anyagból a víz felszínén képződött, és a víz oxigénellátását akadályozó film révén).

Ultrahangos diszpergálás, szerves oldószerek, emulgeáló vagy diszpergáló szerek használhatók alacsony vízoldékonyságú anyagok törzsoldatai elkészítésének elősegítésére, vagy a vizsgált közegben az ilyen anyagok diszpergálódásának segítésére. Amikor ilyen segédanyagokat használnak, minden vizsgált koncentrációnak ugyanolyan mennyiségű segédanyagot kell tartalmaznia, és további kontrollhalakat kell kitenni a segédanyag ugyanolyan koncentrációja hatásának, mint amelyet a vizsgálati sorozatokban alkalmaznak. Minden ilyen segédanyag koncentrációját minimális értéken kell tartani, de semmi esetre sem szabad meghaladnia a 100 mg/liter értéket a vizsgált közegben.

A vizsgálatot a pH-érték beállítása nélkül kell végrehajtani. Ha létezik bizonyíték a pH-érték jelentős változására, ajánlatos a vizsgálat megismétlése a ph-érték beállításával, meg kell adni az így kapott eredményeket. Ezen esetben be kell állítani a törzsoldat ph-értékét a hígítóvíz ph-értékére, kivéve ha különleges okok szólnak ellene. E célra a legkedvezőbb a HCl és az NaOH használata. Ezt a pH-korrekciót úgy kell végrehajtani, hogy ne változzon meg jelentős mértékben a vizsgált anyag koncentrációja a törzsoldatban. Ha a beállítás a vizsgált vegyület valamilyen kémiai reakcióját vagy fizikai kicsapódását okozza, ezt közölni kell a jelentésben.

1.6.1.2. *Tároló- és hígítóvíz*

Ivóvízellátó rendszerből vett (klór, nehézfémek vagy más anyagok potenciálisan káros koncentrációival nem szennyezett), jó minőségű természetes víz vagy művíz (lásd az I. függeléket) használható. A 10 és 250 mg/l közötti keménységű ($CaCO_3$-ként meghatározva), 6,0 és 8,5 közötti pH-jú vizeket kell előnyben részesíteni.

1.6.2. **Készülék**

Minden készüléket kémiailag inert anyagból kell készíteni.

– automatikus hígító rendszer (átfolyásos vizsgálathoz),

– oxigénmérő,

– vízkeménység meghatározására szolgáló berendezés,

– megfelelő készülék a hőmérséklet szabályozásához,

– pH-mérő.

1.6.3. **Kísérleti hal**

A halaknak jó egészségi állapotban kell lenniük, és mindenfajta látható testi hibától mentesnek kell lenniük.

A kísérlethez használt fajtákat olyan gyakorlati kritériumok alapján kell kiválasztani, mint például egész évbeni könnyű beszerezhetőségük, a problémamentes tartás, a vizsgálati célokra való megfelelőség, relatív érzékenység a kémiai anyagokra és minden olyan gazdasági, biológiai vagy ökológiai tényező, amelynek bármilyen hatása lehet. A halfajták kiválasztásakor a kapott adatok összehasonlíthatóságát és a nemzetközi harmonizáció szükségességét (lásd az 1. pontban hivatkozott szakirodalmat) is szem előtt kell tartani.

A 2. függelék ismerteti az e vizsgálat végrehajtásához javasolt halfajták jegyzékét; az előnyben részesített fajták a zebradánió és a szivárványos pisztráng.

1.6.3.1. *Tartás*

A kísérleti halaknak lehetőleg egyetlen állományból kell származniuk, hasonló méretűeknek és korúaknak kell lenniük. A halakat legalább 12 napig a következő körülmények között kell tartani:

betöltés:

a rendszernek (visszaforgatás vagy átáramoltatás) és a halfajtáknak megfelelően,

víz:

lásd az 1.6.1.2. pontot,

világítás:

napi 12–16 órás megvilágítás,

oldott oxigén koncentrációja:

a levegőtelítettségi érték legalább 80 %-a,

etetés:

hetente vagy naponta háromszor, amelyet a vizsgálat kezdete előtt 24 órával befejeznek.

1.6.3.2. *Mortalitás*

A 48 órás szoktatási időtartamot követően fel kell jegyezni az elpusztult állatok számát a következő kritériumok alkalmazásával:

– ha a populáció 10 %-ánál több hal elpusztul 7 napon belül:

akkor a teljes állományt le kell selejtezni,

– ha a populáció 5 és 10 %-a pusztul el:

akkor a tartási idő 7 további nappal meghosszabbodik. Ha további pusztulás nem történik, az állomány elfogadható, egyébként nem,

– ha a populáció kevesebb, mint 5 %-a pusztul el:

akkor az állomány alkalmazható a vizsgálathoz.

1.6.4. **Szoktatási időtartam**

Az alkalmazás előtt minden halat legalább 7 napig kell tartani olyan minőségű és hőmérsékletű vízben, mint amit a vizsgálat során fognak alkalmazni.

1.6.5. **A kísérlet végrehajtása**

A vizsgálatot megelőzheti egy előzetes vizsgálat, amely információkkal szolgál arról a koncentrációtartományról, amelyet a fő vizsgálatban kell használni.

A vizsgált sorozaton kívül vizsgált anyag nélküli kontrollvizsgálatot, és a segédanyagot tartalmazó kontroll-anyag-vizsgálatot is végre kell hajtani.

A vizsgált vegyület fizikai és kémiai tulajdonságaitól függően statikus, félstatikus vagy átfolyásos vizsgálatot lehet választani, a minőségi követelmények teljesítése érdekében.

A halakat a következő módon kell kitenni az anyag hatásának:

– időtartam: 96 óra,

– állatok száma: koncentrációnként legalább 7,

– tartályok: alkalmas űrtartalmúak, a javasolt egyedsűrűség figyelembevételével,

– egyedsűrűség: 1 g hal/liter ajánlott a statikus és a félstatikus vizsgálatokhoz; az átfolyásos rendszerekhez elfogadható ennél nagyobb egyedsűrűség is,

– vizsgált koncentráció: legalább 5, egymástól 2,2-et nem meghaladó konstans tényezővel eltérő és, amennyire lehetséges, a 0–100 %-os mortalitási tartományt átfedő koncentráció,

– víz: lásd az 1.6.1.2. pontot,

– világítás: 12–16 órás megvilágítás naponta,

– hőmérséklet: a fajtáknak megfelelő (lásd a 2. függeléket), de minden esetben ± 1 °C-on belül,

– az oldott oxigén koncentrációja: a kiválasztott hőmérsékleten a levegőtelítettségi-érték nem kevesebb, mint 60 %-a,

– etetés: nincs.

A halakat meg kell vizsgálni az első 2–4 óra után, és legalább 24 órás időközönként. A halak akkor tekinthetők élettelennek, ha a farokúszó érintése nem vált ki reakciót, és nem látható semmilyen légzőmozgás. Az elpusztult halakat el kell távolítani, és ezt fel kell jegyezni.

Nyilvántartást kell vezetni a látható rendellenességekről (például egyensúly-vesztés, az úszási viselkedés és a légzés változásai, pigmentáció stb.).

Naponta végre kell hajtani a ph-érték, az oldott oxigénkoncentráció és a hőmérséklet méréseit.

Határérték-vizsgálat

Az e módszerben leírt eljárások segítségével végrehajtható a határérték-vizsgálat 100 mg/l koncentrációval annak bemutatására, hogy az LC_{50} nagyobb, mint e koncentráció.

Ha az anyag olyan természetű, hogy nem érhető el a vizsgált vízben a 100 mg/l-es koncentráció, a határérték-vizsgálatot a használt közegben az anyag oldhatóságával egyenlő koncentrációval (vagy a stabil diszperziót alkotó maximális koncentrációval) kell végrehajtani (lásd még az 1.6.1.1. pontot is).

A határérték-vizsgálatot 7–10 hallal kell végrehajtani úgy, hogy a kontrollcsoportban lévő halak száma ezzel azonos legyen. (A binomiális elmélet szerint, amikor 10 hal alkalmazása mellett nem tapasztaltak halálozást, akkor 99,9 %-os a megbízhatósága annak, hogy az LC_{50} nagyobb, mint a határérték-vizsgálatban használt koncentráció. 7, 8 vagy 9 hal esetében a nulla halálozás legalább 99 %-os megbízhatóságot biztosít arra, hogy az LC_{50} nagyobb, mint az alkalmazott koncentráció).

Ha pusztulás következik be, a teljes vizsgálatot végre kell hajtani. Ha szubletális hatásokat figyelnek meg, ezeket fel kell jegyezni.

2. ADATOK ÉS KIÉRTÉKELÉS

Minden olyan időtartamhoz, amikor megfigyeléseket jegyeztek fel (24, 48, 72 és 96 óra), fel kell rajzolni a féllogaritmusos papírra az egyes javasolt expozíciós időtartamok során a koncentráció függvényében megállapított százalékos pusztulást.

Ha lehetséges, minden egyes megfigyelési időhöz meg kell becsülni az LC_{50}-et és a konfidenciahatárokat (p=0,05) standard eljárások segítségével; ezen értékeket egy vagy legfeljebb két szignifikáns számjegyre kell kerekíteni (példák két számjegyre kerekítésre: a 173,5-ből 170; 0,127-ből 0,13; 1,21-ből 1,2 lesz).

Olyan esetekben, amikor a koncentráció/hatás görbe meredeksége túl nagy ahhoz, hogy lehetővé váljon az LC_{50} kiszámítása, elegendő ezen érték grafikus becslése.

Ha két, egymást követő koncentráció 2,2 arány mellett csak 0 és 100 %-os pusztulást ad, akkor ez a két érték elegendő azon tartomány jelzésére, amelybe az LC_{50} esik.

Ha megállapítható, hogy nem tartható fenn a vizsgált anyag stabilitása vagy homogenitása, ezt közölni kell a jelentésben, és körültekintően kell eljárni az eredmények értelmezésekor.

3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a kísérleti halakkal kapcsolatos információkat (tudományos név, törzs, szállító, mindenféle előkezelés, számuk és méretük az egyes vizsgált koncentrációkban),

– a hígítóvíz eredetét és fő kémiai jellemzőit (pH, keménység, hőmérséklet),

– alacsony vízoldékonyságú anyagok esetében a törzsoldat és vizsgált oldat elkészítésének módszerét,

– minden segédanyag koncentrációját,

– a használt koncentrációk jegyzékét és a vizsgált oldatban a vizsgált anyag koncentrációinál a stabilitással kapcsolatban rendelkezésre álló minden információt,

– kémiai elemzés esetén: a használt módszereket és kapott eredményeket,

– a határérték-vizsgálat eredményeit, adott esetben,

– az alkalmazott vizsgálati eljárás kiválasztásának indokait és részleteit (például statikus, félstatikus, adagolási sebesség, átfolyási sebesség, levegőztetett-e, egyedsűrűség stb.),

– a vizsgáló berendezés leírását,

– a világítási rendszert,

– a vizsgált oldatok oldott oxigén koncentrációit, ph-értékeit és hőmérsékleteit, minden 24 órában,

– bizonyítékot arról, hogy teljesültek a minőségi követelmények,

– táblázatot, amely mutatja a kumulatív pusztulást minden egyes koncentráció és kontroll esetében (és ha szükséges, a segédanyagot tartalmazó kontroll esetében is) minden egyes javasolt megfigyelési időpontban,

– a koncentráció/hatás-görbe grafikus ábrázolását a vizsgálat végén,

– ha lehetséges, az LC_{50}-értékeket minden egyes javasolt megfigyelési időpontban (95 %-os konfidencia határokkal),

– az LC_{50}-értékek meghatározására használt statisztikai eljárásokat,

– ha referenciaanyagot használnak, a kapott eredményeket,

– azt a legnagyobb vizsgált koncentrációt, amely még nem okoz pusztulást a vizsgálat időtartamában,

– azt a legalacsonyabb vizsgált koncentrációt, amely 100 %-os pusztulást okoz a vizsgálat időtartamában.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 203. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges és frissítések.

(2) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – *Teleostei, Cyprinidae*). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (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, macroinvertabrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteenth edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolf, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793–821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying biossay results. Water Res., 1970, vol. 4. 3–32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65–84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

1. függelék

Művíz

Példa megfelelő hígítóvízre

Minden kémiai anyagnak analitikai tisztaságúnak kell lennie.

A víznek jó minőségű, desztillált víznek vagy 5 μScm^{-1}-nél kisebb vezetőképességű, ioncserélt víznek kell lennie.

A víz desztillálásához használt készüléknek semmilyen rézből készült alkatrészt nem szabad tartalmaznia.

Törzsoldatok:

$CaCL_2$. $2H_2O$ (kalcium-klorid-dihidrát):	11,76 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	
$MgSO_4$. $7H_2O$ (magnéziumszulfát-heptahidrát):	4,93 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	
$NaHCO_3$ (nátrium-hidrogénkarbonát):	2,59 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	
KCl (káliumklorid):	0,23 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	

A hígításhoz használt művíz

A négy törzsoldat mindegyikéből 25 ml-t kell összekeverni, és vízzel 1 literre feltölteni.

A keveréket addig kell levegőztetni, amíg az oldott oxigén koncentrációja egyenlő nem lesz a levegőtelítettségi értékkel.

A pH-nak 7,8 ± 0,2-nek kell lennie.

Ha szükséges, a pH-t NaOH-val (nátrium-hidroxiddal) vagy HCl-val (sósavval) kell beállítani.

Az így elkészített hígítóvizet 12 óráig állni kell hagyni, és nem szabad tovább levegőztetni.

Ezen oldatban a Ca- és Mg-ionok összege 2,5 mmol/liter. A Ca:Mg ionok aránya 4:1 és az Na:K ionok aránya 10:1. Ezen oldat teljes lúgossága 0,8 mmol/liter.

A hígítóvíz elkészítésekor nem szabad megváltoztatni a víz összetételét vagy tulajdonságait.

2. függelék

A vizsgálathoz javasolt halfajták

Javasolt fajták	Javasolt vizsgálati hőmérséklet-tartomány (°C)	A kísérleti állatok javasolt összhosszúsága (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton – Buchanan) zebradánió	20-tól 24-ig	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) amerikai cselle	20-tól 24-ig	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) ponty	20-tól 24-ig	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlegel 1850) japán fogasponty	20-tól 24-ig	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) guppi	20-tól 24-ig	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) kékkopoltyús naphal	20-tól 24-ig	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) szivárványos pisztráng	12-től 17-ig	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) jász	20-tól 24-ig	6,0 ± 2,0

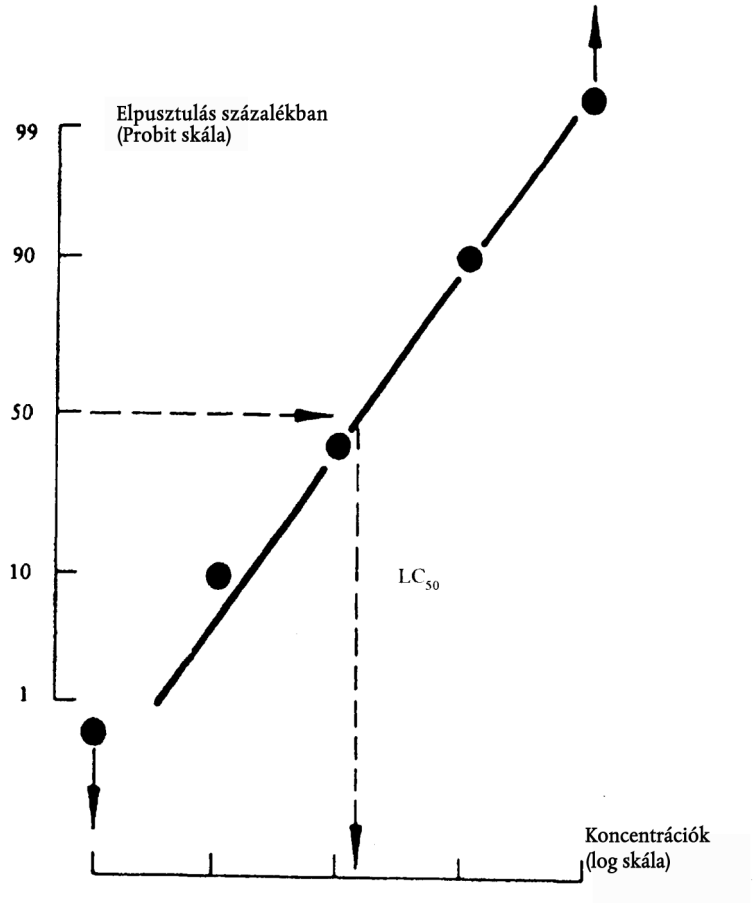
Tenyésztés

A fent felsorolt halakat könnyű tenyészteni és/vagy könnyen beszerezhetők az egész év során. Alkalmasak a tenyésztésre vagy halgazdaságokban, vagy laboratóriumban, betegség- és parazita-kontrollált állapotok mellett úgy, hogy a kísérleti állatok egészségesek és ismert származásúak lesznek. E halak a világ számos részén rendelkezésre állnak.

3. függelék

Példa koncentrációra: elpusztulás százalékban

Példa LC_{50} meghatározására féllogaritmusos papír segítségével



C.2. AKUT TOXICITÁS *DAPHNIA* ESETÉBEN

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat célja valamely anyag azon közepes, effektív koncentrációjának (EC_{50}) meghatározása, amely édes vízben a *Daphnia* mozgásképtelenségéhez vezet. Hasznosnak bizonyul, ha a vizsgálat megkezdése előtt rendelkezésre állnak információk az anyag vízoldékonyságáról, gőznyomásáról, kémiai stabilitásáról, disszociációs állandóiról és biológiai lebonthatóságáról.

Mind a vizsgálat tervezéséhez, mind az eredmények értelmezéséhez figyelembe kell venni további információkat is (ilyenek például a szerkezeti képlet, a tisztasági fok, a szennyeződések jellege és százalékos aránya, az adalékanyagok jelenléte és mennyisége, az n-oktanol/víz megoszlási koefficiens).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Ezen irányelv LC_{50}-re vonatkozó követelménye *Daphnia* esetében kielégítettnek tekinthető az EC_{50}-nek az e vizsgálati módszerben leírt meghatározásával.

Az akut toxicitást e vizsgálat a közepesen hatékony immobilizáló koncentrációként (EC_{50}) fejezi ki. Ez az a koncentráció, a kiindulási koncentrációra vonatkoztatva, amely egy adott vizsgált csoportban a *Daphniák* 50 %-át mozgásképtelenné teszi valamilyen pontosan megadott folyamatos expozíciós időtartamon belül.

Mozgásképtelenség:

Azon állatokat, amelyek nem képesek úszni a vizsgálati tartály óvatos megkeverése után 15 másodpercen belül, mozgásképtelennek kell tekinteni.

A vizsgált anyag minden koncentrációját tömeg/térfogat (milligramm/liter) mértékegységben kell megadni. E koncentrációk tömeg/tömeg ($mg.kg^{-1}$) mértékegységben is megadhatók.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Vizsgálható referenciaanyag annak bemutatására, hogy a laboratóriumi vizsgálati körülmények között nem változott-e meg jelentős mértékben a vizsgált fajok reakciója.

A 2. függelék tartalmazza a négy különböző anyag használatával végrehajtott EGK-körvizsgálat eredményeinek összefoglalását.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Végrehajtható határérték-vizsgálat 100 mg/liter koncentrációval annak bemutatására, hogy az EC_{50} nagyobb, mint ez a koncentráció.

A *Daphniát* 48 órán át ki kell tenni a vízhez hozzáadott vizsgált anyag hatásának különböző koncentrációtartományok alkalmazásával. Ha rövidebb expozíciós időt alkalmaznak, ezt meg kell indokolni a jelentésben.

Az egyébként azonos vizsgálati körülmények és vizsgáltanyag-koncentrációk megfelelő tartománya mellett a vizsgált anyag különböző koncentrációi különböző mértékben fejtik ki a hatásukat a *Daphnia* úszóképességére. A különböző koncentrációk azt eredményezik, hogy a vizsgálat végén különböző azon *Daphniák* százalékos aránya, amelyek már nem képesek úszni. A 0 vagy 100 %-os bénulást okozó koncentrációkat közvetlenül kell meghatározni a vizsgálati megfigyelésekből, míg a 48 órás EC_{50}-et számítással kell meghatározni, ha lehetséges.

E módszerhez statikus rendszert kell használni, a vizsgált oldatokat nem kell megújítani az expozíciós időtartam során.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A minőségi követelmények mind a határérték-vizsgálati, mind a teljes vizsgálati módszerre érvényesek.

A kontrollállatoknál az immobilizációs arány a vizsgálat végére nem haladhatja meg a 10 %-ot.

Ügyelni kell arra, hogy a kontrollcsoportokban lévő kísérleti *Daphniák* ne ragadjanak fenn a felületi feszültség miatt a víz felszínén.

Kívánatos, hogy a vizsgálati tartályokban az oldott oxigén koncentrációja mindig 3 mg l^{-1} fölött maradjon a vizsgálat során. Az oldott oxigén koncentrációjának semmilyen körülmények között sem szabad 2 mg l^{-1} alá csökkennie.

A vizsgált anyag koncentrációit a kísérlet során mindvégig a kezdeti koncentráció 80 %-án belüli értéken kell tartani.

Az olyan anyagok esetében, amelyek stabil oldatokat képezve könnyen oldódnak a vizsgált közegben, tehát azok, amelyek jelentős mértékben nem fognak párologni, lebomlani, hidrolizálni vagy abszorbeálódni, a kezdeti koncentráció a névleges koncentrációval egyenlőnek tekinthető. Bizonyítani kell, hogy a koncentrációk a vizsgálat során mindvégig megmaradnak, és a minőségi követelmények teljesülnek.

Azon anyagok esetében, amelyek:

i. a vizsgált közegben kevéssé oldhatók; vagy

ii. stabil emulziók vagy diszperziók létrehozására képesek; vagy

iii. vizes oldatokban nem stabilak,

abból kell kiindulni, hogy a kezdeti koncentráció a vizsgálat kezdetén az oldatban mért (vagy ha ez technikailag nem lehetséges, a vízoszlopban mért) koncentráció. A koncentrációt az egyensúlyba hozatal után, de a kísérleti organizmusok behelyezése előtt kell meghatározni.

Ezen esetek közül mindegyikben további méréseket kell végrehajtani a vizsgálat során a tényleges expozíciós koncentrációk megerősítésére, vagy annak megerősítésére, hogy teljesülnek-e a minőségi követelmények.

A pH-nak nem szabad 1 egységnél nagyobb mértékben változnia.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Reagensek**

1.6.1.1. *A vizsgált anyagok oldatai*

El kell készíteni a szükséges erősségű törzsoldatokat az anyagnak ioncserélt vízben vagy az 1.6.1.2. pontnak megfelelő vízben történő feloldásával.

A kiválasztott vizsgált koncentrációkat a törzsoldat hígításával kell elkészíteni. Ha nagy koncentrációkat vizsgálnak, az anyag közvetlenül a hígítóvízben oldható fel.

Az anyagokat általában csak az oldhatóság határáig kell vizsgálni. Néhány anyagnál (például olyan anyagok esetében, amelyeknek kicsi a vízoldékonysága, nagy a P_{ow}-értéke vagy azok esetében, amelyek stabil diszperziót alkotnak, nem pedig valódi oldatot hoznak létre vízben) elfogadható az anyag oldhatósági határa fölötti vizsgált koncentráció használata a maximális oldható/stabil koncentráció elérésének biztosítására. Fontos azonban, hogy e koncentráció ne zavarja meg a vizsgált rendszert valamilyen más módon (például az anyagból a víz felszínén képződött, és a víz oxigénellátását akadályozó film révén).

Ultrahangos diszpergálás, szerves oldószerek, emulgeáló vagy diszpergáló szerek használhatók alacsony vízoldékonyságú anyagok törzsoldatai elkészítésének elősegítésére, vagy a vizsgált közegben az ilyen anyagok diszpergálódásának segítésére. Amikor ilyen segédanyagokat használnak, minden vizsgált koncentrációnak ugyanolyan mennyiségű segédanyagot kell tartalmaznia, és további kontrollhalakat kell kitenni a segédanyag ugyanolyan koncentrációja hatásának, mint amelyet a vizsgálati sorozatokban alkalmaznak. Minden ilyen segédanyag koncentrációját minimális értéken kell tartani, de semmi esetre sem szabad meghaladnia a 100 mg/liter értéket a vizsgált közegben.

A vizsgálatot a ph-érték beállítása nélkül kell végrehajtani. Ha létezik bizonyíték a ph-érték jelentős változására, ajánlatos a vizsgálat megismétlése a ph-érték beállításával, meg kell adni az így kapott eredményeket. Ezen esetben be kell állítani a törzsoldat ph-értékét a hígítóvíz ph-értékére, kivéve ha különleges okok szólnak ellene. E célra a legkedvezőbb a HCl és az NaOH használata. Ezt a pH-beállítást úgy kell végrehajtani, hogy ne változzon meg jelentős mértékben a vizsgált anyag koncentrációja a törzsoldatban. Ha a beállítás a vizsgált vegyület valamilyen kémiai reakcióját vagy fizikai kicsapódását okozza, ezt közölni kell a jelentésben.

1.6.1.2. *Vizsgált víz*

E vizsgálathoz művizet kell használni (lásd az 1. függeléket és a szakirodalmat (2): ISO 6341). Ajánlatos, hogy a tenyésztéshez használt víz hasonló minőségű (pH, keménység) legyen, mint a vizsgálathoz használt víz, hogy ne legyen szükség alkalmazkodási periódus beiktatására a vizsgálat előtt.

1.6.2. **Készülék**

Szokásos laboratóriumi készülékeket és berendezéseket kell használni. Azon berendezéseknek, amelyek majd érintkezésbe kerülnek a vizsgált oldatokkal, lehetőleg teljes egészében üvegből kell készülniük, ilyenek:

– oxigénmérő (mikroelektródával, vagy olyan, amely kis térfogatú mintákban az oldott oxigén mérésére alkalmas),

– megfelelő készülék a hőmérséklet szabályozásához,

– pH-mérő,

– vízkeménység meghatározására szolgáló berendezés.

1.6.3. **Kísérleti organizmusok**

A *Daphnia magna* a kedvelt kísérleti állatfaj, jóllehet *Dapnia pulex* használata is megengedett. A kísérleti állatoknak a vizsgálat kezdetén 24 óránál fiatalabbaknak, laboratóriumi tenyésztésűeknek, szemmel látható betegségtől menteseknek és ismert élettörténetűeknek (például tenyésztés – bármilyen előkezelés stb.) kell lenniük.

1.6.4. **A kísérlet végrehajtása**

A vizsgálatot megelőzheti egy előzetes vizsgálat, amely információkkal szolgál arról a koncentrációtartományról, amelyet a fő vizsgálatban kell használni.

A vizsgált sorozaton kívül a vizsgált anyag nélküli kontrollvizsgálatot és az adalékanyagot tartalmazó kontrollanyag vizsgálatot is végre kell hajtjani.

Daphniát a következőkben leírt módon kell kitenni a vizsgált anyag hatásának:

– *időtartam:* lehetőleg 48 óra,

– *állatok száma:* legalább 20 állat minden egyes vizsgált koncentráció mellett, lehetőleg öt állatból álló négy csoportba vagy 10 állatból álló két csoportba osztva,

– *egyedsűrűség:* legalább 2 ml vizsgált oldatot kell biztosítani minden egyes állathoz,

– *vizsgált koncentráció:* a vizsgált oldatot közvetlenül a *Daphniák* behelyezése előtt kell elkészíteni, lehetőleg anélkül, hogy vízen kívül bármilyen oldószert használnánk. A koncentrációkat mértani sorba kell beállítani, 2,2-t meg nem haladó koncentrációarányban. A kontrollanyagokkal együtt kell vizsgálni azon koncentrációkat, amelyek elegendőek ahhoz, hogy 0 és 100 %-os immobilizációt okozzanak 48 óra után, és az immobilizáció közbenső mértékeinek azt a tartományát, amely lehetővé teszi a 48 órás EC_{50} kiszámítását,

– *víz:* lásd az 1.6.1.2. pontot,

– *világítás:* tetszés szerint választható világos-sötét ciklus,

– *hőmérséklet:* a vizsgálati hőmérsékletnek 18 és 22 °C között kell lennie, de minden egyes vizsgálat végrehajtásakor állandónak kell lennie, ± 1 °C eltérés megengedhető,

– *levegőztetés:* a vizsgált oldatot nem levegőztetik,

– *etetés:* nincs.

A kontrollok és minden vizsgált koncentráció pH-ját valamint az oxigén koncentrációját meg kell mérni a vizsgálat végén; a vizsgált oldatok pH-ját nem szabad módosítani.

Az illékony vegyületeket olyan, teljesen megtöltött, zárt tartályokban kell vizsgálni, amelyek elegendően nagyok ahhoz, hogy megakadályozzák az oxigénhiány fellépését.

A *Daphniákat* legalább a 24 órás expozíció után, majd 48 óra után meg kell vizsgálni.

Határérték-vizsgálat

Az e módszerben leírt eljárások segítségével végrehajtható a határérték-vizsgálat 100 mg/l koncentrációval annak bemutatására, hogy az EC_{50} nagyobb, mint e koncentráció.

Ha az anyag olyan természetű, hogy nem érhető el a vizsgált vízben a 100 mg/l-es koncentráció, a határérték-vizsgálatot a használt közegben az anyag oldhatóságával egyenlő koncentrációval (vagy a stabil diszperziót alkotó maximális koncentrációval) kell végrehajtani (lásd még az 1.6.1.1. pontot is).

A határérték-vizsgálatot 20 *Daphnia* használatával kell végrehajtani úgy, hogy a kontrollcsoportban lévő állatok száma ezzel azonos legyen. Ha mozgásképtelenséget tapasztaltak, végre kell hajtani a teljes vizsgálatot.

2. ADATOK ÉS KIÉRTÉKELÉS

Minden egyes olyan időtartamhoz, amikor megfigyeléseket jegyeznek fel (24 és 48 óra), fel kell vinni a koncentráció függvényében megállapított százalékos immobilizációt a féllogaritmusos papírra.

Ha lehetséges, minden egyes megfigyelési időhöz meg kell becsülni az EC_{50}-et és a konfidenciahatárokat ($p = 0,05$) standard eljárások segítségével; ezen értékeket egy vagy legfeljebb két szignifikáns számjegyre kell kerekíteni (példák két számjegyre kerekítésre: a 173,5-ből 170; 0,127-ből 0,13; 1,21-ből 1,2 lesz).

Olyan esetekben, amikor a koncentráció/hatás görbe meredeksége túl nagy ahhoz, hogy lehetővé váljon az EC_{50} kiszámítása, elegendő ezen érték grafikus becslése.

Ha két egymást követő koncentráció 2,2 arány mellett csak 0 és 100 %-os immobilizációt okoz, akkor e két érték elegendő azon tartomány jelzésére, amelybe az EC_{50} esik.

Ha megállapítható, hogy nem tartható fenn a vizsgált anyag stabilitása vagy homogenitása, ezt közölni kell a jelentésben, és körültekintően kell eljárni az eredmények értelmezésekor.

3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a vizsgált organizmusokkal kapcsolatos információkat (tudományos név, törzs, szállító, mindenféle előkezelés, tenyésztési módszer – forrást, fajtát és táplálékmennyiséget is beleértve, etetés gyakorisága),

– a hígítóvíz eredetét és fő kémiai jellemzőit (pH, keménység, hőmérséklet),

– alacsony vízoldékonyságú anyagok esetében a törzsoldat és vizsgált oldat elkészítésének módszerét,

– minden segédanyag koncentrációját,

– a használt koncentrációk jegyzékét és a vizsgált oldatban a vizsgált anyag koncentrációinál a stabilitással kapcsolatban rendelkezésre álló minden információt,

– kémiai elemzés esetén: a használt módszereket és a kapott eredményeket,

– a határérték-vizsgálat eredményeit, adott esetben,

– a vizsgáló berendezés leírását,

– a világítási rendszert,

– a vizsgált oldatok oldott oxigén koncentrációit, ph-értékeit és hőmérsékleteit, minden 24 órában,

– bizonyítékot arról, hogy teljesültek-e a minőségi követelmények,

– táblázatot, amely mutatja a kumulatív immobilizációt minden egyes koncentráció és kontroll esetében (és ha szükséges, a segédanyagot tartalmazó kontroll esetében is) minden egyes javasolt megfigyelési időpontban (24 és 48 óra),

– a koncentráció/hatás görbe grafikus ábrázolását a vizsgálat végén,

– ha lehetséges, az EC_{50}-értékeket minden egyes javasolt megfigyelési időpontban (95 %-os konfidencia határokkal),

– az EC_{50}-értékek meghatározására használt statisztikai eljárásokat,

– ha referenciaanyagot használnak, a kapott eredményeket,

– azt a legnagyobb vizsgált koncentrációt, amely még nem okoz pusztulást a vizsgálat időtartamában,

– azt a legalacsonyabb vizsgált koncentrációt, amely 100 %-os pusztulást okoz a vizsgálat időtartamában.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 202. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges és frissítések.

(2) International Standard ISO, Water Quality – Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341-1989

(3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera – crustacea) NFT 90 301 (January 1983)

(4) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(5) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (11)

(6) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(7) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose- effect experiments, J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1949, vol. 96, 99–113.

(8) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793–821.

(9) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying biossay results. Water Res., 1970, vol. 4. 3–32.

(10) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM, 1977, STP 634, 65–84.

(11) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

1. függelék

Művíz

Példa megfelelő hígítóvízre (az ISO 6341 szerint)

Minden kémiai anyagnak analitikai tisztaságúnak kell lennie.

A víznek jó minőségű, desztillált víznek vagy 5 μScm^{-1}-nél kisebb vezetőképességű, ioncserélt víznek kell lennie.

A víz desztillálásához használt készüléknek semmilyen rézből készült alkatrészt nem szabad tartalmaznia.

Törzsoldatok:

$CaCL_2$. $2H_2O$ (kalcium-klorid-dihidrát):	11,76 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	
$MgSO_4$. $7H_2O$ (magnéziumszulfát-heptahidrát):	4,93 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	
$NaHCO_3$ (nátrium-hidrogénkarbonát):	2,59 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	
KCl (káliumklorid):	0,23 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	

Hígításhoz használható művíz

A négy törzsoldat mindegyikéből 25 ml-t kell összekeverni, és vízzel 1 literre feltölteni.

A keveréket addig kell levegőztetni, amíg az oldott oxigén koncentrációja egyenlő nem lesz a levegőtelítettségi értékkel.

A pH-nak 7,8 ± 0,2-nek kell lennie.

Ha szükséges, a pH-t NaOH-val (nátrium-hidroxiddal) vagy HCl-val (sósavval) kell beállítani.

Az így elkészített hígítóvizet 12 óráig állni kell hagyni, és nem szabad tovább levegőztetni.

Ezen oldatban a Ca- és Mg-ionok összege 2,5 mmol/liter. A Ca:Mg ionok aránya 4:1 és az Na:K ionok aránya 10:1. Ezen oldat teljes lúgossága 0,8 mmol/liter.

A hígítóvíz elkészítésekor nem szabad megváltoztatni a víz összetételét vagy tulajdonságait.

2. függelék

Az 1978-ban végrehajtott (a 2. számú szakirodalomban is idézett) EGK-körvizsgálat eredményeinek összefoglalása.

Figyelem: E körvizsgálat célja a 24 órás EC_{50} meghatározása volt.

Felhasznált anyagok:

1) Káliumdikromát

2) Tetrapropil-benzol-szulfonsav

3) Tetrapropil-benzol-szulfonsav nátriumsója

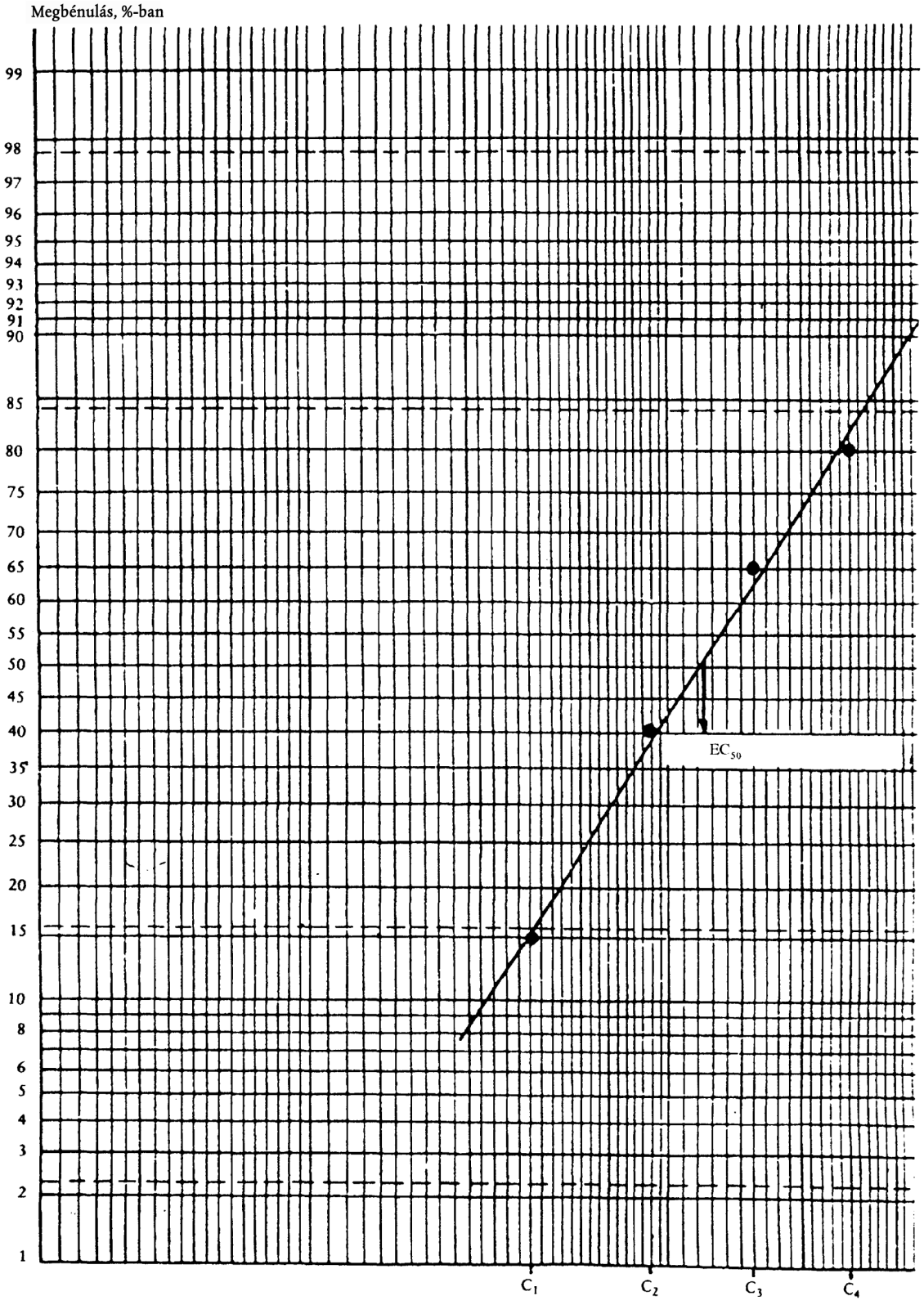
4) Triklór-2,4,5-fenoxi-ecetsav káliumsója

Anyag	Résztvevő laboratóriumok száma	Az eredmények száma a számításhoz	24 órás EC_{50} mg/l, átlagérték
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

3. függelék

Példa koncentrációra: immobilizációs görbe

Példa EC_{50} meghatározására log-probit papír segítségével



C.3. ALGASZANÖVEKEDÉS-GÁTLÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

A vizsgálat célja, hogy valamely anyagnak az egysejtű zöldalgafajok növekedésére gyakorolt hatását meghatározzuk. Viszonylag rövid idejű (72 órás) vizsgálatokkal is több nemzedéken keresztül figyelhetők meg a hatások. A módszer több, egysejtű algafajjal való használatra is adaptálható, ám ezen esetben az alkalmazott módszer leírását is mellékelni kell a vizsgálati jelentéshez.

A jelen módszer legkönnyebben vízben jól oldódó vizsgált anyagokra alkalmazható, amelyek a vizsgálati körülmények között nagy valószínűséggel vízben oldott állapotban maradnak.

A módszer olyan anyagokhoz használható, amelyek közvetlenül nem akadályozzák az alga növekedésének mérését.

Hasznosnak bizonyul, ha rendelkezésre állnak információk az anyag vízoldékonyságáról, gőznyomásáról, kémiai stabilitásáról, disszociációs állandóiról és biológiai lebonthatóságáról a vizsgálat megkezdése előtt.

Mind a vizsgálat tervezéséhez, mind az eredmények értelmezéséhez figyelembe kell venni további információkat is (ilyenek például a szerkezeti képlet, a tisztasági fok, szennyeződések jellege és százalékos aránya, adalékanyagok mennyisége, n-oktanol/víz megoszlási koefficiens).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Sejtsűrűség: sejtek száma milliliterenként;

Növekedés: a sejtsűrűség növekedése a vizsgálat időtartama alatt;

Növekedési sebesség: a sejtsűrűség növekedése egységnyi idő alatt;

EC_{50}: e módszerben azon vizsgált anyag koncentrációja, amely 50 %-os csökkenést eredményez a növekedésben (E_bC_{50}) vagy a növekedési rátában (E_rC_{50}) a kontrollhoz viszonyítva;

NOEC (megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció): e módszerben az a legnagyobb vizsgált koncentráció, amelynél jelentős növekedésgátlás nem figyelhető meg a kontrollhoz viszonyítva.

A vizsgált anyag minden koncentrációját tömeg/térfogat (milligramm/liter) mértékegységben kell megadni. E koncentrációk tömeg/tömeg ($mg.kg^{-1}$) mértékegységben is megadhatók.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Vizsgálható referenciaanyag annak bemutatására, hogy a laboratóriumi vizsgálati körülmények között nem változott-e meg jelentős mértékben a vizsgált fajok érzékenysége.

Ha használnak referenciaanyagot, meg kell adni az eredményeket a jelentésben. Káliumdikromát használható referenciaanyagként, de ennek színe hatással lehet a sejtekhez rendelkezésre álló fény minőségére és a fényerőre, valamint a spektrofotometriai meghatározásokra, ha használnak ilyeneket. Káliumdikromátot használtak egy nemzetközi, laboratóriumközi vizsgálatban (lásd a 3. szakirodalmat és a 2. függeléket).

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Végrehajtható határérték-vizsgálat 100 mg/liter koncentrációval annak bemutatására, hogy az EC_{50} nagyobb, mint e koncentráció.

A kiválasztott zöldalgafaj exponenciálisan növekvő sejtkultúráit több nemzedéken keresztül meghatározott körülmények között kezelik a vizsgált anyag különféle koncentrációival.

A vizsgált oldatokat 72 órás időtartamig kell inkubálni, amelynek során legalább minden 24 órában meg kell mérni a sejtsűrűséget minden egyes oldatban. A növekedésgátlást a kontrolltenyészethez viszonyítva kell meghatározni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A minőségi követelmények mind a határérték-vizsgálati, mind a teljes vizsgálati módszerre érvényesek.

A kontrolltenyészetekben a sejtsűrűségnek legalább 16-szorosára kell növekednie 3 napon belül.

A vizsgált anyag koncentrációit a kísérlet során mindvégig a kezdeti koncentráció 80 %-án belüli értéken kell tartani.

Az olyan anyagok esetében, amelyek stabil oldatokat képezve könnyen oldódnak a vizsgált közegben, tehát azok, amelyek jelentős mértékben nem fognak párologni, lebomlani, hidrolizálni vagy abszorbeálódni, a kezdeti koncentráció a névleges koncentrációval egyenlőnek tekinthető. Bizonyítani kell, hogy a koncentrációk a vizsgálat során mindvégig megmaradnak, és a minőségi követelmények teljesülnek.

Azon anyagok esetében, amelyek:

i. a vizsgált közegben kevéssé oldhatók; vagy

ii. stabil emulziók vagy diszperziók létrehozására képesek; vagy

iii. vizes oldatokban nem stabilak,

abból kell kiindulni, hogy a kezdeti koncentráció a vizsgálat kezdetén az oldatban mért koncentráció. A koncentrációt a kiegyenlítődési periódust követően kell meghatározni.

Ezen esetek közül mindegyikben további méréseket kell végrehajtani a vizsgálat során a tényleges expozíciós koncentrációk megerősítésére, vagy annak megerősítésére, hogy teljesülnek-e a minőségi követelmények.

Abból kell kiindulni, hogy jelentős mennyiségű vizsgált anyag épülhet be az algabiomasszába a vizsgálat időtartama során. Ezért a fenti minőségi követelménynek való megfelelőség bizonyítására figyelembe kell venni mind az algabiomasszába beépült anyagmennyiséget, mind az oldatba (vagy, ha ez technikailag nem lehetséges, a vízoszlopba) beépített anyagot. Azonban, mivel az algabiomasszába beépült anyag koncentrációjának meghatározása jelentős technikai problémákat vethet fel, a minőségi követelmények teljesítése bemutatható egy, a legnagyobb anyagkoncentrációjú, de alga nélküli vizsgálati tartály alkalmazásával és az oldatbeli (vagy, ha ez technikailag nem lehetséges, a vízoszlopban) koncentrációk mérésével a vizsgálati időtartam kezdetén és végén.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Reagensek**

1.6.1.1. *A vizsgált anyagok oldatai*

El kell készíteni a szükséges erősségű törzsoldatokat az anyagnak ioncserélt vízben vagy az 1.6.1.2. pontnak megfelelő vízben történő feloldásával.

A kiválasztott vizsgált koncentrációt az alga előtenyészetekhez alkalmas aliquot részek hozzáadásával kell elkészíteni (lásd az 1. függeléket). Az anyagokat általában csak az oldhatóság határáig kell vizsgálni. Néhány anyagnál (például olyan anyagok esetében, amelyeknek kicsi a vízoldékonysága, nagy a P_{ow} értéke vagy azok esetében, amelyek stabil diszperziót alkotnak, nem pedig valódi oldatot hoznak létre vízben) elfogadható az anyag oldhatósági határa fölötti vizsgált koncentráció használata a maximális oldható/stabil koncentráció elérésének biztosítására. Fontos azonban, hogy e koncentráció ne zavarja meg a vizsgált rendszert valamilyen más módon (például az anyagból a víz felszínén képződött, és a víz oxigénellátását akadályozó film révén).

Ultrahangos diszpergálás, szerves oldószerek, emulgeáló vagy diszpergáló szerek használhatók alacsony vízoldékonyságú anyagok törzsoldatai elkészítésének elősegítésére, vagy a vizsgált közegben az ilyen anyagok diszpergálódásának segítésére. Amikor ilyen segédanyagokat használnak, minden vizsgált koncentrációnak ugyanolyan mennyiségű segédanyagot kell tartalmaznia, és további kontrollokat kell kitenni a segédanyag ugyanolyan koncentrációja hatásának, mint amelyet a vizsgálati sorozatokban alkalmaznak. Minden ilyen segédanyag koncentrációját minimális értéken kell tartani, de semmi esetre sem szabad meghaladnia a 100 mg/liter értéket a vizsgált közegben.

A vizsgálatot a ph-érték beállítása nélkül kell végrehajtani. Ha létezik bizonyíték a ph-érték jelentős változására, ajánlatos a vizsgálat megismétlése a ph-érték beállításával, meg kell adni az így kapott eredményeket. Ezen esetben be kell állítani a törzsoldat ph-értékét a hígítóvíz ph-értékére, kivéve ha különleges okok szólnak ellene. E célra a legkedvezőbb a HCl és az NaOH használata. Ezt a pH beállítást úgy kell végrehajtani, hogy ne változzon meg jelentős mértékben a vizsgált anyag koncentrációja a törzsoldatban. Ha a beállítás a vizsgált vegyület valamilyen kémiai reakcióját vagy fizikai kicsapódását okozza, ezt közölni kell a jelentésben.

1.6.1.2. *Vizsgálati közeg*

A víznek jó minőségű desztillált víznek vagy 5 μS cm^{-1}-nél kisebb vezetőképességű, ioncserélt víznek kell lennie. A víz desztillálásához használt készüléknek semmilyen rézből készült alkatrészt nem szabad tartalmaznia.

A következő közeg ajánlott.

Négy törzsoldatot kell elkészíteni a következő táblázatnak megfelelően. A törzsoldatokat sterilizálni kell membránszűréssel vagy autoklávban, és sötétben, 4 °C hőmérsékleten kell tárolni. A 4. számú törzsoldatot csak membránszűréssel szabad sterilizálni. E törzsoldatokat hígítani kell a vizsgált oldatokbeli végleges tápanyag-koncentrációk elérése érdekében.

Tápanyag	Koncentráció a törzsoldatban		Végső koncentráció a vizsgált oldatban	
1. törzsoldat: makrótápanyagok				
NH_4Cl	1,5	g/l	15	mg/l
$MgCl_2.6H_2O$	1,2	g/l	12	mg/l
$CaCl_2.2H_2O$	1,8	g/l	18	mg/l
$MgSO_4.7H_2O$	1,5	g/l	15	mg/l
$KH_2\ PO_4$	0,16	g/l	1,6	mg/l
2. törzsoldat: Fe-EDTA				
$FeCl_3.6H_2$	80	mg/1	0,08	mg/l
$Na_2EDTA.2H_2O$	100	mg/l	0,1	mg/l
3. törzsoldat: nyomelemek				
H_3BO_3	185	mg/l	0,185	mg/l
$MnCl_2.4H_2O$	415	mg/l	0,415	mg/l
$ZnCl_2$	3	mg/l	3×10^{-3}	mg/l
$CoCl_2.6H_2O$	1,5	mg/l	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l
$CuCl_2.2H_2O$	0,01	mg/l	10^{-5}	mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$	7	mg/l	7×10^{-3}	mg/l
4. törzsoldat: $NaHCO_3$				
$NaHCO_3$	50	g/l	50	mg/l

A közeg pH-ja körülbelül 8 a levegőztetés után.

1.6.2. **Készülék**

– Szokásos laboratóriumi berendezés,

– Alkalmas űrtartalmú vizsgáló lombikok (körülbelül 250 ml-es kúpos lombikok alkalmasak, ha a vizsgált oldat térfogata 100 ml). Minden vizsgáló lombiknak azonosnak kell lenni az anyag és a méret tekintetében,

– Tenyésztő készülék: szekrény vagy kamra, amelyben 21 °C és 25 °C közötti hőmérséklet tartható fenn ± 2 °C eltéréssel, és folyamatos, egyenletes megvilágítás biztosított 400–700 nm spektrális tartományban. Ha a kontrolltenyészetekben lévő algák elérték a javasolt növekedési rátát, feltételezhető, hogy megfelelőek voltak a növekedés feltételei, a fény intenzitását is ideértve.

Az átlagos koncentrációjú oldatoknál ajánlott a 60 és 120 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (35 és 70 × 10^{18} $foton.m^{-2}.s^{-1}$) tartományban lévő fényerő használata, megfelelő receptor segítségével 400–700 nm tartományban mérve. Lux-ban kalibrált fénymérő műszerek esetében elfogadható egy ezzel egyenértékű, 6 000-től 10 000 lx-ig terjedő tartomány.

A fényerő az algatenyészettől 0,35 méteres távolságban elhelyezett négy–hét, 30 W-os, egyen- és váltakozó áramú, fehér (körülbelül 4 300 K színhőmérsékletű) fénycső segítségével érhető el.

– A sejtsűrűség-méréseket az élő sejtek számára kifejlesztett, közvetlen számolási eljárásokkal, például mikroszkópos számlálókamra, kell végrehajtani. Használhatók más eljárások is (fotometria, turbidimetria stb.), ha azok elegendően érzékenyek, és bizonyítottan kielégítően korrelálnak a sejtsűrűséggel.

1.6.3. **Kísérleti organizmusok**

Ajánlatos, hogy a vizsgálathoz használt zöldalgafajták könnyen tenyészthető és vizsgálható, gyorsan szaporodó fajták legyenek. A következők az előnyben részesített fajták:

– *Selenastrum capricornutum,* például ATCC 22662 vagy CCAP 278/4,

– *Scenedesmus subspicatus,* például 86.81 SAG.

Megjegyzés:

ATCC = American Type Culture Collection (U.S.A.)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (U.K.)

SAG = Collection of algal culture (Göttingen, F.R.G.)

Ha más fajtákat használnak, meg kell adni a törzset.

1.6.4. **A kísérlet végrehajtása**

Az előzetes vizsgálatok eredményei alapján kell meghatározni azt a koncentráció-tartományt, amelyben a hatások valószínűleg bekövetkeznek.

A két növekedési paraméter (biomassza és növekedési ráta) a növekedésgátlás nagymértékben eltérő értékeit eredményezheti; az előzetes vizsgálatban mindkettőt használni kell annak biztosítására, hogy a koncentrációk mértani sorozata lehetővé tegye mind az E_bC_{50}, mind az E_rC_{50} megállapítását.

Kezdeti sejtsűrűség

Ajánlatos, hogy körülbelül 10^4 sejt/ml legyen a vizsgált tenyészetekben a kezdeti sejtsűrűség *Selenastrum capricornutum* és *Scenedesmus subspicatus* esetében. Amikor más fajtákat használnak, a biomasszának hasonlónak kell lennie.

A vizsgált anyag koncentrációi

A vizsgálathoz legalább 5 koncentrációt kell mértani sorba állítani, 2,2-t nem meghaladó koncentráció arányban. A vizsgált legalacsonyabb koncentrációnak nem szabad megfigyelt hatással lennie az alga növekedésére. A vizsgált legnagyobb koncentrációnak a kontrollhoz viszonyítva legalább 50 %-kal kell gátolnia, és lehetőleg teljesen meg kell gátolnia a növekedést.

Ismétlések és kontrollok

A vizsgálat tervének három ismétlést kell tartalmaznia minden egyes vizsgált koncentrációnál. Három kontrollt kell vizsgálni a vizsgált anyag nélkül, és ha van ilyen, három, a segédanyagot tartalmazó kontrollt is kell vizsgálni. Ha indokolt, a vizsgálati terv megváltoztatható a koncentrációk számának növelésével és a koncentrációnkénti ismétlések számának csökkentésével.

A vizsgálat végrehajtása

El kell készíteni a vizsgált anyagot a kívánt koncentrációkban, valamint a kívánt mennyiségű algaoltóanyagot tartalmazó vizsgált tenyészeteket a vizsgált anyag törzsoldatai aliquot részeinek hozzáadásával az alkalmas mennyiségű alga előtenyészetekhez (lásd az 1. függeléket).

Fel kell rázni a lombikokat, és el kell helyezni azokat a tenyésztőkészülékbe. Az algasejteket szuszpenzióban kell tartani rázással, keveréssel vagy levegőztetéssel a gázcsere javítására és a pH-változás csökkentésére. A tenyészeteket 21 és 25 °C közötti hőmérséklet-tartományban kell tartani ± 2 °C eltérésen belül szabályozva.

Minden egyes lombikban, a vizsgálat kezdete után legalább a 24., 48. és 72. órában, meg kell határozni a sejtsűrűséget. A vizsgált anyag megfelelő koncentrációját tartalmazó szűrt algatáptalajt kell használni a háttér meghatározására, amikor közvetlen számlálási módszerektől eltérő sejtsűrűségméréseket használnak.

A pH-t a vizsgálat kezdetén és a 72. órában kell mérni.

A kontrollok pH-jának általában nem szabad 1,5 egységnél nagyobb mértékben eltérnie a vizsgálat során.

Illékony anyagok vizsgálata

A mai napig nem létezik általánosan elfogadott módszer az illékony anyagok vizsgálatára. Amikor valamilyen anyagról ismert, hogy hajlamos az elpárolgásra, megnövelt felső szabadterű, zárt vizsgálólombikok használhatók. A zárt lombikok felső szabad terének kiszámításakor figyelembe kell venni a CO_2-hiány kialakulásának lehetőségét. E módszer megváltoztatásához már léteznek javaslatok (lásd a szakirodalom 4. pontját).

Meg kell kísérelni az oldatban maradó anyagmennyiség meghatározását; rendkívüli óvatosság ajánlatos a zárt rendszerek segítségével illékony kémiai anyagokkal végrehajtott vizsgálatok eredményeinek értelmezésekor.

Határérték-vizsgálat

Az e módszerben leírt eljárások segítségével végrehajtható a határérték-vizsgálat 100 mg/l koncentrációval annak bemutatására, hogy az EC_{50} nagyobb, mint e koncentráció.

Ha az anyag olyan természetű, hogy nem érhető el a vizsgált vízben a 100 mg/l-es koncentráció, a határérték-vizsgálatot a használt közegben az anyag oldhatóságával egyenlő koncentrációval (vagy a stabil diszperziót alkotó maximális koncentrációval) kell végrehajtani (lásd még az 1.6.1.1. pontot is).

A határérték-vizsgálatot legalább háromszor kell végrehajtani, azonos számú kontrollokkal. A két növekedési paramétert (biomassza és növekedési ráta) kell felhasználni a határérték-vizsgálathoz.

Ha valamely határérték-vizsgálatban 25 %-os vagy ennél nagyobb közepes csökkenést állapítanak meg a biomasszában vagy a növekedési rátában a határérték-vizsgálat és a kontroll között, a teljes vizsgálatot végre kell hajtani.

2. ADATOK ÉS KIÉRTÉKELÉS

Táblázatban kell összefoglalni a vizsgált tenyészetekben és kontrollokban mért sejtsűrűséget a vizsgált anyag koncentrációival és a mérések időpontjaival együtt. A növekedési görbék létrehozásához fel kell vinni az idő (0–72 h) függvényében az egyes vizsgáltanyag-koncentrációkhoz és a kontrollokhoz megállapított sejtsűrűség átlagértékét.

A koncentráció/hatás összefüggés meghatározására a következő két megközelítést kell használni. Néhány anyag alacsony koncentrációkban stimulálhatja a növekedést. Csak a 0 és 100 % közötti növekedésgátlást jelző adatokat kell figyelembe venni.

2.1. A NÖVEKEDÉSI GÖRBÉK ALATTI TERÜLETEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

A növekedési görbék és az $N = N_0$ vízszintes vonal közötti terület a következő képletnek megfelelően számítható ki:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \ldots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

ahol

A = terület,

N_0 = sejtek száma/ml a t_0 időpontban (a vizsgálat kezdetén),

N_1 = mért sejtszám/ml a t_1 időpontban,

N_n = mért sejtszám/ml a t_n időpontban,

t_1 = az első mérés ideje a vizsgálat kezdete után,

t_n = az n-edik mérés ideje a vizsgálat kezdete után,

n = a vizsgálat kezdete után végrehajtott mérések száma.

Az egyes vizsgáltanyag-koncentrációk mellett a növekedésgátlás százalékos arányát (I_A) a következő képletnek megfelelően lehet kiszámítani:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

ahol

A_c = a kontroll növekedési görbe és az $N=N_0$ vízszintes vonal közötti terület,

A_t = a t koncentráció melletti növekedési görbe és az $N=N_0$ vízszintes vonal közötti terület.

Az I_A értékeket a megfelelő koncentrációk függvényében fel kell vinni egy féllogaritmusos vagy féllogaritmusos probit papírra. Ha probit papírra vittük fel a pontokat, azokra egyenes vonalat kell illeszteni szemmel vagy számított regresszió alapján.

A regressziós egyenesből kell megbecsülni az EC_{50}-et egy, az 50 %-os gátlással (I_A = 50 %) egyenértékű koncentráció leolvasásával. Ahhoz, hogy ezen érték egyértelműen legyen jelezve ezen számítási módszerrel összefüggésben, ajánlatos az E_bC_{50}-szimbólum használata. Lényeges, hogy az E_bC_{50}-et a megfelelő expozíciós időtartammal együtt adják meg, például E_bC_{50}(0–72 h).

2.2. NÖVEKEDÉSI RÁTÁK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Az exponenciálisan növekedő tenyészetek átlagos, specifikus növekedési rátája (μ) a következőképpen számítható ki:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

ahol t_0 a vizsgálat kezdete.

Az átlagos specifikus növekedési ráta az idő függvényében felvitt ln N görbén a regressziós egyenes meredekségéből határozható meg.

A specifikus növekedési ráta egyes vizsgáltanyag-koncentrációk melletti százalékos gátlását (Iμt) a következő képlet segítségével kell kiszámítani:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

ahol

μ_c = a kontroll átlagos specifikus növekedési rátája

μ_t = a t vizsgált koncentrációhoz tartozó átlagos specifikus növekedési ráta

Fel kell vinni az átlagos specifikus növekedési ráta minden egyes vizsgált anyagkoncentráció melletti százalékos csökkenését a kontrollértékkel összehasonlítva a koncentráció logaritmusának függvényében. Az így kapott görbéből leolvasható az EC_{50}. Az e módszerrel megállapított EC_{50} félreérthetetlen jelölésére ajánlatos az E_rC_{50} szimbólum használata. A mérési időket jelezni kell, például, ha az érték 0 és 72 órás időkre vonatkozik, a szimbólum a következő: E_rC_{50}(0–72 h).

Megjegyzés: A specifikus növekedési ráta logaritmikus mennyiség, és a növekedési ráta kismértékű változásai nagy változásokhoz vezethetnek a biomasszában. Ebből következően az E_bC- és E_rC-értékek számszerűen nem hasonlíthatók össze.

2.3. A NOEC KISZÁMÍTÁSA

A megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt („no observed effect concentration" = NOEC) több minta összehasonlítására szolgáló alkalmas statisztikai eljárással (például varianciaanalízis és Dunnett-próba) kell meghatározni az A. növekedési görbék melletti területek egyes ismétlődő értékeinek (lásd a 2.1. pontot) vagy a μ specifikus növekedési ráták (lásd a 2.2. pontot) segítségével.

3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– vizsgált anyag: kémiai azonosító adatok,

– vizsgált organizmusok: eredet, laboratóriumi tenyészet, törzsszám, tenyésztés módszere,

– vizsgálati körülmények:

  – a vizsgálat kezdetének és befejezésének időpontja és időtartama,

  – hőmérséklet,

  – tápoldat összetétele,

  – a tenyésztéshez használt készülékek,

  – az oldatok pH-ja a vizsgálat kezdetén és végén (magyarázatot kell adni, ha 1,5 egységnél nagyobb pH-eltérés figyelhető meg),

  – a vizsgált anyag oldhatóvá tételére használt segédanyag és módszer, valamint a segédanyag koncentrációja a vizsgált oldatokban,

  – a fény intenzitása és minősége,

  – vizsgált koncentrációk (mért és névleges),

– eredmények:

  – sejtsűrűség minden lombik esetében, minden egyes mérési pontban és a sejtsűrűség mérési módszere,

  – átlagos sejtsűrűség,

  – növekedési görbék,

  – koncentráció-hatás összefüggés grafikus ábrázolása,

  – EC-értékek és a számítás módszere,

  – NOEC,

  – egyéb megfigyelt hatások.

4. SZAKIRODALOM

(1) OECD, Párizs, 1981, 201. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges.

(2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*", in: Rufolf/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

(3) ISO 8692 – Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.

4) S.Galassi and M.Vighi – Chemosphere, 1981, vol.10, 1123–1126.

1. függelék

Példa algatenyésztési eljárásra

Általános megfigyelések

Az alábbiakban ismertetett eljárások alapján végzett tenyésztés célja a toxicitásvizsgálatokhoz használható algatenyészetek létrehozása.

Olyan alkalmas módszereket kell használni, amelyekkel megelőzhető az algatenyészet baktériumos fertőződése (ISO 4833). Axenikus kultúrák kívánatosak lehetnek, az azonban mindenképpen létfontosságú, hogy csak egyféle algasejt legyen jelen.

Minden műveletet steril körülmények között kell végezni az egyéb algasejtekkel vagy baktériumokkal való szennyeződés elkerülése érdekében. Szennyezett tenyészeteket nem szabad alkalmazni.

Az algakultúrák kialakításának eljárásai

Tápoldat elkészítésének módja:

A tápoldat koncentrált törzsoldatok hígításával készíthető el. A szilárd táptalajhoz hozzá kell adni az agar 0,8 %-át. A használt tápoldatnak sterilnek kell lennie. Az autoklávban történő sterilizálás NH_3 veszteséghez vezethet.

Törzstenyészet:

A törzstenyészetek kis algatenyészetek, amelyeket rendszeresen friss táptalajba kell oltani azért, hogy kezdeti vizsgált anyagként szolgáljanak. Ha nem használnak rendszeresen tenyészeteket, akkor azokat ferde agarra kell széleszteni. E tenyészeteket minden két hónapban legalább egyszer friss médiumba kell oltani.

A törzstenyészeteket a megfelelő tápoldatot tartalmazó kúpos lombikokban (körülbelül 100 ml-es űrtartalmú) kell szaporítani. Amikor az algákat 20 °C hőmérsékleten inkubálják folyamatos megvilágítás mellett, hetenkénti átoltás szükséges.

Az átoltás során bizonyos mennyiségű „régi" tenyészetet kell átvinni steril pipettákkal egy friss tápfolyadékot tartalmazó lombikba úgy, hogy a gyorsan növekvő fajták esetében a kezdeti koncentráció körülbelül a régi tenyészetnek a századrésze legyen.

Valamely fajta növekedési rátája a növekedési görbe segítségével határozható meg. Ha ez ismert, meghatározható az a sűrűség, amelynek elérésekor a tenyészetet át kell oltani. Ezt azelőtt kell végrehajtani, mielőtt a tenyészet eléri az elpusztulási fázist.

Előtenyészet:

Az előtenyészetnek megfelelő mennyiségű algát kell termelnie, amiket a vizsgált kultúráknál inokulumként lehet alkalmazni. Az előtenyészetet a vizsgálati körülmények között inkubálni kell, és általában akkor kell használni azokat, amikor még exponenciálisan növekednek, tehát körülbelül háromnapos inkubálási időtartam után. Azon algatenyészeteket, amelyek deformálódott vagy abnormális sejteket tartalmaznak, ki kell dobni.

2. függelék

Az ISO 8692 – Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum* a káliumdikromátot vizsgáló, 16 laboratóriumközi vizsgálat következő eredményeiről számol be:

	Átlagértékek (mg/l)	Tartomány (mg/l)
E_rC_{50} (0–72 h	0,84	0,60-tól 1,03-ig
E_bC_{50} (0–72 h)	0,53	0,20-tól 0,75-ig

C.4. A „GYORS" BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG MEGHATÁROZÁSA

I. RÉSZ ÁLTALÁNOS

I.1. BEVEZETÉS

Ez a leírás hat vizsgálati módszert ismertet, amelyek lehetővé teszik a kémiai anyagok szűrését a biológiailag könnyen végbemenő lebonthatóság szempontjából, valamely aerob vizes közegben.

a) Oldott szerves szén („Dissolved Organic Carbon" = DOC) csökkenés (C.4-A. módszer)

b) Módosított OECD vizsgálat – DOC-csökkenés (C.4-B. módszer)

c) Szén-dioxid-fejlődés vizsgálat (CO_2) (módosított Sturm-féle vizsgálat) (C.4.-C. módszer)

d) Manometrikus respirometria (C.4-D. módszer)

e) Zárt palack (C.4-E. módszer)

f) MITI (Ministry of International Trade and Industry – Japán) (C.4-F. módszer).

A módszer leírásának I. része ismerteti mind a hat vizsgálathoz tartozó általános és közös tételeket és megjegyzéseket. Az egyes módszerekre sajátosan jellemző tételek a II–VII. részben találhatók. A mellékletek fogalommeghatározásokat, képleteket és iránymutató anyagokat tartalmaznak.

Egy 1988-ban, az OECD-országok laboratóriumaiban végrehajtott körvizsgálat azt mutatta, hogy a módszerek egymással egyező eredményeket adnak. Azonban a vizsgált anyag fizikai jellemzőitől függően a módszerek közül az egyik vagy a másik előnyben részesíthető.

I.2. A MEGFELELŐ MÓDSZER KIVÁLASZTÁSA

A legmegfelelőbb módszer kiválasztásához lényegesek a kémiai anyag oldhatóságára, gőznyomására és adszorpciós jellemzőire vonatkozó információk. Rendszerint ismerni kell a kémiai szerkezetet vagy a képletet a paraméterek, mint például a ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (lásd az I. és II. mellékletet) elméleti értékeinek kiszámítására és/vagy mért értékeinek ellenőrzésére.

Azon vizsgált anyagok, amelyek vízben legalább 100 mg/l mértékben oldhatók, a fenti módszerek közül bármelyikkel kiértékelhetők, feltéve hogy nem illékonyak és nem adszorbeálódnak. Az 1. táblázat tartalmazza a megfelelő módszereket azon kémiai anyagokhoz, amelyek vízben gyengén oldhatók, illékonyak vagy adszorbeálódnak. A III. melléklet írja le azt a módot, ahogyan a vízben gyengén oldható és illékony anyagok kezelhetők. Mérsékelten illékony kémiai anyagok a DOC-csökkenés módszerrel vizsgálhatók, ha elegendő gáztér van a vizsgálati tartályokban (amelyeket megfelelően le kell zárni). Ezen esetben abiotikus kontrollt kell alkalmazni minden lehetséges fizikai veszteség figyelembevételére.

1. táblázat: A vizsgálati módszerek alkalmazhatósága

Vizsgálat	Analitikai módszer	Alkalmas olyan anyagokhoz, amelyek:		
		rosszul oldódnak	illékonyak	adszorbeálódnak
DOC-csökkenés	Oldott szerves szén	–	–	+/–
Módosított OECD-vizsgálat	Oldott szerves szén	–	–	+/–
CO_2 fejlődés vizsgálat	Respirometria: CO_2-fejlődés	+	–	+
Manometrikus respirometria	Manometrikus respirometria: oxigénfogyasztás	+	+/–	+
Zárt palack	Respirometria: oldott oxigén	+/–	+	+
MITI-vizsgálat	Respirometria: oxigénfogyasztás	+	+/–	+

A kapott eredmények értelmezéséhez szükség van a vizsgált anyag tisztaságára vagy relatív arányaira vonatkozó információkra, különösen kismértékű lebonthatóság vagy szélsőséges eredmények esetén.

Nagyon hasznosnak bizonyulhatnak a vizsgált anyag baktériummal szembeni toxicitására vonatkozó információk (IV. melléklet), ezek lényegesek lehetnek az alacsony biológiai lebomlási értékek megfelelő értelmezéséhez.

I.3. REFERENCIAANYAGOK

Az eljárás ellenőrzéséhez a normál vizsgálatsorozattal egyidejűleg megfelelő lombik segítségével olyan referenciaanyagokat kell megvizsgálni, amelyek kielégítik a biológiailag gyors lebonthatóság kritériumait.

Alkalmas kémiai anyagok az anilin (frissen desztillált), a nátrium-acetát és a nátrium-benzoát. E referenciaanyagok közül mindegyik lebomlik ezen módszerekben, még akkor is, ha szándékosan nem történt inokulum hozzáadás.

Javasolt olyan referenciaanyagot keresni, amely biológiailag gyorsan lebontható, de amelyhez szükség van valamilyen inokulum hozzáadására. A kálium-hidrogén-ftalátot javasolták, de további bizonyítékot kell beszerezni, mielőtt ezt elfogadnánk referenciaanyagként.

A respirometriás vizsgálatokban a nitrogéntartalmú vegyületek a nitrifikáció miatt hatással lehetnek az oxigénfelvételre (lásd a II. és V. mellékletet).

I.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot ásványianyag-tápoldatban fel kell oldani vagy szuszpendálni, és aerob állapotok mellett, sötétben vagy diffúz fényben be kell oltani és inkubálni. A vizsgált oldatban az oltóanyagnak tulajdonítható DOC mennyiségét a vizsgált anyagnak tulajdonítható DOC-mennyiséggel összehasonlítva a lehető legalacsonyabban kell tartani. Figyelembe kell venni az inokulum endogén aktivitását egyidejűleg végzett vakpróbák segítségével, amelyek esetében az oldat csak inokulumot tartalmaz, de vizsgált anyagot nem, jóllehet, az anyag jelenlétében a sejtek endogén aktivitása nem fog pontosan megegyezni az endogén kontrollban jelentkező aktivitással. Egyidejűleg vizsgálni kell valamely referenciaanyagot az eljárások működésének ellenőrzésére.

Általában a lebomlást az olyan paraméterek meghatározása követi, mint például a DOC, a CO_2-képződés és az oxigénfelvétel, és elegendően gyakori időközönként méréseket kell végrehajtani a biológiai lebomlás kezdete és vége megállapításának lehetővé tételére. Automata respirométer alkalmazása esetén a mérés folyamatos. Más paramétereken kívül esetenként a DOC-ot is mérni kell, de ezt a mérést rendszerint csak a vizsgálat kezdetén és végén kell elvégezni. Specifikus kémiai elemzés is használható a vizsgált anyag elsődleges lebomlásának kiértékelésére és a képződött valamennyi közbenső anyag koncentrációjának meghatározására (kötelező a MITI-vizsgálatban).

A vizsgálat általában 28 napig tart. Azonban a vizsgálat befejezhető a 28. nap előtt, ha a biodegradációs görbe elért egy platót legalább három meghatározás során. A vizsgálatok 28 napon túlra is meghosszabbíthatók, amikor a biodegradációs görbe azt mutatja, hogy a biológiai lebomlás elkezdődött, de a plató (a vízszintes szakasz) elérése a 28. napig nem történt meg.

I.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

I.5.1. **Reprodukálhatóság**

A biológiai lebomlás természete és az inokulumként használt baktériumpopulációk sokfélesége miatt a meghatározásokat legalább kétszer kell végrehajtani.

Általános tapasztalat, hogy minél nagyobb a vizsgált oldószerhez kezdetben hozzáadott mikroorganizmusok koncentrációja, annál kisebb lesz az ismétlések közötti eltérés (szórás). A körvizsgálatok azt is bemutatták, hogy nagy eltérések lehetnek a különböző laboratóriumok által nyert eredmények között, de általában megegyezés tapasztalható a biológiailag könnyen lebontható vegyületeknél.

I.5.2. **A vizsgálat érvényessége**

A vizsgálat akkor tekinthető érvényesnek, ha a vizsgálat végén vagy a „tíznapos ablak" végén, az adott esettől függően, a platónál a vizsgált kémiai anyag eltávolításakor a vizsgálat megismétlésével kapott értékek szélső értékeinek különbsége kisebb, mint 20 %, és ha a referenciaanyag százalékos lebomlása 14 nap alatt elérte a könnyű biológiai lebonthatóság szintjét. Ha ezek közül a feltételek közül valamelyik nem teljesül, meg kell ismételni a vizsgálatot. A módszerek szigorúsága miatt az alacsony értékek nem jelentik szükségképpen azt, hogy a vizsgált anyag biológiailag nem lebontható a környezeti feltételek mellett, hanem azt jelzi, hogy további vizsgálatokra lesz szükség a biológiai lebonthatóság meghatározására.

Ha valamely toxicitási vizsgálatban, amely mind a vizsgált anyagot, mind a referenciaanyagot tartalmazza, 35 %-nál kisebb lebomlás (a DOC alapján) vagy 25 %-nál kisebb lebomlás (a ThOD vagy $ThCO_2$ alapján) történt 14 nap alatt, a vizsgált kémiai anyagról feltételezhető, hogy annak gátló hatásai vannak (lásd a IV. mellékletet is). A vizsgálatsorozatot meg kell ismételni, ha lehetséges, a vizsgált kémiai anyag kisebb koncentrációja és/vagy az inokulum nagyobb koncentrációja, de 30 mg szilárd anyag/liternél nem nagyobb koncentráció használatával.

I.6. ÁLTALÁNOS ELJÁRÁSOK ÉS ELŐKÉSZÜLETEK

A 2. táblázat foglalja össze a vizsgálatokra érvényes általános körülményeket. A kifejezetten az egyes vizsgálatokhoz tartozó készülékek és egyéb kísérleti körülmények leírása később, az adott vizsgálathoz tartozó címszó alatt olvasható.

2. táblázat: Vizsgálati körülmények

Vizsgálat	DOC-csökkenés	CO_2-fejlődés	Manometrikus respirometria	Módosított OECD-vizsgálat	Zárt palack	MITI (1)
A vizsgált anyag koncentrációja mg/l 10–40 mg ThOD/l	10–20	10–40	100 50–100	100	2–10 5–10	mg DOC/l
Az inokulum koncentrációja (sejt/l, megközelítő érték)	≤ 30 mg/l SS vagy ≤ 100 ml kifolyó szennyvíz/liter (10^7 – 10^8)			0,5 ml másodlagos szennyvíz/l (10^5)	≤ 5 ml kifolyó szennyvíz/l (10^4 – 10^6)	30 mg/l SS (10^7 – 10^8)
Elemek koncentrációja ásványi oldószerben (mg/l-ben)						
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					Lehetőleg 7,0
Hőmérséklet	22 ± 2 °C					25 + 1 °C

DOC = „Dissolved Organic Carbon" (oldott szerves szén) ThOD = „Theoretical Oxygen Demand" (elméleti oxigénigény) SS = „Suspended Solids" (szuszpendált szilárd anyagok)

I.6.1. **Hígítóvíz**

Toxikus anyagok (például Cu^{++} ionok) gátló hatással járó koncentrációitól mentes ioncserélt vagy desztillált vizet kell használni. E víznek nem szabad a vizsgált anyag által bevitt szerves széntartalom 10 %-ánál többet tartalmaznia. A vizsgált víz nagy tisztaságára a nagy vakpróbaértékek kiküszöböléséhez van szükség. A szennyeződés származhat a saját szennyeződésekből, valamint az ioncserélő műgyantákból és a baktériumból vagy algából származó roncsolt anyagból is. Minden egyes vizsgálatsorozathoz csak egyetlen adag vizet kell használni, amelyet előzőleg DOC-elemzéssel kell ellenőrizni. Ilyen ellenőrzésre nincs szükség a zárt palack vizsgálathoz, de a víz oxigénfogyasztásának alacsonynak kell lennie.

I.6.2. **Az ásványianyag-tápoldat törzsoldatai**

A vizsgált oldatok elkészítéséhez megfelelő koncentrációjú ásványianyag-tápoldatokat tartalmazó törzsoldatokat kell készíteni. A következő törzsoldatok használhatók (különböző hígítási arányokkal) a DOC-csökkenés, a módosított OECD, a CO_2-fejlődési, a manometrikus respirometriás és a zártpalackos vizsgálati módszerekhez. A hígítási arányok és a MITI-vizsgálat során alkalmazandó ásványianyag-tápoldat elkészítése az adott vizsgálatok leírásában olvasható.

Törzsoldatok: A következő törzsoldatokat kell elkészíteni analitikai tisztaságú reagensek segítségével.

a)	Kálium-dihidrogén-foszfát, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikálium-hidrogén-foszfát, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát, $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$	33,40 g
	Ammónium-klorid, NH_4Cl	0,50 g
	Ezen anyagokat fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre. Az oldat pH-jának 7,4-nek kell lennie.	
b)	Kalcium-klorid, vízmentes, $CaCl_2$	27,50 g
	vagy kalcium-klorid-dihidrát, $CaCl_2 . 2 H_2O$	36,40 g
	Ezen anyagokat fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre.	
c)	Magnézium-szulfát-heptahidrát, $MgSO_4 . 7 H_2O$	22,50 g
	Ezt az anyagot fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre.	
d)	Vas(III)-klorid-hexahidrát, $FeCl_3 . 6 H_2O$	0,25 g
	Ezt az anyagot fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre.	

Megjegyzés: azért, hogy ne kelljen közvetlenül a használat előtt előkészíteni ezen oldatot, hozzá kell adni literenként egy csepp tömény HCl-t vagy 0,4 gramm etilén-diamin-tetra-ecetsav-dinátrium sót (EDTA).

I.6.3. **Kémiai anyagok törzsoldatai**

Ha az oldhatóság túllépi az 1 g/litert, akkor fel kell oldani szükség szerint 1–10 gramm vizsgált vagy referenciaanyagot ioncserélt vízben, és ezt ki kell egészíteni 1 literre. Egyébként a törzsoldatokat ásványianyag-tápoldatban kell elkészíteni, vagy közvetlenül az ásványianyag-tápoldathoz kell hozzáadni a vizsgált anyagot. A kevésbé oldható kémiai anyagok kezelésének módját a III. melléklet tartalmazza, de a MITI-vizsgálat (C.4-F. módszer) esetében sem oldószereket, sem pedig emulgálószereket nem kell használni.

I.6.4. **Inokulum**

Az inokulum különféle forrásokból származhat: lehet eleveniszap, szennyvíztisztítóból kifolyt víz (nem klórozott), felszíni víz és talaj, vagy ezek vegyesen. A DOC-csökkenés, a CO_2-fejlődés és a manometrikus respirometriás vizsgálatok esetében, ha eleveniszapot használnak, azt döntően háztartási szennyvizet befogadó szennyvíztisztító telepből vagy egységből kell venni. Más forrásokból származó inokulumokkal kapcsolatban bebizonyosodott, hogy ezek az eredmények nagyobb szórását adják. A módosított OECD- és a zártpalack- vizsgálat esetében több hígított inokulumra van szükség, iszappehely nélkül, és az előnyben részesített forrás a háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telepből vagy egységből származó szennyvíz. A MITI-vizsgálathoz az inokulum több forrásból származik, ezek ismertetése e vizsgálat leírásában olvasható.

I.6.4.1. *Eleveniszapból származó inokulum*

Az eleveniszap-mintát frissen kell összegyűjteni valamely, döntő részben háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység levegőztető tartályából. Ha szükséges, el kell távolítani a durva részecskéket azáltal, hogy finom szűrőn keresztül szűrik át a vizsgált mintát, ezután aerob módon kell tárolni az iszapot.

Másik szóba jöhető megoldás: a durva részecskék eltávolítása után az iszapot ülepíteni vagy centrifugálni kell (például 1 100 g mellett 10 percen át). A felülúszó folyadékot el kell távolítani. Az iszap mosható ásványianyag-tápoldatban. A koncentrált iszapot az ásványianyag-tápoldatban kell szuszpendáltatni, a 3–5 gramm szuszpendált szilárd anyag/liter koncentráció elérése érdekében, majd levegőztetni kell, amíg szükséges.

Az iszapot megfelelően működő hagyományos üzemből kell venni. Ha az iszapot nagysebességű szennyvíztisztító telepről kell begyűjteni, vagy az vélhetően tartalmaz gátlószereket, mosni kell az iszapot. Alapos keverés után le kell ülepíteni vagy centrifugálni kell az újraszuszpendált iszapot, el kell távolítani a felülúszó folyadékot, és újra kell szuszpendáltatni a mosott iszapot további ásványianyag-tápoldatban. Ezt az eljárást addig kell ismételni, amíg az iszap többlet szubsztráttól vagy gátlószertől mentesnek nem tekinthető.

A teljes újraszuszpendálódás elérése után, vagy nem kezelt iszap esetében közvetlenül a használat előtt kell mintát venni a szuszpendált szilárd részecskék száraz tömegének meghatározására.

További alternatíva az eleveniszap homogenizálása (3–5 gramm szuszpendált szilárd anyag/liter). Az iszapot mechanikus keverőgépben 2 percen át közepes fordulatszámmal kell keverni. Le kell ülepíteni a megkevert iszapot 30 percig, vagy ha szükséges, hosszabb ideig, és le kell szűrni a folyadékot 10 ml/l ásványianyag-tápoldatot tartalmazó inokulumként való használatra.

I.6.4.2. *Egyéb inokulumforrások*

E források döntően háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység másodlagos kezelt szennyvízéből származhatnak. Friss mintákat kell gyűjteni, és azokat levegővel érintkezve tartani a szállítás során. A mintákat 1 órán át kell ülepedni hagyni, vagy durva szűrőpapíron át kell szűrni, a leszűrt kezelt szennyvizet vagy filtrátumot levegővel érintkezve kell tartani. Ásványianyag-tápoldat literenként legfeljebb 100 ml ilyen típusú inokulum használható.

További inokulum forrás a felszíni víz. Ebben az esetben megfelelő felszíni vízmintát kell begyűjteni, például folyóból, tóból, és a felhasználásig levegővel érintkezve kell tartani. Ha szükséges, az inokulumot szűréssel vagy centrifugálással lehet sűríteni.

I.6.5. **Az inokulum előkondícionálása**

Az inokulum előkondícionálható a kísérleti körülményekhez, de nem adaptálható előre a vizsgált anyaghoz. Az előkondícionálás az eleveniszapnak ásványianyag-tápoldatban vagy másodlagos szennyvízben 5–7 napon keresztüli, a vizsgálati hőmérsékleten végrehajtott levegőztetéséből áll. Az előkondícionálás esetenként javítja a vizsgálati módszerek pontosságát a vakpróba értékek csökkentésével. Szükségtelennek tekinthető a MITI-inokulum előkondícionálása.

I.6.6. **Abiotikus kontrollok**

Amikor szükséges, ellenőrizni kell a vizsgált anyag esetleges abiotikus lebomlását inokulumot nem tartalmazó, steril kontrollokban a DOC-csökkenés, oxigénfelvétel vagy szén-dioxid-fejlődés meghatározásával. A sterilizáció membránszűrés útján (0,2–0,45 mikrométer) vagy megfelelő koncentrációjú, alkalmas toxikus anyag hozzáadásával történik. Ha membránszűrést alkalmaznak, aszeptikusan kell mintákat venni a steril körülmények megőrzése érdekében. Ha előzőleg még nem zártuk ki a vizsgált anyag adszorpcióját, akkor azon vizsgálatoknak, amelyek a DOC csökkenéseként mérik a biológiai lebomlást, különösen eleveniszap inokulummal, tartalmazniuk kell beoltott és toxikus anyagot tartalmazó abiotikus kontrollt.

I.6.7. **A lombikok száma**

Az egyes vizsgálatsorozatokban használandó lombikok számát az egyes vizsgálatok leírásai ismertetik.

A következő típusú lombikokat kell használni:

Vizsgált szuszpenzió: vizsgált anyagot és inokulumot tartalmaz.

Inokulum vakpróba: csak inokulumot tartalmaz.

Eljáráskontroll: referenciaanyagot és inokulumot tartalmaz.

Abiotikus steril kontroll: steril, csak vizsgált anyagot tartalmaz (lásd az I.6.6. pontot).

Adszorpciós kontroll: vizsgált anyagot, inokulumot és sterilizáló szert tartalmaz.

Toxicitáskontroll: vizsgált anyagot, referenciaanyagot és inokulumot tartalmaz.

A vizsgált szuszpenzióban és az inokulum vakpróbában a meghatározásnak feltétlenül egyidejűleg kell történnie. A többi lombikban is ajánlott egyidejűleg elvégezni a meghatározásokat.

Ez azonban nem mindig lehetséges. Gondoskodni kell arról, hogy elegendő minta vagy mért érték álljon rendelkezésre a „tíznapos ablakban" a százalékos csökkenés kiértékelésének lehetővé tételére.

I.7. ADATOK ÉS KIÉRTÉKELÉS

A D_t (százalékos lebomlás) számításához mind a vizsgálati tartályokban, mind az inokulum vakpróbában a paraméter kétszeri mérésének átlagát kell használni. A képleteket a későbbiekben ismertetett, az egyes vizsgálatokkal foglalkozó szakaszok tartalmazzák. A lebomlás folyamata grafikus ábrázolásban látható, és bemutatásra kerül a „tíznapos ablak". Ki kell számítani és megadni a jelentésben a „tíznapos ablak" végén, a platónál vagy a vizsgálat végén elért százalékos csökkenés mértékét, az adott esetnek megfelelően.

A respirometriás vizsgálatokban a nitrogéntartalmú vegyületek a nitrifikáció miatt hatással lehetnek az oxigénfelvételre (lásd a II. és V. mellékletet).

I.7.1. **DOC-meghatározás segítségével mért lebomlás**

A D_t százalékos lebomlást minden alkalommal, amikor mintavétel történt, külön kell kiszámítani a vizsgált anyagot tartalmazó lombikokhoz a kettős DOC-mérések átlagértékeit használva, hogy megítélhető legyen a vizsgálat érvényessége (lásd az I.5.2. pontot). A következő egyenlet szolgál ennek kiszámítására:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

ahol:

D_t = százalékos lebomlás a t időpontban,

C_0 = a beoltott, a vizsgált anyagot tartalmazó ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk kezdeti átlagértéke (mg DOC/l),

C_t = a beoltott, a vizsgált anyagot tartalmazó ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk átlagértéke t időpontban (mg DOC/l),

C_{b0} = a vakpróba beoltott ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk kezdeti átlagértéke (mg DOC/l),

C_{bt} = a vakpróba beoltott ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk átlagértéke t időpontban (mg DOC/l).

Minden koncentráció mérése kísérleti úton történik.

I.7.2. **Specifikus analízis segítségével mért lebomlás**

Amikor rendelkezésre állnak specifikus analitikai adatok, a következő képletből lehet kiszámítani az elsődleges biológiai lebomlást:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

ahol:

D_t = % lebomlás t időpontban, általában a 28. napon,

S_a = a vizsgált anyag maradékmennyisége a vizsgálat végén a beoltott közegben, (mg),

S_b = a vizsgált anyag maradékmennyisége a vakpróbában olyan vízzel/táptalajjal végrehajtott vizsgálat után, amelyhez csak a vizsgált anyagot adtuk hozzá (mg).

I.7.3. **Abiotikus lebomlás**

Abiotikus steril kontroll használatakor a következő képlet segítségével kell kiszámítani a százalékos abiotikus bomlást.

$$\% \text{ abiotikus bomlás} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

ahol

$C_{s(o)}$ = DOC-koncentráció a steril kontrollban a 0. napon,

$C_{s(t)}$ = DOC-koncentráció a steril kontrollban a t-dik napon.

I.8. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a vizsgált és referenciaanyagokat és azok tisztaságát,

– a vizsgálati körülményeket,

– az inokulumot: minősége és a mintavétel helyszíne(i), koncentrációja és minden előkondícionáló kezelés,

– a szennyvízben jelen lévő ipari hulladék arányát és minőségét, ha ismert,

– a vizsgálati időtartamot és hőmérsékletet,

– rosszul oldható vizsgált anyagok esetében a végrehajtott kezelést,

– az alkalmazott vizsgálati módszert: az eljárás minden változtatását tudományosan meg kell indokolni,

– az adatlapot,

– minden megfigyelt gátlási jelenséget,

– minden megfigyelt abiotikus lebomlást,

– specifikus analitikai adatokat, ha rendelkezésre állnak,

– köztes anyagok analitikai adatait, ha rendelkezésre állnak,

– a százalékos lebomlásnak az idő függvényében ábrázolt görbéjét a vizsgált és referenciaanyagokhoz elkészítve; a lappangási fázist, lebomlási fázist, tíznapos ablakot és a meredekséget világosan jelezni kell (I. melléklet). Ha a vizsgálat megfelelt az érvényességi követelményeknek, a vizsgált anyagot tartalmazó lombikok lebomlási százalékainak átlagértéke használható a görbe elkészítéséhez,

– a százalékos csökkenést a „tíznapos ablak” után és a platón vagy a vizsgálat végén.

II. RÉSZ DOC (OLDOTT SZERVES SZÉN) CSÖKKENÉSÉNEK VIZSGÁLATA (C.4-A. módszer)

II.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Egyetlen szerves szénforrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (10–40 mg DOC/l) tartalmazó, beoltott ásványianyag-tápoldat mért mennyiségét sötétben vagy szórt fényben 22 ± 2 °C hőmérsékleten kell levegőztetni.

A lebomlást 28 napos időtartam során gyakori időközönként végrehajtott DOC-elemzés követi. A biológiai lebomlás mértékét a DOC-koncentrációjának csökkenéséből (az inokulum vakpróba figyelembevételével) a kezdetben jelen lévő koncentráció százalékában kell kiszámítani. Az elsődleges biológiai lebomlás mértéke az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő kémiai analízisből is kiszámítható.

II.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

II.2.1. **Készülék**

a) Kúpos lombikok, például 250 ml-től 2 l-ig, a DOC-analízishez szükséges térfogattól függően;

b) Kúpos lombikok fogadására alkalmas rázógép, amelyet vagy termosztáttal kell felszerelni, vagy klimatizált helyiségben kell használni; követelmény, hogy az aerob állapotok minden lombikban fenntarthatók legyenek;

c) Szűrőkészülék, alkalmas membránokkal;

d) DOC-analizátor;

e) Oldott oxigén meghatározására szolgáló készülék;

f) Centrifuga.

II.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b), (c) és (d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

II.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum különféle forrásokból származhat: lehet eleveniszap, szennyvíztisztítóból kifolyt víz, felszíni víz és talaj vagy ezek vegyesen.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontot.

II.2.4. **A lombikok előkészítése**

Példa: 800 ml-es adagokban 2 literes kúpos lombikokba ásványianyag-tápoldatot kell bevinni, ezekhez a vizsgált és referenciaoldatok törzsoldataiból elegendő mennyiséget kell hozzáadni úgy, hogy 10–40 mg DOC/l-rel egyenlő koncentrációt kapjanak. A ph-értéket ellenőrizni kell, és ha szükséges 7,4-re kell beállítani. A lombikokat eleveniszappal vagy más forrásból származó inokulummal kell beoltani (lásd az I.6.4. pontot) úgy, hogy 30 mg szuszpendált szilárd anyag/liternél nem nagyobb végleges koncentrációt kapjanak. Ezenkívül inokulumkontrollokat kell készíteni ásványianyag-tápoldatban, vizsgált vagy referenciaanyagok nélkül.

Ha szükséges, használni lehet egy tartályt a vizsgált anyag lehetséges gátló hatásának ellenőrzésére olyan oldat oltásával, amely az ásványianyag-tápoldatban, mind a vizsgált, mind valamely referenciaanyag hasonló koncentrációit tartalmazza.

Ezenkívül, ha szükséges, egy további, steril lombik is alkalmazható az anyag nem beoltott oldatának segítségével annak ellenőrzésére, hogy lebomlott-e abiotikusan a vizsgált anyag (lásd az I.6.6. pontot).

Ha a vizsgált anyagról gyanítható, hogy jelentős mértékben adszorbeálódik az üvegen, iszapban stb., akkor előzetes vizsgálatot kell végezni az adszorpció valószínű mértékének és a kísérlet alkalmasságának meghatározására (lásd az 1. táblázatot). Elő kell készíteni egy, a vizsgált anyagot, inokulumot és sterilizálószert tartalmazó lombikot.

Minden lombikban ki kell pótolni a térfogatot 1 literre ásványianyag-tápoldattal, és keverés után mintát kell venni mindegyikből a DOC kezdeti koncentrációjának meghatározására (lásd a II.4. mellékletet). Le kell fedni a lombikok nyílását például alufóliával úgy, hogy szabad légcsere jöhessen létre a lombik és a környezete között. Ezután a lombikokat rázógépbe kell helyezni, és el kell kezdeni a vizsgálatot.

II.2.5. **Lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: adszorpciós kontroll

8. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot is.

II.2.6. **A kísérlet végrehajtása**

A kísérlet során mindvégig kétszer kell meghatározni a DOC-koncentrációit minden egyes lombikban olyan ismert időközönként, amely elegendően gyakori meghatározást biztosít ahhoz, hogy megállapítható legyen a „tíznapos ablak" kezdete és a százalékos csökkenés a „tíznapos ablak" végén. A vizsgált szuszpenzióból csak az egyes meghatározásokhoz szükséges minimális mennyiséget kell kivenni.

Mintavétel előtt, ha szükséges, a lombikokban pótolni kell az elpárolgott veszteséget, megfelelő mennyiségű hígítóvíz (I.6.1.) hozzáadásával. Az ásványianyag-tápoldatot alaposan meg kell keverni a mintavétel előtt, és gondoskodni kell arról, hogy a tartályok falához hozzátapadt anyag mintavétel előtt feloldódjon vagy szuszpendálódjon. Közvetlenül a mintavétel végrehajtása után szűrésre van szükség membránszűrővel vagy centrifugálással (lásd a II.4. mellékletet). A szűrt vagy centrifugált mintákat még ugyanazon a napon kell analizálni, ellenkező esetben 2–4 °C hőmérsékleten kell tárolni maximum 48 órán át vagy –18 °C alatti hőmérsékleten hosszabb időtartamig.

II.3. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JELENTÉS

II.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

Ki kell számítani a százalékos lebomlást a t időpontban az I.7.1. (DOC-meghatározás), és választható módon az I.7.2. (specifikus analízis) pontban megadottaknak megfelelően.

Minden eredményt fel kell jegyezni a megadott adatlapokon.

II.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Lásd az I.5.2. pontot.

II.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

II.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

DOC-CSÖKKENÉS VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat koncentráció:… mg/l, az anyagra vonatkoztatva

Kezdeti koncentráció a közegben, t_o:… mg/l az anyagra vonatkoztatva

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondícionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben:… mg/l

5. **SZÉNANALÍZIS**

Szén-analizátor:

	Lombik száma		DOC n nap után (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Vizsgált kémiai anyag + inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, átlag $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, átlag $C_{b(t)}$					
Vakpróba inokulum vizsgált anyag nélkül	3	c_1					
		c_2					
		c, átlag $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, átlag $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ALAPADATOK KIÉRTÉKELÉSE**

Lombik száma		% lebomlás n nap után				
		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				
Átlag ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) A D_1-et és D_2-t nem szabad átlagolni, ha jelentős eltérés van közöttük.

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

7. **ABIOTIKUS KONTROLL** (választható)

	Idő (nap)	
	0	t
DOC-koncentráció (mg/l) steril kontrollban	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIKUS ANALÍZIS** (választható)

	A vizsgált kémiai anyag maradék mennyisége a vizsgálat végén (mg/l)	% elsődleges lebomlás
Steril kontroll	S_b	
Beoltott vizsgált közeg	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

III. RÉSZ. MÓDOSÍTOTT OECD-VIZSGÁLAT (DOC-CSÖKKENÉS) (C.4-B. módszer)

III.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Egyetlen szerves szénforrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (10–40 mg DOC/l) tartalmazó beoltott ásványi oldószer mért mennyiségét sötétben vagy szórt fényben 22 ± 2 °C hőmérsékleten kell levegőztetni.

A lebomlást egy 28 napos időtartam során gyakori időközönként végrehajtott DOC elemzés követi. A biológiai lebomlás mértékét a DOC-koncentrációjának csökkenéséből, (az inokulum vakpróba figyelembevételével) a kezdetben jelen lévő koncentráció százalékában kell kiszámítani. Az elsődleges biológiai lebomlás mértéke az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő kémiai analízisből is kiszámítható.

III.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

III.2.1. **Készülék**

a) Kúpos lombikok, például 250 ml-től 2 l-ig, a DOC-analízishez szükséges térfogattól függően;

b) Rázógép a kúpos lombikok behelyezésére, amelyet vagy termosztáttal kell felszerelni, vagy klimatizált helyiségben kell használni, követelmény, hogy az aerob állapotok minden lombikban fenntarthatók legyenek;

c) Szűrőkészülék, alkalmas membránokkal;

d) DOC-analizátor;

e) Oldott oxigén meghatározására szolgáló készülék;

f) Centrifuga.

III.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b), (c) és (d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

E módszer literenként csak 0,5 ml kezelt szennyvizet használ inokulumként, ezért lehetséges, hogy meg kell erősíteni a közeget nyomelemekkel és növekedési faktorokkal. Ez a következő oldatok mindegyikéből 1 ml hozzáadásával történik 1 liter végső közeghez:

Nyomelemoldat:

Mangán-szulfát-tetrahidrát, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Bórsav, H_3BO_3	57,2 mg
Cink-szulfát-heptahidrát, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Ammónium-heptamolibdát $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe-kelát ($FeCl_3$ etiléndiamin-tetra-ecetsav)	100,0 mg

Ezen anyagokat fel kell oldani, és kipótolni 1 000 ml-re hígítóvízzel.

Vitaminoldat:

Élesztőkivonat	15,0 mg

Az élesztőkivonatot fel kell oldani 100 ml vízben. Sterilizálni kell 0,2 mikrométer pórusméretű membránon keresztülvezetve, vagy frissen kell elkészíteni.

III.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum döntően háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység másodlagos, kezelt szennyvízéből származik. Lásd az I.6.4.2. és az I.6.5. pontot.

A felhasznált mennyiség 0,5 ml/liter ásványianyag-tápoldat.

III.2.4. **A lombikok előkészítése**

Példa: 800 ml-es adagokban 2 literes kúpos lombikokba ásványianyag-tápoldatot kell bevinni, ezekhez a vizsgált- és referenciaoldatok törzsoldataiból elegendő mennyiséget kell hozzáadni úgy, hogy 10–40 mg DOC/l-rel egyenlő koncentrációt kapjanak. Ellenőrizni kell a ph-értéket, és ha szükséges 7,4-re kell beállítani. A lombikokat kezelt szennyvízzel kell beoltani (lásd az I.6.4.2. pontot) 0,5 ml/l koncentráció mellett. Ezenkívül inokulumkontrollokat kell készíteni ásványianyag-tápoldatban, vizsgált- vagy referenciaanyagok nélkül.

Ha szükséges, használni lehet egy tartályt a vizsgált kémiai anyag lehetséges gátló hatásának ellenőrzésére olyan oldat oltásával, amely az ásványi közegben, mind a vizsgált, mind valamely referenciaanyag hasonló koncentrációit tartalmazza. Ezenkívül, ha szükséges, egy további, steril lombik is alkalmazható az anyag nem beoltott oldatának segítségével annak ellenőrzésére, hogy lebomlott-e abiotikusan a vizsgált anyag (lásd az I.6.6. pontot).

Ha a vizsgált anyagról gyanítható, hogy jelentős mértékben adszorbeálódik az üvegen, iszapban stb., akkor előzetes vizsgálatot kell végezni az adszorpció valószínű mértékének és a kísérlet alkalmasságának meghatározására (lásd az 1. táblázatot). Elő kell készíteni egy, a vizsgált anyagot, inokulumot és sterilizálószert tartalmazó lombikot.

Minden lombikban ki kell pótolni a térfogatot 1 literre ásványianyag-tápoldattal, és a keverés után mintát kell venni minden egyes lombikból a DOC kezdeti koncentrációjának meghatározására (lásd a II.4. mellékletet). Le kell fedni a lombikok nyílását például alufóliával úgy, hogy szabad légcsere jöhessen létre a lombik és a környezete között. Ezután a lombikokat rázógépbe kell helyezni, és el kell kezdeni a vizsgálatot.

III.2.5. **A lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: adszorpciós kontroll

8. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot is.

III.2.6. **A vizsgálat végrehajtása**

A vizsgálat során mindvégig kétszer kell meghatározni a DOC-koncentrációit minden egyes lombikban olyan ismert időközönként, amely elegendően gyakori meghatározást biztosít ahhoz, hogy megállapítható legyen a „tíznapos ablak" kezdete és a százalékos csökkenés a „tíznapos ablak" végén. A vizsgált szuszpenzióból csak az egyes meghatározásokhoz szükséges minimális mennyiséget kell kivenni.

Mintavétel előtt, ha szükséges, a lombikokban pótolni kell az elpárolgott veszteséget megfelelő mennyiségű hígítóvíz (I.6.1.) hozzáadásával. Az ásványianyag-tápoldatot alaposan meg kell keverni a mintavétel előtt, és gondoskodni kell arról, hogy a tartályok falához hozzátapadt anyag mintavétel előtt feloldódjon vagy szuszpendálódjon. Közvetlenül a mintavétel végrehajtása után szűrésre van szükség membránszűrővel vagy centrifugálással (lásd a II.4. mellékletet). A szűrt vagy centrifugált mintákat még ugyanazon a napon kell analizálni, ellenkező esetben 2–4 °C hőmérsékleten kell azt tárolni maximum 48 órán át vagy –18 °C alatti hőmérsékleten hosszabb időtartamig.

III.3. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JELENTÉS

III.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

Ki kell számítani a százalékos lebomlást a t időpontban az I.7.1. (DOC meghatározás), és választható módon az I.7.2. (specifikus analízis) pontban megadottaknak megfelelően.

Minden eredményt fel kell jegyezni a megadott adatlapokon.

III.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Lásd az I.5.2. pontot.

III.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

III.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

MÓDOSÍTOTT OECD-VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat koncentráció:… mg/l, az anyagra vonatkoztatva

Kezdeti koncentráció a médiumban, t_o:… mg/l az anyagra vonatkoztatva

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben:… mg/l

5. **SZÉNANALÍZIS**

Szénanalizátor:

	Lombik száma		DOC n nap után (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Vizsgált kémiai anyag + inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, átlag $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, átlag $C_{b(t)}$					
Vakpróba inokulum vizsgált anyag nélkül	3	c_1					
		c_2					
		c, átlag $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, átlag $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ALAPADATOK KIÉRTÉKELÉSE**

Lombik száma		% lebomlás n nap után				
		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				
Átlag ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) A D_1-et és D_2-t nem szabad átlagolni, ha jelentős eltérés van közöttük.

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

7. **ABIOTIKUS KONTROLL** (választható)

	Idő (nap)	
	0	t
DOC-koncentráció (mg/l) steril kontrollban	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIKUS ANALÍZIS** (választható)

	A vizsgált anyag maradékmennyisége a vizsgálat végén (mg/l)	% elsődleges lebomlás
Steril kontroll	S_b	
Beoltott vizsgált közeg	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV. RÉSZ CO_2-FEJLŐDÉSVIZSGÁLAT (C.4-C. módszer)

IV.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Kizárólagos szerves szénforrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (10–20 mg DOC vagy TOC/l) tartalmazó, definiált térfogatú beoltott ásványianyag-tápoldatot szabályozott átfolyási sebesség mellett, szén-dioxid-mentes levegő átvezetésével, sötétben vagy szórt fényben levegőztetni kell. A lebomlást 28 napon át kell követni a termelt szén-dioxid meghatározásával, amelyet bárium- vagy nátrium-hidroxidban kell elnyeletni, és amelyet a maradék hidroxid titrálásával vagy szervetlen szénként kell mérni. A vizsgált anyagból előállított szén-dioxid mennyiséget (a vakpróba inokulumból származó mennyiség figyelembevételével helyesbítve) a $ThCO_2$ százalékaként kell kifejezni. A biológiai lebomlás mértéke az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő DOC-analízisből is kiszámítható.

IV.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

IV.2.1. **Készülék**

a) 2–5 literes lombikok, mindegyik egy, csaknem a tartály aljáig érő levegőztető csővel, és egy kivezető nyílással ellátva;

b) Mágneses keverők, a rosszul oldódó kémiai anyagok kiértékelésekor;

c) Gázabszorpciós üvegek;

d) A légáram szabályozására és mérésére szolgáló készülék;

e) Szén-dioxid kivonására alkalmas berendezés a széndioxid-mentes levegő elkészítéséhez; más lehetőségként gázpalackokból származó CO_2-mentes oxigén és CO_2-mentes nitrogén keveréke használható a megfelelő arányokban (20 % O_2: 80 % N_2);

f) Készülék a szén-dioxid meghatározására, vagy titrimetriás méréshez vagy szervetlenszén-analízishez;

g) Membránszűrő készülék (választható);

h) DOC-analizátor.

IV.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b), (c) és (d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

IV.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum különböző forrásokból szerezhető be: lehet eleveniszap; kezelt szennyvíz; felszíni víz; talaj vagy ezek vegyesen.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontot.

IV.2.4. **A lombikok előkészítése**

A következő térfogatok és tömegek jelzik a 3 liter szuszpenziót tartalmazó 5 literes lombikokhoz tartozó értékeket. Ennél kisebb térfogatú lombikok használatakor megfelelően módosítani kell az értékeket, de gondoskodni kell arról, hogy pontosan mérhető legyen a fejlődött szén-dioxid.

Minden egyes 5 literes lombikba önteni kell 2 400 ml ásványianyag-tápoldatot. Hozzá kell adni megfelelő mennyiségű előkészített eleveniszapot (lásd az I.6.4.1. és I.6.5. pontot) úgy, hogy a végleges 3 literes beoltott keverékben 30 mg/l-nél nem nagyobb szuszpendált szilárd anyag koncentrációt kapjanak.

Más megoldás: először hígítani kell az előkészített iszapot úgy, hogy 500–1 000 mg/l szuszpenziót kapjanak az ásványianyag-tápoldatban, mielőtt hozzáadnánk egy aliquot részt az 5 literes lombik tartalmához a 30 mg/l-es koncentráció elérésére; ez utóbbi eljárás nagyobb pontosságot biztosít. Használhatók más inokulum források is (lásd az I.6.4.2. pontot).

A szén-dioxidnak a rendszerből történő eltávolítása érdekében a beoltott keverékeket CO_2-mentes levegővel kell levegőztetni egy éjszakán át.

Az ismételt vizsgálatokhoz alkalmazandó lombikokhoz a vizsgált anyagot és a referenciaanyagot különkülön kell hozzáadni, ismert töménységű törzsoldatok formájában, úgy, hogy a hozzáadott anyagokkal együtt 10–20 mg DOC vagy TOC/l koncentrációkat kapjanak; néhány lombikhoz nem adnak hozzá kémiai anyagot, hanem hagyják meg azokat inokulumkontrollnak. A rosszul oldódó vizsgált anyagokat közvetlenül kell a lombikokba bevinni tömeg vagy térfogat alapján, vagy azokat a III. mellékletben ismertetett módon kell kezelni.

Ha szükséges, használható egy lombik a vizsgált kémiai anyag esetleges gátló hatásának ellenőrzésére, e lombikba mind a vizsgált, mind a referenciaanyagokat ugyanolyan koncentrációkban kell bevinni, mint ahogy azok a többi lombikban jelen vannak.

Ezenkívül, ha szükséges, egy steril lombik használható annak ellenőrzésére, hogy lebomlik-e abiotikusan a vizsgált kémiai anyag; ehhez az anyag nem beoltott oldatát kell használni (lásd az I.6.6 pontot). A sterilizáció megfelelő koncentrációjú toxikus anyag hozzáadásával történik.

Mindhárom lombikban ki kell egészíteni a szuszpenzió térfogatát 3 literre előzőleg CO_2-mentes levegővel levegőztetett ásványianyag-tápoldat hozzáadásával. Tetszés szerint minták vehetők DOC-analízishez (lásd a II.4. mellékletet) és/vagy a specifikus analízishez. Az abszorpciós üvegeket a lombikok levegőkivezető nyílásához kell csatlakoztatni.

Ha bárium-hidroxidot használnak, három abszorpciós üveget kell sorba csatlakoztatni, amelyek közül mindegyik 100 ml 0,0125 M bárium-hidroxid oldatot tartalmaz, minden egyes 5 literes lombikhoz. Az oldatnak kicsapódott szulfáttól és karbonáttól mentesnek kell lennie, és közvetlenül a használat előtt meg kell határozni a koncentrációját. Ha nátrium-hidroxidot használnak, csatlakoztatni kell két abszorpciós csapdát, amelyek közül a második ellenőrzésre szolgál annak bemutatására, hogy minden szén-dioxid abszorbeálásra került az elsőben. A szérumos üvegekéhez hasonló záróelemmel ellátott üvegek alkalmasak e célra. Mindkét üvegbe 200 ml 0,05 M nátrium-hidroxidot kell bevinni, amely elegendő a vizsgált anyag teljes lebomlásakor fejlődő teljes szén-dioxid mennyiségének abszorbeálására. A nátrium-hidroxid oldat, még ha frissen elkészített is, nyomokban tartalmazni fog karbonátokat; ezt a vakpróbában lévő karbonátmennyiség levonásával korrigálni kell.

IV.2.5. **A lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: toxicitáskontroll

8. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot is.

IV.2.6. **A kísérlet végrehajtása**

A kísérlet kezdetén CO_2-mentes levegőt kell belevezetni a szuszpenziót tartalmazó tartályokba 30–100 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Szabályos időközönként mintákat kell venni a szén-dioxid abszorbensből a CO_2-tartalom elemzésére. Az első 10 nap során ajánlatos az elemzéseket minden második vagy harmadik napon elvégezni, és ezután minden 5. napon a 28. napig azért, hogy meghatározható legyen a „tíznapos ablak".

A 28. napon mintákat kell venni (tetszés szerint) a DOC- és/vagy a specifikus analízis céljából, meg kell mérni a szuszpenzió pH-ját, és bele kell tenni 1 ml tömény sósavat minden egyes lombikba; a lombikokat egész éjszakán át a vizsgált szuszpenziókban jelen lévő szén-dioxid eltávolítása érdekében szellőztetni kell. A 29. napon kell végrehajtani a fejlődött szén-dioxid utolsó elemzését.

A CO_2-mérések napjain el kell választani a lombikhoz legközelebbi bárium-hidroxid abszorbciós üveget, és titrálni kell a hidroxid-oldatot 0,05 M HCl-vel, indikátorként fenolftaleint használva. A többi abszorbciós üveget eggyel közelebb kell tenni a lombikhoz, és el kell helyezni egy új, 100 ml friss 0,0125 M bárium-hidroxidot tartalmazó abszorbciós üveget a sor legtávolabbi végére. Titrálást kell végezni szükség szerint, például amikor jelentős csapadékképződés látható az első abszorpciós üvegben, és mielőtt ennek bármilyen bizonyítéka lenne látható a második üvegen, vagy legalább hetente. Más megoldásként, abszorbensként NaOH-t használva, fecskendővel kis térfogatú nátrium-hidroxid oldat mintát kell venni (az elemzéshez használt szénanalizátor jellemzőitől függően) a lombikhoz legközelebbi abszorbciós üvegből. A mintát be kell fecskendezni a szénelemző készülék IC-részébe a fejlődött szén-dioxid közvetlen elemzéséhez.

A második abszorpciós csapda tartalmát csak a vizsgálat végén kell elemezni az összes szén-dioxid-átvitel figyelembevételével.

IV.3. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JELENTÉS

IV.3.1. **Eredmények kiértékelése**

A titráláskor az abszorberben megkötődött CO_2-mennyiséget a következő összefüggés adja meg:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

ahol:

V = az abszorberben a 100 ml titrálásához használt HCl térfogata (ml),

C_B = a bárium-hidroxid oldat koncentrációja (M),

C_A = a sósavoldat koncentrációja (M),

ha a C_B értéke 0,0125 M és a C_A értéke 0,05 M, 100 ml bárium-hidroxid esetében a titráláshoz felhasznált térfogat 50 ml, és a CO_2 tömegét a következő összefüggés adja meg:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{titráláshoz használt HCl} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Így tehát ebben az esetben a titrált HCl térfogatnak megfelelően a fejlődött CO_2 mennyisége (mg) közötti szorzótényező 1,1.

Ki kell számítani az egyedül az inokulumból és az inokulumból plusz a vizsgált anyagból fejlődött CO_2 tömegét a megfelelő titrálási értékek segítségével, ezek különbsége a kizárólag a vizsgált anyagból fejlődött CO_2 mennyisége.

Például, ha kizárólag az inokulum esetében 48 ml kell a titráláshoz és az inokulum plusz vizsgált anyaghoz együttesen 45 ml, akkor

a CO_2 inokulum esetében = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

a CO_2 inokulum plusz vizsgált anyag esetében = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

tehát a vizsgált anyagból fejlődött CO_2 mennyisége 3,3 mg.

A százalékos biológiai lebomlás a következő összefüggésből számító ki:

$$\% \text{ lebomlás} = \frac{\text{fejlödött mg } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg hozzáadott vizgált anyag}}$$

vagy

$$\% \text{ lebomlás} = \frac{\text{fejlödött mg } CO_2 \times 100}{\text{vizsgálatban hozzáadott mg TOC} \times 3,67}$$

az átváltási arány 3,67 (44/12) a szén és a szén-dioxid között.

Ki kell számítani a százalékos lebomlást minden egyes időintervallum után a mérés végrehajtásának időpontjáig az egyes napokhoz kiszámított $ThCO_2$ értékek százalékának összeadásával.

Nátrium-hidroxid abszorberek esetében ki kell számítani a fejlődött szén-dioxid-mennyiséget, IC-ben (szervetlen szén) (mg) kifejezve, megszorozva az IC koncentrációját az abszorbensben az abszorbens térfogatával.

A százalékos lebomlást a következő összefüggésből lehet kiszámítani:

$$\% \ ThCO_2 = \frac{\text{mg IC, a vizsgált anygottartalmazó lombikból - mg IC a vakpróbábd}}{\text{vizsgált anyagkénthozzáadott TOC}} \times 100$$

A DOC-csökkenését (választható) az I.7. pontban leírtaknak megfelelően lehet kiszámítani. Ezt és minden más eredményt a megadott adatlapokra kell feljegyezni.

IV.3.2. **Eredmények érvényessége**

A vizsgálat kezdetén az ásványianyag-tápoldatban lévő vizsgált anyag szuszpenzió IC-tartalmának a TC 5 %-ánál kevesebbnek kell lennie, és a vizsgálat végén az inokulum vakpróbában a teljes CO_2-fejlődésnek általában nem szabad 40 mg/l oldószernél nagyobbnak lennie. Ha 70 mg CO_2/l-nél nagyobb értékeket kapnak, alaposan meg kell vizsgálni az adatokat és a kísérleti módszert.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

IV.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

IV.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

SZÉN-DIOXID-FEJLŐDÉS VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat koncentráció:… mg/l, az anyagra vonatkoztatva

Kezdeti koncentráció a médiumban:… mg/l az anyagra vonatkoztatva

A lombik tartalmához hozzáadott szén teljes mennyisége:… mg C

$ThCO_2$:… mg CO_2

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben:… mg/l

5. **SZÉN-DIOXID-FEJLŐDÉS ÉS LEBONTHATÓSÁG**

Módszer: $Ba(OH)_2$/NaOH/egyéb

Idő (nap)	A vizsgálatban képződött CO_2 (mg)		A vakpróbában képződött CO_2 (mg)		Képződött CO_2 összesen (mg) vizsgált anyag és a vakpróba különbségeinek átlaga)		$ThCO_2$ $\frac{\text{összes } CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 2	átlag	3 4	átlag	1	2	1	2	átlag
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

6. **SZÉNANALÍZIS** (választható)

Szénanalizátor:

Idő (nap)	Vakpróba mg/l	Vizsgált anyag, mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 ([1])	$C_b(t)$	C_t
([1]) vagy az inkubációs periódus végén		

$$\% \text{ DOC - csökkenés} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTIKUS LEBOMLÁS** (választható)

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{CO_2 - CO2 \text{ fejlődéssteril kontrollban 28 napután (mg)}}{ThCO_2 \text{ mg}} \times 100$$

V. RÉSZ MANOMETRIKUS RESPIROMETRIÁS MÉRÉS (C.4-D. módszer)

V.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Kizárólagos szerves szénforrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (100 mg/l vizsgált anyag, legalább 50–100 mg ThOD/liter létrehozásához) tartalmazó, mért térfogatú, beoltott ásványianyag-tápoldatot kell keverni zárt lombikban, állandó hőmérsékleten (± 1 °C vagy ennél kisebb eltérés mellett) legfeljebb 28 napig. Meg kell határozni az oxigénfogyasztást vagy a respiriométer-palackban az állandó gáztérfogat fenntartásához szükséges (elektrolízis útján előállított) oxigénmennyiség mérésével, vagy a készülékbeli térfogat- vagy nyomásváltozás (vagy a kettő valamilyen kombinációjának) vizsgálatával. A fejlődött szén-dioxidot káliumhidroxid-oldatban vagy valamilyen más alkalmas abszorbensben nyeletik el. A vizsgált anyag által felvett oxigén (az egyidejűleg vizsgált vakpróba inokulum által felvett mennyiség figyelembevételével helyesbítve) mennyiségét a ThOD vagy a COD százalékaként kell kifejezni. Tetszés szerint az elsődleges biológiai lebomlás is kiszámítható az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő specifikus elemzésből, és elvégezhető a végső biológiai lebomlás DOC-analízise.

V.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

V.2.1. **Készülék**

a) alkalmas respiriométer;

b) termosztát, amely ± 1°C vagy ennél nagyobb pontossággal képes a hőmérséklet fenntartására;

c) membránszűrő készülék (választható);

d) szénanalizátor (választható).

V.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b), (c) és (d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

V.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum különböző forrásokból szerezhető be: lehet eleveniszap; kezelt szennyvíz; felszíni víz; talaj vagy ezek vegyesen.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontot.

V.2.4. **A lombikok előkészítése**

A vizsgált- és referenciaanyagból külön lombikokban oldatokat készítenek ásványianyag-tápoldatban, a törzsoldatok felhasználásával úgy, hogy az oldatok koncentrációja általában 100 mg anyag/liter legyen, ami legalább 50–100 mg ThOD/liter értéknek felel meg.

Ki kell számítani a ThOD-t az ammóniumsók képződése alapján, kivéve ha nitrifikáció várható, ebben az esetben a számításnak a nitrátképződésen (lásd a II.2. mellékletet) kell alapulnia.

A ph-értékeket meg kell határozni, és ha szükséges, be kell állítani azokat 7,4 ± 0,2-re.

A rosszul oldódó anyagok hozzáadására későbbi fázisban kerül sor (lásd alább).

Ha meg kell határozni a vizsgált anyag toxicitását, akkor egy másik oldatot kell elkészíteni ásványianyag-tápoldatban, amely ugyanolyan koncentrációkban tartalmazza mind a vizsgált, mind a referenciaanyagokat, mint az egyes oldatok.

Ha mérni kell a fizikai-kémiai okokra visszavezethető oxigénfelvételt, akkor el kell készíteni általában egy 100 mg ThOD/liter koncentrációjú oldatot, amelyet megfelelő toxikus anyag hozzáadásával sterilizálnak (lásd az I.6.6. pontot).

A szükséges térfogatú vizsgált, illetve referenciaoldatokat legalább két lombikba kell szétosztani. Ezenkívül további lombikokba csak ásványianyag-tápoldatot kell tenni (inokulum kontrollvizsgálathoz), illetve, ha szükséges, az összekevert vizsgált/referenciaoldatot és a steril oldatot.

Ha a vizsgált anyag rosszul oldódik, akkor azt közvetlenül e szakaszban tömeg vagy térfogat alapon kell az edénybe bevinni, vagy a III. mellékletben leírt módon kell azt kezelni. Kálium-hidroxidot, nátronmészpasztillákat vagy más abszorbenseket kell adagolni a CO_2–abszorbciós üvegekbe.

V.2.5. **A lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: toxicitáskontroll

8. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot is.

V.2.6. **A kísérlet végrehajtása**

Miután a lombikok elérték a kívánt hőmérsékletet, azokat be kell oltani a megfelelő előkészített eleveniszappal vagy más inokulumforrással úgy, hogy a kapott szuszpendált szilárd anyag koncentrációja ne legyen 30 mg/l-nél nagyobb. Össze kell szerelni a berendezést, elindítani a keverőt, és ellenőrizni a légmentes záródást, majd meg kell kezdeni az oxigénfelvétel mérését. Rendszerint semmilyen további figyelemre nincs szükség, a mért érték leolvasásán és azokon a napi ellenőrzéseken kívül, amelyek során meg kell mérni, hogy fennmaradt-e a megfelelő hőmérséklet és a megfelelő keverés.

Az oxigénfelvételt a rendszeres és gyakori időközönként leolvasott értékekből lehet kiszámítani a berendezés gyártója által megadott módszerek segítségével. Az inkubálás végén, általában a 28. napon, meg kell mérni a lombikok tartalmának pH-ját, különösen akkor, ha alacsony vagy (nitrogéntartalmú vegyületek esetében) meghaladja a $ThOD_{NH4}$ értékét.

Ha szükséges, a respirométerpalackokból a mérés elején és végén, a DOC vagy a specifikus kémiai elemzés végrehajtására mintát kell venni (lásd a II.4. mellékletet). A mérés kezdetén végrehajtott mintavételkor gondoskodni kell arról, hogy ismert legyen a palackban maradó vizsgált szuszpenzió térfogata. Amikor a nitrogént tartalmazó vizsgált anyag oxigént vesz fel, meg kell határozni a nitrit és a nitrát koncentrációjának növekedését a 28 nap alatt, a nitrifikáció következtében elfogyasztott oxigén figyelembevételével (V. melléklet).

V.3. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JELENTÉS

V.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

El kell osztani valamely adott időt követően (az ugyanennyi idő után a vakpróba inokulumkontroll által felvett oxigén figyelembevételével helyesbített) a vizsgált kémiai anyagra vonatkozó oxigénfelvételt (mg) a felhasznált vizsgált anyag tömegével. Ezzel megkapják a mg oxigén/mg vizsgált anyag hányadosaként kifejezett BOD-t, vagyis

$$\text{BOD} = \frac{\text{a vizsgált anyagáltal felvett mg } O_2 \text{ - a vakpróba által felvett mg } O_2}{\text{mg vizsgált anyaga lombikban}}$$

$$= \text{mg } O_2\text{/vizsgált anyag}$$

A százalékos biológiai lebomlás kiszámítható a következő összefüggések valamelyikéből:

$$\%\ \text{biológiai lebomlás} = \%\text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2\text{/mg BOD (mg } O_2\text{/mg anyag))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg ThOD (mg } O_2\text{/mg anyag))}} \times 100$$

vagy:

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg BOD (mg } O_2\text{/mg anyag))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg COD (mg } O_2\text{/mg anyag))}} \times 100$$

Meg kell jegyezni, hogy e két módszer nem ad szükségképpen azonos értéket; az első módszer használatát kell előnyben részesíteni.

Nitrogéntartalmú vizsgált anyagokhoz a megfelelő ThOD-t kell használni (NH_4 vagy NO_3) annak megfelelően, hogy várható-e nitrifikáció, vagy sem (lásd a II.2. mellékletet). Ha előfordul nitrifikáció, de az nem teljes, ki kell számítani egy, a nitrifikálással elfogyasztott oxigént figyelembe vevő korrekciós tényezőt a nitrit és nitrát koncentrációjában létrejövő változásokból (V. melléklet).

Amikor a szerves szén és/vagy a specifikus kémiai analízis mellett döntenek, ki kell számítani a százalékos lebomlást az I.7. pontban leírt módon.

Minden eredményt fel kell jegyezni a mellékelt adatlapokra.

V.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Az inokulum vakpróba oxigénfelvétele általában 20–30 mg O_2/liter, és nem szabad, hogy 60 mg/liternél nagyobb legyen 28 nap alatt. 60 mg/liternél nagyobb értékek esetében alaposan meg kell vizsgálni az adatokat és a kísérleti módszereket. Ha a ph-érték kívül van a 6–8,5-ös tartományon, és a vizsgált anyag által felvett oxigén kevesebb, mint 60 %, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni a vizsgált anyag kisebb koncentrációjával.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

V.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

V.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

MANOMETRIKUS RESPIROMETRIÁS VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat koncentráció:… mg/liter

Kezdeti koncentráció a médiumban, C_o:… mg/liter

Térfogat a vizsgáló lombikban (V):… ml

ThOD vagy COD:… mg O_2/mg vizsgált anyag (NH_4, NO_3)

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben:… mg/l

5. **OXIGÉNFELVÉTEL: BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG**

		Idő (nap)											
		0		7		14			21			28	
O_2 felvétel (mg), vizsgált anyag	1												
	2												
	a, átlag												
O_2 felvétel (mg) vakpróba	3												
	4												
	b, átlag												
Korrigált BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD/mg vizsgált anyag	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												
% lebomlás $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Átlag [1]												
V = közeg térfogata a vizsgálati lombikban													

[1] A D_1-et és D_2-t nem szabad átlagolni, ha jelentős a különbség a kettő között.

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

6. **KORREKCIÓ A NITRIFIKÁCIÓ FIGYELEMBEVÉTELÉVEL** (lásd az V. mellékletet)

Nap	0	28	Különbség
i. Nitrátkoncentráció (mg N/liter)			(N)
ii. Oxigén-egyenértékben kifejezve (4,57 × N × V) (mg)	–	–	
iii. Nitritkoncentráció (mg N/liter)			(N)
iv. Oxigén-egyenértékben kifejezve (3,43 × N × V) (mg)	–	–	
ii + iv. Teljes oxigén-egyenérték	–	–	

7. **SZÉNANALÍZIS** (választható)

Szénanalizátor:

Idő (nap)	Vakpróba mg/liter	Vizsgált anyag mg/liter
0	(C_{blo})	(C_o)
28 [1]	(C_{blt})	(C_t)
[1] vagy az inkubációs periódus végén		

$$\% \text{ DOC csökkenés} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIKUS ANALÍZIS** (választható)

S_b = a vizsgált anyag koncentrációja fizikai-kémiai (steril) kontrollban a 28. napon

S_a = koncentráció a beoltott lombikban a 28. napon

$$\% \text{ biológiai lebomlás} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTIKUS LEBOMLÁS** (választható)

a = oxigénfelvétel a steril lombikokban 28 nap után, (mg)

$$\text{oxigénfelvétel mg vizsgált anyagonkém} = \frac{a}{C_o V}$$

(lásd az 1. és 3. szakaszt)

$$\% \text{ abiotikuslebomlás} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

VI. RÉSZ. ZÁRTPALACK-MÓDSZER (C.4-E. módszer)

VI.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált kémiai anyagnak ásványianyag-tápoldatban lévő, rendszerint 2–5 mg/liter koncentrációjú oldatát be kell oltani viszonylag kis számú, vegyes populációból származó mikroorganizmussal, és teljesen teletöltött, zárt palackokban, sötétben, állandó hőmérsékleten kell tartani. A lebomlást a 28 napos időtartam alatt a feloldódott oxigén analízise követi. A vizsgált anyag által felvett oxigénmennyiséget, az egyidejűleg végrehajtott vizsgálatban a vakpróba inokulum által felvett oxigén figyelembevételével helyesbítve, a ThOD vagy a COD százalékában kell kifejezni.

VI.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

VI.2.1. **Készülék**

a) BOD-palackok, üvegdugókkal, például 250–300 ml-esek;

b) Vízfürdő vagy inkubátor, amelyekben a palackok állandó hőmérsékleten (± 1 °C vagy ennél nagyobb pontosság mellett) sötétben tarthatók;

c) Nagyméretű üvegpalackok (2–5 literesek) a közeg előkészítésére és a BOD-palackok megtöltésére;

d) Oldottoxigén-mérő, valamint reagensek a Winkler-féle titráláshoz.

VI.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

Össze kell keverni 1 ml-t az (a)–(d) oldatokból, és azt hígítóvízzel ki kell egészíteni 1 literre.

VI.2.3. **Az inokulum előkészítése**

Az inokulum valamilyen, döntően háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység másodlagos kezelt szennyvízéből származik. Alternatív inokulumforrás a felszíni víz. Általában egy csepp (0,05 ml) és 5 ml közötti szűrletet kell használni ásványianyag-tápoldat literenként; kísérletezésre lehet szükség adott inokulumforrás vonatkozásában az optimális térfogat kiderítésére (lásd az I.6.4.2. és I.6.5. pontot).

VI.2.4. **A lombikok előkészítése**

Az ásványianyag-tápoldatot legalább 20 percig kell intenzíven levegőztetni. Ugyanazon adagból származó ásványianyag-tápoldattal kell végrehajtani minden egyes vizsgálatsorozatot. Az oldószer általában a vizsgálati hőmérsékleten való 20 óra állást követően kész a felhasználásra. Az oldott oxigén koncentrációját ellenőrzési célból kell meghatározni; az értéknek körülbelül 9 mg/liternek kell lennie 20 °C hőmérsékleten. A levegővel telített közeg minden áthelyezési és áttöltési műveletét buborékmentesen kell végrehajtani, például szívócsövek segítségével.

A BOD-palackok csoportjait kell elkészíteni a vizsgált és a referenciaanyagok meghatározására végzett egyidejű kísérletsorozatokhoz. Elegendő számú BOD-palacknak kell rendelkezésre állnia, az inokulum vakpróbákat is ideértve úgy, hogy legalább két oxigénfogyasztás-mérés legyen végrehajtható a kívánt időintervallumokban, például a 0., 7., 14., 21. és 28. nap után. Lehet, hogy további palackokra lesz szükség annak biztosítására, hogy azonosítható legyen a „tíznapos ablak”.

A teljesen kilevegőztetett ásványianyag-tápoldatot a nagy palackokba úgy kell beletölteni, hogy azok körülbelül 1/3 részükig legyenek megtöltve. Ezután a nagy palackokba bele kell tölteni a vizsgált anyag és a referenciaanyag törzsoldatából elegendő mennyiséget úgy, hogy az anyagok végleges koncentrációja általában ne legyen 10 mg/liternél nagyobb. Semmilyen kémiai anyagot nem lehet beleönteni a vakpróba kontrolloldószert tartalmazó nagy palackba.

Annak biztosítására, hogy az inokulumaktivitás ne legyen korlátozott, az oldott oxigén koncentrációjának nem szabad 0,5 mg/liter alá csökkennie a BOD-palackokban. Ez körülbelül 2 mg/literre korlátozza a vizsgált anyag koncentrációját. Azonban a nehezen lebomló vegyületekhez és az alacsony ThOD értékű vegyületekhez 5–10 mg/liter használható. Néhány esetben ajánlatos lehet a vizsgált anyagot egyidejűleg vizsgálni két különböző, például 2 és 5 mg/liter-es koncentráció mellett. Általában a ThOD-t az ammóniumsók képződése alapján kell kiszámítani, de ha nitrifikáció várható, vagy ismert, hogy ez előfordul, a számításnak a nitrátképződésen kell alapulnia ($ThOD_{NO3}$: lásd a II.2. mellékletet). Azonban, ha előfordul ugyan nitrifikáció, de ez nem teljes, korrekciót kell végrehajtani a nitrit és a nitrát koncentrációjában az elemzés által meghatározott változások figyelembevételével (lásd az V. mellékletet).

Ha meg kell vizsgálni a vizsgált anyag toxicitását (például abban az esetben, ha előzőleg kis mértékű biológiai lebonthatóság volt tapasztalható), akkor egy másik palacksorozat szükséges.

Egy másik nagy palackra is szükség van a kilevegőztetett, kb. harmadáig megtöltött ásványianyag-tápoldat befogadására, valamint a vizsgált anyag és a referenciaanyag bevitelére olyan végleges koncentrációban, amely általában megegyezik a többi nagy palackban lévő koncentrációval.

A nagy palackokban lévő oldatokat másodlagos kifolyó szennyvízzel (egy cseppel vagy körülbelül 0,05 ml-től 5 ml/l-ig terjedő mennyiséggel), vagy valamilyen más forrásból származó inokulummal, például folyóból vett vízzel (lásd az I.6.4.2. pontot) kell beoltani. Végül az oldatokat kilevegőztetett ásványianyag-tápoldattal kell kiegészíteni úgy, hogy kitöltsék a teljes térfogatot, az oldószer beviteléhez a palack aljáig leérő csövet kell használni, azért hogy megfelelő keveredést érjenek el.

VI.2.5. **A palackok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

Egy tipikus vizsgálatsorozatban a következő palackokra van szükség:

a vizsgált anyagot és az inokulumot (vizsgált szuszpenzió) tartalmazó legalább 10 palack,

csak inokulumot (inokulum vakpróba) tartalmazó legalább 10 palack,

referenciaanyagot és inokulumot (eljáráskontroll) tartalmazó legalább 10 palack,

és amikor szükséges, a vizsgált anyagot, referenciaanyagot és inokulumot (toxicitáskontroll) tartalmazó 6 palack. Annak biztosítására, hogy meghatározható legyen a „tíznapos ablak”, körülbelül kétszer ennyi palackra lehet szükség.

VI.2.6. **A kísérlet végrehajtása**

Minden egyes előkészített oldatot a megfelelő nagy palack alsó negyedéből kell kiadagolni (nem az aljából) egy cső segítségével a BOD-palackok megfelelő csoportjába úgy, hogy minden BOD-palack teljesen tele legyen. A palackokat ezután óvatosan meg kell ütögetni az esetleges légbuborékok eltávolítása céljából. A palackokat a nulla időpontban azonnal elemezni kell az oldott oxigén mennyiségének megállapítása céljából a Winkler- vagy az elektróda módszer segítségével. A palackok tartalma tartósítható a Winkler-módszerrel végrehajtott későbbi elemzéshez mangán(II)-szulfát és nátrium-hidroxid (első Winkler-reagens) hozzáadásával. A gondosan ledugózott palackokat, amelyek az oxigént barna mangán(III)-hidroxidként kötve tartalmazzák, sötétben, 10–20 °C hőmérsékleten, 24 óránál nem hosszabb ideig kell tárolni, mielőtt végrehajtanánk a Winkler-módszer hátralévő lépéseit. A többi, másodpéldányként szolgáló palackot is le kell fedni dugóval, gondoskodva arról, hogy ne legyen bennük légbuborék, e palackokat 20 °C hőmérsékleten, sötét helyen kell inkubálni. Minden egyes vizsgálatsorozatot egy teljes párhuzamos sorozatnak kell kísérnie az inokulum vakpróbaértékek meghatározására. A 28 napos inkubálási idő során bizonyos időközönként (legalább hetente) minden sorozatból legalább két palackot el kell távolítani az oldott oxigén mennyiségének meghatározása érdekében.

A hetenként vett mintáknak lehetővé kell tenniük valamely 14 napos időintervallum során a százalékos csökkenés kiértékelését, míg a 3-4 naponként történő mintavételnek lehetővé kell tennie a „tíznapos ablak" meghatározását, amelyhez körülbelül kétszer annyi palackra van szükség.

Nitrogéntartalmú anyagok vizsgálata esetében korrekciót kell végrehajtani a nitrifikáció következtében végbemenő oxigénfelvétel tekintetében. Ennek végrehajtására az O_2-elektróda módszert kell használni az oldott oxigén koncentrációjának meghatározására, ezután mintát kell venni a BOD-palackból a nitrit és a nitrát elemzésére. A nitrit és a nitrát koncentrációjának növekedéséből lehet kiszámítani a felhasznált oxigén mennyiségét (lásd az V. mellékletet).

VI.3. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JELENTÉS

VI.3.1. **Eredmények kiértékelése**

Először ki kell számítani az egyes időtartamok utáni BOD-t a vizsgált anyag oxigénfelvételéből kivonva az inokulum vakpróba oxigénfelvételét (mg O_2/liter). A korrigált oxigénfelvétel értékét el kell osztani a vizsgált anyag koncentrációjával (mg/liter), hogy megkapják az adott BOD-t mg oxigén/mg vizsgált anyagként. Ki kell számítani a százalékos biológiai lebonthatóságot az adott BOD-nek az adott ThOD-val (a II.2. mellékletnek megfelelően kiszámított) vagy COD-val (elemzéssel meghatározva, lásd a II.3. mellékletet) való elosztásával, azaz:

$$\text{BOD} = \frac{\text{a vizsgált anyag } O_2 \text{ felvétele, mg - ban - a vakpróba } O_2 \text{ felvétele mg - ban}}{\text{a palackbanlévõ vizsgált anyagmg - ban}}$$

$$= \text{mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag}$$

$$\%\ \text{lebomlás} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg BOD (mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag))}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg ThOD (mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag))}} \times 100$$

vagy

$$\%\ \text{lebomlás} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg BOD (mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag))}}{\text{COD (mg } O_2/\text{mg COD (mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag))}} \times 100$$

Meg kell jegyezni, hogy e két módszer nem ad szükségképpen azonos értéket; az első módszer használatát kell előnyben részesíteni.

Nitrogéntartalmú anyagok vizsgálatához a megfelelő ThOD-t kell használni (NH_4 vagy NO_3) annak megfelelően, hogy várható-e nitrifikáció, vagy sem. Ha előfordul nitrifikáció, de az nem teljes, ki kell számítani egy, a nitrifikálással elfogyasztott oxigént figyelembe vevő korrekciós tényezőt a nitrit és nitrát koncentrációjában létrejövő változásokból (V. melléklet).

VI.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Az inokulum vakpróbában az oxigéncsökkenésnek nem szabad 1,5 mg oldott oxigén/liternél nagyobbnak lennie 28 nap eltelte után. Ennél nagyobb értékek esetén meg kell vizsgálni a kísérleti módszereket. A vizsgált palackokban a maradékoxigén koncentrációjának soha nem szabad 0,5 mg/liter alá csökkennie. Az ilyen alacsony oxigénszintek csak akkor érvényesek, ha az oldott oxigén meghatározására használt módszer képes pontosan mérni az ilyen alacsony szinteket.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

VI.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

VI.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

ZÁRTPALACKOS VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció:… mg/liter

Kezdeti koncentráció a palackban:… mg/liter

ThOD vagy COD:… mg O_2/mg vizsgált anyag

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Koncentráció a reakciókeverékben:… mg/liter

5. **OLDOTT OXIGÉN (DO) MEGHATÁROZÁSA**

Módszer: Winkler-módszer/oldott oxigén mérése elektródával

Meghatározások a palackokból

Inkubálás időtartama (nap)			Oldott oxigén (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Vakpróba (vizsgált anyag nélkül)	1	C_1				
	2	C_2				
Átlag	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Vizsgált anyag	1	a_1				
	2	a_2				
Átlag	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

6. **KORREKCIÓ A NITRIFIKÁCIÓ FIGYELEMBEVÉTELÉVEL** (lásd az V. mellékletet)

Inkubálás időtartama (nap)	0	n_1	n_2	n_3
i. Nitrátkoncentráció (mg N/liter)				
ii. Nitrátkoncentráció változása (mg N/liter)	–			
iii. Oxigén-egyenértékben kifejezve (mg/liter)	–			
iv. Nitritkoncentráció (mg N/liter)				
v. Nitritkoncentráció változása (mg N/liter)	–			
vi. Oxigén-egyenértékben kifejezve (mg/liter)	–			
iii + vi. Teljes oxigén-egyenérték (mg/liter)	–			

7. **OLDOTTOXIGÉN-CSÖKKENÉS: % LEBOMLÁS**

	Csökkenés n nap után (mg/liter)			
	n_1	n_2	n_3	
1. PALACK: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
2. PALACK: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
1. PALACK: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{vizsgált anyag koncentrác iója} \times \text{ThOD kémiai anyag}}$				
2. PALACK: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{vizsgált anyag koncentrác iója} \times \text{ThOD kémiai anyag}}$				
$\%\ D\ \text{átlag}(^1) = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(1) Ne adagolható, ha jelentős különbség van az ismételt mérések között.

m_{to} = a vizsgálati palackban a 0 időpontban mért érték

m_{tx} = a vizsgálati palackban az x időpontban mért érték

m_{bo} = vakpróbában mért átlagos érték a 0 időpontban

m_{bx} = vakpróbában mért átlagos érték az x időpontban

A 6. szakaszban a iii + vi-ból származó nitrifikáció figyelembevételére is korrekciót kell alkalmazni.

8. **AZ OLDOTT OXIGÉN CSÖKKENÉSE AZ INOKULUM VAKPRÓBÁBAN**

A vakpróba által felvett oxigén: $(m_{bo} - m_{b28})$ mg/liter. Ez az oxigénfelvétel fontos a vizsgálat érvényességéhez. Ennek 1,5 mg/liternél kevesebbnek kell lennie.

VII. RÉSZ MITI-VIZSGÁLAT (C.4-F. módszer)

VII.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyag tenyészközegben létrehozott, különlegesen tenyésztett, nem adaptált mikroorganizmusokkal beoltott, folyamatosan kevert oldatában vagy szuszpenziójában az oxigénfelvételt 28 napos időtartamon át egy elsötétített, zárt, automata, 25 ± 1 °C hőmérsékleten tartott respirométerben mérik. A fejlődött szén-dioxidot nátronmésszel nyeletik el. A biológiai lebonthatóságot az elméleti oxigénfelvétel (ThOD) százalékos felvételeként (a vakpróba felvételének figyelembevételével) kell kifejezni. Az elméleti biológiai lebonthatóság mértékét is ki kell számítani az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő specifikus kémiai elemzésből, és/vagy más lehetőségként, a DOC-elemzésből.

VII.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

VII.2.1. **Készülék**

a) Szokásos körülmények között 6 darab, egyenként 300 ml-es és a CO_2 abszorbens elhelyezésére szolgáló készüléket tartalmazó palackkal felszerelt respirométer vagy automata elektrolitikus BOD-mérő;

b) Klímakamra és/vagy vízfürdő 25 °C ± 1 °C vagy ennél nagyobb pontosságú;

c) Membránszűrő készülék (választható);

d) Szénanalizátor (választható).

VII.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A következő törzsoldatokat kell elkészíteni analitikai minőségű reagensek és víz használatával (I.6.1.):

a)	Kálium-dihidrogén-foszfát, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikálium-hidrogén-foszfát, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrát Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	Ammónium-klorid, NH_4Cl	1,70 g
	Ezen anyagokat vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.	
	Az oldat ph-értékének 7,2-nek kell lennie.	
b)	Magnézium-szulfát-heptahidrát, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.	
c)	Kalcium-klorid, vízmentes, $CaCl_2$	27,50 g
	Vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.	
d)	Vas(III)klorid-hexahidrát, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.	

Az (a), (b), (c) és (d) oldatok közül mindegyikből 3 ml-t kell venni, és kiegészíteni 1 literre.

VII.2.3. **Az inokulum előkészítése**

Friss mintákat kell tíznél nem kevesebb helyről összegyűjteni, főleg olyan területekről, ahol különböző kémiai anyagokat használnak és bocsátanak ki. 1 liternyi szennyvíziszap, felszíni víz, talaj stb. mintákat kell begyűjteni olyan helyekről, mint például szennyvíztisztító, ipari szennyvízkezelő telepek, folyók, tavak, tengerek, és ezeket alaposan össze kell keverni. A lebegő, úszó anyag eltávolítása után a mintát állni kell hagyni, majd a felülúszó folyadék pH-ját 7 ± 1-re kell beállítani nátrium-hidroxid vagy foszforsav hozzáadásával.

Megfelelő térfogatú, szűrt felülúszó folyadékot eleveniszapot tartalmazó tartályba kell beletölteni, majd ezt körülbelül 23 ½ órán át kell levegőztetni. A levegőztetés leállítása után 30 perccel ki kell engedni a felülúszó folyadék teljes térfogatának körülbelül egyharmadát, és ennek helyére ezzel egyenlő térfogatú, glukózból, peptonból és kálium-foszfátból egyaránt 0,1 %-ot tartalmazó (7-es pH-jú) oldatot kell a leülepedett anyaghoz hozzáadni, ezután újra kell kezdeni a levegőztetést. Minden nap egyszer ismételik meg ezt az eljárást. A szennyvíziszap-fermentort a jól bevált gyakorlatnak megfelelően kell működtetni: a kifolyó szennyvízből nyert folyadékoknak tisztáknak kell lenniük, a hőmérsékletet 25 ± 2 °C-on kell tartani, a pH-nak 7 ± 1-nek kell lennie, a szennyvíziszapnak jól leülepedettnek kell lennie, elegendő levegőztetést kell biztosítani, hogy a keverék állandóan aerob állapotban legyen, jelen kell lenniük protozoáknak, és legalább minden harmadik hónapban meg kell vizsgálni a szennyvíziszap aktivitását valamely referenciaanyaggal összevetve. Szennyvíziszap nem használható inokulumként, amíg legalább egy hónap el nem telt a működtetés kezdete óta, de nem használható fel négy hónapnál később sem. Ezután rendszeres időközönként, minden három hónapban egyszer, legalább 10 helyről mintát kell venni.

Össze kell keverni a használatban lévő eleveniszap szűrt, felülúszó folyadékát a frissen gyűjtött, tíz forrásból származó keverék ezzel egyenlő térfogatú, szűrt, felülúszó folyadékával, és az egyesített folyadékot a fentieknek megfelelően tovább kell tenyészteni azért, hogy ugyanolyan aktivitáson tartsák a friss és régi iszapot. Az egységbe történő betöltés után 18–24 órával ki kell venni az inokulumként használni kívánt iszapot.

VII.2.4. **A lombikok előkészítése**

Az alábbi hat lombikot kell előkészíteni:

1. számú: a vizsgált anyag hígítóvízben, 100 mg/liter koncentrációban

2., 3. és 4. számú: a vizsgált anyag ásványianyag-tápoldatban, 100 mg/liter koncentrációban

5. számú: referenciaanyag (például anilin) ásványianyag-tápoldatban, 100 mg/liter koncentrációban

6. számú: csak ásványianyag-tápoldat.

A rosszul oldódó vizsgált anyagokat közvetlenül kell bevinni tömeg vagy térfogat alapon, vagy azokat a III. mellékletben leírt módon kell kezelni, kivéve hogy sem oldószereket, sem pedig emulgeátorokat nem szabad használni. A CO_2 abszorbenst az erre a célra biztosított specifikus tartókban kell bevinni minden lombikba. A pH-t 7,0-ra kell beállítani a 2., 3. és 4. lombikban.

VII.2.5. **A vizsgálat végrehajtása**

Be kell oltani a 2., 3. és 4. (vizsgált szuszpenzió), 5. (eljáráskontroll) és 6. (inokulum vakpróba) lombikokat kis térfogatú oltóanyaggal úgy, hogy 30 mg/l szuszpendált szilárd anyagot kapjanak. Az 1. lombikhoz, amely abiotikus kontrollként szolgál, nem kell inokulumot adni. Össze kell állítani a berendezést, ellenőrizni kell a légmentes záródást, elindítani a keverőt, majd megkezdeni az oxigénfelvétel mérését sötétséget biztosítva. Naponta ellenőrizni kell a hőmérsékletet, a keverőt és a coulometriás oxigénfelvétel-mérőt, valamint fel kell jegyezni a lombikok tartalmának minden változását. Le kell olvasni közvetlenül a hat lombikhoz tartozó oxigénfelvételt valamilyen megfelelő módszerrel, például a hatpontos szalagos, öníró műszer segítségével, amely létrehoz egy BOD-görbét. Az inkubációs periódus végén, általában a 28. napon, meg kell mérni a lombikok tartalmának pH-ját, és meg kell határozni a maradék vizsgált anyag és minden közbenső anyag koncentrációját, a vízben oldható anyagok esetében a DOC-koncentrációt (II.4. melléklet). Különleges gondossággal kell eljárni az illékony kémiai anyagok esetében. Ha nitrifikáció várható, meg kell határozni a nitrát és a nitrit koncentrációt, ha lehetséges.

VII.3. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JELENTÉS

VII.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

Adott időt követően el kell osztani a vizsgált anyag által felvett oxigén tömegét (mg) (az ugyanennyi idő után a vakpróba inokulumkontroll által felvett oxigén figyelembevételével végrehajtott korrekció után) a felhasznált vizsgált anyag tömegével. Ezzel megkapják a mg oxigén/mg vizsgált anyag hányadosaként kifejezett BOD-t, azaz:

$$BOD = \frac{\text{a vizsgált anyag O2 felvétele mg - a vakpróba O2 felvétele mg}}{\text{a lombikban lévõ vizsgált anyag mg}}$$

$$= \text{mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag}$$

A százalékos biológiai lebomlást a következő összefüggésből lehet kiszámítani:

$$\%\ \text{biológiai lebomlás} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD(mg } O_2\text{BOD (mg O2/mg kémiai anyag))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{ThOD (mg O2/mg kémiai anyag))}} \times 100$$

Keverékek esetében elemanalízisből lehet kiszámítani a ThOD-t ugyanúgy, mint egyszerű vegyületek esetén. A használandó ThOD-érték ($ThOD_{NH4}$ vagy $ThOD_{NO3}$) attól függ, hogy nincs jelen vagy teljes-e a nitrifikáció (II.2. melléklet). Azonban, ha előfordul nitrifikáció, de ez nem teljes, korrekciót kell végrehajtani annak az oxigénnek a figyelembevételével, amelyet a nitrit és a nitrát koncentrációiban létrejövő változásokból kiszámított nitrifikáció fogyaszt el (V. melléklet).

A százalékos elsődleges biológiai lebomlást a specifikus (kiindulási) anyag veszteségéből (lásd az I.7.2. pontot) lehet kiszámítani.

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Ha a vizsgált anyagra vonatkozóan veszteség fordult elő fizikai-kémiai okokra visszavezethetően az 1. lombikban, ezt fel kell jegyezni a jelentésbe, és a vizsgált anyagnak az e lombikban a 28. nap után meglévő koncentrációját (S_b) kell használni a százalékos biológiai lebomlás kiszámításához.

A DOC-meghatározások végrehajtásakor (választható) ki kell számítani a százalékos végső biológiai lebomlást a következő összefüggésből:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

úgy, ahogyan ezt az I.7.1. pont ismerteti. Ha DOC-csökkenés fordult elő az 1. lombikban, amely a fizikai-kémiai okokból bekövetkező csökkenést méri, akkor az e lombikban lévő DOC-koncentrációt kell használni a százalékos biológiai bomlás kiszámítására.

Minden eredményt fel kell jegyezni a mellékelt adatlapokra.

VII.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Az inokulum vakpróba oxigénfelvétele általában 20–30 mg O_2/l, és nem szabad 60 mg/l-nél nagyobbnak lennie 28 nap alatt. 60 mg/l-nél magasabb értékek esetében alaposan meg kell vizsgálni az adatokat és a kísérleti módszereket. Ha a pH-érték a 6–8,5 tartományon kívül van, és a vizsgált anyag oxigénfogyasztása kevesebb, mint 60 %, a vizsgálatot meg kell ismételni a vizsgált anyag kisebb koncentrációjával.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

Ha az anilinnek az oxigénfogyasztásból kiszámított százalékos lebomlása nem lépi túl a 40 %-ot 7 nap után és a 65 %-ot 14 nap után, a vizsgálatot érvénytelennek kell tekinteni.

VII.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

VII.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

MITI (I) VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat koncentráció:… mg/l, az anyagra vonatkoztatva

Kezdeti koncentráció a médiumban:… mg/l az anyagra vonatkoztatva

Reakciókeverék térfogata, V:… ml

ThOD:… mg O_2/l

4. **INOKULUM**

Iszapminta-vételi helyek:

1) …
2) …
3) …
4) …
5) …
6) …
7) …
8) …
9) …
10) …

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja az eleveniszapban mesterséges szennyvízzel végrehajtott akklimatizáció után =… mg/l

Eleveniszap térfogata 1 liter végső közegben =… ml

Szennyvíziszap koncentrációja a végső közegben =… mg/l

5. **OXIGÉNFELVÉTEL: BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG**

A vizsgálathoz használt respirométer típusa:

			Idő (nap)				
			0	7	14	21	28
O_2 felvétel (mg), vizsgált anyag	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 felvétel (mg), vakpróba	b						
korrigált O_2 felvétel (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
BOD mg vizsgált anyagonként	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	1. lombik					
		2. lombik					
		3. lombik					
% lebomlás $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Átlag [1]					

Megjegyzés: Hasonló formátumok használhatók a referenciavegyülethez.

[1] Nem átlagolható, ha jelentős eltérés van az ismételt méréssel kapott értékek között.

6. **SZÉNANALÍZIS** (választható)

Szénanalizátor:

Lombik	DOC				% DOC csökkenés	Átlag
	Mért		Korrigált			
Víz + vizsgált anyag	a				–	–
Iszap + vizsgált anyag	b1		b1–c			
Iszap + vizsgált anyag	b2		b2–c			
Iszap + vizsgált anyag	b3		b3–c			
Kontroll vakpróba	c		–		–	–

$$\% \text{ DOC csökkenés} : \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **SPECIFIKUS KÉMIAI ELEMZÉSBŐL SZÁRMAZÓ ADATOK**

	Vizsgált anyag maradékmennyisége a vizsgálat végén	% lebomlás
Vakpróba vizsgálat vízzel	Sb	
Beoltott közeg	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ lebomlás} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Ki kell számítani a % lebomlást az a1-es, a2-es, illetve a3-as lombikhoz.

8. **MEGJEGYZÉSEK**

Mellékelni kell az idő függvényében felrajzolt BOD-görbét, ha az rendelkezésre áll.

I. MELLÉKLET

RÖVIDÍTÉSEK ÉS FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

DO: Oldott oxigén: (mg/l) az oldott oxigén koncentrációja valamely vizes mintában.

BOD: Biokémiai oxigénigény: valamely vizsgált vegyület metabolizálásakor a mikroorganizmusok által felhasznált oxigén mennyisége; g oxigénfelvétel/g vizsgált vegyületként kifejezve is használják. (lásd a C.5. módszert)

COD: Kémiai oxigénigény (g): valamely vizsgált vegyületnek forró, savas, dikromáttal végrehajtott oxidálása során felvett oxigén mennyisége; megadja a jelen lévő oxidálható anyag mennyiségének mértékét; oxigénfelvétel (g)/vizsgált vegyület (g) formában is használják. (lásd a C.6. módszert)

DOC: Oldott szerves szén: az oldatban jelen lévő szerves szén, amely átszűrhető 0,45 mikrométeres szűrőn, vagy 15 percig tartó 40 000 $m.s^{-2}$ (±4 000 g) intenzitású centrifugálást követően a felülúszóban marad.

ThOD: Elméleti oxigénigény (mg): valamely vegyi anyag teljes oxidálásához szükséges teljes oxigénmennyiség; a molekuláris képletből számítják ki (lásd a II.2. mellékletet), és oxigénigény (mg)/vizsgált vegyület (mg) formában is használják.

$ThCO_2$: Elméleti széndioxid-felszabadulás (mg): az a számított szén-dioxid-mennyiség, amelynek létre kell jönnie a vizsgált vegyület ismert vagy mért széntartalmából, a teljes ásványosodás során; fejlődött szén-dioxid (mg)/vizsgált vegyület (mg) formában is használják.

TOC: Összes szerves szén: az oldatban és szuszpenzióban lévő szerves szén összege egy mintában.

IC: Szervetlen szén.

TC: Összes szén: a mintában jelen lévő szerves és szervetlen szén összege.

Elsődleges biológiai lebonthatóság:

valamely anyag kémiai szerkezetében biológiai folyamattal okozott változás, amely ezen anyag speciális tulajdonságának elvesztését eredményezi.

Teljes biológiai lebonthatóság (aerob):

az a lebomlási szint, amikor a vizsgált vegyületet teljesen felhasználják a mikroorganizmusok szén-dioxid, víz, ásványi sók és új mikrobás, sejtalkotórészek (biomassza) létrejöttét eredményezve.

Biológiailag könnyen lebontható:

olyan vegyi anyagok tetszőleges kategorizálása, amelyek megfeleltek bizonyos, a teljes biológiai lebonthatóság meghatározott szűrési vizsgálatok követelményeinek; e vizsgálatok olyan szigorúak, hogy feltételezhető, hogy az ilyen vegyületek vizes környezetekben aerob körülmények között biológiailag gyorsan és teljesen lebomlanak.

Biológiailag potenciálisan lebontható:

azoknak a vegyi anyagoknak a kategorizálása, amelyek esetében valamilyen elfogadott biológiai lebonthatóság vizsgálat során egyértelműen bizonyított a biológiai lebonthatóság (elsődleges vagy teljes).

Kezelhetőség:

biológiai szennyvízkezelés során vegyületek eltávolítás szempontjából történő kezelhetősége, anélkül, hogy káros hatással lennének a kezelési folyamat normál működésére. Általában a biológiailag gyorsan lebontható vegyületek kezelhetők, de nem minden biológiailag potenciálisan lebontható vegyület kezelhető. Abiotikus folyamatok is végbemehetnek.

Fáziskésés

valamely lebonthatósági vizsgálatban a beoltástól kezdődő és addig terjedő időtartam, amíg a lebomlási százalék legalább 10 %-ra növekedett. A fáziskésés gyakran nagyon változékony, és gyengén reprodukálható.

Lebomlási idő

a fáziskésés végétől kezdődő és addig tartó időtartam, amikor a lebomlás elérte a legnagyobb szintjének 90 %-át.

Tíznapos ablak

a 10 %-os lebomlás elérését közvetlenül követő 10 nap.

II. MELLÉKLET

MEGFELELŐ ÖSSZEFOGLALÓ PARAMÉTEREK KISZÁMÍTÁSA ÉS MEGHATÁROZÁSA

A választott módszertől függően, szükség lesz bizonyos összefoglaló paraméterekre. A következő szakasz ezen értékek levezetését írja le. E paraméterek használatát az egyes módszerek ismertetik.

1. **Széntartalom**

A széntartalmat az ismert elemi összetételből számító ki vagy a vizsgált anyag elemi analízise határozza meg.

2. **Elméleti oxigénigény (ThOD)**

Az elméleti oxigénigény (ThOD) kiszámítható, ha ismert vagy elemi analízissel meghatározásra került az elemi összetétel. A következő vegyület esetében:

$$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$$

nitrifikáció nélkül,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16[2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

vagy nitrifikációval,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16[2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Kémiai oxigénigény (COD)**

A kémiai oxigénigényt (COD) a C.6. módszernek megfelelően kell meghatározni.

4. **Oldott szerves szén (DOC)**

Az oldott szerves szén (DOC): bármely vegyi anyagnak vagy vizes keveréknek egy 0,45 mikrométeres szűrőn átszűrhető szerves szén része.

A vizsgálati tartályokból mintákat vesznek, és a mintákat azonnal átszűrik megfelelő membránszűrő segítségével. A szűrlet első 20 ml-jét (a mennyiség csökkenthető kisméretű szűrők használatakor) elvetik. Befecskendezés esetén 10–20 ml-t vagy ennél kevesebbet (a térfogat a szénanalizátorhoz szükséges mennyiségtől függ) megőriznek a szén elemzéséhez. A DOC-koncentrációt olyan szervesszén-analizátor segítségével határozzák meg, amely a vizsgálatban használt kezdeti DOC-koncentráció 10 %-ával egyenértékű vagy annál kisebb szénkoncentráció pontos mérésére képes.

Azok a szűrt minták, amelyek nem elemezhetők ugyanazon a munkanapon, hűtőszekrényben, 2–4 °C hőmérsékleten 48 óráig vagy –18 °C hőmérséklet alatt ennél hosszabb ideig tárolhatók.

Megjegyzések:

A *membránszűrőket* gyakran impregnálják felületaktív anyagokkal a hidrofilizáció biztosítására. Így tehát a szűrő akár több mg olyan oldható szerves szenet is tartalmazhat, amely befolyásolhatja a biológiai lebonthatóság vizsgálat eredményeit. A felületaktív anyagok és más, oldható szerves vegyületek eltávolíthatók a szűrőkről három, egyenként egy órás időtartamon keresztül deionizált vízben történő forralással. A szűrők ezután egy héten át vízben tárolhatók. Eldobható szűrőbetétek használatakor minden egyes adagot ellenőrizni kell, meg kell győződni arról, hogy nem szabadít-e fel oldható szerves szenet.

A membránszűrő típusától függően adszorpció útján visszamaradhat a vizsgált vegyi anyag. Ezért ajánlott ezt megelőzni.

Szűrés helyett 15 percen át 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 *g*) melletti *centrifugálás* alkalmazható a TOC és DOC megkülönböztetésére. Ez a módszer nem megbízható 10 mg DOC/l alatti kezdeti koncentrációnál, mivel vagy nem távozik el minden baktérium, vagy újraoldódik a szén a baktériumplazma részeként.

SZAKIRODALOM

– Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th edition, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, 65.

– Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

– DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

– Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13 (1), 169.

III. MELLÉKLET

ROSSZUL OLDHATÓ ANYAGOK BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁGÁNAK FELMÉRÉSE

A rosszul oldható anyagokkal végrehajtott biológiai lebonthatósági vizsgálatokban a következő szempontoknak kell különleges figyelmet szentelni.

Míg a homogén folyadékok ritkán járnak mintavételi problémákkal, ajánlatos a szilárd anyagokat megfelelő eszközökkel homogenizálni a homogenitás hiánya miatti hibák elkerülésére. Különleges gondossággal kell eljárni, amikor vegyi anyagok keverékeiből vagy nagy mennyiségű szennyeződéseket tartalmazó anyagokból néhány mg-nyi reprezentatív minta szükséges.

A vizsgálatok során különböző formájú keverés használható. Gondosan kell eljárni, csak olyan mértékű keverést szabad alkalmazni, amely éppen elegendő a vegyi anyag diszpergált állapotban tartásához, és amelynél nem lép fel túlmelegedés, túlzott habzás vagy a baktériumok mechanikai károsodása.

A vegyi anyag stabil diszperzióját létrehozó emulgeálószer használható. Ez nem lehet toxikus a baktériumra, és a vizsgálati körülmények között nem szabad biológiailag lebomlania vagy habzást okoznia.

Az oldószerekre ugyanaz a követelmény érvényes, mint az emulgeálószerekre.

Nem ajánlott szilárd hordozóanyagok használata szilárd vizsgált anyagokhoz, ezek olajos anyagokhoz lehetnek alkalmasak.

Segédanyagok, ilyenek például az emulgeálószerek, oldószerek és hordozóanyagok használatakor segédanyag-vakpróbát kell végrehajtani.

A három respirometriás vizsgálat – CO_2, BOD, MITI – közül bármelyik használható a rosszul oldható vegyületek biológiai lebonthatóságának vizsgálatára.

SZAKIRODALOM

– de Morsier, A. et. al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

– Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

IV. MELLÉKLET

AZ OLTÓANYAGRA FELTEHETŐEN TOXIKUS VEGYI ANYAGOK BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁGÁNAK FELMÉRÉSE

Amennyiben valamely vegyi anyagot könnyű biológiai lebonthatóság vizsgálatának vetik alá, és úgy tűnik, hogy biológiailag nem lebontható, a következő eljárás ajánlatos, amennyiben különbséget kell tenni a gátlás és a közömbösség között. (Reynolds és munkatársai, 1987)

Hasonló vagy azonos oltóanyagot kell használni a toxicitás- és a biológiai lebonthatóság vizsgálatokhoz.

A könnyű biológiai lebonthatóság megállapítására irányuló vizsgálatokban vizsgált vegyi anyagok toxicitásának értékeléséhez az iszaplégzésintenzitás-gátlási (aktivált szennyvíziszap légzésgátlási vizsgálat – 88/302/EGK irányelv), BOD- és/vagy növekedésgátló módszerek vagy ezek kombinációjának alkalmazása tűnik megfelelőnek.

Amennyiben el kell kerülni a toxicitásra visszavezethető gátlást, ajánlott a biológiailag gyors lebonthatóság megállapítására végrehajtott vizsgálatot a toxicitás vizsgálatban kapott EC_{50}-es értékek 1/10-ét (vagy az EC_{20}-értékeknél kisebbet) el nem érő vizsgáltanyag-koncentrációt alkalmazni. 300 mg/l-nél nagyobb EC_{50}-es értékű vegyületek nem valószínű, hogy toxikus hatással rendelkeznek a biológiailag gyors lebonthatóság vizsgálatában.

A 20 mg/l-nél kisebb EC_{50}-értékek valószínűleg súlyos problémákat jelentenek a későbbi vizsgálat esetében. Alacsony vizsgálati koncentrációkat kell alkalmazni, amely szükségessé teszi a szigorú és érzékeny zártpalackvizsgálat használatát vagy a ^{14}C – címkézésű anyag használatát. Más megoldásként, valamely akklimatizált oltóanyag a vizsgált anyag magasabb koncentrációjának használatát teheti lehetővé. Az utóbbi esetben azonban elvész a biológiailag könnyű lebonthatóság vizsgálatának különös követelménye.

SZAKIRODALOM

Reynolds, I. et. al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

V. MELLÉKLET

A NITRIFIKÁCIÓ OKOZTA OXIGÉNFELVÉTEL FIGYELEMBEVÉTELE

Nitrogént nem tartalmazó vizsgált anyagok biológiai lebonthatóságának oxigénfelvétellel történő értékelésében a nitrifikáció figyelmen kívül hagyása miatti hibák kismértékűek (5 %-nál nem nagyobbak) még akkor is, ha az oldószerben lévő ammónium-N oxidációja ingadozik a vizsgálati anyagot tartalmazó és a vakpróbatartályok között. Nitrogéntartalmú vizsgált anyagok esetében azonban súlyos hibák jelentkezhetnek.

Amennyiben a nitrifikáció bekövetkezett, de ez nem teljes, a reakciós keverék mért oxigénfelvétele helyesbíthető az ammónium nitritté és nitráttá oxidálásában felhasznált oxigén mennyiségével, ha a nitrit és a nitrát inkubálása során a koncentrációváltozásokat a következő egyenletek segítségével határozzák meg:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Teljes:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Az 1. egyenletből az ammónium-kloridban (NH_4Cl) lévő 28 g nitrogén oxigénfelvétele a nitritté oxidálódás során 96 g, azaz a szorzótényező 3,43 (96/28). Hasonlóképpen a 3. egyenletből látható, hogy a 28 g nitrogén oxigénfelvétele, miközben nitráttá oxidálódik 128 g, vagyis a szorzótényező 4,57 (128/28).

Mivel a reakciók *szekvenciálisak*, amelyeket meghatározott és egymástól különböző baktériumfajták hajtanak végre, lehetőség van a nitrit koncentrációjának növelésére vagy csökkentésére; az utóbbi esetben létrehozható a nitrát egyenértékű koncentrációja. Így a nitrátképződés során felhasznált oxigén értéke 4,57, szorozva a nitrát koncentrációjának növekedésével, míg a nitrit képződésével kapcsolatos oxigén értéke 3,43, szorozva a nitrit koncentrációjának növekedésével, vagy a koncentrációja csökkenése esetén az oxigén-veszteség −3,43 szorozva a koncentráció csökkenéssel.

Azaz:

$$\text{A nitrátképződés során felhasznált } O_2 = 4{,}57 \times \text{a nitrátkoncentráció növekedése} \quad (4)$$

és

$$\text{Nitritképződés során felhasznált } O_2 = 3{,}43 \times \text{a nitritkoncentráció növekedése} \quad (5)$$

és

$$\text{Nitritkoncentráció csökkenésekor az elvesztett } O_2 = -3{,}43 \times \text{a nitritkoncentráció csökkenése} \quad (6)$$

úgy, hogy

$$\text{Nitrifikációból adódó } O_2 \text{ felvétel} = \pm\ 3{,}43 \times \text{nitritkoncentráció változás} + 4{,}57 \times \text{a nitrát-koncentráció növekedése} \quad (7)$$

és így

$$\text{C-oxidációból adódó } O_2 \text{ felvétel} = \text{teljes megfigyelt felvétel} - \text{nitrifikációból adódó felvétel} \quad (8)$$

Amennyiben csak a teljes oxidált nitrogént határozzák meg, a nitrifikáció miatti oxigénfelvétel első megközelítésben 4,57 × oxidált N-növekedés.

A C-oxidáció következtében létrejövő oxigénfelvétel helyesbített értékét ezután összehasonlítják a ThOD NH_3-mal a II. mellékletben bemutatott számításnak megfelelően.

C.5. LEBOMLÁS – BIOKÉMIAI OXIGÉNIGÉNY

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E módszer célja a szilárd vagy folyékony szerves anyagok biokémiai oxigénigényének (BOD) meghatározása.

A módszerrel kapott adatok vízben oldható vegyületekre vonatkoznak; azonban elvben illékony vegyületek és vízben kis mértékben oldható vegyületek is vizsgálhatók.

A módszer csak az olyan szerves anyagokhoz alkalmazható, amelyek a vizsgálatban használt koncentráció mellett nincsenek gátló hatással a baktériumokra. Amennyiben a vizsgált anyag a vizsgálati koncentráció mellett nem oldható, különleges intézkedéseket kell alkalmazni a vizsgált anyag megfelelő mértékű diszpergálása céljából, például az ultrahangos diszpergálás használatával.

A vizsgált anyag toxicitására vonatkozó információk hasznosaknak bizonyulhatnak az alacsony vizsgálati eredmények értelmezése és a megfelelő vizsgálati koncentráció kiválasztásában.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A BOD: az adott anyagot tartalmazó oldat meghatározott mennyiségének meghatározott körülmények között biokémiai oxidációjához szükséges oldott oxigén tömege.

Az eredményeket BOD gramm/vizsgált anyag gramm formában fejezik ki.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Célszerű megfelelő referenciaanyag használata az oltóanyag aktivitásának ellenőrzése érdekében.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Alkalmas oldószerben feloldott vagy diszpergált, előre meghatározott anyagmennyiséget mikroorganizmusokkal beoltanak, és sötét helyen, állandó, meghatározott környezeti hőmérsékleten inkubálnak.

A BOD-t az oldott oxigéntartalomnak a vizsgálat elején és végén mért különbségével határozzák meg. A vizsgálat időtartamának legalább 5 napnak és legfeljebb 28 napnak kell lennie.

E vizsgálattal párhuzamosan vizsgált anyagot nem tartalmazó vakpróbát kell elvégezni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A BOD-meghatározás nem tekinthető valamely anyag biológiai lebonthatósága érvényes meghatározásának. E vizsgálat csak screening-vizsgálatnak tekinthető.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Elkészítik az anyag oldatát vagy diszperzióját az alkalmazott módszerhez megfelelő BOD-koncentráció megállapítása érdekében. Ezután megfelelő nemzeti vagy nemzetközi szabványt alkalmazásával meghatározzák a BOD-t.

2. **ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS**

A kiválasztott standardizált módszernek megfelelően kiszámítják az induló oldat BOD-értékét, majd átszámítják ezt BOD (gramm)/vizsgált anyagra (gramm).

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

Meg kell adni az alkalmazott módszert.

A biokémiai oxigénigényt legalább három érvényes mérés átlagaként kell meghatározni.

Minden, az eredmények értelmezése szempontjából lényeges információt és megjegyzést meg kell adni, különös tekintettel az anyag szennyeződéseire, fizikai állapotára, toxikus hatásaira és jellemző összetételére, amely befolyásolhatja az eredményt.

A vizsgálati jelentésben fel kell tüntetni, ha a biológiai nitrifikáció gátlása céljából segédanyagot használnak.

4. **SZAKIRODALOM**

Szabványok jegyzéke, például:

NF T 90 – 103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. LEBOMLÁS – KÉMIAI OXIGÉNIGÉNY

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E módszer célja szilárd vagy folyékony szerves anyagok kémiai oxigénigényének (COD) mérése tetszőleges, standardizált módon megállapított laboratóriumi körülmények mellett.

Az anyag képletére vonatkozó információk hasznosak e vizsgálat végrehajtásához és a kapott eredmények értelmezéséhez (például klórozott szerves vegyületek, szerves vegyületek vassói, halogénsók).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A kémiai oxigénigény valamely anyag oxidálhatóságának a mértéke, meghatározott laboratóriumi körülmények között az anyag által felhasznált valamilyen oxidáló reagenssel egyenértékű oxigénmennyiségben kifejezve.

Az eredményt COD (gramm)/vizsgált anyag (gramm) formában fejezik ki.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagokat alkalmazni. Ezeknek elsősorban a módszer megfelelőségének időnkénti ellenőrzésére és arra kell szolgálniuk, hogy lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Vízben feloldott vagy diszpergált, előre meghatározott anyagmennyiséget oxidálnak erős kénsavoldatban lévő kálium-dikromáttal, ezüst-szulfátot használva katalizátorként, két órán át reflux mellett. Szabványosított, vas-ammónium-szulfáttal végrehajtott titrálással meghatározzák a maradék dikromátot.

Klórtartalmú anyagok esetében hozzáadnak higany-szulfátot (*) a klorid okozta zavaró hatás csökkentésére.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A meghatározás tetszőleges módja miatt a COD-t „oxidálhatósági mérőszámnak" kell tekinteni, és mint ilyet, gyakorlati módszerként használják szerves anyag mérésére.

A klorid zavarhatja e vizsgálatot; továbbá a szervetlen redukáló- vagy oxidálószerek is befolyásolhatják a COD-meghatározást.

Néhány gyűrűs vegyületet és sok illékony anyagot (például alacsony szénatomszámú zsírsavak) nem teljesen oxidál ez a vizsgálat.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Elkészítik az anyag oldatát vagy diszperzióját 250 és 600 mg/l közötti COD létrehozására.

Megjegyzések:

Rosszul oldódó és nem diszpergálható anyagok esetében kimérhető körülbelül 5 mg COD-nek megfelelő, finomra porított anyag vagy folyékony anyag, és vízzel együtt a kísérleti berendezésbe helyezhető.

Gyakran és különösen a rosszul oldódó anyagok esetében a kémiai oxigénigény (COD) előnyösen meghatározható a módszer egyik változatával, azaz egy nyomáskiegyenlítővel ellátott zárt rendszerben (H. Kelkenberg, 1975). E módosított változattal gyakran mennyiségileg sikeresen határozhatók meg azok a vegyületek, amelyek a hagyományos módszerrel csak nehezen határozhatók meg – ilyen például az ecetsav. Azonban ez a módszer sem alkalmas piridin esetében. Amennyiben az (1) szakirodalomban előírt módon a kálium-dikromát koncentrációt 0,25 N-re (0,0416 M) növelik, ez megkönnyíti az anyag 5–10 mg-os mennyiségének közvetlen bemérését, amely lényeges a vízben rosszul oldódó anyagok COD-értékének meghatározásához [(2) szakirodalom)].

A COD-t ezután valamilyen alkalmas nemzeti vagy nemzetközi szabványt követve kell meghatározni.

2. **ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS**

A kísérleti lombikban lévő COD-t a kiválasztott standardizált módszer segítségével kell kiszámítani és átszámítani COD (gramm)/vizsgált anyag (gramm) formába.

(*) A higanysókat tartalmazó oldatokat használat után megfelelő módon kell kezelni, hogy a higany ne kerüljön ki a környezetbe.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

Meg kell adni a használt referenciamódszert.

A kémiai oxigénigényt legalább három mért érték középértékeként kell megadni. Minden, az eredmények értelmezése szempontjából lényeges információt és megjegyzést meg kell adni, különösen az anyag szennyeződéseivel, fizikai állapotával és jellemző tulajdonságaival kapcsolatosakat (amennyiben ismertek), amelyek hatással lehetnek az eredményekre.

Amennyiben a klorid befolyásoló hatásának minimalizálása céljából higany-szulfát használnak, ezt is meg kell adni a vizsgálati jelentésben.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

A szabványok jegyzéke, például:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

C.7. LEBOMLÁS – ABIOTIKUS LEBOMLÁS, HIDROLÍZIS A pH FÜGGVÉNYÉBEN

1. **MÓDSZER**

Ez a módszer az OECD-vizsgálati irányelven (1) alapul.

1.1. BEVEZETÉS

A hidrolízis fontos reakció az abiotikus lebomlás szabályozásában. Ez a reakció különösen a biológiailag rosszul lebontható anyagok esetében lényeges; emellett hatással lehet valamely anyag környezetben való perzisztenciájára.

A legtöbb hidrolízisreakció *pszeudo*-elsőfokú reakció, és ebből következően a felezési idők függetlenek a koncentrációtól. Ez rendszerint lehetővé teszi a laboratóriumi koncentrációban talált eredmények extrapolálását a környezeti állapotokra.

Ezenkívül már több példát is közöltek a (2) szakirodalomban, amely megfelelő megegyezést mutat a különböző típusú vegyi anyagok esetében a tiszta és természetes vizek esetében kapott eredményekkel.

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag gőznyomásáról.

A módszer csak vízben oldható anyagokra alkalmazható. A szennyeződések hatással lehetnek az eredményekre.

A vegyi anyagok hidrolitikus viselkedését a környezetben leggyakrabban előforduló pH-értékek mellett (pH 4–9) kell vizsgálni.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A hidrolízis valamely RX vegyi anyag vízzel való reakciójára utal. Ez a reakció az X-csoportnak OH-val történő nettó cseréjével mutatható be:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \quad [1]$$

A következő összefüggés adja meg azt a sebességet, amellyel csökken az RX koncentrációja:

$$\text{sebesség} = k\,[H_2O]\cdot[RX] \quad [2]$$

Mivel a vegyi anyaggal összehasonlítva a víz nagyobb arányban van jelen, az ilyen típusú reakciót rendszerint *pszeudo* elsőfokú reakciónak hívják, ahol a megfigyelt sebességi állandót az alábbi összefüggés adja meg:

$$k_{obs} = k \times [H_2O] \quad [3]$$

Ez a konstans a következő kifejezés segítségével határozható meg egy pH-érték és egy T hőmérséklet esetében:

$$k_{obs}\ \frac{2{,}303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

ahol:

t = idő,

C_o = az anyag koncentrációja a nulladik időpontban,

C_t = az anyag koncentrációja a t időpontban, és

2,303 = a természetes és 10-es alapú logaritmus közötti váltószám.

A koncentrációk gramm/liter-ben vagy mol/liter-ben vannak kifejezve.

A $k_{megfigyelt}$ állandónak a dimenziója (idő)$^{-1}$.

A $t_{1/2}$ „felezési idő” a vizsgált anyag koncentrációjának 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges idő, azaz:

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

A (4) és (5) egyenletből levezethető hogy:

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{obs} \quad [6]$$

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagokat alkalmazni. Ezeknek elsősorban a módszer megfelelőségének időnkénti ellenőrzésére és arra kell szolgálniuk, hogy lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

A következő anyagokat használták referenciaanyagként (1):

Acetil-szalicilsav (aszpirin)

Tiofoszforsav, 0,0-dietil 0-(6-metil-2-(1-metiletil)4-pirimidinil) észter. (Dimpilát, diazinon)

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az anyagot kis koncentrációban feloldják vízben; szabályozzák a pH-t és a hőmérsékletet.

Az anyag koncentrációinak csökkenését az idő előrehaladtával valamilyen alkalmas analitikai eljárással követik.

A koncentráció logaritmusát az idő függvényében ábrázolják, és ha ez az ábra egyenes vonalat ad, a meredeksége az elsőfokú sebességállandót adja meg (lásd a 2. pontot).

Amennyiben nem lehetséges valamely adott hőmérséklethez tartozó sebességállandó közvetlen meghatározása, általában a sebességállandó hőmérsékletfüggését meghatározó Arrhenius-összefüggéssel meg lehet becsülni a konstanst. Megfelelő hőmérséklet alapján meghatározott sebességállandó logaritmusának K abszolút hőmérséklet reciprokának függvényében meghatározott lineáris görbéjéből lehetőség van az olyan sebességállandó extrapolálására, amelyet közvetlenül nem lehetett meghatározni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A (2) szakirodalom szerint a szerves vegyületek 13 osztályában a hidrolízis sebességállandóinak mérései nagy pontosságúak lehetnek.

Az ismételhetőség különösen a pH és a hőmérséklet szabályozásától függ, a mikroorganizmusok jelenléte és különös esetekben az oldott oxigén koncentrációja hatással lehet rá.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Reagensek**

1.6.1.1. *Pufferoldatok*

A vizsgálatot három pH-értéken hajtják végre: 4,0, 7,0 és 9,0.

Ehhez pufferoldatokat kell készíteni reagens tisztaságú vegyi anyagok és desztillált vagy deionizált steril víz használatával. A pufferrendszerekre néhány példát a függelék mutat.

A vizsgálathoz használt pufferrendszer hatással lehet a hidrolízis sebességére; amennyiben van rá bizonyíték, egy másik pufferrendszert kell alkalmazni. A (2) szakirodalomban borát- vagy acetátpufferek használata javasolt foszfát helyett.

Amennyiben a vizsgálat során használt hőmérsékleten nem ismert a pufferoldatok pH-értéke, ez meghatározható kiválasztott hőmérsékleten kalibrált pH-mérővel ± 0,1 pH egység pontossággal.

1.6.1.2. *Vizsgált oldatok*

A vizsgált anyagot fel kell oldani a kiválasztott pufferben, és a koncentrációnak nem szabad 0,01 M-nél vagy a telítettségi koncentráció felénél nagyobbnak lennie, amennyiben ez utóbbi alacsonyabb.

Vízzel elegyíthető szerves oldószerek használata csak vízben kismértékben oldható anyagokhoz ajánlott.

Az oldószer mennyiségének 1 %-nál kisebbnek kell lennie, és nem szabad befolyásolnia a hidrolízis folyamatát.

1.6.2. **Készülék**

Ledugózott üveglombikokat kell használni, de el kell kerülni a zsír használatát a csiszolt csatlakozási felületen.

Amennyiben a vegyi anyag vagy a pufferrendszer illékony, vagy ha a vizsgálatot magas hőmérsékleteken készülnek végrehajtani, légmentesen zárt vagy válaszfallal zárt csövek használatát kell előnyben részesíteni, és kerülni kell a nagy légtereket.

1.6.3. **Analitikai módszer**

A módszernek olyan sajátos módszernek kell lennie, amely lehetővé teszi a vizsgált anyag meghatározását a vizsgált oldat koncentrációiban alkalmazható több, megfelelő analitikai módszer kombinációja is.

A vizsgálathoz használt analitikai módszer az anyag természetétől függ, megfelelően pontosnak és érzékenynek kell lennie a kezdeti koncentráció 10 %-os csökkenésének észlelésére.

1.6.4. **Vizsgálati körülmények**

A vizsgálatokat szabályozott hőmérsékletű, zárt helyen vagy a kiválasztott hőmérséklettől legfeljebb ± 5 °C-kal eltérő, állandó hőmérsékletű fürdőben hajtják végre. A hőmérsékletet ± 0,1 °C-on belül tartják és mérik. A fotolitikus zavaró hatást megfelelő eszközökkel kell elkerülni.

A könnyen oxidálható anyagok esetében az oldott oxigént el kell távolítani (például az oldat elkészítése előtt öt percig nitrogén vagy argon buborékoltatásával).

1.6.5. **Vizsgálati eljárás**

1.6.5.1. *Elővizsgálat*

Minden anyag esetében elővizsgálatot kell végrehajtani 50 ± 0,5 °C hőmérsékleten három: 4,0, 7,0 és 9,0 pH-érték mellett. Megfelelő számú mérést kell végrehajtani annak felmérésére, hogy minden egyes pH-értéken és 50 °C hőmérsékleten a felezési idő ($t_{1/2}$) kisebb-e 2,4 óránál, vagy 10 %-os hidrolízisnél kevesebbet figyelnek-e meg öt nap után. [Ezek az értékek becsülhetően 1 napnál rövidebb felezési időnek, illetve 1 évnél hosszabb felezési időnek felelnek meg a környezeti körülményeknek (25 °C) jobban megfelelő körülmények között.]

Amennyiben az előzetes vizsgálat azt jelzi, hogy a vizsgált anyag 50 %-a vagy ennél nagyobb része hidrolizált 2,4 óra alatt 50 °C hőmérsékleten, vagy kevesebb, mint 10 %-a hidrolizált öt nap után a három pH-érték (4, 7 és 9) valamelyikénél, további vizsgálat nem szükséges.

Más esetekben és minden olyan pH-értéken, amelynél ez a feltétel nem teljesült, az 1. vizsgálatot kell elvégezni.

1.6.5.2. *1. vizsgálat*

Az 1. vizsgálatot egyetlen, lehetőleg 50 ± 0,5 °C hőmérsékleten, és lehetőleg steril körülmények között hajtják végre olyan pH-értékek mellett, amelyekhez az előzetes vizsgálat további vizsgálatok szükségességét jelezte.

A megadott pH-értékek mellett a *pszeudo* elsőfokú viselkedés vizsgálata érdekében elegendő számú mintát (legalább négyet) kell kiválasztani a hidrolízis 20–70 %-os tartományának lefedésére.

Az 1. vizsgálat végrehajtásakor alkalmazott valamennyi pH-érték esetében meghatározzák a reakció fokát.

25 °C hőmérséklet melletti sebességállandó becslése:

A kísérlet végrehajtásának módjára vonatkozó döntés attól függ, hogy lehet-e következtetni az 1. vizsgálatból arra, hogy a reakció *pszeudo* elsőfokú-e vagy sem.

Amennyiben nem lehet biztosan következtetni az 1. vizsgálatból arra, hogy a reakció *pszeudo* elsőfokú-e, további kísérleteket kell végrehajtani a 2. vizsgálatban leírt módon.

Amennyiben biztosan lehet következtetni az 1. vizsgálatból arra, hogy a reakció *pszeudo* elsőfokú, további vizsgálatokat kell végrehajtani a 3. vizsgálatban leírtaknak megfelelően. [Más lehetőségként, különleges körülmények között, a 25 °C hőmérséklet melletti sebességállandók kiszámíthatók az 1. vizsgálatból kapott eredmények segítségével számított, 50 °C melletti konstansokból (lásd a 3.2. pontot).]

1.6.5.3 *2. vizsgálat*

Ezt a vizsgálatot minden olyan pH-érték esetében végrehajtják, amelyhez az 1. vizsgálat eredményei kimutatták, hogy szükség van a 2. vizsgálat végrehajtására:

– vagy 40 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten,

– vagy két 50 °C feletti, egymástól legalább 10 °C-kal eltérő hőmérsékleten.

Minden pH-értékhez és hőmérséklethez, amelyek esetében a 2. vizsgálatot végrehajtják, legalább hat, megfelelően elosztott adatpontot kell használni úgy, hogy a hidrolízis mértéke 20 és 70 % közötti tartományban legyen.

Minden pH-érték és a hozzá rendelt hőmérséklet esetén a vizsgálatot kétszer kell elvégezni. Amennyiben a 2. vizsgálatot két, 50 °C feletti hőmérsékleten hajtják végre, az ismételt vizsgálatot lehetőleg e közül a két hőmérséklet közül az alacsonyabbikon kell végrehajtani.

Minden olyan pH-érték és hőmérséklet esetében, ahol a 2. vizsgálatot hajtják végre, lehetőség szerint meg kell adni a felezési idő ($t_{1/2}$) grafikus becslését.

1.6.5.4. *3. vizsgálat*

Ezt a vizsgálatot minden olyan pH-érték esetében végrehajtják, amelyhez az 1. vizsgálat eredményei kimutatták, hogy szükség van a vizsgálat végrehajtására:

– vagy 40 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten,

– vagy két 50 °C feletti, egymástól legalább 10 °C-kal eltérő hőmérsékleten.

Minden pH-értékhez és hőmérséklethez, amelyek esetében a 3. vizsgálatot végrehajtják, három adatpontot kell választani, az elsőt a nulladik időpontban, a másodikat és harmadikat 30 %-ot meghaladó fokú hidrolízis mellett; a $k_{megfigyelt}$ konstanst és a $t_{1/2}$-et ki kell számítani.

2. **ADATOK**

Pszeudo elsőfokú viselkedés esetében minden vizsgált pH-értékhez és hőmérséklethez a $k_{megfigyelt}$ értékei a koncentráció logaritmusainak az idő függvényében ábrázolt görbéiből kaphatók meg a következő kifejezés segítségével:

$$k_{obs} = - \text{ meredekség} \times 2{,}303 \qquad [7]$$

Ezenkívül a $t_{1/2}$ a [6] egyenletnek megfelelően számítható ki.

Adott esetben a $k_{25\ °C}$ értékét az Arrhenius-féle egyenlet alkalmazásával kell kiszámolni.

Nem *pszeudo* elsőfokú viselkedés esetében lásd a 3.1. pontot.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

– az anyag jellemzőit,

– a referenciaanyagokkal kapott valamennyi eredményt,

– a vizsgálathoz használt analitikai módszer elvét és részleteit,

– minden egyes vizsgálat esetében: a hőmérsékletet, pH-értéket, a pufferösszetételt és egy, valamennyi koncentráció-idő adatpontot tartalmazó táblázatot,

– *pszeudo* elsőfokú reakció esetében a $k_{megfigyelt}$ és $t_{1/2}$ értékeit és ezek számítási eljárását,

– nem *pszeudo* elsőfokú reakció esetében az eredményeket az idő függvényében a koncentráció logaritmusaként kell ábrázolni,

– az eredmények értelmezéséhez szükséges minden információt és megfigyelést.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A vizsgált anyag sebességállandójának (25 °C-on) elfogadható értékei kiszámíthatók, feltéve hogy az aktivációs energia kísérleti úton meghatározott értékei már rendelkezésre állnak a vizsgált anyag homológjaihoz, továbbá ha reálisan feltételezhető, hogy a vizsgált anyag aktivációs energiája ugyanolyan nagyságrendű.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 111. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges

(2) W. Mabey and T. Mill, „Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions," J. Phys. Chem. Ref. Data, 1978, vol. 7 (2), 383–415.

Függelék

PUFFERKEVERÉKEK

A. **CLARK ÉS LUBS**

Az ezekben a táblázatokban közölt pH-értékeket potenciális mérésekből számították ki Sörensen-féle standard egyenletek használatával. A tényleges pH-érték 0,04 egységgel nagyobb, mint a táblázatban közölt értékek.

Összetétel	pH
0,1 M kálium-hidrogén-ftalát + 0,1 N HCl 20 °C hőmérsékleten	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig	3,8
0,1 M kálium-hidrogén-ftalát + 0,1 N NaOH 20 °C hőmérsékleten	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig	4,2
0,1 M monokálium-foszfát + 0,1 N NaOH 20 °C hőmérsékleten	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig	7,0
35,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig	7,2

0,1 M H_3BO_3 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH 20 °C hőmérsékleten	
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsav 100 ml-ig	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsav 100 ml-ig	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsav 100 ml-ig	9,2

B. **KOLTHOFF ÉS VLEESHOUWER**

Összetétel	pH
0,1 M monokálium-citrát és 0,1 N NaOH 18 °C hőmérsékleten (kis mennyiségű timolkristályt kell hozzáadni a penészgombák szaporodásának megakadályozására)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig	4,2

C. **SÖRENSEN**

0,05 M borax + 0,1 N HCl

Összetétel		pH			
ml borax	ml HCl	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M borax + 0,1 N NaOH

Összetétel		pH			
ml borax	ml NaOH	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12