31992L0069

KOMISIJOS DIREKTYVA 92/69/EEB

1992 m. liepos 31 d.

septynioliktąjį kartą su technikos pažangos derinanti Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1967 m. birželio 27 d. Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, ([1]) pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyva 92/32/EEB, ([2]) ypač į jos 28 ir 29 straipsnius,

kadangi Direktyvos 67/548/EEB 3 straipsnio 1 dalyje ir 1988 m. birželio 7 d. Tarybos direktyvos 88/379/EEB dėl valstybių narių įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų preparatų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo su paskutiniais pakeitimais, ([3]) padarytais Komisijos direktyva 90/492/EEB, ([4]) 3 straipsnyje numatyta, kad medžiagų ir preparatų fizikocheminės savybės, toksiškumas ir ekologinis toksiškumas nustatomas Direktyvos 67/548/EEB V priede nurodytais metodais,

kadangi Direktyvos 67/548/EEB V priedo tekstas šiuo metu yra paskelbtas dviem dalimis, kurių viena yra Komisijos direktyvos 84/449/EEB ([5]) priedas, o kita – Komisijos direktyvos 88/302/EEB ([6]) priedas;

kadangi, siekiant atsižvelgti į technikos plėtrą, būtina peržiūrėti Komisijos direktyvos 84/449/EEB priede pateiktus bandymų metodus;

kadangi, siekiant atsižvelgiant į technikos plėtrą, taip pat būtina peržiūrėti jūros dumblių inhibicijos tyrimo metodą, kurį šiuo metu galima rasti Komisijos direktyvos 88/302/EEB priede ir šia proga perkelti šį tyrimo metodą į Direktyvos 84/449/EEB priedą;

kadangi pagal Tarybos direktyvą 86/609/EEB dėl valstybių narių įstatymų ir kitų teisės aktų, susijusių su eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsauga, suderinimo ([7]) reikėtų iki minimumo sumažinti bandymams naudojamų gyvūnų skaičių;

kadangi šios direktyvos nuostatos atitinka Direktyvų dėl techninių kliūčių panaikinimo pavojingų medžiagų ir preparatų prekybos srityje derinimo su technikos pažanga komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Direktyvos 84/449/EEB priedas keičiamas šios direktyvos priedu.

([1]) OL L 196, 1967 8 16, p.1.
([2]) OL L 154, 1992 6 5, p. 1.
([3]) OL L 187, 1988 7 16, p.14.
([4]) OL L 275, 1990 10 5, p. 35.
([5]) OL L 251, 1984 9 19, p. 1.
([6]) OL L 133, 1988 5 30, p. 1 ir OL L 136, 1988 6 2, p.20.
([7]) OL L 358, 1986 12 18, p.1.

2 straipsnis

Šia direktyva panaikinamas Direktyvos 88/302/EEB priede apibūdintas jūros dumblių inhibicijos tyrimo metodas.

3 straipsnis

Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję iki 1993 m. spalio 30 d., įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

Valstybės narės, priimdamos šias nuostatas, daro jose nuorodą į šią direktyvą arba tokia nuoroda daroma jas oficialiai skelbiant.

Tokios nuorodos darymo tvarką nustato valstybės narės.

4 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1992 m. liepos 31 d.

Komisijos vardu

Karel VAN MIERT

Komisijos narys

PRIEDAS

1992 m. liepos 31 d. Komisijos direktyvos Nr. 92/669/EEB, septynioliktąjį kartą dėl technikos pažangos derinančios Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo, priedas [1]

[1] OL L 383, 1992 12 29, p.113.

TURINYS

ĮVADAS

A DALIS: FIZIKINIŲ IR CHEMINIŲ SAVYBIŲ NUSTATYMO METODAI..... 9

A.1. Lydimosi/užšalimo temperatūra..... 9
A.2. Virimo temperatūra..... 19
A.3. Santykinis tankis..... 25
A.4. Garų slėgis..... 30
A.5. Paviršiaus įtemptis..... 51
A.6. Tirpumas vandenyje..... 58
A.8. Pasiskirstymo koeficientas..... 67
A.9. Pliūpsnio temperatūra..... 78
A.10. Degumas (kietosios medžiagos)..... 80
A.11. Degumas (dujos)..... 83
A.12. Degumas (sąlytis su vandeniu)..... 85
A.13. Piroforinės kietųjų medžiagų ir skysčių savybės..... 89
A.14. Sprogstamosios savybės..... 91
A.15. Užsidegimo temperatūra (skysčiai ir dujos)..... 102
A.16. Kietųjų medžiagų santykinė užsidegimo temperatūra..... 103
A.17. Oksidacinės savybės (kietosios medžiagos)..... 106

B DALIS: TOKSIŠKUMO NUSTATYMO METODAI..... 111

Bendrasis įvadas: b dalis..... 111
B.1. Ūminis toksiškumos (oralinis)..... 114
B.1. Dar kartą ūminis toksiškumas (oralinis) – fiksuotų dozių metodas..... 117
B.2. Ūminis toksiškumas (inhaliacinis)..... 121
B.3. Ūminis toksiškumas (per odą)..... 125
B.4. Ūminis toksiškumas (odos dirginimas)..... 128
B.5. Ūminis toksiškumas (akių dirginimas)..... 131
B.6. Odos jautrumas (sensibilizavimas)..... 135
B.7. Kartotinių dozių (28 dienos) toksiškumas (oralinis)..... 140
B.8. Kartotinių dozių (28 dienos) toksiškumas (inhaliacinis)..... 144
B.9. Kartotinių dozių (28 dienos) toksiškumas (per odą)..... 148
B.10. Mutageniškumas (žinduolių citogenetinis bandymas *in vitro*)..... 152
B.11. Mutageniškumas (žinduolių kaulų čiulpų citogenetinis bandymas *in vivo*, chromosomų analizė). 155
B.12. Mutageniškumas (mikrobranduolinis bandymas)..... 158
B.13. Mutageniškumas (*echerichia coli* – grįžtamosios mutacijos analizė)..... 161
B.14. Mutageniškumas (*salmonella typhimurium* – grįžtamosios mutacijos analizė)..... 164

C DALIS. EKOTOKSISKUMO NUSTATYMO METODAI..... 167

C.1. Ūmus toksiškumo poveikis žuvims..... 167
C.2. Ūmus toksiškumo poveikis dafnijoms..... 176
C.3. Dumblių inhibavimo bandymas..... 183
C.4. „Lengvo“ biologinio skaidomumo matavimas..... 191
II dalis. DOC išnykimo bandymas (C.4-A metodas)..... 198
III dalis. Modifikuotas OECD atrankos bandymas (C.4-B metodas)..... 201
IV dalis. CO2 išsiskyrimo bandymas (C.4-C metodas)..... 206
V dalis. Manometrinis respirometrinis bandymas (C.4-D metodas)..... 211
VI dalis. Uždarosios kolbos bandymas (C.4-E metodas)..... 215
VII dalis. M.I.T.I. bandymas (C.4-F metodas)..... 220
PRIEDAI..... 225
C.5. Skaidymas. Biocheminis deguonies poreikis..... 230
C.6. Skaidymas. Cheminis deguonies poreikis..... 231
C.7. Skaidymas. Abiotinio hidrolizinio skaidymo kaip ph funkcijos nustatymas..... 233

ĮVADAS

Priede pateikti bandymo metodai Direktyvos 79/831/EEB VII ir VIII prieduose išvardytoms fizikocheminėms, toksikologinėms ir ekotoksikologinėms savybėms nustatyti. Metodai pagrįsti kompetentingų tarptautinių institucijų (ypač OECD) pripažintais ir rekomenduotais metodais.

Kai tokių metodų nėra, buvo pritaikyti nacionaliniai standartai arba mokslininkų sutarti metodai. Paprastai bandymai turėtų būti daromi su medžiaga kaip apibrėžta Direktyvoje. Reikėtų kreipti dėmesį į priemaišų įtaką bandymų rezultatams.

Kai šio priedo metodai netinka tirti tam tikrą savybę, pranešėjas turi pagrįsti taikytą pakaitinį metodą.

Bandymai ir tyrimai su gyvūnais daromi pagal nacionalines nuostatas ir turi būti atsižvelgiama į žmoniško elgesio su gyvūnais principus ir į naujausius pasiekimus gyvūnų gerovės srityje tarptautiniu mastu.

Iš kelių lygiaverčių bandymo metodų pasirenkamas metodas, kuriame naudojamas mažiausias gyvūnų skaičius.

A DALIS: FIZIKINIŲ IR CHEMINIŲ SAVYBIŲ NUSTATYMO METODAI

A.1. LYDYMOSI/UŽŠALIMO TEMPERATŪRA

1. **METODAS**

Didžioji dauguma apibūdintų metodų yra pagrįsti OECD Test Guidelines (1). Pagrindiniai principai yra pateikti 2 ir 3 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Apbūdintieji metodai ir prietaisai turi būti taikomi nustatant medžiagų lydymosi temperatūrą, netaikant jokių apribojimų jų grynumo laipsniui.

Metodo parinkimas priklauso nuo svarbiausių tiriamos medžiagos savybių. Todėl ribinis koeficientas priklausys nuo to, ar galima, ar negalima tą medžiagą lengvai, sunkiai pulverizuoti, ar visai neįmanoma.

Kai kurioms medžiagoms labiau tinka nustatyti užšalimo arba kietėjimo temperatūrą, jų nustatymo standartai taip pat yra įtraukti į šį metodą.

Jeigu dėl tam tikrų medžiagos savybių minėtų parametrų neįmanoma tinkamai išmatuoti, gali tikti skystėjimo temperatūra.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Lydymosi temperatūra – tai temperatūra, kuriai esant fazinis virsmas iš kietosios būsenos į skystąją vyksta atmosferos slėgyje ir ši temperatūra tiksliai atitinka užšalimo temperatūrą.

Kadangi daugumos medžiagų fazinis virsmas vyksta virš temperatūrų ribos, ji dažnai apibūdinama kaip lydymosi riba.

Vienetų atitikmenys (iš K į °C)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsijaus temperatūra, Celsijaus laipsniai (°C).

T: termodinaminė temperatūra, Kelvinai (K).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nebūtina naudoti etalonines medžiagas visais tais atvejai, kai tiriama nauja medžiaga. Pirmiausia jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant šio metodo veikimą ir siekiant palyginti gautus rezultatus su kitų metodų rezultatais.

Kai kurios kalibravimo medžiagos yra pateiktos nuorodose (4).

1.4. TYRIMO METODO ESMĖ

Nustatoma fazinio virsmo iš kietosios būsenos į skystąją arba iš skystosios būsenos į kietąją temperatūra (temperatūrų riba). Praktikoje šildant/aušinant bandomos medžiagos mėginį atmosferos slėgyje, yra nustatoma pradinė lydymosi/užšalimo temperatūra ir galutinės lydymosi/užšalimo stadijos temperatūra. Apibūdinami penki metodų tipai, būtent: kapiliarinis metodas, karštosios pakopos metodai, užšalimo temperatūros nustatymas, terminės analizės metodai ir skystėjimo temperatūros nustatymas (pvz., naftos riebalų).

Tam tikrais atvejais vietoje lydymosi temperatūros yra patogu matuoti užšalimo temperatūrą.

1.4.1. **Kapiliarinis metodas**

1.4.1.1. *Lydymosi temperatūros matavimo prietaisai su skysčių vonia*

Nedidelis kiekis gerai susmulkintos medžiagos dedamas į kapiliarinį vamzdelį ir tvirtai užspaudžiamas. Kapiliarinis vamzdelis šildomas kartu su termometru, lydymosi metu nustatomas mažesnis nei apytikriai 1 K/min. temperatūros pakitimas. Nustatoma pradinė ir galutinė lydymosi temperatūra.

1.4.1.2. *Lydymosi temperatūros matavimo prietaisai su metaliniu bloku*

Taip kaip apibūdinta 1.4.1.1 punkte, išskyrus tai, kad kapiliarinis vamzdelis ir termometras dedami į pašildytą metalinį bloką, ir jie stebimi per bloke esančias skylutes.

1.4.1.3. *Detekcija fotoelementu*

Kapiliariniame vamzdelyje esantis mėginys yra automatiškai šildomas metaliniame cilindre. Šviesos spindulys nukreipiamas pro medžiagą per cilindre esančią skylutę į tiksliai kalibruotą fotoelementą. Daugumos besilydančių medžiagų optinės savybės keičiasi nuo matinių iki skaidrių. Į fotoelementą patenkančios šviesos intensyvumas didėja ir siunčia sustabdymo signalą į skaitmeninį indikatorių, kuris rodo kaitinimo kameroje esančio platininio varžinio termometro temperatūrą. Šis metodas netinka kai kurioms ryškią spalvą turinčioms medžiagoms.

1.4.2. **Lydymosi pakopos**

1.4.2.1. *Kofler karštasis strypas*

Kofler karštajame strype naudojami du metalo gabalai, turintys skirtingą terminį laidumą, šildomi elektra, kur strypas sukonstruojamas taip, kad temperatūros gradientas būtų beveik linijinis per visą jo ilgį. Karštojo strypo temperatūra gali svyruoti nuo 283 iki 573 K kartu su specialiu prietaisu temperatūrai parodyti, kurį sudaro judantis velenėlis su rodykle ir kilpelė, skirta konkrečiam strypui. Kad būtų nustatyta lydymosi temperatūra, labai plonas medžiagos sluoksnis dedamas tiesiai ant karšto strypo paviršiaus. Po kelių sekundžių tarp skystosios ir kietosios fazės pasirodo ryški skiriamoji linija. Temperatūra skiriamojoje linijoje yra užrašoma rodyklę nustatant taip, kad ji būtų ant linijos.

1.4.2.2. *Lydymosi temperatūros mikroskopas*

Keletas mikroskopo karštųjų stadijų yra naudojamos nustatant lydymosi temperatūrą esant labai mažam medžiagos kiekiui. Daugumoje karštųjų stadijų temperatūra yra matuojama jautriu termoelementu, bet kartais naudojami ir gyvsidabrio termometrai. Tipiškame mikroskopiniame karštosios pakopos lydymosi temperatūros nustatymo aparate yra kaitinimo kamera, kurią sudaro metalinė plokštelė, virš kurios ant šliaužiklio yra dedamas mėginys. Metalinės plokštelės centre yra skylė, per kurią patenka šviesa nuo mikroskopo apšvietimo veidrodėlio. Naudojimo metu kamera uždengiama stiklo plokštele, kad į erdvę, kurioje yra mėginys, nepatektų oro.

Mėginio kaitinimą reguliuoja reostatas. Atliekant labai tikslius matavimus optinėmis anizotropinėmis medžiagomis, gali būti naudojama poliarizuota šviesa.

1.4.2.3. *Menisko metodas*

Šis metodas yra visų pirma naudojamas poliamidams.

Temperatūra, kurioje išnyksta silikoninės alyvos meniskas, esantis tarp karštosios pakopos ir uždengiančiojo stiklo, prie kurio pridėtas poliamidinis pavyzdys, yra nustatoma vizualiai.

1.4.3. **Užšalimo temperatūros nustatymo metodas**

Mėginys dedamas į specialų mėgintuvėlį, kuris įdedamas į aparatą užšalimo temperatūrai nustatyti. Aušinimo metu mėginys atsargiai ir nuolatos maišomas, o jo temperatūra yra matuojama atitinkamais intervalais. Kai kelis kartus užrašius rodmenis temperatūra nusistovi, ši temperatūra (su pakoreguota termometro paklaida) yra užrašoma kaip užšalimo temperatūra.

Peršaldymo turi būti vengiama norint išlaikyti pusiausvyrą tarp kietosios ir skystosios fazės.

1.4.4. **Terminė analizė**

1.4.4.1. *Diferencinė terminė analizė (DTA)*

Pagal šią metodiką medžiagos ir etaloninės medžiagos temperatūrų skirtumas yra užrašomas kaip temperatūros funkcija, kai tai medžiagai ir etaloninei medžiagai yra naudojama ta pati kontroliuojamos temperatūros programa. Jeigu mėginyje įvyksta virsmas, kurio metu pakinta entalpija, tokį pasikeitimą parodo endoterminis (lydymosi) arba egzoterminis (užšalimo) nukrypimas nuo užrašytos temperatūros pagrindinės linijos.

1.4.4.2. *Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija (DSK)*

Pagal šią metodiką įvesties energijų skirtumas medžiagoje ir etaloninėje medžiagoje užrašomas kaip temperatūros funkcija, kai tai medžiagai ir etaloninei medžiagai yra naudojama ta pati kontroliuojamos temperatūros programa. Ši energija – tai energija, reikalinga nustatyti medžiagos ir etaloninės medžiagos nuliniam temperatūrų skirtumui. Jeigu mėginyje įvyksta virsmas, kurio metu pakinta entalpija, tokį pasikeitimą parodo endoterminis (lydymosi) arba egzoterminis (užšalimo) nukrypimas nuo užrašyto šilumos srauto pagrindinės linijos.

1.4.5. **Skystėjimo temperatūra**

Šis metodas buvo sukurtas naudoti naftos alyvoms, jis taip pat tinka aliejinėms medžiagoms, kurių lydymosi temperatūra yra žema.

Iš anksto pašildytas mėginys atvėsinamas ypač greitai ir yra tikrinamas 3 K intervalais srauto charakteristikoms nustatyti. Žemiausia temperatūra, kuriai esant nustatytas medžiagos judėjimas, yra užrašoma kaip skystėjimo temperatūra.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Įvairių metodų, naudojamų lydymosi temperatūrai/lydymosi intervalui nustatyti, pritaikomumas ir tikslumas yra pateikti šioje lentelėje:

LENTELĖ: METODŲ TAIKOMUMAS

A. Kapiliarinis metodas

Matavimo metodas	Medžiagos, kurias galima pulverizuoti	Medžiagos, kurių negalima lengvai pulverizuoti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas [1]	Galiojantis standartas
Lydymosi temperatūros prietaisai su skysčių vonia	Taip	Tik keletas	273 – 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Lydymosi temperatūrų priemonės su metaliniu bloku	Taip	Tik keletas	293 - >573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Detekcija fotoelementu	Taip	Keletas, naudojant prietaisus s	253 – 573 K	± 0,5 K	

[1] Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

B. Karštosios stadijos ir užšalimo metodai

Matavimo metodas	Medžiagos, kurias galima pulverizuoti	Medžiagos, kurių negalima lengvai pulverizuoti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas (1)	Galiojantis standartas
Kofler karštasis strypas	Taip	Ne	283 – > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Lydymosi temperatūros mikroskopas	Taip	Tik keletas	273 - >573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Menisko metodas	Ne	Ypač poliamidams	293 – >573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Užšalimo temperatūros nustatymo metodai	Taip	Taip	223 – 573 K	± 0,5 K	Pvz., BS 4695

(1) Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

C. Terminė analizė

Matavimo metodas	Medžiagos, kurias galima pulverizuoti	Medžiagos, kurių negalima lengvai pulverizuoti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas (1)	Galiojantis standartas
Diferencinė terminė analizė	Taip	Taip	173 – 1273 K	Iki 600 K ± 0,5 K iki 1273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija	Taip	Taip	173 – 1273 K	Iki 600 K ± 0,5 K iki 1273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

D. Skystėjimo temperatūra

Matavimo metodas	Medžiagos, kurias galima pulverizuoti	Medžiagos, kurių negalima lengvai pulverizuoti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas (1)	Galiojantis standartas
Skystėjimo temperatūra	Naftos alyvoms ir alyvinėms medžiagoms	Naftos alyvoms ir alyvinėms medžiagoms	223 – 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

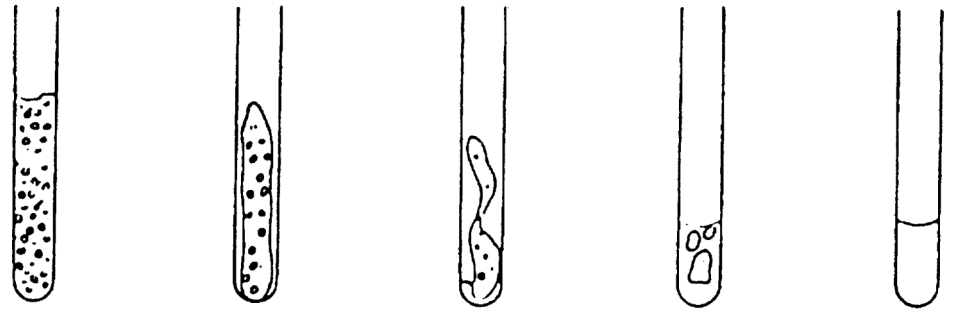
1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

Beveik visų tyrimo metodų darbo eiga yra aprašyta tarptautiniuose ir nacionaliniuose standartuose (žr. 1 priedėlį).

1.6.1. **Kapiliariniai metodai**

Jeigu smulkiai pulverizuotų medžiagų temperatūra yra didinama pamažu, paprastai būna lydymosi pakopos, parodytos 1 pav.

1 paveikslas



A pakopa B pakopa C pakopa D pakopa E pakopa

A pakopa (lydymosi pradžia): smulkūs lašeliai vienodai prilimpa prie vidinės kapiliarinio vamzdelio sienelės.

B pakopa: tarp mėginio ir vidinės sienelės atsiranda tarpas dėl lydinio suslūgimo.

C pakopa: suslūgęs mėginys pradeda smukti žemyn ir skystėti.

D pakopa: paviršiuje susidaro meniskas, bet matomo kiekio mėginys lieka kietas.

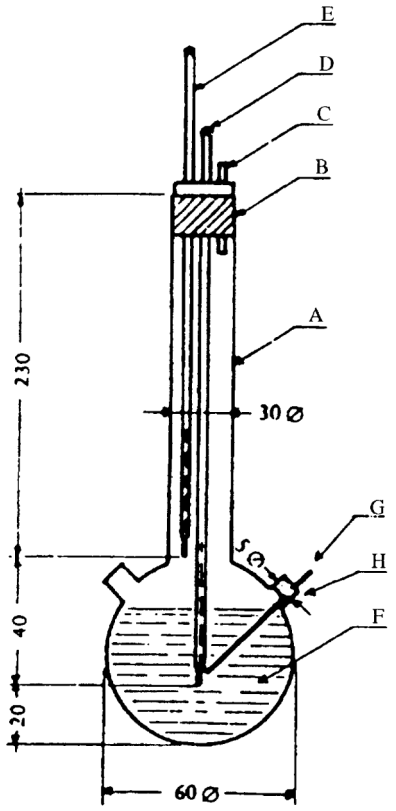
E pakopa: (baigiamoji lydymosi pakopa): kietųjų dalelių nebėra.

Lydymosi temperatūros nustatymo metu temperatūra yra užrašoma lydymosi pradžioje ir baigiamojoje stadijoje.

1.6.1.1. *Lydymosi temperatūros prietaisai su skysčių vonios aparatu*

2 pav. parodytas standartizuotas stiklinis lydymosi temperatūros nustatymo aparatas, (JIS K 0064); visos charakteristikos pateiktos milimetrais.

2 pav.



A: Matavimo indas
B: Kamštis
C: Ventiliatorius
D: Termometras
E: Papildomas termometras
F: Vonios skystis
G: Stiklinis kapiliaras, 80 – 100 mm ilgio, vidinis skersmuo – 1,0 ± 0,2 mm sienelės storis – 0,2-0,3
H: Šoninis vamzdelis

Vonios skystis:

Turi būti parenkamas atitinkamas skystis. Skysčio pasirinkimas priklauso nuo lydymosi temperatūros, kurią reikia nustatyti., pvz., parafininė alyva – temperatūra ne aukštesnė kaip 473 K, silikoninė alyva – temperatūra ne aukštesnė kaip 573 K.

Jei lydymosi temperatūra aukštesnė negu 523 K, gali būti naudojamas mišinys iš trijų dalių sieros rūgšties ir dviejų dalių kalio sulfato (pagal masių santykį). Jeigu naudojamas toks mišinys, reikia imtis atitinkamų atsargumo priemonių.

Termometras:

Turi būti naudojami tik tokie termometrai, kurie atitinka žemiau toliau pateiktų arba lygiaverčių standartų reikalavimus:

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

Darbo eiga:

Sausoji medžiaga grūstuvėje sutrinama į smulkius miltelius ir dedama į kapiliarinį vamzdelį, kurio vienas galas užlydytas, kad jį užpildžius, medžiagos sluoksnis, stipriai ją suslėgus, būtų 3 mm storio. Norint gauti tolygiai suslėgtą mėginį, kapiliarinį vamzdelį iš apytikriai 700 mm aukščio reikėtų vertikalia kryptimi paleisti per stiklinį vamzdelį ant laikrodžio stiklo.

Užpildytas kapiliarinis vamzdelis dedamas į vonią taip, kad vidurinė gyvsidabrio termometro galiuko dalis liestų vamzdelį toje vietoje, kur yra mėginys. Paprastai kapiliarinis vamzdelis dedamas į aparatą, kurio temperatūra yra apie 10 K žemesnė negu lydymosi temperatūra.

Vonios skystis šildomas taip, kad temperatūra didėtų apie 3 K/min. Skystį reikia maišyti. Kai temperatūra yra 10 K žemesnė negu laukiama lydymosi temperatūra, temperatūros didėjimo greitis yra nustatomas taip, kad neviršytų 1 K/min.

Apskaičiavimas:

Lydymosi temperatūra apskaičiuojama taip:

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

kai:

T – = koreguota lydymosi temperatūra, K

T_D – = D termometro parodymai, K

T_E – = E termometro parodymai, K

n – = D termometro gyvsidabrio stulpelio padalų skaičius ant iškilusios jo dalies.

1.6.1.2. *Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su metaliniu bloku*

Aparatūra:

Ją sudaro:

— cilindrinis metalinis blokas, kurio viršutinė dalis yra tuščia ir sudaro ertmę (žr. 3 pav.).

— metalinis kaištis su dviem ar keliomis skylutėmis, per kurias kapiliaras įstatomas į metalinį bloką,

— metalinio bloko kaitinimo sistema, kuri, pavyzdžiui, yra tiekiama per bloke įtaisytą elektrinę varžą,

— reostatas energijos padavimui reguliuoti, jeigu kaitinimui naudojama elektra,

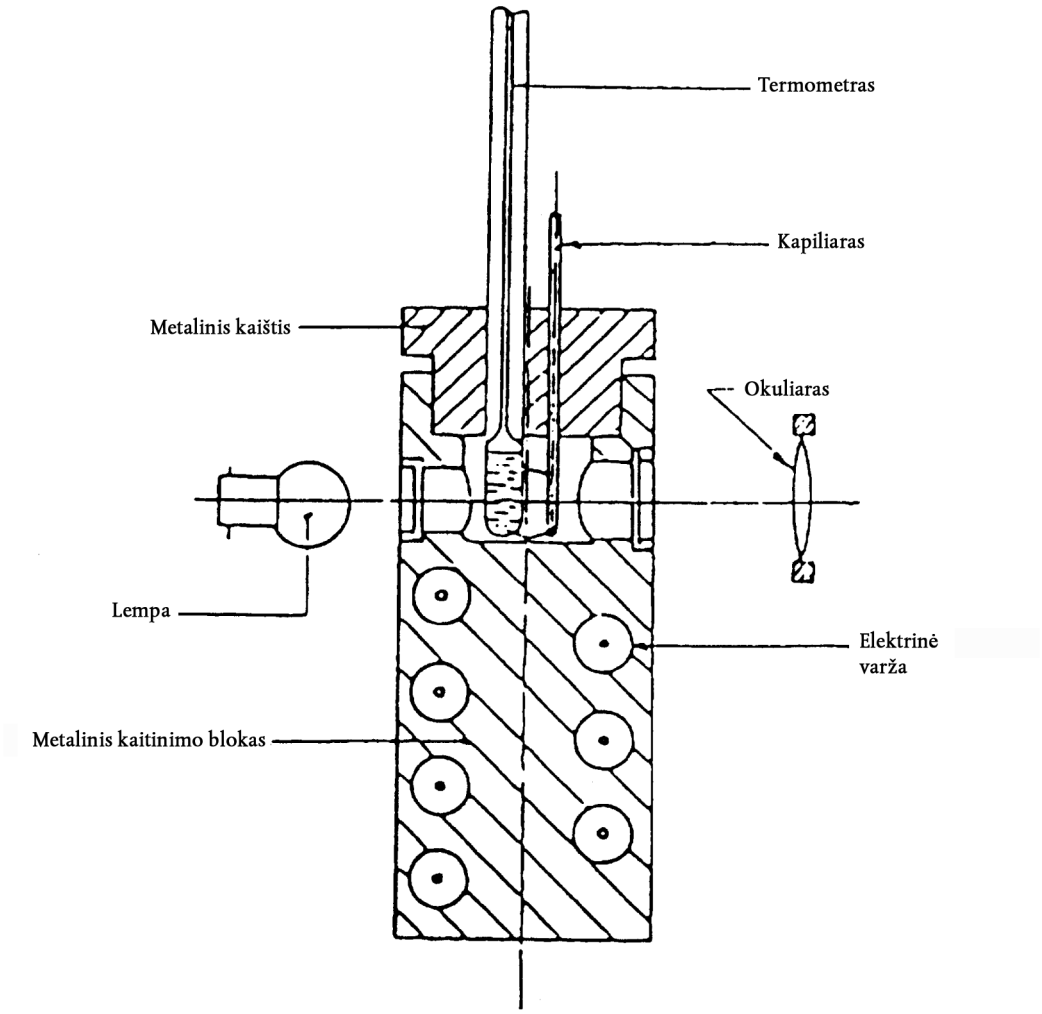
— keturi langeliai iš šilumai atsparaus stiklo išorinėse kameros sienose, esantys visiškai priešingose pusėse statmenai vienas kitam. Priešais vieną iš šių langelių yra mikroskopo okuliaras kapiliariniam vamzdeliui stebėti. Kiti trys langeliai naudojami aparato vidui apšviesti lempomis,

— kaitrai atsparaus stiklo kapiliarinis vamzdelis vienu uždaru galu (žr. 1.6.1.1).

Termometras:

Žiūrėti 1.6.1.1 punkte nurodytus standartus. Taip pat naudojami panašaus tikslumo termoelektriniai matavimo prietaisai.

3 paveikslas



1.6.1.3. *Detekcija fotoelementu*

Aparatūra ir darbo eiga:

Aparatūrą sudaro metalinė kamera su automatizuota kaitinimo sistema. Trys kapiliarai užpildomi pagal 1.6.1.1 ir dedami į krosnį.

Aparatui kalibruoti galima kelis kartus linijiniu būdu padidinti temperatūrą, o atitinkamai padidinta temperatūra yra elektriniu būdu suderinama pagal iš anksto pasirinktą konstantą ir tiesinį koeficientą. Savirašiai parodo tikrąją krosnies temperatūrą bei kapiliaruose esančios medžiagos temperatūrą.

1.6.2. **Karštosios stadijos**

1.6.2.1. *Kofler karštasis strypas*

Žr. priedėlį.

1.6.2.2. *Lydymosi temperatūros mikroskopas*

Žr. priedėlį.

1.6.2.3. *Menisko metodas (poliamidai)*

Žr. priedėlį.

Kaitinimo sparta lydymosi temperatūroje turėtų būti mažesnė kaip 1 K/min.

1.6.3. **Užšalimo temperatūros nustatymo metodai**

Žr. priedėlį.

1.6.4. **Terminė analizė**

1.6.4.1. *Diferencinė terminė analizė*

Žr. priedėlį.

1.6.4.2. *Diferencinė pražvalgos kalorimetrija*

Žr. priedėlį.

1.6.5. **Skystėjimo temperatūros nustatymas**

Žr. priedėlį.

2. **DUOMENYS**

Kai kuriais atvejais reikalinga termometro korekcija.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— naudotas metodas,

— tikslios medžiagos charakteristikos (identiškumas ir priemaišos) ir išankstinio gryninimo pakopa, jeigu tokia yra,

— tikslumo apskaičiavimas.

Ne mažiau kaip dviejų matavimų, esančių apskaičiavimo tikslumo diapazone (žr. lenteles), vidurkis ataskaitoje pateikiamas kaip lydymosi temperatūra.

Jeigu temperatūrų skirtumas pradinėje ir baigiamojoje lydymosi pakopoje atitinka tam metodui nustatytas tikslumo ribas, baigiamosios lydymosi pakopos temperatūra yra lydymosi temperatūra; kitais atvejais pateikiamos dvi temperatūros reikšmės.

Jeigu medžiaga suyra arba sublimuojasi dar nepasiekus lydymosi temperatūros, fiksuojama temperatūra, kuriai esant toks reiškinys vyksta.

Turi būti pateikiama visa informacija ir pastabos, kurios gali būti svarbios duomenų aiškinimui, ypač apie medžiagoje esančias priemaišas ir jos fizikinę būseną.

4. **LITERATŪRA**

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

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

3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods 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 laboartories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

Priedėlis

Papildomos techninės informacijos galima ieškoti toliau nurodytuose standartuose.

1. **Kapiliariniai metodai**

1.1. Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su skysčių vonia

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 46-34	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schnelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2. Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su metaliniu bloku

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

2. **Karštosios stadijos**

2.1. *Kofler* karštasis strypas

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

2.2. Lydymosi temperatūros mikroskopas

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmeltztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Menisko metodas (poliamidai)

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	Resines de poliamides. Determination du „point de Fusion“ Metode du menisque

3.	**Užšalimo temperatūros nustatymo metodai**	
	BS 4633	Method for determination of crystallizing point
	BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
	DIN 51421	Bestimmun des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
	ISO 2207	Cires de petrole: determination de la temperature de figeage
	DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsauren
	NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
	NF T 20-051	Metode de determination du point de cristallisation (point de congelation)
	ISO 1392	Method for the determination of the freezing point
4.	**Terminė analizė**	
4.1.	Diferencinė terminė analizė	
	ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differencial 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.	Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija	
	ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differencial 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.	**Skystėjimo temperatūros nustatymas**	
	ASTM D 97-66	Echantillonnage et analyse des produits du petrole: Point de trouble et point d'ecoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
	ASTM D 97-66	Standard tes methos for pour point of petroleum oils
	ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point

A.2. VIRIMO TEMPERATŪRA

1. **METODAS**

Dauguma apibūdintų metodų yra pagrįsti OECD Test Guideline (1). Pagrindiniai principai pateikti 2 ir 3 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Čia apibūdinti metodai ir prietaisai gali būti naudojami skystoms ir blogai besilydančioms medžiagoms, jei cheminių reakcijų, kuriose jos naudojamos, temperatūra nėra žemesnė nei virimo temperatūrą (pvz., autooksidacija, persigrupavimas, skilimas ir pan.). Šiuos metodus galima taikyti grynoms ir priemaišų turinčioms skystosioms medžiagoms.

Ypatingas dėmesys atkreiptinas į tuos metodus, kuriuose naudojama detekcija fotoelementu ir terminė analizė, kadangi šiais metodais galima nustatyti tiek lydymosi, tiek virimo temperatūrą. Be to, matavimus galima atlikti automatiškai.

Dinaminis metodas geras tuo, kad jį taip pat galima naudoti nustatant garų slėgį ir nebūtina virimo temperatūrą koreguoti iki normalaus slėgio (101,325 kPa), kadangi normalus slėgis matavimų metu gali būti nustatomas manostatu.

Pastabos:

Priemaišų įtaka nustatant virimo temperatūrą labai priklauso nuo priemaišų svarbiausių savybių. Jeigu mėginyje yra lakiųjų priemaišų, kurios galėtų turėti įtakos rezultatams, medžiagą reikia išgryninti.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Normali virimo temperatūra yra apibrėžiama kaip temperatūra, kurioje skysčių garų slėgis yra lygus 101,325 kPa.

Jeigu virimo temperatūra matuojama ne normaliame atmosferos slėgyje, temperatūros priklausomybė nuo garų slėgio gali būti apibūdinama *Clausius- Clapeyron* lygtimi:

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

kai:

p – = medžiagos garų slėgis paskaliais

ΔH_V – = garavimo šiluma, J mol^{-1}

R – = universalioji molinė dujų konstanta = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T – = termodinaminė temperatūra, K

Virimo temperatūra yra nustatoma atsižvelgiant į matavimo metu esantį aplinkos slėgį.

Vienetų atitikmenys:

Slėgis (vienetai: kPa)

100 kPa = 1 baras = 0,1 MPa

(„baras“ vis dar leistinas, bet nerekomenduojamas)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(neleistini vienetai „mm Hg“ ir „Torr“)

1 atm = standartinė atmosfera = 101 325 Pa

(neleistinas vienetas „atm“)

Temperatūra (vienetai: K)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsijaus temperatūra, Celsijaus laipsniai (°C)

T: termodinaminė temperatūra, kelvinai (K)

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nebūtina naudoti etalonines medžiagas visais tais atvejai, jeigu tiriama nauja medžiaga. Pirmiausia jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant šio metodo veikimą ir gautų rezultatų lyginimui su kitų metodų rezultatais.

Kai kurias kalibravimo medžiagas galima rasti priede išvardytuose metoduose.

1.4. TYRIMO METODO ESMĖ

Penki virimo temperatūros (virimo intervalo) nustatymo metodai yra pagrįsti virimo temperatūros matavimu, kiti du pagrįsti termine analize.

1.4.1. **Nustatymas ebulioskopu**

Iš pradžių ebulioskopai buvo sukurti molekuliniam svoriui nustatyti didinant virimo temperatūrą, bet jie taip pat tinka tiksliems virimo temperatūros matavimams atlikti. Labai paprastas aparatas yra apibūdintas ASTM D 1120-72 (žr. priedėlį). Šiame aparate skystis šildomas aplinkos sąlygomis atmosferos slėgyje, kol užverda.

1.4.2. **Dinaminis metodas**

Šį metodą sudaro garų pakartotino suskystinimo temperatūros matavimas atitinkamu termometru esant deflegmacijai verdant. Taikant šį metodą galima keisti slėgį.

1.4.3. **Distiliacijos metodas virimo temperatūrai nustatyti**

Šį metodą sudaro skysčio distiliavimas ir garų pakartotino suskystinimo temperatūros matavimas bei distiliato kiekio nustatymas.

1.4.4. **Siwoloboff metodas**

Mėginys šildomas mėgintuvėlyje, panardintame į kaitinimo vonioje esantį skystį. Užlydytas kapiliarinis vamzdelis, kurio apatinėje dalyje yra oro burbuliukas, panardinamas į tą patį mėgintuvėlį.

1.4.5. **Detekcija fotoelementu**

Pagal *Siwoloboff* metodą atliekamas automatinis fotoelektrinis matavimas, naudojant kylančius burbuliukus.

1.4.6. **Diferencinė terminė analizė**

Pagal šią metodiką yra užrašomi medžiagos ir etaloninės medžiagos temperatūrų skirtumai kaip temperatūros funkcija, kai medžiagai ir etaloninei medžiagai yra taikoma ta pati kontroliuojama temperatūrų programa. Jeigu mėginyje įvyksta virsmas, kurio metu pasikeičia entalpija, tą pokytį parodo endoterminis nuokrypis (virimas) nuo pagrindinės užrašytų temperatūrų linijos.

1.4.7. **Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija**

Šia metodika skirtumas tarp energijos įvesties į medžiagą ir į etaloninę medžiagą yra užrašomas kaip temperatūros funkcija, kai medžiagai ir etaloninei medžiagai yra taikoma ta pati kontroliuojama temperatūrų programa. Ši energija – tai energija, reikalinga nustatyti medžiagos ir etaloninės medžiagos nulinį temperatūrų skirtumą. Jeigu mėginyje įvyksta virsmas, kurio metu pasikeičia entalpija, tą pokytį parodo endoterminis nuokrypis (virimas) nuo pagrindinės užrašytų temperatūrų linijos.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Skirtingų metodų, naudojamų virimo temperatūrai/virimo intervalui nustatyti, taikymas ir tikslumas yra pateikti 1 lentelėje.

1 LENTELĖ: METODŲ PALYGINIMAS

Matavimo metodas	Apskaičiuotas tikslumas	Galiojantis standartas
Ebulioskopas	± 1,4 K (iki 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (iki 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dinaminis metodas	± 0,5 K (iki 600 K) (2)	
Distiliavimo procesas (virimo intervalas)	± 0,5 K (iki 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Pagal *Siwoloboff*	± 0,2 K (iki 600 K) (2)	
Detekcija fotoelementu	± 0,3 K (373 K) (2)	
Diferencinė terminė kalorimetrija	± 0,5 K (iki 600 K) ± 0,2 K (iki 1273 K)	ASTM E 537-76
Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija	± 0,5 K (iki 600 K) ± 0,2 K (iki 1273 K)	ASTM E 537-76

(1) Šis tikslumas tinka tik labai paprastai priemonei, pavyzdžiui, aprašytai ASTM D 1120-72; ji gali būti patobulinta sudėtingesniais ebulioskopiniais prietaisais.
(2) Tinka tik grynoms medžiagoms. Naudojant kitokiomis sąlygomis, reikėtų pagrįsti.

1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

Kai kurių mėginio metodų darbo eiga yra apibūdinta tarptautiniuose ir nacionaliniuose standartuose (žr. priedą).

1.6.1. **Ebulioskopas**

Žr. priedėlį.

1.6.2. **Dinaminis metodas**

Žr. A.4 tyrimo metodą. Garų slėgio nustatymas.

Užrašoma stebėtoji virimo temperatūra, kai slėgis – 101,325 kPa.

1.6.3. **Distiliavimo procesas (virimo intervalas)**

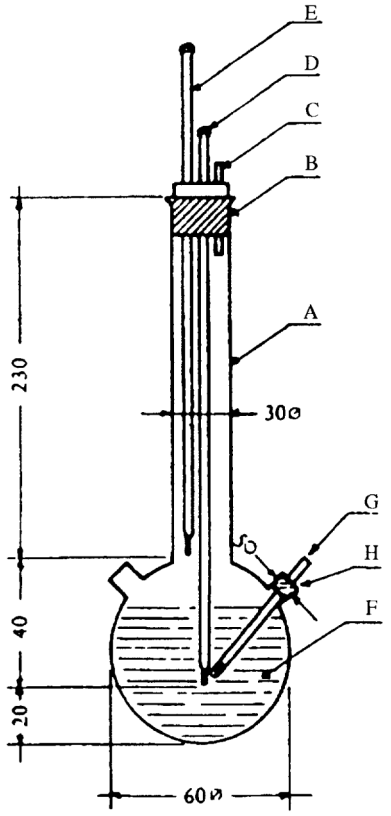
Žr. priedėlį.

1.6.4. **Siwoloboff metodas**

Mėginys kaitinamas mėgintuvėlyje, kurio skersmuo apie 5 mm, lydymosi temperatūros nustatymo aparate (1 pav.)

1 pav. pavaizduotas standartizuotas lydymosi ir virimo temperatūros nustatymo aparatas (JIS K 0064) (stiklinis, visi duomenys nurodyti milimetrais).

1 paveikslas



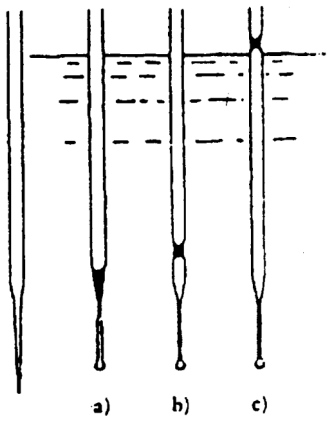
A: Matavimo indas
B: Kamštis
C: Ventiliatorius
D: Termometras
E: Papildomas termometras
F: Vonios skystis
G: Mėgintuvėlio vamzdelis, didžiausias išorinis skersmuo – 5 mm; kuriame yra apie 100 mm ilgio kapiliaras, vidinis skersmuo apie 1 mm, o sienelės storis – apie 0,2 – 0,3 mm
H: Šoninis vamzdelis

Kapiliarinis vamzdelis (virinimo kapiliarinis vamzdelis), kuris užlydytas 1 cm virš apatinio galo, dedamas į mėgintuvėlio vamzdelį. Mėginio yra dedama tiek, kad užlydytoji kapiliarinio vamzdelio dalis būtų žemiau skysčio paviršiaus. Mėgintuvėlio vamzdelis su virinimo kapiliariniu vamzdeliu yra pritaisomas arba prie termometro gumine juostele, arba pritvirtinamas laikikliu iš šono (žr. 2 pav.)

2 pav.
Pagal *Siwoloboff*



3 pav.
Modifikuotas variantas



Vonios skystis parenkamas pagal virimo temperatūrą. Kai temperatūra siekia 573 K, gali būti naudojama silikoninė alyva. Parafininė alyva gali būti naudojama tik iki 473 K. Vonios skystis kaitinamas taip, kad temperatūra iš pradžių didėtų 3 K/min. Vonioje esantis skystis turi būti maišomas. Kai temperatūra siekia apie 10 K žemiau laukiamos virimo temperatūros, kaitinimas sumažinamas taip, kad temperatūros didėjimo greitis būtų 1 K/min. Pasiekus virimo temperatūrą, iš virinimo kapiliarinio vamzdelio pradeda kilti burbuliukai.

Virimo temperatūra yra ta temperatūra, kai staiga atvėsinus burbuliukų nebelieka, o skystis staiga pradeda kilti kapiliariniu vamzdeliu. Termometras atitinkamai rodo medžiagos virimo temperatūrą.

Modifikuotame variante (3 pav.) virimo temperatūra nustatoma lydymosi temperatūros nustatymo kapiliariniame vamzdelyje. Jis yra išploninamas ištempiant apie 2 cm (a), išsiurbiamas nedidelis kiekis mėginio. Atvirasis plonojo vamzdelio galiukas yra užlydomas taip, kad jo gale liktų mažas oro burbuliukas. Kaitinant aparatą lydymosi temperatūroje (b), oro burbuliukas plečiasi. Virimo temperatūra atitinka temperatūrą, kurioje medžiagos gumulėlis pasiekia vonioje esančio skysčio paviršių (c).

1.6.5. **Detekcija fotoelementu**

Kapiliariniame vamzdelyje esantis mėginys kaitinamas įkaitintame metaliniame bloke.

Šviesos spindulys nukreipiamas pro bloke esančias tam tinkančias skylutes per medžiagą į tiksliai kalibruotą fotoelementą.

Didėjant mėginio temperatūrai virinimo kapiliariniame vamzdelyje atsiranda pavienių oro burbuliukų. Pasiekus virimo temperatūrą, burbuliukų labai padaugėja. Dėl to pasikeičia šviesos intensyvumas, kurį užregistruoja fotoelementas, ir paduodamas sustabdymo signalas į indikatorių, parodantį bloke esančio platininio varžinio termometro parodymus.

Šis metodas yra ypač naudingas, kadangi leidžia nustatyti iki 253,15 K (-20° C) žemesnę negu kambario temperatūrą nedarant jokių pakeitimų aparate. Prietaisas paprasčiausiai turi būti dedamas į aušinimo vonią.

1.6.6. **Terminė analizė**

1.6.6.1. *Diferencinė terminė analizė*

Žr. priedėlį.

1.6.6.2. *Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija*

Žr. priedėlį.

2. **DUOMENYS**

Esant nedideliems nukrypimams nuo normalaus slėgio (daugiausiai ± 5 kPa), virimo temperatūra normalizuojama iki T_n naudojantis tokiomis Sidney Young skaitmeninių verčių lygties vidutinėmis vertėmis:

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

kai:

Δp – = $(101{,}325 - p)$ [pastaba]

p – = slėgio matavimas, kPa

f_T – = virimo temperatūros pokyčio greitis, slėgis K/kPa

T – = išmatuota virimo temperatūra, K

T_n – = virimo temperatūra, koreguota iki normalaus slėgio, K

Daugumos medžiagų temperatūros korekcijos koeficientai f_T ir jų aproksimavimo lygtys yra įtrauktos į pirmiau minėtus tarptautinius ir nacionalinius standartus.

Pavyzdžiui, DIN 53171 metodas nurodo tokias apytikres korekcijas dažuose esantiems tirpikliams:

2 LENTELĖ: TEMPERATŪRA – KOREKCIJOS KOEFICIENTAI f_T

Temperatūra T (K)	Korekcijos koeficientas 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. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Į mėginio ataskaitą, jeigu įmanoma, įtraukiama tokia informacija:

— naudotas metodas,

— tikslios medžiagos charakteristikos (identiškumas ir priemaišos) ir išankstinio gryninimo, jeigu toks naudojamas, stadija,

— tikslumo apskaičiavimas.

Ne mažiau kaip dviejų matavimų, patenkančių į apskaičiuotą tikslumo intervalą (žr. 1 lentelę), vidutinė temperatūra nurodoma kaip virimo temperatūra.

Nurodomos išmatuotos virimo temperatūros ir jų vidurkiai, o slėgis(iai), kuriame buvo atlikti šie matavimai, nurodomas kPa. Pageidautina, kad slėgis būtų artimas normaliam atmosferos slėgiui.

Visa informacija ir pastabos, svarbios duomenų aiškinimui, turi būti pateikiamos ataskaitoje, ypač atsižvelgiant į priemaišas ir medžiagos fizikinę būseną.

4. **LITERATŪRA**

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

2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, volume II.

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

Priedėlis

Papildomos techninės informacijos, pavyzdžiui, galima ieškoti šiuose standartuose:

1. **Ebulioskopas**

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

2. **Distiliavimo procesas (virimo intervalas)**

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 determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungsmittel fur Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: determination du rendement et de l'intervale de distillation

3. **Diferencinė terminė analizė ir diferencinė skenuojamoji kalorimetrija**

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

A.3. SANTYKINIS TANKIS

1. **METODAS**

Apibūdintieji metodai yra pagrįsti OECD Test Guideline (1). Pagrindiniai principai yra pateikti 2 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Apibūdintieji santykinio drėgnumo nustatymo metodai yra be apribojimų taikomi kietosioms ir skystosioms medžiagoms atsižvelgiant į jų grynumo laipsnį. Naudotini metodai pateikti 1 lentelėje.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Kietųjų kūnų arba skysčių santykinis tankis D_4^{20} yra tikrinamos medžiagos tūrio masės, nustatytos 20 °C temperatūroje, santykis su tokio paties tūrio vandens mase, nustatyta 4° C temperatūroje. Santykinis tankis dimensijos neturi.

Medžiagos tankis ρ yra jos masės m ir tūrio v dalmuo.

Tankis ρ nurodomas SI vienetais – kg/m^3.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS (1) (3)

Nebūtina etalonines medžiagas naudoti visais atvejais, kai tyrinėjama nauja medžiaga. Pirmiausia jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant metodo veikimą ir lyginant gautus rezultatus su kitais metodais gautais rezultatais.

1.4. METODŲ ESMĖ

Naudojamos keturios metodų klasės.

1.4.1. **Plūdrumo metodai**

1.4.1.1. *Areometras* (skystosioms medžiagoms)

Tankis gali būti pakankamai tiksliai ir greitai nustatomas plūduriuojančiu areometru, kuriuo įmanoma nustatyti skysčio tankį pagal imersijos gylį remiantis graduotos skalės parodymais.

1.4.1.2. *Hidrostatinė pusiausvyra* (skystosioms ir kietosioms medžiagoms)

Mėginio, pasverto ore ir atitinkamame skystyje (pvz., vandenyje) svorių skirtumas gali būti naudojamas tankiui nustatyti.

Kietiesiems kūnams matuojamas tankis – tai vienintelis naudoto konkretaus mėginio pavyzdys. Nustatant skysčių tankį, žinomo tūrio v kūnas yra sveriamas iš pradžių ore, po to – skystyje.

1.4.1.3. *Panardintų kūnų metodas* (skystosioms medžiagoms) (4)

Pagal šį metodą skysčio tankis yra nustatomas pagal duomenų, gautų sveriant skystį prieš žinomo tūrio kūno panardinimą į jį, panardinus į jį ir ištraukus iš jo, skirtumą.

1.4.2. **Piknometro metodai**

Kietiesiems kūnams ir skysčiams gali būti naudojami įvairių formų ir žinomo tūrio piknometrai. Tankis apskaičiuojamas paėmus pilno ir tuščio piknometro svorio ir jo žinomo tūrio skirtumą.

1.4.3. **Oro palyginimo piknometras** (kietiesiems kūnams)

Bet kokios formos kietojo kūno tankį galima išmatuoti kambario temperatūroje su dujų palyginimo piknometru. Medžiagos tūris matuojamas įvairiai kalibruotame tūrio cilindre ore arba inertinėse dujose. Užbaigus tūrio matavimą, tankio apskaičiavimams vieną kartą matuojama masė.

1.4.4. **Virpesių densitometras** (5) (6) (7)

Skysčio tankis gali būti matuojamas virpesių densitometru. U raidės formos mechaninis osciliatorius vibruojamas osciliatoriaus rezonanso dažniu, kuris priklauso nuo jo masės. Dedant mėginio, keičiasi osciliatoriaus rezonanso dažnis. Aparatas turi būti kalibruojamas pagal dvi žinomo tankio skystąsias medžiagas. Geriau šias medžiagas parinkti taip, kad jų tankiai apimtų matuotiną intervalą.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Skirtingų metodų, naudojamų santykiniam tankiui nustatyti, pritaikymo galimybė pateikta lentelėje.

1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

Standartai, kuriuose, pavyzdžiui, reikėtų ieškoti informacijos apie papildomus techninius ypatumus, yra pateikti priede.

Tyrimai turi vykti 20° C temperatūroje, atliekant ne mažiau kaip du matavimus.

2. **DUOMENYS**

Žr. standartus.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Ataskaitoje apie tyrimą, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— naudotas metodas,

— tikslios medžiagos charakteristikos (identiškumas ir priemaišos) bei išankstinio gryninimo, jeigu toks naudojamas, stadija.

Santykinis tankis D_4^{20} pateikiamas kaip apibrėžta 1.2 punkte, kartu pateikiant duomenis apie matuotos medžiagos fizinę būseną.

Pateikiama visa informacija ir pastabos, svarbios aiškinant rezultatus, kuriuos reikia pateikti ataskaitoje, ypač atsižvelgiant į priemaišas ir medžiagos fizinę būseną.

LENTELĖ: METODŲ PRITAIKYMAS

Matavimo metodas	Tankis		Didžiausia galima dinaminė klampa	Galiojantis standartas
	Kietieji	Skystosios		
1.4.1.1. Areometras		Taip	5 Pa s	ISO 387
				ISO 649-2
				NF T 20-050
1.4.1.2. Hidrostatinė pusiausvyra				
a) kietieji kūnai	Taip			ISO 1183 (A)
b) skysčiai		Taip	5 Pa s	ISO 901 ir 758
1.4.1.3. Panardintų kūnų metodas		Taip	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknometras				ISO 3507
a) kietieji kūnai	Taip			ISO 1183(B)
				NF T 20-053
b) skysčiai		Taip	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Oro palyginamasis piknometras	Taip			DIN 55990 Teil 3
				DIN 53243
1.4.4. Virpesių densitometras		Taip	5 Pa s	

4. **LITERATŪRA**

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

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

3) IUPAC< recommended reference materials for realization of physico-chemical propertie, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

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

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

6) Baumgarten, D., Fullmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen – Verfahten zur Dichtebestimmung bei flussingen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717-726.

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

Priedėlis

Papildomos techninės informacijos, pavyzdžiui, galima ieškoti šiuose standartuose:

1. **KLAMPUMO METODAI**

1.1. Areometras

DIN 12790, ISO 387	Areometras; bendrosios instrukcijos
DIN 12791	I dalis: Tankio areometrai; konstrukcija, reguliavimas ir naudojimas
	II dalis: Tankio areometrai; standartizuoti matmenys, paskirtis
	III dalis: Naudojimas ir tyrimas
ISO 49-2	Laboratoriniai stikliniai indai:Bendros paskirties tankio areometrai
NF T 20-050	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui – skysčių tankio nustatymas – Areometrinis metodas
DIN 12793	Laboratoriniai stikliniai indai: intervalo nustatymo areometrai

1.2. Hidrostatinė pusiausvyra

Kietosioms medžiagoms	
ISO 1183	A metodas: Plastikų tankio ir santykinio tankio nustatymo metodai, išskyrus akytųjų plastikų
NF T 20-049	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui – Kietųjų kūnų, išskyrus miltelių ir akytųjų medžiagų, tankio nustatymas – Hidrostatinės pusiausvyros metodas
ASTM-D-792	Plastmasių savitasis sunkis ir tankis
DIN 53479	Plastmasių ir elastinių medžiagų tyrimas; tankio nustatymas
Skystosioms medžiagoms	
ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Mineralinių alyvų ir susijusių medžiagų tyrimas; tankio nustatymas
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 ir ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Nevalytos naftos ir skystų naftos produktų tankio, savitojo sunkio arba API sunkio nustatymas areometrijos metodu
BS 4714	Nevalytos naftos ir skystų naftos produktų tankio, savitojo sunkio arba API sunkio nustatymas areometrijos metodu

1.3. Panardintų kūnų metodas

DIN 53217	Dažų, lakų ir panašių dengiančiųjų medžiagų tyrimas; tankio nustatymas; panardintų kūnų metodas

2. **PIKNOMETRIJOS METODAI**

2.1. Skystosioms medžiagoms

ISO 3507	Piknometrai
ISO 758	Skystieji cheminiai produktai; tankio nustatymas 20° C temperatūroje
DIN 12797	*Gay-Lussac* piknometras (nelakiems skysčiams, kurie nėra per klampūs
DIN 12798	*Lipkin* piknometras (skysčiams, kurių kinematinė klampa mažesnė kaip 100 x 10^{-6} m^2 s^{-1} 15 ^{0}C temperatūroje)

DIN 12800	*Sprengel* piknometras (skysčiams kaip DIN 12798)
DIN 12801	*Reischauer* piknometras (skysčiams, kurių kinematinė klampa mažesnė kaip 100 x 10^{-6} m^2 s^{-1} 20° C temperatūroje, taip pat taikoma hidrokarbonatams angliavandeniams ir vandeniniams tirpalams, bei skysčiams su didesniu garų slėgiu, apie 1 barą 90° C temepratūroje))
DIN 12806	*Hubbard* piknometras (visų rūšių klampiems skysčiams, kurių slėgis nėra per aukštas, ypač dažams, lakams ir bitumui)
DIN 12807	*Bingham* piknometras (skysčiams, kaip DIN 12801)
DIN 12808	*Jaulmes* piknometras (ypač etanoliui ir vandens tirpalui)
DIN 12809	Piknometras su pagrindiniu termometru ir kapiliariniu šoniniu vamzdeliu (skysčiams, kurie nėra per klampūs)
DIN 53217	Dažų, lakų ir panašių produktų tyrimas; tankio nustatymas piknometru
DIN 51757	7 punktas: mineralinių alyvų ir susijusių medžiagų tyrimas; tankio nustatymas
ASTM D 297	15 skirsnis: Gumos produktai – cheminė analizė
ASTM D 2111	C metodas: Halogenizuoti organiniai junginiai
BS 4699	Naftos produktų savitojo sunkio ir tankio nustatymo metodas (graduoto bikapiliarinio piknometro metodas)
BS 5903	Naftos produktų santykinio tankio ir tankio nustatymo metodas kapiliariniu – užkimštu piknometru
NF T 20-053	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui – Milteliuose ir skysčiuose esančių kietųjų medžiagų tankio nustatymas – Piknometrinis metodas

2.2. Kietosioms medžiagoms

ISO 1183	B metodas: Plastikų, išskyrus akytųjų, tankio ir santykinio tankio nustatymo metodai
NF T 20-053	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui – Milteliuose ir skysčiuose esančių kietųjų kūnų tankio nustatymas – Piknometrinis metodas
DIN 19683	Dirvožemių tankio nustatymas

3. **ORO PALYGINIMO PIKNOMETRAS**

Din 55990	3 dalis: Prufung von Anstrichstoffen und ahnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prufung

A.4. GARŲ SLĖGIS

1. **METODAS**

Dauguma apibūdintų metodų yra pagrįsti OECD Test Guideline (1). Pagrindiniai principai pateikti 2 ir 3 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Naudinga turėti išankstinę informaciją apie šiam tyrimui reikalingos medžiagos struktūrą, lydymosi temperatūrą ir virimo temperatūrą.

Nėra vienintelės matavimų eigos, taikytinos įvairiems garų slėgiams. Todėl garų slėgiui nuo < 10^{-4} iki 10^{5} Pa matuoti rekomenduojama naudoti kelis metodus.

Paprastai priemaišos turi įtakos garų slėgiui ir tai visų pirma priklauso nuo priemaišų rūšies.

Jeigu bandinyje yra lakių priemaišų, kurios galėtų turėti įtakos rezultatams, medžiaga gali būti gryninama. Taip pat tiktų nustatyti garų slėgį techninėms medžiagoms.

Kai kuriuose čia apibūdintuose metoduose naudojamas aparatas su metalinėmis dalimis; į tai turėtų būti atsižvelgiama tiriant ėsdinančias (ardančias) medžiagas.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Medžiagos garų slėgis yra apibrėžiamas kaip sočiųjų garų slėgis virš kietosios arba skystosios medžiagos. Esant termodinaminei pusiausvyrai grynos medžiagos garų slėgis – tai tik temperatūros funkcija.

Naudotinas slėgio vienetas SI turėtų būti paskalis (Pa).

Vienetai, kurie buvo istoriškai naudojami, kartu su atitikmenų koeficientais:

1 toras (1 mm Hg)	= 1,333 x 10^{2} Pa
1 atmosfera	= 1,013 x 10^{5} Pa
1 baras	= 10^{5} Pa

Temperatūros vienetas SI sistemoje – kelvinas (K).

Universalioji molinė dujų konstanta R = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}.

Dujų slėgio temperatūrinė priklausomybės yra apibūdinta *Clausius-Clapeyron* lygtimi:

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

kai:

p – = medžiagos garų slėgis paskaliais

ΔH_V – = garinimo šiluma, J mol^{-1}

R – = universalioji molinė dujų konstanta, J mol^{-1} K^{-1}

T – = termodinaminė temperatūra, K

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nebūtina naudoti etaloninių medžiagų visais tais atvejais, kai tiriama nauja medžiaga. Pirmiausia jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant šio metodo veikimą ir gautiems rezultatams palyginti su kitų metodų rezultatais.

1.4. TYRIMO METODŲ ESMĖ

Garų slėgiui nustatyti yra siūlomi septyni metodai, kuriuos galima taikyti skirtingiems garų slėgio intervalams. Kiekvienu metodu garų slėgis yra nustatomas įvairiose temperatūrose. Kai temperatūrų intervalas ribotas, grynosios medžiagos garų slėgio logaritmas yra temperatūros inversijos tiesinė funkcija.

1.4.1. **Dinaminis metodas**

Dinaminiu metodu yra matuojama virimo temperatūra, kuri priklauso nuo apibrėžto slėgio.

Rekomenduojamas intervalas:

10^3 - 10^5 Pa.

Šis metodas taip pat rekomenduojamas nustatant normalią virimo temperatūrą ir yra patogus, kai temperatūra yra iki 600 K.

1.4.2. **Statinis metodas**

Statiniuose procesuose, esant termodinaminei pusiausvyrai, uždaroje sistemoje susidaręs garų slėgis yra nustatomas apibrėžtoje temperatūroje. Šis metodas tinka vienkomponentėms ir daugiakomponentėms kietosioms ir skystosioms medžiagoms.

Rekomenduojamas intervalas:

10 - 10^5 Pa.

Šis metodas taip pat gali būti naudojamas 1 – 10 Pa intervale, jeigu atsargiai elgiamasi.

1.4.3. **Izoteniskopas**

Šis standartizuotas metodas taip pat yra statinis metodas, bet paprastai netinka daugiakomponentėms sistemoms. Papildomos informacijos galima gauti: ASTM metodas D-2879-86.

Rekomenduojamas intervalas:

Nuo 100 iki 10^5 Pa.

1.4.4. **Efuzijos metodas: garų slėgio pusiausvyra**

Medžiagos kiekis, išeinantis iš elemento per laiko vienetą per žinomo dydžio apertūrą, yra nustatomas vakuume taip, kad medžiagos sugrįžimas į elementą būtų nedidelis (pvz., matuojant impulsą, generuotą jautrioje pusiausvyroje garų čiurkšle arba matuojant prarastą svorį).

Rekomenduojamas intervalas:

10^{-3} – 1 Pa.

1.4.5. **Efuzijos metodas: svorio praradimu arba sugaudant išgaravusias medžiagas**

Metodas pagrįstas tiriamos medžiagos, garų pavidalu išlekiančios iš *Knudsen* elemento (4) per laiko vienetą per angą ultravakuumo sąlygomis, masės apskaičiavimui. Ištekėjusių garų masę galima gauti nustatant elemento prarastą masę arba kondensuojant garus žemoje temperatūroje ir nustatant išgarintos medžiagos kiekį chromatografinės analizės būdu. Garų slėgis apskaičiuojamas naudojant *Hertz-Knudsen* priklausomybę.

Rekomenduojamas intervalas:

10^{-3} – 1 Pa.

1.4.6. **Dujų soties metodas**

Inertinių nešančiųjų dujų srovė leidžiama virš medžiagos taip, kad ji įsisotina jų garais. Medžiagos, perneštos žinomu nešančiųjų dujų kiekiu, kiekis yra matuojamas arba surenkant į tinkamą gaudyklę, arba betarpiška analizine technika. Tai naudojama garų slėgiui apskaičiuoti esant tam tikrai temperatūrai.

Rekomenduojamas intervalas:

10^{-4} – 1 Pa.

Šį metodą taip pat galima naudoti 1 – 10 Pa intervale, jeigu atsargiai elgiamasi.

1.4.7. **Sukamasis rotorius**

Sukamojo rotoriaus manometre tikrasis matavimo elementas – plieno rutuliukas, kybantis magnetiniame lauke ir besisukantis labai dideliu greičiu. Dujų slėgis yra nustatomas pagal nuo slėgio priklausantį plieno rutuliuko lėtėjimą.

Rekomenduojamas intervalas:

10^{-4} – 0,5 Pa.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Įvairūs garų slėgio nustatymo metodai yra palyginami pagal jų taikytinumą, pasikartojamumą, atkuriamumą, matavimo intervalą, galiojantį standartą. Tai padaryta šioje lentelėje.

KOKYBĖS KRITERIJAI

Matavimo metodas	Medžiagos		Apskaičiuotas pasikartojamumas ([1])	Apskaičiuotas atkuriamumas ([1])	Rekomenduojamas intervalas	Galiojantis standartas
	kietosios	skystosios				
1.4.1. Dinaminis metodas	Mažai tirpios	Taip	Iki 25%	Iki 25%	10^3Pa – 2 x 10^3Pa	—
			1 – 5%	1 – 5%	2 x 10^3Pa – 10^5 Pa	—
1.4.2. Statinis metodas	Taip	Taip	5 – 10%	5 – 10%	10 Pa – 10^5 Pa ([2])	NFT 20-048 (5)
1.4.3. Izoteniskopas	Taip	Taip	5 – 10%	5 – 10%	10^2 Pa – 10^5 Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4. Efuzijos metodas - Garų slėgio pusiausvyra	Taip	Taip	5 – 20%	Iki 50%	10^{-3} Pa – 1 Pa	NFT 20-047 (6)
1.4.5. Efuzijos metodas - Svorio praradimas	Taip	Taip	10 – 30%	Iki 50%	10^{-4} Pa – 1 Pa	—
1.4.6. Dujų soties metodas	Taip	taip	10 – 30%	Iki 50%	10^{-4} Pa – 1 Pa[2]	—
1.4.7. Sukamojo rotoriaus metodas	Taip	taip	10 – 20%	Iki 50%	10^{-4} Pa – 0,5 Pa	—

([1]) Priklauso nuo grynumo laipsnio
([2]) Šiuos metodus taip pat galima naudoti 1 – 10 Pa intervale, jeigu atsargiai elgiamasi.

1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Dinaminis matavimas**

1.6.1.1. *Aparatūra*

Paprastai matavimo aparatūrą sudaro virinimo indas su stikliniu arba metaliniu aušintuvu (1 pav.), temperatūros matavimo įrenginys ir slėgio reguliavimo ir matavimo įrenginys. Paveiksle parodytas paprastas matavimo aparatas yra padarytas iš karščiui atsparaus stiklo ir sudarytas iš penkių dalių:

Didelį, iš dalies dvigubų sienelių vamzdį sudaro matinio gaubto jungtis, aušintuvas, aušinimo indas ir įsiurbimo anga.

Stiklo cilindras su *Cottrell* „siurbliu“ yra įtaisomas vamzdyje virinimo dalyje, o smulkinto stiklo paviršius yra nelygus, kad būtų išvengiama „kunkuliavimo“ virinimo metu.

Temperatūra matuojama atitinkamu temperatūros jutikliu (pvz., varžiniu termometru, gaubto termoelementas, panardintas aparate iki matavimo padalos (1 pav., Nr. 5) per atitinkamą įsiurbimo angą (pvz., vidinį šlifą).

Reikalingos jungtys yra padarytos taip, kad būtų galima reguliuoti slėgį ir tiktų matavimo įrenginiui.

Kolba, kuri veikia kaip buferinis tūris, su matavimo aparatu yra sujungta kapiliariniu vamzdeliu.

Virinimo indas kaitinamas kaitinimo elementu, iš apačios įdėtu į stiklinį aparatą. Kaitinimui reikalinga srovė nustatoma ir reguliuojama termoelementu.

Vakuuminiu siurbliu sudaromas būtinas vakuumas tarp 10^2 Pa ir apytikriai 10^5 Pa.

Slėgiui reguliuoti naudojamas atitinkamas vožtuvas orui arba azotui matuoti (matavimo intervalas apytikriai 10^2 – 10^5 Pa) ir ventiliuoti.

Slėgis matuojamas manometru.

1.6.1.2. *Matavimo eiga*

Garų slėgis matuojamas nustatant mėginio temperatūrą įvairiuose apibrėžtuose slėgiuose, apie 10^3 –10^5 Pa. Nekintanti temperatūra esant pastoviam slėgiui rodo, kad pasiekta virimo temperatūra. Šio metodo negalima naudoti putokšliams matuoti.

Medžiaga dedama į švarų sausą indą. Gali būti sunkumų naudojant nemiltelinius kietuosius kūnus, bet jų kartais nelieka pašildant aušinimo gaubtą. Kai tik indas užpildomas, aparato jungė užsandarinama, o medžiaga degazuojama. Tada nustatomas žemiausias norimas slėgis ir įjungiamas kaitinimas. Tuo pačiu metu temperatūros jutiklis sujungiamas su savirašiu.

Pusiausvyra pasiekiama, kai esant pastoviam slėgiui užregistruojama pastovi temperatūra. Reikia būti ypač atsargiems ir virinimo metu vengti kunkuliavimo. Be to, ant aušintuvo turi vykti kondensacija. Nustatant blogai besilydančių medžiagų garų slėgį, stebėti, kad neužsikimštų kondensatorius.

Užregistravus pusiausvyros tašką, nustatomas didesnis slėgis. Ši darbo eiga tęsiama, kol pasiekiama 10^5 Pa (iš viso apie 5 – 10 matavimo taškų). Kontrolei matavimo taškai turi būti kartojami slėgiui mažėjant.

1.6.2. **Statinis matavimas**

1.6.2.1. *Aparatūra*

Aparatą sudaro indas su mėginiu, kaitinimo ir aušinimo sistema mėginio temperatūrai reguliuoti ir temperatūrai matuoti. Į aparatą taip pat įeina prietaisai slėgiui nustatyti ir matuoti. 2a ir 2b paveiksluose parodyti pagrindiniai naudoti principai.

Prie mėginio kameros (2a pav.) iš vienos pusės yra pritvirtinamas atitinkamas didelio slėgio vožtuvas. U formos vamzdelis, kuriame yra atitinkamas manometro skystis, yra pritvirtinamas iš kitos pusės. Vienas U formos vamzdelio galas atsišakoja į vakuuminį siurblį, azoto cilindrą arba ventiliacijos vožtuvą ir manometrą.

Vietoje U formos vamzdelio gali būti naudojamas manometras su slėgio indikatoriumi (2b pav.).

Mėginio temperatūrai reguliuoti, mėginio indas su vožtuvu ir U formos vamzdeliu arba manometru dedamas į vonią, kurioje palaikoma pastovi ± 0,2 K temperatūra. Temperatūra matuojama išorinėje indo, kuriame yra mėginys, sienelės pusėje arba pačiame inde.

Vakuuminis siurblys su prieš srovę veikiančiu aušinimo sifonu naudojamas sudaryti vakuumą aparate.

2a metodu medžiagos garų slėgis yra matuojamas netiesiogiai naudojant nulinį indikatorių. Tokiu būdu atsižvelgiama į tai, kad U formos vamzdelyje esančio skysčio tankis pasikeičia, jeigu temperatūra smarkiai keičiasi.

Manometre gali būti naudojamas gyvsidabris, esant įprastam slėgiui iki 10^2 Pa, o silikatinės alyvos bei ftalatai tinka naudoti, kai slėgis yra žemesnis nei 10^2 Pa, bet ne žemesnis nei 10 Pa. Kai slėgis žemesnis nei 10^{-1} Pa, galima naudoti netgi manometrus su kaitinamosiomis membranomis. Kai slėgis žemesnis nei 10^2 Pa, naudojami ir kitokie manometrai.

1.6.2.2. *Matavimų eiga*

Prieš matuojant visos 2 pav. pavaizduoto prietaiso dalys turi būti kruopščiai išvalytos ir išdžiovintos.

Pagal 2a metodą U formos vamzdelis užpildomas pasirinktu skysčiu, kuris prieš užrašant parodymus gali būti degazuotas aukštesnėje temperatūroje.

Tiriamoji medžiaga dedama į aparatą, kuris po to uždaromas, o temperatūra sumažinama tiek, kad būtų galima atlikti degazavimą. Temperatūra turi būti pakankamai žema, kad būtų užtikrintas oro išsiurbimas, bet daugiakomponenčių sistemų atveju tai neturi pakeisti medžiagos struktūros. Jeigu reikia, maišant galima greičiau nustatyti pusiausvyrą.

Mėginį galima peršaldyti, pvz., skystu azotu (stengiantis, kad neįvyktų oro arba siurblyje esančio skysčio kondensacija) arba etanolio ir sauso ledo mišiniu. Žemai temperatūrai matuoti naudojama reguliuojamos temperatūros vonia, sujungta su ypač žemos temperatūros matuokliu.

Atidarius mėginio indo vožtuvą, siurbiama kelias minutes, kad būtų pašalintas oras. Po to vožtuvas uždaromas, o mėginio temperatūra sumažinama iki žemiausio norimo lygio. Prireikus degazavimo veiksmai turi būti pakartojami kelis kartus.

Mėginį kaitinant garų slėgis kyla. Tai pakeičia U formos vamzdelyje esančio skysčio pusiausvyrą. Jai atstatyti į aparatą per vožtuvą leidžiama azoto arba oro, kol slėgio indikatoriaus skystis vėl bus ties nuline padala. Tam reikalingą slėgį gali kambario temperatūroje parodyti precizinis manometras. Šis slėgis atitinka medžiagos garų slėgį tam tikroje matuojamoje temperatūroje.

2b metodas yra panašus, bet garų slėgio parodymai nuskaitomi tiesiogiai.

Garų slėgio priklausomybė nuo temperatūros yra nustatoma mažais intervalais (iš viso apytikriai 5-10 matavimo taškų) iki norimo maksimumo. Žemos temperatūros parodymus reikia pakartotinai išmatuoti.

Jeigu iš pakartotinių matavimų gautos vertės nesutampa su esančiomis kreivėje, gautoje padidinus temperatūrą, tai gali būti dėl vienos iš šių priežasčių:

1. Mėginyje tebėra oro (pvz., didelio klampumo medžiagose) arba liko medžiagų, kurių virimo temperatūra yra žema ir kuri/kurios išsiskiria kaitinimo metu. Jos gali būti pašalinamos išsiurbiant po papildomo peršaldymo.

2. Aušinimo temperatūra yra nepakankamai žema. Šiuo atveju skystasis azotas naudojamas kaip aušalas.

   Tiek 1, tiek 2 atveju matavimai turi būti pakartojami.

3. Medžiagoje vyksta cheminė reakcija tyrinėjamame temperatūrų intervale (pvz., skilimas, polimerizacija).

1.6.3. **Izoteniskopas**

Išsamų šio metodo aprašymą galima rasti 7 nuorodoje. Šio matavimo prietaiso principas pavaizduotas 3 paveiksle. Panašiai kaip statinis metodas, apibūdintas 1.6.2, izoteniskopas tinka tyrinėti kietuosius ir skystuosius kūnus.

Jeigu tai skystieji kūnai, pati medžiaga naudojama kaip skystis pagalbiniame manometre. Į izoteniskopą dedamas toks kiekis skysčio, kurio pakanka kolbai užpildyti, ir prie izoteniskopo pritaisoma trumpoji manometro kojelė. Izoteniskopas pritaisomas prie vakuuminės sistemos, iš jos išsiurbiamas oras, po to užpildoma azotu. Sistemos išsiurbimas ir išvalymas kartojamas du kartus, kad būtų pašalinamas liekamasis deguonis. Užpildytas izoteniskopas dedamas horizontaliai, kad mėginys mėginio kolboje ir manometro sekcijoje (U dalis) pasklistų plonu sluoksniu. Slėgis sistemoje sumažinamas iki 133 Pa, o mėginys yra iš lengvo šildomas, kol ima virti (ištirpusių sujungtųjų dujų pašalinimas). Tada izoteniskopas dedamas taip, kad mėginys vėl atsirastų kolboje ir trumpojoje manometro kojelėje ir abu būtų pilni skysčio. Palaikomas toks pat slėgis kaip degazuojant; išsikišęs mėginio kolbos galiukas šildomas nedidelėje liepsnoje, kol išsiskyrę mėginio garai gerai pasklis ir išstums dalį mėginio iš viršutinės kolbos dalies ir manometro kojelės į izoteniskopo manometro sekciją, sudarydami garų pripildytą be azoto erdvę.

Po to izoteniskopas dedamas į pastovios temperatūros vonią, azoto slėgis derinamas tol, kol jo slėgis tampa lygus mėginio slėgiui. Slėgio pusiausvyrą parodo izoteniskopo manometro sekcija. Pusiausvyros sąlygomis azoto garų slėgis yra lygus medžiagos garų slėgiui.

Kietosioms medžiagoms, atsižvelgiant į slėgį ir temperatūrų intervalą, yra naudojami manometro skysčiai, nurodyti 1.6.2.1. Tokiu atveju kietasis kūnas, kurį reikia ištirti, dedamas į kolbą ir degazuojamas padidintoje temperatūroje. Degazuotas manometro skystis pilamas į ilgosios izoteniskopo kojelės kolbelę. Po to izoteniskopas palenkiamas taip, kad manometre esantis skystis nutekėtų į U formos vamzdelį. Garų slėgis, kaip temperatūros funkcija, yra matuojamas pagal 1.6.2.

1.6.4. **Efuzijos metodas: garų slėgio pusiausvyra**

1.6.4.1. *Aparatūra*

Įvairūs aparatūros variantai yra apibūdinti literatūros 1 nuorodoje. Joje apibūdintas aparatas iliustruoja bendrą naudojamą principą (4 pav.). 4 paveiksle parodytos pagrindinės aparato sudedamosios dalys: tai didelio vakuumo nerūdijančio plieno arba stiklo indas, įranga vakuumui sudaryti ir matuoti bei įmontuotos sudedamosios dalys garų slėgiui matuoti svarstyklėmis. Į aparatą įmontuotos šios sudedamosios dalys:

— garinimo krosnis su junge ir sukamąja įsiurbimo anga. Garinimo krosnis – tai cilindrinis indas, pavyzdžiui, iš vario arba chemiškai atsparaus, gero šiluminio laidumo lydinio. Taip pat galima naudoti stiklinį indą vario sienelėmis. Krosnies skersmuo apie 3-5 cm, aukštis – 2-5 cm. Garų srovė išleidžiama per skirtingo dydžio angas, kurių būna nuo vienos iki trijų. Krosnis šildoma apačioje esančia kaitinimo plokšte arba iš išorės apvyniota spirale. Kad šiluma nebūtų veltui eikvojama pagrindinei plokštei kaitinti, šildytuvas ant pagrindinės plokštės tvirtinamas mažo terminio laidumo metalu (melchioras arba chromnikelinis plienas), pvz., melchioro vamzdelis pritaisomas prie sukamosios angos, jeigu naudojama krosnis su keliomis angomis. Šio įtaiso privalumas – galima įtaisyti varinį strypą. Taip galima aušinti iš išorinės pusės naudojant aušinimo vonią,

— jeigu varinės krosnies dangtelyje yra trys skirtingo skersmens angos, viena nuo kitos esančios 90° kampu, galima apimti įvairius garų slėgio intervalus per visą matavimų intervalą (angų skersmuo apytikriai 0,30-4,50 mm). Didelės angos naudojamos mažam garų slėgiui ir atvirkščiai. Sukant krosnį galima nustatyti norimą angą arba tarpinę padėtį garų srovėje (krosnies skylė – skydas – svarstyklių lėkštė), išsiskiria molekulių srautas arba jis nukreipiamas per krosnies angą į svarstyklių lėkštę. Kad būtų išmatuota medžiagos temperatūra, termoelementas arba varžinis termometras dedamas tinkamoje vietoje,

— virš skydo yra labai jautrių mikrosvarstyklių lėkštė (žr. toliau). Svarstyklių lėkštės skersmuo yra apie 30 mm. Paauksuotas aliuminis yra tam tinkanti medžiaga,

— svarstyklių lėkštė yra apgaubta cilindrine žalvarine arba varine šaldymo dėže. Atsižvelgiant į svarstyklių rūšį joje yra angos svarstyklių svirtelei ir anga dangtyje molekulių srovei, kuri turėtų garantuoti visišką garų kondensaciją ant svarstyklių lėkštės. Šilumos išsiskyrimas į išorę, pavyzdžiui, yra užtikrinamas vario strypeliu, sujungtu su šaldymo dėže. Strypelis yra ištraukiamas per pagrindinę plokštę ir nuo jos termiškai izoliuojamas, pavyzdžiui, chromnikelio plieno vamzdeliu. Strypelis panardinamas į Diuaro indą su skystu azotu, esančiu po pagrindine plokšte, arba skystasis azotas cirkuliuoja strypeliu. Taip šaldymo dėžė yra laikoma apytikriai −120 °C temperatūroje. Svarstyklių lėkštė aušinama tik spinduliavimu, kurio pakanka, kad tiriamasis slėgio intervalas būtų pakankamas (aušinama apie 1 valandą iki matavimų pradžios),

— svarstyklės dedamos virš šaldymo dėžės. Tinka, pavyzdžiui, labai jautrios svarstyklės, 2 pečių elektroninės mikrosvarstyklės (8) arba labai jautrus judamosios ritės prietaisas (žr. OECD Test Guideline 104, Edition 12.05.81),

— pagrindinėje plokštelėje taip pat yra elektrinės jungtys termoelementams (arba varžiniams termometrams) ir kaitinimo ritėms,

— vakuumas inde sudaromas naudojant dalinį vakuuminį siurblį (reikalingas vakuumas apytikriai 1-2 x 10^{-3} Pa, gaunamas po 2 valandų siurbimo). Slėgis reguliuojamas atitinkamu jonizacijos manometru.

1.6.4.2. *Matavimų eiga*

Indas užpildomas tiriamąja medžiaga ir uždaromas dangteliu. Gaubtas ir šaldytuvo dėžė įstumiami į krosnį. Aparatas uždaromas ir įjungiami vakuumo siurbliai. Slėgis prieš pradedant matavimus turėtų būti apie 10^{-4} Pa. Šaldymo dėžės aušinimas pradedamas esant 10^{-2} Pa.

Kai pasiekiamas reikalingas vakuumo lygis, pradedama kalibravimo serija žemiausioje reikalaujamoje temperatūroje. Nustatoma atitinkama anga dangtelyje, garų srovė teka per gaubtą tiesiai virš angos, į ataušintą svarstyklių lėkštę. Svarstyklių lėkštė turi būti pakankamai didelė, kad visa per gaubtą nukreipta srovė patektų į ją. Garų srovės savo jėga veikia į svarstyklių lėkštę, ir molekulės kondensuojasi ant vėsaus paviršiaus.

Dėl vienkartinės ir vienalaikės kondensacijos reaguoja savirašis. Įvertinus signalus gaunama dviejų rūšių informacija:

1. Čia apibūdintame aparate garų slėgis yra nustatomas tiesiogiai pagal garų postūmio kiekį į svarstyklių lėkštę (čia nereikia žinoti molekulinio svorio (2)). Kai vertinami parodymai, turi būti atsižvelgiama į tokius geometrinius veiksnius, kaip krosnies anga ir molekulinio srauto kampas.

2. Tuo pačiu metu kondensato masę galima matuoti ir taip galima apskaičiuoti garavimo koeficientą. Taip pat galima apskaičiuoti garų slėgį pagal garavimo koeficientą ir molekulinį svorį pagal Herzo lygtį (2).

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

kai:

G – = garavimo koeficientas (kg s^{-1} m^{-2})

M – = molinė masė (g mol^{-1})

T – = temperatūra (K)

R – = universalioji molinė dujų konstanta (J mol^{-1} K^{-1})

p – = garų slėgis (Pa)

Pasiekus reikalingą vakuumą, pradedami matavimai žemiausioje norimoje matavimų temperatūroje.

Tolesniems matavimams temperatūra didinama mažais intervalais, kol pasiekiama didžiausia norima temperatūros vertė. Po to mėginys aušinamas ir galima užrašyti antrą garų slėgio kreivę. Jeigu antro matavimo metu nepavyksta patvirtinti pirmo matavimo rezultatų, gali būti, kad medžiaga irsta matuojamame temperatūros intervale.

1.6.5. **Efuzijos metodas – pagal prarastą svorį**

1.6.5.1. *Aparatūra*

Efuzijos aparatą sudaro šios pagrindinės dalys:

— rezervuaras, kuriame galima nustatyti pastovią temperatūrą ir jį galima išsiurbti ir kur sudėti efuzijos elementai,

— didelio vakuumo siurblys (pvz., difuzinis siurblys arba turbomolekulinis siurblys) su vakuumo matuokliu,

— gaudyklė, kurioje naudojamas suskystintas azotas arba sausasis ledas.

Kaip pavyzdys 5 paveiksle pavaizduotas elektra šildomas aliumininis vakuumo rezervuaras su 4 nerūdijančio plieno efuzijos elementais. Apytikriai 0,3 mm storio nerūdijančio plieno folijoje yra 0,2-1,0 mm skersmens efuzijos antgaliai, prie efuzijos elemento pritaisyti įsriegiamu dangteliu.

1.6.5.2. *Matavimo eiga*

Etalonine ir tiriamąja medžiagomis užpildomas kiekvienas efuzijos elementas, metalinė diafragma su antgaliu yra apsaugota įsriegtu dangteliu, kiekvienas elementas pasveriamas 0,1 mg tikslumu. Elementas dedamas į aparatą su nustatyta temperatūra, kuriame oras išsiurbiamas tiek, kad slėgis būtų viena dešimtąja mažesnis negu reikalaujama. Apibrėžtais laiko intervalais nuo 5 iki 30 valandų į aparatą įleidžiama oro, o efuzijos elemento masės nuostolis nustatomas pakartotinai ją pasveriant.

Norint užtikrinti, kad lakiosios priemaišos neturėtų įtakos rezultatams, elementas pakartotinai sveriamas apibrėžtais laiko intervalais, kad būtų patikrinama, ar garavimo sparta yra pastovi ne mažiau kaip du tokius laiko intervalus.

Garų slėgis *p* efuzijos elemente gaunamas:

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

kai:

p – = garų slėgis (Pa)

m – = medžiagos, išeinančios iš elemento per laiką *t*, masė (kg)

t – = laikas (s)

A – = skylės plotas (m^2)

K – = korekcijos koeficientas

R – = universalioji dujų konstanta (J mol^{-1} K^{-1})

T – = temperatūra (K)

M – = molekulinė masė (kg mol^{-1})

Korekcijos koeficientas K priklauso nuo cilindrinio antgalio ilgio santykio su jo spinduliu:

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

Pirmiau pateikta lygtis gali būti užrašoma taip:

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

kai $E = \frac{1}{KA}\sqrt{2\,\pi\,R}$ ir tai yra efuzijos konstanta.

Ši efuzijos elemento konstanta *E* gali būti nustatoma su etaloninėmis medžiagomis (2,9) pagal šią lygtį:

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

kai:

p(r) – = etaloninės medžiagos garų slėgis (Pa)

M(r) - = etaloninės medžiagos molekulinė masė (kg mol^{-1})

1.6.6. **Dujų soties metodas**

1.6.6.1. *Aparatūra*

Tipišką aparatą, naudojamą šiam tyrimui atlikti, sudaro keletas sudedamųjų dalių, nurodytų 6a paveiksle, kurios apibūdinamos toliau (1).

Inertinės dujos:

Nešančiosios dujos neturi sukelti cheminės reakcijos su tiriamąja medžiaga. Paprastai šiam tikslui tinka azotas, bet kartais gali būti reikalingos kitos dujos (10). Naudojamos dujos turi būti sausos (žr. 6a paveikslą, 4 punktą: santykinio drėgnio jutiklis).

Srauto kontrolė:

Atitinkama dujų kontrolės sistema yra reikalinga tam, kad būtų užtikrinta, jog per soties kolonėlę einantis srautas būtų pastovus ir toks, koks pasirinktas.

Garų surinkimo gaudyklės:

Tai priklauso nuo tam tikrų bandinio ypatybių ir pasirinkto analizės metodo. Garų turėtų būti sugaunamas toks kiekis ir taip, kad po to būtų galima atlikti analizę. Tam tikroms tiriamosioms medžiagoms tinka gaudyklės su tokiais skysčiais kaip heksanas arba etilenglikolis. Kitoms medžiagoms gali būti naudojami kietieji absorbentai.

Kaip garų sugaudymo ir po to atliekamos analizės alternatyva gali būti naudojama betarpiška tyrimų technika, pavyzdžiui, chromatografas, gali būti naudojama kiekybiškai nustatyti kiekį medžiagos, perneštos žinomu kiekiu nešančiųjų dujų. Be to, galima išmatuoti mėginio masės nuostolius.

Šilumokaitis:

Matuojant skirtingose temperatūrose gali reikėti į agregatą įmontuoti šilumokaitį.

Sotintuvo kolonėlė:

Mėginys iš tirpalo dedamas ant atitinkamo nejudančio laikiklio. Apdengtas laikiklis dedamas į soties kolonėlę, kurios dydžiai ir srauto greitis turėtų būti tokie, kad būtų užtikrinta visiška nešančiųjų dujų sotis. Soties kolonėlėje turi būti pastovi temperatūra. Matuojant aukštesnėje negu kambario temperatūroje, vieta tarp soties kolonėlės ir gaudyklių turėtų būti šildoma, kad būtų išvengta tiriamos medžiagos kondensacijos.

Kad būtų sumažintas masės pernešimas, pasireiškiantis difuzija, kapiliarinis vamzdelis gali būti įtaisomas už soties kolonėlės (6b pav.)

1.6.6.2. *Matavimo darbo eiga*

Soties kolonėlės paruošimas:

Tiriamos medžiagos tirpalas labai lakiame tirpiklyje dedamas į atitinkamą laikiklio kiekį. Turėtų būti dedamas pakankamas kiekis mėginio, kad tyrimo metu išliktų sotis. Visas tirpiklis išgarinamas ore arba sukamajame garintuve, ir gerai išmaišyta medžiaga dedama į sotintuvo kolonėlę. Nustačius pastovią bandinio temperatūrą, sausas azotas leidžiamas per aparatą.

Matavimas:

Gaudyklės arba betarpiškai įtaisytas detektorius yra sujungti su kolonėlės nutekamuoju vamzdeliu, užrašomas laikas. Srauto greitis yra tikrinamas pradžioje ir reguliariais intervalais eksperimento eigoje, naudojant barboterį (arba visą laiką – debitmačiu).

Turi būti matuojamas slėgis prie sotintuvo išėjimo angos. Tai gali būti daroma vienu iš būdu:

a) įmontuojant manometrą tarp sotintuvo ir gaudyklių (to gali nepakakti, kadangi taip padidėja įrangos užimama erdvė ir adsorbcinis paviršius); arba

b) nustatant staigų slėgio mažėjimą visoje konkrečioje sugaudymo sistemoje, atskirame eksperimente naudojamą kaip srauto greičio funkcija (tai gali nelabai tikti skysčių gaudyklėms).

Laikas, reikalingas surinkti tokį tiriamos medžiagos kiekį, reikalingą skirtingiems analizės metodams, yra nustatomas atliekant išankstinius matavimus arba apskaičiavimus. Medžiagos surinkimas tolesniems mėginiams gali vykti naudojant betarpiškai įmontuotą kiekio tyrimo techniką (pvz., chromatografą). Prieš apskaičiuojant garų slėgį tam tikroje temperatūroje, turi būti atliekami išankstiniai matavimai, norint nustatyti didžiausią srauto greitį, kuris visiškai įsotins nešančiąsias dujas medžiagos garais. Tai garantuojama, jeigu nešančiosios dujos yra leidžiamos per sotintuvą pakankamai lėtai, kad mažesnis greitis nesukeltų didesnio apskaičiuotojo garų slėgio.

Specialus analizės metodas nustatomas pagal tiriamos medžiagos prigimtį (pvz., dujų chromatografija arba gravimetrija).

Nustatomas medžiagos kiekis, perneštos žinomu nešančiųjų dujų tūriu.

1.6.6.3. *Garų slėgio apskaičiavimas*

Garų slėgis apskaičiuojamas pagal garų slėgį (W/V) tokia lygtimi:

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

kai:

p – = garų slėgis (Pa)

W – = išgarinto mėginio masė (g)

V – = įsotintų dujų tūris (m^3)

R – = universalioji molinė dujų konstanta (J mol^{-1} K^{-1})

T – = temperatūra (K)

M – = tiriamos medžiagos molinė masė (g mol^{-1})

Matuojamiems tūriams turi būti koreguojami debitmačio ir sotintuvo su nustatyta temperatūra slėgio bei temperatūrų skirtumai. Jeigu debitmatis yra žemiau garų gaudyklės, koregavimas gali būti reikalingas atsižvelgiant į išgarintos gaudyklės ingredientus (1).

1.6.7. **Sukamasis rotorius (8, 11, 13)**

1.6.7.1. *Aparatūra*

Sukamojo rotoriaus metodu gali būti naudojamas sukamojo rotoriaus klampumo matuoklis, kaip parodyta 8 paveiksle. Eksperimentinės konstrukcijos schema parodyta 7 paveiksle.

Paprastai matavimo aparatas susideda iš sukamojo rotoriaus matavimo galvutės, įdėtos į apvalkalą su nustatyta temperatūra (reguliuojama 0,1° C ribose). Konteineris su mėginiu dedamas į apvalkalą su nustatyta temperatūra (reguliuojama 0,1° C ribose), o visos kitos konstrukcijos dalys yra laikomos aukštesnėje temperatūroje, kad būtų išvengiama kondensacijos. Didelio vakuumo siurblys sujungiamas su sistema didelio vakuumo vožtuvais.

Sukamojo rotoriaus matavimo galvutę sudaro vamzdelyje esantis plieninis rutuliukas (4-5 mm skersmens). Rutuliukas kybo magnetiniame lauke, jam stabilizuoti paprastai naudojamas nuolatinio magneto ir reguliavimo ričių derinys.

Rutuliukas sukamas ričių sukeliamu sukamuoju lauku. Griebiančiosios ritės, matuojančios visada egzistuojantį žemą šoninį kamuoliuko įmagnetinimą, naudojamos išmatuoti jo sukimosi greitį.

1.6.7.2. *Matavimų eiga*

Kai rutuliukas pasiekia tam tikrą sukimosi greitį v(o) (paprastai apie 400 sūkių per sekundę), tolesnis energijos padavimas liaujasi ir dėl dujų trinties įvyksta stabdymas.

Sukimosi greičio sumažėjimas matuojamas kaip laiko funkcija. Kadangi trintis dėl magnetinio sustabdymo palyginti su dujų trintimi yra nežymi, dujų slėgis *p* apskaičiuojamas taip:

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

kai:

$\bar{c}$ = vidutinis dujų molekulių greitis

r – = rutuliuko spindulys

p – = rutuliuko tankis

σ - = liestinio judesio kiekio perdavos koeficientas (ε = 1, kai rutuliuko paviršius idealiai sferinis)

t – = laikas

v(t) – = sukimosi greitis, praėjus laikui t

v(o) – = pradinis sukimosi greitis

Ši lygtis gali būti užrašyta taip:

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

kai t_n, t_{n-1} yra laikas, reikalingas tam tikram apsisukimų skaičiui N atlikti. Šie laiko intervalai t_n ir t_{n-1} eina vienas paskui kitą, o $t_n > t_{n-1}$.

Vidutinis dujų molekulių greitis apskaičiuojamas pagal:

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

kai:

T – = temperatūra

R – = universalioji molinė dujų konstanta

M – = molio masė

2. **DUOMENYS**

Bet kuriame iš ankstesnių metodų garų slėgis turėtų būti nustatomas naudojant mažiausiai dvi temperatūras. Kai ribos yra nuo 0 iki 50 C, norint patikrinti garų slėgio kreivės tiesiškumą, reikėtų naudoti tris arba daugiau temperatūras.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— taikytas tyrimo metodas;

— tikslios medžiagos charakteristikos (identiškumas ir priemaišos) ir išankstinio gryninimo pakopa, jeigu tokia yra,

— mažiausiai du garų slėgio ir temperatūros dydžiai, pageidautina 0–50 C ribose,

— visi neapdoroti duomenys,

— log p ir 1/T kreivės santykis,

— garų slėgio apskaičiavimas ribose, esant 20 arba 25 C.

Jei pastebimas keitimasis (būklės keitimasis, skilimas), reikia pažymėti šią informaciją:

— keitimosi pobūdis,

— temperatūra, kurioje esant atmosferiniam slėgiui prasideda keitimasis,

— garų slėgis 10 ir 20 C žemiau keitimosi temperatūros ir 10 ir 20 C aukščiau šios temperatūros (jei keitimasis nėra iš kietos į dujinę būseną).

Visa rezultatų aiškinimui svarbi informacija ir pastabos turi būti pateikiamos ataskaitoje, ypač reikia pateikti informaciją apie medžiagos priemaišas ir fizinę būklę.

4. **LITERATŪRA**

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

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

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

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

5) NF T 20-048 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use - Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10 1 to 105 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. Vac. Sci. Technol.(A), 1987, vol. 5 (4), 2440.

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

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

11) G. Comsa, J.K. Fremerey 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 priedėlis

Apskaičiavimų metodas

ĮVADAS

Apskaičiuotosios garų slėgio vertės gali būti naudojamos:

— nusprendžiant, kuris eksperimentinis metodas tinkamas,

— pateikiant apskaičiavimus arba ribinę vertę tais atvejais, kai eksperimentinio metodo negalima taikyti dėl techninių priežasčių (taip pat ir kai garų slėgis labai žemas),

— padėti nustatyti tuos atvejus, kai pagrįstai neatliekami eksperimentiniai matavimai, kadangi aplinkos temperatūroje garų slėgis gali būti < 10^{-5} Pa.

APSKAIČIAVIMO METODAS

Skystųjų ir kietųjų kūnų garų slėgis gali būti apskaičiuojamas naudojant pakeistą *Watson* koreliaciją (a). Vieninteliai reikalingi eksperimentiniai duomenys – tai normali virimo temperatūra. Metodas turi būti taikomas visame slėgių intervale nuo 10^{5} Pa iki 10^{-5} Pa.

Išsami informacija apie metodą pateikta leidinyje *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (b).

APSKAIČIAVIMŲ TVARKA

Pagal b nuorodą garų slėgis apskaičiuojamas taip:

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

kai:

T – = norima temperatūra

T_b – = normali virimo temperatūra

P_{vp} – = garų slėgis temperatūroje T

ΔH_{vb} – = garinimo šiluma

ΔZ_b – = spūdumo koeficientas (apskaičiuotas esant 0,97)

m – = empirinis koeficientas, priklausantis nuo fizikinės būsenos norimoje temperatūroje.

Toliau

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

kai K_F – empirinis koeficientas atsižvelgiant į medžiagos poliškumą. Kelių junginių rūšims K_F koeficientai yra išvardyti b nuorodoje.

Gana dažnai galima gauti duomenis, kur virimo temperatūra pateikiama sumažintame slėgyje. Tokiu atveju pagal b nuorodą garų slėgis apskaičiuojamas taip:

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

kai T_1 – virimo temperatūra sumažintame slėgyje P_1.

ATASKAITA

Naudojant apskaičiavimo metodą, ataskaitoje pateikiama išsami apskaičiavimų dokumentacija.

LITERATŪRA

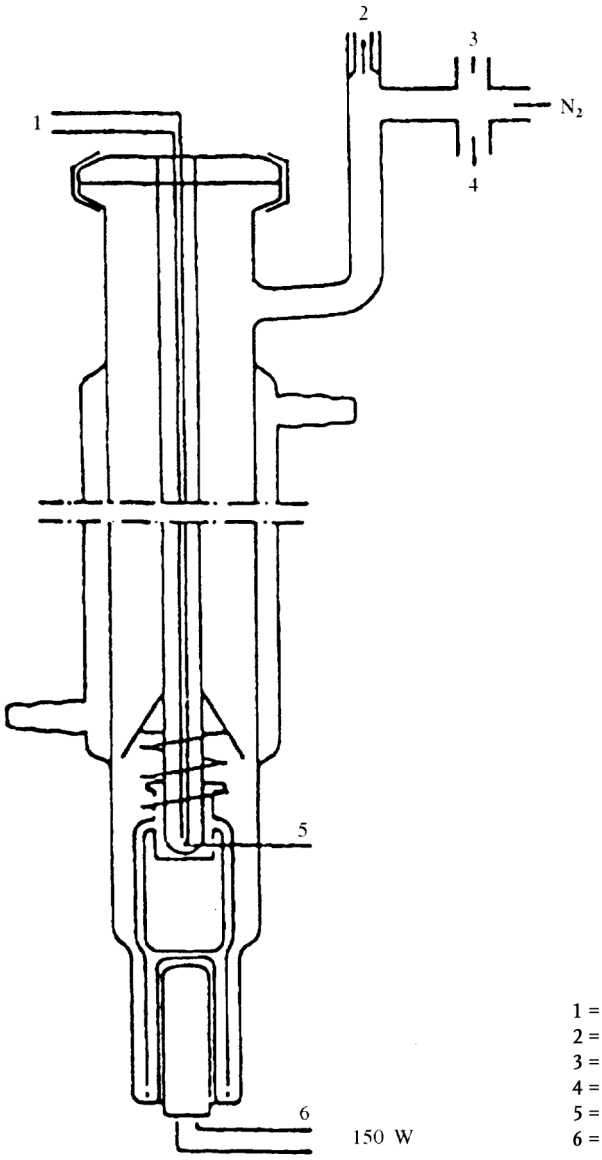
a) K. M. Watson, Ind. Eng.Chem.; 1943, vol. 35, 398.

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

2 priedėlis

1 paveikslas

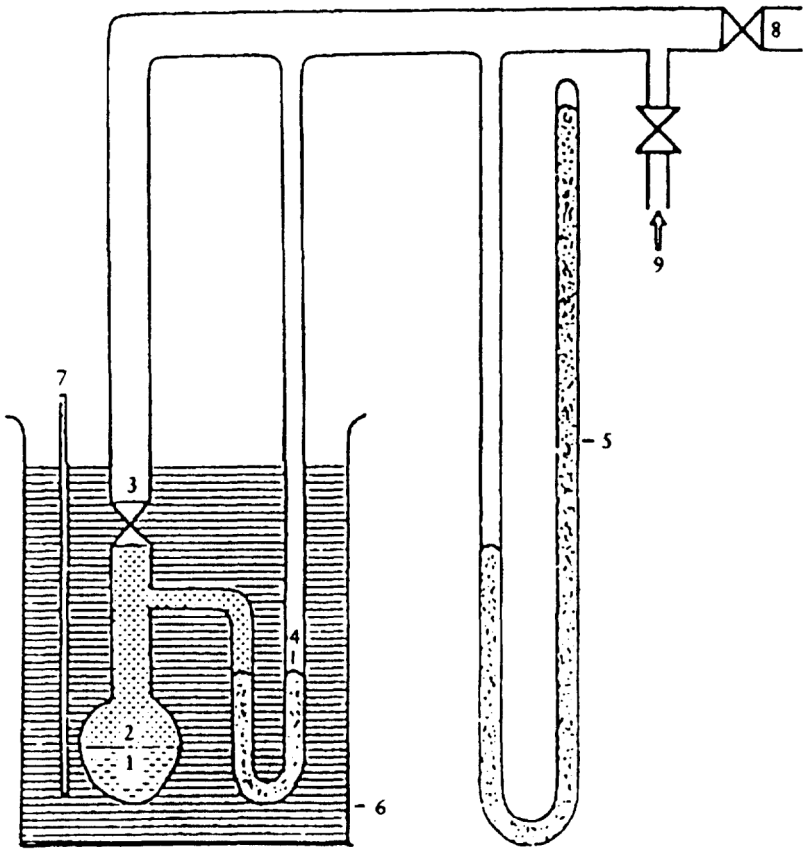
Garų slėgio kreivės nustatymo pagal dinaminį metodą aparatūra



1 = Termoelementas
2 = Vakuumo buferinis t?ris
3 = Manometras
4 = Vakuumas
5 = Matavimo taškas
6 = Šildymo elementas *circa* 150 W

2a paveikslas

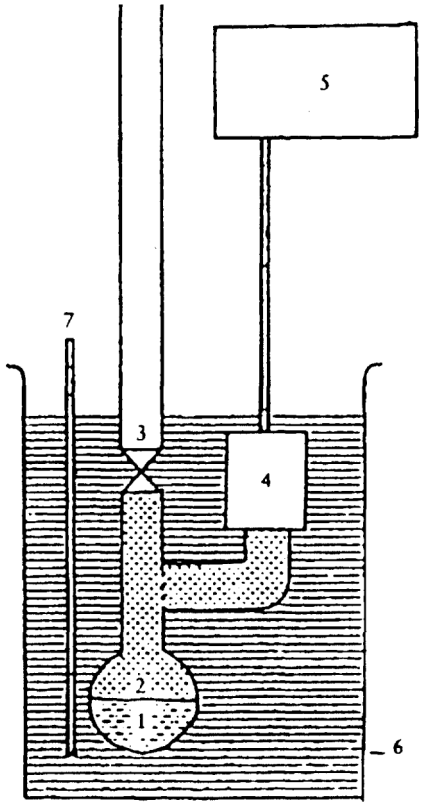
Garų slėgio kreivės nustatymo pagal statinį metodą (naudojant U formos manometrą) aparatūra



1. Mėginys
2. Garų fazė
3. Didelio vakuumo vožtuvas
4. U formos (papildomas) manometras
5. Manometras
6. Vonia su nustatoma temperatūra
7. Temperatūros matavimo prietaisas
8. Į vakuumo siurblį
9. Ventiliacija

2b paveikslas

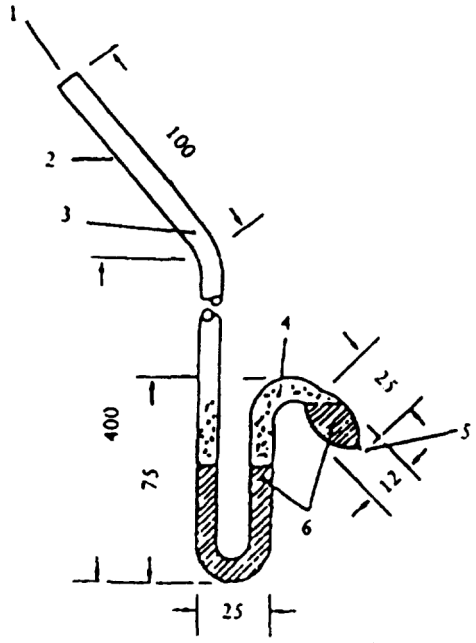
Garų slėgio kreivės nustatymo pagal statinį metodą (naudojant slėgio indikatorių) aparatūra



1. Mėginys
2. Garų fazė
3. Didelio vakuumo vožtuvas
4. Slėgio matuoklis
5. Slėgio indikatorius
6. Vonia su nustatoma temperatūra
7. Temperatūros matavimo prietaisas

3 paveikslas

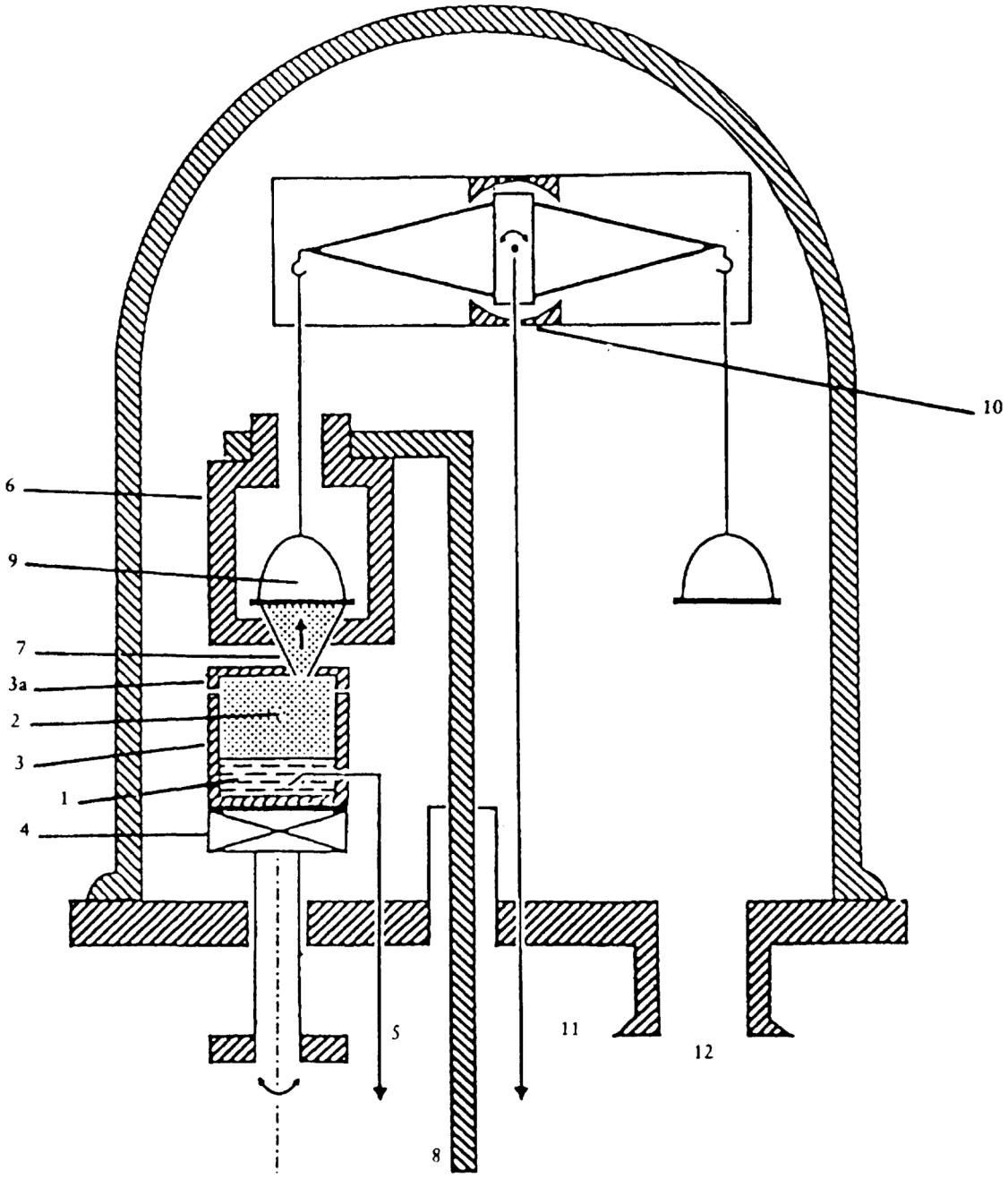
Izoteniskopas (žr. 7 nuorodą)



1. Į slėgio kontrolės ir matavimo sistemą
2. 8 mm OD vamzdelis
3. Sausas azotas slėgio sistemoje
4. Mėginio garai
5. Mažas antgalis
6. Skystas mėginys

4 paveikslas

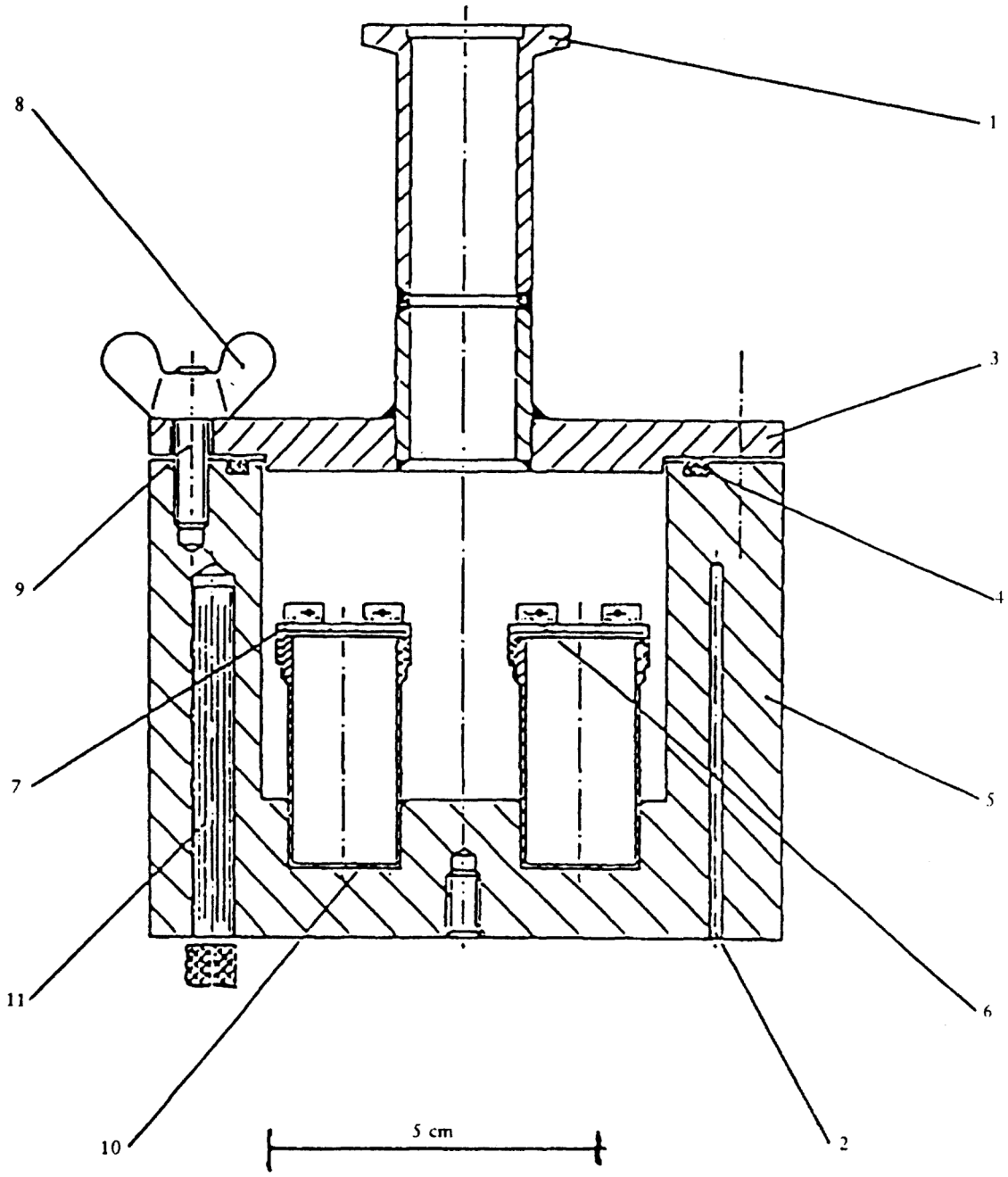
Garų slėgio kreivės nustatymo pagal garų slėgio pusiausvyros metodą aparatūra



1. Mėginys
2. Garų fazė su garų srove
3. Garinimo krosnis su sukamąja įsiurbimo anga
3a. Krosnies dangtis su anga
4. Krosnies šildymas (šaldymas)
5. Mėginio temperatūros matavimas
6. Šaldymo dėž?
7. Gaubtas
8. Šaldymo dėžės šaldymo strypas
9. Svarstyklių lėkštė
10. Mikrosvarstyklės
11. Į savirašį
12. Į didelio vakuumo siurblį

5 paveikslas

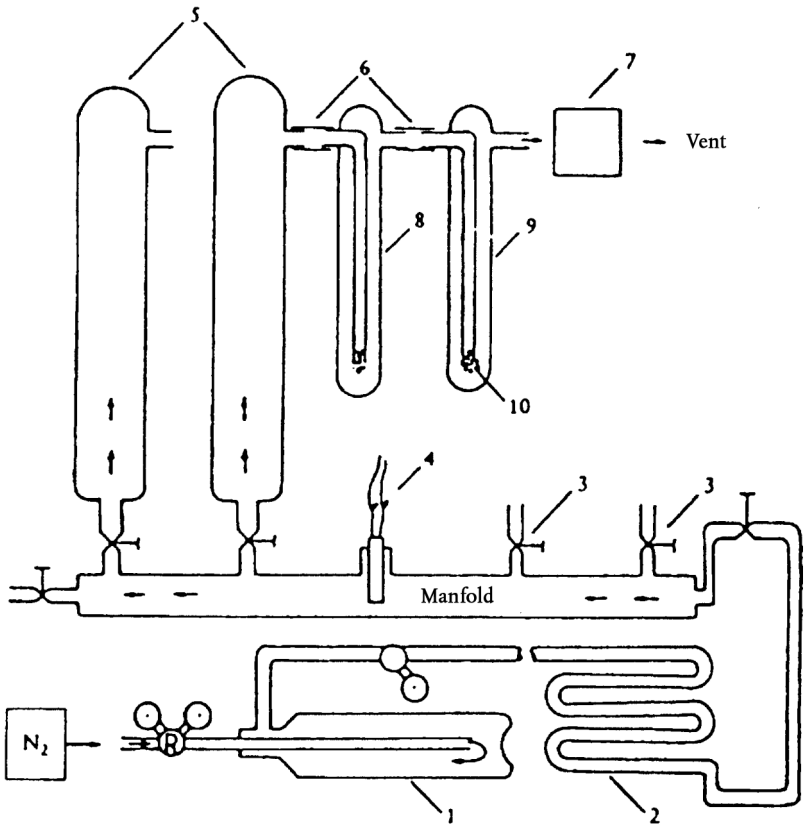
Aparatūros garinimui žemame slėgyje efuzijos metodu, efuzijos celės tūris 8 cm^3, pavyzdys



1. Jungtis su vakuumu
2. Ertmės platinos varžiniams termometrams arba temperatūrai matuoti bei kontroliuoti (2)
3. Vakuumo rezervuaro dangtis
4. O formos žiedas
5. Aliumininis vakuumo rezervuaras
6. Prietaisas efuzijos elementams įtaisyti ir išimti
7. Įsriegiamas dangtis
8. Sparnuotosios veržlės (6)
9. Varžtai (6)
10. Nerūdijančio plieno efuzijos elementai
11. Kaitinimo elementai (6)

6a paveikslas

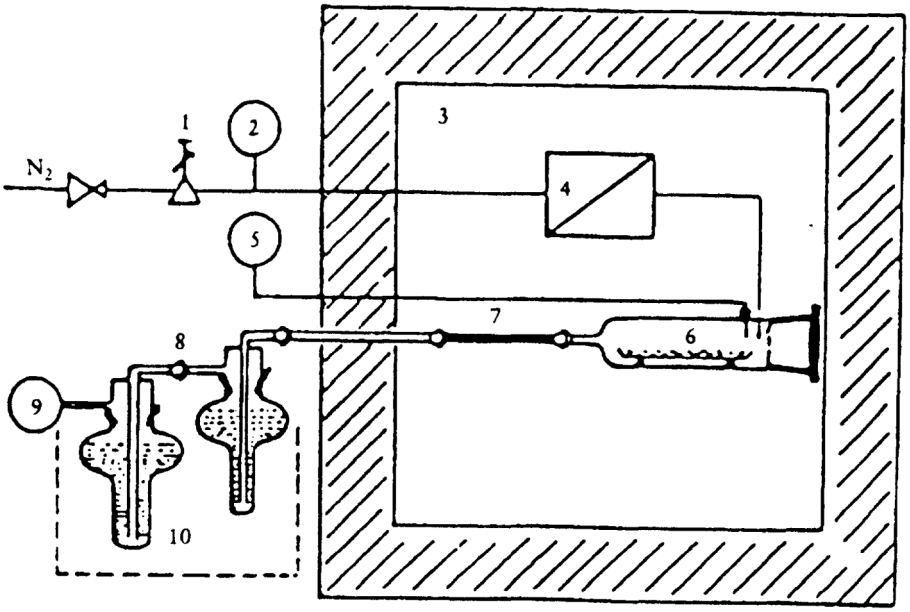
Srauto sistemos pavyzdys garų slėgiui nustatyti dujų soties metodu



1. Srauto reguliatorius
2. Šilumokaitis
3. Adatiniai vožtuvai
4. Santykinio drėgnio jutiklis
5. Soties kolonėlės
6. PTFE jungtys
7. Debitmatis
8. Gaudyklė (absorberis)
9. Alyvos gaudyklė
10. Frituotasis barboteris

6b paveikslas

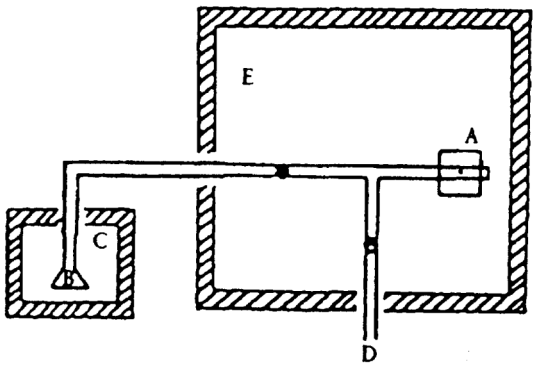
Garų slėgo nustatymo dujų soties metodu pavyzdys su kapiliariniu vamzdeliu, įtaisytu už įsotinimo kameros sistemos



1. Terminis masės debitmatis
2. Manometras
3. Kamera su kontroliuojama temperatūra
4. Nešančiųjų dujų ritė, nustatanti temperatūrą
5. Termometras (Pt 100)
6. Dujų įsotinimo kamera
7. Kapiliarinis vamzdelis
8. Absorbcijos indai
9. Dujomatis
10. Šaltoji gaudyklė

7 paveikslas

Eksperimentinės įrangos pavyzdys sukamojo rotoriaus metodui

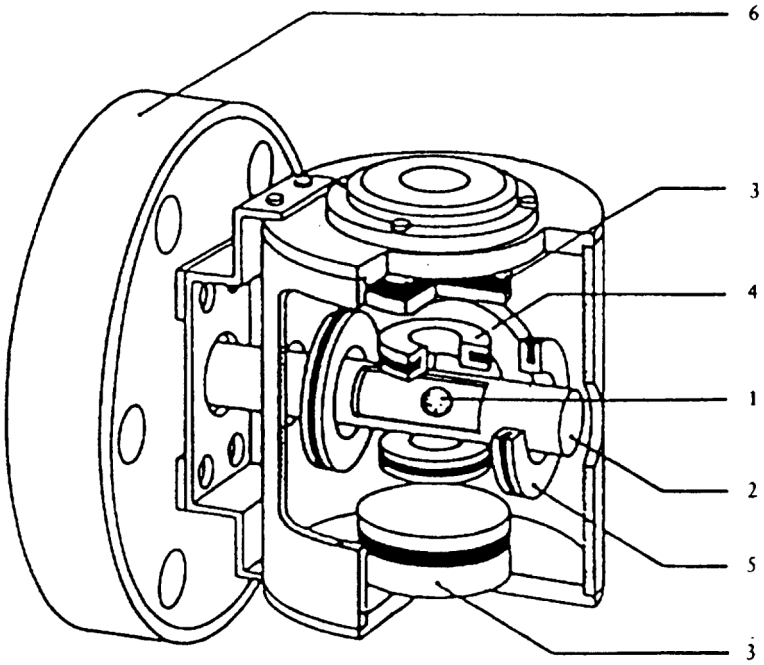


Garų slėgio aparatas

A. Sukamojo rotoriaus jutiklio galvutė;
B. Mėginio elementas;
C. Termostatas;
D. Vakuumo linija (turbosiurblys);
E. Oro termostatas.

8 paveikslas

Sukamojo rotoriaus matavimo galvutės pavyzdys



1. Rutuliukas;
2. 6 išsiurbtas vamzdinis ilgintuvas;
3. Nuolatiniai magnetai (2);
4. Ritės (2) vertikaliai stabilizacijai;
5. Varančiosios ritės (4);
6. Jungiamasis tarpiklis.

A.5. PAVIRŠIAUS ĮTEMPTIS

1. **METODAS**

Apibūdintieji metodai yra pagrįsti OECD Test Guideline (1). Pagrindiniai principai pateikti 2 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Apibūdintieji metodai turi būti taikomi vandeninių tirpalų paviršiaus įtempties matavimuose.

Naudinga prieš atliekant šiuos bandymus iš anksto turėti informaciją apie medžiagos micelių tirpumą vandenyje, struktūrą, hidrolizines savybes ir kritines koncentracijas.

Toliau išvardyti metodai yra taikytini daugumai cheminių medžiagų, netaikant jokių apribojimų jų grynumo laipsniui.

Paviršiaus įtempties matavimuose cikliniu tenzometru apsiribojama vandeniniais tirpalais, kurių dinaminis klampumas mažesnis negu apytikriai 200 mPa s.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Gibso paviršiaus energija vienam paviršiaus vienetui laikoma paviršiaus įtemptimi.

Paviršiaus įtemptis nurodoma:

N/m (SI vienetais) arba

mN/m (SI pogrupiais)

1 N/m = 10^3 dinų/cm

1 mN/m = 1 dina/cm nebevartojamoje cgs sistemoje

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninių medžiagų nereikia naudoti visais tais atvejais, kai tyrinėjama nauja medžiaga. Jos pirmiausia turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant metodų veikimą ir lyginti rezultatus su kitais metodais gautais rezultatais.

Etaloninės medžiagos, kurios įeina į didelę grupę paviršiaus įtempčių, pateiktos 1 ir 3 nuorodose.

1.4. METODŲ ESMĖ

Šie metodai yra pagrįsti matavimais didžiausios jėgos, reikalingos vertikaliai įtempti ant ąselės arba žiedo, esančio sąlytyje su matavimo stiklinėje esančio tiriamojo skysčio paviršiumi, norint skystį atskirti nuo to paviršiaus arba plokštelės, kurios kraštas liečiasi su tuo paviršiumi, kad būtų pritraukta susidariusi plėvelė.

Vandenyje tirpios medžiagos, kai jų koncentracija ne mažesnė kaip 1 mg/l, yra tiriamos vandeniniuose tirpaluose esant pavienei koncentracijai.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Šie metodai yra žymiai tikslesni, negu tai gali būti reikalinga aplinkosaugai įvertinti.

1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

Medžiagos tirpalas paruošiamas distiliuotame vandenyje. Šio tirpalo koncentracija turėtų sudaryti 90 % medžiagos soties tirpumo vandenyje; jeigu ši koncentracija viršija 1 g/l, tyrimui naudojama 1 g/l koncentracija. Medžiagų, kurių tirpumas vandenyje mažesnis kaip 1 mg/l, nereikia tirti.

1.6.1. **Anodinis metodas**

Žr. ISO 304 ir NF T 73-060 (Paviršinio aktyvumo reagentai – paviršiaus įtempties nustatymas tempiant skystąsias plėveles).

1.6.2. **Ąselės metodas**

Žr. ISO 304 ir NF T 73-060 (Paviršinio aktyvumo reagentai – paviršiaus įtempties nustatymas tempiant skystąsias plėveles).

1.6.3. **Žiedo metodas**

Žr. ISO 304 ir NF T 73-060 (Paviršinio aktyvumo reagentai – paviršiaus įtempties nustatymas tempiant skystąsias plėveles).

1.6.4. **OECD suderintas cirkuliarinis metodas**

1.6.4.1. *Aparatūra*

Parduodami tenzometrai tinka šiems matavimams. Juos sudaro šie elementai:

— kilnojamasis mėginio stalelis,

— matavimo sistema,

— matavimo kūnas (žiedas),

— matavimo indas.

1.6.4.1.1. Kilnojamasis mėginio stalelis

Kilnojamasis mėginio stalelis naudojamas kaip kontroliuojamos temperatūros matavimo indo, kuriame yra tiriamasis skystis, atrama. Kartu su jėgos matavimo sistema jis dedamas ant stovo.

1.6.4.1.2. Jėgos matavimo sistema

Jėgos matavimo sistema (žr. paveikslą) yra virš mėginio stalelio. Jėgos matavimo paklaida neturi viršyti $\pm 10^{-6}$ N, atitinkančią paklaidos ribą ± 0,1 mg matuojant masę. Daugeliu atvejų parduodamų tenzometrų matavimo skalė yra kalibruota mN/m taip, kad paviršiaus įtemptis gali būti tiesiogiai parodoma mN/m, 0,1 mN/m tikslumu.

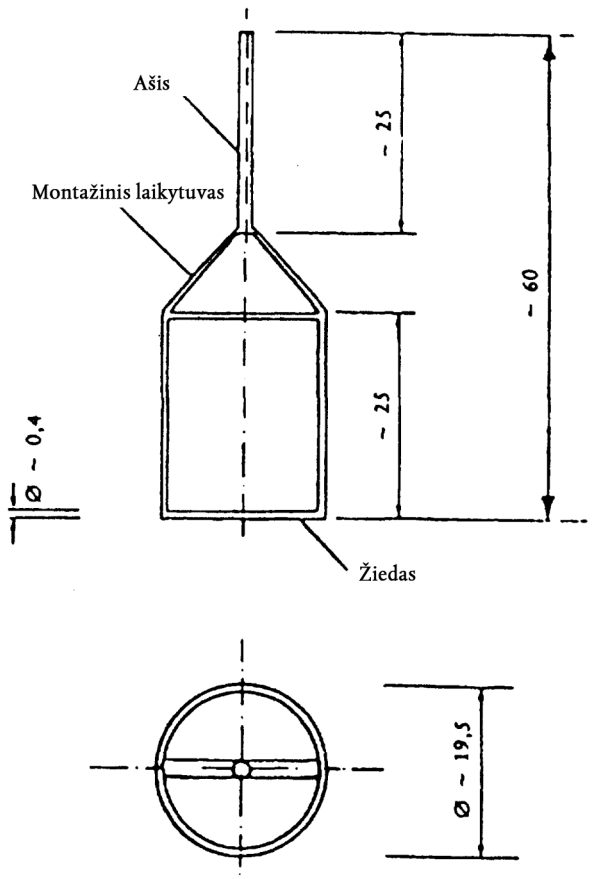
1.6.4.1.3. Matavimo kūnas (žiedas)

Paprastai žiedas yra padarytas iš platinos ir iridžio vielos, kurios storis 0,4 mm, o perimetras 60 mm. Vielos žiedas pakabinamas horizontaliai ant metalinės ašies ir montažinio laikytuvo, kad būtų galima sujungti su jėgos matavimo sistema (žr. paveikslą).

Paveikslas

Matavimo kūnas

(Visos dimensijos nurodytos milimetrais)



1.6.4.1.4. Matavimo indas

Matavimo indas su tiriamu tirpalu, kuris turi būti išmatuotas – tai stiklinis indas su kontroliuojama temperatūra. Jo konstrukcija turi būti tokia, kad matavimo metu tiriamo tirpalo skysčio temperatūra ir dujų fazė virš jo paviršiaus išliktų pastovios ir kad mėginys negaruotų. Tinka cilindriniai stikliniai indai, kurių vidinis skersmuo ne mažesnis kaip 45 mm.

1.6.4.2. *Aparatūros paruošimas*

1.6.4.2.1. Valymas

Stikliniai indai turi būti kruopščiai išvalomi. Jeigu reikia, jie išplaunami karšta chromo sieros rūgštimi, o po to sirupo tirštumo sieros rūgštimi (83-98% H_3PO_4 svorio) kruopščiai nuskalaujami vandeniu iš čiaupo ir galiausiai nuplaunami du kartus distiliuotu vandeniu, kol bus gaunama neutrali reakcija, po to išdžiovinama arba nuskalaujama dalimi mėginio tirpalo, kurį reikia išmatuoti.

Žiedas iš prdažių turi būti gerai nuskalaujamas vandeniu, kad būtų pašalinamos bet kokios vandenyje tirpios medžiagos, trumpam pamerkiamas į chromo sieros rūgštį, nuplaunamas du kartus distiliuotu vandeniu, kol bus gaunama neutrali reakcija, ir galiausiai lengvai pašildomas virš metanolio liepsnos.

Pastaba:

Tarša medžiagomis, kurios neištirpsta arba nesuyra veikiamos chromo sieros rūgštimi arba fosforo rūgštimi, pavyzdžiui, polisilosanai, yra pašalinama atitinkamais organiniais tirpikliais.

1.6.4.2.2. Aparato kalibravimas

Aparatas patvirtinamas patikrinant nulinį tašką ir suderinant taip, kad prietaiso parodymai leistų patikimai nustatyti mN/m.

Montažas:

Aparatas išlyginamas, pavyzdžiui, pagal tenzometro pagrindo spirito lygį, suderinant pagrinde esančius koreguojančius varžtus.

Nulinio taško derinimas:

Įtaisius žiedą ant aparato ir prieš pamerkiant jį į skystį, tenzometro parodymai suderinami taip, kad rodytų nulį, ir patikrinama, kad žiedas kabėtų lygiagrečiai skysčio paviršiui. Tam tikslui skysčio paviršius gali būti naudojamas kaip veidrodis.

Kalibravimas:

Tikrasis bandymo kalibravimas gali būti atliekamas naudojant dvi darbo eigas:

a) naudojant masę: darbo eiga naudojant žinomos masės, 0,1-1,0 g, pasvarėlius, uždedamus ant žiedo. Kalibravimo koeficientas Φ_a, iš kurio turi būti padauginamas kiekvienas prietaiso parodymas, nustatomas pagal šią lygtį (1):

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

kai:

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

m – = pasvarėlio masė (g)

g – = sunkio greitėjimas (981 cm s^{-2} jūros lygyje)

b – = vidutinis žiedo perimetras (cm)

σ_a – = tenzometro parodymai po to, kai ant žiedo uždedami pasvarėliai (mN/m).

b) naudojant vandenį: darbo eiga naudojant gryną vandenį, kurio paviršiaus įtemptis, kai temperatūra, pavyzdžiui, lygi 23 °C, yra 72,3 mN/m. Ši darbo eiga greitesnė negu svorio kalibravimas, bet visuomet yra pavojus, kad vandens paviršiaus įtemptį iškreips taršos paviršinio aktyvumo medžiagomis pėdsakai.

Kalibravimo koeficientas Φ_b, iš kurio padauginami visi prietaiso parodymai, yra nustatomas pagal lygtį (2):

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

kai:

σ_0 – = nuorodoje apie vandens paviršiaus įtemptį nurodyta vertė (mN/m)

σ_g – = išmatuota vandens paviršiaus įtempties vertė (mN/m),

abi tokioje pat temperatūroje.

1.6.4.3. *Mėginių paruošimas*

Vandeniniai tirpalai paruošiami iš tiriamųjų medžiagų naudojant reikalingas koncentracijas vandenyje, juose neturi būti jokių neištirpusių medžiagų.

Tirpalas turi būti laikomas pastovioje temperatūroje (± 0,5° C). Kadangi tirpalo, esančio matavimo inde, paviršiaus įtemptis kinta laike, atliekami keli matavimai skirtingu laiku ir brėžiama kreivė, parodanti paviršiaus įtemptį kaip laiko funkciją. Jeigu niekas toliau nesikeičia, tai pusiausvyros būsena pasiekta.

Tarša kitų medžiagų dulkėmis ir dujomis trukdo matavimams. Todėl darbas turi būti atliekamas po apsauginiu gaubtu.

1.6.5. **Bandymo sąlygos**

Matavimai atliekami apytikriai 20° C temperatūroje ir kontroliuojami ± 0,5° C ribose.

1.6.6. **Bandymo vykdymas**

Matuojami tirpalai perpilami į kruopščiai išvalytą matavimo indą, stengiantis, kad nesusidarytų putų, po to matavimo indas dedamas ant bandymo aparato stalelio. Stalelio viršus su matavimo indu keliamas aukštyn, kol žiedas panyra žemiau matuojamo tirpalo paviršiaus. Po to stalelio viršus pamažu ir tolydžiai nuleidžiamas (apie 0,5 cm/min. greičiu), atskiriant žiedą nuo paviršiaus, kol bus pasiekta maksimali jėga. Skysčio sluoksnis, besiliečiantis su žiedu, neturi atsiskirti nuo žiedo. Užbaigus matavimus, žiedas vėl iškeliamas į paviršių, matavimai kartojami tol, kol bus gauta pastovi paviršiaus įtempties vertė. Kiekvienam nustatymui užrašomas tirpalo perpylimo į matavimo indą laikas. Matavimai užrašomi esant maksimaliai jėgai, reikalingai atskirti žiedą nuo skysčio paviršiaus.

2. **DUOMENYS**

Norint apskaičiuoti paviršiaus įtemptį, aparato parodyta vertė mN/m pirma dauginama iš kalibravimo koeficiento Φ_a arba Φ_b (priklausomai nuo naudotos kalibravimo darbo eigos). Taip bus gaunama vertė, kuri taikoma tik apytikriai ir todėl ją reikia koreguoti.

Harkins ir Jordan (4) paviršiaus įtempties vertėms, matuotoms žiedo metodu, empiriškai nustatė korekcijos koeficientus, kurie priklauso nuo žiedo dimensijų, skysčio tankio ir jo paviršiaus įtempties.

Kadangi korekcijos koeficiento nustatymas kiekvienam atskiram matavimui pagal Harkins ir Jordan lenteles yra daug pastangų reikalaujantis darbas, vandeninių tirpalų paviršiaus įtempčiai apskaičiuoti gali būti naudojama supaprastinta koreguotų paviršiaus įtempties verčių skaitymo tvarka tiesiogiai iš šios lentelės. (Interpoliacija turi būti naudojama parodymams, svyruojantiems tarp lentelėje pateiktų verčių).

LENTELĖ: MATUOTOS PAVIRŠIAUS ĮTEMPTIES KOREKCIJA

Tik vandeniniams tirpalams, $\rho \equiv 1$ g/cm^3

R = 9,55 mm (vidutinis žiedo spindulys)

r = 0,185 mm (vidutinis laido spindulys)

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

Ši lentelė buvo sudaryta remiantis Harkins-Jordan korekcijomis. Ji panaši į vandens ir vandeninių tirpalų (tankis $\rho = 1$ g/cm^3) DIN standartą (DIN 53914) ir taikoma pardavinėjamam žiedui, kurio dimensijos R = 9,55 mm (vidutinis žiedo spindulys) ir r = 0,185 mm (žiedo laido spindulys). Lentelėje yra pateiktos koreguotos paviršiaus įtempties matavimų vertės, paimtos po kalibravimo su svoriais arba kalibravimo su vandeniu.

Kitaip, be išankstinio kalibravimo, paviršiaus įtemptis gali būti apskaičiuojama pagal šią formulę:

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

kai:

F – = jėga, matuota dinamometru plėvelės nutrūkimo taške

R – = žiedo spindulys

r – = korekcijos koeficientas (1)

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, kiek įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— naudotas metodas,

— naudoto vandens arba tirpalo rūšis,

— tikslus ir išsamus medžiagos apibūdinimas (identiškumas ir priemaišos),

— matavimo rezultatai: paviršiaus įtemptis (parodymai), nurodant tiek atskirus parodymus ir jų aritmetinį vidurkį, tiek koreguotą vidurkį (atsižvelgiant į įrangą ir korekcijos lentelę),

— tirpalo koncentracija,

— bandymo temperatūra,

— naudoto tirpalo amžius; ypač laikas nuo paruošimo iki tirpalo matavimo,

— paviršiaus įtempties priklausomybės nuo laiko perpylus tirpalą į matavimo indą apibūdinimas,

— visa informacija ir pastabos, svarbios rezultatų, apie kuriuos reikia pranešti, aiškinimui, ypač atsižvelgiant į priemaišas ir medžiagos fizikinę būseną.

3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Laikant, kad 20° C temperatūroje distiliuoto vandens paviršiaus įtemptis lygi 72,75 mN/m, medžiagos, kurių paviršiaus įtemptis mažesnė kaip 60 mN/m, pagal šio bandymo sąlygas, turėtų būti laikomos paviršinio aktyvumo medžiagomis.

4. **LITERATŪRA**

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

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

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

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

A.6. TIRPUMAS VANDENYJE

1. **METODAS**

Apibūdintasis metodas yra pagrįstas OECD Test Guideline (1).

1.1. ĮVADAS

Šiam bandymui atlikti naudinga turėti išankstinių duomenų apie medžiagos struktūrinę formulę, garų slėgį, disociacijos konstantą ir hidrolizę (pH funkciją).

Nėra atskiro metodo, apimančio visą tirpumo vandenyje intervalą.

Du toliau apibūdinti bandymų metodai apima visą tirpumo intervalą, bet nėra taikytini lakiosioms medžiagoms:

— vienas, taikomas iš tikrųjų grynoms mažo tirpumo medžiagoms ($<10^{-2}$ gramų viename litre), ir kurios stabilios vandenyje, nurodytas kaip „kolonėlės eliuavimo metodas“,

— kitas, kuris taikomas iš tikrųjų grynoms didesnio tirpumo medžiagoms ($>10^{-2}$ gramų viename litre) ir kurios yra pastovios vandenyje, nurodytas kaip „kolbos metodas“.

Tiriamosios medžiagos tirpumą vandenyje gali stipriai paveikti joje esančios priemaišos.

1.2. APIBRĖŽIMAS IR VIENETAI

Medžiagos tirpumas vandenyje yra apibrėžiamas medžiagos soties masės koncentracija vandenyje tam tikroje temperatūroje. Tirpumas vandenyje yra apibrėžiamas masės vienetais tirpalo tūryje. SI vienetai – tai kg/m^3 (taip pat gali būti naudojama gramai litre).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninių medžiagų nereikia naudoti visais tais atvejais, kai tyrinėjama nauja medžiaga. Pirmiausiai jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant metodo veikimą ir palyginti gautus rezultatus su kitais metodais gautais rezultatais.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Apytikris bandinio kiekis ir laikas, reikalingas soties masės koncentracijai gauti, turėtų būti nustatomas paprastu išankstiniu bandymu.

1.4.1. **Kolonėlės eliuavimo metodas**

Šis metodas pagrįstas bandomosios medžiagos eliuavimu su vandeniu iš mikrokolonėlės, pakrautos inertine indiferentine medžiaga, pavyzdžiui, stiklo rutuliukais arba smėliu, padengta bandomosios medžiagos pertekliumi. Tirpumas vandenyje yra nustatomas tada, kai eliuato masės koncentracija yra pastovi. Tai parodoma koncentracijos kreivės plokščiąja dalimi kaip laiko funkcija.

1.4.2. **Kolbos metodas**

Šiuo metodu medžiaga (kietosios medžiagos turi būti pulverizuojamos) ištirpinama vandenyje, kurio temperatūra šiek tiek aukštesnė negu bandymo temperatūra. Pasiekus sotį, mišinys ataušinamas ir laikomas bandymo temperatūroje, maišant tiek, kiek to reikia pusiausvyrai pasiekti. Matavimas gali būti atliekamas ir tiesiogiai bandymo temperatūroje, jeigu tinkamu bandinių parinkimu užtikrinama, kad bus pasiekta soties pusiausvyra. Po to medžiagos masės koncentracija vandeniniame tirpale, kuriame neturi būti jokių neištirpusių dalelių, yra nustatoma atitinkamu analitiniu metodu.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.5.1. **Pakartojamumas**

Kolonėlės eliuavimo metodu pakartojamumas gali būti < 30 %; kolbos metodu turėtų būti nustatoma < 15 %.

1.5.2. **Jautrumas**

Tai priklauso nuo analizės metodo, bet masės koncentracija gali būti nustatoma iki 10^{-6} gramų viename litre.

1.6. METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Bandymo sąlygos**

Bandymą geriau atlikti 20 ± 0,5° C temperatūroje. Jeigu manoma, kad tirpumas priklauso nuo temperatūros (> 3 % vienam °C), turėtų būti taip pat naudojamos dar dvi temperatūros vertės, ne mažiau kaip 10° C didesnė ir mažesnė už iš pradžių pasirinktą temperatūrą. Tokiu atveju temperatūra turėtų būti kontroliuojama ± 0,1° C ribose. Pasirinktoji temperatūra turėtų būti išlaikoma pastovi visose svarbiose įrangos dalyse.

1.6.2. **Išankstinis bandymas**

Į apytikriai 0,1 g bandinio (kietosios medžiagos turi būti pulverizuojamos), esančio stikliniu kamščiu užkimštame 10 ml graduotame cilindre kambario temperatūroje, palaipsniui pilami vis didesni distiliuoto vandens tūriai, nurodyti žemiau pateiktoje lentelėje:

0,1 g, ištirpstantis „x“ ml vandens	0,1	0,5	1	2	10	100	>100
Apytikris tirpumas (gramai litre)	> 1000	1000 - 200	200 – 100	100 – 50	50 – 10	10 – 1	<1

Kiekvieną kartą įpylus nurodytą kiekį vandens, mišinys stipriai kratomas 10 minučių ir vizualiai tikrinama, ar nėra neištirpusių mėginio dalelių. Jeigu, pridėjus 10 ml vandens, mėginys arba jo dalys neištirpsta, eksperimentas turi būti pakartojamas 100 ml matavimo cilindre su didesniais tūriais vandens. Jeigu tirpumas mažesnis, laikas, reikalingas medžiagai ištirpinti, gali būti žymiai ilgesnis (turėtų būti skiriamos ne mažiau kaip 24 valandos). Apytikris tirpumas lentelėje yra pateiktas tokiame įdedamo vandens tūryje, kuriame mėginys visiškai ištirpsta. Jeigu medžiaga vis tiek yra akivaizdžiai netirpi, turėtų būti skiriama daugiau negu 24 valandos (daugiausiai 96 val.), arba reikėtų toliau skiesti, išsiaiškinant, ar turėtų būti naudojamas kolonėlės eliuavimo arba tirpumo kolboje metodas.

1.6.3. **Kolonėlės eliuavimo metodas**

1.6.3.1. *Pagalbinė medžiaga, tirpiklis ir eliuatas*

Kolonėlės eliuavimo metode pagalbinė medžiaga turėtų būti inertiška. Medžiagos, kurias galima naudoti – tai stiklo rutuliukai ir smėlis. Atitinkamas lakus tirpiklis, atitinkantis analizinio reagento kokybę, turėtų būti naudojamas bandomajai medžiagai uždėti ant pagalbinės medžiagos. Du kartus distiliuotas stikliniame arba kvarciniame aparate destiliuotas vanduo, turėtų būti naudojamas kaip eliuatas.

Pastaba:

Vanduo tiesiai iš organinio jonitinio filtro neturi būti naudojamas.

1.6.3.2. *Pagalbinės medžiagos pakrovimas*

Pasveriama apie 600 mg pagalbinės medžiagos ir perpilama į 50 ml apvaliadugnę kolbą.

Tinkamas, pasvertas bandomos medžiagos kiekis ištirpinamas pasirinktame tirpiklyje. Atitinkamas šio tirpalo kiekis dedamas į pagalbinę medžiagą. Tirpiklis turi būti visiškai išgarinamas, pavyzdžiui, sukamajame garintuve; priešingu atveju pagalbinės medžiagos soties nebus pasiekta dėl pasiskirstymo reiškinių ant pagalbinės medžiagos paviršiaus.

Pagalbinės medžiagos pakrovimas gali sukelti problemų (klaidingi rezultatai), jeigu tiriamoji medžiaga yra nusodinama kaip alyva arba skirtinga kristalo fazė. Problemą reikėtų spręsti eksperimentiniu būdu ir apie tai pateikti išsamią informaciją.

Pakrauta pagalbinė medžiaga paliekama įmirkti apie dvi valandas apytikriai 5 ml vandens, po to suspensija dedama į mikrokolonėlę. Kitais atvejais pakraunama sausa pagalbinė medžiaga gali būti supilama į vandens pripildytą mikrokolonėlę, po to apie dvi valandas leidžiama nusistovėti pusiausvyrai.

Bandymo eiga:

Medžiagos eliuavimas iš pagalbinės medžiagos gali būti atliekamas dviem skirtingais būdais:

— recirkuliaciniu siurbliu (žr. 1 paveikslą),

— lyginančiuoju indu (žr. 4 paveikslą).

1.6.3.3. *Kolonėlės eliuavimo metodas su recirkuliaciniu siurbliu*

Aparatūra

Tipinės sistemos schema pateikta 1 paveiksle. Tinkanti mikrokolonėlė parodyta 2 paveiksle, nors tinka ir bet kokio kito dydžio, jeigu atitinka atkuriamumo ir jautrumo kriterijus. Kolonėlėje turėtų būti tiek laisvos erdvės, kad tilptų ne mažiau kaip penki vandens sluoksnio tūriai ir mažiausiai penki mėginiai. Kitais atvejais dydį galima sumažinti, jeigu naudojamas užkraunamasis tirpiklis, naudojamas pakeisti pradinius su priemaišomis pašalinamus penkis sluoksnio tūrius.

Kolonėlė turėtų būti sujungta su recirkuliaciniu siurbliu, kuriuo galima kontroliuoti apytikriai 25 ml/h srautus. Siurblys sujungiamas su politetrafluoretileno (P.T.F.E) ir(arba) stiklinėmis jungtimis. Kolonėlė ir siurblys, juos sumontavus, turėtų paimti išmetamą kiekį ir nustatyti sluoksnio tūrio pusiausvyrą atmosferos slėgyje. Į kolonėlėje esančią medžiagą papildomai dedamas nedidelis (5 mm) stiklo vatos kaištis, kuris taip pat naudojamas dalelytėms filtruoti. Recirkuliacinis siurblys, pavyzdžiui, gali būti peristaltiniu siurbliu arba membraniniu siurbliu (reikia imtis atsargumo priemonių, kad vamzdyje esanti medžiaga nebūtų užteršiama ir(arba) neįvyktų absorbcija).

Matavimo eiga

Srautas leidžiamas per kolonėlę. Rekomenduojama, kad būtų naudojamas apytikriai 25 ml/val. debitas (apibūdintai kolonėlei tai – 10 sluoksnio tūrių/val.). Pirmieji penki sluoksnio tūriai (mažiausiai) yra išpilami, kad būtų pašalinamos vandenyje tirpios priemaišos. Po to recirkuliacinis siurblys dirba tol, kol pasiekiama pusiausvyra, kaip nustatyta penkiais vienas po kito dedamais mėginiais, kurių koncentracijos skiriasi ne daugiau kaip ± 30 % juos atsitiktinai parenkant. Šie mėginiai turėtų būti vienas nuo kito atskiriami laiko intervalais, kurio metu pasikeičia ne mažiau kaip 10 eliuato sluoksnio tūrių.

1.6.3.4. *Kolonėlės eliuavimo metodas su išlyginančiuoju indu*

Aparatūra (žr. 3 ir 4 pav.)

Išlyginantysis indas: išlyginančiojo indo jungtis yra padaroma iš matinio stiklo jungties, kuri sujungta PTFE vamzdeliais. Rekomenduojamas apie 25 ml/val. debitas. Viena po kitos sekančios eliuato frakcijos turėtų būti surenkamos ir analizuojamos pasirinktu metodu.

Matavimo eiga

Tos vidurinio eliuato intervalo frakcijos, kurių koncentracijos yra pastovios (± 30 %) ne mažiau kaip penkiose iš eilės einančiose frakcijose, yra naudojamos nustatyti tirpumą vandenyje.

Abiem atvejais (naudojant recirkuliacinį siurblį arba išlyginantį indą) viską reikia dar kartą pakartoti su puse pirmojo debito kiekio. Jeigu abu rezultatai sutampa, bandymas yra patenkinamas; jeigu esant mažesniam debitui nustatomas akivaizdžiai didesnis tirpumas, debitas turi būti dalijamas pusiau, kol dviem vienas po kito einančiais matavimais bus nustatytas toks pat tirpumas.

Abiem atvejais (naudojant recirkuliacinį siurblį arba išlyginantį indą) frakcijos turėtų būti patikrinamos, ar nėra koloidinių medžiagų, tikrinant, ar nėra Tindalio reiškinio (šviesos sklaidos). Dėl tokių dalelių rezultatai tampa negaliojančiais, o bandymas turėtų būti pakartojamas, pagerinant kolonėlės filtravimo darbo eigą.

Turėtų būti užrašomas kiekvieno bandinio pH. Darbo eiga turėtų būti kartojama tokioje pat temperatūroje.

1.6.4. **Kolbos metodas**

1.6.4.1. *Aparatūra*

Kolbos metodui reikalingos tokios medžiagos:

— paprasti laboratoriniai stikliniai indai ir prietaisai,

— prietaisas, tinkantis tirpalams suplakti kontroliuojamoje pastovioje temperatūroje,

— centrifuga (geriau su reguliuojama temperatūra), jeigu reikia, su emulsijomis, ir

— įrenginys analiziniam nustatymui.

1.6.4.2. *Matavimo eiga*

Medžiagos kiekis, reikalingas norimam vandens tūriui įsotinti, yra apskaičiuojamas išankstiniu bandymu. Reikalingas vandens tūris priklauso nuo analizės metodo ir tirpumo intervalo. Apytikriai penki anksčiau nustatyti medžiagos kiekiai pasveriami į kiekvieną iš trijų stiklinių indų su stikliniais kamščiais (pvz., centrifugos vamzdžiai, kolbos). Pasirinktas vandens kiekis pilamas į kiekvieną indą, kiekvienas indas sandariai užkemšamas. Užkimšti indai kratomi 30° C temperatūroje. (Turėtų būti naudojamas kratytuvas arba maišytuvas, galintys dirbti pastovioje temperatūroje, pvz., magnetinis maišymas termostatu kontroliuojamoje vandens vonioje). Po paros vienas indas išimamas ir pakartotinai nustatoma pusiausvyra per 24 valandas bandymo temperatūroje retsykiais pakratant. Inde esantis turinys centrifuguojamas bandymo temperatūroje, mėginio aiškioje hidratuotoje fazėje koncentracija nustatoma atitinkamu analiziniu metodu. Su kitomis dviem kolbomis elgiamasi taip pat, prieš tai nustatant pradinę pusiausvyrą 30 ^{0}C temperatūroje atitinkamai per dvi ir tris paras. Jeigu duomenys apie koncentraciją, gauti ne mažiau kaip iš paskutiniųjų dviejų indų, atitinka reikalavimus, bandymas yra patenkinamas. Visas bandymas turėtų būti pakartojamas naudojant ilgesnius pusiausvyros nustatymo laikus, jeigu 1, 2 ir 3 indo rezultatai krypsta į didesnes vertes.

Matavimo eigą taip pat galima atlikti be išankstinio inkubacinio laikotarpio 30^{0}C temperatūroje. Kad būtų galima įvertinti soties pusiausvyros nustatymo koeficientą, mėginiai yra imami tada, kai maišymo laikas nebeturi įtakos tiriamojo tirpalo koncentracijai.

Turėtų būti užrašomas kiekvieno mėginio pH.

1.6.5. **Analizė**

Atliekant šiuos nustatymus pasirenkamas tai medžiagai tinkantis analizės metodas, kadangi nedideli tirpių medžiagų kiekiai gali būti didelių matuojamo tirpumo paklaidų priežastis. Tokių metodų pavyzdžiai: dujų arba skysčių chromatografija, titravimo metodai, fotometriniai metodai, voltamperometriniai metodai.

2. **DUOMENYS**

2.1. KOLONĖLĖS ELIUAVIMO METODAS

Vidutinė vertė, gauta iš ne mažiau kaip penkių mėginių, iš eilės paimtų iš soties kreivės plokščiosios dalies, turėtų būti apskaičiuojama kiekvienam matavimui, kaip ir standartinis nuokrypis. Duomenys turėtų būti pateikiami tokiais vienetais: masė tirpalo tūriui.

Vidurkiai, apskaičiuojami naudojant skirtingus dviejų bandymų srautus, yra palyginami, o jų pakartojamumas turėtų būti mažesnis kaip 30 %.

2.2. KOLBOS METODAS

Duomenys turėtų būti gaunami kiekvienai iš trijų kolbų, o iš tų duomenų, kurie laikomi esantys pastovūs (pakartojamumas mažesnis kaip 15 %.), išvedamas vidurkis ir pateikiamas masės vienam tirpalo tūriui vienetais. Tam gali tekti masės vienetus pakartotinai paversti tūrio vienetais, naudojant tankį, jeigu tirpumas labai didelis (> 100 gramų viename litre).

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. KOLONĖLĖS ELIUAVIMO METODAS

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— išankstinio bandymo rezultatai,

— išsamios medžiagos charakteristikos (tapatybė ir priemaišos),

— kiekvieno mėginio individualiosios koncentracijos, debitai ir pH,

— ne mažiau kaip penkių mėginių vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai, paimti iš soties kreivės plokščiosios dalies,

— dviejų, vienas paskui kitą sekančių matavimų bendrasis vidurkis,

— vandens temperatūra įsisotinimo metu,

— naudotas analizės metodas,

— naudotos pagalbinės medžiagos charakteristikos,

— pagalbinės medžiagos pakrovimas,

— naudotas tirpiklis,

— bet kokio medžiagos cheminio nepastovumo įrodymai bandymo metu ir naudotas metodas,

— visa informacija, svarbi rezultatų aiškinimui, ypač apie priemaišas ir medžiagos fizikinę būseną.

3.2. KOLBOS METODAS

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— išankstinio bandymo rezultatai,

— išsamios medžiagos charakteristikos (identiškumas ir priemaišos),

— kiekvienas individualus nustatymas ir vidurkis, jeigu kiekvienai kolbai buvo nustatoma daugiau negu viena vertė,

— kiekvieno mėginio pH,

— skirtingų kolbų, kurių duomenys sutampa, bendrasis vertės vidurkis,

— bandymo temperatūra,

— naudotas analizės metodas,

— bet kokio medžiagos cheminio nepastovumo įrodymai bandymo metu ir naudotas metodas,

— visa informacija, svarbi rezultatų aiškinimui, ypač apie priemaišas ir medžiagos fizinę būseną.

4. **LITERATŪRA**

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

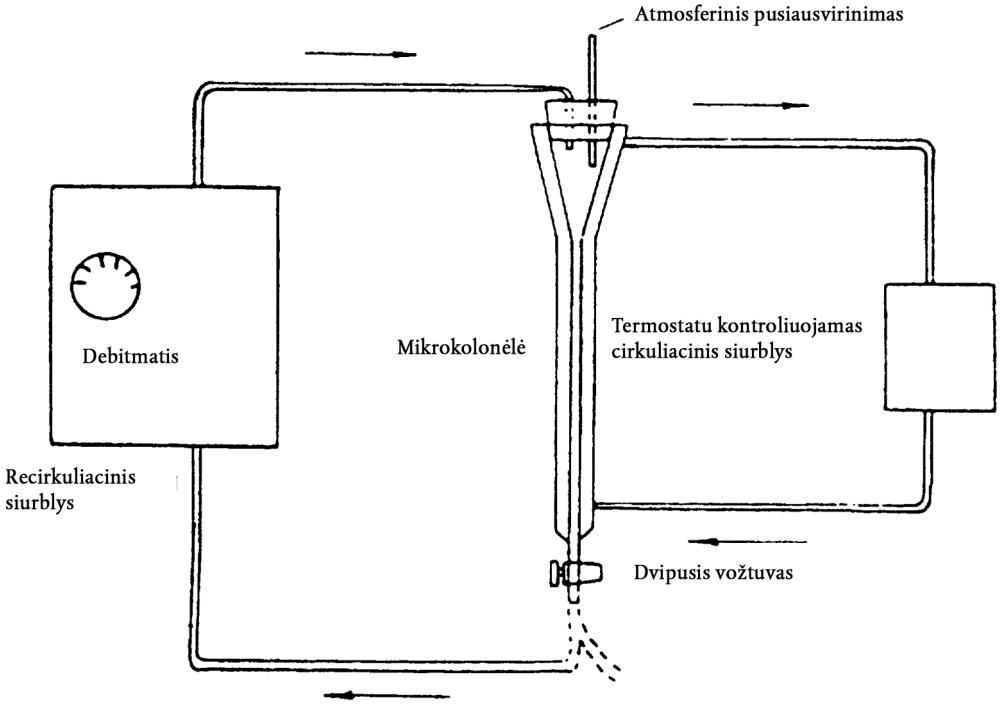
2) NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.

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

Priedėlis

1 paveikslas

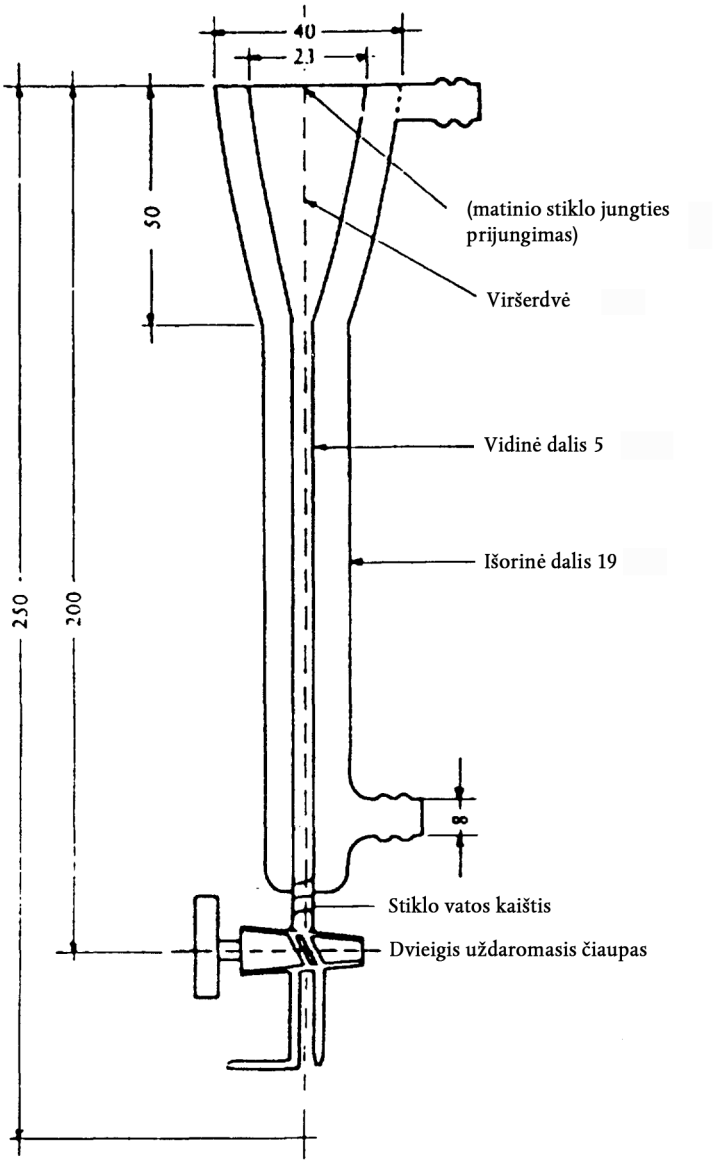
Kolonėlės eliuavimo metodas su recirkuliaciniu siurbliu



2 paveikslas

Tipiška mikrokolonėlė

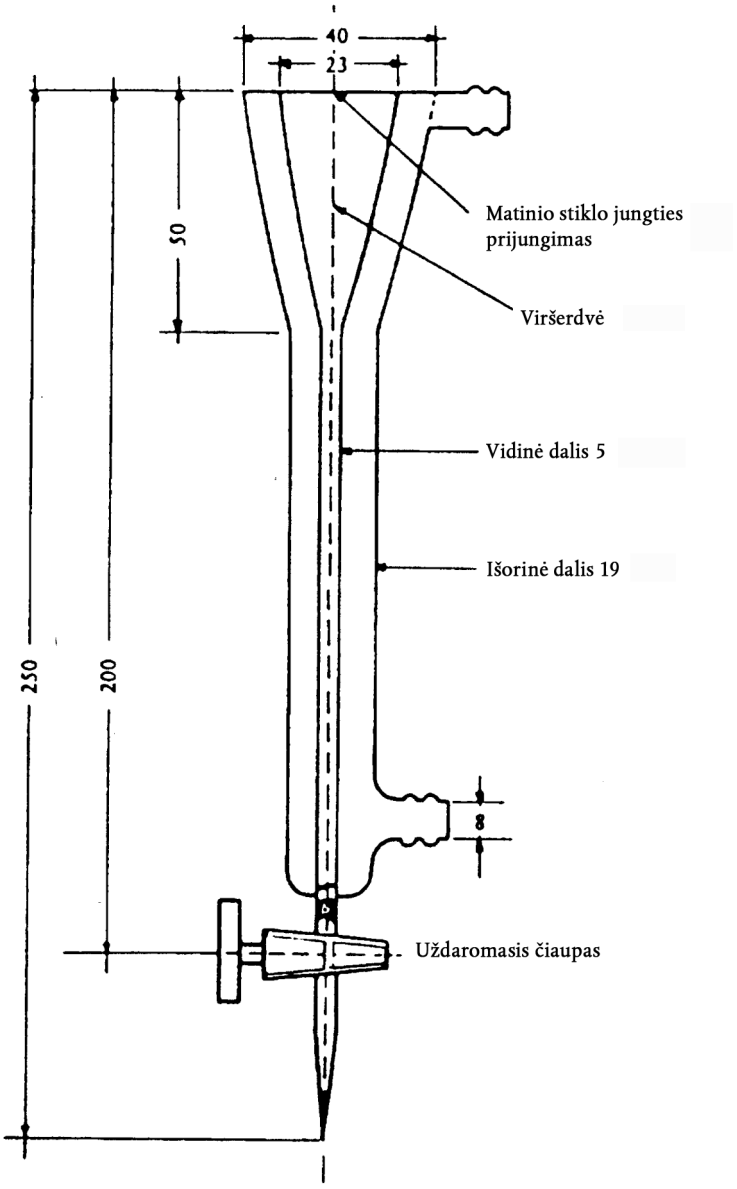
(Visi dydžiai pateikti milimetrais)



3 paveikslas

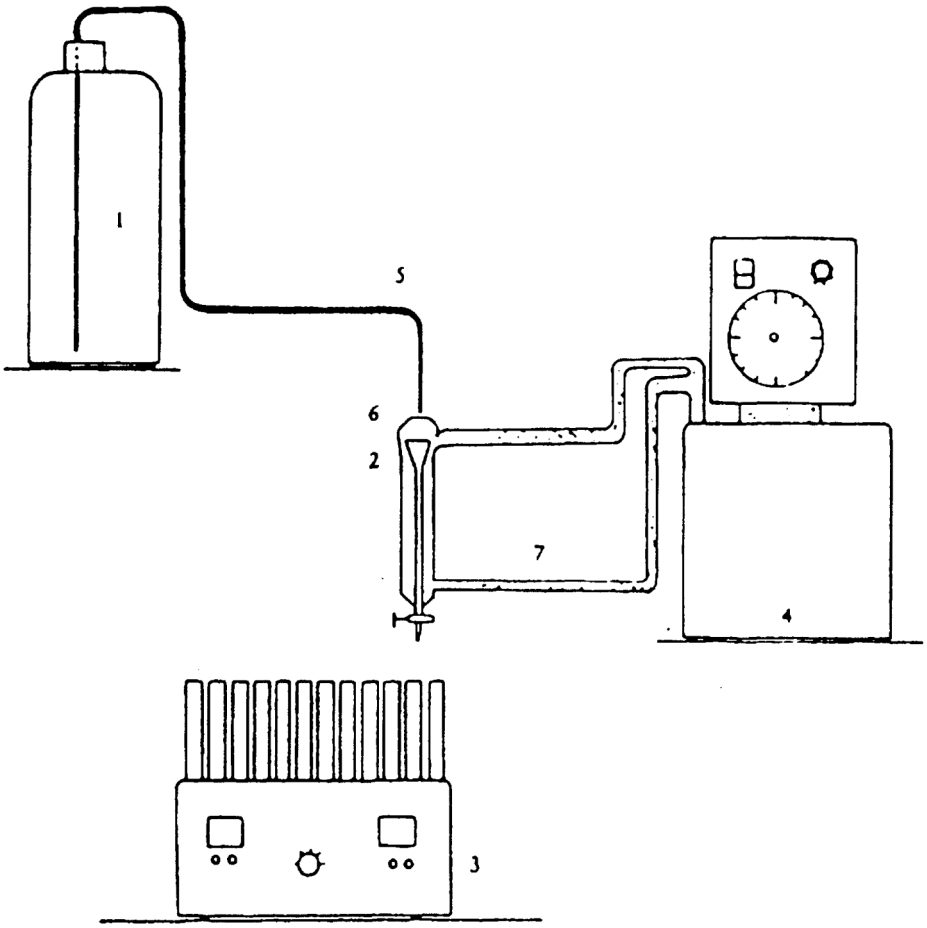
Tipiška mikrokolonėlė

(Visi dydžiai pateikti milimetrais)



4 paveikslas

Kolonėlės eliuavimo metodas su išlyginamuoju indu



1 = Išlyginasis indas (pvz., 2,5 litrų kolba)
2 = Kolonėlė (žr. 3 pav.)
3 = Frakcijos rinktuvas
4 = Termostatas
5 = Teflono vamzdeliai
6 = Matinio stiklo jungtis
7 = Vamzdelis vandeniui (tarp termostato ir kolonėlės, vidinis skersmuo: apie 8 mm).

A.8. PASISKIRSTYMO KOEFICIENTAS

1. METODAS

Apibūdintasis „kratomos kolbos“ metodas yra pagrįstas OECD Test Guideline (1).

1.1. ĮVADAS

Šiam bandymui naudinga turėti išankstinę informaciją apie medžiagos struktūrinę formulę, disociacijos konstantą, tirpumą vandenyje, hidrolizę, tirpumą n-oktanolyje ir paviršiaus įtemptį.

Matavimai turėtų būti atliekami su jonizuojamomis medžiagomis, esančiomis tik nejonizuota forma (laisvoji riebalų rūgštis arba laisvoji bazė) ir gaunamomis naudojant atitinkamą buferinį tirpalą, kurio pH ne mažiau kaip vienu vienetu mažesnis (laisvoji riebalų rūgštis) arba didesnis (laisvoji bazė) kei pK.

Šį bandymo metodą sudaro dvi atskiros darbo eigos: kratomos kolbos metodas ir efektyvoji skysčių chromatografija (HPLC). Pirmoji yra taikoma, kai log P_{ow} vertė (žr. toliau esančius apibrėžimus) yra 2–4 ribose, o antroji – 0-6 ribose. Prieš atliekant bet kurį iš šių eksperimentų, pirma turėtų būti iš anksto apskaičiuojamas pasiskirstymo koeficientas.

Kratomos kolbos metodas taikomas tik visiškai grynoms, vandenyje ir *n*-oktanolyje tirpioms medžiagoms. Jis netaikomas paviršinio aktyvumo medžiagoms (kurioms turėtų būti pateikiama apskaičiuota vertė arba apskaičiavimai, pagrįsti individualiu tirpumu *n*-oktanolyje ir vandenyje).

HPLC metodas neturi būti taikomas stiprioms rūgštims ir bazėms, metalų kompleksiniams junginiams, paviršinio aktyvumo medžiagoms arba medžiagoms, reaguojančioms su eliuatu. Šioms medžiagoms turėtų būti pateikiama apskaičiuotoji vertė arba apskaičiavimas, pagrįstas individualiuoju tirpumu *n*-oktanolyje arba vandenyje.

HPLC metodas yra mažiau jautrus priemaišoms, esančioms bandomajame junginyje, negu kratomos kolbos metodas. Nepaisant to, dėl priemaišų buvimo kai kuriais atvejais rezultatų aiškinimas tampa sudėtingas, kadangi tampa sunku priskirti smailes. Mišiniams, kurių juostos neišskaidytos, turėtų būti nustatomos viršutinė ir apatinė log P ribos.

1.2. APIBRĖŽIMAS IR VIENETAI

Pasiskirstymo koeficientas (P) yra apibrėžiamas kaip medžiagos, ištirpintos dviejų fazių sistemoje, sudarytoje iš dviejų nesimaišančių tirpiklių, pusiausvyros koncentracijų (c_i) santykis. Jeigu tai *n*-oktanolis ir vanduo:

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{n-oktanolis}}}{C_{\text{vanduo}}}$$

Todėl pasiskirstymo koeficientas (P) yra dviejų koncentracijų dalmuo ir paprastai pateikiamas kaip jo dešimtainis logaritmas (log P).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kratomoskolbos metodas

Etaloninių medžiagų nereikia naudoti visais tais atvejais, kai tyrinėjama nauja medžiaga. Pirmiausiai jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant metodo veikimą ir palyginti gautus rezultatus su kitais metodais gautais rezultatais.

HPLC metodas

Norint išmatuotus HPLC duomenis apie junginį susieti su jo P verte, turi būti brėžiamas kalibravimo log P palyginimo su chromatografiniais duomenimis grafikas, panaudojant ne mažiau kaip 6 pamatinius taškus. Vartotojas sprendžia, kokias tinkamas etalonines medžiagas naudoti. Jeigu įmanoma, ne mažiau kaip vieno etaloninio junginio P_{ow} turėtų būti didesnis negu bandomosios medžiagos, o kitas P_{ow} turėtų būti mažesnis negu bandomosios medžiagos. Jeigu log P vertės yra mažesnės nei 4, kalibravimas gali būti pagrindžiamas duomenimis, gautais kratomos kolbos metodu. Kai log P vertės didesnės nei 4, kalibravimas gali būti pagrindžiamas literatūroje patvirtintomis vertėmis, jeigu jos atitinka apskaičiuotąsias vertes. Norint gauti tikslesnes vertes, geriau pasirinkti tuos etaloninius junginius, kurie struktūros požiūriu yra susiję su bandomąja medžiaga.

Išsamų daugumos chemikalų log P_{ow} verčių sąrašą galima rasti 2 ir 3 nuorodose. Jeigu duomenų apie struktūriškai susijusių junginių pasiskirstymo koeficientus neįmanoma gauti, tada gali būti naudojamas bendresnio pobūdžio kalibravimas, nustatytas su kitais etaloniniais junginiais.

Rekomenduojamų etaloninių medžiagų ir jų P_{ow} verčių sąrašas pateiktas 2 priedėlyje.

1.4. METODO ESMĖ

1.4.1. **Kratomos kolbos metodas**

Pasiskirstymo koeficientui nustatyti turi būti pasiekiama pusiausvyra tarp visų sąveikaujančių sistemos sudedamųjų dalių ir turi būti nustatytos koncentracijos medžiagų, ištirpintų tose dviejose fazėse. Šiam klausimui skirtos literatūros nagrinėjimas rodo, kad problemai spręsti gali būti naudojamos kelios metodikos, pvz., kruopštus dviejų fazių sumaišymas ir po to vykstantis jų atskyrimas, norint nustatyti tyrinėjamos medžiagos pusiausvyros koncentraciją.

1.4.2. **HPLC metodas**

HPLC yra atliekama su analizinėmis kolonėlėmis, įkrautomis prekyboje esančiomis kietosiomis fazėmis su ilgomis angliavandenių grandinėmis (pvz., C_8, C_{18}), chemiškai sujungtomis su kvarcu. Chemikalai, įšvirkšti ant tokios kolonėlės, juda išilgai skirtingais greičiais, kadangi pasiskirstymas tarp judančiosios būsenos ir angliavandenio nuostoviosios būsenos yra skirtingo laipsnio. Chemikalų mišiniai dėl jų hidrofobiškumo yra pirma eliuliuojami vandenyje tirpiais chemikalais, po to alyvoje tirpiais chemikalais proporcingai jų angliavandenio ir vandens pasiskirstymo koeficientui. Tai leidžia nustatyti santykį tarp sulaikymo trukmės tokioje kolonėlėje (atvirkštinė fazė) ir *n*-oktanolio/vandens pasiskirstymo koeficientą. Pasiskirstymo koeficientas yra nustatomas iš *talpinio faktoriaus k*, gaunamo iš lygties:

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

kai t_R – bandomosios medžiagos sulaikymo trukmė, o t_0 – vidutinis laikas, reikalingas tirpiklio molekulei pereiti per kolonėlę (pradinis laikas).

Kiekybiniai analizės metodai nereikalingi, reikia tik nustatyti eliuavimo laiką.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.5.1 **Pakartojamumas**

Kratomos kolbos metodas

Norint užtikrinti pasiskirstymo koeficiento tikslumą, turi būti atliekami dvigubi nustatymai esant trims skirtingoms bandymo sąlygoms, kuriomis apibrėžtas medžiagos kiekis, taip pat tirpiklio tūriai gali būti keičiami Nustatytos pasiskirstymo koeficiento vertės, išreikštos bendruoju logaritmu, turėtų patekti į ± 0,3 log vienetų intervalą.

HPLC metodas

Norint padidinti pasikliovimą matavimais, turi būti atliekami kartotiniai nustatymai. Log P vertės, gautos iš pavienių matavimų, turėtų patekti į ± 0,1 log vienetų intervalą.

1.5.2. **Jautrumas**

Kratomos kolbos metodas

Metode naudojamas matavimų intervalas yra nustatomas pagal analizės darbo eigos aptikimo ribą. Tai turėtų leisti įvertinti log P_{ow} vertes intervale nuo 2 iki 4 (kartais, kai to reikalauja tam tikros sąlygos, šis intervalas log P_{ow} gali būti išplečiamas iki 5), jeigu tirpinio koncentracija bet kokioje būsenoje nėra didesnė negu 0,01 molio viename litre.

HPLC metodas

HPLC metodas leidžia įvertinti log P_{ow} pasiskirstymo koeficientus intervale 0-6.

Paprastai junginio pasiskirstymo koeficientas gali būti įvertinamas iki ± 0,1 log vienetų kratomos kolbos vertės. Tipiška koreliacija gali būti randama 4, 5, 6, 7, 8 literatūros nuorodose. Didesnį tikslumą galima pasiekti, jeigu koreliacijos grafikai yra pagrindžiami struktūriškai susijusiais etaloniniais junginiais (9).

1.5.3. **Tikslumas**

Kratomos kolbos metodas

Nernsto pasiskirstymo dėsnis praskiestiems tirpalams taikomas tik esant pastoviai temperatūrai, slėgiui ir pH. Jis taikomas tiktai grynai medžiagai, ištirpintai dviejuose grynuose tirpikliuose. Jeigu tuo pačiu metu keli skirtingi tirpiniai yra vienoje arba abiejose būsenose, tai gali turėti įtakos rezultatams.

Dėl ištirpusių molekulių disociacijos arba asociacijos yra gaunami nukrypimai nuo Nersto pasiskirstymo dėsnio. Tokius nukrypimus rodo tai, kad pasiskirstymo koeficientas tampa priklausomu nuo tirpalo koncentracijos.

Dėl naudojamos daugkartinės pusiausvyros šis bandymo metodas neturėtų būti naudojamas jonizuojamiems junginiams, jeigu nenaudojama korekcija. Tokiems junginiams reikėtų apsvarstyti galimybę vietoje vandens naudoti buferinius tirpalus; buferinio tirpalo pH turėtų būti ne mažesnis kaip vienas medžiagos pKa vienetas, ir reikėtų atsižvelgti į šio pH tinkamumą aplinkai.

1.6. METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Išankstinis pasiskirstymo koeficiento įvertinimas**

Pasiskirstymo koeficientą geriau vertinti naudojant apskaičiavimo metodą (žr. 1 priedėlį) arba atitinkamais atvejais pagal bandomosios medžiagos tirpumo koeficientą grynuose tirpikliuose (10).

1.6.2. **Kratomos kolbos metodas**

1.6.2.1. *Preparatas*

n-oktanolis: pasiskirstymo koeficiento nustatymas turėtų būti atliekamas su didelio grynumo analiziniais reagentais.

Vanduo: turėtų būti naudojamas distiliuotas arba du kartus distiliuotas vanduo, naudojant stiklinį arba kvarcinį aparatą. Jonizuojamiems junginiams, jeigu tai pagrįsta, vietoje vandens turėtų būti naudojami buferiniai tirpalai.

Pastaba:

Vanduo, paimtas tiesiogiai iš jonitinio filtro, neturėtų būti naudojamas.

1.6.2.1.1. Išankstinis tirpiklių sotinimas

Prieš nustatant pasiskirstymo koeficientą, tirpiklio sistemos fazės yra abipusiai sotinamos purtant eksperimento temperatūroje. Kad tai būtų atlikta, pakanka ant mechaninės purtyklės 24 valandas purtyti du didelius standartinius butelius, kuriuose yra didelio grynumo analizinis *n*-oktanolis arba vanduo su pakankamu kiekiu kito tirpiklio, po to leidžiama pakankamai ilgai nusistovėti, kad atsiskirtų fazės ir nusistovėtų sotis.

1.6.2.1.2. Bandymo paruošimas

Visas dviejų fazių sistemos tūris turėtų beveik užpildyti bandymo indą. Taip bus išvengta medžiagos nuostolių dėl lakumo. Naudotini tūrio koeficientas ir medžiagos kiekiai pasirenkami taip:

— išankstinis pasiskirstymo koeficiento apskaičiavimas (žr. ankstesnį punktą),

— mažiausias bandomos medžiagos kiekis, reikalingas analizei atlikti, ir

— didžiausios koncentracijos apribojimas bet kurioje fazėje 0,01 molio vienam litrui.

Atliekami trys bandymai. Pirmajame naudojamas apskaičiuotas *n*-oktanolio ir vandens tūrio santykis; antrajame – šis santykis dalinamas iš dviejų; o trečiajame – šis santykis dauginamas iš dviejų (pvz., 1:1; 1:2; 2:1).

1.6.2.1.3. Bandymo medžiaga

Pagrindinis tirpalas paruošiamas iš anksto vandeniu įsotintame *n*-oktanolyje. Šio pagrindinio tirpalo koncentracija turėtų būti tiksliai nustatoma prieš jį naudojant pasiskirstymo koeficiento nustatymui. Šis tirpalas turėtų būti laikomas pastovumą užtikrinančiomis sąlygomis.

1.6.2.2. *Bandymo sąlygos*

Turėtų būti išlaikoma pastovi bandymo temperatūra (± 1° C), o temperatūros intervalas – 20-25° C.

1.6.2.3. *Matavimo eiga*

1.6.2.3.1. Pasiskirstymo pusiausvyros nustatymas

Kiekvienai bandymo sąlygai turėtų būti paruošiami dvigubi bandymo indai su reikalingu tiksliai pamatuotu dviejų tirpiklių kiekiu su būtinu pagrindinio tirpalo kiekiu.

n-oktanolio fazės turėtų būti matuojamos pagal tūrį. Bandymo indai turėtų būti dedami arba į tinkamą purtyklę arba kratomi ranka. Jeigu naudojamas centrifugos vamzdis, rekomenduojama greitai sukti vamzdį 180 ^{0} apie jo skersinę ašį taip, kad bet koks pagautas oro kiekis iškiltų per tas dvi fazes. Patirtis parodė, kad pasiskirstymo pusiausvyrai nustatyti paprastai pakanka 50 tokių apsukų. Kad nekiltų abejonių, rekomenduojama 100 apsukų per penkias minutes.

1.6.2.3.2. Fazių atskyrimas

Jeigu reikia, kad fazės atsiskirtų, mišinys centrifuguojamas. Tai turėtų būti atliekama laboratorine centrifuga kambario temperatūroje arba, jeigu naudojama centrifuga su nekontroliuojama temperatūra, centrifugos vamzdžiai, siekiant nustatyti pusiausvyrą, turėtų būti bandymo temperatūroje ne trumpiau kaip vieną valandą iki analizės.

1.6.2.4. *Analizė*

Nustatant pasiskirstymo koeficientą yra būtina nustatyti bandomos medžiagos koncentracijas abiejose fazėse. Tą galima atlikti iš kiekvieno vamzdžio imant kiekvienos iš dviejų fazių alikvotinę dalį kiekvienai bandymo sąlygai ir jas analizuoti pagal pasirinktą darbo eigą. Visas medžiagos, esančios abiejose fazėse, kiekis turėtų būti apskaičiuojamas ir palyginamas su iš pradžių dėtos medžiagos kiekiu.

Hidratuotos fazės mėginiai turėtų būti imami tokia tvarka, kad būtų kaip galima labiau sumažinamas pavojus įtraukti *n*-oktanolio pėdsakus: hidratuotos fazės mėginiui paimti gali būti naudojamas stiklinis švirkštas su nuimama adata. Iš pradžių švirkštas turėtų būti iš dalies pripildytas oro. Oras turėtų būti švelniai išstumiamas tuo pačiu metu įterpiant adatą per *n*-oktanolio sluoksnį. Į švirkštą įtraukiamas pakankamas tūris hidratuotos fazės. Švirkštas greitai ištraukiamas iš tirpalo ir nuimama adata. Švirkšto turinys gali būti naudojamas kaip hidratuotas mėginys. Dviejų atskirtų fazių koncentraciją geriau nustatyti tai medžiagai tinkamu metodu. Analizės metodų, kurie gali būti tinkami, pavyzdžiai:

— fotometrinis metodas,

— dujų chromatografija,

— efektyvioji skysčių chromatografija.

1.6.3. **HPLC metodas**

1.6.3.1. *Pasiruošimas*

Aparatūra

Reikalingas skysčių chromatografas su įtaisytu impulsų nesukeliančiu siurbliu ir atitinkamu detektoriumi. Rekomenduojama naudoti injekcinį vožtuvą su injekcinėmis kilpomis. Tai, kad nuostoviojoje fazėje yra polinės grupės, gali smarkiai pakenkti HPLC kolonėlės darbą. Todėl nuostoviosiose fazėse turėtų būti mažiausias procentas polinių grupių (11). Gali būti naudojamos parduodamos mikrodalelių atvirkštinių fazių įkrovos arba jau įkrautos kolonėlės. Apsaugos kolonėlė gali būti dedama tarp įšvirkštimo sistemos ir analizinės kolonėlės.

Judančioji fazė

HPLC tinkantis metanolis ir HPLC tinkantis vanduo naudojami eliuentiniam tirpikliui paruošti, kuris prieš naudojimą degazuojamas. Turėtų būti naudojamas izokratinis eliuavimas. Turėtų būti naudojami metanolio/vandens santykiai su mažiausiu 25 % vandens kiekiu. Paprastai pakanka 3:1 (v/v) metanolio-vandens mišinio log P 6 junginiams eliuuoti per vieną valandą, kai debitas 1 ml/min. Jeigu junginių log P didelis, gali reikėti sutrumpinti eliuavimo laiką (taip pat ir etaloninių junginių), sumažinant judančiosios fazės poliškumą arba kolonėlės ilgį.

Medžiagos, kurių tirpumas *n*-oktanolyje yra mažas, turi polinkį mažoms log P_{ow} vertėms, kai naudojamas HPLC metodas; tokių junginių smailės kartais atsiranda įvykus tirpiklio frontui. Tai tikriausiai vyksta dėl to, kad pasiskirstymo procesas yra per lėtas pusiausvyrai pasiekti per normalų atskyrimo HPLC laiką. Tada debito mažinimas ir/arba metanolio/vandens santykio mažinimas gali būti veiksminga priemonė patikimai vertei gauti.

Bandymo ir etaloniniai junginiai turėtų būti tirpūs judančiojoje fazėje ir pakankamos koncentracijos, kad juos būtų galima aptikti. Tik išimtiniais atvejais gali būti naudojami priedai su metanolio ir vandens mišiniu, kadangi priedai pakeičia kolonėlės savybes. Chromatogramose su priedais yra privaloma naudoti tokios pat rūšies atskirą kolonėlę. Jeigu metanolio ir vandens mišinys netinka, gali būti naudojami kiti organiniai vandenyje tirpūs mišiniai, pvz., etanolis ir vanduo arba acetonitrilas ir vanduo.

Eliuato pH yra ypač svarbus jonizuojamiems junginiams. Jis turėtų būti kolonėlės eksploatacijos pH intervalo ribose, kuris paprastai yra 2-8. Rekomenduojama atlikti buferinius veiksmus. Reikia stengtis išvengti druskų nuosėdų ir kolonėlės gedimų, kurie pasireiškia dėl tam tikrų organinės fazės/buferinių mišinių. Nepatartina matuoti HPLC kvarcinėmis stacionariomis fazėmis, kai pH didesnis negu 8, kadangi dėl naudojamos šarminės judančiosios fazės gali greitai pablogėti kolonėlės veikimas.

Tirpiniai

Etaloniniai junginiai turėtų būti kiek įmanoma grynesni. Junginiai, kurie turi būti naudojami bandyme arba kalibravimui, jeigu įmanoma, ištirpinami judančiojoje fazėje.

Bandymo sąlygos

Matavimų metu temperatūra neturėtų svyruoti daugiau negu ± 2 K.

1.6.3.2. *Matavimas*

Nulinio laiko t_0 apskaičiavimas

Nulinį laiką t_0 galima nustatyti naudojant homologinę eilę (pvz., *n*-alkilmetilketonus) arba nepasiskirsčiusius organinius junginius (pvz., tiokarbamidas arba formamidas). Apskaičiuojant nulinį laiką t_0 naudojant homologinę eilę, įšvirkščiami ne mažiau kaip septyni homologinės eilės nariai ir nustatomos atitinkamos sulaikymo trukmės. Neapdorotos sulaikymo trukmės $t_{r(nc + 1)}$ brėžiamos kaip $t_{r(nc + 1)}$ funkcija, o regresijos lygties - a ir b:

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

(n_c – anglies atomų skaičius). Po to gaunamas nulinis laikas t_0 pagal:

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

Kalibravimo grafikas

Po to sudaromas log k verčių ir log P santykio koreliacijos grafikas atitinkamiems etaloniniams junginiams. Praktiškai vienu metu įšvirkščiama nuo 5 iki 10 standartinių etaloninių junginių, kurių log P maždaug atitinka tikėtiną intervalą, ir nustatomos sulaikymo trukmės, geriau ant įrašančiojo integratoriaus, sujungto su aptikimo sistema. Apskaičiuojami atitinkami talpos koeficiento logaritmai log k ir brėžiamas log P, nustatyto kratomos kolbos metodu, funkcijos grafikas. Kalibruojama reguliariais intervalais, ne rečiau kaip kartą per dieną, kad būtų galima atlikti galimus pakitimus kolonėlės darbe.

Mėginio talpos koeficiento nustatymas

Įšvirkščiamas kiek įmanoma mažesnis mėginio judančiosios fazės kiekis. Nustatoma tokia sulaikymo trukmė (dvigubas nustatymas), kad būtų galima apskaičiuoti talpos koeficientą k. Iš etaloninių junginių koreliacijos grafiko galima interpoliuoti mėginio pasiskirstymo koeficientą. Jeigu pasiskirstymo koeficientas labai mažas arba labai didelis, būtina ekstrapoliacija. Tokiais atvejais ypač reikia atsižvelgti į regresijos tiesės pasikliovimo ribas.

2. **DUOMENYS**

Kratomos kolbos metodas

Nustatytų P verčių patikimumas gali būti patikrinamas palyginant dvigubo nustatymo vidurkius su suminiu vidurkiu.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— tikslios medžiagos charakteristikos (identiškumas ir priemaišos),

— jeigu metodų neįmanoma panaudoti (pvz., paviršinio aktyvumo medžiaga), turėtų būti pateikiama apskaičiuotoji vertė arba duomenys, pagrįsti individualiu tirpumu *n*-oktanolyje ir vandenyje,

— visa informacija ir pastabos, svarbios duomenų aiškinimui, ypač atsižvelgiant į medžiagoje esančias priemaišas ir jos fizikinę būseną.

Kratomos kolbos metodui:

— išankstinio įvertinimo, jei toks buvo, rezultatai,

— temperatūros nustatymas,

— duomenys apie analizės procedūras, naudotas nustatant koncentracijas,

— centrifugavimo, jei jis buvo naudotas, laikas ir greitis,

— kiekvienam nustatymui matuotas koncentracijas abiejose fazėse (tai reiškia, kad ataskaitoje bus pateikta iš viso 12 koncentracijų),

— mėginio svoris, kiekvienos naudotos fazės tūris kiekviename mėgintuvėlyje ir visas apskaičiuotas mėginio kiekvienoje fazėje kiekis nusistovėjus pusiausvyrai,

— apskaičiuotos pasiskirstymo koeficiento (P) vertės ir vidutinė vertė turėtų būti pateikiamos ataskaitoje kiekvienai bandymo sąlygų grupei, kaip ir visų nustatymų vidutinės vertės. Jeigu galima prielaida, kad koncentracija priklauso nuo pasiskirstymo koeficiento, tai turėtų būti nurodoma ataskaitoje,

— turėtų būti pateikiami standartiniai individualiųjų P verčių nuokrypiai nuo vidutinės vertės,

— visų nustatymų vidurkis P turėtų būti išreiškiamas logaritmu (dešimtainis logaritmas),

— teoriškai apskaičiuotas P_{ow}, jei ši vertė buvo nustatyta arba jeigu matuotoji vertė > 10^4,

— naudoto vandens ir hidratuotos fazės pH eksperimento metu,

— jeigu naudojami buferiai, buferių naudojimo vietoje vandens pagrindimas, buferių sudėtis, koncentracija ir pH, hidratuotos fazės pH prieš eksperimentą ir po jo.

HPLC metodui:

— išankstinių vertinimų, jeigu tokie buvo, rezultatai,

— mėginiai ir etaloninės medžiagos, jų grynumas,

— nustatymo temperatūros intervalas,

— pH dydis, kuriam esant buvo atliekamas nustatymas,

— išsami informacija apie analizes ir apsauginę kolonėlę, judančiąją fazę ir nustatymo vidurkius,

— duomenys apie kalibravimui naudotų etaloninių junginių sulaikymo trukmes ir literatūroje randamas log P vertes,

— išsami informacija apie regresijos tiesės sudarymą (log k santykis su log P),

— vidutiniai bandomo junginio duomenys apie sulaikymo trukmes ir interpoliuotą log P vertę,

— įrenginių ir darbo sąlygų apibūdinimas,

— eliuavimo profiliai,

— į kolonėlę pakrautų mėginių ir etaloninių medžiagų kiekiai,

— nulinis laikas ir kaip jis buvo matuojamas.

4. **LITERATŪRA**

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

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

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

4) L. Renberg, G. Sundstrom and K. Sundh-Nygard, 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 anr 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 Hydrophbic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemocal 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. Cem., 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 Aktivitat 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 Deller, New York, Basel 1978.

23) N. S. Nirrlees, S. J. Noulon, C. T. Murthy, P. J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vo. 19, 615.

1 priedėlis

Apskaičiavimo (vertinimo) metodai

Įvadas

Apskaičiavimo metodų, duomenų ir pavyzdžių bendrasis įvadas pateiktas *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (a).

Apskaičiuotosios P_{ow} vertės gali būti naudojamos:

— spręsti apie eksperimentinių metodų tinkamumą (kratomos kolbos metodo intervalas: log P_{ow} vertės nuo 2 iki 4, HPLC intervalas: log P_{ow}: nuo 0 iki 6),

— bandymo tinkamoms sąlygoms parinkti (pvz., etalonines medžiagas HPLC metodikose, *n*-oktanolio ir vandens tūrių santykį kratomos kolbos metode),

— galimų eksperimentinių paklaidų laboratorijos vidinės kontrolės priemone,

— P_{ow} įverčiui gauti tais atvejais, kai eksperimentiniai metodai negali būti taikomi dėl techninių priežasčių.

Vertinimo metodas

Išankstinis pasiskirstymo koeficiento įvertis

Pasiskirstymo koeficientas gali būti įvertintas, naudojant bandomosios medžiagos tirpumo grynuose tirpikliuose vertes:

Taigi:

$$P_{\text{įvertis}} = \frac{\text{soties}_{\text{n-oktanolis}}}{\text{soties}_{\text{vanduo}}}$$

Apskaičiavimo metodai

Apskaičiavimo metodų esmė

Visi apskaičiavimo metodai remiasi formaliuoju molekulės dalinimu į atitinkamas mažesnes struktūras, kurių log P_{ow} tikrieji pokyčiai yra žinomi. Tuomet visos molekulės log P_{ow} apskaičiuojamas kaip atitinkamų dalių verčių suma pridedant pataisos dėl sąveikų molekulės viduje dėmenų sumą.

Dalių konstantų ir pataisos dėmenų sąrašus galima rasti (b), (c), (d), (e). Kai kurie sąrašai yra nuolat atnaujinami (b).

Kokybės kriterijai

Paprastai apskaičiavimo metodo patikimumas mažėja kuo sudėtingesnė junginio sandara. Paprastų molekulių, turinčių mažą molekulinę masę ir vieną arba dvi funkcines grupes, atveju, tarp įvairiais fragmentavimo metodais gautų rezultatų ir išmatuotos vertės galima laukti 0,1 - 0,3 log P_{ow} vieneto nuokrypio. Sudėtingesnių molekulių atveju paklaidos ribos gali būti didesnės. Tai priklauso nuo fragmentų konstantų patikimumo ir jų buvimo, taip pat nuo sugebėjimo įvertinti intramolekulines sąveikas (pvz., vandenilio jungtis) ir pataisos dėmenų teisingo naudojimo (mažiau problemų turint kompiuterinę programą CLOGP-3) (b). Joninių junginių atveju svarbu teisingai įvertinti krūvį arba jonizacijos laipsnį.

Apskaičiavimo metodai

Hansch π-metodas

Pradinė hidrofobinio pakaito darinio konstanta, π, įvesta *Fujita et al.* (f) apibrėžiama taip:

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

kai: P_{ow} (PhX) aromatinio darinio pasiskirstymo koeficientas ir P_{ow} (PhH) pradinio junginio pasiskirstymo koeficientas

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

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

Pagal jo apibrėžimą π-metodas labiausiai taikytinas pakaitų aromatiniame žiede atveju, π-vertės didelei daliai pakaitų yra pateiktos lentelėse (b), (c), (d). Jos taikomos apskaičiuoti aromatinių molekulių arba aromatinių struktūrinių fragmentų log P_{ow}.

Rekker metodas

Pagal *Rekker* (g) log P_{ow} vertė apskaičiuojama taip:

$$\log P_{ow} \sum_i a_i f_i \sum_i (\text{sąveikos dėmenų})$$

kai f_i atstovauja įvairių molekulės fragmentų konstantas ir a_i – jų pasikartojimo dažnį tiriamoje molekulėje. Pataisos dėmenys gali būti išreikšti kaip vienos atskiros C_m, (vadinamosios „magiškosios konstantos“) sveikasis kartotinis. Fragmentų konstantos f_i ir C_m buvo nustatytos iš 1054 eksperimentinių P_{ow} verčių sąrašo (825 junginiai), naudojant daugianarę regresinę analizę (c), (h). Sąveikos dėmenų nustatymas atliekamas pagal nustatytas taisykles, kurios aprašytos literatūroje (e), (h), (i).

Hansch-Leo metodas

Pagal *Hansch ir Leo* (c) log P_{ow} vertė apskaičiuojama taip:

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

kai f_i atstovauja įvairių molekulės fragmentų konstantas, F_i – pataisos dėmenis ir a_i, b_i – atitinkamus pasikartojimo dažnius. Atomų ir grupių fragmentinių verčių sąrašas ir pataisos dėmenų F_i (vadinamųjų „faktorių“) sąrašas buvo nustatyti bandymų ir klaidų metodu, naudojant eksperimentines P_{ow} vertes. Pataisos dėmenys buvo suskirstyti į keletą skirtingų klasių (a), (c). Atsižvelgti į visas taisykles ir pataisos dėmenis yra gana sudėtinga ir reikalauja daug laiko. Yra sukurti programų paketai (b).

Kombinuotasis metodas

Sudėtinių molekulių log P_{ow} apskaičiavimas gali būti iš esmės pagerintas, jei molekulė dalinama į didesnes struktūrines dalis, kurių log P_{ow} patikimos vertės randamos lentelėse (b), (c) arba gaunamos naudojant pačių atliktus matavimus. Vėliau tokie fragmentai (pvz., heterociklai, antrachinonas, azobenzenas) gali būti derinami *Hansch* π-vertėmis arba su *Rekker* arba *Leo* fragmentų konstantomis.

Pastabos

i) Apskaičiavimo metodai gali būti taikomi tik iš dalies arba visiškai jonizuotiems junginiams, jei įmanoma atsižvelgti į būtinuosius pataisos faktorius.

ii) Jei gali būti padaryta prielaida apie tarpmolekulinių vandenilinių jungčių buvimą, turi būti pridedami atitinkami pataisos dėmenys (maždaug nuo + 0,6 iki +1,0 log P_{ow} vieneto) (a). Tokių ryšių buvimo požymiai gali būti gauti naudojant molekulės erdvinius modelius arba spektroskopinius duomenis.

iii) Jei galimos kelios tautomerinės formos, apskaičiavimai turi remtis pačia patikimiausia forma.

iv) Būtina kruopščiai sekti fragmentų konstantų sąrašų pataisas.

Ataskaita

Taikant apskaičiavimo (vertinimo) metodus, bandymų ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti tokia informacija:

— medžiagos aprašymas (mišinys, priemaišos ir t.t.),

— kokio nors galimo intramolekulinio vandenilinio ryšio, disociacijos, krūvio ir visų kitų neįprastų veiksnių (pvz., tautomerijos) požymiai,

— apskaičiavimo metodo aprašymas,

— duomenų bazės identifikavimas arba šaltinis,

— ypatumai pasirenkant fragmentus,

— išsamus apskaičiavimo dokumentavimas.

Nuorodos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 priedėlis

Etaloninės medžiagos, rekomenduotos naudoti taikant HPLC (High Power Liquid Chromatography – efektyvioji skysčių chromatografija)

Nr.	Etaloninė medžiaga	Log P_{ow}	pK_a
1	2-Butanonas	0,3	
2	4-acetilpiridinas	0,5	
3	Anilinas	0,9	
4	N-fenilacetamidas	1,0	
5	Benzilo alkoholis	1,1	
6	p-metoksifenolis	1,3	pK_a = 10,26
7	Feniloksiacto rūgštis	1,4	pK_a = 3,12
8	Fenolis	1,5	pK_a = 9,92
9	2,4-dinitrofenolis	1,5	pK_a = 3,96
10	Benznitrilas	1,6	
11	Fenilacetonitrilas	1,6	
12	4-metilbenzilo alkoholis	1,6	
13	Acetofenonas	1,7	
14	2-nitrofenolis	1,8	pK_a = 7,17
15	3-nitrobenzenkarboninė rūgštis	1,8	pK_a = 3,47
16	4-chloranilinas	1,8	pK_a = 4,15
17	Nitrobenzenas	1,9	
18	3-fenilpropen-2-olis	1,9	
19	Benzenkarboninė rūgštis	1,9	pK_a = 4,19
20	p-krezolis	1,9	pK_a = 10,17
21	3-fenilakrilo rūgštis	2,1	pK_a = 3,89 cis 4,44 trans
22	Metilfenileteris	2,1	
23	Metibenzoatas	2,1	
24	Benzenas	2,1	
25	3-metilbenzenkarboninė rūgštis	2,4	pK_a = 4,27
26	4-chlorfenolis	2,4	pK_a = 9,1
27	Trichloretilenas	2,4	
28	Atrazinas	2,6	
29	Etilbenzoatas	2,6	
30	2,6-dichlorbenznitrilas	2,6	
31	3-chlorbenzenkarboninė rūgštis	2,7	pK_a = 3,82
32	Toluenas	2,7	
33	1-naftolis	2,7	pK_a = 9,34
34	2,3-dichloranilinas	2,8	
35	Chlorbenzenas	2,8	
36	Alilfenileteris	2,9	
37	Brombenzenas	3,0	
38	Etilbenzenas	3,2	
39	Benzofenonas	3,2	
40	4-fenilfenolis	3,2	pK_a =9,54
41	Timolis	3,3	
42	1,4-dichlorbenzenas	3,4	
43	Difenilaminas	3,4	pK_a = 0,79
44	Naftalinas	3,6	
45	Fenilbenzoatas	3,6	
46	Izopropilbenzenas	3,7	
47	2,4,6-trichlorfenolis	3,7	pK_a = 6
48	Difenilas	4,0	
49	Benzilbenzoatas	4,0	
50	2,4-dinitro-6-(*antr*- butil)-fenolis	4,1	
51	1,2,4-trichlorbenzenas	4,2	
52	Dodekankarboninė rūgštis	4,2	
53	Difenileteris	4,2	
54	*n*-butilbenzenas	4,5	
55	Fenantrenas	4,5	
56	Fluorantenas	4,7	
57	Dibenzilas	4,8	
58	2,6-difenilpiridinas	4,9	
59	Trifenilaminas	5,7	
60	DDT [2,2,2-trichlor-1,1-*bis*-(*p*-chlorfenil)etanas]	6,2	
	Kitos mažą log P_{ow} turinčios medžiagos		
1	Nikotino rūgštis	-0,07	

A.9. PLIŪPSNIO TEMPERATŪRA

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Prieš atliekant šį bandymą, naudinga turėti išankstinę informaciją apie medžiagos degumą. Bandymo metodika taikytina skystosioms medžiagoms, kurių garai gali būti padegti uždegimo priemonėmis. Šiame tekste pateikti metodai patikimi tiktai tame pliūpsnio temperatūros intervale, kuris yra tam metodui nurodytas.

Renkantis taikytiną metodą, būtina atsižvelgti į reakcijos tarp mėginio ir mėginio indo galimybę.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Pliūpsnio temperatūra – tai mažiausia temperatūra, su pataisa 101,325 kPa slėgiui, kurioje bandymo metodui apibrėžtomis sąlygomis virš skysčio atsiranda tiek garų, kad mėginio inde susidaro degus garų ir oro mišinys.

Vienetai: °C;

$t = T - 273{,}15$;

(t vienetai – °C, T vienetai – K).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etalonines medžiagas nebūtina naudoti kiekvienu atveju tiriant naują medžiagą. Daugiausia jos turi būti naudojamos, kai reikia kartais tikrinti metodo veikimą ir norint lyginti su rezultatais, gautais kitais metodais.

1.4. METODO ESMĖ

Medžiaga pilama į mėginio indą ir pagal atskiram bandymo metodui naudojamą metodiką šildoma arba aušinama iki bandymo temperatūros. Užsidegimo bandymai atliekami norint nustatyti, ar mėginys bandymo temperatūroje užsiliepsnoja ar neužsiliepsnoja.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.5.1. **Pakartojamumas**

Pakartojamumas kinta atsižvelgiant į pliūpsnio temperatūros intervalą ir taikomą bandymo metodą; didžiausias kintamumas 2 °C.

1.5.2. **Jautrumas**

Jautrumas priklauso nuo taikyto bandymo metodo.

1.5.3. **Specifiškumas**

Kai kurių bandymo metodų specifiškumas apribotas tam tikrais pliūpsnio temperatūros intervalais ir priklauso nuo medžiagai būdingų savybių (pvz., didelės klampos).

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Ruošimas**

Bandomosios medžiagos mėginys įpilamas į bandymo aparatą pagal 1.6.3.1 ir (arba) 1.6.3.2.

Saugai užtikrinti rekomenduojama, kad intensyviai reaguojančių ir nuodingų medžiagų mėginys būtų mažas, maždaug 2 cm^3.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

Aparatas, kiek tai atitinka saugą, turi būti dedamas nuo traukos apsaugotoje vietoje.

1.6.3. **Bandymo eiga**

1.6.3.1 *Pusiausvirasis metodas*

Žr. ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2 *Nepusiausvirasis metodas*

Abel aparatas:

Žr. BS 2000 170 dalį, NF M07-011, NF T66-009.

Abel-Pensky aparatas:

Žr. EN 57, DIN 51755 1 dalį (temperatūra 5 - 65 °C), DIN 51755 2 dalį (temperatūra mažesnė nei 5 °C), NF M07-036.

Tag aparatas:

Žr. ASTM D 56.

Pensky-Martens aparatas:

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

Pastabos:

Kai nepusiausviruoju metodu pagal 1.6.3.2 nustatoma, kad pliūpsnio temperatūra lygi 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C arba 55 ± 2 °C, jos vertė turi būti patvirtinta pusiausviruoju metodu, naudojant tą patį aparatą.

Skelbti rezultatams gali būti taikomi tik tokie metodai, kuriais galima nustatyti pliūpsnio temperatūrą.

Klampių skysčių (dažų, dervų ir panašių medžiagų), turinčių tirpiklių, pliūpsnio temperatūrai nustatyti gali būti taikomas tik klampių medžiagų pliūpsnio temperatūrai nustatyti tinkamas metodas.

Žr. ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 1 dalį.

2. **DUOMENYS**

3. **ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (identifikavimas ir priemaišos),

— turi būti nurodytas taikytas metodas, taip pat visi galimi nukrypimai,

— rezultatai ir visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

4. **NUORODOS**

Nėra.

A.10. DEGUMAS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Prieš atliekant šį bandymą, naudinga turėti išankstinę informaciją apie medžiagos potencialias sprogstamąsias savybes.

Šis bandymas turi būti taikomas tik medžiagoms, turinčioms miltelių, granulių arba pastos pavidalą.

Nenorint įtraukti visas medžiagas, kurios gali būti padegtos, tačiau tik greitai degančias arba kurių elgsena degant bet kuriuo atveju yra ypač pavojinga, labai degiomis medžiagomis laikomos tik tos medžiagos, kurių degimo greitis yra didesnis nei tam tikra ribinė vertė.

Gali būti ypač pavojinga, jei įkaitimo zona plinta metaliniuose milteliuose, kadangi gesinant liepsną kyla sunkumų. Metaliniai milteliai turi būti laikomi labai degiomis medžiagomis, jei jie palaiko įkaitimo zonos plitimą miltelių masėje per tam tikrą laiką.

1.2. APIBRĖŽIMAS IR VIENETAI

Degimo laikas reiškiamas sekundėmis.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO ESMĖ

Formuojamas maždaug 250 mm ilgio vientisas medžiagos strypas arba miltelių juosta ir atliekamas išankstinis atrankos bandymas, norint nustatyti, ar padegus dujiniu degikliu vyksta degančios liepsnos plitimas ar rusenimas. Jei plitimas 200 mm juosta įvyksta per nustatytą laiką, tuomet degimo greičiui nustatyti bandymas atliekamas pagal visą programą.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nenurodyti.

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Išankstinis atrankos bandymas**

Ant nedegios, neakytos ir šilumai nelaidžios pagrindo plokštės formuojamas maždaug 250 mm ilgio, 20 mm pločio ir 10 mm aukščio medžiagos strypas arba miltelių juosta.

Vienas miltelių juostos galas karšta dujų degiklio liepsna (mažiausias skersmuo 5 mm) veikiamas tol, kol milteliai užsidega arba ne ilgiau kaip 2 minutes (metalų arba metalų lydinių milteliai veikiami 5 minutes). Reikia pasižymėti, ar degimo zona išilgai 200 mm plinta 4 min. bandymo laiko (arba 40 minučių metalų miltelių atveju). Jei medžiaga neužsidega ir degimo zona išilgai 200 mm miltelių juostos plinta su liepsna arba rusenant 4 minutes (arba 40 minučių) bandymo laiko, medžiaga neturi būti laikoma labai degia ir toliau jos bandyti nereikia. Jei degimo zona 200 mm ilgio medžiagos miltelių juosta plinta mažiau kaip 4 minutes arba mažiau kaip 40 minučių, jei tai metaliniai milteliai, turi būti atliekama toliau aprašyta veiksmų seka (1.6.2 punktas ir toliau).

1.6.2. **Degimo greičio bandymas**

1.6.2.1. *Ruošimas*

Medžiagos milteliai arba granulės suberiamos į 250 mm ilgio formą, turinčią trikampio formos skerspjūvį, kurio vidinis aukštis 10 mm ir plotis 20 mm. Abejose formos pusėse išilgine kryptimi tvirtinamos dvi iš šonų ribojančios metalinės plokštės, kurios yra 2 mm aukštesnės nei viršutinis trikampio skerspjūvio kraštas (žr. paveikslą). Forma tris kartus numetama iš 2 cm aukščio ant kieto paviršiaus. Jei reikia, forma vėl pripildoma. Šoninės ribojančios plokštės nuimamos ir medžiagos perteklius nubraukiamas. Ant formos viršaus uždedama nedegi, neakyta ir blogai šilumą leidžianti pagrindo plokštė, įtaisas apverčiamas ir forma nuimama.

Pastos pavidalo medžiagos dedamos ant nedegios, neakytos ir blogai šilumą leidžiančios pagrindo plokštės, pagaminant iš jų 250 mm ilgio juostelę, kurios skerspjūvio plotas apie 1 cm^2.

1.6.2.2 *Bandymų sąlygos*

Jei bandoma drėgmei jautri medžiaga, bandymas ją išėmus iš indo turi būti atliekamas kiek įmanoma greičiau.

1.6.2.3 *Bandymo eiga*

Krūvelė dedama į traukos spinta skersai traukos krypčiai.

Oro greitis turi būti pakankamas, kad dūmai negalėtų patekti į laboratoriją, ir bandymo metu turi nesikeisti. Apie įtaisą turi būti įtaisytas nuo traukimo saugantis ekranas.

Krūvelei viename gale padegti naudojama karšta dujų degiklio liepsna (mažiausias skersmuo 5 mm). Kai krūvelė sudega 80 mm atstumu, kitoje 100 mm atkarpoje matuojamas degimo greitis. Bandymas atliekamas šešis kartus, jei teigiamas rezultatas negaunamas anksčiau, kiekvieną kartą naudojant švarią šaltą plokštę.

2. **DUOMENYS**

Vertinant rezultatus, reikalinga degimo trukmė, nustatyta išankstiniame atrankos bandyme (1.6.1.) ir trumpiausia degimo trukmė, gauta ne daugiau kaip šešiuose bandymuose (1.6.2.3.).

3. **ATASKAITA**

3.1. Bandymų ataskaita

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (identifikavimas ir priemaišos),

— bandomosios medžiagos apibūdinimas, jos fizinė būsena, įskaitant drėgmės kiekį,

— išankstinių atrankos bandymų ir degimo greičio bandymo, jei buvo atliekamas, rezultatai,

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

3.2. Rezultatų aiškinimas

Miltelių, granulių ir pastos pavidalo medžiagos turi būti laikomos labai degiomis, jei degimo trukmė bet kuriame bandyme, atliktame pagal 1.6.2 aprašytą metodiką, yra mažesnė kaip 45 sekundės. Metalų arba metalų lydinių milteliai laikomi labai degiais, jei jie gali būti padegti ir liepsna arba reakcijos zona visu bandiniu plinta 10 minučių arba mažiau.

4. **NUORODOS**

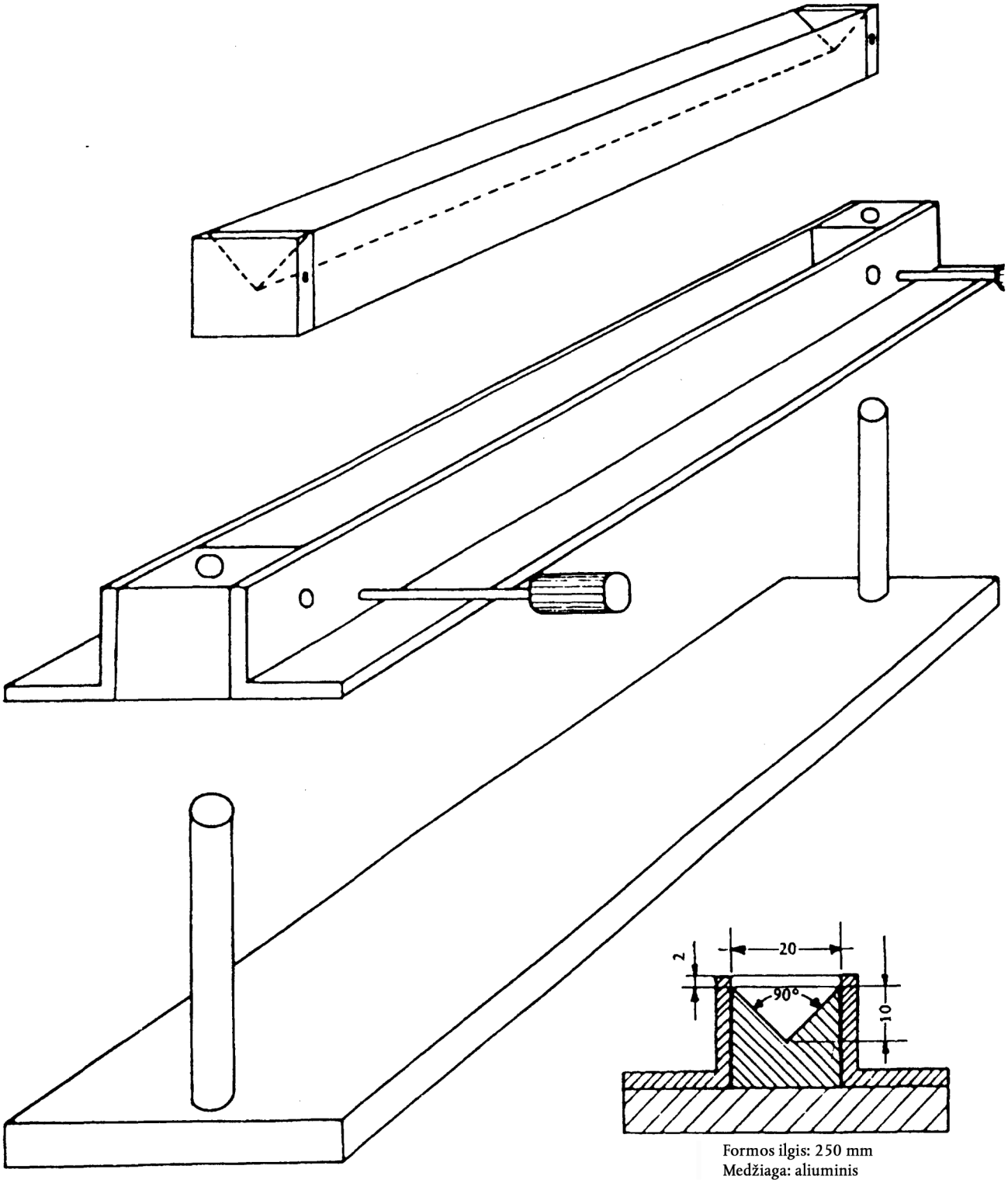
(1) NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

Priedėlis

Paveikslas

Forma ir priedai krūvelei ruošti

(Visi matmenys milimetrais)



Formos ilgis: 250 mm
Medžiaga: aliuminis

A.11. DEGUMAS (DUJOS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šis metodas leidžia nustatyti, ar dujos, sumaišytos su oru kambario temperatūroje (maždaug 20 °C) ir atmosferos slėgyje, yra degios, o jei degios, tai koks yra degumo koncentracijos intervalas. Didinamos koncentracijos bandomųjų dujų mišiniai su oru veikiami elektros kibirkštimi ir stebima, ar mišinys užsidega.

1.2. APIBRĖŽIMAS IR VIENETAI

Degumo intervalas yra intervalas tarp apatinės ir viršutinės sprogimo ribinės koncentracijos. Apatinė ir viršutinė sprogimo ribinė koncentracija yra tokia degių dujų mišinio su oru ribinė koncentracija, kuriai esant liepsnos plitimas nevyksta.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO ESMĖ

Dujų koncentracija ore didinama pakopomis ir kiekvienos pakopos dujų mišinys veikiamas elektros kibirkštimi.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Neapibrėžti.

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

Bandymo indas – vertikaliai pastatytas stiklinis cilindras, kurio mažiausias vidinis skersmuo 50 mm ir mažiausias aukštis 300 mm. Uždegimo elektrodai, tarp kurių yra 3-5 mm atstumas, įdedami 60 mm nuo cilindro dugno. Cilindras turi slėgio mažinimo angą. Norint apriboti bet kokio sprogimo padarytą žalą, aparatas turi būti apsaugotas skydu.

Uždegimo šaltiniu naudojama stovinčioji indukcinė 0,5 s trukmės kibirkštis, generuojama aukštos įtampos transformatoriaus, kurio išėjimo įtampa 10-15 kV (didžiausia imamoji galia 300 W). Tinkamos aparatūros pavyzdys aprašytas (2) nuorodoje.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

Bandymas turi būti atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

1.6.3. **Bandymo eiga**

Žinomos koncentracijos dujų mišinys su oru leidžiamas į cilindrą, naudojant dozavimo siurblius. Per mišinį leidžiama kibirkštis ir stebima, ar liepsna atsiskiria nuo liepsnos šaltinio ir plinta savaime ar taip nevyksta. Dujų koncentracija keičiama 1 % tūr. pakopomis tol, kol dujos užsidega, kaip tai aprašyta anksčiau.

Jei cheminė dujų sandara rodo, kad jos neturėtų būti degios, ir gali būti apskaičiuota jų stechiometrinio mišinio su oru sudėtis, tai 1 % pakopomis reikia tikrinti pradedant mišiniu, kuriame dujų yra 10 % mažiau nei stechiometrinės sudėties mišinyje, ir baigiant mišiniu, kuriame dujų yra 10 % daugiau nei stechiometrinės sudėties mišinyje.

2. **DUOMENYS**

Šiai savybei nustatyti reikalingi tik duomenys apie liepsnos plitimą.

3. **ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (identifikavimas ir priemaišos),

— naudotos aparatūros aprašymas, nurodant matmenis,

— temperatūra, kurioje bandymas buvo atliekamas,

— bandytos koncentracijos ir gauti rezultatai,

— bandymo rezultatas: nedegios dujos ar labai degios dujos,

— jei padaryta išvada, kad dujos nedegios, tai turi būti nurodytas koncentracijos intervalas, kuriame tai buvo bandoma 1 % pakopomis,

— turi būti pateikta visa rezultatams aiškinti reikalinga informacija ir pastabos.

4. **NUORODOS**

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

(2) W.Berthold, D.Conrad, T.Grewer, H.Grosse-Wortmann, T.Redeker und H.Schacke. 'Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-lng.-Tech. 1984, vol 56, 2, 126-127.

A.12. DEGUMAS (SĄLYTIS SU VANDENIU)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šis bandymo metodas gali būti taikomas norint nustatyti, ar dėl medžiagos reakcijos su vandeniu arba drėgme nesusidaro pavojingas kiekis vienos arba keleto rūšių dujų, kurios galėtų būti labai degios.

Bandymo metodas gali būti taikomas kietosioms ir skystosioms medžiagoms. Šis metodas netaikytinas medžiagoms, kurios užsidega ore.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Labai degios: medžiagos, kurios sąlytyje su vandeniu arba drėgnu oru pavojingais kiekiais ne mažesne kaip 1 litras/kg per valandą sparta išskiria labai degias dujas.

1.3. METODO ESMĖ

Medžiaga bandoma laikantis toliau aprašytos pakopų sekos; jei dujos kurios nors pakopoje užsiliepsnoja, toliau bandyti nebūtina. Jei žinoma, kad medžiaga su vandeniu intensyviai nereaguoja, pradėkite nuo 4 pakopos (1.3.4).

1.3.1. **1 pakopa**

Bandomoji medžiaga dedama į lovelį su distiliuotu vandeniu 20 °C temperatūroje ir stebima, ar išsiskiriančios dujos užsiliepsnoja ar neužsiliepsnoja.

1.3.2. **2 pakopa**

Bandomoji medžiaga dedama ant filtravimo popieriaus, padėto į lėkštelę su distiliuotu vandeniu 20 °C temperatūroje, ir stebima, ar išsiskiriančios dujos užsiliepsnoja ar neužsiliepsnoja. Filtravimo popierius skirtas tik tam, kad medžiaga būtų vienoje vietoje, kas padidintų užsiliepsnojimo galimybę.

1.3.3. **3 pakopa**

Iš bandomosios medžiagos padaroma krūvelė, kurios aukštis apie 2 cm ir skersmuo 3 cm. Ant krūvelės lašinami keli lašai vandens ir stebima, ar išsiskiriančios dujos užsiliepsnoja ar neužsiliepsnoja.

1.3.4. **4 pakopa**

Bandomoji medžiaga maišoma su distiliuotu vandeniu 20 °C temperatūroje ir kas valandą septynias valandas matuojama dujų išsiskyrimo sparta. Jei dujų skyrimosi sparta svyruoja arba septynias valandas didėja, matavimo trukmė turi būti padidinta ne ilgiau kaip iki penkių parų. Bandymas gali būti sustabdytas, jei išsiskyrimo sparta kuriuo nors momentu yra didesnė kaip 1 litras/kg per valandą.

1.4. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nenustatyti.

1.6. METODŲ APRAŠYMAS

1.6.1. **1 pakopa**

1.6.1.1. *Bandymo sąlygos*

Bandymas atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

1.6.1.2. *Bandymo eiga*

Nedidelis kiekis (skersmuo maždaug 2 mm) bandomosios medžiagos turi būti įdėta į lovelį su distiliuotu vandeniu. Reikia stebėti, ar i) skiriasi kokios nors dujos ir ii) ar jos užsiliepsnoja. Jei dujos užsiliepsnoja, medžiagos toliau bandyti nereikia, nes medžiaga laikoma pavojinga.

1.6.2. **2 pakopa**

1.6.2.1. *Aparatūra*

Filtravimo popierius dedamas distiliuoto vandens, įpilto į bet kokį tinkamą indą, pvz., 100 mm skersmens garinimo lėkštelę, paviršiuje.

1.6.2.2. *Bandymo sąlygos*

Bandymas atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

1.6.2.3. *Bandymo eiga*

Nedidelis kiekis (skersmuo maždaug 2 mm) bandomosios medžiagos dedamas filtravimo popieriaus centre. Reikia stebėti, ar i) skiriasi kokios nors dujos ir ii) ar jos užsiliepsnoja. Jei dujos užsiliepsnoja, medžiagos toliau bandyti nereikia, nes medžiaga laikoma pavojinga.

1.6.3. **3 pakopa**

1.6.3.1. *Bandymo sąlygos*

Bandymas atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

1.6.3.2. *Bandymo eiga*

Iš bandomosios medžiagos daroma krūvelė, kurios aukštis apie 2 cm ir skersmuo 3 cm ir kurios viršuje yra padarytas įdubimas. Į įdubimą lašinami keli lašai vandens ir stebima, ar i) skiriasi kokios nors dujos ir ii) ar jos užsiliepsnoja. Jei dujos užsiliepsnoja, medžiagos toliau bandyti nereikia, nes medžiaga laikoma pavojinga.

1.6.4. **4 pakopa**

1.6.4.1. *Aparatūra*

Surenkamas paveiksle parodytas aparatas.

1.6.4.2. *Bandymo sąlygos*

Apžiūrėkite talpyklą su bandomąja medžiaga, ar jame nėra miltelių < 500 μm (dalelių dydis). Jei milteliai sudaro daugiau kaip 1 % visos medžiagos masės arba jei medžiaga yra trapi, tai norint atsižvelgti į dalelių dydžio mažėjimą laikymo ir krovimo metu, prieš bandymus visa medžiaga turi būti sumalta į miltelius; kitu atveju medžiaga turi būti bandoma tokia, kokia gauta. Bandymas turi būti atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C) ir atmosferiniame slėgyje.

1.6.4.3. *Bandymo eiga*

Į aparato lašinamąjį piltuvą įpilama 10-20 ml vandens, o į kūginę kolbą įdedama 10 g bandomosios medžiagos. Išsiskyrusių dujų tūris gali būti išmatuotas bet kuriuo tinkamu būdu. Atidaromas lašinamojo piltuvo čiaupas, kad vanduo galėtų tekėti į kūginę kolbą, ir paleidžiamas sekundmatis. Išsiskyrusių dujų kiekis kas valandą matuojamas septynias valandas. Jei per šį laiką išsiskyrusių dujų kiekis svyruoja arba jei šio laikotarpio pabaigoje išsiskyrusių dujų kiekis didėja, matavimai turi būti tęsiami ne ilgiau kaip penkias paras. Jei kuriuo nors matavimo momentu dujų išsiskyrimo sparta yra didesnė kaip 1 litras/kg per valandą, bandymą galima nutraukti. Šis bandymas turi būti pakartotas tris kartus.

Jei cheminė dujų sudėtis nežinoma, dujos turi būti analizuojamos. Jei dujose yra labai degių komponentų ir nėra žinoma, ar visas mišinys yra labai degus, turi būti paruoštas ir pagal A. 11 metodą išbandytas tokios pačios sudėties mišinys.

2. **DUOMENYS**

Medžiaga laikoma pavojinga, jei:

— bet kurioje bandymo pakopoje įvyksta užsidegimas,

arba

— degios dujos skiriasi didesne kaip 1 litras/kg bandomosios medžiagos per valandą sparta.

3. **ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (identifikavimas ir priemaišos),

— bet kokio bandomosios medžiagos pradinio ruošimo detalės,

— bandymų rezultatai (1,2,3 ir 4 pakopos),

— išsiskyrusių dujų cheminė sudėtis,

— dujų išsiskyrimo sparta, jei vykdoma 4 pakopa (1.6.4),

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

4. **NUORODOS**

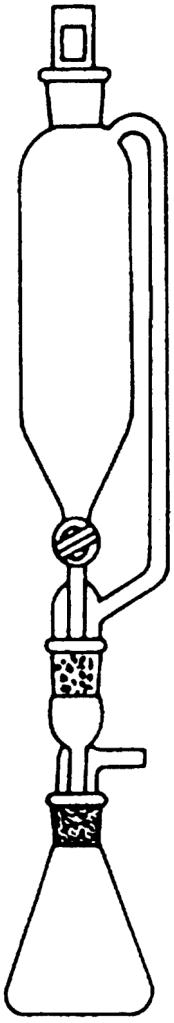
(1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

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

Priedėlis

Paveikslas

Aparatas



A.13. PIROFORINĖS KIETŲJŲ MEDŽIAGŲ IR SKYSČIŲ SAVYBĖS

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Bandymo metodikos taikytinos kietosioms ir skystosioms medžiagoms, kurių maži kiekiai užsidega po trumpalaikio sąlyčio su oru kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

Šis bandymo metodas netaikomas medžiagoms, kurios kambario temperatūros ore užsidega tik po kelių valandų arba dienų arba kurioms reikia aukštesnės temperatūros.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Laikoma, kad medžiagos turi piroforinių savybių, jei 1.6 apibrėžtomis sąlygomis jos užsidega arba apanglėja.

Savaiminį skysčių užsidegimą gali tekti bandyti taikant A.15 metodą „Savaiminio užsidegimo temperatūra (skysčiai ir dujos)“.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO ESMĖ

Kieta arba skysta medžiaga maišoma su inertišku nešikliu ir kambario temperatūroje penkias minutes laikoma ore. Jei skystos medžiagos neužsidega, jos sugeriamos filtravimo popieriumi ir kambario temperatūroje (maždaug 20 °C) penkias minutes laikomos ore. Kieta arba skysta medžiaga laikoma piroforine, jei ji užsidega, arba skystis uždega ar apadegina filtravimo popierių.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Pakartojamumas: kadangi tai labai svarbu saugai, vienintelio teigiamo rezultato pakanka, kad medžiaga būtų laikoma piroforine.

1.6 BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

Maždaug 10 cm skersmens porcelianinė lėkštutė kambario temperatūroje (maždaug 20 °C) apytikriai iki 5 mm pripildoma diatomito.

Pastaba:

Diatomitas arba kuri nors kita panaši inertiška medžiaga, kurią būtų galima visur gauti, turi būti imama vietoje žemės, ant kurios bandomoji medžiaga galėtų būti išpilta avarijos atveju.

Bandyti skysčiams, kurie neužsidega ore sumaišyti su inertiniu nešikliu, reikia turėti sausą filtravimo popierių.

1.6.2. **Bandymo eiga**

a) *Milteliai*

1-2 cm^3 bandomosios kietos medžiagos miltelių iš maždaug 1 m aukščio beriama ant nedegaus paviršiaus ir žiūrima, ar medžiaga užsidega krisdama arba per penkias minutes po nusėdimo.

Bandymas kartojamas šešis kartus, jei medžiaga neužsidega.

b) *Skysčiai*

Maždaug 5 cm^3 bandomojo skysčio supilama į paruoštą porcelianinę lėkštutę ir stebima, ar medžiaga užsidega per penkias minutes.

Jei per šešis bandymus medžiaga neužsidega, daromi tokie bandymai:

0,5 ml mėginys švirkštu užpilamas ant akyto filtravimo popieriaus ir stebima, ar per penkias minutes po suvilgymo filtravimo popierius užsidega ar anglėja. Bandymas atliekamas tris kartus, jei popierius neužsidega arba neanglėja.

2. **DUOMENYS**

2.1. Rezultatų apdorojimas

Bandymas gali būti nutrauktas, kai kurio nors bandymo rezultatas yra teigiamas.

2.2. Vertinimas

Jei su inertišku nešikliu sumaišyta ir ore padėta medžiaga užsidega per penkias minutes arba jei skystoji medžiaga per penkias minutes apdegina arba uždega joje suvilgytą ir ore padėtą filtravimo popierių, ji laikoma piroforine medžiaga.

3. **ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (identifikavimas ir priemaišos),

— bandymų rezultatai,

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

4. **NUORODOS**

(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. SPROGSTAMOSIOS SAVYBĖS

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šis metodas pateikia bandymo schemą norint nustatyti, ar kelia sprogimo pavojų kieta arba pastos pavidalo medžiaga, veikiant liepsnai (terminis jautrumas) arba smūgiui ar trinčiai (jautrumas mechaniniams veiksniams), ir ar kelia sprogimo pavojų skysta medžiaga, veikiant liepsnai arba smūgiui.

Metodas susideda iš trijų dalių:

(a) terminio jautrumo bandymas (1);

(b) mechaninio jautrumo smūgiui bandymas (1);

(c) mechaninio jautrumo trinčiai bandymas (1).

Šiuo metodu gauti duomenis leidžia įvertinti tikimybę įvykti sprogimui, jei veikia kai kurie įprasti veiksniai. Metodas neskirtas nustatyti, ar medžiaga gali sprogti bet kokiomis sąlygomis.

Metodas tinka nustatyti, ar tam tikromis direktyvoje apibrėžtomis sąlygomis medžiaga kelia sprogimo pavojų (terminis ir mechaninis jautrumas). Jame naudojama kelių tipų aparatūra, kuri turi platų pritaikymą tarptautiniu mastu (1) ir kurią naudojant paprastai gaunami reikšmingi duomenys. Reikia pripažinti, kad metodas nėra tikslus. Be nurodytos aparatūros gali būti naudojami alternatyvūs aparatai, jei jie turi tarptautinį pripažinimą, o rezultatai gali būti atitinkamai susieti su rezultatais, gautais nurodyta aparatūra.

Bandymų atlikti nereikia, kai turima informacija apie medžiagos termodinamines savybes (pvz., susidarymo šilumą, skilimo šilumą) ir (arba) kai kurių chemiškai aktyvių grupių (2) nebuvimas struktūrinėje formulėje leidžia pagrįstai neabejoti, kad medžiaga negali greitai suirti skiriantis dujoms arba šilumai (t.y. medžiaga nekelia jokio sprogimo pavojaus). Su skysčiais nereikia atlikti mechaninio jautrumo trinčiai bandymo.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Sprogstamosios medžiagos:

medžiagos, kurios gali sprogti veikiant liepsnai arba kurios yra jautrios smūgiui ar trinčiai nurodytame aparate (arba mechaniškai yra jautresnės nei 1,3-dinitrobenzenas alternatyviame aparate).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

1,3-dinitrobenzenas, techniškai gryna kristalinė medžiaga, išsijota per 0,5 mm sietą, skirta trinties ir smūgio metodams.

Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazinas (RDX, heksogenas, ciklonitas - CAS 121-82-4), perkristalintas iš vandeninio cikloheksanono tirpalo, drėgnas išsijotas per 250 μm sietą ir išlikęs ant 150 μm sieto bei išdžiovintas 103 ± 2 °C temperatūroje (4 valandas), skirtas antros eilės trinties ir smūgio bandymams.

1.4. METODO ESMĖ

Norint nustatyti trijų jautrumo bandymų saugos sąlygas, būtina atlikti išankstinius bandymus.

1.4.1. **Saugaus naudojimo bandymai (3)**

Rūpinantis sauga, prieš atliekant pagrindinius bandymus labai maži medžiagos mėginiai (maždaug 10 mg) atviroje vietoje kaitinami dujų liepsnoje, veikiami smūgio bet kokiame patogios formos aparate ir veikiami trinties, naudojant medinį plaktuką ir priekalą arba bet kokios rūšies trinties aparatą. Tikslas – nustatyti, ar medžiaga yra tiek jautri ir sprogi, kad paskirtieji jautrumo bandymai, ypač terminio jautrumo bandymas, turi būti atliekami laikantis specialių saugos priemonių, kad būtų išvengta pavojaus sužeisti operatorių.

1.4.2. **Terminis jautrumas**

Norint nustatyti, ar medžiaga gali sprogti intensyvaus kaitinimo ir apibrėžto uždaro tūrio sąlygomis, ji pagal šį metodą kaitinama plieniniame vamzdyje, uždarytame diafragma, turinčia skirtingą angos skersmenį.

1.4.3. **Mechaninis jautrumas (smūgis)**

Taikant šį metodą medžiaga veikiama smūgio, kai nustatyto dydžio masė metama iš nustatyto aukščio.

1.4.4. **Mechaninis jautrumas (trintis)**

Taikant šį metodą kietos arba pastos pavidalo medžiagos veikiamos trinties tarp standartinių paviršių nustatytomis apkrovos ir santykinio judėjimo sąlygomis.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nenurodyti.

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Terminis jautrumas (liepsnos veikimas)**

1.6.1.1. *Aparatūra*

Aparatą sudaro vienkartinio naudojimo plieninis vamzdis su jam skirtu daugkartinio naudojimo uždarymo įtaisu (1 paveikslas), įstatytas į kaitinimo ir apsauginį įtaisą. Kiekvienas vamzdis yra giliojo tempimo plonalakščio plieno vamzdis (žr. priedėlį), vamzdžio vidinis skersmuo 24 mm, ilgis 75 mm, sienelių storis 0,5 mm. Atviras vamzdžio galas užriečiamas, kad jį būtų galima uždaryti diafragmos bloku. Jį sudaro slėgiui atspari diafragma, kurios centre esanti anga yra gerai pritvirtinta prie vamzdžio dviejų dalių sriegine jungtimi (veržle ir sandarikliu su sriegiu). Veržlė ir sandariklis su sriegiu pagaminti iš chromo manganinio plieno (žr. priedėlį), kuris nekibirkščiuoja iki 800 °C. Diafragmos yra 6 mm storio, pagamintos iš kaitrai atsparaus plieno (žr. priedėlį), ir turi įvairaus skersmens angas.

1.6.1.2. *Bandymų sąlygos*

Paprastai medžiaga yra bandoma tokia, kokia yra gauta, nors kai kuriais atvejais, pvz., jei ji yra presuota, lieta arba kitokiu būdu tankinta, prieš bandant ją gali tekti smulkinti.

Jei bandomos kietosios medžiagos, kiekvienam bandymui reikalingos medžiagos masė nustatoma atliekant dviejų pakopų tuščiąjį bandymą. Pasvertas vamzdis pripildomas 9 cm^3 medžiagos, toliau medžiaga plūkama 80 N jėga, tenkančia visam vamzdžio skerspjūviui. Kad būtų saugu arba tais atvejais, kai bandinio fizinė forma dėl spaudimo gali pasikeisti, gali būti taikomos kitos pripildymo metodikos; pvz., jei medžiaga yra labai jautri trinčiai, plūkimas netinka. Jei medžiaga yra spūdi, jos dedama daugiau ir ji plūkama, kol vamzdis pripildomas tiek, kad iki viršaus lieka 55 mm. Nustatoma bendra masė, kurios reikia pripildyti iki 55 mm lygio, ir dedamos dar dvi tokios dalys, kiekvieną kartą plukant 80 N jėga. Po to plukant arba išimant medžiagos dedama tiek, kad iki vamzdžio viršaus liktų 15 mm. Atliekamas antras tuščiasis bandymas, iš pradžių su suplūktu kiekiu, kuris sudarytų vieną trečdalį pirmame tuščiajame bandyme nustatytos masės. Įdedamos dar dvi tokios dalys plukant 80 N jėga, po to, prireikus, įdedant arba išimant dalį medžiagos nustatomas jos 15 mm lygis iki viršaus. Kietosios medžiagos kiekis, nustatytas antrame tuščiajame bandyme, naudojamas kiekvienam bandymui, pripildant tris kartus vienodais kiekiais, kiekvieną kartą suspaudžiant iki 9 cm^3 reikalinga tam jėga. (Tai galima palengvinti naudojant tarpinius žiedus).

Skysčių ir gelių dedama į vamzdį iki 60 mm aukščio, ypatingą dėmesį kreipiant į gelių dėjimą, kad būtų išvengta tuštumų susidarymo. Ant vamzdžio iš apačios užstumiamas sandariklis su sriegiu, įstatoma diafragma su reikiamo skersmens anga ir, šiek tiek sutepus molibdeno disulfido pagrindu pagamintu tepalu, užsukama veržlė. Yra labai svarbu kontroliuoti, kad medžiaga visiškai nepatektų tarp jungės ir diafragmos arba tarp sriegių.

Kaitinama propano dujomis iš pramoninio baliono, turinčio reduktorių (60-70 mbar), leidžiamomis per debitmatį ir tolygiai vamzdynu paskirstomomis (kaip rodo degiklių liepsnos stebėjimas) keturiems degikliams. Degikliai išdėstyti apie bandymo kamerą, kaip parodyta 1 paveiksle. Keturi degikliai bendrai suvartoja 3,2 litro propano per minutę. Galima deginti kitokias dujas ir naudoti kitokius degiklius, tačiau kaitinimo sparta turi būti tokia, kokia nurodyta 3 paveiksle. Visuose aparatuose kaitinimo sparta turi būti periodiškai tikrinama, naudojant dietilftalatu pripildytus vamzdžius, kaip parodyta 3 paveiksle.

1.6.1.3. *Bandymų eiga*

Kiekvienas bandymas atliekamas tol, kol vamzdis sutrūkinėja į dalis, arba jis kaitinamas penkias minutes. Vertinama, kad bandyme įvyko sprogimas, jei jis baigiasi vamzdžio sutrūkimu į tris arba daugiau skeveldrų, kurios kai kuriais atvejais gali jungtis siauromis metalo juostomis, kaip parodyta 2 paveiksle. Jei bandymo metu susidaro mažiau skeveldrų arba jų visai nesusidaro, tuomet nelaikoma, kad įvyko sprogimas.

Iš pradžių atliekama trijų bandymų serija su 6,0 mm skersmens diafragma, ir jei sprogimų neįvyksta, atliekama antroji trijų bandymų serija su 2 mm skersmens diafragma. Jei sprogimas įvyksta bet kurioje bandymų serijoje, tolesni bandymai nereikalingi.

1.6.1.4 *Vertinimas*

Bandymų rezultatas laikomas teigiamu, jei sprogimas įvyksta bet kurioje anksčiau nurodytų bandymų serijoje.

1.6.2 **Mechaninis jautrumas (smūgis)**

1.6.2.1. *Aparatūra (4 paveikslas)*

Pagrindinės tipiško aparato su krintančiu kūju dalys yra lietas plieninis blokas su pagrindu, priekalas, kolona, kreipikliai, krintantys svarsčiai, paleidžiantysis įtaisas ir mėginio laikiklis. Plieninis priekalas, 100 mm (skersmuo) × 70 mm (aukštis), varžtais tvirtinamas ant plieninio bloko, 230 mm (aukštis) ´ 250 mm (plotis) ´ 200 mm (aukštis), esančio ant lieto pagrindo 450 mm (ilgis) × 450 mm (plotis) ´ 60 mm (aukštis). Kolona, pagaminta iš besiūlio trauktinio plieninio vamzdžio, tvirtinama laikiklyje, priveržtame užpakalinėje plieninio bloko sienoje. Keturiais varžtais aparatas tvirtinamas prie vientiso betoninio bloko, 60 ´ 60 ´ 60 cm, tokiu būdu, kad kreipiklių strypai būtų vertikalūs ir krintantis svarstis kristų laisvai. Naudojami 5 ir 10 kg svarsčiai, pagaminti iš vientiso plieno. Visų svarsčių smogiamoji galvutė pagaminta iš grūdinto plieno, HRC 60 - 63, ir jos mažiausias skersmuo lygus 25 mm.

Mėginys dedamas į smūgiavimo įtaisą, kurį sudaro du vienas ant kito uždėti koaksialūs plieniniai cilindrai, esantys tuščiaviduriame cilindro formos plieniniame kreipiamajame žiede. Vientiso plieno cilindrai turi būti 10 (-0,003, -0,005) mm skersmens ir 10 mm aukščio, jų paviršius turi būti poliruotas, kraštai apvalinti (kreivės spindulys 0,5 mm) ir HRC 58-65 kietumo. Tuščiavidurio cilindro išorinis skersmuo turi būti lygus 16 mm, poliruotos ištekintos angos skersmuo 10 (+0,005, +0,010) mm ir aukštis 13 mm. Smogiamasis įtaisas surinktas ant tarpinio priekalo (26 mm skersmuo ir 26 mm aukštis), pagaminto iš plieno, ir centruotas žiedu su angomis dujoms išleisti.

1.6.2.2. *Bandymų sąlygos*

Mėginio tūris turi būti lygus 40 mm^3, arba tūris turi atitikti bet kokį alternatyvųjį aparatą. Kietos medžiagos turi būti išbandytos sausos ir ruošiamos taip:

(a) milteliai sijojami (sieto akučių dydis 0,5 mm); bandoma visa tai, kas išbyra per sietą;

(b) presuotos, lietos ar kitu būdu tankintos medžiagos smulkinamos į mažus gabalus ir sijojamos; bandoma sijota 0,5-1 mm skersmens dalelių frakcija, kuri turi būti reprezentatyvi pradinės medžiagos dalis.

Medžiagos, kurios paprastai tiekiamos pastos pavidalo, turi būti, jei tai įmanoma, bandomos išdžiovintos arba bet kuriuo atveju pašalinus kuo didesnę dalį skiediklio. Skysčiai bandomi tarp viršutinio ir apatinio cilindro esant 1 mm tarpui.

1.6.2.3. *Bandymų eiga*

Atliekama šešių bandymų serija, metant 10 kg masės svarstį iš 0,40 m aukščio (40 J). Jei 40 J atveju šešių bandymų metu sprogimas įvyksta, turi būti atliekama kita 6 bandymų serija, metant 5 kg masės svarstį iš 0,15 m aukščio (7,5 J). Kituose aparatuose bandinys lyginamas su pasirinktąja etalonine medžiaga, naudojant nustatytą metodiką (pvz., kėlimo-metimo metodiką ir t.t.).

1.6.2.4. *Vertinimas*

Bandymų rezultatas laikomas teigiamu, jei bent vieno bandymo metu, naudojant nurodytą smūgiavimo įtaisą, įvyksta sprogimas (liepsnos blyksniai ir (arba) garsas, prilygstantis sprogimo garsui) arba bandinys yra jautresnis nei 1,3-dinitrobenzenas ar heksogenas atliekant alternatyvų smūgio bandymą.

1.6.3. **Mechaninis jautrumas (trintis)**

1.6.3.1. *Aparatūra (5 paveikslas)*

Trinties aparatą sudaro lieto plieno pagrindo plokštė, ant kurios montuojamas trinties įtaisas. Jį sudaro nejudantis porcelianinis kaištis ir judanti porcelianinė plokštė. Porcelianinė plokštė privirtinta prie vežimėlio, kuris juda dviem kreipikliais. Vežimėlis prijungtas prie elektros variklio jungiamuoju strypu, ekscentriniu krumpliaračiu ir atitinkama pavara tokiu būdu, kad porcelianinė plokštė po porcelianiniu kaiščiu juda tik kartą 10 mm į priekį ir atgal. Porcelianinį kaištį galima apkrauti, pvz., 120 arba 360 N apkrova.

Plokščios porcelianinės plokštės pagamintos iš balto techninio porceliano (šiurkštumas nuo 9 iki 32 μm), jų matmenys: 25 mm (ilgis) × 25 mm (plotis) × 5 mm (storis). Cilindrinis 15 mm ilgio porcelianinis kaištis taip pat pagamintas iš balto techninio porceliano, jo skersmuo lygus 10 mm, ir galai turi šiurkštintą sferinį paviršių, kurio kreivės spindulys lygus 10 mm.

1.6.3.2. *Bandymų sąlygos*

Bandinio tūris turi būti lygus 10 mm^3 arba bandinio tūris turi atitikti bet kurį alternatyvų aparatą.

Kietos medžiagos išbandomos sausos ir ruošiamos taip:

(a) milteliai sijojami (sieto akučių dydis 0,5 mm); bandoma visa tai, kas iškrenta per sietą;

(b) presuotos, lietos ar kitu būdu sutankintos medžiagos smulkinamos į mažus gabalus ir sijojamos; bandymuose naudojama sijota frakcija, kurios dalelių skersmuo < 0,5 mm.

Medžiagos, kurios paprastai tiekiamos pastos pavidalu, turi būti bandomos sausos, jei galima. Jei sauso medžiagos pavidalo paruošti neįmanoma, pasta (pašalinus kiek įmanoma didesnį kiekį skiediklio) bandoma šablonu pagaminant 0,5 mm storio, 2 mm pločio ir 10 mm ilgio plėvelę.

1.6.3.3. *Bandymų eiga*

Porcelianinis kaištis uždedamas ant bandomosios medžiagos ir veikiamas apkrova. Atliekant bandymą porceliano plokštės akytumo žymės turi būti skersai judėjimo krypties. Kaištis turi būti ant bandinio, po kaiščiu turi būti pakankamas kiekis bandinio medžiagos ir plokštė po kaiščiu turi judėti teisingai. Plokštelę padengti pastos pavidalo medžiaga naudojamas 0,5 mm storio saikiklis, turintis 2 × 10 mm griovelį. Porcelianinė plokštelė turi judėti po porcelianiniu kaiščiu 10 mm į priekį ir atgal per 0,44 sekundės. Kiekviena plokštelės ir kaiščio paviršiaus dalis turi būti naudojama tik vieną kartą; du kiekvieno kaiščio galai naudojami dviems bandymams ir kiekvienas iš dviejų plokštelės paviršių naudojamas trims bandymams.

Atliekama šešių bandymų serija, naudojant 360 N apkrovą. Jei šių šešių bandymų metu gaunamas teigiamas rezultatas, turi būti atlikta kita šešių bandymų serija su 120 N apkrova. Kituose aparatuose bandinys lyginamas su pasirinkta etalonine medžiaga, taikant nustatytą metodiką (pvz., kėlimo-metimo metodiką ir t.t.).

1.6.3.4 *Vertinimas*

Bandymų rezultatai laikomi teigiamais, jei kurio nors šių bandymų metu naudojant nustatytą trinties aparatą įvyksta bent vienas sprogimas (prilygstantis sprogimui traškesys ir (arba) sprogimą primenantis garsas arba liepsnos blyksnis) arba jei jie atitinka lygiaverčius kriterijus vykdant alternatyvų trinties bandymą.

2. DUOMENYS

Iš esmės medžiaga pagal šią direktyvą laikoma kelianti sprogimo pavojų, jei terminio jautrumo, jautrumo smūgiui arba trinčiai bandymo rezultatas yra teigiamas.

3. ATASKAITA

3.1. BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti tokia informacija:

— bandomosios medžiagos identiškumas, sudėtis, grynumas, drėgmės kiekis ir t.t.,

— bandinio fizinė forma ir ar jis buvo smulkinamas, trupinamas ir (arba) sijojamas,

— stebėjimai vykdant terminio jautrumo bandymus (pvz., bandinio masė, skeveldrų skaičius ir t.t.),

— stebėjimai vykdant mechaninio jautrumo bandymus (pvz., didelio dūmų kiekio susidarymas arba visiškas medžiagos irimas be garso, liepsnos, kibirkščių, traškesio ir t.t.),

— kiekvieno tipo bandymų rezultatai,

— jei buvo naudojamas alternatyvus aparatas, turi būti pateiktas mokslinis pagrindimas, taip pat duomenys apie koreliaciją tarp rezultatų, gautų nustatytu aparatu, ir rezultatų, gautų lygiaverčiu aparatu,

— visi naudingi komentarai, pvz., nuoroda į panašių medžiagų bandymus, kurie gal būt tiktų tinkamai paaiškinti rezultatus,

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS IR VERTINIMAS

Bandymų ataskaitoje turi būti paminėti visi rezultatai, kurie laikomi klaidingais, anomaliais arba nereprezentatyviais. Jei kokius nors rezultatus reikia atmesti, turi būti pateiktas aiškinimas ir visų alternatyvių arba papildomų bandymų rezultatai. Jei anomalus rezultatas negali būti paaiškintas, jis turi būti priimtas toks, koks yra, ir turi būti naudojamas medžiagai atitinkamai klasifikuoti.

4. **NUORODOS**

(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.

Priedėlis

Terminio jautrumo bandyme naudojamų medžiagų specifikacijos pavyzdys (žr. DIN 1623)

(1) Vamzdis: medžiagos specifikacija No 1.0336.505 g

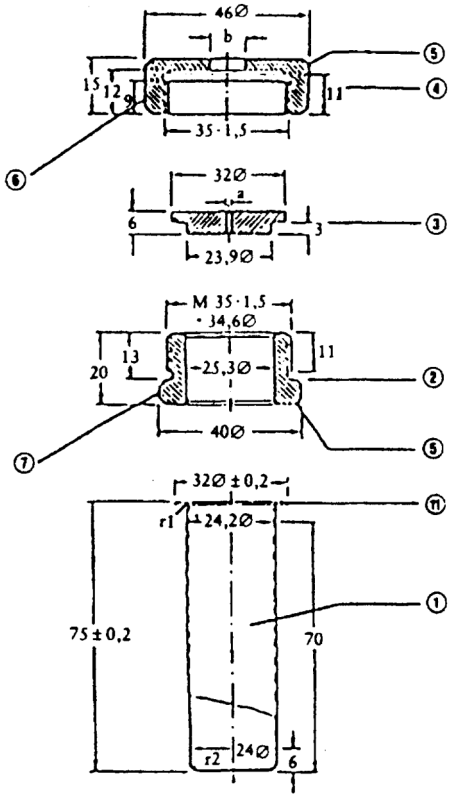
(2) Diafragma: medžiagos specifikacija No 1.4873

(3) Sandariklis su sriegiu ir veržlė: medžiagos specifikacija No 1.3817

1 paveikslas

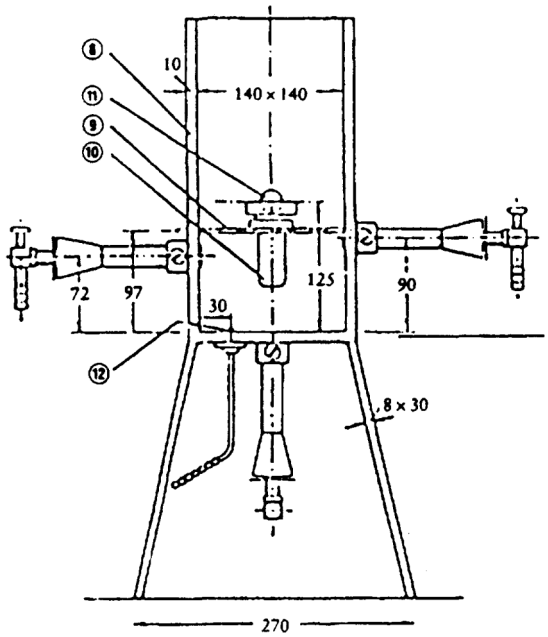
Terminio jautrumo bandymo aparatas

(visi matmenys milimetrais)



1a pav. Plieninis vamzdis ir priedai

(1) vamzdis
(1a) išorinė jungė
(2) sandariklis su sriegiu; mažo trinties koeficiento sriegis
(3) diafragma: skersmuo a = 2,0 arba 6,0 mm
(4) veržlė b = 10 mm skersmuo
(5) nuožulnus paviršius
(6) 2 briaunos 41 dydžio raktui



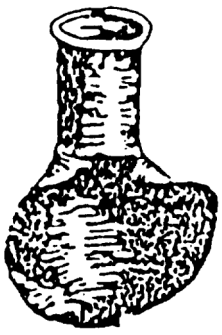
1b pav. Kaitinimo ir apsauginis įtaisas

(7) 2 briaunos 36 dydžio raktui
(8) skeveldroms atspari dėžė
(9) 2 strypai vamzdžiui laikyti
(10) surinktas vamzdis
(11) užpakalinio degiklio padėtis; kiti degikliai matomi
(12) tuščiosios eigos purkštukas

2 paveikslas

Terminio jautrumo bandymas

Skeveldrų susidarymo pavyzdžiai



Sprogimas neįvyko



Sprogimas neįvyko



Sprogimas



Sprogimas



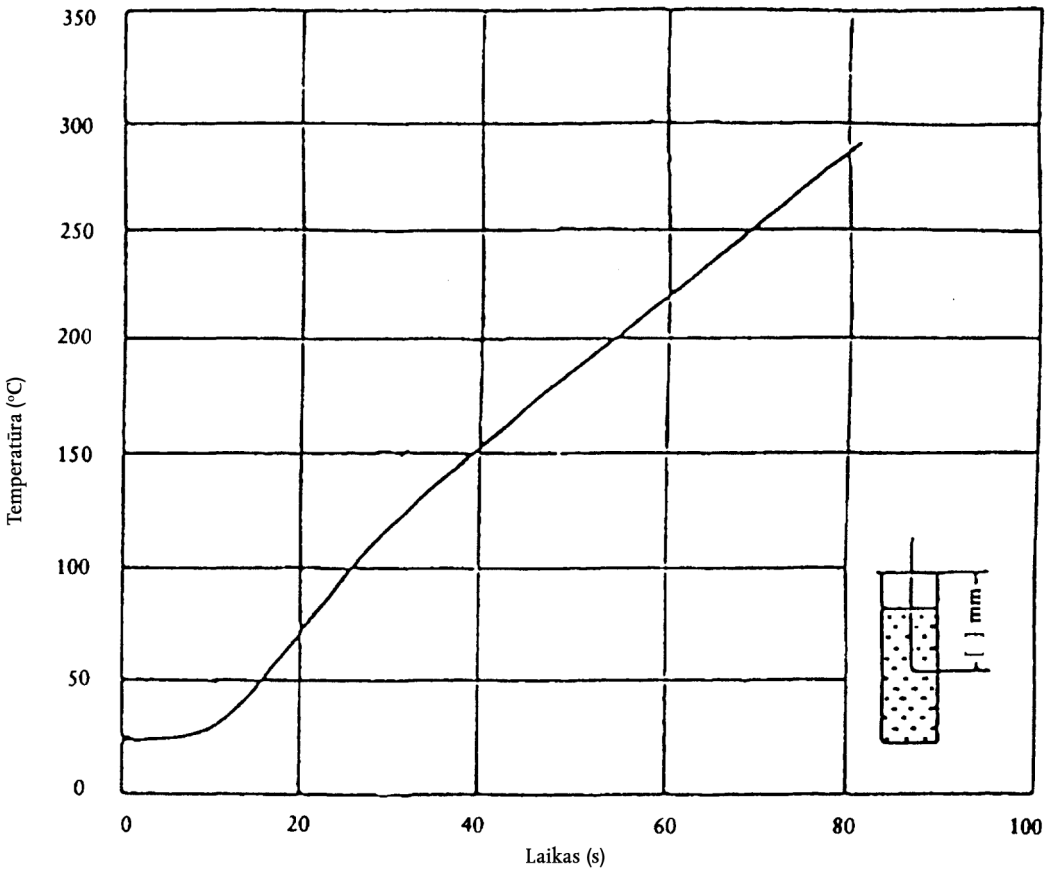
Sprogimas



Sprogimas

3 paveikslas

Kaitinimo spartos kalibravimas terminio jautrumo bandymui

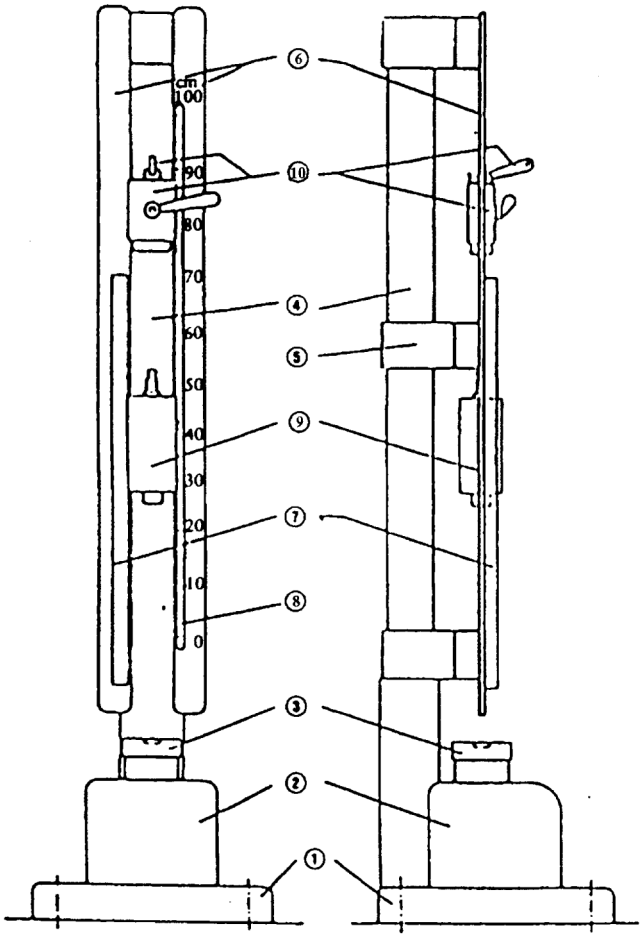


Temperatūros ir laiko priklausomybės kreivė gauta kaitinant dibutilftalatą (27 cm^3) uždarame (1,5 mm diafragma) vamzdyje, naudojant propano 3,2 litro/minutę srautą. Temperatūra matuota 1 mm skersmens chromelio/aliumelio termoelementas, įdėtas į apvalkalą iš nerūdijančio plieno ir įstatytas vamzdžio viduryje 43 mm žemiau jo briaunos. Kaitinimo sparta 135 °C-285 °C temperatūroje turi būti nuo 185 iki 215 K/minutę.

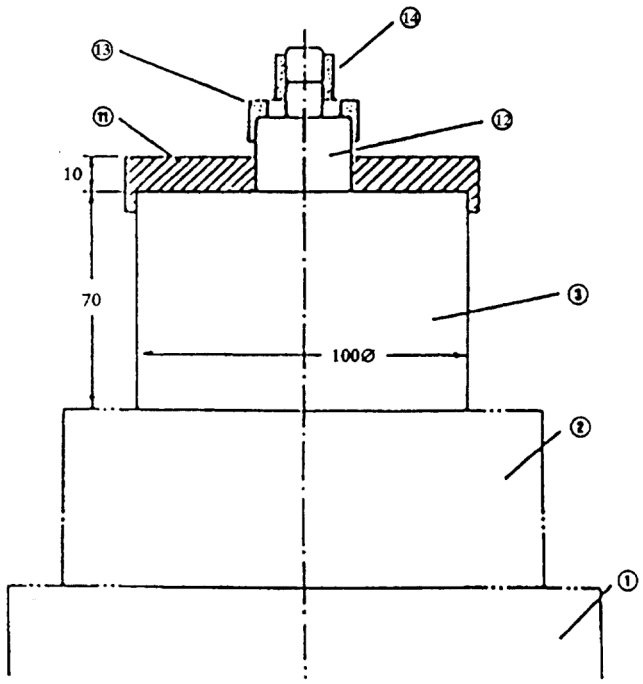
4 paveikslas

Jautrumo smūgiui bandymo aparatas

(visi matmenys milimetrais)



4a pav. Krintantis kūjis, priekis ir šonas, bendras vaizdas

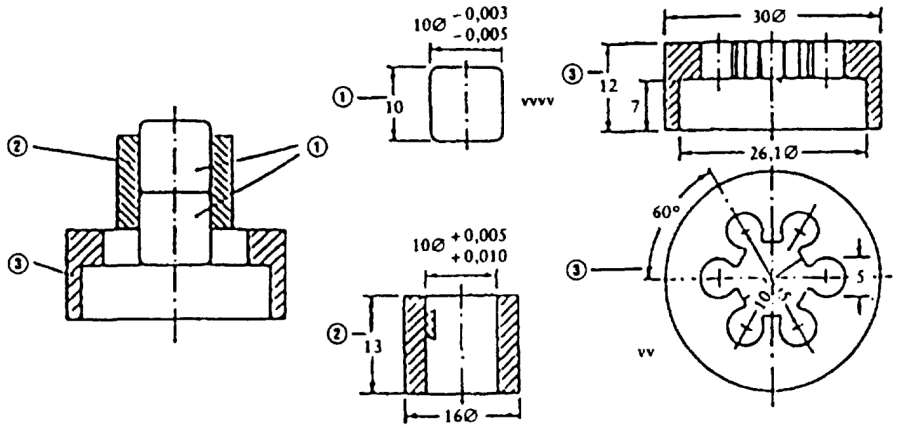


4b pav. Krintantis kūjis, apatinė dalis

(1) pagrindas, 450 × 450 × 60
(2) plieninis blokas, 230 × 250 × 200
(3) priekalas, 100 skersmuo × 70
(4) kolona
(5) vidurinioji skersė
(6) 2 kreipikliai
(7) krumplinis stovas
(8) graduotoji skalė
(9) krintantis kūjis (tvoklė)
(10) laikantysis ir paleidžiantysis įtaisas
(11) nustatymo plokštė
(12) tarpinis priekalas (keičiamas), 26 skersmuo × 26
(13) nustatymo žiedas su angomis
(14) smūgiavimo įtaisas

4 paveikslo

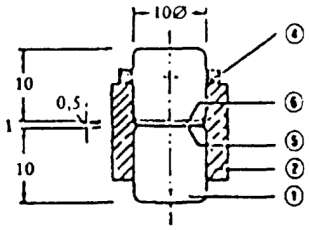
tąsa

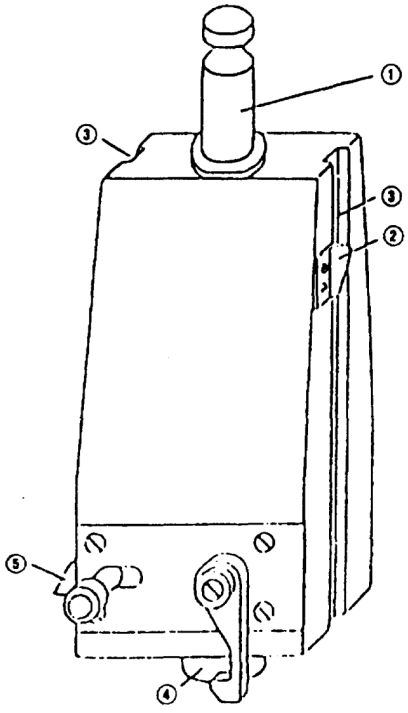


4c pav. Smūgiavimo įtaisas miltelių arba pastos pavidalo medžiagoms

(1) plieniniai cilindrai
(2) plieninių cilindrų kreipiamasis žiedas
(3) nustatymo žiedas su angomis
(a) vertikalusis pjūvis
(b) horizontalioji projekcija
(4) guminis žiedas
(5) skystoji medžiaga (40 mm³)
(6) erdvė be skysčio

4d pav. Smūgiavimo įtaisas skysčiams



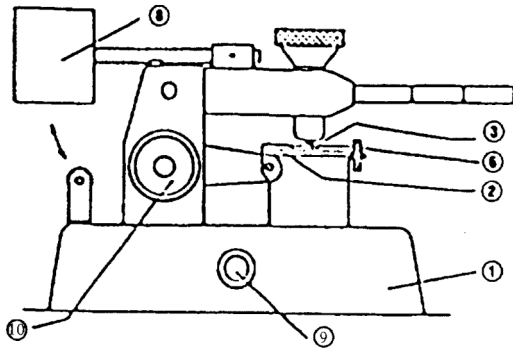


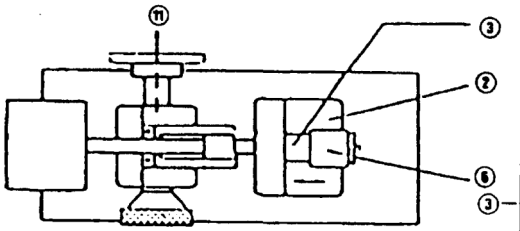
4e pav. Kūjis (kūjo masė 5 kg)

(1) pakabos mova
(2) aukščio žymeklis
(3) padėties nustatymo griovelis
(4) cilindrinė smūgiavimo galvutė
(5) gaudyklė

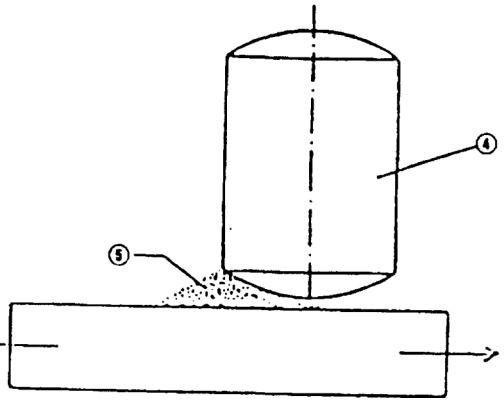
5 paveikslas

Jautrumo trinčiai bandymo aparatas





5a pav. Trinties aparatas, vertikalusis ir horizontalusis vaizdas



5b pav. Kaiščio ant bandinio pradinė padėtis

(1) plieninis pagrindas
(2) judamasis vežimėlis
(3) porcelianinė plokštelė, 25 × 25 × 5 mm, dedama ant vežimėlio
(4) nejudantis porcelianinis kaištis 10 mm skersmuo × 15 mm
(5) bandinys, apytikriai 10 mm³
(6) kaiščio laikiklis
(7) apkrovos svirtis
(8) atsvaras
(9) jungiklis
(10) ratas vežimėlio pradinei padėčiai nustatyti
(11) į elektrinės pavaros variklį

A.15. UŽSIDEGIMO TEMPERATŪRA (SKYSČIAI IR DUJOS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šiuo bandymu neturi būti bandomos sprogstamosios medžiagos ir medžiagos, kurios užsidega sąlytyje su oru esant kambario temperatūrai. Bandymo metodika taikytina dujoms, skysčiams ir garams, kurie ore gali užsidegti susilietę su karštu paviršiumi.

Užsidegimo temperatūra gali žymiai sumažėti, jei yra katalizinių priemaišų, dėl paviršiaus medžiagos arba dėl didesnio bandymo indo tūrio.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Užsidegimo laipsnis išreikiamas užsidegimo temperatūra. Užsidegimo temperatūra yra mažiausia temperatūra, kurioje bandomoji medžiaga užsidega, sumaišyta su oru esant bandymo metode apibrėžtoms sąlygoms.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninės medžiagos nurodytos standartuose (žr. 1.6.3). Jos pirmiausiai turi būti naudojamos tikrinti metodo veikimą ir lyginti rezultatus, gautus taikant kitus metodus.

1.4. METODO ESMĖ

Taikant šį metodą nustatoma mažiausia gaubto vidinio paviršiaus temperatūra, kurioje užsidega po gaubtu įpurkštos dujos, garai arba skystis.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Pakartojamumas kinta atsižvelgiant į užsidegimo temperatūros intervalą ir taikytą metodą.

Jautrumas ir specifiškumas priklauso nuo taikyto bandymo metodo.

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

Aparatas aprašytas 1.6.3 nurodytame metode.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

Bandomosios medžiagos bandinys yra bandomas pagal 1.6.3 nurodytą metodą.

1.6.3. **Bandymo eiga**

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

2. **DUOMENYS**

Užrašykite bandymų temperatūrą, atmosferos slėgį, naudotą bandinio kiekį ir bandinio užsidegimo vėlinimosi trukmę.

3. **ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (identifikavimas ir priemaišos),

— naudotas bandinio kiekis, atmosferos slėgis,

— naudota apatatūra,

— matavimų rezultatai (bandymų temperatūra, užsidegimo rezultatai, atitinkamų vėlinimosi trukmė),

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

4. **NUORODOS**

Nėra.

A.16. KIETŲJŲ MEDŽIAGŲ SANTYKINĖ UŽSIDEGIMO TEMPERATŪRA

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šiuo bandymu neturi būti bandomos sprogiosios medžiagos ir medžiagos, kurios sąlytyje su oru užsidega kambario temperatūroje.

Šio bandymo tikslas – gauti išankstinę informaciją apie kietųjų medžiagų užsidegimą aukštesnėje temperatūroje.

Jei medžiagos reakcijos su deguonimi arba egzoterminio jos skilimo metu susidariusi šiluma aplinkoje išsisklaido nepakankamai greitai, dėl savaiminio įkaitimo įvyksta užsidegimas. Taigi, užsidegimas įvyksta, kai šilumos susidarymo greitis yra didesnis nei jos netekimo greitis.

Bandymo metodika yra naudinga kaip išankstinis kietųjų medžiagų atrankos bandymas. Atsižvelgiant į sudėtingą kietųjų medžiagų užsidegimo ir degimo prigimtį, šiuo metodu nustatyta užsidegimo temperatūra turi būti taikoma tik palyginimui.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Pagal šį metodą nustatyta užsidegimo temperatūra yra mažiausia aplinkos temperatūra, išreikšta °C, kurioje tam tikras medžiagos kiekis užsidega apibrėžtomis sąlygomis.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO ESMĖ

Tam tikras bandomosios medžiagos kiekis kambario temperatūroje dedamas į krosnį; užrašoma bandinio viduje matuojamos temperatūros kitimo laike kreivė, krosnies temperatūrą 0,5 °C/min sparta didinant iki 400 °C arba iki lydymosi temperatūros, jei ji žemesnė. Šiame bandyme krosnies temperatūra, kurioje bandinio temperatūra pasiekia 400 C dėl savaiminio įkaitimo, vadinama užsidegimo temperatūra.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

1.6.1.1. *Krosnis*

Laboratorinė krosnis (tūris apie 2 litrus), kuri turėtų programuojamą temperatūros reguliavimą ir kurioje būtų savaiminė oro cirkuliacija bei sprogimo slėgio mažinimo vožtuvas. Norint išvengti galimo sprogimo pavojaus, bet kokios skilimo metu susidarančios dujos turi nepatekti ant elektrinių kaitinimo elementų.

1.6.1.2. *Kubas iš vielos tinklelio*

Iš nerūdijančio plieno pagamintas vielos tinklelis su 0,045 mm akutėmis turi būti supjaustytas pagal 1 paveiksle pateiktą pavyzdį. Tinklelis turi būti sulankstytas kubu su atviru viršumi ir sutvirtintas viela.

1.6.1.3. *Termoelementai*

Tinkami termoelementai.

1.6.1.4. *Savirašis*

Bet koks dviejų koordinačių savirašis, kalibruotas nuo 0 °C iki 600 °C arba pagal atitinkamą įtampą.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

Medžiagos bandomos tokios, kokios yra gaunamos.

1.6.3. **Bandymo eiga**

Kubas pildomas bandomąja medžiaga ir švelniai tapšnojant jos dedama daugiau, kol kubas visiškai prisipildo. Toliau kubas kambario temperatūroje pakabinamas krosnies viduryje. Vienas termoelementas dedamas kubo viduryje, o temperatūrai krosnyje registruoti kitas termoelementas dedamas tarp kubo ir krosnies sienos.

Krosnies ir bandinio temperatūra nuolat užrašoma, krosnies temperatūrą 0,5 °C/min sparta didinant iki 400 °C arba iki lydymosi temperatūros, jei ji yra žemesnė.

Kai medžiaga užsidega, bandinyje esantis termoelementas rodys labai staigų temperatūros didėjimą palyginti su krosnies temperatūra.

2. **DUOMENYS**

Norint vertinti, svarbu žinoti krosnies temperatūrą, kurioje bandinio temperatūra dėl jo savaiminio įkaitimo pasiekia 400 °C (žr. 2 paveikslą).

3. **ATASKAITA**

Jei įmanoma, ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— bandyti pateiktos medžiagos apibūdinimas,

— matavimo rezultatai, įskaitant temperatūros kitimo laike kreivę,

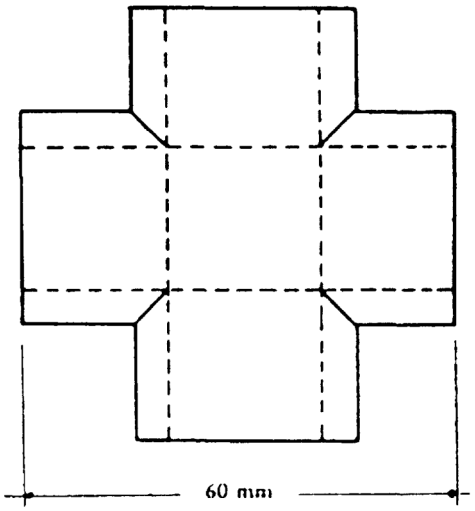
— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

4. **NUORODOS**

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

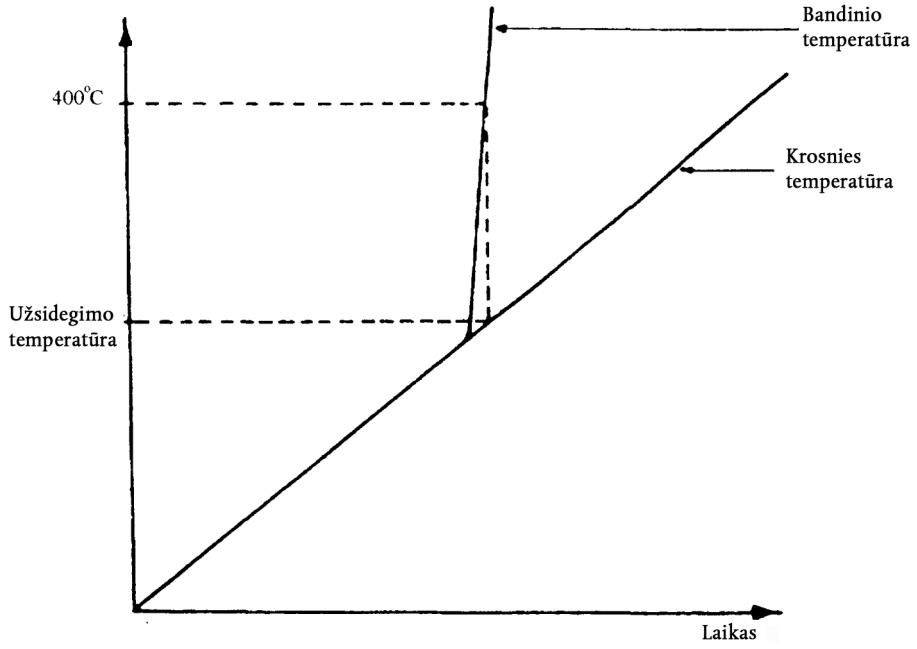
1 paveikslas

20 mm bandymo kubo pavyzdys



2 paveikslas

Tipiška temperatūros kitimo laike kreivė



A.17. OKSIDACINĖS SAVYBĖS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Prieš atliekant šį bandymą naudinga turėti išankstinę informaciją apie bet kurias medžiagos potencialias sprogumo savybes.

Šis bandymas netaikomas skysčiams, dujoms, sprogstamosioms arba labai degioms medžiagoms arba organiniams peroksidams.

Šio bandymo atlikti nereikia, jei struktūrinės formulės analizė leidžia pagrįstai neabejoti, kad medžiaga negali egzotermiškai reaguoti su degiąja medžiaga.

Norint išsiaiškinti, ar bandymas turi būti atliekamas taikant ypatingas saugumo priemones, turi būti daromas išankstinis bandymas.

1.2. APIBRĖŽIMAS IR VIENETAI

Degimo trukmė: reakcijos laikas, kurį reakcijos zona sklinda palei krūvelę, bandymą atliekant pagal 1.6 aprašytą metodiką.

Degimo greitis: išreikštas milimetrais per sekundę.

Didžiausias degimo greitis: degimo greičio didžiausia vertė, gauta deginant mišinius, kuriuose oksidatorius sudaro nuo 10 % iki 90 % mišinio masės.

1.3. ETALONINĖ MEDŽIAGA

Bandyme ir išankstiniame bandyme kaip etaloninė medžiaga naudojamas bario nitratas (analiziškai grynas).

Etaloninis mišinys yra toks bario nitrato ir celiuliozės miltelių mišinys, paruoštas pagal 1.6, kurio degimo greitis yra didžiausias (paprastai tai mišinys, kuriame bario nitrato yra 60 % masės).

1.4. METODO ESMĖ

Išankstinis bandymas atliekamas saugos tikslais. Toliau bandyti nereikia, jei išankstiniu bandymu nustatoma, kad bandomoji medžiaga turi oksidacinių savybių. Jei taip nėra, su medžiaga turi būti atliktas visas bandymas.

Atliekant visą bandymą, bandomoji medžiaga ir atitinkama degioji medžiaga maišomos įvairiais santykiais. Iš kiekvieno mišinio paruošiama krūvelė, kuri viename gale padegama. Nustatytas didžiausias degimo greitis lyginamas su etaloninio mišinio didžiausiu degimo greičiu.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Jei reikia, tinka bet kuris malimo ir maišymo būdas su sąlyga, kad šešių atskirų bandymų didžiausio degimo greitis nuo aritmetinio vidurkio vertės skiriasi ne daugiau kaip 10 %.

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Paruošimas**

1.6.1.1. *Bandomoji medžiaga*

Bandinį smulkinkite, kad dalelių dydis būtų < 0,125 mm pagal tokią metodiką: bandomąją medžiagą sijokite, likusiąją dalį malkite ir vėl sijokite, kol per sietą išsijojamas visas bandinys.

Galima taikyti bet kokį malimo ir sijojimo būdą, kuris atitiktų kokybės kriterijus.

Prieš ruošiant mišinį medžiaga išdžiovinama 105 °C temperatūroje iki pastoviosios masės. Jei bandomosios medžiagos skilimo temperatūra yra mažesnė kaip 105 °C, medžiaga turi būti išdžiovinta atitinkamoje mažesnėje temperatūroje.

1.6.1.2. *Degiosios medžiagos*

Degioji medžiaga yra celiuliozės milteliai. Celiuliozės rūšis turi atitikti plonasluoksnėje chromatografijoje arba kolonėlinėje chromatografijoje naudojamą celiuliozę. Tinkama nustatyta celiuliozės rūšis, kurios daugiau kaip 85 % plaušelių ilgis yra nuo 0,020 iki 0,075 mm. Celiuliozės milteliai sijojami per sietą, kurio akučių dydis 0,125 mm. Visą bandymą turi būti naudojama celiuliozė iš tos pačios partijos.

Prieš ruošiant mišinį celiuliozės milteliai džiovinami 105 °C temperatūroje iki pastoviosios masės.

Jei išankstiniam bandymui naudojami medienos miltai, ruošiami spygliuočių medienos miltai, surinkus tą dalį, kuri nusisijoja per 1,6 mm dydžio akučių sietą, ji gerai sumaišoma, po to ne didesnis kaip 25 mm storio sluoksnis keturias valandas džiovinamas 105 °C temperatūroje. Atšaldoma ir laikoma sandariame inde, jį pripildžius kuo pilniau, kol reikės naudoti, geriausiai per 24 valandas po džiovinimo.

1.6.1.3. *Padegimo šaltinis*

Padegimo šaltiniu turi būti naudojama karšta dujų degiklio liepsna (mažiausias skersmuo 5 mm). Jei naudojamas kitas uždegimo šaltinis (pvz., bandant inertinių dujų atmosferoje), būtina pateikti aprašymą ir pagrindimą.

1.6.2. **Bandymo eiga**

Pastaba:

Oksidatorių mišiniai su celiuliuze arba medienos miltais turi būti laikomi potencialiai sprogiais mišiniais ir su jais turi būti elgiamasi kiek galima atsargiau.

1.6.2.1. *Išankstinis bandymas*

Išdžiovinta medžiaga gerai sumaišoma su išdžiovinta celiuliuze arba medienos miltais imant 2 masės dalis bandomosios medžiagos ir 1 masės dalį celiuliozės arba medienos miltų ir mišinys, pripildant be plūkimo kūgio formos šabloną (pvz., laboratorinį stiklinį piltuvą, užkimšus jo kojelę), formuojamas į kūgio formos krūvelę, kurios matmenys 3,5 cm (pagrindo skersmuo) × 2,5 cm (aukštis).

Krūvelė dedama ant šaltos nedegios, neakytos ir blogai šilumą praleidžiančios pagrindo plokštės. Bandymas turi būti atliktas traukos spintoje, kaip aprašyta 1.6.2.2.

Padegimo šaltiniu prisiliečiama prie kūgio. Stebimas ir užrašomas vykstančios reakcijos intensyvumas ir trukmė.

Jei reakcija vyksta intensyviai, medžiaga turi būti laikoma oksiduojančia.

Kiekvienu atveju, jei kyla abejonių, būtina atlikti toliau aprašytą bandinių eilės bandymą.

1.6.2.2. *Bandinių eilės bandymas*

Paruoškite oksidatoriaus ir celiuliozės mišinius, kuriuose oksidatoriaus kiekis kinta kas 10 % nuo 10 % iki 90 % masės. Norint degimo greičio didžiausią vertę gauti tiksliau, kraštiniams atvejams turi būti naudojami tarpinės sudėties oksidatoriaus ir celiuliozės mišiniai.

Krūvelei paruošti naudojama forma. Iš metalo pagaminta forma yra 250 mm ilgio, o jos skerspjūvis yra trikampis, kurio vidinis aukštis 10 mm ir vidinis ilgis 20 mm. Abejose formos pusėse išilgine kryptimi tvirtinamos dvi šoninės metalinės plokštės, kurios yra 2 mm aukštesnės nei viršutinis trikampio skerspjūvio kraštas (žr. paveikslą). Šis įtaisas pripildomas mišinio, jo neplukant ir įpilant nedidelį perteklių. Forma vieną kartą numetama iš 2 cm aukščio ant kieto paviršiaus, o medžiagos perteklius nubraukiamas įstrižai pasukta plokštele. Šoninės plokštės nuimamos ir likę milteliai lyginami velenėliu. Po to ant formos viršaus uždedama nedegi, neakyta ir blogai šilumą praleidžianti pagrindo plokštė, įtaisas apverčiamas ir forma nuimama.

Krūvelė dedama į traukos spintą skersai traukos krypčiai.

Oro greitis turi būti pakankamas, kad dūmai negalėtų patekti į laboratoriją, ir bandymo metu turi nesikeisti. Apie įtaisą turi būti įtaisytas nuo traukimo saugantis ekranas.

Kadangi celiuliozė ir kai kurios bandomosios medžiagos yra higroskopiškos, bandymas turi būti atliekamas kiek įmanoma greičiau.

Vieną krūvelės galą padekite, prikišę prie jo liepsną.

Po to, kai reakcijos zona įveikia pradinį 30 mm atstumą, matuokite reakcijos trukmę 200 mm atstumu.

Bandymas atliekamas su etalonine medžiaga ir bent vieną kartą su kiekvienu iš bandomosios medžiagos mišinių su celiulioze.

Jei nustatoma, kad didžiausias degimo greitis yra žymiai didesnis nei etaloninio mišinio didžiausias degimo greitis, bandymas gali būti nutrauktas; priešingu atveju bandymas turi būti pakartotas penkis kartus su kiekvienu iš trijų mišinių, kuriems gautas didžiausias degimo greitis.

Jei kyla įtarimas, kad rezultatas yra klaidingai teigiamas, bandymas turi būti pakartotas vietoje celiuliozės naudojant inertišką medžiagą, kurios dalelių dydis būtų panašus, pvz., diatomitą. Be to, bandomosios medžiagos ir celiuliozės mišinys, kurio degimo greitis yra didžiausias, turi būti pakartotinai išbandytas inertiškoje atmosferoje (deguonies < 2 % pagal tūrį).

2. **DUOMENYS**

Saugos tikslais turi būti laikoma, kad didžiausias degimo greitis, o ne jo vidutinė vertė yra bandomosios medžiagos oksidacines savybes apibūdinantis parametras.

Vertinant imama didžiausia degimo greičio vertė, gauta atlikus šešis atitinkamo mišinio bandymus.

Nubrėžkite kiekvieno mišinio didžiausiojo degimo greičio priklausomybės nuo oksidatoriaus koncentracijos kreivę. Iš kreivės nustatykite didžiausiąją degimo greičio vertę.

Šešios išmatuotos degimo greičio vertės, gautos atliekant bandymus su mišiniu, kuriam nustatytas didžiausias degimo greitis, turi nesiskirti nuo aritmetinio vidurkio vertės daugiau kaip 10 %; kitu atveju turi būti patobulinti malimo ir maišymo metodai.

Gautą didžiausiąjį degimo greitį palyginkite su etaloninio mišinio didžiausiuoju degimo greičiu (žr. 1.3).

Jei bandymai atliekami inertiškoje atmosferoje, didžiausias reakcijos greitis lyginamas su etaloninio mišinio degimo inertiškoje atmosferoje didžiausiu greičiu.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMŲ ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— bandomosios medžiagos identifikavimas, sudėtis, grynumas, drėgmės kiekis ir t.t.;

— kiekvienas bandinio apdorojimo būdas (pvz., malimas, džiovinimas,...);

— bandymuose naudotas uždegimo šaltinis;

— matavimų rezultatai;

— reakcijos pobūdis (pvz., degimas pliūpsniais paviršiuje, degimas visoje bandinio masėje, visa informacija apie degimo produktus,...);

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus, įskaitant degimo intensyvumo aprašymą (liepsnojimas, kibirkščiavimas, rūkimas, lėtas rusenimas ir t.t.) ir apytikrę degimo trukmę, nustatytą išankstiniame saugos (atrankos) bandyme bandomajai ir etaloninei medžiagoms;

— bandymų su inertiška medžiaga rezultatai, jei yra;

— bandymų inertiškoje atmosferoje rezultatai, jei yra.

3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Laikoma, kad medžiaga yra oksiduojanti, jei:

a) išankstinio bandymo reakcija vyksta intensyviai;

b) atliekant išsamų bandymą bandomųjų mišinių degimo greitis yra didesnis arba lygus celiuliozės ir bario nitrato etaloninio mišinio didžiausiajam degimo greičiui.

Norint išvengti klaidingai teigiamų rezultatų, juos aiškinant turi būti atsižvelgta į rezultatus, gautus atliekant medžiagos mišinių su inertiška medžiaga bandymus ir (arba) inertiškoje atmosferoje atliktų bandymų rezultatus.

4. **NUORODOS**

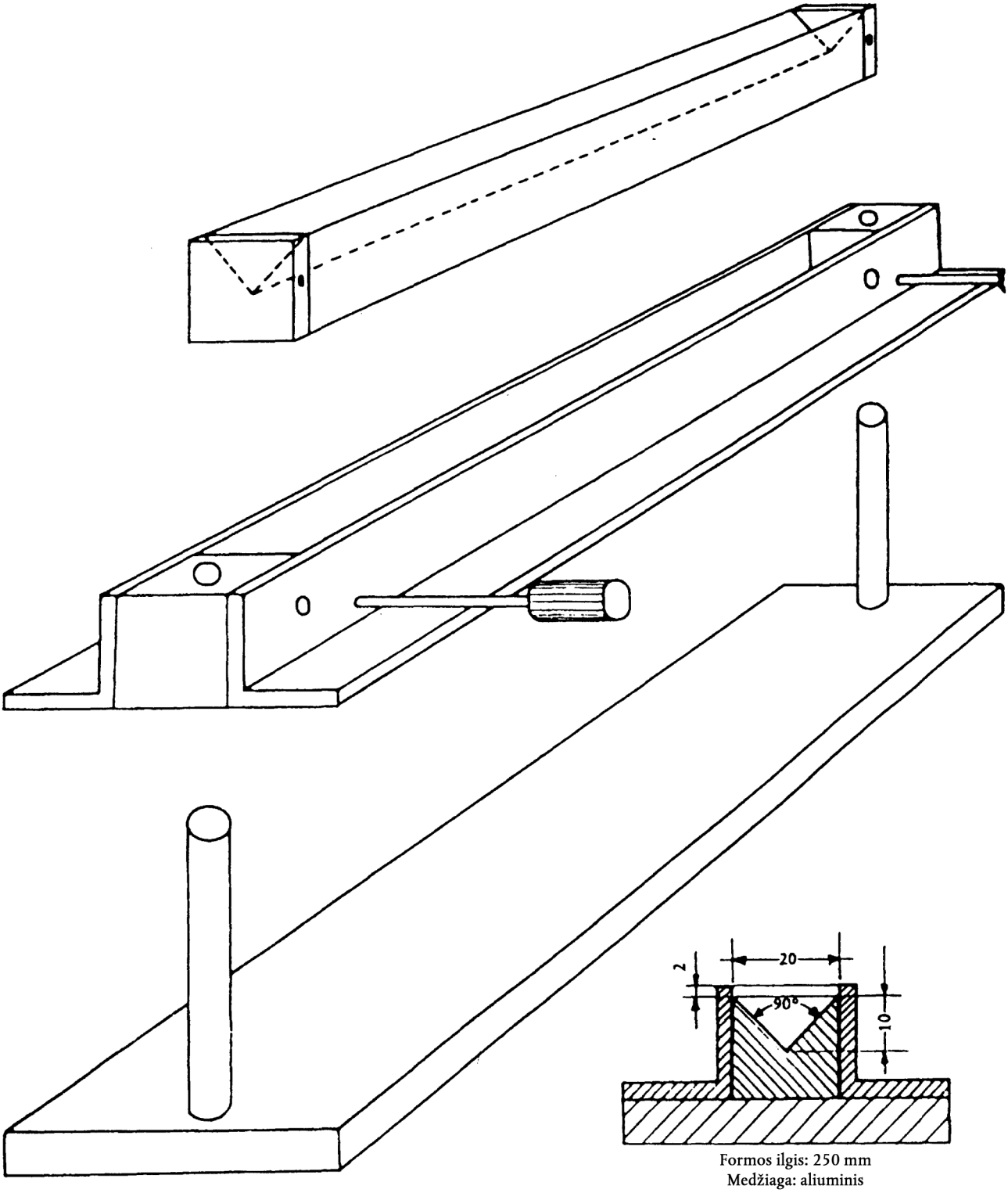
(1) NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Priedėlis

Paveikslas

Krūvelei ruošti naudojama forma ir priedai

(visi matmenys milimetrais)



Formos ilgis: 250 mm
Medžiaga: aliuminis

B DALIS: TOKSIŠKUMO NUSTATYMO METODAI

BENDRASIS ĮVADAS: B DALIS

A. ĮVADAS

Žr. bendrąjį įvadą.

B. APIBRĖŽIMAI

i) **Ūminis toksiškumas** apima nepageidaujamus poveikius, pasireiškiančius per nustatytą laiką (paprastai 14 dienų) įvedus vieną medžiagos dozę.

ii) **LD_{50}** (medianinė mirtina dozė) – tai statistiškai apskaičiuojama viena medžiagos dozė, kai manoma, kad ji gali būti žūties priežastimi 50 % dozę gavusių gyvūnų. LD_{50} vertė yra išreiškiama tiriamosios medžiagos svorio ir tiriamo gyvūno svorio vieneto (miligramai vienam kilogramui) santykiu.

iii) **LC_{50}** (medianinė mirtina koncentracija) – tai statistiškai apskaičiuojama medžiagos koncentracija, kai manoma, kad ji gali būti žūties priežastimi poveikio metu arba per nustatytą laiką po poveikio 50 % dozę gavusių gyvūnų. LC_{50} vertė yra išreiškiama tiriamosios medžiagos svorio ir standartinio oro tūrio santykiu (miligramai litre).

iv) **Neigiamo poveikio nesukelianti dozė** – tai maksimali dozė arba poveikis, naudojamas bandyme, sukeliantis toksiškumo požymius, kurių negalima aptikti.

v) **Poūmis/apylėtis toksiškumas** apima nepageidaujamus poveikius, pasireiškiančius eksperimentiniams gyvūnams dėl kartotinos kasdieninės chemikalo dozės arba poveikio trumpą jų gyvenimo laikotarpį.

vi) **Maksimali toleruojama dozė** (MTD) – tai didžiausia dozė, sukelianti toksiškumo požymius gyvūnams, kuri neturi didesnio poveikio išlikimui, atsižvelgiant į bandymą, kuriam ji yra naudojama.

vii) **Odos dirginimas** – tai grįžtamųjų uždegiminių pokyčių odoje sukėlimas, paveikus tiriamąja medžiaga.

viii) **Akių dirginimas** – tai grįžtamųjų pokyčių akyje sukėlimas, paveikus tiriamąja medžiaga priekinį akies paviršių.

ix) **Odos jautrinimas** (sensibilizavimas) (alerginis kontaktinis dermatitas) – tai imuniniu būdu pakeista odos reakcija į medžiagą.

Specialūs inhaliacinio toksiškumo sąvokų apibrėžimai

— **aerozolis** apibrėžiamas kaip dalelės (kietosios ir(arba) skystosios), tolygiai išsisklaidžiusios ore,

— **aerodinaminis skersmuo** – tai vienetinio tankio sferos skersmuo ($1 g/cm^{-3}$), kurios galutinis stabilizacijos greitis toks pat kaip nagrinėjamosios dalelės,

— **masės medianinis aerodinaminis skersmuo** (MMAD) – tai apskaičiuotas aerodinaminis skersmuo, dalijantis aerozolio pasiskirstymą pusiau, kai matuojama mase,

— **geometrinis standartinis nuokrypis** (GSD) – tai įvertintų 84 procentilių ir 50 procentilių santykis, kuris nurodo kumuliacinių dalelių dydžio pasiskirstymo kreivės statumą, tariant, kad dalelių pasiskirstymas log normalus.

Specialūs fiksuotųjų dozių darbo eigos sąvokų apibrėžimai, nustatant ūmų oralinį toksiškumą

— **Aiškus toksiškumas** nurodo toksišką poveikį, matomą įvedus tiriamosios medžiagos, kurio stiprumas yra toks, kad kitos didesnės dozės įvedimas galėtų būti žūties priežastimi,

— **Diskriminacinė dozė** – tai didžiausia iš keturių fiksuotų dozių, kuri gali būti įvedama nesukeliant mirštamumo dėl cheminio junginio (taip pat ir humaniškas nužudymas).

C. MUTAGENIŠKUMAS (taip pat kancerogeniškumo pirminės atrankos bandymas)

Išankstiniam galimo medžiagos mutageniškumo įvertinimui reikia gauti informacijos apie dvi galutinio tikslo kategorijas, būtent, genų mutaciją ir chromosomų aberacijas.

Šie du galutiniai tiksliai yra įvertinami šiais bandymais:

i) Bandymai, sukeliantys geno (taško) mutacijas prokarioto ląstelėse, pavyzdžiui, *Salmonella typhimurium;* taip pat priimtini bandymai, naudojant *Escherichia coli*. Vieno iš šių dviejų organizmų pasirinkimą gali nulemti svarbiausios chemikalo, kuris turi būti bandomas, savybės.

ii) Bandymai, sukeliantys *in vitro* išaugintų žinduolių ląstelių chromosomų aberacijas; taip pat priimtinas ir *in vivo* metodas (kaulų čiulpų ląstelių mikrobranduolinis bandymas arba metafazinė analizė). Tačiau jeigu nėra kontraindikacijų, tinkamiausi laikomi *in vitro* metodai.

D. DUOMENŲ VERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Rezultatų, gautų bandymus atliekant su gyvūnais ir *in vitro*, ekstrapoliavimui tiesiogiai žmogui yra taikomi tam tikri apribojimai ir į tai turi būti atsižvelgiama, kaip vertinami ir aiškinami bandymo rezultatai.

Įrodymai (jei juos įmanoma gauti) apie žmogui sukeliamus poveikius, gali būti pagrindas nustatant cheminių medžiagų galimą poveikį žmonėms..

E. LITERATŪRA

Toksikologija – tai besivystanti eksperimentinė mokslo šaka, ir kiekvienu klausimu apstu literatūros. Svarbios informacijos galima rasti OECD Test Guidelines.

Papildomos pastabos

Gyvūnų priežiūra

Toksiškumo bandymuose labai svarbu griežta aplinkosaugos sąlygų ir tinkamos gyvūnų priežiūros kontrolė.

i) Laikymo sąlygos

Aplinkos sąlygos eksperimentinių gyvūnų patalpose arba aptvaruose turėtų būti tinkamos bandomai rūšiai. Žiurkėms, pelėms ir jūrų kiaulytėms tinkamos sąlygos yra tos, kai kambario temperatūra 22 ± 3ºC, santykinė drėgmė – nuo 30 iki 70 %; triušiams temperatūra turėtų būti 20 ± 3ºC, santykinė drėgmė – nuo 30 iki 70 %.

Tam tikros rūšies eksperimentinė technika yra ypač jautri temperatūros poveikiams, ir tokiais atvejais į bandymo metodo aprašymą įtraukiamas išsamus atitinkamų sąlygų apibūdinimas. Visuose toksiškumo poveikių tyrimuose temperatūra ir drėgnumas turėtų būti stebimi, registruojami ir įtraukiami į galutinę bandymo ataskaitą.

Jeigu šviesa yra dirbtinė, ji paprastai turėtų būti įjungiama tokia tvarka: 12 valandų šviesos, 12 valandų tamsos. Išsamus šviesos režimo apibūdinimas turėtų būti užregistruotas ir įtraukiamas į galutinę bandymo ataskaitą.

Bandymų su gyvūnais ataskaitoje yra svarbu nurodyti naudotų narvelių rūšį ir kiekviename narvelyje gyvenančių gyvūnų skaičių tiek poveikio cheminėmis medžiagomis metu, tiek ir po to einančiu stebėjimo laikotarpiu.

ii) Šėrimo sąlygos

Šėrimas turėtų atitikti visus mitybos reikalavimus bandomai gyvūnų rūšiai. Jeigu tiriamosios medžiagos yra įvedamos gyvūnams kartu su pašaru, maistinė vertė gali būti sumažinama suderinant medžiagą ir sudėtines pašaro dalis.

Į tokios reakcijos galimybę turėtų būti atsižvelgiama nagrinėjant bandymo rezultatus.

Pašare esančių teršalų, kurie žinomi galintys turėti įtakos toksiškumui, koncentracijos neturėtų būti interferencinės.

Gyvūnų gerovė

Detalizuojant bandymo metodus tinkamas dėmesys buvo skiriamas gyvūnų gerovei. Toliau trumpai pateikiami keli pavyzdžiai, šis sąrašas nėra išsamus. Metodų aprašyme turėtų būti pateikiamos tikslios formuluotės ir(arba) sąlygos

— Ūmaus oralinio toksiškumo nustatymui taikomas alternatyvus metodas „fiksuotų dozių procedūra“. Taikant šią procedūrą žūtis nėra specialus galutinis tikslas. Šiam metodui reikia mažesnio gyvūnų skaičiaus ir sukeliama mažiau skausmo ir kančios negu atliekant klasikinį ūmaus oralinio toksiškumo nustatymą.

— Naudotų gyvūnų skaičius sumažinamas iki moksliškai priimtino minimumo: B.1 ir B.3 metodais tik penki tos pačios lyties gyvūnai tiriami viena doze; tik 10 gyvūnų (ir tik 5 neigiamai kontrolinei grupei) naudojami nustatant odos jautrinimą (sensibilizavimą) vykdant jūrų kiaulyčių maksimizacijos bandymą (B.6 metodas); gyvūnų, reikalingų teigiamai kontrolei, kai mutageniškumas bandomas *in vivo*, skaičius taip pat sumažinamas (B.11 ir B.12 metodai).

— Gyvūnų kenčiamas skausmas ir kančios bandymų metu yra mažinami iki minimumo: gyvūnus, turinčius stiprius ir ilgalaikius kančios ir skausmo požymius, reikia humaniškai nužudyti; tiriamųjų medžiagų dozavimo bandymai neturėtų būti atliekami su medžiagomis, kurios žinomos kaip galinčios sukelti skausmą ir kančias dėl jų ėsdinančių (ardančių) arba dirginančių savybių (B.1, B.2 ir B.3 metodai).

— Bandymų naudojant netinkamai dideles dozes, išvengiama atliekant ribinius bandymus ne tik ūminio toksiškumo bandymuose (B.1, B.2 ir B.3 metodai), bet taip pat ir mutageniškumo bandymuose *in vivo* (B.11 ir B.12 metodai).

— Dirginimo bandymų strategija dabar sudaro galimybes nevykdyti bandymo arba jį atlikti tik su vienu gyvūnu, jeigu galima pateikti pakankamai mokslinių įrodymų.

Tokie moksliniai įrodymai gali būti pagrindžiami medžiagos fizikinėmis cheminėmis savybėmis, jau atliktų bandymų rezultatais arba gerai pagrįstais bandymų *in vitro* rezultatais. Pavyzdžiui, jeigu ūminio toksiškumo bandymas per odą buvo atliktas taikant medžiagos ribinę dozę (B.3 metodas) ir nebuvo nustatyta odos sudirginimo, gali nebereikėti toliau tirti odos dirginimo (B.4 metodas); medžiagos, pasižymėjusios akivaizdžiu ardymu (ėdamumu) arba stipriu odos sudirginimu atliekant odos dirginimo bandymą (B.4 metodas), neturėtų būti toliau bandomos akių dirginimo bandymais (B.5 metodas).

B.1. ŪMINIS TOKSIŠKUMAS (ORALINIS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrąją įvadinę B (A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAI

Žr. bendrąją įvadinę B (B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Tiriamoji medžiaga skiriama vartoti per burną ją įvedant zondu pamatuotomis dozėmis kelioms eksperimentinių gyvūnų grupėms, viena dozė – vienai grupei. Dozių pasirinkimas gali būti pagrindžiamas eksponometrinio bandymo rezultatais. Vėliau renkami duomenys apie poveikį ir nugaišimo atvejus. Gyvūnams, nugaišusiems bandymo metu, yra atliekama autopsija, ir užbaigus bandymą, atliekama likusių gyvų gyvūnų autopsija. Pirmiausia šis metodas yra tiesiogiai skiriamas bandymams su graužikais.

Gyvūnus, kurie turi aiškių ir ilgalaikių kančios ir skausmo požymių, reikia humaniškai nužudyti. Jeigu žinoma, kad dėl medžiagų, naudojamų dozavimo bandymuose, gali kilti skausmas ir kančia dėl jų ardančių (ėsdinančių) arba dirginančių savybių, tokie bandymai neturėtų būti atliekami.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Gyvūnai yra laikomi eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki bandymo pradžios. Prieš bandymą sveiki jauni suaugę gyvūnai yra randomizuojami ir paskiriami į poveikio grupes. Jeigu reikia, mėginys ištirpinamas arba suspenduojamas atitinkamame tirpiklyje. Rekomenduojama, jeigu tik įmanoma, pirmiausia naudoti vandeninį tirpalą, po to augalinio aliejaus tirpalą, po to ištirpinant bet kokiame tirpiklyje arba suspensijoje. Jeigu tai nevandeniniai tirpikliai, turėtų būti žinomos atitinkamos tirpiklio toksiškumo charakteristikos arba jos turėtų būti nustatomos prieš bandymą arba jo metu. Graužikams paprastai šis tūris neturėtų viršyti 10 ml/kg kūno svorio, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių gali būti naudojama 20 ml/kg. Bandomo tūrio įvairavimas turėtų būti mažinamas koreguojant koncentraciją, kad būtų užtikrinamas pastovus visų dozių tūris.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Jeigu nėra kontraindikacijų, pirmenybė atiduodama žiurkėms.

Turėtų būti pasirenkamos plačiai naudojamos laboratorinės gyvūnų rūšys. Bandymo pradžioje kiekvienos lyties naudotų gyvūnų svorio pokyčio įvairavimas neturėtų viršyti ± 20 % atitinkamo vidutinio svorio.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienai dozei yra naudojama ne mažiau kaip septyni graužikai. Jie visi turėtų būti tos pačios lyties. Patelės turi būti neturėjusios jauniklių arba nevaikingos. Turint informacijos, kad kuri nors lytis yra daug jautresnė, dozė turėtų būti skiriama tai lyčiai.

Pastaba: Atliekant ūminio toksiškumo bandymus su aukštesniaisiais negu graužikai gyvūnais, turėtų būti apsvarstoma galimybė naudoti mažesnį jų skaičių.

Dozės turėtų būti atidžiai renkamos, ir reikėtų dėti visas pastangas neviršyti vidutiniškai toksiškų dozių. Tokiuose bandymuose turėtų būti vengiama įvesti mirtinas tiriamosios medžiagos dozes.

1.6.2.3. *Dozės*

Jų turėtų būti pakankamai, ne mažiau kaip trys, ir atitinkamai paskirstytų, kad susidarytų tiriamosios grupės, turinčios atitinkamą toksiško poveikio intervalą ir mirštamumo procentą. Duomenų turėtų būti tiek, kad būtų galima sudaryti dozės ir reakcijos kreivę ir, jeigu įmanoma, galima būtų nustatyti LD_{50}.

1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu naudojami graužikai, ribinis bandymas skiriant vieną dozę, ne mažesnę kaip 2 000 mg/kg kūno svorio, gali būti atliekamas penkių patinėlių ir penkių patelių grupei pagal pirmiau apibūdintą darbo eigą. Jeigu cheminis junginys yra nugaišimo priežastis, reikėtų apsvarstyti, ar nereikėtų atlikti išsamų bandymą.

1.6.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpis turėtų būti ne trumpesnis kaip 14 dienų. Tačiau stebėjimų trukmė neturėtų būti griežtai nustatoma. Ji turėtų būti nustatoma pagal toksines reakcijas, jų pasireiškimo dažnumą ir sveikimo trukmę; todėl ji gali būti pailginama, jeigu laikoma, kad tai reikalinga. Svarbu yra laikas, per kurį toksiškumo požymiai atsiranda ir išnyksta, taip pat nugaišimo laikas, ypač jeigu yra tendencija, kad žūtis ištinka vėliau.

1.6.3. **Darbo eiga**

Gyvūnams prieš įvedant į organizmą medžiagą neturėtų būti duodama pašaro. Žiurkėms pašaro turėtų būti neduodama nakčiai; gyvūnams, kurių metabolizmas yra didesnis, paskiriamas trumpesnis laikotarpis be pašaro; vandens kiekis neribojamas. Kitą dieną gyvūnai turėtų būti sveriami ir tada viena dozė tiriamosios medžiagos per virškinimo traktą įvedama zondu. Jeigu vienos dozės įvesti neįmanoma, dozė gali būti duodama mažesnėmis dalimis per laiką, kuris neviršija 24 valandų. Įvedus medžiagą, pašaro gali būti neduodama dar tris ar keturias valandas. Jeigu dozė įvedama dalimis per tam tikrą laikotarpį, gali reikėti gyvūnams duoti pašaro ir vandens, atsižvelgiant į to laikotarpio trukmę.

Įvedus medžiagą, atliekami ir metodiškai užrašomi stebėjimai, užrašomi duomenys apie kiekvieną atskirą gyvūną. Pirmą dieną stebėjimai turėtų būti vykdomi dažnai.

Kruopštus klinikinis tyrimas turėtų būti atliekamas ne rečiau kaip vieną kartą kiekvieną darbo dieną, kiti stebėjimai turėtų būti atliekami kiekvieną dieną, imantis atitinkamų veiksmų, dėl kurių dėl bandymo prarandamų gyvūnų skaičius būtų mažesnis, pvz., rastų negyvų gyvūnų autopsija ir silpnų arba gaištančių gyvūnų izoliavimas arba nužudymas. Turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimai, taip pat respiratorinės, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų ir somatomotorinės veiklos ir elgsenos pasikeitimai. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tremorų, konvulsijų, salivacijos, diarėjos, letargo, miego ir komos stebėjimams. Nugaišimo laikas turėtų būti užrašomas kaip galima tiksliau.

Gyvūnams, kurie nugaišo bandymo metu ir kurie išliko gyvi dėl bandymo nutraukimo, yra atliekama autopsija. Visi dideli patologiniai pokyčiai turėtų būti registruojami. Jeigu nurodyta, turėtų būti paimami audiniai histopatologiniam ištyrimui.

Priešingos lyties toksiškumo įvertinimas

Užbaigus bandymą su viena lytimi, ne mažesnei kaip penkių priešingos lyties gyvūnų grupei įvedama dozė, kad būtų nustatyta, ar šios lyties gyvūnai yra daug jautresni tiriamajai medžiagai. Tai, kad naudojamas mažesnis kiekis gyvūnų, gali būti pagrindžiama individualiomis aplinkybėmis. Jeigu galima gauti pakankamai informacijos įrodyti, kad tiriamos lyties gyvūnai yra daug jautresni, galima apsieiti be priešingos lyties gyvūnų bandymo.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai tiriamai grupei nurodant gyvūnų skaičių bandymo pradžioje, kiekvieno gyvūno nugaišimo laiką, gyvūnų, turinčių kitokius toksiškumo požymius, skaičių, pateikiant toksiško poveikio ir autopsijos rezultatų aprašymą. Turėtų būti nustatomas kiekvieno gyvūno svoris ir užregistruojamas prieš pat įvedant tiriamąją medžiagą, po to kas savaitę ir nugaišimo metu. Turėtų būti apskaičiuojami ir užregistruojami svorio pasikeitimai, jeigu išgyvenama ilgiau negu vieną dieną. Gyvūnai, kurie humaniškai nužudomi dėl cheminio junginio sukeliamų kančių ir skausmo, yra užregistruojami kaip nugaišimo atvejai, kurių priežastis – cheminis junginys. LD_{50} gali būti nustatomas pripažintu metodu. Į duomenų vertinimą turėtų įeiti sąryšis, jeigu toks yra, tarp gyvūnų, paveiktų tiriamąja medžiaga, ir visų specifinių rodiklių dažnumo ir stiprumo, taip pat ir elgsenos bei klinikinių parodymų, didesnių audinių pakitimų, kūno svorio pasikeitimų, žūties ir kitų toksikologinių poveikių.

3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašarai ir pan.

— bandymo sąlygos,

— dozės (nurodant tirpiklį, jeigu naudojamas, ir koncentraciją),

— gyvūnų, kuriems įvestos dozės, lytis,

— duomenų lentelės pagal lytį ir dozes (t. y. nugaišusių ar bandymo metu nužudytų gyvūnų skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, paveiktų gyvūnų skaičius),

— nugaišimo laikas įvedus dozę, priežastys ir kriterijai, kuriais naudotasi humaniškai nužudant gyvūnus,

— visi pastebėjimai,

— dalyvavusiai visame bandyme lyčiai – LD_{50} vertė, kuri nustatyta per 14 dienų (nurodant tiksliai apibrėžtą nustatymo metodą),

— LD_{50} 95 % pasikliautinasis intervalas (tais atvejais, kai gali būti pateikta),

— dozės ir mirštamumo kreivė ir statumas (jeigu įmanoma nustatyti pagal nustatymo metodą),

— autopsijos duomenys,

— visi histopatologiniai duomenys,

— bet kurio bandymo su priešinga lytimi rezultatai,

— rezultatų aptarimas (ypatingas dėmesys turėtų būti atkreipiamas į tai, kokį poveikį apskaičiuojamai LD_{50} vertei gali turėti humaniškas gyvūnų nužudymas bandymo metu),

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. LITERATŪRA

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

B.1 DAR KARTĄ ŪMINIS TOKSIŠKUMAS (ORALINIS) – FIKSUOTŲ DOZIŲ METODAS

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAI

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Ūmaus oralinio toksiškumo bandymas pateikia informaciją apie nepageidaujamus poveikius, kurie, prarijus vieną tiriamos medžiagos dozę, gali atsirasti per trumpą laikotarpį.

Fiksuotų dozių metodas taikomas dviem etapais.

Atliekant pirminio stebėjimo bandymą įvairios dozės, įvestos į virškinamąjį traktą zondu pavieniams vienos lyties gyvūnams, yra tyrinėjamos nuosekliai. Stebėjimo metu gaunama informacija apie dozės ir toksiškumo sąryšį, taip pat mažiausios mirtinos dozės apskaičiavimą. Paprastai šiame pirmajame etape naudojami ne daugiau negu penki gyvūnai.

Pagrindinio bandymo metu viena iš anksto nustatyta medžiagos dozė (5, 50, 500 arba 2 000 mg/kg) įvedama zondu į virškinamąjį traktą penkių patinėlių ir penkių patelių grupėms. Dozė nustatoma stebėjimo bandymu ir yra tokia, kuri, manoma, gali sukelti „aiškų toksiškumą“ (žr. 1.2. Apibrėžimai), bet ne žūtį.

Įvedus medžiagą, stebimas jos sukeliamas poveikis.

Jeigu pirminė pasirinkta dozė sukelia aiškų toksiškumą, bet ne žūtį dėl cheminio junginio, tolesnis bandymas nereikalingas.

Jeigu pasirinktoji dozė nesukelia aiškaus toksiškumo, medžiaga turėtų būti dar kartą ištiriama naudojant didesnę dozę. Jeigu gyvūnai nugaišta arba jeigu dėl stiprios toksinės reakcijos gyvūnus reikia humaniškai nužudyti, medžiaga turėtų būti dar kartą ištiriama naudojant mažesnę dozę.

Tokia darbo eiga leidžia nustatyti „diskriminacinę dozę“ (žr. 1.2. Apibrėžimai), tai yra didžiausią iš anksto nustatytą dozę, kuri gali būti įvedama, nesukeldama žūties (įskaitant humanišką nužudymą).

Gyvūnus, kurie turi aiškių ir ilgalaikių kančios ir skausmo požymių, reikia humaniškai nužudyti. Jeigu žinoma, kad dėl medžiagų, naudojamų dozavimo bandymuose, gali kilti skausmas ir kančia dėl jų ardančių (ėsdinančių) arba dirginančių savybių, tokie bandymai neturėtų būti atliekami.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

1.6.1.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Jeigu nėra kontraindikacijų, pirmenybė atiduodama žiurkėms.

Pasirenkamos plačiai naudojamos laboratorinės veislės. Kiekvienai lyčiai bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio įvairovė neturėtų viršyti ± 20 % atitinkamo vidutinio svorio.

Gyvūnai yra laikomi eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki bandymo. Prieš bandymą sveiki jauni suaugę gyvūnai randomizuojami ir paskiriami į stebėjimo ir į pagrindinio bandymo poveikio grupes. Praktiškai pagrindiniam bandymui gali būti reikalinga tik viena kiekvienos lyties grupė.

1.6.1.2. *Dozių paruošimas ir įvedimas*

Jeigu reikia, tiriamoji medžiaga yra ištirpinama arba suspenduojama atitinkamame tirpiklyje. Rekomenduojama, jeigu įmanoma, pirma apsvarstyti galimybę įvesti vandeninį tirpalą, po to išnagrinėjant galimybę įvesti aliejinį tirpalą, po to tirpalą su kitais tirpikliais arba suspensiją. Jeigu naudojami nevandeniniai tirpikliai, turėtų būti žinomos atitinkamos tirpiklio toksiškumo charakteristikos arba jos turėtų būti nustatomos prieš bandymą ar jo metu. Graužikams paprastai tas tūris neturėtų viršyti 10 ml/kg kūno svorio, išskyrus vandeninius tirpalus, kada gali būti naudojama 20 ml/kg. Tiriamojo tūrio įvairavimas turėtų būti sumažinamas nustatant koncentraciją, kad būtų užtikrinamas pastovus kiekvienos dozės tūris.

Prieš įvedant medžiagą gyvūnams neturi būti duodama pašaro. Žiurkėms pašaro neduodama nakčiai; vandens kiekis neribojamas. Kitą dieną gyvūnai turėtų būti sveriami, ir po to į virškinimo traktą zondu įvedama viena dozė medžiagos. Jeigu vienkartinės dozės neįmanoma įvesti, dozė gali būti duodama mažesnėmis dalimis per laikotarpį, neviršijantį 24 valandų. Įvedus medžiagą, pašaro negalima duoti nuo trijų iki keturių valandų. Jeigu dozė įvedama dalimis per tam tikrą laikotarpį, gali būti reikalinga gyvūnams duoti pašaro ir vandens, atsižvelgiant į to laikotarpio trukmę.

1.6.2. **Darbo eiga**

1.6.2.1. *Stebėjimo bandymas*

Tiriamas įvairių dozių poveikis atskiriems gyvūnams. Paprastai naudojamos patelės, jeigu nėra informacijos, kad patinėliai yra jautresnė lytis. Dozuojama nuosekliai, prieš įvedant dozę kitam gyvūnui daromas 24 valandų intervalas. Visi gyvūnai atidžiai stebimi, ar nepasireikš toksiškumo požymiai ne trumpiau kaip septynias dienas; jeigu per septynias dienas išlieka vidutiniškas toksiškumas, gyvūnai turėtų būti stebimi papildomas septynias dienas. Nagrinėjamos tokios pradinės dozės: 5, 50, 500 ir 2 000 mg/kg. Jeigu pirmoji pasirinkta dozė nesukelia stipraus toksiškumo, o kita didesnė dozė sukelia žūtį, tuomet atitinkamais atvejais būtina ištirti vieną arba kelias tarpines dozes. Tokiu būdu turėtų būti įmanoma surinkti informaciją apie dozę(-es), sukeliančią(-ias) tam tikrus toksiškumo požymius, ir mažiausias dozes, sukeliančias žūtį.

Ypač dėmesingai reikia parinkti pradinę dozę, naudojant duomenis apie panašius atitinkamus chemikalus. Jeigu tokios informacijos nėra, pirmiausia siūloma naudoti 500 mg/kg dozę. Jeigu dėl pradinės dozės neatsiranda jokių toksiškumo požymių, tiriama imant kitą, didesnę dozę. Jeigu įvedus 2 000 mg/kg nėra nugaišimo atvejų, stebėjimo bandymas laikomas baigtu, ir pagrindinis bandymas turėtų būti vykdomas naudojant šią dozę. Jeigu stiprus poveikis, dėl kurio reikia humaniškai nužudyti, atsiranda įvedus pradinę dozę (pvz., 500 mg/kg), kitam gyvūnui yra duodama mažesnė dozė. Jeigu šis gyvūnas lieka gyvas, kitiems gyvūnams gali būti įvedamos atitinkamos tarpinės dozės tarp fiksuotų dozių. Paprastai dirbama su ne daugiau kaip penkiais gyvūnais.

1.6.2.2. *Pagrindinis bandymas*

Kiekviena tiriama dozė leidžiama ne mažiau 10 gyvūnų (penki patinėliai ir penkios patelės). Patelės turėtų būti neturėjusios jauniklių ir nevaikingos.

Fiksuotų dozių metodo principas yra tas, kad pagrindiniam bandymui naudojamos tik vidutinio toksiškumo dozės. Turėtų būti vengiama įvesti mirtinas tiriamosios medžiagos dozes.

Bandymui parenkama viena naudotina dozė iš keturių fiksuotų dozių, t. y. 5, 50, 500 arba 2 000 mg/kg kūno svorio. Pasirinktoji pradinė dozė turėtų būti tokia, kad ji galėtų sukelti aiškų toksiškumą, bet ne žūties atvejus dėl cheminio junginio (taip pat ir humaniškus nužudymus; atsitiktinės žūtys neįtraukiamos, bet jas reikėtų užregistruoti). Tolesnių tyrimų nebūtina atlikti, jeigu ši dozė sukelia aiškų toksiškumą, bet ne žūties atvejus, susijusius su cheminiu junginiu.

Jeigu aiškus toksiškumas nepasireiškia įvedus pasirinktą dozę, ta medžiaga turėtų būti dar kartą tiriama dar viena, didesne doze. Tačiau gyvūnai turėtų būti toliau stebimi, kol pasibaigs stebėjimo laikotarpis. Jeigu dėl stipraus toksiškumo arba nugaišimo atvejų, susijusių su cheminiu junginiu, gyvūnus reikia humaniškai nužudyti, medžiaga turėtų būti dar kartą tiriama kita, mažesne doze. Tačiau gyvūnai, kurių nereikia humaniškai nužudyti, turėtų būti stebimi visą stebėjimo laiką.

Įvedus dozę, atliekami stebėjimai, kurie sistemingai užrašomi. Apie kiekvieną gyvūną turi būti daromi atskiri įrašai.

Stebėjimo laikotarpis turėtų būti ne trumpesnis kaip 14 dienų. Tačiau stebėjimų trukmė neturėtų būti griežtai nustatoma. Ji turėtų būti nustatoma pagal toksines reakcijas, jų pasireiškimo dažnumą ir sveikimo laikotarpio trukmę; todėl jis gali būti pratęsiamas, jeigu tai laikoma reikalinga. Svarbus yra laikas, kada toksiškumas atsiranda ir išnyksta, taip pat nugaišimo laikas, ypač jeigu yra tendencija toksiškumo požymiams pasireikšti vėliau.

Kruopštus klinikinis tyrimas turėtų būti atliekamas ne rečiau kaip du kartus dozės įvedimo dieną ir po to ne rečiau kaip vieną kartą kiekvieną darbo dieną. Gyvūnai, turintys akivaizdžių skausmo ir kančios požymių, turėtų būti humaniškai nužudomi. Bus reikalingi papildomi stebėjimai kelias pirmąsias dienas įvedus dozę, jeigu išlieka toksiškumo požymiai. Bandymas gali būti nutraukiamas, jeigu tampa aišku, kad pasirinktoji dozė buvo per didelė.

Stebimi odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimai, taip pat respiratorinės, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų ir somatomotorinės veiklos ir elgsenos pasikeitimai. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tremorų, konvulsijų, salivacijos, diarėjos, letargo, miego ir komos stebėjimams.

Individualus gyvūnų svoris turėtų būti nustatomas prieš pat tiriamosios medžiagos įvedimą, kiekvieną dieną tris dienas iš eilės ir po to dar kartą per savaitę. Gyvūnams, kurie žuvo bandymo metu ir išliko gyvi iki bandymo pabaigos, yra atliekama autopsija. Visi dideli patologiniai pokyčiai turėtų būti registruojami. Jeigu nurodyta, turėtų būti paimami audiniai histopatologiniam ištyrimui.

Gali prireikti ištirti antrą, o išimtinais atvejais ir trečią dozę, tai priklauso nuo rezultatų, gautų naudojant ankstesnę dozę.

Tais atvejais, jei medžiaga yra mirtina, kai dozė lygi 5 mg/kg kūno svorio (arba jeigu stebėjimo bandymas parodė, kad tokia dozė bus mirtina), gali tekti toliau tyrinėti ūmų medžiagos toksiškumą.

2. DUOMENYS

Stebėjimo bandymo pagrindinio bandymo duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai tyrinėtai dozei nurodant gyvūnų skaičių bandymo pradžioje; toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičių; skaičių gyvūnų, rastų nugaišusių bandymo metu, arba humaniškai nužudytų; pateikiamas toksiškumo poveikio apibūdinimas, o atliekant pagrindinį bandymą – ar buvo nustatytas aiškus toksiškumas dėl cheminio junginio poveikio; toksiško poveikio eiga; ir autopsijos rezultatai. Turėtų būti apskaičiuojamas ir registruojamas svorio pasikeitimas, jeigu išgyvenama ilgiau negu vieną dieną.

Gyvūnai, kurie yra humaniškai nužudomi dėl cheminio junginio sukelto skausmo ir kančios, yra registruojami kaip su cheminiu junginiu susiję nugaišimo atvejai.

3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, atitinkamais atvejais pateikiama tokia informacija apie stebėjimo bandymą ir pagrindinį bandymą:

— rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašarai ir pan.,

— bandymo sąlygos,

— dozės (nurodant tirpiklį, jeigu naudojamas, ir koncentraciją),

— išsamūs duomenys apie visas tirtas dozes,

— duomenų apie reakciją lentelės pagal lytį ir dozes (t. y. naudotų gyvūnų skaičius; kūno svorio pasikeitimai; jei tokių yra, gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo nužudyti bandymo metu, skaičius; toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius; poveikio pobūdis, stiprumas ir trukmė),

— toksiškumo požymių pasireiškimo eiga ir nurodant, ar tai buvo grįžtamieji poveikiai,

— jei gyvūnai nugaišo arba buvo nužudyti, nugaišimo laikas po dozės įvedimo, priežastys ir kriterijai, kuriais naudotasi gyvūnus humaniškai nužudant,

— autopsijos duomenys,

— visi histopatologiniai duomenys,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas, atsižvelgiant į aiškaus toksiškumo požymius ir diskriminacinę dozę, nustatytą bandymo metu.

3.2. DUOMENŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

DOZĖ	REZULTATAI	PAAIŠKINIMAS
5 mg/kg kūno svorio	Mažiau kaip 100 % liko gyvi	LABAI TOKSIŠKI cheminiai junginiai
	100 % liko gyvi; bet yra aiškus toksiškumas	TOKSIŠKI junginiai
	100 % liko gyvi; aiškaus toksiškumo nėra	Žr. rezultatus, kai 50 mg/kg
50 mg/kg kūno svorio	Mažiau kaip 100 % liko gyvi	Cheminiai junginiai, kurie gali būti TOKSIŠKI arba LABAI TOKSIŠKI. Žr. rezultatus, kai 5 mg/kg
	100 % liko gyvi; bet yra aiškus toksiškumas	PAVOJINGI cheminiai junginiai
	100 % liko gyvi; aiškaus toksiškumo nėra	Žr. rezultatus, kai 500 mg/kg
500 mg/kg kūno svorio	Mažiau kaip 100 % liko gyvi	Cheminiai junginiai, kurie gali būti TOKSIŠKI arba PAVOJINGI. Žr. rezultatus, kai 50 mg/kg
	100 % liko gyvi; bet yra aiškus toksiškumas	Cheminiai junginiai yra laikomi neturintys didelio aiškaus toksiškumo
	100 % liko gyvi; aiškaus toksiškumo nėra	Žr. rezultatus, kai 2 000 mg/kg
2 000 mg/kg kūno svorio	Mažiau kaip 100 % liko gyvi	Žr. rezultatus, kai 500 mg/kg
	100 % liko gyvi; bet yra aiškus toksiškumas	Cheminiai junginiai neturi didelio aiškaus toksiškumo

Taip pat žiūrėti bendrą įvadinę B(D)dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrą įvadinę B(E) dalį.

B.2. ŪMINIS TOKSIŠKUMAS (INHALIACINIS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Naudinga turėti išankstinę informaciją apie medžiagos dalelių dydžio pasiskirstymą, garų slėgį, lydymosi temperatūrą, virimo temperatūrą, pliūpsnio temperatūrą ir sprogumą (jeigu tinka).

Taip pat žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAI

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Kelios eksperimentinių gyvūnų grupės yra veikiamos tiriamąja medžiaga apibrėžtą laikotarpį tam tikra tvarka suskirstytomis koncentracijomis, viena koncentracija naudojama vienai grupei. Po to atliekami poveikio ir žūties atvejų stebėjimai. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama autopsija, o užbaigus bandymą – likusiems gyviems gyvūnams atliekama autopsija.

Gyvūnus, kurie turi aiškių ir ilgalaikių kančios ir skausmo požymių, reikia humaniškai nužudyti. Jeigu žinoma, kad dėl medžiagų, naudojamų dozavimo bandymuose, gali kilti skausmas ir kančia dėl jų ardančių (ėsdinančių) arba dirginančių savybių, tokie bandymai neturėtų būti atliekami.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Gyvūnai laikomi eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki eksperimento. Prieš bandymą sveiki jauni gyvūnai yra randomizuojami ir suskirstomi į reikalingą grupių skaičių. Jie neturi patirti dirbtinai sukurto poveikio, išskyrus atvejus, jei tai daryti rekomenduojama dėl tam tikro poveikio aparato tipo.

Kietąsias tiriamas medžiagas gali tekti mikronizuoti, kad būtų gaunamos atitinkamo dydžio dalelės.

Prireikus į tiriamąją medžiagą gali būti dedama atitinkamo tirpiklio, kad būtų gaunama atitinkama tiriamos medžiagos koncentracija atmosferoje, po to turėtų būti naudojama kontrolinė tirpiklių grupė. Jeigu tirpiklis ar kiti priedai yra naudojami dozavimui palengvinti, turėtų būti žinoma, kad jie nesukels toksiško poveikio. Atitinkamais atvejais gali būti naudojamasi ankstesniais duomenimis.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Jeigu nėra kontraindikacijų, pirmenybė atiduodama žiurkėms.Turėtų būti panaudojamos plačiai naudojamos laboratorinės veislės. Kiekvienai lyčiai bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio įvairavimas neturėtų viršyti ± 20% atitinkamo vidutinio svorio.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Ne mažiau kaip dešimt graužikų (penki patinėliai ir penkios patelės) yra naudojami kiekvienai koncentracijai. Patelės turėtų būti neturėjusios jauniklių ir nevaikingos.

Pastaba: Atliekant ūminio toksiškumo bandymus su aukštesniaisiais negu graužikai gyvūnais turi būti apsvarstoma galimybė naudoti mažesnį gyvūnų skaičių.

Dozės turėtų būti atidžiai parenkamos ir turėtų būti dedamos visos pastangos neviršyti vidutiniškai toksiškų dozių. Tokiuose bandymuose turėtų būti vengiama įvesti mirtinas tiriamosios medžiagos dozes.

1.6.2.3. *Poveikio koncentracijos*

Koncentracijų skaičius turėtų būti pakankamas, ne mažiau trijų, ir taip paskirstytų, kad susidarytų bandymo grupės, turinčios tam tikrą toksiško poveikio intervalą ir mirštamumo procentą. Duomenų turi būti tiek, kad pakaktų sudaryti mirtinų koncentracijų kreivę ir atitinkamais atvejais būtų galima tinkamai nustatyti LC_{50}.

1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu penkis bandomus patinėlius ir penkias bandomas pateles paveikus 5 mg skystos arba kietos medžiagos viename litre dujų arba aerozolio (arba, jeigu tai neįmanoma dėl tiriamos medžiagos fizikinių arba cheminių, taip pat ir sprogumo savybių – maksimalia pasiekiama koncentracija) keturias valandas, per 14 dienų nebūna su tuo cheminiu junginiu susijusių nugaišimo atvejų, laikoma, kad tolesnis bandymas yra nereikalingas.

1.6.2.5. *Poveikio trukmė*

Poveikio trukmė turėtų būti lygi keturioms valandoms.

1.6.2.6. *Įrenginiai*

Gyvūnai turėtų būti bandomi inhaliaciniais įrenginiais, skirtais išlaikyti dinaminį oro srautą ne mažiau kaip 12 oro pasikeitimų per valandą, kad būtų užtikrintas pakankamas deguonies kiekis ir vienodai pasiskirstytų poveikio atmosfera. Jeigu naudojama kamera, ji turėtų būti tokios konstrukcijos, kad kaip galima būtų sumažinamas gyvūnų susigrūdimas ir kad jie įkvėptų kaip galima daugiau tiriamosios medžiagos. Paprastai, norint užtikrinti kameros atmosferos pastovumą, visas bandomų gyvūnų „tūris“ neturėtų viršyti 5 % bandymo kameros tūrio. Atskiroje kameroje gali būti paveikiama burna ir nosis, tik galva arba visas kūnas; du pirmieji būdai padeda sumažinti tiriamos medžiagos patekimą kitais keliais.

1.6.2.7. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpis turėtų būti ne trumpesnis kaip 14 dienų. Tačiau stebėjimo trukmė neturėtų būti griežtai nustatoma. Ji turėtų būti nustatoma pagal toksines reakcijas, jų pasireiškimo dažnumą ir sveikimo laikotarpio trukmę; todėl, jeigu laikoma reikalinga, jis gali būti pailginamas. Labai svarbus yra laikas, kada toksiškumo požymiai atsiranda ir išnyksta, bei nugaišimo laikas, ypač jeigu yra tendencija, kad žūtis pasireiškia vėliau.

1.6.3. **Darbo eiga**

Prieš pat poveikį gyvūnai yra sveriami ir po to paveikiami tiriama koncentracija tam skirtame aparate keturias valandas po to, kai kameroje nustatoma koncentracijos pusiausvyra. Pusiausvyros nustatymo trukmė turi būti trumpa. Temperatūra, kurioje vykdomas bandymas, turėtų būti išlaikoma 22 ± 3ºC. Tinkamiausias santykinis drėgnumas yra tarp 30 % ir 70 %, bet tam tikrais atvejais (pvz., atliekant tam tikrus aerozolių bandymus), tai gali būti neįgyvendinama. Išlaikant nedidelį neigiamą slėgį kameros viduje ($\&_{ge}$, 5 mm vandens) užkertamas kelias tiriamajai medžiagai patekti į aplinką. Poveikio metu turėtų būti duodama pašaro ir vandens. Turėtų būti naudojamos atitinkamos bandymo atmosferos generavimo ir monitoringo sistemos. Tokia sistema turėtų užtikrinti, kad kaip galima greičiau bus pasiektos pastovios poveikio sąlygos. Kamera turėtų būti tokios konstrukcijos ir taip veikti, kad kameros viduje būtų palaikomas vienodas bandymo atmosferos pasiskirstymas.

Turėtų būti atliekami šie matavimai arba monitoringas:

— oro srauto greičio (visą laiką),

— tikrosios tiriamos medžiagos koncentracijos, matuojamos kvėpavimo zonoje ne mažiau kaip tris kartus poveikio metu (esant tam tikrai atmosferai, pvz., naudojant didelės koncentracijos aerozolius, gali tekti vykdyti dažnesnį monitoringą). Poveikio metu koncentracija neturėtų keistis daugiau negu ± 15 % vidutinės vertės. Tačiau naudojant tam tikrus aerozolius, šio kontrolės lygio gali būti neįmanoma pasiekti, tokiu atveju būtų priimtinas platesnis intervalas. Aerozolių dalelių dydžio analizė turėtų būti atliekama reikiamu dažnumu (ne rečiau kaip vieną kartą vienai bandomajai grupei),

— temperatūros ir drėgnumo, jeigu įmanoma, visą laiką.

Poveikio metu ir po jo atliekami stebėjimai, kurie sistemingai užrašomi; apie kiekvieną gyvūną turėtų būti daromi atskiri įrašai. Pirmą dieną stebėjimai turėtų būti atliekami dažnai. Kruopštus klinikinis ištyrimas turėtų būti atliekamas ne rečiau kaip vieną kartą kiekvieną darbo dieną, kiti stebėjimai turėtų būti vykdomi kiekvieną dieną, imantis atitinkamų veiksmų iki minimumo sumažinti bandymo metu prarandamų gyvūnų skaičių, pvz., rastų negyvų gyvūnų autopsija arba užšaldymas ir nusilpusių arba gaištančių gyvūnų izoliavimas arba nužudymas.

Stebimi odos ir kailio, akių, gleivinės pasikeitimai, taip pat respiratorinės, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų ir somatomotorinės veiklos ir elgsenos pasikeitimai. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tremorų, konvulsijų, salivacijos, diarėjos, letargo, miego ir komos stebėjimams. Nugaišimo laikas turėtų būti užrašomas kaip galima tiksliau. Kiekvieno gyvūno svoris turėtų būti nustatomas kiekvieną savaitę po poveikio ir šiam nugaišus.

Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, ir tiems, kurie išlieka gyvi bandymą sustabdžius, atliekama autopsija, ypač atkreipiant dėmesį į visus viršutinių ir apatinių kvėpavimo takų pokyčius. Turėtų būti užregistruojami visi dideli patologiniai pokyčiai. Jeigu reikalaujama, turėtų būti paimami audiniai histopatologiniam tyrimui.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, nurodant kiekvienos bandomos grupės gyvūnų skaičių bandymo pradžioje, kiekvieno gyvūno nugaišimo laiką, gyvūnų, turinčių kitokius toksiškumo požymius, skaičių, pateikiant toksiškų poveikių ir autopsijos duomenų aprašymą. Turėtų būti apskaičiuojami ir registruojami svorio pasikeitimai, jeigu išgyvenama ilgiau negu vieną dieną. Gyvūnai, kurie humaniškai nužudomi dėl cheminio junginio sukeliamų kančių ir skausmo, yra užregistruojami kaip nugaišimo atvejai, kurių priežastis – cheminis junginys. LD_{50} gali būti nustatomas pripažintu metodu. Į duomenų vertinimą turėtų įeiti sąryšis, jeigu toks yra, tarp gyvūnų poveikio tiriamąja medžiaga ir visų specifinių rodiklių dažnumo ir stiprumo, taip pat ir elgsenos ir klinikinių parodymų, didesnių audinių pakitimų, kūno svorio pasikeitimų, mirštamumo ir kitų toksikologinių poveikių.

3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašarai ir pan.;

— bandymo sąlygos: poveikio aparato apibūdinimas

taip pat aparato konstrukcija, tipas, dydžiai, oro šaltinis, aerozolių generavimo sistema, oro kondicionavimo metodas ir gyvūnų laikymo bandymo kameroje, jeigu tokia naudojama, būdas. Turėtų būti apibūdinama temperatūros, drėgnumo matavimo įranga, aerozolio koncentracijos ir dalelių dydžio pasiskirstymas.

Duomenys apie poveikį

Jie turėtų būti pateikiami lentelėse vidutinėmis vertėmis ir kintamumo vienetais (pvz., standartinis nuokrypis) ir, jeigu įmanoma, į juos turėt būti įtraukti:

a) oro srauto, tekančio inhaliacijos įrenginiu, greitis;

b) oro temperatūra ir drėgnumas;

c) nominalios koncentracijos (visas tiriamos medžiagos kiekis, įdėtas į inhaliacijos įrenginį, padalytas iš oro tūrio);

d) tirpiklio, jeigu naudotas, rūšis;

e) faktinės koncentracijos kvėpavimo bandymo zonoje;

f) masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAD) ir geometrinis standartinis nuokrypis (GSD);

g) pusiausvyros nustatymo periodas;

h) poveikio periodas;

— duomenų apie reakciją pagal lytį ir poveikį surašymas į lenteles (pvz., gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo nužudyti bandymo metu, skaičius; toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius; paveiktų gyvūnų skaičius);

— nugaišimo laikas poveikio metu arba po jo, priežastys ir kriterijai, kuriais naudotasi humaniškai nužudant gyvūnus;

— visi pastebėjimai;

— LC_{50} vertė kiekvienai lyčiai, nustatyta stebėjimo laikotarpio pabaigoje (nurodant apskaičiavimo metodą);

— LC_{50} 95 % pasikliautinasis intervalas (tais atvejais, kai gali būti pateikta);

— dozės ir mirštamumo kreivė ir statumas (jeigu įmanoma pagal nustatymo metodą);

— autopsijos duomenys;

— visi histopatologiniai duomenys;

— rezultatų aptarimas (ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tam, kokį poveikį humaniškas gyvūnų nužudymas bandymo metu galėtų turėti apskaičiuojamai LC_{50} vertei);

— rezultatų aiškinimas.

3.2. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

B.3. ŪMINIS TOKSIŠKUMAS (PER ODĄ)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Tiriamoji medžiaga dedama ant odos suskirstytomis dozėmis kelioms eksperimentinių gyvūnų grupėms, viena dozė – vienai grupei. Po to atliekami poveikio ir nugaišimo atvejų stebėjimai. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama autopsija, ir, užbaigus bandymą, autopsija daroma išlikusiems gyviems gyvūnams.

Gyvūnus, kurie turi aiškių ir ilgalaikių kančios ir skausmo požymių, reikia humaniškai nužudyti. Jeigu žinoma, kad dėl medžiagų, naudojamų dozavimo bandymuose, gali kilti skausmas ir kančia dėl jų ardančių (ėsdinančių) arba dirginančių savybių, tokie bandymai neturėtų būti atliekami.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Gyvūnai laikomi eksperimentiniuose narveliuose eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki eksperimento pradžios. Prieš bandymą sveiki jauni suaugę gyvūnai randomizuojami ir paskiriami į apdorojimo grupes. Apytikriai 24 valandas iki bandymo nuo gyvūno kūno sprando srityje pašalinamas kailis, jį nukerpant arba nuskutant. Jeigu kailis kerpamas arba skutamas, reikia stengtis nenubrūžinti odos, tai gali pakeisti pralaidumą. Tiriamajai medžiagai uždėti turėtų būti nukirpta ar nuskusta ne mažiau kaip 10 % kūno paviršiaus. Jeigu bandomos kietosios medžiagos, kurios atitinkamais atvejais gali būti pulverizuojamos, tiriamoji medžiaga turėtų būti pakankamai sudrėkinama vandeniu arba, jeigu reikia, atitinkamu tirpikliu, kad būtų užtikrinamas geras sąlytis su oda. Jeigu naudojamas tirpiklis, turėtų būti atsižvelgiama į tirpiklio poveikį tiriamosios medžiagos įsiskverbimui į odą. Skystos tiriamosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Gali būti naudojamos suaugusios žiurkės arba triušiai. Gali būti naudojamos kitos rūšys, bet jų naudojimas turėtų būti pagrindžiamas. Turėtų būti panaudojamos plačiai naudojamos veislės. Kiekvienai lyčiai bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio įvairavimo intervalas neturėtų viršyti ± 20 % atitinkamo vidutinio svorio

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienai dozei naudojama ne mažiau 5 gyvūnų. Jie visi turėtų būti vienos lyties. Jeigu naudojamos patelės, jos turėtų būti neturėjusios jauniklių ir būti nevaikingos. Jeigu galima gauti informacijos, parodančios, kad kuri nors lytis yra daug jautresnė, dozė taikoma tai lyčiai.

Pastaba: Atliekant ūminio toksiškumo bandymus su aukštesniaisiais negu graužikai gyvūnais reikėtų išnagrinėti galimybę naudoti mažesnį gyvūnų skaičių. Dozės turėtų būti kruopščiai parenkamos, ir stengiamasi neviršyti vidutinio toksiškumo dozių. Tokių bandymų metu turėtų būti vengiama įvesti mirtinas tiriamosios medžiagos dozes.

1.6.2.3. *Dozės*

Jų turėtų būti pakankamas skaičius, ne mažiau kaip trys, ir atitinkamai paskirstytų, kad susidarytų tiriamosios grupės, turinčios atitinkamą toksiško poveikio intervalą ir mirštamumo procentą. Duomenų turėtų būti tiek, kad būtų galima sudaryti dozės ir reakcijos kreivę ir, jeigu įmanoma, būtų galima nustatyti LD_{50}.

1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu naudojami graužikai, ribinis bandymas suleidžiant vieną dozę, ne mažesnę kaip 2 000 mg/kg kūno svorio, gali būti atliekamas su penkių patinėlių ir penkių patelių grupe, naudojant aukščiau apibūdintą darbo eigą. Jeigu cheminis junginys tampa nugaišimo priežastimi, reikėtų apsvarstyti, ar nereikėtų atlikti išsamų tyrimą.

1.6.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpis turėtų būti ne trumpesnis kaip 14 dienų. Tačiau stebėjimų trukmė neturėtų būti griežtai nustatoma. Ji turėtų būti nustatoma pagal toksines reakcijas, jų pasireiškimo dažnumą ir sveikimo laikotarpio trukmę; todėl jis gali būti pailginamas, jeigu laikoma, kad to reikia. Svarbus yra laikas, per kurį toksiškumo požymių atsiranda ir išnyksta, taip pat nugaišimo laikas, ypač jeigu yra tendencija, kad žūtis pasireiškia vėliau.

1.6.3. **Darbo eiga**

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Tiriamoji medžiaga turėtų būti tolygiai uždedama ant plotelio, kurio dydis sudaro apie 10 % viso kūno paviršiaus. Jeigu medžiagos labai toksiškos, paveikiamas paviršius gali būti mažesnis, bet kaip galima didesnis plotas turėtų būti padengiamas kiek įmanoma plonesniu ir lygesniu sluoksniu.

Tiriamoji medžiaga turėtų liestis su oda akytu marlės tvarsčiu ir nedirginančia lipnia juostele per visą 24 valandų poveikio laiką. Tiriamoji vieta ir toliau turėtų būti atitinkamai padengta, kad būtų išsaugotas marlės tvarstis ir tiriamoji medžiaga bei užtikrinama, kad gyvūnai nepraris tiriamosios medžiagos. Gali būti naudojami ribotuvai, kad tiriamoji medžiaga nebūtų praryjama, bet visiško imobilizavimo metodas nerekomenduojamas.

Poveikio laikotarpio pabaigoje tiriamosios medžiagos likutis turėtų būti nuimamas, paprastai naudojant vandenį ar kokį kitą atitinkamą odos valymo būdą.

Poveikio metu atliekami stebėjimai, kurie sistemingai užrašomi. Apie kiekvieną gyvūną turėtų būti daromi atskiri įrašai. Pirmą dieną stebėjimai turėtų būti atliekami dažnai. Kruopštus klinikinis ištyrimas turėtų būti atliekamas ne rečiau kaip vieną kartą kiekvieną darbo dieną, kiti stebėjimai turėtų būti vykdomi kiekvieną dieną, imantis atitinkamų veiksmų iki minimumo sumažinti bandymo metu prarandamų gyvūnų skaičių, pvz., rastų negyvų gyvūnų autopsija arba užšaldymas ir nusilpusių arba gaištančių gyvūnų izoliavimas arba nužudymas.

Turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimai, taip pat respiratorinės, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų ir somatomotorinės veiklos ir elgsenos pasikeitimai. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tremorų, konvulsijų, salivacijos, diarėjos, letargo, miego ir komos stebėjimams. Nugaišimo laikas turėtų būti užrašomas kaip galima tiksliau. Gyvūnams, kurie nugaišo bandymo metu ir kurie išliko gyvi dėl bandymo nutraukimo, yra atliekama autopsija. Visi dideli patologiniai pokyčiai turėtų būti registruojami. Jeigu nurodyta, turėtų būti paimami audiniai histopatologiniam ištyrimui.

Priešingos lyties toksiškumo įvertinimas

Užbaigus bandymą su viena lytimi, dozė skiriama ne mažiau kaip vienai grupei, susidedančiai iš 5 priešingos lyties gyvūnų, kad būtų nustatyta, ar šios lyties gyvūnai nėra labiau jautresni tiriamai medžiagai. Esant kitokioms sąlygoms, mažesnio gyvūnų skaičiaus naudojimas turėtų būti pagrindžiamas. Jeigu galima gauti pakankamai informacijos, įrodančios, kad tiriamos lyties gyvūnai yra daug jautresni, galima apsieiti be priešingos lyties gyvūnų bandymo.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai grupei nurodant gyvūnų skaičių bandymo pradžioje, kiekvieno gyvūno nugaišimo laiką, gyvūnų, turinčių kitokius toksiškumo požymius, skaičių, pateikiant toksiškų poveikių ir autopsijos duomenų aprašymą. Turėtų būti nustatomas kiekvieno gyvūno svoris ir užrašomas prieš pat įvedant tiriamąją medžiagą, po to kartą per savaitę ir nugaišimo metu; turėtų būti apskaičiuojami svorio pasikeitimai ir užrašomi, jeigu išgyvenama ilgiau negu vieną dieną. Gyvūnai, kurie humaniškai nužudomi dėl cheminio junginio sukeliamų kančių ir skausmo, yra užregistruojami kaip žūties atvejai, kurių priežastis – cheminis junginys. LD_{50} gali būti nustatomas pripažintu metodu.

Į duomenų vertinimą turėtų įeiti sąryšis, jeigu toks yra, tarp gyvūnų, paveiktų tiriamąja medžiaga, ir visų specifinių rodiklių dažnumo ir stiprumo, taip pat ir elgsenos ir klinikinių parodymų, didesnių audinių pakitimų, kūno svorio pasikeitimų, mirštamumo ir kitų toksikologinių poveikių.

3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.,

— bandymo sąlygos (taip pat odos nuvalymo metodas ir tvarstymo būdas: uždaras arba neuždaras),

— dozės (nurodant tirpiklį, jeigu naudojamas, ir koncentracijas),

— gyvūnų, kuriems įvestos dozės, lytis,

— duomenų lentelės pagal lytį ir dozes (t. y. gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo nužudyti bandymo metu, skaičius; toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, paveiktų gyvūnų skaičius),

— nugaišimo laikas įvedus dozę, priežastys ir kriterijai, kuriais naudotasi humaniškai nužudant gyvūnus,

— visi pastebėjimai,

— išsamiame bandyme dalyvavusių lyčių LD_{50} vertės, kurios nustatytos per 14 dienų (nurodant apibrėžtą nustatymo metodą),

— LD_{50} 95 % pasikliautinasis intervalas (tais atvejais, kai gali būti pateikta),

— dozės ir mirštamumo kreivė ir statumas, jeigu įmanoma nustatyti pagal nustatymo metodą,

— autopsijos duomenys

— visi histopatologiniai duomenys,

— bet kurio bandymo su priešinga lytimi rezultatai,

— rezultatų aptarimas (ypatingas dėmesys turėtų būti atkreipiamas į tai, kokį poveikį apskaičiuojamai LD_{50} vertei gali turėti humaniškas gyvūnų nužudymas bandymo metu),

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. LITERATŪRA

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

B.4. ŪMINIS TOKSIŠKUMAS (ODOS DIRGINIMAS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Pradinis svarstymas

Reikėtų kruopščiai išnagrinėti visą turimą informaciją apie medžiagą, kad būtų tiriama kiek įmanoma mažiau medžiagos tokiomis sąlygomis, kurios galėtų sukelti stiprias reakcijas. Toliau pateikta informacija gali būti naudinga nusprendžiant, ar tinka visas bandymas, vieno gyvūno bandymas, ar tolesnis bandymas nereikalingas.

i) Fizinės ir cheminės savybės bei cheminis reaktyvumas. Labai rūgščių arba šarminių medžiagų (pavyzdžiui, nustatytas pH 2 arba mažesnis, ar 11,5 arba didesnis) nereikia bandyti pirminiam odos dirginimui, jeigu tikimasi, kad jos sukels ardantį (ėsdinantį) poveikį. Taip pat turėtų būti atsižvelgiama į rezervinį šarmingumą ir rūgštingumą.

ii) Jeigu galima gauti įtikinančių įrodymų apie gerai pagrįstus *in vitro* bandymų didelius poveikius, nereikia vykdyti viso bandymo.

iii) Ūminio toksiškumo bandymų rezultatai. Jeigu ūminio toksiškumo bandymas per odą buvo atliktas su medžiaga naudojant ribinę bandymo dozę (2 000 mg/kg kūno svorio) ir nebuvo pastebėta odos sudirginimo, nereikia toliau vykdyti bandymų. Be to, nereikia tirti medžiagų per odą, jeigu nebuvo įrodyta, kad jos labai toksiškos.

Medžiagos, kurią reikia ištirti, viena dozė dedama ant odos keliems eksperimentiniams gyvūnams, kurių kiekvienas yra kontrolinis. Tikrinami parodymai apie sudirginimo laipsnį, jie užrašomi praėjus tam tikram laikui ir apibūdinami, siekiant pateikti išsamų poveikio įvertinimą. Stebėjimų trukmė turėtų būti tokia, kad jos pakaktų išsamiam stebėtų poveikių grįžtamumui įvertinti.

Gyvūnus, kurie turi aiškių ir ilgalaikių kančios ir skausmo požymių, reikia humaniškai nužudyti.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Apytikriai 24 valandos prieš bandymą nuo gyvūno kūno sprando srityje turėtų būti pašalinamas kailis, jį nukerpant arba nuskutant.

Kerpant arba nuskutant kailiuką, reikėtų stengtis nenubrūžinti odos. Naudojami tik gyvūnai, turintys sveiką nesugadintą odą.

Kai kurios triušių veislės turi tankių plaukų saleles, kurios tam tikru metų laiku yra gerai matomos. Šiose tankiai suaugusių plaukų vietose bandomos medžiagos neturėtų būti dedamos.

Tiriant kietąsias medžiagas (kurios, jeigu reikia, gali būti pulverizuojamos), bandomoji medžiaga turėtų būti gerai sudrėkinama vandeniu arba, prireikus, atitinkamu tirpikliu, kad būtų užtikrinamas geras sąlytis su oda. Jeigu naudojami tirpikliai, turėtų būti atsižvelgiama į bandomos medžiagos tirpiklio poveikį odos dirginimui. Skystos tiriamosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Nors gali būti naudojamos kelios žinduolių rūšys, pirmenybė atiduodama žiurkėms albinosams.

1.6.2.2. *Gyvūnų skaičius*

Jeigu pagal *in vitro* atrankos rezultatus arba kitus argumentus įtariama, kad medžiaga galėtų sukelti nekrozę (t.y. būti ardanti (ėsdinanti)), reikėtų bandymą atlikti su vienu gyvūnu. Jeigu pagal šio bandymo rezultatus ardymo (ėsdinimo) nenustatoma, bandymas turėtų būti užbaigiamas papildomai naudojant ne mažiau kaip du gyvūnus.

Visam bandymui naudojami ne mažiau kaip trys sveiki suaugę gyvūnai. Nereikia neapdorotai kontrolinei grupei naudoti atskirų gyvūnų. Papildomi gyvūnai gali būti reikalingi abejotinoms reakcijoms išsiaiškinti.

1.6.2.3. *Dozės*

Jeigu nėra kontraindikacijų, bandomoje vietoje uždedama 0,5 ml skystos arba 0,5 g kietos arba pusiau kietos medžiagos. Kiekvieno gyvūno greta esanti nepaveikta oda yra naudojama bandymo kontrolei.

1.6.2.4. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpio trukmė neturėtų būti griežtai nustatoma. Ji turėtų būti tokia, kad pakaktų išsamiai įvertinti stebėtų poveikių grįžtamumą arba negrįžtamumą, bet paprastai neturi viršyti 14 dienų nuo medžiagos uždėjimo.

1.6.3. **Darbo eiga**

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Tiriamoji medžiaga turėtų būti uždedama ant mažo odos plotelio (apytikriai 6 cm^2) uždengiant marlės skiaute, kuri pritvirtinama nedirginančia lipnia juostele. Jeigu naudojami skysčiai arba tam tikros pastos, gali reikėti tiriamąją medžiagą uždėti ant marlės skiautės ir po to ją dėti ant odos. Skiautė turėtų liestis su oda naudojant atitinkamą uždarą arba pusiau uždarą tvarstymo būdą visą poveikio laikotarpį. Gyvūnai turėtų nepasiekti skiautės ir nepraryti arba neįkvėpti tiriamosios medžiagos.

Poveikio laikotarpio pabaigoje, jeigu tai įmanoma, tiriamosios medžiagos likučiai turėtų būti pašalinami naudojant vandenį arba atitinkamą tirpiklį, nepakeičiant atsiradusios reakcijos arba epidermio vientisumo.

Paprastai poveikis trunka keturias valandas.

Jeigu įtariama, kad medžiaga gali sukelti nekrozę (t.y. yra ardanti (ėsdinanti)), poveikio trukmė turėtų būti sutrumpinama (pvz., iki vienos valandos arba trijų minučių). Tokiam bandymui iš pradžių gali būti naudojamas tik vienas gyvūnas ir, jeigu neatsiranda tiriamojo cheminio junginio sukeliamo ūminio odos toksiškumo, vienu metu tam gyvūnui gali būti uždedamos trys skiautės. Pirmoji skiautė nuimama po trijų minučių. Jeigu stiprios odos reakcijos nepastebėta, antroji skiautė nuimama po vienos valandos. Jeigu šiame etape stebėjimai parodo, kad reikalingas keturių valandų poveikis ir kad jį galima humaniškai atlikti, trečioji skiautė nuimama po keturių valandų, ir sudaroma rezultato intensyvumo įvertinimo skalė.

Šiuo atveju (pvz., kai įmanomas keturių valandų poveikis), bandymas turėtų būti užbaigiamas papildomai naudojant ne mažiau kaip dar du papildomus gyvūnus, jeigu nėra laikoma, kad nehumaniška taip daryti (pvz., jeigu per kitas keturias poveikio valandas stebima nekrozė).

Jeigu po trijų minučių arba vienos valandos pastebima didelė odos reakcija (pvz., nekrozė), bandymas nedelsiant nutraukiamas.

Tam tikromis sąlygomis gali būti nurodoma taikyti ilgesnį poveikį, pavyzdžiui, kai numatoma, kad vartos ir bus veikiamas žmogus.

1.6.3.1. *Stebėjimas ir reakcijos intensyvumo įvertinimas*

Turėtų būti stebima, ar gyvūnai neturi eritemos ir edemos požymių, o reakcija įvertinama po 60 minučių, vėliau po 24, 48 ir 72 valandų nuėmus skiautę. Sudaroma odos dirginimo intensyvumo įvertinimo skalė ir užrašoma pagal 1 lentelėje nurodytą sistemą. Gali reikėti tolesnių stebėjimų, jeigu grįžtamosios reakcijos nenustatomos per 72 valandas. Kartu su dirginimo stebėjimais turėtų būti išsamiai apibūdinami visi dideli organų pažeidimai, pavyzdžiui, ardymas (ėsdinimas) (negrįžtamas odos audinių suardymas) ir kiti toksiški poveikiai.

Gali būti naudojamos tokios metodikos kaip odos raukšlės histopatologinis ištyrimas arba storio matavimas, kad būtų išsiaiškinamos abejotinos reakcijos arba rezultatai, kurių nesimato dėl ant odos užteptos tiriamos medžiagos.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinami juos surašant į lenteles, nurodant kiekvieno gyvūno eritemos ir edemos sudirginimo laipsnius per visą stebėjimo laiką. Turėtų būti registruojami visi dideli organų pakenkimai, sudirginimo laipsnio ir pobūdžio apibūdinimas, stebėtieji grįžtami arba ardymo (ėsdinimo) bei kitokie toksiškumo poveikiai.

3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— - rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.

— bandymo sąlygos (taip pat atitinkamos chemikalo fizikinės ir cheminės savybės, odos paruošimo ir nuvalymo metodika, tvarstymo būdas: uždaras ar pusiau uždaras);

— duomenų apie dirginimą surašymas į lenteles kiekvienam gyvūnui kiekvieną stebėjimo laiko periodą (pvz., 1, 24, 48 ir 72 valandos ir t.t.nuėmus skiautę);

— visų didelių organų pakenkimų, įskaitant ardymą (ėsdinimą) apibūdinimas;

— stebėto dirginimo laipsnio ir pobūdžio apibūdinimas ir visi histopatologiniai duomenys;

— visų toksiškumo poveikių, išskyrus odos dirginimą, apibūdinimas;

— duomenų aptarimas;

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. LITERATŪRA

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

Priedėlis

LENTELĖ: ODOS REAKCIJOS INTENSYVUMO VERTINIMO SKALĖ

Eritemų ir šašų susidarymas

	Vertė
Eritemos nėra	0
Labai nedidelė eritema (vos pastebima)	1
Gerai matoma eritema	2
Nuo vidutiniškos iki stiprios eritemos	3
Didelė eritema (burokėlio raudonumo) arba šašų susidarymas (gilūs sužeidimai), kliudantys gauti parodymus apie eritemą	4

Edemos susidarymas

Edemos nėra	0
Labai nedidelė edema (vos pastebima)	1
Nedidelė edema (plotelio kraštai gerai matomi, nes aiškiai pakilę)	2
Vidutiniška edema (kraštai pakilę apytikriai 1 mm)	3
Didelė edema (pakilę daugiau negu 1 mm ir išplitę už paveikto plotelio ribų)	4

B.5. ŪMINIS TOKSIŠKUMAS (AKIŲ DIRGINIMAS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Pirminis nagrinėjimas

Reikia kruopščiai išnagrinėti visą prieinamą informaciją apie medžiagą, kad būtų kiek įmanoma sumažinamas medžiagų tyrimas tokiomis sąlygomis, kurios galėtų sukelti stiprias reakcijas. Šiuo atžvilgiu toliau pateikta informacija gali būti naudinga.

i) Fizikinės ir cheminės savybės bei cheminis reakcingumas. Labai rūgščių arba šarminių medžiagų, dėl kurių, pavyzdžiui, akies pH gali būti lygus 2 arba mažesnis, ar 11,5 arba didesnis, nereikėtų bandyti, jeigu tikimasi, kad dėl jų atsiras didelių audinių pažeidimų. Taip pat turėtų būti atsižvelgiama į rezervinį šarmingumą arba rūgštingumą.

ii) Gerai pagrįsti alternatyvių bandymų rezultatai; medžiagos, jeigu buvo įrodyta, kad jos potencialiai gali turėti ardančių (ėsdinančių) arba stiprių dirginančių savybių, neturėtų būti naudojamos akių dirginimo bandymuose, darant prielaidą, kad atliekant bandymą pagal šį metodą tokios medžiagos akims turės didelį poveikį.

iii) Odos dirginimo bandymų rezultatai. Medžiagos, jeigu buvo įrodyta, kad jos tikrai ardo (ėsdina) arba stipriai dirgina odą atliekant odos dirginimo bandymą, toliau neturėtų būti bandomos akių dirginimo bandymais, darant prielaidą, kad tokios medžiagos galėtų turėti didelį poveikį akims.

Medžiagos, kurią reikia ištirti, viena dozė dedama ant vienos akies keliems eksperimentiniams gyvūnams; nepaveikta akis naudojama kontrolinei informacijai gauti. Sudirginimo laipsnis yra įvertinamas ir suskirstomas tam tikrais intervalais ir toliau apibūdinama, kad būtų gaunamas išsamus poveikių įvertinimas. Stebėjimų trukmė turėtų būti tokia, kad jos pakaktų išsamiam stebėtų poveikių grįžtamumui arba negrįžtamumui įvertinti.

Gyvūnus, kurie turi aiškių ir ilgalaikių kančios ir skausmo požymių, reikia humaniškai nužudyti.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Kiekvieno eksperimentinio gyvūno, laikinai atrinkto bandymui, abi akys turėtų būti patikrinamos per 24 valandas iki bandymo pradžios. Gyvūnai, kuriems nustatomas akių sudirginimas, akių defektai arba prieš tai buvęs ragenos pažeidimas, neturėtų būti naudojami.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Nors buvo naudota daugybė eksperimentinių gyvūnų, rekomenduojama, kad bandymas būtų atliekamas naudojant sveikus suaugusius triušius albinosus.

1.6.2.2. *Gyvūnų skaičius*

Reikia atlikti bandymą su vienu gyvūnu, jeigu numatomi pastebimi poveikiai. Jeigu šio bandymo, atlikto su vienu triušiu, rezultatai rodo, kad medžiagos akims poveikis yra labai dirginantis (grįžtamasis poveikis) arba ardantis (ėsdinantis) (negrįžtamieji poveikiai) taikant apibūdintąją darbo eigą, tolesnių akių dirginimo bandymų su papildomais gyvūnais nereikia vykdyti. Kartais tolesni bandymai su papildomais gyvūnais gali būti tinkami tyrinėjant ypatingus aspektus.

Kitais, ne vieno gyvūno bandymo atvejais, turi būti naudojama ne mažiau 3 gyvūnų. Papildomi gyvūnai gali būti reikalingi abejotinoms reakcijoms išsiaiškinti.

1.6.2.3. *Dozės*

Tyrinėjant skysčius, naudojama 0,1 ml dozė. Tyrinėjant kietąsias medžiagas, pastas ir miltelines medžiagas, naudojamo kiekio tūris turėtų būti 0,1 ml arba jos turėtų sverti apytikriai 0,1 g (svoris visada turi būti užrašomas). Jeigu tiriamoji medžiaga yra kieta arba granuliuota, ji sumalama į smulkius miltelius. Dalelių tūris turėtų būti matuojamas po to, kai jos švelniai supresuojamos, pvz., patapšnojus matavimo indą.

Medžiagų, kurios laikomos pulverizatoriuose arba hermetiškuose aerozolio balionėliuose, skystis turėtų būti išpurškiamas ir surenkama 0,1 ml bei įlašinama į akį, kaip apibūdinta skysčių atveju.

1.6.2.4. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpio trukmė neturėtų būti griežtai nustatoma. Jis turėtų būti toks, kad pakaktų išsamiai įvertinti stebėtų poveikių grįžtamumą arba negrįžtamumą, bet paprastai neturi viršyti 21 dienos po įlašinimo.

1.6.3. **Darbo eiga**

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Tiriamoji medžiaga turėtų būti įlašinama į kiekvieno gyvūno vienos akies akių gleivinės maišelį, švelniai atitraukus apatinį voką nuo akies obuolio. Po to vokai švelniai vienai sekundei suglaudžiami, kad medžiaga nenutekėtų. Kita akis, kuri neapdorojama, naudojama kontrolei.

Jeigu manoma, kad medžiaga gali sukelti nereikalingą skausmą, prieš lašinant tiriamąją medžiagą gali būti naudojamas vietinis anestetikas. Vietinio anestetiko rūšis, koncentracija ir naudojimo laikas turėtų būti atidžiai parenkami, užtikrinant, kad dėl jo vartojimo nebus didelio reakcijos į tiriamąją medžiagą skirtumo. Kontrolinė akis turėtų būti panašiai anestezuojama.

Bandomųjų gyvūnų akys neturėtų būti plaunamos 24 valandas po tiriamosios medžiagos įlašinimo. Praėjus 24 valandoms, galima nuplauti, jeigu laikoma, kad tai tinka.

Jeigu bandymu įrodoma, kad kai kurios medžiagos yra dirginančios, gali būti nurodoma atlikti papildomus bandymus naudojant triušius, kuriems akys nuplaunamos tuoj pat įlašinus medžiagą. Tokiais atvejais rekomenduojama naudoti tris triušius. Praėjus pusei minutės po įlašinimo, triušių akys plaunamos pusę minutės naudojant bet kokį tūrį ir srovės greitį, kuris nesukeltų pakenkimų.

1.6.3.1. *Stebėjimas ir reakcijos intensyvumo įvertinimas*

Akys turėtų būti tikrinamos praėjus 1, 24, 48 ir 72 valandoms. Jeigu po 72 valandų nėra akių pakenkimų, bandymas gali būti užbaigiamas.

Gali būti reikalinga pailginti stebėjimus, jeigu vykdomas ilgalaikis ragenos pakenkimas arba kitas akių dirginimas, norint nustatyti organų pakenkimo vystymąsi bei jo grįžtamumą arba negrįžtamumą. Be ragenos, rainelės ir akių gleivinės stebėjimų, turėtų būti registruojami ir ataskaitoje pateikiami kiti pastebėti organų pakenkimai. Akių reakcijos intensyvumo vertinimas (lentelė) turėtų būti užrašomas kiekvieno patikrinimo metu. (Akių reakcijų intensyvumo vertinimas priklauso nuo įvairių aiškinimų. Norint padėti tyrimo laboratorijoms ir toms laboratorijoms, kurios dalyvauja organizuojant ir aiškinant stebėjimus, gali būti naudojamos iliustruotos rekomendacijos.)

Reakcijų tikrinimą galima palengvinti naudojant binokulinę lupą, rankinę plyšinę lempą, biomikroskopą arba kitokį tinkamą įtaisą. Užregistravus 24 valandų stebėjimus, bet kurio arba visų triušių akys gali būti patikrinamos fluoresceinu.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėje, nurodant kiekvieno gyvūno sudirginimo laipsnius nustatytu stebėjimo laiku. Turėtų būti pateikiamas sudirginimo laipsnio ir pobūdžio, didelių organų pakenkimų ir visų su akimis nesusijusių stebėtų poveikių apibūdinimas.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— - duomenys apie gyvūnus (rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.);

— bandymo sąlygos (taip pat svarbios fizikinės ir cheminės tiriamosios medžiagos savybės);

— duomenų apie reakcijos į dirginimą/ardymą (ėsdinimą) surašymas į lenteles pagal kiekvieną atskirą gyvūną kiekvienu stebėjimo laiko momentu (pvz., 1, 24, 48 ir 72 valandą);

— visų stebėtų rimtų pakenkimų apibūdinimas;

— aprašomasis stebėto dirginimo arba ėsdinimo (ardymo), taip pat paveiktos ragenos ir grįžtamumo apibūdinimas;

— metodo, naudoto dirginimui, reakcijos intensyvumui įvertinti praėjus 1, 24, 48 ir 72 valandoms, apibūdinimas (pvz., rankinė plyšinė lempa, biomikroskopas, fluoresceinas)

— visų pastebėtų su akimis nesusijusių vietinių poveikių apibūdinimas;

— duomenų aptarimas;

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

Priedėlis

AKIŲ PAKENKIMŲ INTENSYVUMO VERTINIMO SKALĖ

Ragena

Drumstis: tankumo laipsnis (tankiausia zona, paimta duomenų užrašymui)

Opėjimo arba drumstumo nėra	0
Išsibarsčiusios arba išsklidusios drumstumo zonos (išskyrus nedidelį normalaus blizgėjimo prislopinimą), rainelės elementai aiškiai matomi	1
Lengvai įžiūrima beveik permatoma zona, rainelės elementai vos pastebimi	2
Perlamutrinės zonos, rainelės elementai nematomi, vyzdys vos įžiūrimas	3
Ragena matinė, rainelė neįžiūrima dėl nepermatomumo	4

Rainelė

Normali	0
Labai pagilėjusios raukšlės, kongestija, pabrinkimas, vidutiniška hiperemija aplink rageną arba injekcija, arba bet kuris iš jų ar jų derinys, rainelė vis dar reaguoja į šviesą (vangi reakcija teigiama)	1
Nereaguoja į šviesą, kraujavimas, stiprus suardymas (bet kuris iš jų arba visi)	2

Junginė

Raudonumas (priskiriamas patiems stipriausiems parodymams apie voką ir bulbarinę junginę, palygti su kontroline akimi)

Kraujo indai normalūs	0
Kai kurie kraujo indai aiškiai hiperemiški (įšvirkšta)	1
Išsklaidyta, tamsiai raudonos spalvos, atskiri indai sunkiai pastebimi	2
Išsklaidyta, jautienos raudonumo	3

Chemozė: akių vokai ir(arba) niktitacinės membranos

Paburkimo nėra	0
Bet koks paburkimas, didesnis negu normalus (taip pat niktitacinės membranos)	1
Akivaizdus paburkimas, taip pat vokų eversija	2
Paburkimas, pusiau užmerkti vokai	3
Paburkimas, vokai užmerkti daugiau nei per pusę	4

B.6. ODOS JAUTRINIMAS (SENSIBILIZAVIMAS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Pastabos

Bandymų jautrumas ir sugebėjimas nustatyti potencialius žmogaus odos sensibilizatorius yra laikomi svarbūs toksiškumo klasifikavimo sistemoje, kuri svarbi žmonių sveikatai.

Nėra atskiro bandymo metodo, kuriuo būtų tiksliai nustatomos visos medžiagos, galinčios jautrinti žmogaus odą, ir kuris tiktų visoms medžiagoms.

Pasirenkant bandymą turi būti atsižvelgiama į tam tikrus veiksnius, pavyzdžiui, medžiagos fizikines savybes, taip pat jos gebėjimą įsiskverbti į odą.

Bandymai, kuriems naudojamos jūrų kiaulytės, gali būti skirstomi į pagalbinius bandymus, kuriuose alerginė būsena yra sustiprinama ištirpinant arba suspenduojant tiriamąją medžiagą *Freunds Complete Adjuvant* (FCA), ir į nepagalbinius bandymus.

Pagalbiniai bandymai gali būti tikslesni, numatant galimą žmogaus odos jautrinimo tam tikra medžiaga poveikį, negu tais metodais, kuriuose *Freunds Complete Adjuvant* nenaudojamas, ir todėl šiems metodams atiduodama pirmenybė.

Jūrų kiaulyčių maksimizacijos bandymas (GPMT) yra plačiai naudojamas pagalbinis bandymas. Nors keli kiti metodai gali būti naudojami nustatyti medžiagos gebėjimą sukelti odos jautrinimo reakciją, GPMT yra laikomas pagalbine metodika, kuriai atiduodama pirmenybė.

Daugumai chemikalų klasių nepagalbiniai bandymai (vienas iš populiariausių yra *Buehler* bandymas) yra laikomi mažiau jautriais.

Tam tikrais atvejais gali būti daug priežasčių pasirinkti *Buehler* bandymą, kurį atliekant naudojamasi greičiau vietine aplikacija negu intrakutanine injekcija, kuri naudojama atliekant jūrų kiaulyčių maksimizacijos bandymą. Tie atvejai, kai naudojamas *Buehler* bandymas, turėtų būti moksliškai pagrindžiami.

Šiame metode apibūdinamas jūrų kiaulyčių maksimizacijos bandymas (GPMT) ir *Buehler* bandymas. Kiti metodai gali būti taikomi tik tuo atveju, jeigu jie yra gerai pagrįsti ir pateikiamas mokslinis pagrindimas.

Nepriklausomai nuo taikomo metodo, jūrų kiaulyčių veislės, kuri naudojama odos jautrinimo bandyme, jautrumas turi būti tikrinamas reguliariais intervalais (šeši mėnesiai), naudojant žinomą, nuo švelnaus iki vidutiniško, sensibilizatorių bei gaunant pakankamą skaičių teigiamų reakcijų.

Taip pat žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Toliau išvardytos medžiagos, prireikus, atskiestos, rekomenduojamos naudoti kartu su bet kuria kita jautrinančia (sensibilizuojančia) medžiaga, kuri žinoma iš literatūros arba kuri priklauso tyrinėjamų medžiagų grupei.

– p-fenilenediaminas	CAS Nr. 106-50-3
– 2,4-dinitrochlorbenzenas	CAS Nr. 97-00-7
– kalio dichromatas	CAS Nr. 7778-50-9
– neomicino sulfatas	CAS Nr. 1405-10-3
–nikelio sulfatas	CAS Nr. 7786-81-4

1.4. BANDYMO METODŲ ESMĖ

Po to, kai atliekamas pirminis poveikis tiriamąja medžiaga („indukcijos“ periodas), gyvūnams apytikriai dvi savaites po paskutinio indukcinio poveikio taikomas „provokacijos“ poveikis tiriamąja medžiaga, norint nustatyti, ar buvo sukelta padidėjusio jautrumo būsena. Jautrinimas nustatomas tikrinant odos reakciją į provokacijos poveikį.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Jūrų kiaulyčių maksimizacijos bandymas (GPMT)**

1.6.1.1. *Pasirengimas*

Sveikos jaunos jūrų kiaulytės albinosai yra randomizuojamos ir paskiriamos į poveikio ir kontrolines grupes. Prieš paskiriant dozę mentės srityje pašalinami plaukai juos kerpant arba skutant. Reikėtų stengtis nepažeisti odos.

1.6.1.2. *Bandymo sąlygos*

1.6.1.2.1. Eksperimentiniai gyvūnai

Panaudojamos plačiai naudojamos laboratorinės jūrų kiaulytės albinosai, sveriančios mažiau negu 500 g.

1.6.1.2.2. Skaičius ir lytis

Gali būti naudojami patinėliai ir (arba) patelės. Jeigu naudojamos patelės, jos turėtų būti neturėjusios jauniklių arba nevaikingos. Poveikio grupėse naudojama mažiausiai 10 gyvūnų ir ne mažiau kaip 5 gyvūnai kontrolinėje grupėje. Mažesnis gyvūnų skaičius turėtų būti pagrindžiamas. Jeigu gaunami abejotini rezultatai, histopatologinis ištyrimas gali padėti nuspręsti, ar bandymas turėtų būti pakartotas naudojant kitą gyvūnų grupę.

Jeigu neįmanoma padaryti abejonių nekeliančios išvados, kad tiriamoji medžiaga yra sensibilizatorius arba kad ji tokia nėra, rekomenduojama atlikti bandymą su papildomais gyvūnais, kurių iš viso būtų ne mažiau 20 bandomųjų ir 10 kontrolinių.

1.6.1.2.3. Dozės

Yra nustatoma tokia tiriamosios medžiagos koncentracija, kad būtų gaunami tam tikri odos dirginimo įrodymai, bet gyvūnai ją turi gerai toleruoti kiekviename indukcijos etape.

Provokacijos koncentracija turėtų būti maksimali koncentracija, kai negaunama jokių neįjautrintų gyvūnų odos jautrinimo įrodymų.

Šias koncentracijas galima nustatyti atliekant nedidelės apimties (nuo dviejų iki trijų gyvūnų) bandomąjį tyrimą.

1.6.1.2.4. Stebėjimo laikotarpis

Indukciniu laikotarpiu yra vykdomi stebėjimai, norint patikrinti galimus dirginimo poveikius. Po provokacinio poveikio odos reakcija registruojama praėjus 24 ir 48 valandoms po to, kai nuimama skiautė.

1.6.1.3. *Darbo eiga*

Gyvūnai sveriami prieš bandymo pradžią ir bandymui pasibaigus. Mentės srityje pašalinami plaukai. Darbo eigą sudaro du etapai:

1.6.1.3.1. Indukcija

0 diena – paveikta grupė

Toliau nurodytos intrakutaninės injekcijos, kurių kiekvieną sudaro 0,1 ml, po dvi yra suleidžiamos mentės srityje, abipus vidurinės linijos:

1 injekcija:	0,1 ml Freunds Complete Adjuvant (FCA) sumaišytas su vandeniu arba fiziologiniu tirpalu 1:1,
2 injekcija	0,1 ml tiriamosios medžiagos, jeigu reikia, su atitinkamu tirpikliu,
3 injekcija	0,1 ml tiriamosios medžiagos su FCA

3 injekcija – vandenyje tirpios medžiagos ištirpinamos 0,05 ml vandens ir 0,05 ml neskiesto FCA. Jeigu turi būti tiriamos riebaluose tirpios arba netirpios medžiagos, jos maišomos su neskiestu FCA.

3 injekcijos galutinė tiriamosios medžiagos koncentracija yra lygi 2-os injekcijos koncentracijai.

1 ir 2 injekcijos yra švirkščiamos šalia viena kitos ir arčiausiai galvos, o 3-ioji švirkščiama link uodeginės tiriamos zonos dalies.

0 diena – kontrolinė grupė

Šios intrakutaninių injekcijų poros yra švirkščiamos į tas pačias zonas kaip nurodyta pirmiau:

1 injekcija:	0,1 ml Freunds Complete Adjuvant (FCA) sumaišytas su vandeniu arba fiziologiniu tirpalu 1:1,
2 injekcija	0,1 ml vien tirpiklio,
3 injekcija	0,1 ml tirpiklio su FCA

6 diena – kontrolinė ir paveikta grupės

Jeigu medžiaga nedirgina odos, bandomoji zona, ją nukirpus ir(arba) nuskutus, nudažoma 0,5 ml 10 % natrio laurilsulfatu vazeline, kad būtų sukeliamas vietinis dirginimas.

7 diena – paveikta grupė

Nuo bandomos zonos vėl pašalinami plaukai. Tiriamoji medžiaga atitinkamame tirpiklyje (tirpiklio pasirinkimas turėtų būti pagrindžiamas; kietosios medžiagos smulkiai pulverizuojamos ir sumaišomos su atitinkamu tirpikliu; skysčiai, prireikus, gali būti dedami tiesiogiai) paskleidžiama ant filtravimo popieriaus (2 x 4 cm) ir dedama ant bandomos zonos bei laikoma sąlytyje 48 valandas, sutvarsčius uždaru būdu.

7 diena – kontrolinė grupė

Nuo bandomos zonos vėl pašalinami plaukai. Vien tirpiklis dedamas panašiu būdu ant bandomos zonos ir laikomas sąlytyje 48 valandas, sutvarsčius uždaru būdu.

1.6.1.3.2. Provokacija

21 diena

Nuo paveiktų ir kontrolinių gyvūnų šonų pašalinami plaukai. Skiautė arba apdangalas su tiriamąja medžiaga dedami ant paveiktų gyvūnų vieno šono, o skiautė arba apdangalas tik su tirpikliu – ant kito šono.

Skiautės laikomos sąlytyje 24 valandas, sutvarsčius uždaru būdu.

Kontrolinė grupė veikiama tokiu pat būdu.

23 ir 24 dienos

— nuėmus skiautę, po 21 valandos provokacijos zona nuvaloma ir prireikus pašalinami plaukai,

— po trijų valandų (48 valandos nuo provokacijos pradžios), stebima ir registruojama odos reakcija,

— praėjus 24 valandoms po šio stebėjimo, atliekamas ir užregistruojamas antrasis stebėjimas (72 valandos).

Kad išaiškėtų pirmosios provokacijos metu gauti rezultatai, turėtų būti svarstoma galimybė taikyti antrąją provokaciją, prireikus, naudojant naują tirpiklį kontrolinei grupei, maždaug po vienos savaitės nuo pirmosios provokacijos.

1.6.1.3.3. Stebėjimas ir odos reakcijų intensyvumo vertinimas

Turėtų būti užregistruojamos ir pateikiamos ataskaitos apie visas odos reakcijas ir bet kokius rezultatus, atsiradusius dėl indukcijos ir provokacijos.

Gali būti naudojamos tokios metodikos, kaip odos raukšlės storio histopatologinis ištyrimas arba matavimas, kad būtų išsiaiškinamos abejotinos reakcijos, kurių nematyti dėl odos nudažymo tiriamąja medžiaga.

1.6.2. **Buehler bandymas**

1.6.2.1. *Preparatai*

Sveikos, jaunos jūrų kiaulytės albinosai randomizuojamos ir paskiriamos į poveikio ir kontrolines grupes. Prieš įvedant dozę, nuo vieno šono pašalinami plaukai juos kerpant ir(arba) skutant. Turi būti imamasi atsargos priemonių, kad nebūtų nepažeidžiama oda.

1.6.2.2. *Bandymo sąlygos*

1.6.2.2.1. Eksperimentiniai gyvūnai

Panaudojamos plačiai naudojamos laboratorinės jūrų kiaulytės albinosai, sveriančios mažiau negu 500 g.

1.6.1.2.2. Skaičius ir lytis

Gali būti naudojami patinėliai ir(arba) patelės. Jeigu naudojamos patelės, jos turėtų būti neturėjusios jauniklių arba būti nevaikingos. Poveikio grupėse naudojama mažiausiai 20 gyvūnų ir ne mažiau kaip 10 gyvūnų kontrolinėje grupėje. Mažesnis gyvūnų skaičius turėtų būti pagrindžiamas. Jeigu gaunami neaiškūs rezultatai, histopatologinis ištyrimas gali padėti nuspręsti, ar bandymas turėtų būti pakartotas naudojant kitą gyvūnų grupę.

1.6.2.2.3. Dozės

Kiekviename indukcijos etape yra nustatoma tiriamosios medžiagos aukščiausia koncentracija, kuri būtų sistemiškai toleruojama ir kuri, dirginančių medžiagų atveju, daugumai bandomų gyvūnų sukeltų nuo švelnaus iki vidutinio dirginimą. Provokacijos koncentracija turėtų būti maksimali, kurią taikant nebūtų įrodymų apie neįjautrintų gyvūnų sudirginimą. Šias koncentracijas galima nustatyti atliekant nedidelės apimties (nuo dviejų iki trijų gyvūnų) bandymą.

1.6.2.2.4. Stebėjimo laikotarpis

Indukciniu laikotarpiu vykdomi odos stebėjimai, siekiant patikrinti dirginimo poveikius. Po provokacijos poveikio odos reakcija registruojama praėjus 24 ir 48 valandoms po to, kai nuimama skiautė, t.y. po 30 ir 54 valandų nuo uždėjimo pradžios.

1.6.2.3. *Darbo eiga*

Gyvūnai sveriami prieš bandymo pradžią ir bandymui pasibaigus.

Darbo eigą sudaro du etapai:

1.6.2.3.1. Indukcija

0 diena – paveikta grupė

Nuo vieno šono pašalinami plaukai. 0,5 ml tiriamosios medžiagos atitinkamame tirpiklyje (tirpiklio pasirinkimas turėtų būti pagrindžiamas; skysčiai prireikus gali būti dedami tiesiogiai) yra paskleidžiami ant medvilninio tampono. Dedama ant bandomos zonos ir laikoma sąlytyje su oda 6 valandas, uždėjus skiautę arba apdangalą ir tinkamai sutvarsčius uždaru būdu.

0 diena – kontrolinė grupė

Nuo vieno šono pašalinami plaukai. Ant bandomos zonos panašiu būdu dedamas tik tirpiklis. Jis laikomas sąlytyje su oda 6 valandas, uždėjus skiautę arba apdangalą ir tinkamai sutvarsčius uždaru būdu.

7 ir 14 dienos

7 dieną ir 14 dieną ant tos pačios bandomos zonos (prireikus pašalinus plaukus) dedama ta pati aplikacija, kaip ir 0 dieną

1.6.2.3.2. Provokacija

28 diena

Nuo kito paveiktų ir kontrolinių gyvūnų šono pašalinami plaukai. Uždaru tvarstymu skiautė arba apdangalas su 0,5 ml tiriamosios medžiagos, kurios maksimali koncentracija yra nedirginanti, dedama ant tiriamo gyvūno užpakalinės šono dalies. Uždaru tvarstymu skiautė arba apdangalas tik su tirpikliu dedamas ant priekinės šono dalies.

Uždaro tvarstymo skiautės laikomos sąlytyje 6 valandas.

Kontrolinė grupė paveikiama tokiu pat būdu.

29 ir 30 dienos

— praėjus 21 valandai po skiautės nuėmimo, provokacijos zona nuvaloma ir prireikus pašalinami plaukai,

— dar po trijų valandų (praėjus 30 valandų nuo provokacijos pradžios) stebima ir užregistruojama odos reakcija,

— praėjus 24 valandoms nuo šio stebėjimo, atliekamas ir užregistruojamas antras stebėjimas.

1.6.2.3.3. Stebėjimas ir odos reakcijų intensyvumo vertinimas

Visos odos reakcijos ir bet kokie neįprasti duomenys, gauti po indukcijos ir provokacijos, turėtų būti registruojami ir pateikiami ataskaitoje.

Tokios metodikos kaip odos raukšlės histopatologiniai tyrimai arba storio matavimai gali būti naudojamos išsiaiškinant abejotinas reakcijas, kurias sunku nustatyti dėl odos nusidažymo tiriamąja medžiaga.

2. **DUOMENYS (GPMT ir Buehler bandymas)**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėje, nurodant kiekvieno gyvūno odos reakciją kiekvieno stebėjimo metu.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS (GPMT ir Buehler bandymas)**

3.1. BANDYMO ATASKAITA (GPMT ir Buehler bandymas)

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— naudotų jūros kiaulyčių veislė;

— bandymo sąlygos, tirpiklio ir tiriamosios medžiagos koncentracijos, naudotos atliekant indukcijas ir provokacijas;

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis;

— kiekvieno gyvūno svoris bandymo pradžioje ir pabaigoje;

— visi stebėjimai, atlikti su kiekvienu gyvūnu, taip pat odos reakcijos intensyvumo vertinimo sistema, jeigu tokia naudota;

— duomenų aptarimas;

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS (GPMT ir Buehler bandymas)

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

B.7. KARTOTINŲ DOZIŲ (28 DIENOS) TOKSIŠKUMAS (ORALINIS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAI

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Tiriamoji medžiaga įvedama per virškinamąjį traktą kiekvieną dieną padalytomis dozėmis kelioms grupėms eksperimentinių gyvūnų, viena dozė – vienai grupei per 28 dienų laikotarpį. Visą šį laikotarpį gyvūnai stebimi kiekvieną dieną toksiškumo požymiams nustatyti. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama autopsija, ir bandymo pabaigoje išlikusiems gyvūnams atliekama autopsija.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Gyvūnai laikomi eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki bandymo. Prieš bandymą sveiki jauni gyvūnai randomizuojami ir paskiriami į poveikio grupes. Tiriamoji medžiaga gali būti įvedama su pašaru, pro skrandžio zondą, kapsulėmis arba su geriamuoju vandeniu. Visiems gyvūnams dozės įvedamos tokiu pat būdu viso eksperimento vykdymo metu. Jeigu dozių įvedimui palengvinti naudojamas tirpiklis arba kiti priedai, turėtų būti žinoma, kad jie nesukels toksiškų poveikių. Jeigu reikia, gali būti naudojami ankstesnių bandymų duomenys.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Jeigu nėra kontraindikacijų, pirmenybė atiduodama žiurkėms. Paprastai naudojamos įprastos jaunų sveikų gyvūnų laboratorinės veislės, ir geriausia būtų, kad dozės būtų įvedamos prieš žiurkėms sulaukiant šešių savaičių ir jokiu būdu ne vyresnėms kaip 8 savaičių.

Bandymą užbaigus, naudotų gyvūnų svorio skirtumas neturėtų viršyti ± 20 % atitinkamo vidutinio svorio.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienai dozei turėtų būti naudojama ne mažiau 10 gyvūnų (penkios patelės ir penki patinėliai). Patelės turėtų būti neturėjusios jauniklių ir būti nevaikingos. Jeigu planuojami tarpiniai nužudymai, gyvūnų skaičius turėtų būti padidinamas tokiu gyvūnų skaičiumi, kurį planuojama nužudyti iki bandymo pabaigos. Be to, papildoma 10 gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus) gali būti paveikiama didelėmis dozėmis 28 dienas ir po poveikio 14 dienų stebimi toksinio poveikio grįžtamumo, stabilumo arba uždelsto atsiradimo požymiai. Taip pat naudojama papildoma 10 kontrolinių gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus).

1.6.2.3. *Dozės*

Turėtų būti naudojamos ne mažiau kaip trys dozės ir viena kontrolinė grupė. Išskyrus tuos atvejus, kai paveikiama tiriamąja medžiaga, su kontrolinės grupės gyvūnais turėtų būti elgiamasi visiškai taip pat, kaip ir su bandomosios grupės objektais. Jeigu dozavimui palengvinti naudojamas tirpiklis, kontrolinei grupei turi būti skiriamos tokios pat dozės su tirpikliu, kokio skiriamos veikiamai grupei, ir ji turi gauti tokį patį tirpiklio kiekį, kurį gauna didžiausios dozės grupė. Didžiausia dozė turėtų sukelti toksiškumo poveikį, bet neturi būti miršta mumo arba tik kelių tokių atvejų priežastimi. Mažiausia dozė neturėtų sukelti jokio toksiškumo požymio. Jeigu yra praktinis poveikio žmogui įvertinimas, mažiausia dozė jį turėtų viršyti. Geriausia, jeigu vidurinė dozė galėtų sukelti mažiausius pastebimus toksiškumo poveikius. Jeigu naudojama daugiau negu viena tarpinė dozė, dozės turėtų būti išskirstomos intervalais taip, kad susidarytų toksiškų poveikių intensyvumo vertinimo skalė. Mažų ir tarpinių dozių bei kontrolinėje grupėse nugaišimo atvejų dažnumas turėtų būti nedidelis, kad būtų galima prasmingai įvertinti rezultatus.

Jeigu tiriamoji medžiaga įvedama su pašaru, gali būti naudojama arba pastovi pašaro davinio koncentracija (ppm arba mg/kg maisto), arba pastovios dozės gyvūno kūno svorio atžvilgiu; kitoks naudojimas turi būti pagrindžiamas. Jeigu medžiaga įvedama zondu, dozė turėtų būti įvedama panašiais intervalais kiekvieną dieną ir dozės turėtų būti duodamos tokiais intervalais (kas savaitę arba du kartus per savaitę), kad būtų išlaikoma pastovi dozė gyvūno kūno svorio atžvilgiu.

1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu 28 dienų bandymas, atliktas pagal toliau išsamiai apibūdintą metodą naudojant vieną dozę 1 000 mg/kg kūno svorio per dieną arba didesnę dozę, susijusią su tikėtinu poveikiu žmogui, kai toks yra žinomas, nesukelia toksiškumo, laikoma, kad bandymo nereikia tęsti. Silpnai toksiškų medžiagų atvejais svarbu užtikrinti, kad konkrečios tiriamosios medžiagos, įvedamos su pašaru, kiekiai ir kitos savybės, atitiktų normalius mitybos reikalavimus.

1.6.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, toksiškumo požymiai registruojami įtraukiant jų atsiradimo laiką, laipsnį ir trukmę. Turėtų būti registruojamas nugaišimo laikas ir laikas, kada atsirado ir išnyko toksiškumo požymiai.

1.6.3. **Darbo eiga**

Gyvūnai 28 dienų laikotarpiu nuo penkių iki septynių dienų per savaitę kiekvieną dieną yra veikiami tiriamąja medžiaga. Gyvūnai, esantys bet kurioje papildomoje grupėje, kuri toliau stebima, turėtų būti laikomi dar 14 dienų neatliekant bandymų, kad būtų galima nustatyti atsigavimą po toksiškų poveikių arba tokių poveikių išsilaikymą.

Turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir akies gleivinės pokyčiai, taip pat kvėpavimo, kraujo apytakos, vegetacinės ir centrinės nervų sistemų pokyčiai, somatomotorinės veiklos ir elgsenos sutrikimai.Kiekvieną savaitę turėtų būti matuojamas suvartoto pašaro kiekis (taip pat suvartojamo vandens kiekis, jeigu medžiaga įvedama su geriamuoju vandeniu), gyvūnai turėtų būti sveriami kiekvieną savaitę.

Reguliarus gyvūnų stebėjimas yra reikalingas tam, kad būtų užtikrinama, jog kiek įmanoma bus stengiamasi neprarasti gyvūnų dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė arba dėl netinkamo taikymo metodo. Bandymo laikotarpio pabaigoje išlikusiems gyviems nepagalbinio poveikio grupių gyvūnams atliekama autopsija. Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kenčiantys dideles kančias ar skausmą, kai tai pastebima, turėtų būti pašalinami, humaniškai nužudomi ir atliekama autopsija.

Bandymo pabaigoje gyvūnams, taip pat ir kontroliniams, atliekami tokie tyrimai:

1. hematologija, taip pat bent jau kraujo kūnelių, hemoglobino koncentracijos, eritrocitų kiekio apskaičiavimas, visas ir diferencinis leukocitų kiekis ir krešėjimo matavimas;

2. klinikinė kraujo biochemija, taip pat įtraukiant ne mažiau kaip vieną kepenų ir inkstų funkcijų parametrą: alanino aminotransferazė (anksčiau žinoma kaip glutamo piruvo transaminazė), aspartato aminotransferazės serumas (anksčiau žinomas kaip glutamo oksalato transminazė), šlapimo azotas, albuminas, kraujo kreatininas, visas bilirubino kiekis ir visas serumo baltymų kiekis.

Kitus tyrimus, kurie gali būti reikalingi kompetentingam toksikologiniam įvertinimui atlikti, sudaro kalcio, fosforo, chloro, natrio, kalio, badavimo gliukozės nustatymas, lipidų, hormonų, rūgščių ir šarmų pusiausvyros, methemoglobino, cholinesterazės aktyvumo analizė.

Atitinkamais atvejais gali būti naudojama papildoma klinikinė biochemija stebėtų poveikių tyrinėjimui išplėsti.

1.6.3.1. *Bendroji nekroskopija*

Visiems bandomiems gyvūnams turi būti atliekama visa bendroji nekroskopija. Bent jau kepenys, inkstai, antinksčiai ir sėklidės turėtų būti pasveriami drėgni tuojau pat po skrodimo, kad neišdžiūtų. Organai ir audiniai (kepenys, inkstai, blužnis, sėklidės, antinksčiai, širdis ir bet kurie kiti organai, kurie turi didelių matomų pažeidimų arba kurių dydis pasikeitęs) turėtų būti konservuojami atitinkamoje terpėje galimam histopatologiniam ištyrimui ateityje.

1.6.3.2. *Histopatologinis ištyrimas*

Didelių dozių grupėje ir kontrolinėje grupėje turėtų būti atliekamas užkonservuotų organų ir audinių histologinis ištyrimas. Organai ir audiniai, kurie turi defektų, atsirandančių įvedus didžiausias tiriamosios medžiagos dozes, turėtų būti ištiriami visose mažesnių dozių grupėse. Visų papildomų grupių gyvūnai turėtų būti ištiriami histologiškai, ypatingą dėmesį skiriant tiems organams ir audiniams, jeigu nustatyta, kad kitose paveiktose grupėse tie poveikiai pasireiškė.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai bandomai grupei nurodant gyvūnų skaičių bandymo pradžioje ir gyvūnų, kuriems atsirado kiekvienos rūšies pakenkimų, skaičių.

Visi stebėti rezultatai turėtų būti įvertinami naudojant atitinkamą statistikos metodą. Gali būti naudojamas bet kuris pripažintas statistikos metodas.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.;

— bandymo sąlygos;

— dozės (nurodant tirpiklį, jeigu naudojamas) ir koncentracijos;

— duomenys apie toksines reakcijas pagal lytį ir dozę;

— poveikio nesukelianti dozė, jeigu įmanoma;

— nugaišimo laikas bandymo metu arba ar gyvūnai išgyveno iki jo pabaigos;

— toksiški ir kiti poveikiai;

— visų nenormalių požymių pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga;

— duomenys apie pašarą ir kūno svorį;

— naudoti hematologiniai bandymai ir visi rezultatai;

— naudoti klinikinės biochemijos bandymai ir visi rezultatai;

— nekroskopijos duomenys;

— išsamus visų histopatologinių duomenų aprašymas;

— statistinis duomenų apdorojimas, atitinkamais atvejais;

— duomenų aptarimas;

— duomenų aiškinimas;

3.2. DUOMENŲ VERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

B.8. KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENOS) TOKSIŠKUMAS (INHALIACINIS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Naudinga turėti išankstinę informaciją apie medžiagos dalelių dydžio pasiskirstymą, garų slėgį, lydymosi temperatūrą, virimo temperatūrą, pliūpsnio temperatūrą ir sprogumą (atitinkamais atvejais).

Taip pat žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Kelios eksperimentinių gyvūnų grupės kiekvieną dieną apibrėžtu laikotarpiu yra paveikiamos tiriamąja medžiaga suskirstytomis koncentracijomis, viena koncentracija naudojama vienai grupei 28 dienas. Jeigu tirpiklis naudojamas tam, kad būtų lengviau gaunama atitinkama tiriamosios medžiagos koncentracija aplinkoje, turėtų būti naudojama kontrolinė tirpiklio grupė. Medžiagos įvedimo laikotarpiu gyvūnai stebimi kiekvieną dieną toksiškumo požymiams nustatyti. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama autopsija, o bandymui pasibaigus, išlikusiems gyviems gyvūnams daroma autopsija.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Gyvūnai laikomi eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki eksperimento pradžios. Prieš bandymą sveiki jauni gyvūnai randomizuojami ir suskirstomi į reikalingą skaičių grupių. Tam tikrais atvejais į tiriamąją medžiagą gali būti dedama atitinkamo tirpiklio, kad būtų lengviau gaunama atitinkama medžiagos koncentracija aplinkoje. Jeigu tirpiklis arba kiti priedai naudojami dozavimui palengvinti, turi būti žinoma, kad jie nesukelia toksiškų poveikių. Atitinkamais atvejais gali būti naudojami ankstesnių bandymų duomenys.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Jeigu nėra kontraindikacijų, pirmenybė atiduodama žiurkėms. Naudojamos įprastų laboratorinių veislių jauni, sveiki gyvūnai.

Bandymą užbaigus naudotų gyvūnų svorio pokyčiai neturėtų viršyti ± 20 % atitinkamo vidutinio svorio.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienoje bandymo grupėje turėtų būti naudojama ne mažiau 10 gyvūnų (penkios patelės ir penki patinėliai). Patelės turėtų būti neturėjusios jauniklių ir būti nevaikingos. Jeigu planuojami tarpiniai nužudymai, gyvūnų skaičius turėtų būti padidinamas tokiu gyvūnų skaičiumi, kuris buvo planuojamas nužudyti iki bandymo pabaigos. Be to, papildoma 10 gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus) gali būti paveikiama didele koncentracija 28 dienas ir po poveikio 14 dienų stebimi toksinių poveikių grįžtamumo, stabilumo arba uždelsto atsiradimo požymiai. Taip pat naudojama papildoma kontrolinė 10 gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus).

1.6.2.3. *Poveikio koncentracija*

Turi būti ne mažiau kaip trys tiriamosios medžiagos koncentracijos ir viena kontrolinė arba tirpiklio kontrolinė grupė (atitinkanti didžiausios dozės tirpiklio koncentraciją), jeigu naudojamas tirpiklis. Išskyrus tuos atvejus, kai paveikiama tiriamąja medžiaga, su kontrolinės grupės gyvūnais turėtų būti elgiamasi visiškai taip pat, kaip su bandomosios grupės gyvūnais. Didžiausia koncentracija turėtų sukelti toksiškumo, poveikį, bet neturi būti mirštamumo arba tik kelių tokių atvejų priežastimi. Mažiausia koncentracija neturėtų sukelti jokio toksiškumo požymio. Jeigu yra praktinis poveikio žmogui įvertinimas, mažiausia dozė jį turėtų viršyti. Geriausia, jeigu vidurinė dozė galėtų sukelti mažiausius pastebimus toksiškumo poveikius. Jeigu naudojama daugiau negu viena tarpinė dozė, dozės turėtų būti išskirstomos intervalais taip, kad toksiškus poveikius būtų galima grupuoti. Mažų ir tarpinių dozių bei kontrolinėje grupėse žūties atvejų paplitimas turėtų būti nedidelis, kad būtų galima prasmingai įvertinti rezultatus.

1.6.2.4. *Poveikio trukmė*

Kiekvienos dienos poveikio trukmė turėtų būti šešios valandos, bet gali būti reikalingi kitokie laikotarpiai, kad atitiktų specialius reikalavimus.

1.6.2.5. *Įrenginiai*

Gyvūnai turėtų būti bandomi inhaliacinėje įrangoje, sukonstruotoje taip, kad būtų išlaikomas dinaminis oro srautas, kuriam esant per valandą oras pasikeičia ne mažiau kaip 12 kartų, užtikrinant pakankamą deguonies kiekį ir vienodą poveikio atmosferos pasiskirstymą. Jeigu naudojama kamera, ji turėtų būti taip suprojektuota, kad bandomieji gyvūnai nesibūriuotų ir kad įkvepiant tiriamosios medžiagos būtų kiek įmanoma padidintas poveikis. Paprastai, norint užtikrinti kameros atmosferos pastovumą, visas bandomųjų gyvūnų „tūris“ neturėtų viršyti 5 proc. bandymo kameros tūrio. Gali būti naudojamas burnos ir nosies, tik galvos arba atskirai viso kūno poveikis kameroje; du pirmieji sumažins kitais dviem atvejais sunaudojamą kiekį.

1.6.2.6. *Stebėjimo laikotarpis*

Toksiškumo požymiai eksperimentiniams gyvūnams turėtų būti stebimi kiekvieną dieną viso poveikio metu ir sveikimo laikotarpiu. Nugaišimo s laikas ir tas laikas, kai pasireiškia ir išnyksta toksiškumo požymiai, turėtų būti registruojamas.

1.6.3. **Darbo eiga**

Gyvūnai 28 dienų laikotarpiu nuo penkių iki septynių dienų per savaitę kiekvieną dieną yra veikiami tiriamąja medžiaga. Gyvūnai, esantys bet kurioje papildomoje grupėje, kuri toliau stebima, turėtų būti laikomi dar 14 dienų neatliekant bandymų, kad būtų galima nustatyti atsigavimą po toksiškų poveikių arba tokių poveikių išsilaikymą. Temperatūra, kuriai esant vykdomas bandymas, turėtų būti palaikoma 22 ± 3ºC.

Tinkamiausias santykinis drėgnumas yra tarp 30 ir 70 %, bet tam tikrais atvejais (pvz., atliekant tam tikrų aerozolių bandymus) tai gali būti neįgyvendinama. Išlaikant kameros viduje nedidelį neigiamą slėgį (≤ 5 mm vandens), tiriamoji medžiaga negalės patekti į aplinką. Poveikio metu neturi būti duodama pašaro ir vandens.

Turėtų būti naudojama dinaminė inhaliacijos sistema, kartu su atitinkama analizės koncentracijos kontrolės sistema. Tinkamas poveikio koncentracijas rekomenduojama nustatyti bandomuoju tyrimu. Oro srautas turėtų būti nustatomas taip, kad poveikio kameroje būtų užtikrinamos vienarūšės sąlygos. Tokia sistema turėtų užtikrinti, kad kaip galima greičiau būtų nustatomos pastovios poveikio sąlygos.

Turėtų būti matuojama arba kontroliuojama:

a) oro srauto greitis (nenutrūkstamai);

b) tikroji tiriamosios medžiagos koncentracija, matuojama kvėpavimo zonoje. Kasdieninio poveikio laikotarpiu koncentracija neturėtų svyruoti daugiau negu ± 15 % vidutinės vertės. Tačiau tam tikrų aerozolių atveju šio kontrolės lygio neįmanoma pasiekti, tada būtų priimtinas platesnis intervalas. Viso bandymo metu kiekvienos dienos koncentracijos turėtų būti, kiek tai praktiškai įmanoma, išlaikomos pastovios. Aerozoliams ne mažiau kaip viena dalelių dydžio analizė turėtų būti atliekama kiekvienai bandomajai grupei per savaitę;

c) temperatūra ir drėgnumas, jeigu įmanoma nenutrūkstamai.

Poveikio metu ir po jo vykdomi nuolatiniai stebėjimai ir registravimas; kiekvienam gyvūnui turėtų būti daromi atskiri įrašai. Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, o toksiškumo požymiai registruojami nurodant pasireiškimo laiką, jų laipsnį ir trukmę. Turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir akies gleivinės pokyčiai, taip pat kvėpavimo, kraujo apytakos, vegetacinės ir centrinės nervų sistemų pokyčiai, somatomotorinės veiklos ir elgsenos sutrikimai. Kiekvieną savaitę turėtų būti nustatomas gyvūnų svoris. Taip pat rekomenduojama kiekvieną savaitę matuoti suvartoto pašaro kiekį. Reguliarus gyvūnų stebėjimas yra reikalingas tam, kad būtų užtikrinama, jog kiek įmanoma bus stengiamasi bandymo metu neprarasti gyvūnų dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė arba dėl netinkamo taikymo metodo. Bandymo laikotarpio pabaigoje išlikusiems gyviems nepagalbinio poveikio grupių gyvūnams atliekama autopsija. Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kenčiantys dideles kančias ar skausmą, kai tai pastebima, turėtų būti pašalinami, humaniškai nužudomi ir atliekama autopsija.

Bandymo pabaigoje visiems gyvūnams, taip pat ir kontroliniams, atliekami tokie tyrimai:

i) hematologija, taip pat bent jau kraujo kūnelių, hemoglobino koncentracijos, eritrocitų kiekio apskaičiavimas, visas ir diferencinis leukocitų kiekis ir krešėjimo matavimas;

ii) klinikinė kraujo biochemija, taip pat įtraukiant ne mažiau kaip vieną kepenų ir inkstų funkcijų parametrą: alanino aminotransferazės serumas (anksčiau žinomas kaip glutamo piruvo transaminazė), aspartato aminotransferazės serumas (anksčiau žinomas kaip glutamo oksalato transminazė), šlapimo azotas, albuminas, kraujo kreatininas, visas bilirubino kiekis ir visas serumo baltymų kiekis.

Kitus nustatymus, kurie gali būti reikalingi kompetentingam toksikologiniam įvertinimui atlikti, sudaro kalcio, fosforo, chloro, natrio, kalio, badavimo gliukozės nustatymas, lipidų, hormonų, rūgščių ir šarmų pusiausvyros, methemoglobino, cholinesterazės aktyvumo analizė.

Atitinkamais atvejais gali būti naudojama papildoma klinikinė biochemija stebėtų toksiškumo poveikių tyrinėjimui išplėsti.

1.6.3.1. *Bendroji nekroskopija*

Visiems bandymo gyvūnams turi būti atliekama visa bendroji nekroskopija. Bent jau kepenys, inkstai, antinksčiai, plaučiai ir sėklidės turėtų būti pasveriami drėgni tuojau pat po skrodimo, kad neišdžiūtų. Organai ir audiniai (kvėpavimo traktas, kepenys, inkstai, blužnis, sėklidės, antinksčiai, širdis ir visi kiti organai, kurie turi didelių matomų pažeidimų arba kurių dydis pasikeitęs) turėtų būti konservuojami atitinkamoje terpėje galimam histopatologiniam ištyrimui ateityje. Plaučiai turėtų būti išimami sveiki, pasveriami ir apdorojami atitinkamu fiksatyvu užtikrinant, kad bus išsaugota plaučių struktūra.

1.6.3.2. *Histopatologinis ištyrimas*

Didelių koncentracijų grupėje ir kontrolinėje grupėje(-se) turėtų būti atliekamas užkonservuotų organų ir audinių histologinis ištyrimas. Organai ir audiniai, pažeisti tiriamosios medžiagos, kuri įvesta didžiausiomis dozėmis, turėtų būti ištiriami visose mažesnių dozių grupėse. Visų papildomų grupių gyvūnai turėtų būti ištiriami histologiškai, ypatingą dėmesį skiriant tiems organams ir audiniams, kuriems nustatyta, kad kitose paveiktose grupėse tie poveikiai pasireiškė.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, nurodant gyvūnų skaičių kiekvienos grupės bandymo pradžioje ir gyvūnų, kuriems atsirado kiekvienos rūšies pakenkimų, skaičių.

Visi stebėti rezultatai turėtų būti įvertinami naudojant atitinkamą statistikos metodą. Gali būti naudojamas bet kuris pripažintas statistikos metodas.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.;

— bandymo sąlygos;

Poveikio aparato apibūdinimas bei brėžinys, tipas, matmenys, taip pat oro šaltinis, aerozolių generavimo sistema, oro kondicionavimo metodas ir gyvūnų laikymo sąlygų bandymo kameroje, jeigu tokia naudojama, apibūdinimas. Turėtų būti apibūdinama temperatūra, drėgnumo matavimo įranga ir atitinkamais atvejais aerozolio koncentracijų pastovumas ir dalelių dydžio pasiskirstymas.

Duomenys apie poveikį

Jie turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidutines vertes ir kintamumo vienetus (t. y. standartinis nuokrypis) ir, jeigu įmanoma, į juos turėtų įtraukiami:

a) oro srauto, tekančio per inhaliacijos įrenginį, greitis;

b) oro temperatūra ir drėgnumas;

c) nominalios koncentracijos (visas tiriamos medžiagos kiekis, įdėtas į inhaliacijos įrenginį, padalytas iš oro tūrio);

d) tirpiklio rūšis, jeigu naudotas;

e) faktinės koncentracijos bandymo kvėpavimo zonoje;

f) masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAD) ir geometrinis standartinis nuokrypis (GSD);

— duomenys apie toksinę reakciją pagal lytį ir koncentraciją;

— nugaišimo laikas poveikio metu arba nurodant, ar gyvūnai išgyveno iki pabaigos;

— toksiškų arba kitokių poveikių apibūdinimas; poveikių nesukeliančios koncentracijos;

— kiekvieno ypatingo požymio stebėjimo laikas ir tolesnė jo eiga;

— duomenys apie maistą ir kūno svorį;

— naudoti hematologiniai bandymai ir jų rezultatai;

— naudoti klinikiniai biocheminiai bandymai ir jų rezultatai;

— autopsijos duomenys;

— išsamus visų histopatologinių duomenų aprašymas;

— statistinis duomenų apdorojimas, jeigu įmanomas;

— duomenų aptarimas;

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

B.9. KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENOS) TOKSIŠKUMAS (PER ODĄ)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAI

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Tiriamoji medžiaga 28 dienas kiekvieną dieną dedama ant odos pamatuotomis dozėmis kelioms eksperimentinių gyvūnų grupėms, viena dozė – vienai grupei. Poveikio metu gyvūnai stebimi kiekvieną dieną toksiškumo požymiams nustatyti. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama autopsija, bandymą užbaigus likusiems gyviems gyvūnams atliekama autopsija.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Gyvūnai laikomi eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki eksperimento pradžios. Prieš bandymą sveiki jauni gyvūnai randomizuojami ir paskiriami į poveikio ir kontrolines grupes. Prieš pat bandymą nuo bandomųjų gyvūnų kūno sprando srityje nukerpamas kailis. Galima ir skusti, bet tai turėtų būti atliekama apytikriai prieš 24 valandas iki bandymo. Pakartotinai kirpti arba skusti paprastai reikia apytikriai kas savaitę. Jeigu kailis kerpamas arba skutamas, reikia stengtis nenubrūžinti odos. Tiriamajai medžiagai uždėti turėtų būti nukerpama ne mažiau kaip 10 % proc. kūno paviršiaus. Turėtų būti atsižvelgiama į gyvūno kūno svorį, nusprendžiant, koks plotas turėtų būti be kailio, ir į apdangalo dydį. Jeigu bandomos kietosios medžiagos, kurios prireikus gali būti pulverizuojamos, tiriamoji medžiaga turėtų būti pakankamai sudrėkinama vandeniu arba, tam tikrais atvejais, atitinkamu tirpikliu, kad būtų užtikrinamas geras sąlytis su oda. Skystos tiriamosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos. Dedamos nuo penkių iki septynių kartų per savaitę.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Gali būti naudojamos suaugusios žiurkės, triušiai arba jūrų kiaulytės. Gali būti naudojamos kitos rūšys, bet jų naudojimas turėtų būti pagrindžiamas.

Bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio pakitimo intervalas neturėtų viršyti ± 20 % atitinkamo vidutinio svorio.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienai dozei turėtų būti naudojama ne mažiau 10 gyvūnų (penkios patelės ir penki patinėliai), turinčių sveiką odą. Patelės turėtų būti neturėjusios jauniklių ir būti nevaikingos. Jeigu planuojami tarpiniai nužudymai, gyvūnų skaičius turėtų būti padidinamas tokiu gyvūnų skaičiumi, kuris buvo planuojamas nužudyti iki bandymo pabaigos. Be to, papildoma 10 gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus) gali būti veikiama didele doze 28 dienas ir po poveikio 14 dienų stebimi toksinio poveikio grįžtamumo, stabilumo arba uždelsto atsiradimo požymiai. Taip pat naudojama papildoma 10 kontrolinių gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus).

1.6.2.3. *Dozės*

Reikalingos ne mažiau kaip trys dozės, kontrolinė grupė arba tirpiklio kontrolinė grupė, jeigu naudojamas tirpiklis. Poveikio laikas turėtų būti ne trumpesnis kaip šešios valandos per dieną. Tiriamoji medžiaga turėt būti uždedama panašiu laiku kiekvieną dieną ir intervalai (kas savaitę arba kas dvi savaites) suderinami taip, kad gyvūno kūno svorio atžvilgiu būtų išlaikoma pastovi dozė. Išskyrus tuos atvejus, kai paveikiama tiriamąja medžiaga, su kontrolinės grupės gyvūnais turėtų būti elgiamasi visiškai taip pat, kaip ir su bandomosios grupės objektais. Jeigu dozavimui palengvinti naudojamas tirpiklis, kontrolinei grupei turi būti skiriamos tokios pat dozės su tirpikliu, kokio skiriamos veikiamai grupei, ir ji turi gauti tokį patį tirpiklio kiekį, kurį gauna didžiausios dozės grupė. Didžiausia dozė turėtų sukelti toksiškumo poveikį, bet neturi būti mirštamumo arba tik kelių tokių atvejų priežastimi. Mažiausia dozė neturėtų sukelti jokių toksiškumo požymių. Jeigu yra praktini poveikio žmogui įvertinimas, mažiausia dozė jį turėtų viršyti. Geriausia, jeigu vidurinė dozė galėtų sukelti mažiausius pastebimus toksiškus poveikius. Jeigu naudojama daugiau negu viena tarpinė dozė, dozės turėtų būti išskirstomos intervalais taip, kad susidarytų toksiškų poveikių intensyvumo vertinimo skalė. Mažų ir tarpinių dozių bei kontrolinėse grupėse nugaišimo atvejų dažnumas turėtų būti nedidelis, kad būtų galima prasmingai įvertinti rezultatus.

Jeigu tiriamoji medžiaga sukelia stiprų odos dirginimą, koncentracijos turėtų būti sumažinamos, ir dėl to, naudojant dideles dozes, turėtų susilpnėti kiti toksiški poveikiai arba jų nebūti. Be to, jeigu oda labai stipriai pažeidžiama, reikia bandymą nutraukti ir pradėti naują bandymą naudojant mažesnių koncentracijų dozes.

1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu išankstinis bandymas naudojant 1 000 mg/kg dozę arba didesnę dozę, susijusią su tikėtinu poveikiu žmogui, jeigu toks žinomas, nesukelia aiškaus toksiškumo, laikoma, kad bandymo nereikia tęsti.

1.6.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Eksperimentiniai gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, ar neatsiranda toksiškumo požymių. Turėtų būti registruojamas nugaišimo laikas ir laikas, kada atsirado ir išnyko toksiškumo požymiai.

1.6.3. **Darbo eiga**

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Gyvūnai yra paveikiami tiriamąja medžiaga, geriausiai – 28 dienas septynias dienas per savaitę. Gyvūnai, esantys bet kurioje papildomoje grupėje, kuri toliau stebima, turėtų būti laikomi dar 14 dienų neatliekant bandymų, kad būtų galima nustatyti atsigavimą po toksiškų poveikių arba tokių poveikių išsilaikymą. Poveikio laikas neturėtų būti trumpesnis kaip šešios valandos per dieną.

Tiriamoji medžiaga turėtų būti tolygiai uždedama ant plotelio, kurio dydis sudaro apie 10 % viso kūno paviršiaus. Jeigu medžiagos labai toksiškos, paveikiamas paviršius gali būti mažesnis, bet kaip galima didesnis plotas turėtų būti padengiamas kiek įmanoma plonesniu ir vienodu sluoksniu.

Tiriamoji medžiaga turėtų liestis su oda akytu marlės tvarsčiu ir nedirginančia lipnia juostele. Tiriamoji vieta ir toliau turėtų būti atitinkamai padengta, kad būtų išsaugotas marlės tvarstis ir tiriamoji medžiaga bei užtikrinama, kad gyvūnai nepraris tiriamosios medžiagos. Gali būti naudojami ribotuvai, kad tiriamoji medžiaga nebūtų praryjama, bet visiško imobilizavimo metodas nerekomenduojamas. Gali būti taikomas ir „apsauginio antkaklio“ metodas.

Poveikio laikotarpio pabaigoje tiriamosios medžiagos likutis turėtų būti nuimamas, jeigu tai praktiškai įvykdoma – naudojant vandenį ar kokį kitą atitinkamą odos valymo būdą.

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, o toksiškumo požymiai registruojami nurodant pasireiškimo laiką, jų laipsnį ir trukmę. Turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir akies gleivinės pokyčiai, taip pat kvėpavimo, kraujo apytakos, vegetacinės ir centrinės nervų sistemų pokyčiai, somatomotorinės veiklos ir elgsenos sutrikimai. Kiekvieną savaitę turėtų būti nustatomas gyvūnų svoris. Taip pat rekomenduojama kiekvieną savaitę matuoti suvartoto pašaro kiekį. Reguliarus gyvūnų stebėjimas yra reikalingas tam, kad būtų užtikrinama, jog kiek įmanoma bus stengiamasi neprarasti gyvūnų dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė arba dėl netinkamo taikymo metodo. Bandymo laikotarpio pabaigoje išlikusiems gyviems nepagalbinio poveikio grupių gyvūnams atliekama autopsija. Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kenčiantys dideles kančias ar skausmą, kai tai pastebima, turėtų būti pašalinami, humaniškai nužudomi ir atliekama autopsija.

Bandymo pabaigoje visiems gyvūnams, taip pat ir kontroliniams atliekami tokie tyrimai:

i) hematologija, taip pat bent jau kraujo kūnelių, hemoglobino koncentracijos, eritrocitų kiekio apskaičiavimas, visas ir diferencinis leukocitų kiekis ir krešėjimo matavimas;

ii) klinikinė kraujo biochemija, taip pat įtraukiant ne mažiau kaip vieną kepenų ir inkstų funkcijų parametrą: alanino aminotransferazės serumas (anksčiau žinomas kaip glutamo piruvo transaminazė), aspartato aminotransferazės serumas (anksčiau žinomas kaip glutamo oksalato transminazė), šlapimo azotas, albuminas, kraujo kreatininas, visas bilirubino kiekis ir visas serumo baltymų kiekis.

Kitus tyrimus, kurie gali būti reikalingi kompetentingam toksikologiniam įvertinimui atlikti, sudaro kalcio, fosforo, chloro, natrio, kalio, badavimo gliukozės nustatymas, lipidų, hormonų, rūgščių/šarmų pusiausvyros, methemoglobino, cholinesterazės aktyvumo analizė.

Atitinkamais atvejais gali būti naudojama papildoma klinikinė biochemija stebėtų toksiškumo poveikių tyrinėjimui išplėsti.

1.6.4. **Bendroji nekroskopija**

Visiems bandomiems gyvūnams turėtų būti atliekama visa bendroji nekroskopija. Bent jau kepenys, inkstai, antinksčiai ir sėklidės turėtų būti pasveriami drėgni tuojau pat po skrodimo, kad neišdžiūtų. Organai ir audiniai (tai yra tie organai, kurie turi didelių matomų pakenkimų arba kurių dydis pakitęs) turėtų būti konservuojami atitinkamoje terpėje galimam histopatologiniam ištyrimui ateityje.

1.6.5. **Histopatologinis ištyrimas**

Didelių dozių grupėje ir kontrolinėje grupėje turėtų būti atliekamas užkonservuotų organų ir audinių histologinis ištyrimas. Organai ir audiniai, kurie turi defektų, atsirandančių įvedus didžiausias tiriamosios medžiagos dozes, turėtų būti ištiriami visose mažesnių dozių grupėse. Papildomos grupės gyvūnai turėtų būti ištiriami histologiškai, ypatingą dėmesį skiriant tiems organams ir audiniams, jeigu nustatyta, kad kitose paveiktose grupėse tie poveikiai pasireiškė.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai bandomai grupei nurodant gyvūnų skaičių bandymo pradžioje ir gyvūnų, kuriems atsirado kiekvienos rūšies pakenkimų, skaičių.

Visi stebėti rezultatai turi būti įvertinami naudojant atitinkamą statistikos metodą. Gali būti naudojamas bet kuris pripažintas statistikos metodas.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— duomenys apie gyvūnus (rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.);

— bandymo sąlygos (taip pat tvarstymo būdas: uždaras ar neuždaras);

— dozės (nurodant tirpiklį, jeigu naudotas) ir koncentracijos;

— poveikio nesukelianti dozė, jeigu įmanoma;

— duomenys apie toksines reakcijas pagal lytį ir dozę;

— nugaišimo laikas bandymo metu arba nurodant, ar gyvūnas išgyveno iki pabaigos;

— toksiški arba kitokie poveikiai;

— visų nenormalių požymių pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga;

— duomenys apie pašarą ir kūno svorį;

— naudoti hematologiniai bandymai ir jų rezultatai;

— naudoti klinikiniai biocheminiai bandymai ir jų rezultatai;

— nekroskopijos duomenys;

— išsamus visų histopatologinių duomenų aprašymas;

— statistinis duomenų apdorojimas, jeigu įmanomas;

— duomenų aptarimas;

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

B.10. MUTAGENIŠKUMAS (ŽINDUOLIŲ CITOGENETINIS BANDYMAS *IN VITRO*)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(C) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Citogenetinis bandymas *in vitro* – tai trumpalaikis mutageniškumo bandymas atsekti struktūrines chromosomų aberacijas kultūrinėse žinduolių ląstelėse. Gali būti naudojamos žinomų ląstelių eilių kultūros, taip pat ir pirminių ląstelių kultūros. Ląstelės kultūros, jas paveikus tiriamaisiais chemikalais su atitinkama metabolinio aktyvinimo sistema arba be jos, yra paveikiamos chromosomų dalijimosi inhibitoriumi, pavyzdžiui, kolchininu, kad ląstelės kauptųsi į metafazę panašioje mitozės stadijoje (c-metafazė). Ląstelės surenkamos atitinkamu laiku ir atliekamas chromosomų preparavimas. Preparatai dažomi ir metafazės ląstelės analizuojamos nustatant chromosomų nenormalumus.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

1.6.1.1. *Ląstelės*

Naudojamos žinomos ląstelių eilės arba pirminių ląstelių kultūros, pvz., kininio žiurkėno ląstelės ir žmogaus limfocitai. Tiriamoji medžiaga paruošiama kultūrinėje terpėje arba ištirpinama atitinkamuose tirpikliuose prieš ląsteles paveikiant.

1.6.1.2. *Metabolinio aktyvinimo sistema*

Ląstelės turėtų būti paveikiamos tiriamąja medžiaga tiek kartu su atitinkama metabolinio aktyvinimo sistema, tiek ir be jos. Plačiausiai naudojama sistema – tai postmitochondrinė frakcija, papildyta bendruoju faktoriumi, paruošta iš graužikų kepenų, apdorotų fermentų paveiktais reagentais.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

Kultūrų skaičius:

Kiekvienam eksperimentiniam taškui naudojamos ne mažesnės kaip dvigubos kultūros.

Neigiamos ir teigiamos kontrolės naudojimas:

Tirpikliai (jeigu tirpiklis nėra kultūrinė terpė arba vanduo), kepenų fermentų aktyvinimo mišinys, kepenų fermentų aktyvinimo mišinys ir tirpiklis bei nepaveiktos kontrolės yra naudojami kaip neigiamos kontrolės.

Į kiekvieną eksperimentą įtraukiama teigiama kontrolė; jeigu kepenų fermentų aktyvinimo mišinys yra naudojamas tiriamajam chemikalui aktyvinti, cheminis junginys, kuriam, kaip žinoma, reikalingas metabolinis aktyvinimas, turi būti naudojamas kaip teigiama kontrolė.

Dozės

Naudojamos ne mažiau kaip trys tiriamosios medžiagos dozės ne mažiau kaip vieno logaritmo dozių intervalu. Didžiausia dozė turėtų slopinti mitozės aktyvumą apytikriai 50 % arba turėtų atsirasti kiti citotoksiškumo požymiai. Jeigu tiriamoji medžiaga netoksiška, ji turėtų būti tiriama iki pasiekiama tirpumo riba arba iki maksimalios 5 mg/ml koncentracijos.

Kultūrų sąlygos:

Naudojama atitinkama kultūrinė terpė, inkubacinės sąlygos (pvz., temperatūra, kultūrai naudojami indai, CO_2 koncentracijos ir drėgnumas).

1.6.3. **Darbo eiga**

1.6.3.1. *Kultūrų paruošimas*

Žinomos ląstelių eilės: Ląstelės auginamos iš pagrindinių kultūrų (pvz., tripsinizuojant arba nukratant), pasėjamos kultūros induose atitinkamu tankiu 37 ^{0}C temperatūroje.

Žmogaus limfocitai: Visas heparinizuotas kraujas dedamas į kultūrinę terpę, kurioje yra fitohemaglutinino, veršelio fetalinio serumo ir antibiotikų, inkubuojama 37°C temperatūroje.

1.6.3.2. *Kultūrų apdorojimas tiriamuoju cheminiu junginiu*

i) *Apdorojimas nenaudojant kepenų fermentų aktyvinimo mišinio*

Jeigu įmanoma, visi poveikiai trunka ne mažiau kaip vieną visos ląstelės ciklą, o fiksavimo schemomis užtikrinama pirmųjų po poveikio mitozės ląstelių, paveiktų skirtingais ciklo etapais, analizė.

Jeigu poveikis neapima viso vienos ląstelės ciklo, fiksavimo laikas pasirenkamas ląstelių, esančių skirtinguose ląstelės ciklo etapuose poveikio metu, bandiniams imti, t.y. G_1, S ir G_2.

Tiriamasis chemikalas dedamas į žinomų ląstelių eilių kultūras, jeigu jos yra eksponentiniame augimo etape. Žmogaus limfocitų kultūros apdorojamos, kai jos yra pusiau sinchroninėje padėtyje.

ii) Apdorojimas kepenų enzimų aktyvinimo mišiniu

Poveikiui skirtas tiriamasis cheminis junginys kartu su aktyvinimo sistema turėtų kaip galima ilgiau nesukelti ląstelėse toksiškumo. Jeigu dėl toksiškumo šis poveikis neapima viso ląstelės ciklo, fiksacijos laikas yra pasirenkamas ląstelių, esančių skirtingose ląstelės cikluose, mėginių ėmimo poveikio metu, t.y. G_1, S ir G_2.

Ląstelių surinkimas:

Ląstelių kultūros apdorojamos chromosomų dalijimosi inhibitoriumi atitinkamą laiką prieš jas surenkant. Kiekviena kultūra atskirai yra surenkama ir atskirai apdorojama chromosomų paruošimui. Reikia ne mažiau kaip du kartus surinkti ląsteles. Pirmą kartą rekomenduojama rinkti apytikriai vieno ląstelės ciklo metu, antrą – vėliau. Tai daroma norint užtikrinti, kad bus apimti visi ląstelės ciklo etapai ir ląstelės ciklas užtruks.

1.6.3.3. *Chromosomų paruošimas*

Į chromosomų paruošimą įeina hipotoninis ląstelių paveikimas, paskleidžiant ant objektinių stiklelių, ir nudažymas.

Analizė

Nustatant chromosomų aberacijas analizuojama ne mažiau kaip 100 gerai paskleistų kiekvienos kultūros metafazių. Prieš analizę objektiniai stikleliai koduojami. Tiriant žmogaus limfocitus analizuojamos tik metafazės, turinčios 46 centromerus.

Žinomų ląstelių eilių atveju analizuojamos tik metafazės, turinčios ± 2 modalaus skaičiaus centromerus.

Be to, mitozinis indeksas arba kai kurie kiti citotoksiškumo požymiai atitinkamais atvejais turėtų būti įvertinami bandymo metu kiekvienai dozei atskirai.

2. **DUOMENYS**

Duomenys pateikiami lentelėse. Chromatido tipo aberacijos (pertrūkiai, lūžiai, kaitaliojimasis), chromosomų tipo aberacijos (pvz., pertrūkiai, lūžiai, fragmentacijos, žiedai, dicentrikai, policentrikai) ir neįprastos metafazės (su pertrūkiais ir be jų) yra pateikiami atskirai visoms apdorotoms ir kontrolinėms kultūroms.

Duomenys vertinami naudojantis atitinkamais statistikos metodais.

Rezultatai turi būti palyginami su tuo pačiu metu vykstančios neigiamos kontrolės duomenimis.

Atliekami ne mažiau kaip du nepriklausomi eksperimentai. Tačiau, jeigu galima moksliškai pagrįsti, gali pakakti ir vieno eksperimento. Nebūtina atlikti antro eksperimento visai tokio pat, kaip pirmasis eksperimentas. Žinoma, geriau pakeisti tam tikras bandymo sąlygas, kad būtų gaunami naudingesni duomenys.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— naudotos ląstelės;

— bandymo sąlygos: terpės sudėtis, CO_2 koncentracija, inkubacijos temperatūra, inkubacijos laikas, dozės, poveikio laikas, poveikio naudotu chromosomų dalijimosi inhibitoriumi trukmė ir koncentracija, naudota kepenų fermento aktyvinimo mišinio rūšis, teigiama ir neigiama kontrolė;

— ląstelių kultūrų skaičius;

— analizuotų metafazių skaičius (duomenys pateikiami atskirai pagal kiekvieną kultūrą);

— citotoksiškumo mitozinis indeksas arba kiti požymiai;

— aberacijų rūšis ir skaičius, pateikiamas kiekvienai paveiktai ir kontrolinei kultūrai, chromosomų, naudotų žinomose ląstelių eilėse, modalus skaičius;

— statistinis vertinimas;

— duomenų aptarimas;

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ VERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

B.11. MUTAGENIŠKUMAS (ŽINDUOLIŲ KAULŲ ČIULPŲ CITOGENETINIS BANDYMAS *IN VIVO*, CHROMOSOMŲ ANALIZĖ)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(C) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Šis citogenetinis bandymas *in vivo* – tai trumpalaikis mutageniškumo bandymas, skirtas nustatyti struktūrines chromosomų aberacijas. Paprastai chromosomų aberacijos vertinamos vykstant pirmosioms po poveikio mitozėms. Su cheminiais mutagenais didžioji dalis sukeltų nukrypimų yra chromatidų tipo.

Metodas apima žinduolių kaulų čiulpų ląsteles, kurios paveikiamos tiriamąja chemine medžiaga atitinkamu keliu ir pašalinamos nuosekliais intervalais. Gyvūnai prieš tokį pašalinimą ir toliau veikiami chromosomų dalijimosi inhibitoriumi, pavyzdžiui, kolchlorinu, kad būtų sukaupiamos ląstelės, esančios mitozės metafazės stadijoje (c-metafazė). Padaromi ore išdžiovinti chromosomų preparatai, jie nudažomi, o metafazės mikroskopiškai analizuojamos, siekiant nustatyti chromosomų aberacijas.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasiregimas**

Bandymo chemikalai ištirpinami paprastoje druskoje. Jeigu jie netirpūs, ištirpinami arba suspenduojami atitinkamuose tirpikliuose.

Naudojami šviežiai paruošti tiriamo cheminio junginio tirpalai. Jeigu tirpiklis naudojamas dozavimui palengvinti, jis neturi būti trukdžiu tiriamam cheminiam junginiui arba sukelti toksiško poveikio.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Naudojami graužikai, pavyzdžiui žiurkės, pelės arba kininiai žiurkėnai. Sveiki jauni suaugę gyvūnai randomizuojami ir paskiriami į poveikio ir kontrolines grupes.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Naudojama ne mažiau penkių patinėlių ir penkių patelių kiekvienoje eksperimentinėje ir kontrolinėje grupėje. Tokiu būdu, 10 gyvūnų būtų paaukojami per tam tikrą laiką vienoje grupėje, jeigu į eksperimento grafiką įtraukiami keli bandymo laikotarpiai po poveikio.

Teigiamai kontrolinei grupei pakanka bandinius imti vieną kartą.

1.6.2.3. *Vartojimo būdas*

Tiriamieji cheminiai junginiai paprastai turėtų būti duodami tik vieną kartą. Remiantis toksikologine informacija, gali būti naudojamas kartotinio poveikio grafikas. Tačiau kartotinio poveikio grafikas gali būti naudojamas tik tada, jeigu kaulų čiulpuose dėl tiriamų cheminių junginių neatsiranda citotoksiškų poveikių. Įprastas įvedimo būdas – oralinis ir intraperitoninės injekcijos. Tinka ir kiti įvedimo būdai.

1.6.2.4. *Neigiamos ir teigiamos kontrolės naudojimas*

Cheminis junginys, kuris žinomas kaip sukeliantis chromosomų aberacijas *in vivo*, yra naudojamas kaip teigiama kontrolė, o neigiama (tirpiklio) kontrolinė grupė taip pat yra įtraukiama į kiekvieno eksperimento projektą.

1.6.2.5. *Dozės*

Pagrindinei serijai naudojama viena tiriamo cheminio junginio dozė – tai maksimali toleruojama dozė arba tokia dozė, kuri sukelia tam tikrus citotoksiškumo požymius (pvz., dalinis mitozės slopinimas).

„Netoksiškiems“ cheminiams junginiams maksimali (ribinė) dozė, kuri turi būti ištirta po to, kai suvartojama viena dozė, yra 2 000 mg/kg kūno svorio.

Jeigu naudojamas kartotinių dozių grafikas, ribinė dozė yra 1 000 mg/kg kūno svorio per parą.

Gali būti naudojamos papildomos dozės, jeigu to reikalaujama dėl mokslinių priežasčių.

Jeigu bandymas yra naudojamas kaip patvirtinimo metodas, turėtų būti naudojamos dvi papildomos dozės.

1.6.3. **Darbo eiga**

Bandymą galima vykdyti dviem būdais:

i) Gyvūnai veikiami tiriamu cheminiu junginiu vieną kartą, didžiausia toleruojama doze. Pirmuoju atveju mėginiai imami po poveikio praėjus 24 valandoms. Jeigu šiame etape rezultatai yra akivaizdžiai teigiami, tolesnis mėginių ėmimas nereikalingas. Tačiau jeigu rezultatai neigiami arba abejotini, kadangi tiriamas cheminis junginys gali turėti įtakos ląstelių ciklo kinetikai, taikomas vienas ankstesnio mėginių ėmimo ir vienas vėlesnio mėginių ėmimo intervalas, tinkamai paskirstytas intervale nuo šešių iki 48 valandų.

   Jeigu naudojamos papildomos dozės, mėginiai turi būti imami didžiausios rizikos intervalais arba, jeigu jie nežinomi, praėjus 24 valandoms po poveikio.

ii) Jeigu pagal farmakokinetinę ir metabolinę informaciją reikalingas kartotinio poveikio grafikas, gali būti naudojamas kartotinis dozavimas ir mėginiai turi būti imami praėjus šešioms ir 24 valandoms po paskutinio poveikio.

Kaulų čiulpų preparatas:

Prieš gyvūnus nužudant, jiems daroma intraperitoninė injekcija, suleidžiant atitinkamą chromosomų dalijimosi inhibitoriaus dozę, kad būtų gaunamas pakankamas ląstelių skaičius c metafazėje. Kaulų čiulpai gaunami iš abiejų ką tik nužudytų gyvūnų šlaunikaulių, nuskalaujant izotoniniu tirpalu. Ląstelės, atitinkamai jas hipotoniškai paveikus, yra fiksuojamos ir po to paskleidžiamos ant objektinių stiklelių. Objektiniai stikleliai, juos išdžiovinus ore, nudažomi.

Analizė:

Prieš mikroskopinę analizę objektiniai stikleliai yra koduojami. Analizuojama ne mažiau kaip 50 gerai paskleistų viso centromerų skaičiaus kiekvieno gyvūno metafazės, nustatant struktūrines chromosomų aberacijas. Be to, gali būti nustatomi kiekvieno gyvūno mitoziniai indeksai.

2. **DUOMENYS**

Duomenys pateikiami lentelėse. Chromatidinės ir izochromatidinės aberacijos (pertrūkiai, lūžiai, kaitaliojimasis) ir mitoziniai indeksai, jeigu nustatyti, yra pateikiami atskirame sąraše pagal visus paveiktus ir kontrolinius gyvūnus. Taip pat pateikiami vidutiniai skaičiai ir standartiniai nuokrypiai pagal kiekvieną eksperimentinę ir kontrolinę grupę. Duomenys vertinami naudojant atitinkamus statistikos metodus.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— naudotų gyvūnų rūšis, veislė ir amžius;

— kiekvienos lyties gyvūnų skaičius eksperimentinėje ir kontrolinėje grupėse;

— bandymo sąlygos: išsamus poveikio ir mėginių ėmimo grafiko, dozių, poveikio naudotu chromosomų dalijimosi inhibitoriumi trukmės ir jo koncentracijos apibūdinimas;

— kiekvieno gyvūno analizuotų metafazių skaičius;

— mitoziniai indeksai, jeigu nustatyti;

— aberacijų rūšis ir skaičius pagal kiekvieną paveiktą ir kontrolinį gyvūną;

— toksiškumo požymiai bandymo eigoje;

— statistinis įvertinimas;

— duomenų aptarimas;

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ VERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrą įvadinę B(D) dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrą įvadinę B(E) dalį.

B.12. MUTAGENIŠKUMAS (MIKROBRANDUOLINIS BANDYMAS)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrą įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAS

Žr. bendrą įvadinę B(C) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Mikrobranduolinis bandymas – tai trumpalaikis bandymas *in vivo* su žinduoliais, nustatant chromosomų pakenkimus arba mitozinio aparato pakenkimus chemikalais. Šios analizės pagrindas – mikrobranduolių skaičiaus tiriamų gyvūnų polichromatiniuose eritrocituose padidėjimas, palyginti su kontroliniais gyvūnais.

Mikrobranduoliai yra sudaromi iš chromosomų fragmentų arba chromosomų visumos mitozinėje fazėje. Jeigu eritrocituose susidaro eritroblastų, pagrindinis branduolys išmetamas, bet mikrobranduoliai gali būti išlaikomi citoplazmoje. Šiam bandymui naudojami kaulų čiulpų jauni polichromatiniai eritrocitai, gaunami iš laboratorinių žinduolių, kurie yra veikiami tiriamąja medžiaga atitinkamu būdu. Kaulų čiulpai yra ištraukiami, paruošiami preparatų tepinėliai ir nudažomi. Naudojant mikroskopą suskaičiuojamas mikrobranduolių kiekis polichromatiniuose eritrocituose ir nustatomas polichromatinių ir normochromatinių eritrocitų santykis.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Tiriamieji chemikalai ištirpinami izotoniniame tirpale. Jeigu jie netirpūs, ištirpinami arba suspenduojami atitinkamuose tirpikliuose. Jeigu naudojamas tirpiklis, jis neturi būti trukdžiu tiriamam cheminiam junginiui arba sukelti toksiško poveikio. Paprastai naudojami ką tik paruošti tiriamo cheminio junginio tirpalai.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Rekomenduojama naudoti peles, bet taip pat gali būti naudojami ir kiti žinduoliai. Sveiki jauni suaugę gyvūnai randomizuojami ir paskiriami į poveikio ir kontrolines grupes.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienoje eksperimentinėje ir kontrolinėje grupėje naudojama ne mažiau penkių patelių ir penkių patinėlių. Tokiu būdu, kiekvienoje grupėje per vieną laiko periodą bus nužudoma 10 gyvūnų, jeigu į eksperimento grafiką įtraukiami keli bandymo laikotarpiai po poveikio. Teigiamoje kontrolinėje grupėje pakanka vieno bandinių ėmimo.

1.6.2.3. *Vartojimo būdas*

Tiriami cheminiai junginiai paprastai turėtų būti duodami tik vieną kartą. Remiantis toksikologine informacija, gali būti naudojamas kartotinio poveikio grafikas. Tačiau kartotinio poveikio grafikas gali būti taikomas tik tada, kai tiriamas cheminis junginys nesukelia citotoksinio poveikio kaulų čiulpuose. Įprasti įvedimo būdai – oralinis ir intraperitoninės injekcijos. Gali būti naudojami ir kiti įvedimo būdai.

1.6.2.4. *Neigiamos ir teigiamos kontrolės naudojimas*

Kiekviename eksperimente turi būti naudojamos abi – ir teigiama, ir neigiama (tirpiklio) kontrolės.

1.6.2.5. *Dozės*

Pagrindinei serijai naudojama viena tiriamo cheminio junginio dozė – tai maksimali toleruojama dozė arba tokia dozė, kuri sukelia tam tikrus citotoksiškumo požymius, pvz., pagal polichromatinių ir normochromatinių eritrocitų santykio pasikeitimą.

„Netoksiškiems“ cheminiams junginiams maksimali (ribinė) dozė, kuri turi būti ištirta po to, kai suvartojama viena dozė, yra 2 000 mg/kg kūno svorio.

Jeigu naudojamas kartotinių dozių grafikas, ribinė dozė yra 1 000 mg/kg kūno svorio per dieną.

Gali būti naudojamos papildomos dozės, jeigu to reikalaujama dėl mokslinių priežasčių.

Jeigu bandymas atliekamas kaip patvirtinimo metodas, turėtų būti naudojamos dvi papildomos dozės.

1.6.3. **Darbo eiga**

Bandymą galima vykdyti dviem būdais:

i) Gyvūnai veikiami tiriamu cheminiu junginiu vieną kartą. Mėginių ėmimo laikas turi sutapti su maksimaliais analizės rezultatais, kurie kinta atsižvelgiant į tiriamą cheminį junginį. Todėl kaulų čiulpų mėginiai yra imami ne rečiau kaip du kartus, pradedant juos imti ne anksčiau kaip praėjus 12 valandų po poveikio ir ne vėliau kaip po 48 valandų.

   Jeigu naudojamos papildomos dozės, mėginiai turėtų būti imami didžiausios rizikos intervalais arba, jeigu jis nežinomas, praėjus 24 valandoms po poveikio.

ii) Jeigu pagal farmakokinetinę ir metabolinę informaciją reikalingas kartotinio poveikio grafikas, gali būti naudojamas kartotinis dozavimas ir mėginiai turi būti imami praėjus šešioms ir 12 valandų po paskutinio poveikio.

Kaulų čiulpų preparatas:

Kaulų čiulpai yra gaunami iš abiejų ką tik nužudytų gyvūnų šlaunikaulių, nuskalaujant fetaliniu blauzdos serumu. Ląstelės nusodinamos jas centrifuguojant, o paviršinis sluoksnis išpilamas. Homogeninės ląstelių suspensijos lašai užlašinami ant objektinių stiklelių ir paskleidžiami kaip tepinėlis. Išdžiovinus ore, stikleliai nudažomi.

Analizė:

Prieš mikroskopinę analizę stikleliai koduojami. Kiekvieno gyvūno mikrobranduolių dažnumas yra apskaičiuojamas ne mažiau kaip 1000 polichromatinių eritrocitų.

Normochromatinių ir polichromatinių eritrocitų santykis nustatomas kiekvienam gyvūnui, iš viso apskaičiuojant 1 000 eritrocitų.

2. **DUOMENYS**

Duomenys pateikiami lentelėse. Tokiu būdu apskaičiuotų polichromatinių eritrocitų skaičius, polichromatinių eritrocitų skaičius su mikrobranduoliais ir ląstelių su mikrobranduoliais procentas yra pateikiami atskirai pagal kiekvieną eksperimentinį ir kontrolinį gyvūną, tai pat ir normochromatinių ir polichromatinių eritrocitų santykis. Taip pat pateikiami vidutiniai skaičiai ir standartiniai nuokrypiai pagal kiekvieną eksperimentinę ir kontrolinę grupę. Pateiktieji duomenys yra įvertinami naudojant atitinkamus statistinius metodus.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— naudotų gyvūnų rūšis, veislė ir amžius;

— kiekvienos lyties gyvūnų skaičius eksperimentinėje ir kontrolinėje grupėse;

— bandymo sąlygos: išsamus poveikio ir mėginių ėmimo grafiko, dozių, duomenų apie toksiškumą, neigiamos ir teigiamos kontrolės apibūdinimas;

— mikrobranduolių apskaitos kriterijai;

— dozės ir poveikio santykis, jeigu įmanoma;

— toksiškumo požymiai bandymo eigoje;

— statistinis vertinimas;

— duomenų aptarimas;

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ VERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

B.13. MUTAGENIŠKUMAS (ESCHERICHIA COLI – GRĮŽTAMOSIOS MUTACIJOS ANALIZĖ)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(C) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Escherichia coli triptofano (trp) reversijos sistema – tai mikrobiologinė analizė, kurioje matuojama $trp^- \rightarrow trp^+$ reversija chemikalais, sukelianti pagrindinius organizmo genomo pokyčius.

Bakterijos veikiamos tiriamais chemikalais, esant metaboliniam aktyvinimui arba jo nesant. Praėjus atitinkamam inkubacijos laikotarpiui minimalioje terpėje, suskaičiuojamos revertantų kolonijos ir palyginamos su savaiminių revertantų skaičiumi neapdorotoje kultūroje ir(arba) kontrolinėje tirpiklio kultūroje.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

Analizei atlikti gali būti taikomi tokie metodai: 1) ikiinkubacinis metodas ir 2) tiesioginio įtraukimo metodas, kai bakterijos ir bandymo reagentas yra sumaišomi dengiamojo agaro sluoksnyje ir užpilamas ant atrankiosios agaro lėkštelės paviršiaus.

1.6.1. **Pasirengimas**

1.6.1.1. *Bakterijos*

Bakterijos auginamos 37 °C temperatūroje iki vėlyvosios eksponentinės arba ankstyvosios stacionarinės augimo fazės. Apytikris ląstelių tankis turėtų būti $10^8 – 10^9$ ląstelių mililitre.

1.6.1.2. *Metabolinis aktyvinimas*

Bakterijos turėtų būti paveikiamos tiriamąja medžiaga ir esant atitinkamai metabolinei aktyvinimo sistemai, ir jai nesant. Dažniausiai naudojama sistema yra kofaktoriumi papildyta postmitochondrinė frakcija, paruošta iš graužikų kepenų, apdorota fermentų paveiktais reagentais.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Tyrimui naudojamos padermės*

Turėtų būti naudojamos trys padermės – WP2, WP2 uvr ir WP2 uvr A pKM 101. Turi būti naudojami pripažinti pagrindinių kultūrų paruošimo ir laikymo metodai. Turi būti tikrinami šių padermių auginimo reikalavimai ir padermių genetinė tapatybė, jautrumas UV spinduliuotei arba C mitomicinui, bei WP2 uvr A pKM 101 padermės atsparumas ampicilinui. Iš šių padermių taip pat turėtų būti gaunami savaiminiai revertantai laukiamu dažnių intervalu.

1.6.2.2. *Terpė*

Mutantai reiškiasi ir atrenkami atitinkamoje terpėje esant pakankamam dengiamojo agaro kiekiui.

1.6.2.3. *Neigiamos ir teigiamos kontrolės naudojimas*

Turi būti atliekama nepaveiktų mėginių ir tirpiklio kontrolė, vykdomos tuo pačiu metu. Teigiama kontrolė turi būti vykdoma taip pat dėl dviejų priežasčių:

i) bakterijų padermės jautrumui patvirtinti,

Metilmetano sulfonatas, 4-nitrochinolino oksidas arba etilnitrosourea gali būti naudojami teigiamai kontrolei bandymuose be metobolinio aktyvinimo.

ii) atitinkamų metabolizuojančių sistemų aktyvumui užtikrinti.

Teigiama metabolizuojančios sistemos aktyvumo kontrolė visoms padermėms yra 2-aminoantracenas. Jeigu įmanoma gauti, chemikalų teigiama kontrolė turėtų būti tos pačios klasės, kaip ir tiriamųjų chemikalų.

1.6.2.4. *Tiriamosios medžiagos kiekis lėkštelėje*

Tiriama ne mažiau kaip penki skirtingi tiriamojo chemikalo kiekiai, intervalai tarp lėkštelių – pusė logaritmo. Medžiagos tiriamos iki ribinio tirpumo arba toksiškumo. Toksiškumas įrodomas sumažinant savaiminių revertantų skaičių, išvalant foną arba paveiktų kultūrų išlikimo laipsniu. Netoksiški chemikalai turėtų būti tiriami, kol jų kiekis kiekvienoje lėkštelėje yra 5 mg, prieš nusprendžiant, kad tiriamoji medžiaga yra neigiama.

1.6.2.5. *Inkubavimo sąlygos*

Lėkštelės yra inkubuojamos nuo 48 iki 72 valandų 37 ^{0}C temperatūroje.

1.6.3. **Darbo eiga**

Taikant tiesioginio lėkštelės įvedimo metodą be fermentų aktyvinimo, atitinkamas chemikalas ir 0,1 ml šviežios bakterijų kultūros yra dedami į 2 ml dengiamojo agaro. Atliekant bandymus su metaboliniu aktyvinimu, 0,5 ml kepenų fermentų aktyvinimo mišinio su pakankamu kiekiu pomitochondrinės frakcijos yra dedama į dengiamąjį agarą po to, kai įdedama tiriamojo chemikalo ir bakterijų. Kiekviename vamzdelyje esantis turinys išmaišomas ir pilamas per atrankiosios agaro lėkštelės paviršių. Dengiamajam agarui leidžiama sukietėti, o lėkštelės inkubuojamos 37°C temperatūroje nuo 48 iki 72 valandų. Inkubacinio periodo pabaigoje suskaičiuojamos revertantų kolonijos kiekvienoje lėkštelėje.

Taikant išankstinio inkubavimo metodą tiriamojo chemikalo mišinys, 0,1 ml šviežios bakterijų kultūros ir pakankamas kepenų fermentų aktyvinimo mišinio kiekis arba toks pat kiekis buferinio tirpalo yra iš anksto inkubuojami prieš įdedant 2 ml dengiamojo agaro. Visa kita darbo eiga yra tokia pati kaip ir inkorporavimo metodo.

Visas auginimas lėkštelėje abiem metodams yra atliekamas trimis egzemplioriais.

2. **DUOMENYS**

Duomenys apie revertantų kolonijų skaičių kiekvienoje lėkštelėje yra pateikiami abiem – kontrolinei ir paveiktai serijoms. Tiriant chemikalą ir atliekant kontrolę turėtų būti atliekami skaičiavimai kiekvienoje lėkštelėje, pateikiamas vidutinis revertantų kolonijų lėkštelėje skaičius ir standartiniai nuokrypiai.

Duomenys turėtų būti vertinami naudojant atitinkamus statistinius metodus.

Vykdomi ne mažiau kaip du atskiri eksperimentai. Nebūtina antrą eksperimentą vykdyti visiškai taip pat, kaip pirmąjį. Iš tikrųjų, būtų geriau pakeisti tam tikras bandymo sąlygas, kad būtų gauti naudingesni duomenys.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— bakterijos, naudota padermė;

— bandymo sąlygos: dozės, toksiškumas, terpių sudėtis; poveikio darbo eiga (išankstinė inkubacija, inkubacija); metabolinio aktyvinimo sistema; etaloninės medžiagos, neigiama kontrolė;

— bakterijų skaičius kiekvienoje lėkštelėje, vidutinis revertantų kolonijų skaičius lėkštelėje, standartinis nuokrypis, dozės ir poveikio santykis, jeigu įmanoma;

— duomenų aptarimas;

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ VERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

B.14. MUTAGENIŠKUMAS (*SALMONELLA TYPHIMURIUM* – GRĮŽTAMOSIOS MUTACIJOS ANALIZĖ)

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. APIBRĖŽIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(C) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Salmonella typhimurium histidino (his) reversijos sistema – tai mikrobiologinė analizė, kurios metu $his^- \rightarrow his^+$ reversija matuojama chemikalais, sukeliančiais pagrindines šio organizmo genomo pakeitimo arba genetinio kodo poslinkio mutacijas.

Bakterijos yra veikiamos tiriamaisiais chemikalais esant metaboliniam aktyvinimui arba jo nesant ir dedamos ant lėkštelės su minimalia terpe. Praėjus atitinkamam inkubacijos laikui, revertantų kolonijos yra skaičiuojamos ir palyginamos su savaiminių revertantų skaičiumi nepaveiktoje ir(arba) tirpiklio kontrolinėje kultūroje.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

1.6.1.1. *Bakterijos*

Šviežios bakterijų kultūros yra auginamos 37 °C temperatūroje iki vėlyvosios eksponentinės arba ankstyvosios stacionarios augimo fazės. Ląstelių tankis turėtų būti apytikriai lygus 10^8 – 10^9 ląstelių mililitre.

1.6.1.2. *Metabolinis aktyvinimas*

Bakterijos turėtų būti paveikiamos tiriamąja medžiaga tiek esant atitinkamai metabolinio aktyvinimo sistemai, tiek ir be jos. Dažniausiai naudojama sistema – tai kofaktoriumi papildyta pomitochondrinė frakcija, paruošta iš graužikų kepenų, paveiktų fermentų paveiktais reagentais.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Tyrimui naudojamos padermės*

Turi būti naudojamos ne mažiau kaip keturios padermės – TA 1535, TA 1537 arba TA 97, TA 98 ir TA 100; gali būti naudojamos ir kitos padermės, pavyzdžiui, TA 1538 ir TA 102. Turi būti naudojami pripažinti pagrindinių kultūrų paruošimo ir laikymo metodai. Turi būti tikrinami šių padermių auginimo reikalavimai ir padermių genetinė tapatybė, jautrumas UV spinduliuotei ir kristavioleto tirpalui bei atsparumas ampicilinui. Iš šių padermių taip pat turi būti gaunami savaiminiai revertantai laukiamu dažnių intervalu.

1.6.2.2. *Terpė*

Mutantai reiškiasi ir atrenkami atitinkamoje terpėje esant pakankamam dengiamojo agaro kiekiui.

1.6.2.3. *Neigiamos ir teigiamos kontrolės naudojimas*

Turi būti atliekama nepaveiktų mėginių ir tirpiklio kontrolė, vykdomos tuo pačiu metu. Teigiama kontrolė turi būti vykdoma taip pat dėl dviejų priežasčių:

i) bakterijų padermių jautrumui patvirtinti.

Toliau nurodyti junginiai gali būti naudojami tyrimams be metabolinio aktyvinimo:

Padermė	Revertuoja veikiami
TA 1535, TA 100	Natrio azido
TA 1538, TA 98, TA 97	2-nitrofluoreno
TA 1537	9-aminoakridino
TA 102	Kumeno hidroperoksido

ii) Atitinkamų metabolizuojančių sistemų aktyvinimui užtikrinti.

Teigiama kontrolė vienos metabolizuojančios sistemos veikimui visoms bakterijų padermėms yra 2-aminoantracenas. Jeigu įmanoma gauti, turėtų būti naudojamas tos pačios klasės, kaip ir tiriamųjų chemikalų teigiamai kontrolei.

1.6.2.4. *Tiriamosios medžiagos kiekis lėkštelėje*

Tiriami ne mažiau kaip penki skirtingi tiriamojo chemikalo kiekiai, intervalai tarp lėkštelių – pusė logaritmo. Medžiagos tiriamos iki ribinio tirpumo arba toksiškumo. Toksiškumas įrodomas sumažinant savaiminių revertantų skaičių, išvalant foną arba paveiktų kultūrų išlikimo laipsniu. Netoksiški chemikalai turėtų būti tiriami, kol jų kiekis kiekvienoje lėkštelėje yra 5 mg, prieš nusprendžiant, kad tiriamoji medžiaga yra neigiama

1.6.2.5. *Inkubavimo sąlygos*

Lėkštelės yra inkubuojamos nuo 48 iki 72 valandų 37°C temperatūroje.

1.6.3. **Darbo eiga**

Taikant tiesioginio lėkštelės įvedimo metodą be fermentų aktyvinimo, atitinkamas chemikalas ir 0,1 ml šviežios bakterijų kultūros yra dedami į 2 ml dengiamojo agaro. Atliekant bandymus su metaboliniu aktyvinimu, 0,5 ml kepenų fermentų aktyvinimo mišinio su pakankamu kiekiu pomitochondrinės frakcijos yra dedama į dengiamąjį agarą po to, kai įdedama tiriamojo chemikalo ir bakterijų. Kiekviename vamzdelyje esantis turinys išmaišomas ir pilamas per atrankiosios agaro lėkštelės paviršių. Dengiamajam agarui leidžiama sukietėti, o lėkštelės inkubuojamos 37°C temperatūroje nuo 48 iki 72 valandų. Inkubacinio periodo pabaigoje suskaičiuojamos revertantų kolonijos kiekvienoje lėkštelėje. Taikant išankstinio inkubavimo metodą tiriamojo chemikalo mišinys, 0,1 ml šviežios bakterijų kultūros ir pakankamas kepenų fermentų aktyvinimo mišinio kiekis arba toks pat kiekis buferinio tirpalo yra iš anksto inkubuojami prieš įdedant 2 ml dengiamojo agaro. Visa kita darbo eiga yra tokia pati kaip ir inkorporavimo metodo.

Visas auginimas lėkštelėje abiem metodams yra atliekamas trimis egzemplioriais.

2. **DUOMENYS**

Duomenys apie revertantų kolonijų skaičių kiekvienoje lėkštelėje yra pateikiami abiem – kontrolinei ir paveiktai serijoms.

Tiriant chemikalą ir atliekant kontrolę turėtų būti atliekami skaičiavimai kiekvienoje lėkštelėje, pateikiamas vidutinis revertantų kolonijų lėkštelėje skaičius ir standartiniai nuokrypiai.

Duomenys turėtų būti vertinami naudojant atitinkamus statistinius metodus.

Vykdomi ne mažiau kaip du atskiri eksperimentai. Nebūtina antrą eksperimentą vykdyti visiškai taip pat, kaip pirmąjį. Iš tikrųjų, būtų geriau pakeisti tam tikras bandymo sąlygas, kad būtų gauti naudingesni duomenys.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— bakterijos, naudota padermė;

— bandymo sąlygos: dozės, toksiškumas, terpės sudėtis; poveikio darbo eiga (išankstinė inkubacija, inkubacija); metabolinio aktyvinimo sistema; etaloninės medžiagos, neigiama kontrolė;

— bakterijų skaičius kiekvienoje lėkštelėje, vidutinis revertantų kolonijų skaičius lėkštelėje, standartinis nuokrypis, dozės ir poveikio santykis, jeigu įmanoma;

— duomenų aptarimas;

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ VERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. **LITERATŪRA**

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

C DALIS. EKOTOKSIŠKUMO NUSTATYMO METODAI

C.1. ŪMUS TOKSIŠKUMO POVEIKIS ŽUVIMS

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šio metodo tikslas yra nustatyti medžiagos ūmų mirtiną toksiškumą žuvims gėlame vandenyje. Norint padėti pasirinkti tinkamiausią bandymo metodą (stacionarų, pusiau stacionarų arba pratekėjimo sąlygomis), kad visą bandymo laiką būtų užtikrinta pakankamai pastovi bandomosios medžiagos koncentracija, pageidautina turėti kiek galima daugiau informacijos apie medžiagos tirpumą vandenyje, garų slėgį, cheminį patvarumą, disociacijos konstantas ir biologinį skaidomumą.

Planuojant bandymą ir interpretuojant jo rezultatus, turi būti atsižvelgta į papildomą informaciją (pvz., struktūrinė formulė, grynumo laipsnis, reikšmingesnių priemaišų prigimtis ir procentinis kiekis, priedų buvimas ir jų kiekis, pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientas).

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Ūmus toksiškumas yra stebimas neigiamas poveikis, sukeltas organizme per trumpą medžiagos veikimo laiką (paros). Šiame bandyme ūmus toksiškumas išreikiamas medianine mirtina koncentracija (LC_{50}), – tai medžiagos koncentracija vandenyje, kai per nepertraukiamo veikimo laikotarpį, kuris turi būti nurodytas, žūsta 50 % bandyme naudotos partijos žuvų.

Kiekviena bandomosios medžiagos koncentracija yra skaičiuojama mase tūrio vienetui (mg/litre). Ją dar galima išreikšti mase masės vienetui (mg/kg).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kaip priemonė parodyti, kad laboratorinėmis bandymo sąlygomis bandyme naudotų rūšių atsakas žymiai nepakito, gali būti daromas bandymas su etalonine medžiaga.

Šiam bandymui etaloninės medžiagos nėra apibrėžtos.

1.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Galima atlikti ribinį bandymą su 100 mg/litre koncentracija, norint parodyti, kad LC_{50} yra didesnė nei ši koncentracija.

Žuvys 96 valandas veikiamos bandomąja medžiaga, įdėta į vandenį esant tam tikram koncentracijos verčių intervalui. Mirtingumo duomenys užrašomi bent kas 24 valandas, ir, jei įmanoma, kiekvienai stebėjimo laiko atkarpai skaičiuojama koncentracija, kuriai esant žūsta 50 % žuvų (LC_{50}).

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Kokybės kriterijai turi būti taikomi ir ribinio bandymo metodui, ir viso bandymo metodui.

Mirtingumas kontroliniuose bandymuose bandymo pabaigoje neturi būti didesnis kaip 10 % (arba viena žuvis, jei naudojama mažiau kaip dešimt žuvų).

Ištirpusio deguonies koncentracija visą laiką turi būti didesnė kaip 60 % soties ore vertės.

Bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymo laiką turi būti laikoma 80 % pradinės koncentracijos vertės ribose.

Medžiagų, kurios lengvai tirpsta bandomojoje terpėje ir kurių tirpalai patvarūs, t.y., kuriuose ištirpinta medžiaga žymiai negaruoja, nesuyra, nesihidrolizuoja arba neadsorbuojama, pradine koncentracija galima laikyti vardinę medžiagos koncentraciją. Turi būti pateikti įrodymai, kad koncentracijos buvo išlaikytos per visą bandymą ir kad kokybės kriterijai buvo įvykdyti.

Medžiagų, kurios:

i) mažai tirpsta bandymo terpėje, arba

ii) gali sudaryti patvarias emulsijas arba suspensijas, arba

iii) yra nepatvarios vandeniniuose tirpaluose,

pradine koncentracija turi būti laikoma koncentracija, nustatyta tirpale (ar, jei techniškai tai neįmanoma, išmatuota vandens tūryje) bandymo pradžioje. Koncentracija turi būti nustatyta po to, kai nusistovi pusiausvyra, tačiau prieš bandymų žuvų dėjimą.

Visais atvejais, norint patvirtinti tikrąsias veikimo koncentracijas arba kokybės kriterijų vykdymą, bandymo metu turi būti daromi tolimesni matavimai.

pH vertė neturi keistis daugiau kaip 1 pH vienetu.

1.6 BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

Galima naudoti trijų tipų metodiką:

Bandymas stacionariomis sąlygomis:

Toksiškumo bandymas, kai bandomasis tirpalas neteka. (Tirpalai visą bandymą yra tie patys).

Bandymas pusiau stacionariomis sąlygomis:

Bandymas, kai bandomasis tirpalas neteka, tačiau per ilgesnį laiko tarpą (pvz., kas 24 valandas) daromas reguliarus dozuojamasis bandomojo tirpalo atnaujinimas.

Bandymas pratekėjimo sąlygomis:

Toksiškumo bandymas, kai vanduo bandymo kamerose atnaujinamas visą laiką, bandomąją medžiagą tiekiant su vandeniu, naudojamu bandymo terpei atnaujinti.

1.6.1. **Reagentai**

1.6.1.1. *Bandomųjų medžiagų tirpalai*

Pradiniai reikiamos koncentracijos tirpalai ruošiami ištirpinant medžiagą dejonizuotame vandenyje arba vandenyje pagal 1.6.1.2.

Pasirinktos bandymo koncentracijos tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Jei bandomos didelės koncentracijos, medžiaga gali būti ištirpinta praskiedimo vandenyje tiesiogiai.

Paprastai medžiagos turi būti bandomos tik iki tirpumo ribos. Norint kai kurioms medžiagoms (pvz., vandenyje mažai tirpioms medžiagoms, arba kurių didelis P_{ow}, arba toms, kurios sudaro patvarią dispersiją, o ne tikrąjį tirpalą vandenyje) užtikrinti galimybę pasiekti soties/pastovią koncentraciją, priimtina daryti bandymą virš medžiagos tirpumo ribos. Tačiau yra svarbu, kad tokia koncentracija netrikdytų bandymo sistemos kitais atžvilgiais (pvz., vandens paviršiuje nesusidarytų bandomosios medžiagos plėvelė, kuri neleistų į vandenį patekti deguoniui, ir t.t.).

Ruošiant vandenyje mažai tirpių medžiagų pradinius tirpalus arba norint pagerinti šių medžiagų dispergavimą bandomojoje terpėje, į pagalbą galima pasitelkti dispergavimą ultragarsu, organinius tirpiklius, emulsiklius arba dispergatorius. Kai naudojamos tokios pagalbinės medžiagos, visuose bandomųjų koncentracijų tirpaluose turi būti toks pat pagalbinės medžiagos kiekis, ir papildoma kontrolinė žuvis turi būti veikiama pagalbine medžiaga, kurios koncentracija būtų tokia pat, kaip ir bandymų serijoje. Tokių pagalbinių medžiagų koncentracija turi būti kuo mažesnė ir jokiu būdu neturi būti didesnė kaip 100 mg/litre bandomosios terpės.

Bandymas turi būti daromas nereguliuojant pH vertės. Jei yra įrodymų apie žymų pH vertės kitimą, patartina bandymą kartoti reguliuojant pH vertę, ir bandymo rezultatus pateikti ataskaitoje. Tokiu atveju pradinio tirpalo pH vertė turi būti pakoreguota iki skiedimo vandens pH vertės, jei nėra ypatingos priežasties to nedaryti. Šiam tikslui geriausia naudoti HC1 ir NaOH. Šis pH reguliavimas turi būti daromas taip, kad bandomosios medžiagos koncentracija pradiniame tirpale žymiai nepasikeistų. Jei reguliuojant pH vyksta kokia nors cheminė reakcija arba bandomoji medžiaga fiziškai iškrenta į nuosėdas, tai turi būti nurodyta ataskaitoje.

1.6.1.2. *Laikymo ir skiedimo vanduo*

Galima naudoti geriamojo vandens vandentiekio vandenį (neužterštą potencialiai kenksmingos koncentracijos chloru, sunkiaisiais metalais arba kitomis medžiagomis), geros kokybės gamtinį vandenį arba atkurtąjį vandenį (žr. 1 papildymą). Geriausiai tinka vanduo, kurio bendrasis kietumas yra nuo 10 iki 250 mg/litre (skaičiuojant $CaCO_3$) ir kurio pH yra nuo 6,0 iki 8,5.

1.6.2. **Aparatūra**

Visa aparatūra turi būti pagaminta iš chemiškai inertiškų medžiagų.

— automatinio skiedimo sistema (bandymui pratekėjimo sąlygomis),

— deguonies matuoklis,

— įranga vandens kietumui nustatyti,

— atitinkama termostatavimo aparatūra,

— pH-metras.

1.6.3. **Bandymų žuvys**

Žuvys turi būti sveikos ir neturėti jokių matomų nenormalumo požymių.

Žuvų rūšį reikia rinktis remiantis praktiniais kriterijais, pvz., lengvumas žuvis gauti ištisus metus ir lengvumas jas prižiūrėti, patogumas bandyti, santykinis jautrumas cheminėms medžiagoms, bei kiek nors susijusiais ekonominiais, biologiniais arba ekologiniais faktoriais. Be to, renkantis žuvų rūšis, reikia nepamiršti apie gautų duomenų palyginamumo būtinybę ir esamą tarptautinį derinimą (1 nuoroda).

Žuvų, kurios rekomenduojamos naudoti šiame bandyme, sąrašas pateiktas 2 papildyme; tinkamiausios rūšys yra dryžuotasis danio ir margasis upėtakis.

1.6.3.1. *Laikymas*

Geriausia, jei bandymų žuvys būtų vienos veislės ir panašaus ilgio bei amžiaus. Žuvys turi būti laikomos bent 12 parų tokiomis sąlygomis:

įkrova:

atitinkanti sistemą (su recirkuliavimu arba su pratekėjimu) ir žuvų rūšį,

vanduo:

žr. 1.6.1.2,

šviesa:

kasdienis apšvietimas nuo 12 iki 16 valandų,

ištirpusio deguonies koncentracija:

bent 80 % soties ore vertės,

maitinimas:

tris kartus per savaitę arba kasdieną, nutraukiant maitinimą prieš 24 valandas iki bandymo pradžios.

1.6.3.2. *Mirtingumas*

Po 48 valandų stabilizavimo laikotarpio, užrašomi mirtingumo duomenys ir taikomi tokie kriterijai:

— populiacijos mirtingumas per septynias paras didesnis kaip 10 %:

visa partija atmetama,

— populiacijos mirtingumas 5 - 10 %:

laikoma dar septynias paras. Jei mirtingumas nedidėja, partija priimama, priešingu atveju turi būti atmesta,

— populiacijos mirtingumas mažesnis kaip 5 %:

partiją priimama.

1.6.4. **Adaptavimas**

Prieš tai kaip naudoti, visas žuvis bent septynias paras būtina laikyti vandenyje, kurio kokybė ir temperatūra atitinka bandymo sąlygas.

1.6.5. **Bandymo eiga**

Norint gauti informacijos apie koncentracijų, kurias reikia naudoti pagrindiniame bandyme intervalą, prieš galutinį bandymą gali būti daromas intervalo nustatymo bandymas.

Daromas vienas kontrolinis bandymas be bandomosios medžiagos ir, jei tinka, bandymų serija papildoma dar vienu kontroliniu bandymu, kuriame naudojama pagalbinė medžiaga.

Pagal tai, kokios yra bandomosios medžiagos fizikines ir chemines savybes, turi būti pasirinktas bandymas stacionariomis, pusiau stacionariomis arba pratekėjimo sąlygomis, kad būtų įvykdyti kokybės kriterijai.

Žuvys veikiamos medžiaga, kaip tai aprašyta toliau:

— trukmė: 96 valandos

— gyvūnų skaičius: bent 7 vienai koncentracijai,

— rezervuarai: tinkamo tūrio, atsižvelgiant į rekomenduotą įkrovą,

— įkrova: didžiausia rekomenduota bandymo stacionariomis ir pusiau stacionariomis sąlygomis įkrova – 1 g/litre; sistemoms su pratekėjimu priimtina didesnė įkrova,

— bandomoji koncentracija: bent penkios koncentracijos, kurios skiriasi pastoviu faktoriumi, ne didesniu kaip 2,2, bei kiek įmanoma apima mirtingumo intervalą nuo 0 iki 100 %,

— vanduo: žr. 1.6.1.2,

— šviesa: kasdienis apšvietimas, kurio trukmė nuo 12 iki 16 valandų,

— temperatūra: tinkama rūšiai (2 priedėlis), tačiau konkrečiame bandyme palaikoma ±1 °C tikslumu,

— ištirpusio deguonies koncentracija: ne mažesnė kaip 60 % soties ore vertės pasirinktos temperatūros sąlygomis,

— maitinimas: jokio.

Žuvys tikrinamos iš pradžių po 2-4 valandų, po to – bent kas 24 valandas. Žuvis laikoma negyva, jei liečiant uodeginį stiebelį (caudal peduncle) nėra jokios reakcijos ir jei nesimato jokių kvėpavimo judesių. Po apžiūros negyvos žuvys pašalinamos ir užrašomas negyvų žuvų skaičius.

Užrašomi pastebimi nenormalumai (pvz., pusiausvyros netekimas, plaukimo manieros, kvėpavimo funkcijos, pigmentacijos pokyčiai ir t.t.).

pH, ištirpęs deguonis ir temperatūra turi būti matuojami kasdieną.

Ribinis bandymas

Taikant šiame bandymo metode aprašytas metodikas, galima daryti ribinį bandymą su koncentracija 100 mg/litre, kai norima įrodyti, kad LC_{50} yra didesnė nei ši koncentracija.

Jei medžiagos prigimtis yra tokia, kad 100 mg/litre koncentracijos bandymų vandenyje pasiekti negalima, ribinis bandymas turi būti daromas su koncentracija, lygia medžiagos tirpumui (arba su didžiausia koncentracija, kurioje susidaro patvari suspensija) naudojamoje terpėje (dar žr. 1.6.1.1 punktą).

Ribinis bandymas turi būti daromas naudojant 7-10 žuvų, toks pat žuvų skaičius turi būti naudojamas kontroliniame (-iuose) bandyme (-uose). (Binominio skirstinio teorija sako, kad, jei bandyme su 10 žuvų mirtingumas yra nulinis, pasikliovimo tikimybė, kad LC_{50} yra didesnė nei ribiniame bandyme naudota koncentracija, yra 99,9 %. Mirtingumo nebuvimas, naudojant 7, 8 arba 9 žuvis, užtikrina bent 99 % pasikliovimo tikimybę, kad LC_{50} yra didesnė nei naudota koncentracija).

Jei mirtingumo atvejai pasitaiko, turi būti daromas visas bandymas. Jei stebimi subletalūs padariniai, tai turi būti užrašyta ataskaitoje.

2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Kiekvienam laikotarpiui, kuriam rezultatai buvo užrašyti (24, 48, 72 ir 96 valandos), logaritminiame tikimybiniame popieriuje braižykite mirtingumo, nustatyto kiekvienam rekomenduotam veikimo laikotarpiui, procentinės vertės priklausomybės nuo koncentracijos kreivę.

Kai tai įmanoma, ir kiekvienam matavimo laikotarpiui reikia įvertinti LC_{50} ir pasikliovimo rėžius ($p = 0,05$), tam taikant standartines metodikas; šios vertės turi būti apvalinamos iki vieno ar, daugiausia, iki dviejų reikšmingų skaitmenų (apvalinimo iki dviejų skaitmenų pavyzdys: 170 vietoj 173,5; 0,13 vietoj 0,127; 1,2 vietoj 1,21).

Tais atvejais, kai atsako procentinės vertės ir koncentracijos priklausomybės kreivės polinkis yra per status, kad būtų galima skaičiuoti LC_{50}, pakanka grafinio šios vertės įverčio.

Kai dviem gretimoms koncentracijoms, kurių santykis 2,2, gaunamos 0 ir 100 % mirtingumo vertės, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalui, į kurį patenka LC_{50}.

Jei pastebėta, kad bandomosios medžiagos patvarumo arba homogeniškumo užtikrinti neįmanoma, tai turi būti pateikta ataskaitoje, o interpretuoti rezultatus reikia atsargiai.

3. ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— informacija apie bandymų žuvis (mokslinis pavadinimas, veislė, tiekėjas, bet koks išankstinis apdorojimas, dydis ir kiekvienai bandomajai koncentracijai naudotų žuvų skaičius);

— skiedimo vandens šaltinis ir pagrindinės cheminės savybės (pH, kietumas, temperatūra);

— mažai vandenyje tirpios medžiagos atveju, pradinio tirpalo ir bandomųjų tirpalų ruošimo metodas;

— visų pagalbinių medžiagų koncentracija;

— naudotų koncentracijų sąrašas ir visa turima informacija apie bandomosios medžiagos patvarumą naudotos koncentracijos bandomajame tirpale;

— jei daroma cheminė analizė, taikyti metodai ir gauti rezultatai;

— ribinio bandymo, jei jis buvo daromas, rezultatai;

— taikytos bandymo metodikos pasirinkimo priežastys ir detalės (pvz., stacionariomis sąlygomis, pusiau stacionariomis sąlygomis, dozavimo srautas, pratekėjimo srautas, ar buvo naudojamas aeravimas, žuvų įkrovą ir t.t.);

— bandymų įrangos aprašymas;

— apšvietimo režimas;

— ištirpusio deguonies koncentracija bandomuosiuose tirpaluose, jų pH vertė ir temperatūra kas 24 valandas;

— įrodymas, kad kokybės kriterijai įvykdyti;

— lentelė, kurioje kiekvienam rekomenduotam matavimo laikotarpiui pateiktas bendras mirtingumas kiekvienai koncentracijai ir kontroliniame bandyme (ir kontroliniame bandyme su pagalbine medžiaga, jei reikia);

— atsako procentinės vertės priklausomybės nuo koncentracijos kreivės grafikas bandymo pabaigoje;

— jei įmanoma, LC_{50} vertes kiekvienam rekomenduotam matavimo laikotarpiui (su 95 % pasikliovimo rėžiais);

— statistinės metodikos, taikytos LC_{50} vertėms nustatyti;

— gauti rezultatai, jei naudota etaloninė medžiaga,

— didžiausia bandomoji koncentracija, kurią naudojant mirtingumas bandymo laikotarpiu yra nulinis;

— mažiausia bandomoji koncentracija, bandymo laikotarpiu sukelianti 100 % mirtingumą.

4 **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

2) AFNOR - Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* - Static and Flow Through methods - NFT 90-303 June 1985.

3) AFNOR - Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* - Static and Flow - Through methods - NFT 90-305 June 1985.

4) ISO 7346/1,/2 and/3 - Water Quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan - *Teleostei, Cyprinidae)*. Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

8) NEN 6506 - Water - Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Pan IV, 16 March 1979.

12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph. P. und Boje. R. Ökotoxikologie Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. 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 bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

1 priedėlis

Atkurtasis vanduo

Skiedimui tinkamo vandens pavyzdys

Visos cheminės medžiagos turi būti analiziškai grynos.

Vanduo turi būti geros kokybės distiliuotas vanduo arba dejonizuotas vanduo, kurio savitasis laidumas būtų mažesnis kaip $5 \mu Scm^{-1}$.

Vandens distiliavimo aparate neturi būti jokių varinių detalių.

Pradiniai tirpalai

$CaCl_2 \times 2H_2O$ (kalcio chloridas, dihidratas):	11,76 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	
$MgSO_4 \times 7H_2O$ (magnio sulfatas, heptahidratas):	4,93 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	
$NaHCO_3$ (natrio hidrokarbonatas):	2,59 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	
KC1 (kalio chloridas):	0,23 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	

Atkurtasis skiedimo vanduo

Sumaišykite 25 ml kiekvieno iš šių keturių tirpalų ir praskieskite vandeniu iki 1 litro.

Aeruokite tol, kol ištirpusio deguonies koncentracija pasiekia soties ore lygį.

pH turi būti 7,8 ± 0,2.

Prireikus reguliuokite pH NaOH (natrio hidroksidu) arba HC1 (druskos rūgštimi).

Taip paruoštą skiedimo vandenį padėkite į šalį 12 valandų, jo nereikia daugiau aeruoti.

Ca ir Mg jonų koncentracijų suma šiame tirpale yra lygi 2,5 mmol/litre. Ca ir Mg jonų santykis lygus 4:1, o Na ir K jonų santykis lygus 10:1. Bendrasis šio tirpalo šarmingumas lygus 0,8 mmol/litre.

Joks nukrypimas nuo skiedimo vandens ruošimo būdo neturi keisti vandens sudėties arba savybių.

2 priedėlis

Žuvų rūšys, rekomenduotos naudoti bandymuose

Rekomenduojamos rūšys	Rekomenduojamas bandymų temperatūros intervalas (°C)	Rekomenduojamas bandymų gyvūno bendras ilgis (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Dryžuotasis danio	nuo 20 iki 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Rainė	nuo 20 iki 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Paprastasis karpis	nuo 20 iki 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlegel 1850) Red killifish	nuo 20 iki 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae (Peters 1859) Gupi	nuo 20 iki 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Bluegill	nuo 20 iki 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Margasis upėtakis	nuo12 iki 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Golden orfe	nuo 20 iki 24	6,0 ± 2,0

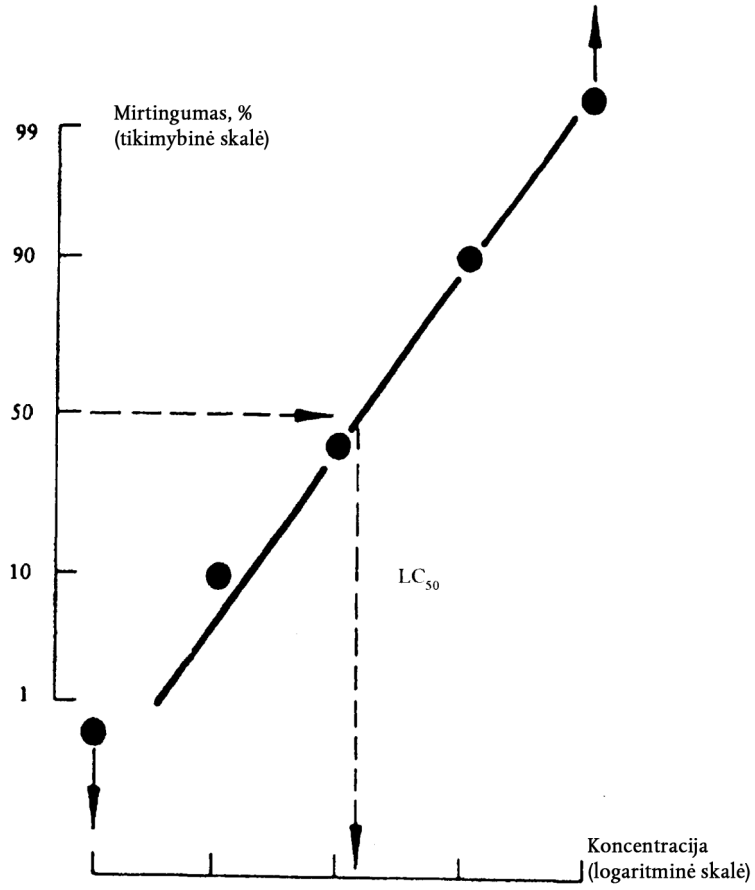
Rinkimas

Lentelėje nurodytas žuvis lengva auginti ir (arba) jų galima gauti ištisus metus. Žuvis galima auginti ir veisti žuvų fermose arba laboratorijoje, ligų ir parazitų kontrolės sąlygomis, kad bandymų gyvūnai būtų sveiki ir būtų žinoma jų kilmė. Šių žuvų yra daugelyje pasaulio kraštų.

3 priedėlis

Koncentracijos pavyzdys: mirtingumo dalis procentais

LC_{50} nustatymo pavyzdys, naudojant logaritminį-tikimybinį popierių



C.2. ŪMUS TOKSIŠKUMO POVEIKIS DAFNIJOMS

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šio bandymo tikslas yra nustatyti medžiagos medianinę efektyvią koncentraciją (EC_{50}) dafnijoms imobilizuoti gėlame vandenyje. Prieš pradedant bandymą, pageidautina turėti kiek galima daugiau informacijos apie medžiagos tirpumą vandenyje, garų slėgį, cheminį patvarumą, disociacijos konstantas ir biologinį skaidomumą.

Planuojant bandymą ir interpretuojant jo rezultatus, turi būti atsižvelgta į papildomą informaciją (pvz., struktūrinė formulė, grynumo laipsnis, reikšmingesnių priemaišų prigimtis ir procentinis kiekis, priedų buvimas ir jų kiekis, pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientas).

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Direktyvos reikalavimas dėl dafnijas veikiančios LC_{50} laikomas įvykdytų, jei EC_{50} nustatoma taip, kaip aprašyta šiame bandymo metode.

Šiame bandyme ūmus toksiškumas išreikiamas medianine efektyvia imobilizavimo koncentracija (EC_{50}). Tai koncentracija, išreikšta pradine verte, kurią naudojant per nepertraukiamo veikimo laikotarpį, kuris turi būti nurodytas, imobilizuojama 50 % bandyme naudotos partijos dafnijų.

Imobilizavimas:

Imobilizuotais laikomi tie gyvūnai, kurie negali plaukti, praėjus 15 sekundžių nuo švelnaus bandymų indo pakratymo.

Visos bandomosios medžiagos koncentracijos yra pateikiamos mase tūrio vienetui (mg/litre). Jas taip pat galima išreikšti mase masės vienetui (mg/kg).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kaip priemonė parodyti, kad laboratorinėmis bandymų sąlygomis naudojamų rūšių jautrumas žymiai nepakito, gali būti daromas bandymas su etalonine medžiaga.

EEC tarplaboratorinio bandymo rezultatų, gautų keturioms medžiagoms, suvestinė pateikta 2 papildyme.

1.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Galima atlikti ribinį bandymą su 100 mg/litre koncentracija, norint parodyti, kad EC_{50} yra didesnė nei ši koncentracija.

Dafnijos 48 valandas veikiamos bandomąja medžiaga, įdėta į vandenį tam tikrame koncentracijų intervale. Jei bandymo trukmė mažesnė, tai turi būti pagrįsta bandymų ataskaitoje.

Kai kitos bandymų sąlygos yra identiškos ir kai bandomoji medžiaga naudojama atitinkamame koncentracijų intervale, vidutinis poveikio į dafnijos gebėjimą plaukti laipsnis dėl skirtingos bandomosios medžiagos koncentracijos yra taip pat nevienodas. Bandymo pabaigoje negalinčių plaukti dafnijų procentinė dalis, esant skirtingoms koncentracijoms, bus nevienoda. Koncentracijos, kurias naudojant imobilizavimas nulinis arba 100 %, gaunamos tiesiogiai, remiantis bandymo metu darytais stebėjimais, tuo tarpu 48 valandų EC_{50} skaičiuojama, jei tai įmanoma.

Šiame metode naudojama stacionarioji sistema, taigi veikimo laikotarpiu bandomieji tirpalai neatnaujinami.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Kokybės kriterijai turi būti taikomi ir ribinio bandymo metodui, ir viso bandymo metodui.

Bandymo pabaigoje imobilizavimas kontroliniuose bandymuose neturi būti didesnis kaip 10 %.

Kontrolinėse grupėse naudojami bandymų gyvūnai neturi būti sulaikomi vandens paviršiuje.

Pageidautina, kad ištirpusio deguonies koncentracija bandymų induose visą bandymo laiką būtų didesnė kaip 3 mg/l. Tačiau jokiomis aplinkybėmis ištirpusio deguonies koncentracija neturi būti mažesnė kaip 2 mg/l.

Bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymo laiką turi būti laikoma 80 % pradinės koncentracijos vertės ribose.

Medžiagų, kurios lengvai tirpsta bandomojoje terpėje ir kurių tirpalai patvarūs, t.y., kuriuose ištirpinta medžiaga labai negaruoja, neskyla, nevyksta hidrolizė arba neadsorbuojama, pradine koncentracija galima laikyti vardinę medžiagos koncentraciją. Turi būti pateikti įrodymai, kad koncentracijos buvo išlaikytos per visą bandymą ir kad kokybės kriterijai buvo įvykdyti.

Medžiagų, kurios:

i) mažai tirpsta bandymo terpėje, arba

ii) gali sudaryti patvarias emulsijas arba suspensijas, arba

iii) yra nepatvarios vandeniniuose tirpaluose,

pradine koncentracija turi būti laikoma koncentracija, nustatyta tirpale (ar, jei techniškai tai neįmanoma, išmatuota vandens tūryje) bandymo pradžioje. Koncentracija turi būti nustatyta po to, kai nusistovi pusiausvyra, tačiau prieš bandymų organizmų dėjimą.

Visais atvejais, norint patvirtinti tikrąsias veikimo koncentracijas arba kokybės kriterijų vykdymą, bandymo metu turi būti daromi tolimesni matavimai.

pH vertė neturi keistis daugiau kaip 1 pH vienetu.

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Reagentai**

1.6.1.1. *Bandomųjų medžiagų tirpalai*

Pradiniai reikiamos koncentracijos tirpalai ruošiami ištirpinant medžiagą dejonizuotame vandenyje arba vandenyje pagal 1.6.1.2.

Pasirinktos bandymo koncentracijos tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Jei bandomos didelės koncentracijos, medžiaga gali būti ištirpinta praskiedimo vandenyje tiesiogiai.

Paprastai medžiagos turi būti bandomos tik iki tirpumo ribos. Norint kai kurioms medžiagoms (pvz., vandenyje mažai tirpioms medžiagoms, arba kurių didelis P_{ow}, arba toms, kurios sudaro patvarią dispersiją, o ne tikrąjį tirpalą vandenyje) užtikrinti galimybę pasiekti soties/pastovią koncentraciją, priimtina daryti bandymą virš medžiagos tirpumo ribos. Tačiau yra svarbu, kad tokia koncentracija netrikdytų bandymo sistemos kitais atžvilgiais (pvz., vandens paviršiuje nesusidarytų bandomosios medžiagos plėvelė, kuri neleistų į vandenį patekti deguoniui, ir t.t.).

Ruošiant vandenyje mažai tirpių medžiagų pradinius tirpalus arba norint pagerinti šių medžiagų dispergavimą bandomojoje terpėje, į pagalbą galima pasitelkti dispergavimą ultragarsu, organinius tirpiklius, emulsiklius arba dispergatorius. Kai naudojamos tokios pagalbinės medžiagos, visuose bandomųjų koncentracijų tirpaluose turi būti toks pat pagalbinės medžiagos kiekis, ir papildomos kontrolinės dafnijos turi būti veikiamos pagalbine medžiaga, kurios koncentracija būtų tokia pat, kaip ir bandymų serijoje. Tokių pagalbinių medžiagų koncentracija turi būti kuo mažesnė ir jokiu būdu neturi būti didesnė kaip 100 mg/litre bandomosios terpės.

Bandymas turi būti daromas nereguliuojant pH vertės. Jei pH vertė turi polinkį žymiai pasikeisti, patartina bandymą kartoti reguliuojant pH vertę, ir bandymo rezultatus pateikti ataskaitoje. Tokiu atveju pradinio tirpalo pH vertė turi būti pakoreguota iki skiedimo vandens pH vertės, jei nėra ypatingos priežasties to nedaryti. Šiam tikslui geriausia naudoti HC1 ir NaOH. Šis pH reguliavimas turi būti daromas taip, kad bandomosios medžiagos koncentracija pradiniame tirpale žymiai nepasikeistų. Jei reguliuojant pH vyksta kokia nors cheminė reakcija arba bandomoji medžiaga fiziškai iškrenta į nuosėdas, tai turi būti nurodyta ataskaitoje.

1.6.1.2. *Bandymų vanduo*

Šiame bandyme naudojamas atkurtasis vanduo (žr. 1 papildymą ir 2 nuorodą: ISO 6341). Kultūrai rekomenduojama naudoti vandenį, kurio kokybė (pH, kietumas) būtų panaši į bandyme naudojamo vandens kokybę, kad prieš bandymą nereikėtų aklimatizuoti.

1.6.2. **Aparatūra**

Turi būti naudojama įprasta laboratorinė aparatūra ir įranga. Būtų geriau, jei su bandomaisiais tirpalais kontaktuojanti įranga būtų pagaminta vien tik iš stiklo:

— Deguonies matuoklis (su mikroelektrodu arba kitokiu įtaisu, tinkamu matuoti ištirpusį deguonį mažo tūrio bandiniuose),

— atitinkama termostatavimo aparatūra,

— pH-metras,

— vandens kietumo nustatymo įranga.

1.6.3. **Bandymų organizmas**

Daphnia magna yra labiausiai bandymui tinkanti rūšis, nors leidžiama naudoti ir *Daphnia pulex*. Bandymų gyvūnų amžius bandymo pradžioje turi būti mažesnis kaip 24 valandos, jie turi būti užauginti laboratorijoje, nesirgti akivaizdžiomis ligomis ir būti žinomos kilmės (pvz.,. veisimo sąlygos, bet koks pradinis apdorojimas ir t.t.).

1.6.4. **Bandymų eiga**

Norint gauti informacijos apie koncentracijų, kurias reikia naudoti pagrindiniame bandyme intervalą, prieš galutinį bandymą gali būti daromas intervalo nustatymo bandymas.

Daromas vienas kontrolinis bandymas be bandomosios medžiagos ir, jei tinka, bandymų serija papildoma dar vienu kontroliniu bandymu, kuriame naudojama pagalbinė medžiaga.

Dafnijos veikiamos medžiaga, kaip tai aprašyta toliau:

— *trukmė:* geriau 48 valandos,

— *gyvūnų skaičius:* bent 20 gyvūnų kiekvienai bandomajai koncentracijai, būtų geriau, jei jie būtų padalinti į keturias grupes po penkis gyvūnus arba į dvi grupes po dešimt gyvūnų,

— *įkrova:* kiekvienam gyvūnui turi tekti ne mažiau kaip 2 ml bandomojo tirpalo,

— *bandomoji koncentracija:* bandomasis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat dafnijų dėjimą, ir geriau būtų nenaudoti jokio tirpiklio, išskyrus vandenį. Koncentracija keičiama pagal geometrinę progresiją, koncentracijų santykis ne didesnis kaip 2,2. Kartu su kontroliniais bandiniais turi būti išbandytos koncentracijos, dėl kurių imobilizaciją po 48 valandų yra 0 ir 100 %, ir intervalas tarpinių imobilizacijos laipsnių koncentracijų, leidžiančių skaičiuoti 48 valandų EC_{50}.

— *vanduo:* žr. 1.6.1.2,

— *šviesa:* šviesos ir tamsos ciklas pasirenkamas laisvai,

— *temperatūra*: bandymų temperatūra turi būti nuo 18 iki 22 °C, tačiau kiekviename atskirame bandyme ji turi būti laikoma ± 1 °C ribose,

— *aeravimas:* per bandomuosius tirpalus oras neturi būti pučiamas,

— *šėrimas:* jokio.

Kontrolinių ir visų koncentracijų bandomųjų tirpalų pH ir deguonies koncentracija turi būti matuojami bandymo pabaigoje; bandomųjų tirpalų pH vertė turi nesikeisti.

Lakios medžiagos turi būti bandomos visiškai užpildytuose uždaruose induose, kurie būtų pakankamai dideli, kad juose galėtų pritrūkti deguonies.

Dafnijos tikrinamos bent po 24 veikimo valandų ir dar kartą po 48 valandų.

Ribinis bandymas

Taikant šiame bandymo metode aprašytas metodikas, galima daryti ribinį bandymą su koncentracija 100 mg/litre, kai norima įrodyti, kad EC_{50} yra didesnė nei ši koncentracija.

Jei medžiagos prigimtis yra tokia, kad 100 mg/litre koncentracijos bandymų vandenyje pasiekti negalima, ribinis bandymas turi būti daromas su koncentracija, lygia medžiagos tirpumui (arba su didžiausia koncentracija, kurioje susidaro patvari suspensija) naudojamoje terpėje (dar žr. 1.6.1.1 punktą).

Ribinis bandymas turi būti daromas naudojant 20 dafnijų, padalintų į dvi arba keturias partijas, tas pat dafnijų skaičius turi būti naudojamas kontroliniame (-iuose) bandyme (-uose). Jei pasitaiko imobilizacijos atvejų, turi būti atliekamas visas bandymas.

2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Kiekvienam laikotarpiui, kuriam rezultatai buvo užrašyti (24 ir 48), logaritminiame- tikimybiniame popieriuje braižykite mirtingumo procentinės vertės priklausomybės nuo koncentracijos kreivę.

Kai tai įmanoma, ir kiekvienam matavimo laikotarpiui reikia įvertinti EC_{50} ir pasikliovimo rėžius ($p = 0,05$), tam taikant standartines metodikas; šios vertės turi būti apvalinamos iki vieno ar, daugiausia, iki dviejų reikšmingų skaitmenų (apvalinimo iki dviejų skaitmenų pavyzdys: 170 vietoj 173,5; 0,13 vietoj 0,127; 1,2 vietoj 1,21).

Tais atvejais, kai atsako procentinės vertės ir koncentracijos priklausomybės kreivės polinkis yra per status, kad būtų galima skaičiuoti EC_{50}, pakanka grafinio šios vertės įverčio.

Kai dviem gretimoms koncentracijoms, kurių santykis 2,2, gaunamos 0 ir 100 % imobilizavimo vertės, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalui, į kurį patenka EC_{50}.

Jei pastebėta, kad bandomosios medžiagos patvarumo arba homogeniškumo užtikrinti neįmanoma, tai turi būti pateikta ataskaitoje, o interpretuoti rezultatus reikia atsargiai.

3. ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— informacija apie bandymų organizmą (mokslinis pavadinimas, veislė, tiekėjas arba šaltinis, bet koks išankstinis apdorojimas, auginimo metodas, įskaitant maisto šaltinį, rūšį ir kiekį, maitinimo dažnį);

— skiedimo vandens šaltinis ir pagrindinės cheminės savybės (pH, temperatūra, kietumas);

— mažai vandenyje tirpios medžiagos atveju, pradinio tirpalo ir bandomųjų tirpalų ruošimo metodas;

— visų pagalbinių medžiagų koncentracija;

— naudotų koncentracijų sąrašas ir visa turima informacija apie bandomosios medžiagos patvarumą naudotos koncentracijos bandomajame tirpale;

— jei daroma cheminė analizė, taikyti metodai ir gauti rezultatai;

— ribinio bandymo, jei jis buvo daromas, rezultatai;

— bandymų įrangos aprašymas;

— apšvietimo režimas;

— ištirpusio deguonies koncentracija bandomuosiuose tirpaluose, jų pH vertė ir temperatūra;

— įrodymai, kad kokybės kriterijai įvykdyti;

— lentelė, kurioje kiekvienam rekomenduotam matavimo laikotarpiui (24 arba 48 valandos) pateiktas bendras imobilizuotų dafnijų skaičius kiekvienai koncentracijai ir kontroliniame bandyme (ir kontroliniame bandyme su pagalbine medžiaga, jei reikia);

— atsako procentinės vertės priklausomybės nuo koncentracijos kreivės grafikas bandymo pabaigoje;

— jei įmanoma, EC_{50} vertes kiekvienam rekomenduotam matavimo laikotarpiui (su 95 % pasikliovimo rėžiais);

— statistinės metodikos, taikytos EC_{50} vertėms nustatyti;

— gauti rezultatai, jei naudota etaloninė medžiaga,

— didžiausia bandomoji koncentracija, kurią naudojant imobilizavimas bandymo laikotarpiu yra nulinis;

— mažiausia bandomoji koncentracija, bandymo laikotarpiu sukelianti 100 % imobilizavimą.

4. **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guidelines 202, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

2) International Standard ISO, Water Quality - Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341-1989

3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera - crusiacea) 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 38412 (L1) und (LII).

6) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

7) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. and Exper. Ther., 1949, vol. 96, 99-113.

8) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

9) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

10) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM, 1977, STP 634, 65-84.

11) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50} US EPA.

1 priedėlis

Atkurtasis vanduo

Skiedimui tinkamo vandens pavyzdys (pagal ISO 6341)

Visos cheminės medžiagos turi būti analiziškai grynos.

Vanduo turi būti geros kokybės distiliuotas vanduo arba dejonizuotas vanduo, kurio savitasis laidumas būtų mažesnis kaip $5 \mu S cm^{-1}$.

Vandens distiliavimo aparate neturi būti jokių varinių detalių.

Pradiniai tirpalai

$CaCl_2 \times 2H_2O$ (kalcio chloridas, dihidratas):	11,76 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	
$MgSO_4 \times 7H_2O$ (magnio sulfatas, heptahidratas):	4,93 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	
$NaHCO_3$ (natrio hidrokarbonatas):	2,59 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	
KC1 (kalio chloridas):	0,23 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	

Atkurtasis skiedimo vanduo

Sumaišykite 25 ml kiekvieno iš šių keturių tirpalų ir praskieskite vandeniu iki 1 litro.

Aeruokite tol, kol ištirpusio deguonies koncentracija pasiekia soties ore lygį.

pH turi būti 7,8 ± 0,2.

Prireikus reguliuokite pH NaOH (natrio hidroksidu) arba HC1 (druskos rūgštimi).

Tai paruoštą skiedimo vandenį padėkite į šalį 12 valandų, jo nereikia daugiau aeruoti.

Ca ir Mg jonų koncentracijų suma šiame tirpale yra lygi 2,5 mmol/litre. Ca ir Mg jonų santykis lygus 4:1, o Na ir K jonų santykis lygus 10:1. Bendrasis šio tirpalo šarmingumas lygus 0,8 mmol/litre.

Joks nukrypimas nuo skiedimo vandens ruošimo būdo neturi keisti vandens sudėties arba savybių.

2 priedėlis

EEC tarplaboratorinio lyginimo bandymo, daryto 1978 (taip pat cituojamo 2 nuorodoje) rezultatų suvestinė

Įspėjimas: šio tarplaboratorinio lyginimo bandymo tikslas buvo nustatyti 24 *valandų* EC_{50}.

Naudota medžiaga:

1) Kalio dichromatas

2) Tetrapropilbenzensulfoninė rūgštis

3) Natrio tetrapropilbenzensulfonatas

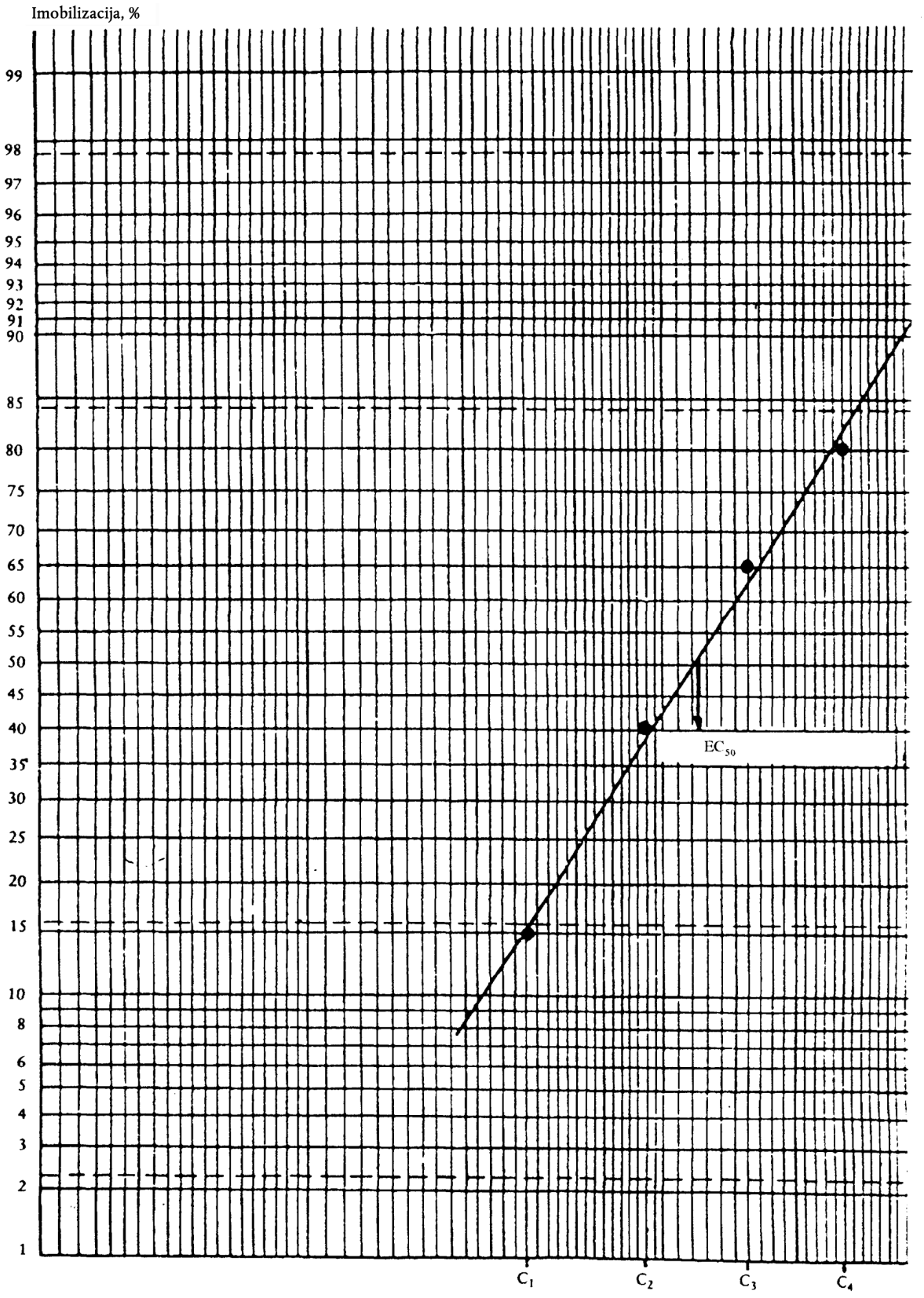
4) Kalio 2,4,5-trichlorfenoksiacetatas

Medžiaga	Dalyvavusių laboratorijų skaičius	Skaičiavimams naudotų rezultatų skaičius	24 h $EC_{50,}$ mg/l, vidutinė vertė
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

3 priedėlis

Koncentracijos pavyzdys: imobilizavimo procentinė dalis

EC_{50} nustatymo pavyzdys, naudojant logaritminį-tikimybinį popierių



C.3. DUMBLIŲ INHIBAVIMO BANDYMAS

1. METODAS

1.1. ĮVADAS

Šio bandymo tikslas yra nustatyti, kaip medžiagos veikia vienaląsčių žalių dumblių rūšių augimą. Per palyginti trumpai (72 valandas) trunkančius bandymus galima įvertinti poveikį kelioms kartoms. Šį metodą galima pertvarkyti taip, kad jį būtų galima taikyti kelioms vienaląsčių dumblių rūšims, tokiu atveju su bandymo ataskaita turi būti pateiktas metodo aprašymas.

Šį metodą lengviausią taikyti vandenyje tirpioms medžiagoms, kurios bandymo sąlygomis greičiausiai lieka vandenyje.

Metodą galima taikyti medžiagoms, kurios tiesiogiai netrukdo matuoti dumblių augimą.

Prieš pradedant bandymą, pageidautina turėti kiek galima daugiau informacijos apie medžiagos tirpumą vandenyje, garų slėgį, cheminį patvarumą, disociacijos konstantas ir biologinį skaidomumą.

Planuojant bandymą ir interpretuojant jo rezultatus, turi būti atsižvelgta į papildomą informaciją (pvz., struktūrinė formulė, grynumo laipsnis, reikšmingesnių priemaišų prigimtis ir procentinis kiekis, priedų buvimas ir jų kiekis, pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientas).

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Ląstelių tankis: ląstelių skaičius viename mililitre;

Augimas: ląstelių tankio padidėjimas per bandymo laiką,

Augimo greitis: ląstelių tankio didėjimas per laiko vienetą;

EC_{50}: šiame metode – tai bandomosios medžiagos koncentracija, kurioje augimas (E_bC_{50}) arba augimo greitis (E_rC_{50}) lyginant su kontroliniu bandymu mažėja 50 %;

NOEC (stebimo poveikio nedaranti koncentracija): šiame metode – tai didžiausia bandomoji koncentracija, kurioje žymaus augimo inhibavimo lyginant su kontroliniu bandymu nepastebėta.

Kiekviena bandomosios medžiagos koncentracija yra skaičiuojama mase tūrio vienetui (mg/litre). Ją dar galima išreikšti mase masės vienetui (mg/kg).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kaip priemonė parodyti, kad laboratorinėmis bandymų sąlygomis naudojamų rūšių jautrumas žymiai nepakito, gali būti daromas bandymas su etalonine medžiaga.

Jei naudojama etaloninė medžiaga, rezultatai turi būti pateikti ataskaitoje. Etalonine medžiaga galima naudoti kalio dichromatą, tačiau jo spalva gali turėti įtakos šviesos, kurią gauna ląstelės, kokybei ir intensyvumui bei spektrofotometrinių nustatymų, jei jie daromi, rezultatams. Kalio dichromatas buvo naudojamas tarptautiniame tarplaboratoriniame bandyme (žr. 3 nuorodą ir 2 papildymą).

1.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Galima daryti ribinį bandymą su 100 mg/litre koncentracija, norint parodyti, kad EC_{50} yra didesnė nei ši koncentracija.

Eksponentiškai augančios atrinktų žaliųjų dumblių kultūros apibrėžtomis sąlygomis per kelias kartas veikiamos įvairios koncentracijos bandomąja medžiaga.

Bandomieji tirpalai inkubuojami 72 valandoms; per tą laiką bent kas 24 valandas kiekviename tirpale matuojamas ląstelių tankis. Nustatomas augimo inhibavimas lyginant su kultūros augimu kontroliniame bandyme.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Kokybės kriterijai turi būti taikomi ir ribinio bandymo metodui, ir viso bandymo metodui.

Ląstelių tankis kontrolinių bandymų kultūrose per tris paras turi būti padidėjęs bent 16 kartų.

Bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymo laiką turi būti laikoma 80 % pradinės koncentracijos vertės ribose.

Medžiagų, kurios lengvai tirpsta bandomojoje terpėje ir kurių tirpalai patvarūs, t.y., kuriuose ištirpinta medžiaga žymiai negaruoja, neskyla, nevyksta hidrolizė arba neadsorbuojama, pradine koncentracija galima laikyti vardinę medžiagos koncentraciją. Turi būti pateikti įrodymai, kad koncentracijos buvo išlaikytos per visą bandymą ir kad kokybės kriterijai buvo įvykdyti.

Medžiagų, kurios:

i) mažai tirpsta bandymo terpėje, arba

ii) gali sudaryti patvarias emulsijas arba suspensijas, arba

iii) yra nepatvarios vandeniniuose tirpaluose,

pradine koncentracija turi būti laikoma koncentracija nustatyta bandymo pradžioje. Koncentracija turi būti nustatyta po to, kai nusistovi pusiausvyra.

Visais atvejais, norint patvirtinti tikrąsias veikimo koncentracijas arba kokybės kriterijų vykdymą, bandymo metu turi būti daromi tolimesni matavimai.

Yra pripažinta, kad per tą laiką, kol vyksta bandymas, žymus bandomosios medžiagos kiekis gali būti sulaikytas dumblių biomase. Taigi, siekiant parodyti, kad vykdomi aukščiau minėti kokybės kriterijai, turi būti atsižvelgta ir į medžiagos kiekį, kuris patenka į dumblių biomasę, ir į medžiagos kiekį tirpale (ar, jei tai techniškai neįmanoma, į vandens tūryje nustatytą medžiagos kiekį). Tačiau, kadangi medžiagos koncentracijos dumblių biomasėje nustatymas gali kelti esminių techninių problemų, atitikimas kokybės kriterijams gali būti parodytas, darant bandymą su didžiausia medžiagos koncentracija, bet be dumblių, ir išmatuojant jos koncentraciją tirpale (ar, jei tai techniškai neįmanoma, vandens tūryje) bandymo pradžioje ir pabaigoje.

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Reagentai**

1.6.1.1. *Bandomųjų medžiagų tirpalai*

Pradiniai reikiamos koncentracijos tirpalai ruošiami ištirpinant medžiagą dejonizuotame vandenyje arba vandenyje pagal 1.6.1.2.

Pasirinktos bandymo koncentracijos tirpalai ruošiami alikvotinę pradinio tirpalo dalį įpilant į dumblių pradinę kultūrą (žr. 1 papildymą). Paprastai medžiagos turi būti bandomos tik iki tirpumo ribos. Norint kai kurioms medžiagoms (pvz., vandenyje mažai tirpioms medžiagoms, arba kurių didelis P_{ow}, arba toms, kurios sudaro patvarią dispersiją, o ne tikrąjį tirpalą vandenyje) užtikrinti galimybę pasiekti soties/pastovią koncentraciją, priimtina daryti bandymą virš medžiagos tirpumo ribos. Tačiau yra svarbu, kad tokia koncentracija netrikdytų bandymo sistemos kitais atžvilgiais (pvz., vandens paviršiuje nesusidarytų bandomosios medžiagos plėvelė, kuri neleistų į vandenį patekti deguoniui, ir t.t.).

Ruošiant vandenyje mažai tirpių medžiagų pradinius tirpalus arba norint pagerinti šių medžiagų dispergavimą bandomojoje terpėje, į pagalbą galima pasitelkti dispergavimą ultragarsu, organinius tirpiklius, emulsiklius arba dispergatorius. Kai naudojamos tokios pagalbinės medžiagos, visuose bandomųjų koncentracijų tirpaluose turi būti toks pat pagalbinės medžiagos kiekis, ir papildomi kontroliniai bandiniai turi būti veikiami pagalbine medžiaga, kurios koncentracija būtų tokia pat, kaip ir bandymų serijoje. Tokių pagalbinių medžiagų koncentracija turi būti kuo mažesnė ir jokiu būdu neturi būti didesnė kaip 100 mg/litre bandomosios terpės.

Bandymas turi būti daromas nereguliuojant pH vertės. Jei yra įrodymų apie žymų pH vertės kitimą, patartina bandymą kartoti reguliuojant pH vertę, ir bandymo rezultatus pateikti ataskaitoje. Tokiu atveju pradinio tirpalo pH vertė turi būti pakoreguota iki skiedimo vandens pH vertės, jei nėra ypatingos priežasties to nedaryti. Šiam tikslui geriausia naudoti HC1 ir NaOH. Šis pH reguliavimas turi būti daromas taip, kad bandomosios medžiagos koncentracija pradiniame tirpale žymiai nepasikeistų. Jei reguliuojant pH vyksta kokia nors cheminė reakcija arba bandomoji medžiaga fiziškai iškrenta į nuosėdas, tai turi būti nurodyta ataskaitoje.

1.6.1.2. *Bandymų terpė*

Vanduo turi būti geros kokybės distiliuotas vanduo arba dejonizuotas vanduo, kurio savitasis laidumas būtų mažesnis kaip $5 \mu Scm^{-1}$. Vandens distiliavimo aparate neturi būti jokių varinių detalių.

Rekomenduojama tokia terpė.

Pagal čia pateiktą lentelę ruošiami keturi pradiniai tirpalai. Pradiniai tirpalai sterilizuojami filtravimu per membraną arba autoklave, ir laikomi tamsoje 4 °C temperatūroje. Pradinis tirpalas nr. 4 turi būti sterilizuojamas tik filtravimu per membraną. Šie pradiniai tirpalai skiedžiami, kad bandomuosiuose tirpaluose būtų gautos galutinės mitybinių medžiagų koncentracijos.

Mitybinė terpė	Koncentracija pradiniame tirpale		Galutinė koncentracija bandomajame tirpale	
1 pradinis tirpalas: mitybiniai makroelementai				
NH_4C1	1,5	g/l	15	mg/l
$MgCl_2 \times 6H_2O$	1,2	g/l	12	mg/l
$CaCl_2 \times 2H_2O$	1,8	g/l	18	mg/l
$MgSO_4 \times 7H_2O$	1,5	g/l	15	mg/l
KH_2PO_4	0,16	g/l	1,6	mg/l
2 pradinis tirpalas: Fe-EDTA				
$FeCl_3 \times 6H_2O$	80	mg/l	0,08	mg/l
$Na_2EDTA \times 2H_2O$	100	mg/l	0,1	mg/l
3 pradinis tirpalas: mikroelementai				
H_3BO_3	185	mg/l	0,185	mg/l
$MnCl_2 \times 4H_2O$	415	mg/l	0,415	mg/l
$ZnCl_2$	3	mg/l	3×10^{-3}	mg/l
$CoCl_2 \times 6H_2O$	1,5	mg/l	1.5×10^{-3}	mg/l
$CuCl_2 \times 2H_2O$	0,01	mg/l	10^{-5}	mg/l
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	7	mg/l	7×10^{-3}	mg/l
4 pradinis tirpalas: $NaHCO_3$				
$NaHCO_3$	50	g/l	50	mg/l

Kai nusistovi pusiausvyra su oru, terpės pH vertė yra lygi maždaug 8.

1.6.2. **Aparatūra**

— Įprastoji laboratorijos įranga,

— Atitinkamo tūrio bandymų kolbos (pvz., jei bandomojo tirpalo tūris 100 ml, tinka 250 ml tūrio kūginės kolbos). Visos kolbos medžiagos ir matmenų atžvilgiu turi būti vienodos.

— Kultūros auginimo aparatūra: spinta arba kamera, kurioje temperatūrą būtų galima palaikyti intervale nuo 21 °C iki 25 °C ± 2 °C tikslumu ir kurioje būtų nuolatinis tolygus apšvietimas intervale nuo 400 iki 700 nm. Jei dumblių kontrolinės kultūros pasiekė rekomenduotą augimo greitį, galima daryti prielaidą, kad augimo sąlygos, įskaitant šviesos intensyvumą, buvo tinkamos.

Rekomenduojama, kad šviesos intensyvumas bandomųjų tirpalų vidutiniame lygyje būtų intervale nuo 60 iki 120 µE × m^{-2} × s^{-1} (nuo 35 iki 70 × 10^{18} fotonų × m^{-2} × s^{-1}), kai matuojama intervale nuo 400 iki 700 nm, naudojant tinkamą imtuvą. Jei naudojami apšvietos matavimo prietaisai kalibruoti liuksais, yra priimtinas lygiavertis intervalas nuo 6 000 iki 10 000 lx.

Tokį šviesos intensyvumą galimą gauti, jei 0,35 m atstumu nuo dumblių kultūros pastatyti nuo keturių iki septynių 30 W universalaus tipo baltų dienos šviesos lempų (spalvos temperatūra maždaug 4300 K).

— Ląstelių tankio matavimai turi būti daromi naudojant tiesioginį gyvų ląstelių skaičiavimo metodą, pvz., mikroskopą su skaičiavimo kamera. Tačiau gali būti naudojami kiti metodai (fotometrija, turbidimetrija,...), jei jie yra pakankamai jautrūs ir jei būtų parodyta, kad jų rezultatai pakankamai gera koreliuoja su ląstelių tankiu.

1.6.3. **Bandymų organizmai**

Patariama naudoti greitai augančių žaliųjų dumblių rūšis, nes jas patogu auginti ir bandyti. Geriausia naudoti šias rūšis:

— *Selenastrum capricornutum,* pvz., ATCC 22662 arba CCAP 278/4,

— *Scenedesmus subspicatus,* pvz., 86.81 SAG,

Pastaba:

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.)

Jei naudojamos kitos rūšys, turi būti nurodytas štamas.

1.6.4. **Bandymų eiga**

Koncentracijos intervalas, kuriame medžiaga galėtų veikti, nustatomas remiantis intervalo nustatymo bandymų rezultatais.

Du augimo matavimo būdai (biomasės kiekio ir augimo greičio nustatymas) gali duoti nesulyginamus augimo inhibavimo rezultatus; abu turi būti taikomi intervalo nustatymo bandyme, siekiant užtikrinti, kad geometrine progresija naudojamos koncentracijos leistų įvertinti E_bC_{50} ir E_rC_{50}.

Pradinis ląstelių tankis

Rekomenduojama, kad pradinis bandymo kultūrų *Selenastrum capricornutum* ir *Scenedesmus subspicatus* ląstelių tankis būtų apie 10^4 ląstelių/ml. Kai naudojamos kitos rūšys, biomasė turi būti panaši.

Bandomosios medžiagos koncentracija

bandymui imamos bent penkios geometrine progresija didėjančios koncentracijos, kurių santykis ne didesnis kaip 2,2. Mažiausios koncentracijos bandomoji medžiaga turi neveikti dumblių augimo. Didžiausios koncentracijos bandomoji medžiaga turi inhibuoti augimą bent 50 %, lyginant su kontroliniu bandymu, ir būtų geriausia, jei augimas būtų visiškai sustabdytas.

Lygiagrečių bandymų skaičius ir kontroliniai bandymai

Pagal bandymo schemą su kiekviena bandomąja koncentracija turi būti daromi trys lygiagretūs bandymai. Daromi trys kontroliniai bandymai be bandomosios medžiagos, ir, jei tinka, dar daromi trys kontroliniai bandymai su pagalbine medžiaga. Jei pasiteisina, bandymo schemą galima keisti, didinant koncentracijų skaičių ir mažinant lygiagrečių bandymų vienai koncentracijai skaičių.

Bandymų eiga

Bandymų kultūros su reikiama koncentracija bandomosios medžiagos ir reikiamu dumblių kiekiu ruošiamos į tinkamą kiekį dumblių iš anksto paruoštos kultūros pilant alikvotinį bandomosios medžiagos pradinių tirpalų tūrį (žr. 1 papildymą).

Kolbos su kultūra supurtomos ir statomos į kultūros auginimo aparatą. Norint bandomuosiuose tirpaluose pagerinti dujų apykaitą ir sumažinti pH kitimą, dumblių ląstelės suspenduojamos tirpalus purtant, maišant arba barbotuojant per juos orą. Kultūros turi būti laikomos temperatūros intervale nuo 21 iki 25 °C, reguliuojant ± 2 °C tikslumu.

Kiekvienoje kolboje ląstelių tankis nustatomas bent po 24, 48 ir 72 valandų nuo bandymo pradžios. Kai ląstelių tankis matuojamas kitu, nei tiesioginis skaičiavimas, metodu, fonui nustatyti naudojama filtruota dumblių terpė su atitinkama bandomosios medžiagos koncentracija.

pH vertė nustatoma bandymo pradžioje ir po 72 valandų.

pH vertė kontroliniuose bandiniuose per visą bandymo laiką paprastai neturi pasikeisti daugiau kaip 1,5 vieneto.

Lakiųjų medžiagų bandymas

Iki šiol nėra visuotinai priimto būdo bandyti lakiąsias medžiagas. Jei žinoma, kad medžiaga turi polinkį garuoti, galima naudoti uždaras bandymų kolbas su padidintu laisvu tūriu virš tirpalo. Skaičiuojant uždarų kolbų laisvąjį tūrį, turi būti atsižvelgta į CO_2 trūkumo galimybę. Buvo pasiūlyti šio metodo variantai (žr. 4 nuorodą).

Reikia stengtis nustatyti tirpale likusios medžiagos kiekį, ir patariama ypač atsargiai interpretuoti bandymų rezultatus, gautus su lakiosiomis medžiagomis uždaroje sistemoje.

Ribinis bandymas

Taikant šiame bandymo metode aprašytas metodikas, galima daryti ribinį bandymą su koncentracija 100 mg/litre, kai norima įrodyti, kad EC_{50} yra didesnė nei ši koncentracija.

Jei medžiagos prigimtis yra tokia, kad 100 mg/litre koncentracijos bandymų vandenyje pasiekti negalima, ribinis bandymas turi būti daromas su koncentracija, lygia medžiagos tirpumui (arba su didžiausia koncentracija, kurioje susidaro patvari suspensija) naudojamoje terpėje (dar žr. 1.6.1.1 punktą).

Turi būti daromas bent trigubas ribinis bandymas, toks pat turi būti ir kontrolinių bandymų skaičius. Ribiniame bandyme turi būti naudojami du augimo matavimo būdai (biomasės kiekis ir augimo greitis).

Jei ribiniame bandyme, lyginant su kontroliniu bandymu, nustatomas 25 % arba didesnis vidutinis biomasės kiekio mažėjimas arba augimo greičio mažėjimas, turi būti daromas visas bandymas.

2. **DUOMENYS IR VERTINIMAS**

Išmatuotas ląstelių tankis bandomosiose kultūrose ir kontroliniuose bandiniuose, kartu su bandomosios medžiagos koncentracijomis ir matavimo laikais pateikiamas lentelėje. Norint gauti augimo kreives, vidutinė ląstelių tankio vertė kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai ir kontroliniuose bandiniuose vaizduojama grafiškai laiko atžvilgiu (0 - 72 h).

Turi būti taikomi du žemiau pateikti būdai, kad būtų galima įvertinti koncentracijos ir jos poveikio priklausomybę. Kai kurios medžiagos, būdamos mažos koncentracijos, gali skatinti augimą. Turi būti įskaitomi tik tie duomenų taškai, kuriuose inhibavimas kinta nuo 0 iki 100 %.

2.1. PLOTŲ PO AUGIMO KREIVĖMIS LYGINIMAS

Plotas tarp augimo kreivės ir horizontaliosios tiesės $N = N_0$ gali būti apskaičiuotas taikant formulę:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \ldots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

čia:

A = plotas,

N_0 = ląstelių skaičius laiku t_0 (bandymo pradžia),

N_1 = išmatuotas ląstelių skaičius/ml laiku t_1,

N_n = išmatuotas ląstelių skaičius/ml laiku t_n,

t_1 = pirmojo matavimo laikas nuo bandymo pradžios,

t_n = $n_{\text{-ojo}}$ matavimo laikas nuo bandymo pradžios.

n = nuo bandymo pradžios darytų matavimų skaičius.

Ląstelių augimo inhibavimo procentinė vertė kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai (I_A) apskaičiuojama taikant formulę:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

čia:

A_c = plotas tarp augimo kreivės, gautos kontroliniame bandyme, ir horizontaliosios tiesės $N = N_0$.

A_t = plotas tarp augimo kreivės, gautos koncentracijai t, ir horizontaliosios tiesės $N = N_0$.

I_A vertės atitinkamų koncentracijų atžvilgiu atidedamos pusiau logaritminiame arba pusiau logaritminiame tikimybiniame popieriuje. Jei vertės atidedamos tikimybiniame popieriuje, per taškus vedama tiesė, arba iš akies arba skaičiuojant iš regresijos lygties.

EC_{50} įvertinama iš regresijos tiesės arba kaip koncentracijos rodmuo, kuris atitinka 50 % inhibavimą (I_A = 50 %). Norint šią vertę pažymėti vienareikšmiai, kaip gautą šiuo skaičiavimo metodu, pasiūlyta vartoti simbolį E_bC_{50}. Svarbu, kad E_bC_{50} būtų nurodomas kartu su atitinkamu veikimo laikotarpiu, pvz., E_bC_{50} (0 - 72 h).

2.2. AUGIMO GREIČIŲ LYGINIMAS

Vidutinis eksponentiškai augančių kultūrų savitasis augimo greitis (μ) gali būti apskaičiuotas pagal formulę:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

čia t_0 bandymo pradžios laikas.

Kitaip, vidutinis savitasis augimo greičio vertė gali būti gauta iš regresijos tiesės kampinio koeficiento N priklausomybės nuo laiko grafike.

Savitojo augimo greičio mažėjimo procentinė vertė kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai ($I_{\mu t}$) skaičiuojama pagal formulę:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

čia:

μ_c = vidutinis savitasis augimo greitis kontroliniame bandyme,

μ_t = vidutinis savitasis augimo greitis, kai bandomoji koncentracija t.

Kiekvienai koncentracijai gautos savitojo augimo greičio mažėjimo vertės ir kontrolinės greičio vertės santykio procentinė vertė brėžiama koncentracijos logaritmo atžvilgiu. Iš gauto grafiko galima gauti EC_{50} vertę. Norint vienareikšmiai pažymėti šiuo metodu gautą EC_{50}, pasiūlyta naudoti simbolį E_rC_{50}. Turi būti nurodytos matavimo laiko ribos, pvz., jei vertė gauta 0 ir 72 valandų laikotarpiui, simbolis užrašomas E_rC_{50} (0-72 h).

Pastaba. Savitasis augimo greitis yra logaritminis dydis, ir nedideli augimo greičio pokyčiai gali būti didelių biomasės pokyčių priežastimi. Taigi, E_bC ir E_rC skaitmeninės vertės nėra palyginamos.

2.3. NOEC SKAIČIAVIMAS

(NOEC – No Observed Effect Concentration – stebimo poveikio nedaranti koncentracija) nustatoma pagal atitinkamą didelio skaičiaus bandinių lyginimo statistinę metodiką (pvz., dispersinė analizė ir Dunnett'o testas), naudojant lygiagrečiuose bandymuose gautas atskiras ploto po augimo kreive vertes A (žr. 2.1 poskyrį) arba savituosius augimo greičius μ (žr. 2.2 poskyrį).

3. ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— bandomoji medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys;

— bandymų organizmai: kilmė, laboratorinė kultūra, štamo numeris, ir auginimo metodas;

— bandymų sąlygos:

  — bandymo pradžios ir pabaigos data bei jo trukmė,

  — temperatūra,

  — terpės sudėtis,

  — auginimo aparatūra,

  — tirpalų pH bandymo pradžioje ir pabaigoje (turi būti pateiktas aiškinimas, jei stebimas pH vertės nukrypimas yra didesnis nei 1,5 vieneto),

  — nešiklis ir metodas, taikytas soliubilizuoti bandomąją medžiagą, bei nešiklio koncentracija bandomuosiuose tirpaluose,

  — šviesos intensyvumas ir kokybė,

  — bandomosios koncentracijos (matuotos arba vardinės).

— rezultatai:

  — ląstelių tankis kiekvienoje kolboje bei kiekviename matavimo taške, taip pat ląstelių tankio nustatymo metodas,

  — ląstelių tankio vidutinės vertės,

  — augimo kreivės,

  — koncentracijos poveikio priklausomybių grafinis vaizdavimas,

  — EC vertės ir skaičiavimo metodas,

  — NOEC

  — kiti pastebėti reiškiniai.

4. NUORODOS

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 Final.

2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag 'Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus,* in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

3) ISO 8692 - Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.

4) S. Galassi and M.Vighi - Chemosphere, 1981, vol. 10, 1123-1126.

1 priedėlis

Dumblių auginimo metodikos pavyzdys

Bendrosios pastabos

Šio kultūros auginimo pagal pateikiamą metodiką tikslas yra gauti dumblių kultūras toksiškumo bandymams.

Norint užtikrinti, kad dumblių kultūros nebūtų užkrėstos bakterijomis, turi būti naudojami tinkami metodai (ISO 4833). Pageidautina naudoti akseniškas kultūras, tačiau pagrindinės yra vienaląsčių dumblių kultūros.

Visi veiksmai turi būti daromi steriliomis sąlygomis, kad nebūtų užkrėsta bakterijomis ir kitais dumbliais. Užkrėstų kultūrų turi būti atsisakyta.

Dumblių kultūros auginimo metodikos

Mitybinių tirpalų (terpės) ruošimas:

terpė gali būti paruošta skiedžiant pradinius mitybinių medžiagų koncentruotus tirpalus. Kietai terpei gauti dedama 0,8 % agaro. Naudojama terpė turi būti sterili. Sterilizuojant autoklave, galima prarasti NH_3.

Pradinė kultūra:

Pradinės kultūros yra mažos dumblių kultūros, kurios reguliariai pernešamos į šviežią terpę, kad jas būtų galima naudoti kaip pradinę bandymų medžiaga. Jei kultūros reguliariai nenaudojamos, jos užnešamos ant gulsčiojo agaro mėgintuvėliuose. Šios kultūros pernešamos į šviežią terpę bent kartą per du mėnesius.

Pradinės kultūros auginamos kūginėse kolbose su atitinkama terpe (tūris apie 100 ml). Kai dumbliai inkubuojami 20 °C temperatūroje su nuolatiniu apšvietimu, pernešti reikia kas savaitę.

Į kolba su šviežia terpe sterilia pipete pernešamas toks 'senos' kultūros kiekis, kad greitai augančių rūšių atveju pradinė koncentracija būtų maždaug 100 kartų mažesnė nei senos kultūros.

Rūšių augimo greitis gali būti nustatytas iš augimo kreivės. Jei greitis žinomas, galima įvertinti, koks turi būti į naują terpę pernešamos kultūros tankis. Tai turi būti daroma prieš tai, kai kultūra pasiekia žūties tarpsnį.

Iš anksto paruošta kultūra:

Iš anksto paruošta kultūra skirta tam, kad būtų gautas bandomosioms kultūroms sėti reikalingas dumblių kiekis. Iš anksto paruošta kultūra inkubuojama bandymo sąlygomis ir naudojama tuomet, kai dar auga eksponentiškai, paprastai maždaug po trijų inkubavimo parų. Kai dumblių kultūroje pasitaiko deformuotos arba nenormalios ląstelės, jos turi būti pašalintos.

2 priedėlis

ISO 8692 - Vandens kokybė - Gėlojo vandens dumblių augimo inhibavimo bandymas su *Scenedesmus subspicatus* ir *Selenastrum capricornutum* pateikia šiuos tarplaboratorinio lyginimo bandymo rezultatus, gautus 16 laboratorijų, tyrusių kalio dichromatą:

	Vidutinė vertė (mg/l)	Intervalas (mg/l)
E_rC_{50} (0 - 72 h)	0,84	0,60 - 1,03
E_bC_{50} (0 - 72 h)	0,53	0,20 - 0,75

C.4. „LENGVO“ BIOLOGINIO SKAIDOMUMO MATAVIMAS

I DALIS. **BENDRIEJI KLAUSIMAI**

I.1. ĮVADAS

Aprašyti šeši metodai, kurie leidžia chemines medžiagas rūšiuoti pagal jų biologinio skaidomumo aerobinėje vandeninėje terpėje lengvumą:

a) Ištirpusios organinės anglies (DOC) išnykimo (Die-Away) (C.4-A metodas)

b) Modifikuotas OECD (Organization for Economic Cooperation and Development – Ekonominio bendradarbiavimo ir vystymosi organizacija) atrankos bandymas - DOC išnykimas (C.4-B metodas)

c) Anglies dioksido (CO_2) išsiskyrimas (modifikuotas Sturm bandymas) (C.4-C metodas)

d) Manometrinė respirometrija (C.4-D)

e) Uždarosios kolbos (Closed bottle) metodas (C.4-E metodas)

f) MITI [Ministry of International Trade and Industry (Tarptautinės prekybos ir pramonės ministerija) - Japonija] (C.4-F metodas).

Bendrieji ir įprastieji visų šešių bandymų klausimai pateikti metodo I dalyje. Atskiriems metodams specifiniai klausimai pateikti II – VII dalyse. Prieduose pateikiami apibrėžimai, formulės ir rekomendacijos.

OECD tarplaboratorinio lyginimo bandymai, daryti 1988, parodė, kad šiais metodais gauti rezultatai yra suderinami. Tačiau priklausomai nuo fizikinių bandomosios medžiagos savybių, pirmenybė gali būti teikiama vienam arba kitam metodui.

I.2. TINKAMO METODO PARINKIMAS

Norint parinkti tinkamiausią metodą, labai svarbi yra informacija apie cheminės medžiagos tirpumą, garų slėgį ir adsorbcijos charakteristikas. Turi būti žinoma cheminė medžiagos formulė, norint skaičiuoti teorines vertes ir (arba) tikrinti išmatuotas parametrų vertes, pvz., ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (žr. I ir II priedus).

Bandomosios cheminės medžiagos, kurių tirpumas vandenyje yra bent 100 mg/l, ir jei jos nėra lakios ir neadsorbuojamos, gali būti įvertintos visais metodais. Toms cheminėms medžiagoms, kurios mažai tirpsta vandenyje, yra lakios arba yra adsorbuojamos, tinkami metodai nurodyti 1 lentelėje. Būdas, kaip reikia elgtis su mažai vandenyje tirpiomis ir lakiomis medžiagomis, yra aprašytas III priede. Vidutiniškai lakios cheminės medžiagos gali būti bandomos DOC išnykimo metodu, jei bandymų induose (kurie turi būti tinkamai užkimšti) dujoms yra pakankamai vietos. Šiuo atveju turi būti įdiegta abiotinė kontrolė, kad būtų galima atsižvelgti į bet kokius fizinius nuostolius.

1 lentelė. Bandymų metodų tinkamumas

Bandymas	Analizės metodas	Tinkamumas medžiagoms, kurios yra:		
		mažai tirpios	lakios	adsorbuojamos
DOC išnykimas	Ištirpusi organinė anglis	—	—	+/-
Modifikuotas OECD atrankos bandymas - DOC išnykimas	Ištirpusi organinė anglis	—	—	+/-
CO_2 išsiskyrimas	Respirometrija: CO_2 išsiskyrimas	+	—	+
Manometrinė respirometrija	Manometrinė respirometrija: deguonies suvartojimas	+	+/-	+
Uždarosios kolbos	Respirometrija: ištirpęs deguonis	+/-	+	+
MITI	Respirometrija: deguonies suvartojimas	+	+/-	+

Norint interpretuoti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra maži arba nežymūs, reikalinga informacija apie bandomosios medžiagos grynumą arba apie pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Informacija apie bandomųjų medžiagų toksiškumą bakterijoms (IV priedas) gali būti labai naudinga, kai reikia pasirinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, ir gali būti esminė, kai reikia teisingai paaiškinti, kodėl biologinio skaidymo vertės yra mažos.

I.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Norint tikrinti metodiką, lygiagrečiai įprastiems bandymams tinkamai paruoštoje kolboje bandomos etaloninės medžiagos, kurios atitinka lengvo biologinio suskaidymo kriterijus.

Tinkamos cheminės medžiagos yra anilinas (šviežiai distiliuotas), natrio acetatas ir natrio benzoatas. Visos šios etaloninės medžiagos skaidomos šių bandymų sąlygomis, net jei sėjimo kultūra ir nėra specialiai įdėta.

Buvo padaryta prielaida, kad reikėtų rasti etaloninę medžiagą, kuri būtų lengvai biologiškai skaidoma, tačiau tik kai yra įdėta sėjimo kultūros. Buvo pasiūlytas kalio hidroftalatas, tačiau prieš tai kaip priimti jį kaip etaloninę medžiagą, reikia apie ją surinkti daugiau duomenų.

Respirometriniuose bandymuose junginiai su azotu gali turėti įtakos deguonies vartojimui dėl nitrifikavimo (žr. II ir V priedus).

I.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Į bandomosios medžiagos tirpalą arba suspensiją mineralinėje terpėje dedama sėjimo kultūra ir tirpalas inkubuojamas aerobinėmis sąlygomis tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje. DOC kiekis bandomosios medžiagos tirpale, kuris atitinka sėjimo kultūrą, turi būti kiek įmanoma mažesnis lyginant su bandomosios medžiagos DOC kiekiu. Atsižvelgiama į sėjimo kultūros endogeninį aktyvumą, lygiagrečiai darant tuščiuosius bandymus su sėjimo kultūra, bet be bandomosios medžiagos, nors ląstelių endogeninis aktyvumas, kai yra bandomosios medžiagos, nevisiškai tiksliai atitinka aktyvumą endogeninio aktyvumo kontroliniame bandyme. Metodikų veikimui tikrinti lygiagrečiai daromas bandymas su etalonine medžiaga.

Bendruoju atveju, skaidymo eiga sekama nustatant parametrus, pvz., DOC, CO_2 susidarymą ir deguonies suvartojimą; matavimai daromi pakankamai dažnai, kad galima būtų nustatyti biologinio skaidymo pradžią ir pabaigą. Jei naudojami automatiniai respirometrai, matavimas yra nepertraukiamas. Kai matuojamas kitas parametras, kartais papildomai matuojama DOC, tačiau tai paprastai daroma tik bandymo pradžioje ir pabaigoje. Galima naudoti specifinę cheminę analizę, kai norima įvertinti pradinį bandomosios medžiagos suskaidymą ir nustatyti bet kurios susidariusios tarpinės medžiagos koncentraciją (privaloma MITI bandyme).

Paprastai bandymas tęsiamas 28 paras. Tačiau bandymą galima baigti anksčiau nei po 28 parų, t.y., kai biologinio skaidymo kreivė pasiekia gulsčiąją dalį bent po trijų matavimų. Bandymai gali būti pratęsti ir daromi ilgiau nei 28 paros, kai kreivė rodo, kad biologinis skaidymas prasidėjo, tačiau 28 parą gulsčioji dalis dar nepasiekta.

I.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

I.5.1. **Atkuriamumas**

Dėl biologinio skaidymo prigimties ir dėl sėjimo kultūros bakterijų populiacijos mišrios sudėties matavimai turi būti daromi bent du kartus.

Yra bendras patyrimas, kad, kuo didesnė bandymo pradžioje į bandomąją terpę įdėtų mikroorganizmų koncentracija, tuo mažesnė bus lygiagrečių bandymų sklaida. Tarplaboratorinio lyginimo bandymai taip pat parodė, kad gali būti didelė sklaida tarp rezultatų, gautų skirtingose laboratorijose, tačiau lengvai biologiškai skaidomų junginių atveju paprastai gaunamas geras sutapimas.

I.5.2. **Bandymų tinkamumas**

Bandymas yra validus, jei skirtumas tarp bandomosios medžiagos šalinimo pakartotinai gautų kraštinių verčių gulsčioje kreivės dalyje, bandymo pabaigoje arba 10 parų lango pabaigoje, kas tinka, yra mažesnis kaip 20 %, ir jei etaloninės medžiagos skaidymo procentinė vertė iki 14 paros pasiekė lengvojo biologinio skaidymo lygį. Jei bet kuri iš šių sąlygų neįvykdyta, bandymas turi būti pakartotas. Dėl metodų tikslumo mažos vertės nebūtinai reiškia, kad bandomoji medžiaga aplinkos sąlygomis biologiškai neskaidoma, tačiau jos rodo, kad biologiniam skaidomumui nustatyti būtina dirbti toliau.

Jei toksiškumo bandyme, kuriame yra ir bandomoji medžiaga, ir etaloninė cheminė medžiaga, skaidymas po 14 parų yra mažesnis kaip 35 % (pagal DOC) arba mažesnis kaip 25 % (pagal ThOD arba $ThCO_2$), bandomosios cheminės medžiagos gali būti laikomos inhibuojančiomis (dar žr. IV priedą). Bandymų serijos turi būti pakartotos, jei tai įmanoma, naudojant mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją ir (arba) didesnę sėjimo kultūros koncentraciją, tačiau ne didesnę kaip 30 mg kietųjų dalelių/litre.

I.6. BENDROSIOS METODIKOS IR PREPARATAI

Bendrosios bandymų sąlygos apibendrintos 2 lentelėje. Aparatūra ir kitos eksperimento sąlygos, specifiškai siejamos su atskiru bandymu, aprašytos vėliau to bandymo aprašyme.

2 lentelė. Bandymų sąlygos

Bandymas	DOC išnykimas	CO_2 išsiskyrimas	Manometrinė respirometrija	Modifikuotas OECD atrankos bandymas	Uždarosios kolbos bandymas	MITI (I)
Bandomosios medžiagos koncentracija mg/l					2-10	100
10-40	10-20	10-40	100	mg DOC/l		
mg ThOD/l			50-100		5-10	
Sėjimo kultūros koncentracija (ląstelių/l, apytikriai)	≤ 30 mg/l SS arba ≤ 100 ml ištakio/l (10^7-10^8)			0,5 ml antrinio ištakio/l (10^5)	≤ 5 ml antrinio ištakio/l (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Elementų koncentracija mineralinėje terpėje (mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0.1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					geriau 7,0
Temperatūra	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C
DOC = ištirpusi organinė anglis ThOD = teorinis deguonies poreikis SS = Suspenduotos kietosios dalelės						

I.6.1. **Skiedimo vanduo**

Naudojamas dejonizuotas arba distiliuotas vanduo, kuriame nebūtų inhibuojančios koncentracijos nuodingųjų medžiagų (pvz., Cu^{2+} jonų). Vandenyje organinės anglies neturi būti daugiau kaip 10 % to kiekio, kuris yra bandomojoje medžiagoje. Didelis bandymo vandens grynumas reikalingas tam, kad būtų eliminuotos didelės tuščiųjų bandinių vertės. Užterštumas gali atsirasti dėl vandeniui būdingų priemaišų ir dar dėl jonitinių dervų bei bakterijų ir dumblių irimo produktų. Kiekvienoje bandymų serijoje naudokite tik vienos partijos vandenį, iš anksto patikrintą atliekant DOC analizę. Toks tikrinimas nėra būtinas uždarosios kolbos bandyme, tačiau deguonies suvartojimas vandeniu turi būti mažas.

I.6.2. **Pradiniai mineralinių komponentų tirpalai**

Norint ruošti bandomuosius tirpalus, ruošiami atitinkamų koncentracijų mineralinių komponentų pradiniai tirpalai. DOC išnykimo, modifikuotos OECD atrankos, CO_2 išsiskyrimo, manometrinės respirometrijos, uždarosios kolbos bandymuose galima naudoti tokius pradinius (su skirtingais skiedimo faktoriais) tirpalus. Skiedimo faktoriai ir specialios mineralinės terpės ruošimas MITI bandymui pateikti konkrečių metodų aprašymuose.

Pradiniai tirpalai: Paruoškite šiuos pardinius tirpalus, naudodami analiziškai grynas medžiagas.

a)	kalio dihidrofosfatas, KH_2PO_4	8,50 g
	kalio hidrofosfatas, K_2HP0_4	21,75 g
	natrio hidrofosfatas, dihidratas, $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	33,40 g
	amonio chloridas, NH_4Cl	0,50 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro. Tirpalo pH turi būti 7,4.	
b)	kalcio chloridas, bevandenis, $CaCl_2$	27,50 g
	arba kalcio chloridas, dihidratas, $CaCl_2 \times 2\ H_2O$	36,40 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	
c)	magnio sulfatas, heptahidratas, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$	22,50 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	
d)	geležies (III) chloridas, heksahidratas, $FeCl_3 \times 6\ H_2O$	0,25 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	

Pastaba: jei nenorite ruošti šį tirpalą prieš patį bandymą, vienam tirpalo litrui įlašinkite vieną lašą konc. HCl arba įdėkite 0,4 g etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druskos (EDTA).

I.6.3. **Cheminių medžiagų pradiniai tirpalai**

Pavyzdžiui, dejonizuotame vandenyje ištirpinkite 1-10 g, kiek reikia,bandomosios arba etaloninės medžiagos ir skieskite iki 1 litro, jei tirpumas didesnis kaip 1 g/l. Pagal kitą būdą pradinius tirpalus ruošiate mineralinėje terpėje arba cheminę medžiagą dedate tiesiai į mineralinę terpę. Kaip ruošti mažiau tirpias chemines medžiagas, žr. III priedą, tačiau MITI bandyme (C.4-F metodas), nei tirpikliai, nei emulsikliai neturi būti naudojami.

I.6.4. **Sėjimo kultūros**

Sėjimo kultūrą galima gauti iš įvairių šaltinių: aktyvusis dumblas, nuotekų ištakiai (nechloruoti), paviršiniai vandenys ir dirvožemiai, arba mišiniai iš šių šaltinių. Jei DOC išnykimo, CO_2 išsiskyrimo ir manometrinės respirometrijos bandymams naudojamas aktyvusis dumblas, jis turi būti imamas iš nuotekų valymo įrenginių arba laboratorinių valymo įrenginių, į kuriuos daugiausia patenka buitinės nuotekos. Buvo nustatyta, kad naudojant sėjimo kultūras iš kitų šaltinių, rezultatų sklaida didesnė. Modifikuotam OECD atrankos ir uždarosios kolbos bandymams reikia labiau praskiestos sėjimo kultūros be dumblo dribsnių, todėl labiau pageidautinas šaltinis yra antrinis ištakis iš buitinių nuotekų valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio. MITI bandymui sėjimo kultūra daroma iš įvairių šaltinių gauto mišinio ir aprašyta šio specialaus bandymo skyriuje.

I.6.4.1. *Sėjimo kultūra iš aktyviųjų dumblų*

Iš daugiausia buitines nuotekas valančio valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio aeravimo tanko surinkite šviežią aktyviojo dumblo bandinį. Prireikus stambias daleles šalinkite filtruodami per tankų tinklinį filtrą ir toliau dumblą laikykite aerobinėmis sąlygomis.

Kitaip, pašalinę visas stambias daleles, leiskite dumblui nusistoti arba centrifuguokite (pvz., 10 min veikiant 1100 *g*). Skysti nuo dumblo pilkite lauk. Dumblą galite plauti mineraline terpe. Suspenduokite koncentruotą dumblą mineralinėje terpėje, kad suspenduotų kietų dalelių koncentracija būtų 3-5 g/l, ir aeruokite tol, kol dumblą panaudosite.

Dumblas turi būti imamas iš gerai veikiančio standartinio įrenginio. Jei dumblą reikia imti iš didelio našumo valymo įrenginio, arba, jei manoma, kad dumble yra inhibitorių, jis turi būti plaunamas. Gerai sumaišytą, pakartotinai suspenduotą dumblą palikite nusistoti arba centrifuguokite, nupilkite nuo jo skystį ir išplautą dumblą dar kartą suspenduokite kitame mineralinės terpės tūryje. Šiuos veiksmus kartojate tol, kol bus galima manyti, kad substrato pertekliaus arba inhibitorių neliko.

Prieš pat dumblo naudojimą, paimkite vėl visiškai suspenduoto arba neapdoroto dumblo bandinį sausų suspenduotų kietųjų dalelių masei nustatyti.

Pagal kitą būdą homogenizuokite aktyvųjį dumblą (3-5 g/l suspenduotų kietųjų dalelių). Maišykite dumblą 2 min vidutiniu greičiu mechaniniame maišiklyje. Palikite sumaišytą dumblą 30 min arba ilgiau, jei to reikia, ir dekantuokite skystį, kurį naudosite kaip sėjimo kultūra, pagal normą 10 ml/l mineralinės terpės.

I.6.4.2. *Kiti sėjimo kultūros šaltiniai*

Ją galima gauti iš valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio, apdorojančių daugiausia buitines nuotekas, antrinio ištakio. Paimkite šviežią bandinį ir, kol gabenate, laikykite jį aerobinėmis sąlygomis. Palikite nusistoti 1 h arba filtruokite per stambų filtrinį popierių, ir dekantuotą ištakį arba filtratą laikykite aerobinėmis sąlygomis, kol naudosite. Vienam litrui mineralinės terpės galima naudoti iki 100 ml šios rūšies sėjimo kultūros.

Kitas sėjimo terpės šaltinis yra paviršinis vanduo. Šiuo atveju paimkite tinkamo paviršinio vandens, pvz., upės, ežero, bandinį ir laikykite aerobinėmis sąlygomis, kol panaudosite. Prireikus sėjimo kultūrą koncentruokite filtravimo arba centrifugavimo būdu.

I.6.5. **Sėjimo kultūrų pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūros gali būti iš anksto kondicionuojamos eksperimento sąlygoms, tačiau iš anksto prie bandomosios cheminės medžiagos neadaptuojamos. Pradinis kondicionavimas susideda iš aktyviojo dumblo tirpalo mineralinėje terpėje arba antrinio ištakio 5-7 parų trukmės aeravimo bandymo temperatūroje. Kartais pradinis kondicionavimas gerina bandymo metodų preciziškumą, nes sumažina tuščiųjų bandinių vertes. Laikoma, kad MITI bandymo sėjimo kultūrai pradinis kondicionavimas yra būtinas.

I.6.6. **Abiotinio skaidymo kontroliniai bandiniai**

Kai reikia, nustatykite galimą bandomosios medžiagos abiotinį skaidymą, matuodami DOC pašalinimą, deguonies suvartojimą arba anglies dioksido išsiskyrimą steriliuose kontroliniuose bandiniuose be pasėtos kultūros. Sterilizuokite filtravimu per membraną (0,2-0,45 μm) arba pridėkite reikiamos koncentracijos tinkamos nuodingos medžiagos. Jei naudojamas filtravimas per membraną, sterilumui užtikrinti bandinius imkite steriliai. Jei bandomosios medžiagos adsorbcija nebuvo iš anksto pašalinta, bandymai, kuriuose skaidymas nustatomas matuojant DOC šalinimą, ypač jei sėjimo kultūra iš aktyviojo dumblo, turi būti su abiotinio skaidymo kontroliniu bandiniu, į kurį dedama sėjimo kultūra ir nuodijama.

I.6.7. **Kolbų skaičius**

Kolbų skaičius tipiškame bandyme nurodytas skyriuje su atitinkamo metodo aprašymu.

Galima naudoti tokio tipo kolbas:

Bandomoji suspensija: su bandomąja medžiaga ir sėjimo kultūra

Sėjimo kultūros tuščiasis bandinys: tik su sėjimo kultūra

Metodikos tikrinimo bandinys: su etalonine medžiaga ir sėjimo kultūra

Abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys: sterilus, su bandomąja medžiaga (žr. I.6.6)

Adsorbcijos kontrolinis bandinys: su bandomąja medžiaga, sėjimo kultūrą ir sterilizavimo agentą

Toksiškumo kontrolinis bandinys: su bandomąja medžiaga, etalonine medžiaga ir sėjimo kultūra.

Būtina, kad nustatymas bandomojoje suspensijoje ir sėjimo kultūros tuščiajame bandinyje būtų daromas lygiagrečiai. Patartina matavimus kitose kolbose taip pat daryti lygiagrečiai.

Tačiau tai ne visuomet įmanoma. Užtikrinkite, kad būtų paimtas pakankamas skaičius bandinių arba padaryta matavimų, norint įvertinti pašalinimo procentinę vertę po 10 parų lango.

I.7. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Skaičiuojant skaidymo procentinę vertę, D_t, naudojamos vidutinės vertės dviejų parametro matavimų bandymų kolboje ir tuščiajame bandinyje su sėjimo kultūra. Formulės pateiktos kituose konkrečius bandymus aprašančiuose skyriuose. Skaidymo eiga vaizduojama grafiškai ir pažymimas 10 parų langas. Apskaičiuokite ir pateikite medžiagos šalinimo, baigiantis 10 parų langui, procentinę vertę ir gulsčiąją kreivės dalį atitinkančią vertę arba bandymo pabaigos vertę, kuri tinka.

Respirometriniuose bandymuose junginiai turintys azoto gali veikti deguonies suvartojimą dėl nitrifikavimo (žr. II ir V priedus).

I.7.1. **Skaidymas, nustatytas pagal DOC kiekio matavimą**

Skaidymo procentinė vertė D_t kiekvieną kartą, kai buvo paimtas bandinys, turi būti skaičiuojama atskirai kolboms su bandomąją medžiaga, naudojant dviejų DOC matavimu vidutines vertes, kad būtų galima įvertinti bandymo tinkamumą (žr. I.5.2.). Skaidymas skaičiuojamas pagal lygtį:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

čia:

D_t = skaidymo % laiku t,

C_0 = vidutinė pradinė DOC koncentracija terpėje su bandomąja medžiaga ir pasėta kultūra (DOC mg/l),

C_t = vidutinė DOC koncentracija terpėje su bandomąja medžiaga ir pasėta kultūra laiku t (DOC mg/l),

C_{b0} = vidutinė pradinė DOC koncentracija tuščiojo bandinio terpėje su pasėta kultūra (DOC mg/l),

C_{bt} = vidutinė DOC koncentracija tuščiojo bandinio terpėje su pasėta kultūra (DOC mg/l).

Visos koncentracijos nustatomos eksperimentiškai.

I.7.2. **Skaidymas, nustatytas darant specifinę analizę**

Kai yra specifinės analizės duomenys, pradinis biologinis skaidymas skaičiuojamas pagal formulę:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

čia:

D_t = skaidymo % laiku t, paprastai 28 paros,

S_a = likutinis bandomosios medžiagos kiekis terpėje su sėjimo kultūra bandymo pabaigoje (mg),

S_b = likutinis bandomosios medžiagos kiekis tuščiajame bandinyje su vandeniu (terpe), į kurį buvo įdėta tik bandomoji medžiaga (mg).

I.7.3. **Abiotinis skaidymas**

Naudojant sterilų kontrolinį bandinį abiotiniam skaidymui nustatyti, abiotinio skaidymo procentinė vertė skaičiuojama pagal formulę:

$$\text{abiotinio skaidymo \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

čia:

$C_{a(0)}$ = DOC koncentracija steriliame kontroliniame bandinyje 0 parą,

$C_{s(t)}$ = DOC koncentracija steriliame kontroliniame bandinyje t parą.

I.8. ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— bandomoji ir etaloninė cheminė medžiaga, jų grynumas;

— bandymų sąlygos;

— sėjimo kultūra: prigimtis ir ėmimo vieta (-os), koncentracija ir bet koks pradinis kondicionavimas;

— nuotekose esančių pramoninių nuotekų dalis ir kiekis, jei tai žinoma;

— bandymo trukmė ir temperatūra;

— apdorojimo būdas mažai tirpių cheminių medžiagų atveju;

— taikytas bandymų metodas; būtina moksliškai pagrįsti ir paaiškinti bet kokį metodikos keitimą;

— specifikacija;

— visi stebėti inhibavimo reiškiniai;

— bet koks stebimas abiotinis skaidymas;

— specifinės cheminės analizės duomenys, jei yra;

— analiziniai duomenys apie tarpinius produktus, jei yra;

— bandomosios medžiagos ir etaloninės medžiagos skaidymo procentinės dalies kitimo laike grafikas; turi būti aiškiai nurodyta vėlavimo fazė, skaidymo fazė, 10 parų langas ir kreivės krypties koeficientas (I priedas). Jei bandymas atitinka tinkamumo kriterijus, grafikui sudaryti galima naudoti skaidymo procentinių verčių vidutines vertes, gautas kolbose su bandomąja medžiaga.

— šalinimo procentinė dalis po 10 parų lango ir kreivės gulsčioje dalyje arba bandymo pabaigoje.

II DALIS. DOC IŠNYKIMO BANDYMAS (C.4-A METODAS)

II.1. METODO ESMĖ

Išmatuotas mineralinės terpės su sėjimo kultūra ir žinomos koncentracijos bandomąja medžiaga (nuo 10 iki 40 mg/l DOC), kuri nominaliai yra vienintelis organinės anglies šaltinis, tūris yra aeruojamas tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje 22 ± 2 °C temperatūroje.

Skaidymas sekamas, 28 paras trumpais intervalais darant DOC analizę. Biologinio skaidymo laipsnis skaičiuojamas, pašalintos DOC koncentraciją (pataisyta dėl DOC koncentracijos sėjimo kultūros tuščiajame kontroliniame bandinyje) reiškiant pradinės koncentracijos procentine dalimi. Pradinio biologinio skaidymo laipsnį galima skaičiuoti pagal papildomą cheminę analizę, daromą inkubavimo pradžioje ir pabaigoje.

II.2. METODO APRAŠYMAS

II.2.1 **Aparatūra**

a) Kūginės kolbos, pvz., nuo 250 ml iki 2 litrų, tūris priklauso nuo DOC analizei reikalingo tūrio;

b) Purtyklė skirta kūginėms kolboms dėti, arba su automatiniu termostatavimu arba naudojama patalpoje su pastovia temperatūra, ir pakankamo galingumo, kad visose kolbose galima būtų palaikyti aerobines sąlygas;

c) Filtravimo aparatas, su tinkamomis membranomis;

d) DOC analizatorius;

e) Ištirpusio deguonies nustatymo aparatūra;

f) Centrifuga.

II.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą, žr. I.6.2.

Sumaišykite 10 ml (a) tirpalo su 800 ml skiedimo vandens, įpilkite po 1 ml (b) - (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

II.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas ir pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūrą galima ruošti iš įvairių šaltinių: aktyvusis dumblas; nuotekų ištakiai; paviršiniai vandenys; dirvožemiai arba mišiniai iš šių šaltinių.

Žr. I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. ir I.6.5.

II.2.4. **Kolbų ruošimas**

Pavyzdžiui, į atskiras 2 l kūgines kolbas įpilkite po 800 ml mineralinės terpės ir pakankamą tūrį bandomosios ir etaloninės medžiagos pradinių tirpalų, kad ekvivalentinė DOC koncentracija būtų 10-40 mg/l. Patikrinkite pH vertę ir prireikus nustatykite lygią 7,4. Įdėkite į kolbas sėjimo kultūros iš aktyviojo dumblo arba kito šaltinio (žr. I.6.4.), kad galutinė suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų ne didesnė kaip 30 mg/l. Taip pat paruoškite sėjimo kultūros tirpalo mineralinėje terpėje kontrolinį bandinį, kuriame nebūtų bandomosios arba etaloninės medžiagos.

Jei reikia, vieną indą naudokite tikrinti galimam bandomosios medžiagos inhibuojamajam poveikiui, į panašios koncentracijos bandomosios ir etaloninės medžiagų tirpalą mineralinėje terpėje įdėję sėjimo kultūros.

Be to, jei reikia, paruoškite dar vieną sterilią kolbą su bandomąja medžiaga be sėjimo kultūros, kad galėtumėte nustatyti, arba vyksta bandomosios medžiagos abiotinis skaidymas (žr. I.6.6.).

Papildomai, jei kyla įtarimas, kad bandomąją medžiagą žymiai adsorbuoja stiklas, dumblas ir t.t., padarykite parengiamąjį įvertinimą galimam adsorbcijos laipsniui nustatyti ir, tuo pačiu, bandymo tinkamumui šiai bandomajai medžiagai (žr. 1 lentelę). Paruoškite kolbą su bandomąja medžiaga, sėjimo kultūra ir sterilizavimo agentu.

Visus tirpalus kolbose skieskite mineraline terpe iki 1 l ir, tirpalus sumaišę, iš kiekvienos kolbos paimkite bandinį DOC pradinei koncentracijai nustatyti (žr. II.4 priedą). Uždenkite kolbų angas pvz., aliuminio folija taip, kad tarp kolbos ir ją supančios aplinkos būtų laisvi oro mainai. Tuomet bandymui pradėti įstatykite kolbas į purtyklę.

II.2.5. **Kolbų skaičius tipiškame bandyme**

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

ir pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: adsorbcijos kontrolinis bandinys

8 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

II.2.6. **Bandymų eiga**

Visą bandymo laiką žinomais laiko tarpais, bet pakankamai dažnai, kad galima būtų nustatyti 10 parų lango pradžią ir šalinimo procentinę vertę 10 parų lango pabaigoje, kiekvienoje kolboje po du kartus nustatykite DOC koncentraciją. Imkite tik mažiausią bandomosios suspensijos tūrį, reikalingą kiekvienam nustatymui.

Jei būtina, prieš imdami bandinį, kompensuokite garavimo iš kolbų nuostolius, įpildami reikiamą kiekį skiedimo vandens (I.6.1). Prieš imdami bandinį, gerai sumaišykite kultūros terpę ir užtikrinkite, kad prieš bandinio ėmimą ant kolbos sienelių prilipusi medžiaga būtų ištirpinta arba suspenduota. Paėmę bandinį, jį iš karto filtruokite per membraninį filtrą arba centrifuguokite (žr. II.4 priedą). Nufiltruotus arba centrifuguotus bandinius analizuokite tą pačią dieną, arba laikykite 2-4 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 48 h, jei ilgiau – žemesnėje kaip -18 °C temperatūroje.

II.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

II.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Apskaičiuokite skaidymo procentinę vertę laiku t, kaip nurodyta I.7.1. (DOC nustatymas) ir, neprivalomai, kaip I.7.2. (specifinė analizė).

Visus rezultatus užrašykite pateiktose specifikacijose.

II.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Žr. I.5.2

II.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

II.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

DOC IŠNYKIMO BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMŲ PRADŽIOS DATA**

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: mg/l, kaip cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje, t_0: mg/l, kaip cheminės medžiagos

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje: mg/l

5. **ANGLIES NUSTATYMAS**

Anglies analizatorius:

	Kolba Nr.		DOC (mg/l) po n parų				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Bandomoji cheminė medžiaga ir sėjimo kultūra	1	a_1					
		a_2					
		a, vidutinė vertė $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, vidutinė vertė $C_{b(t)}$					
Sėjimo kultūros tuščiasis bandinys be bandomosios medžiagos	3	c_1					
		c_2					
		c, vidutinė vertė $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, vidutinė vertė $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **NEAPDOROTŲ DUOMENŲ VERTINIMAS**

Kolba Nr.		% skaidymo po n parų				
		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				
Vidutinė vertė [1]	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

[1] D_1 ir D_2 vidutinė vertė neturi būti skaičiuojama, jei tarp jų yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams bandiniams.

7. **ABIOTINIO SKAIDYMO KONTROLINIS BANDINYS (neprivalomas)**

	Laikas (paros)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) steriliame kontroliniame bandinyje	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotinio skaidymo } \% = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFINĖ CHEMINĖ ANALIZĖ (neprivaloma)**

	Bandomosios medžiagos likutinis kiekis bandymo pabaigoje (mg/l)	% pirminio skaidymo
Sterilus kontrolinis bandinys	S_b	
Bandymo terpė su sėjimo kultūra	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

III DALIS. MODIFIKUOTAS OECD ATRANKOS BANDYMAS (C.4-B METODAS)

III.1. METODO ESMĖ

Į išmatuotą mineralinės terpės tūrį su žinoma koncentracija bandomosios medžiagos (nuo 10 iki 40 mg/l DOC), kuri nominaliai yra vienintelis organinės anglies šaltinis, įpilama sėjimo kultūros 0,5 ml 1 l terpės. Mišinys yra aeruojamas tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje 22 ± 2 °C temperatūroje.

Skaidymas sekamas, 28 paras trumpais intervalais darant DOC analizę. Biologinio skaidymo laipsnis skaičiuojamas, pašalintos DOC koncentraciją (pataisyta dėl DOC koncentracijos sėjimo kultūros tuščiajame kontroliniame bandinyje) reiškiant pradinės koncentracijos procentine dalimi. Pradinio biologinio skaidymo laipsnį galima skaičiuoti pagal papildomą cheminę analizę, daromą inkubavimo pradžioje ir pabaigoje.

III.2. METODO APRAŠYMAS

III.2.1. **Aparatūra**

a) Kūginės kolbos, pvz., nuo 250 ml iki 2 litrų, tūris priklauso nuo DOC analizei reikalingo tūrio;

b) Purtyklė skirta kūginėms kolboms dėti, kuri būtų arba su automatiniu termostatavimu arba naudojama patalpoje su pastovia temperatūra, ir pakankamo galingumo, kad visose kolbose galima būtų palaikyti aerobines sąlygas;

c) Filtravimo aparatas, su tinkamomis membranomis;

d) DOC analizatorius;

e) Ištirpusio deguonies nustatymo aparatūra;

f) Centrifuga.

III.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą, žr. I.6.2.

Sumaišykite 10 ml (a) tirpalo su 800 ml skiedimo vandens, įpilkite po 1 ml (b) - (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

Šiame metode kaip sėjimo kultūra naudojama tik 0,5 ml ištakio/litre ir todėl gali tekti didinti terpės mikroelementų ir augimo faktorių koncentraciją. Tai daroma įpilant po 1 ml kiekvieno šių tirpalų vienam galutinio terpės tūrio litrui.

Mikroelementų tirpalas:

Mangano sulfatas, tetrahidratas, $MnSO_4 \times 4\ H_2O$	39,9 mg
Boro rūgštis, H_3BO_3	57,2 mg
Zinko sulfatas, heptahidratas, $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	42,8 mg
Amonio heptamolibdatas $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe-chelatas ($FeCl_3$ ir etilendiamintetraacto rūgštis)	100,0 mg

Ištirpinkite skiedimo vandenyje ir praskieskite juo iki 1000 ml.

Vitaminų tirpalas:

Mielių ekstraktas	15,0 mg

Ištirpinkite mielių ekstraktą 100 ml vandens. Sterilizuokite filtruodami per 0,2 μm membraną arba pagaminkite šviežiai.

III.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas ir pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūrą ruošiama iš nuotekų valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio, valančių daugiausia buitines nuotekas, antrinio ištakio. Žr. I.6.4.2. ir I.6.5.

Naudojama 0,5 ml vienam litrui mineralinės terpės.

III.2.4. **Kolbų ruošimas**

Pavyzdžiui, į atskiras 2 l kūgines kolbas įpilkite po 800 ml mineralinės terpės ir pakankamą tūrį bandomosios ir etaloninės medžiagos pradinių tirpalų, kad ekvivalentinė DOC koncentracija būtų 10-40 mg/l. Patikrinkite pH vertę ir prireikus nustatykite lygią 7,4. Įdėkite į kolbas 0,5 ml/l sėjimo kultūros iš nuotekų ištakio (žr. I.6.4.2), kad galutinė suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų ne didesnė kaip 30 mg/l. Taip pat paruoškite sėjimo kultūros tirpalo mineralinėje terpėje kontrolinį bandinį, kuriame nebūtų bandomosios arba etaloninės medžiagos.

Jei reikia, vieną indą naudokite tikrinti galimam bandomosios medžiagos inhibuojamajam veikimui, į panašios koncentracijos bandomosios ir etaloninės medžiagų tirpalą mineralinėje terpėje įdėję sėjimo kultūros. Be to, jei reikia, paruoškite dar vieną sterilią kolbą su bandomąja medžiaga be sėjimo kultūros, kad galėtumėte nustatyti, arba vyksta bandomosios medžiagos abiotinis skaidymas (žr. I.6.6.).

Papildomai, jei kyla įtarimas, kad bandomąją medžiagą žymiai adsorbuoja stiklas, dumblas ir t.t., padarykite parengiamąjį įvertinimą galimam adsorbcijos laipsniui nustatyti ir, tuo pačiu, bandymo tinkamumui šiai bandomajai medžiagai (žr. 1 lentelę). Paruoškite kolbą su bandomąja medžiaga, sėjimo kultūra ir sterilizavimo agentu.

Visus tirpalus kolbose skieskite mineraline terpe iki 1 l ir, tirpalus sumaišę, iš kiekvienos kolbos paimkite bandinį DOC pradinei koncentracijai nustatyti (žr. II.4 priedą). Uždenkite kolbų angas pvz., aliuminio folija taip, kad tarp kolbos ir ją supančios aplinkos būtų laisvi oro mainai. Tuomet bandymui pradėti įstatykite kolbas į purtyklę.

III.2.5. **Kolbų skaičius tipiškame bandyme**

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

ir pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: adsorbcijos kontrolinis bandinys

8 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

III.2.6. **Bandymų eiga**

Visą bandymą žinomais laiko intervalais, bet pakankamai dažnai, kad galima būtų nustatyti 10 parų lango pradžią ir procentinę šalinimo vertę 10 parų lango pabaigoje, nustatykite po du kartus DOC koncentracijas kiekvienoje kolboje. Imkite tik minimalų kiekvienam nustatymui reikalingą bandomosios suspensijos tūrį.

Jei būtina, prieš imdami bandinį kompensuokite garavimo iš kolbų nuostolius, įpildami reikiamą kiekį skiedimo vandens (I.6.1). Prieš imdami bandinį, gerai sumaišykite kultūros terpę ir užtikrinkite, kad prieš bandinio ėmimą ant kolbos sienelių prilipusi medžiaga būtų ištirpinta arba suspenduota. Paėmę bandinį, jį iš karto filtruokite per membraninį filtrą arba centrifuguokite (žr. II.4 priedą). Nufiltruotus arba centrifuguotus bandinius analizuokite tą pačią dieną, arba laikykite 2-4 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 48 h, jei ilgiau – žemesnėje kaip -18 °C temperatūroje.

III.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

III.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Apskaičiuokite skaidymo procentinę vertę laiku t, kaip nurodyta I.7.1. (DOC nustatymas) ir, neprivalomai, kaip I.7.2 (specifinė analizė).

Visus rezultatus užrašykite pateiktose specifikacijose.

III.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Žr. I.5.2.

III.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

III.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

MODIFIKUOTAS OECD ATRANKOS BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: mg/l, kaip cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje, t_0: mg/l, kaip cheminės medžiagos

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje: mg/l

5. **ANGLIES NUSTATYMAS**

Anglies analizatorius:

	Kolbos Nr.		DOC po n parų (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Bandomoji cheminė medžiaga ir sėjimo kultūra	1	a_1					
		a_2					
		a, vidutinė vertė $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, vidutinė vertė $C_{b(t)}$					
Sėjimo kultūros tuščiasis bandinys be bandomosios medžiagos	3	c_1					
		c_2					
		c, vidutinė vertė $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, vidutinė vertė $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **NEAPDOROTŲ DUOMENŲ VERTINIMAS**

Kolba Nr.		skaidymo % po n parų				
		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				
Vidutinė vertė ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) D_1 ir D_2 vidutinė vertė neturi būti skaičiuojama, jei tarp jų yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams bandiniams.

7. **ABIOTINIO SKAIDYMO KONTROLINIS BANDINYS (neprivalomas)**

	Trukmė (paros)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) steriliame kontroliniame bandyme	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotinio skaidymo \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFINĖ CHEMINĖ ANALIZĖ (neprivaloma)**

	Bandomosios medžiagos likutinis kiekis bandymo pabaigoje (mg/l)	% pirminio skaidymo
Sterilus kontrolinis bandinys	S_b	
Bandymo terpė su sėjimo kultūra	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV DALIS. CO_2 IŠSISKYRIMO BANDYMAS (C.4-C METODAS)

IV.1. METODO ESMĖ

Žinomas mineralinės terpės su sėjimo kultūra turis, kuriame kaip vienintelis nominalus organinės anglies šaltinis yra žinomos koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga (10-20 mg DOC arba TOC/l), tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje yra aeruojamas, reguliuojamu greičiu barbotuojant anglies dioksido neturintį orą. Skaidymas 28 paras stebimas, nustatant susidariusio anglies dioksido, sugeriamo bario arba natrio hidroksidu, kiekį, matuojamą likusio hidroksido titravimu arba kaip neorganinė anglis. Iš bandomosios cheminės medžiagos susidariusio anglies dioksido kiekis (pataisytas atimant anglies dioksido, susidarančio tuščiajame bandinyje su sėjimo kultūra, kiekį) yra skaičiuojamas kaip procentinė $ThCO_2$ vertė. Kitaip biologinio skaidymo laipsnį galima skaičiuoti, nustatant papildomą DOC kiekį inkubavimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje.

IV.2. METODO APRAŠYMAS

IV.2.1. **Aparatūra**

a) 2-5 litrų talpos kolbos, kiekviena su aeravimo vamzdžiu, siekiančiu beveik indo dugną, ir išleidimo anga;

b) Magnetiniai maišikliai, kai vertinamos mažai tirpios cheminės medžiagos;

c) Dujų sugėrimo kolbos;

d) Įtaisas reguliuoti ir matuoti oro srautą;

e) Aparatas anglies dioksidui išplauti, kuriuo ruošiamas oras, neturintis anglies dioksido; pagal kitą būdą galima naudoti iš balionų tiekiamų CO_2 neturinčio deguonies ir CO_2 neturinčio azoto mišinį, dujas maišant teisingu santykiu (20 % O_2: 80 % N_2);

f) Įtaisas anglies dioksidui nustatyti titravimo būdu arba kokio nors tipo neorganinės anglies analizatorius;

g) Membraninio filtravimo įtaisas (neprivalomas);

h) DOC analizatorius (neprivalomas).

IV.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą, žr. I.6.2.

Sumaišykite 10 ml (a) tirpalo su 800 ml skiedimo vandens, įpilkite po 1 ml (b) - (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

IV.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas ir pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūrą galima ruošti iš įvairių šaltinių: aktyvusis dumblas; nuotekų ištakiai; paviršiniai vandenys; dirvožemiai arba mišiniai iš šių šaltinių.

Žr. I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. ir I.6.5.

IV.2.4. **Kolbų ruošimas**

Kaip pavyzdys, toliau nurodyti tūriai ir masės 5 litrų kolboms su 3 l suspensijos. Jei naudojate mažesnius tūrius, kiekius atitinkamai keiskite, tačiau užtikrinkite, kad būtų galima tiksliai matuoti susidariusio anglies dioksido kiekį.

Į kiekvieną 5 litrų kolbą įpilkite 2400 ml mineralinės terpės. Įpilkite atitinkam tūrį paruošto aktyviojo dumblo (žr. I.6.4.1. ir I.6.5.), kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija mišinio su sėjimo kultūra galutiniame 3 l tūryje būtų ne didesnė kaip 30 mg/l.

Kitas būdas, kai paruoštas dumblas iš pradžių skiedžiamas mineralinėje terpėje ruošiant 500 - 1000 mg/l suspensiją, po to alikvotinis šios suspensijos tūris pilamas į 5 litrų kolbos turinį, kad koncentracija būtų 30 mg/l; tai užtikrina didesnį preciziškumą. Galima naudoti kitus sėjimo kultūros šaltinius (žr. I.6.4.2).

Per naktį šiuos mišinius su sėjimo kultūra aeruokite CO_2 neturinčiu oru, kad iš sistemos būtų išvalytas anglies dioksidas.

Į lygiagrečiam bandymui skirtas kolbas atskirai įpilkite bandomosios ir etaloninės medžiagų žinomus pradinių tirpalų tūrius, kad dėl įdėtų cheminių medžiagų būtų gautos nuo 10 iki 20 mg DOC arba TOC/l koncentracijos; į kai kurias kolbas cheminių medžiagų nedėkite, bet palikite jas kaip sėjimo kultūros kontrolinius bandinius. Mažai tirpias medžiagas dėkite tiesiai į kolbas, remdamiesi mase arba tūriu, arba darykite, kaip aprašyta III priede.

Jei reikia, vieną kolbą naudokite bandomosios cheminės medžiagos galimam inhibuojamajam veikimui tikrinti, įdėdami į ją ir bandomosios, ir etaloninės cheminės medžiagos, kurių koncentracija būtų tokia pat, kaip ir kitose kolbose.

Be to, jei reikia patikrinti, arba nevyksta bandomosios cheminės medžiagos abiotinis skaidymas, turėkite sterilią kolbą su bandomąja chemine medžiaga be sėjimo kultūros (žr. I.6.6.). Sterilizuokite įdėdami atitinkamos koncentracijos nuodingos medžiagos.

Suspensijas visose kolbose skieskite iki 3 l, įpildami mineralinės terpės, prieš tai aeruojamos CO_2 neturinčiu oru. Neprivaloma, bet galima siurbti bandinius DOC analizei (žr. II.4 priedą) ir specifinei analizei. Prie kolbų oro išleidimo angų prijunkite dujų sugėrimo kolbas.

Jei naudojamas bario hidroksidas, prie kiekvienos 5 l kolbos nuosekliai prijunkite po tris dujų sugėrimo kolbas, kurių kiekvienoje būtų 100 ml 0,0125 M bario hidroksido tirpalo. Tirpale neturi būti sulfato ir karbonato nuosėdų ir jo koncentracija turi būti nustatyta prieš pat tirpalo naudojimą. Jei naudojamas natrio hidroksidas, junkite dvi gaudykles, antroji būtų kontrolinė, siekiant parodyti, kad visas anglies dioksidas buvo absorbuotas pirmoje gaudyklėje. Tinka dujų sugėrimo kolbos, uždarytos serumo butelių dangčiais. Į kiekvieną kolbą įpilkite 200 ml 0,05 M natrio hidroksido tirpalo, kurio pakanka sugerti visą kiekį anglies dioksido, išsiskyrusio visiškai suskaidant bandomąją medžiagą. Natrio hidroksido tirpalas, net šviežiai paruoštas, turi karbonatų pėdsakus; pataisa padaroma, atimant tuščiajame bandinyje susidariusio karbonato kiekį.

IV.2.5. **Kolbų skaičius tipiškame bandyme**

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

ir pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

8 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

IV.2.6. **Bandymų eiga**

Pradėkite bandymą, per suspensiją barbotuodami 30-100 ml/min oro be CO_2 srautą. CO_2 nustatyti periodiškai imkite anglies dioksido absorbento bandinius. Norint identifikuoti 10 parų lango periodą, rekomenduojama pirmąsias dešimt dienų analizę daryti kas antrą arba trečią dieną, o po to iki 28 paros – kas penktą dieną.

28 parą paimkite bandinius (neprivalomai) DOC ir (arba) specifinei analizei, išmatuokite suspensijų pH vertes ir į kiekvieną kolbą įpilkite 1 ml koncentruotos druskos rūgšties; aeruokite kolbas per naktį, kad iš bandomųjų suspensijų būtų pašalintas anglies dioksidas. 29 parą darykite paskutinę išsiskyrusio anglies dioksido analizę.

CO_2 matavimo dieną atjunkite arčiausiai kolbos prijungtą absorberį su bario hidroksidu, ir titruokite bario hidroksido tirpalą 0,05 M HCl tirpalu, indikatoriumi naudodami fenolftaleiną. Perkelkite likusius absorberius per vieną vietą arčiau kolbos ir kitame nuosekliai sujungtų absorberių gale prijunkite naują absorberį su 100 ml šviežio 0,0125 M bario hidroksido. Titruokite, kai tai būtina, pvz., kai pirmojoje gaudyklėje matyti daug nuosėdų, bet jų dar nėra antroje, arba bent kartą per savaitę. Iš kitos pusės, jei absorbentu naudojamas NaOH, švirkštu iš arčiau kolbos stovinčio absorberio paimkite mažą natrio hidroksido tirpalo bandinį (tai priklauso nuo naudojamo anglies analizatoriaus charakteristikų). Purkškite bandinį į anglies analizatoriaus IC dalį, kad galėtumėte tiesiogiai nustatyti išsiskyrusį anglies dioksidą.

Antrosios gaudyklės turinį analizuokite tik bandymo pabaigoje, kad būtų galima padaryti pataisą dėl galimo anglies dioksido išnešimo.

IV.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

IV.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Absorberyje sugerto CO_2 kiekis nustatomas pagal tokią titravimo formulę:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

čia:

V = 100 ml absorberio turinio titruoti sunaudotos HC1 tūris (ml),

C_B = bario hidroksido tirpalo koncentracija (M),

C_A = druskos rūgšties tirpalo koncentracija (M),

jei C_B lygi 0,0125 M ir C_A lygi 0,05 M, 100 ml bario hidroksido tirpalui titruoti reikia 50 ml, ir CO_2 masė nustatoma pagal lygtį:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HC1 sunaudoto titravimui} = 1{,}1 \times \text{ml HC1}$$

Taigi šiuo atveju, titravimui sunaudoto HC1 tūrio perskaičiavimo į susidariusio CO_2 mg faktorius yra 1,1.

Naudodami atitinkamas titravimo vertes, apskaičiuokite vien iš sėjimo kultūros bei iš sėjimo kultūros ir bandomosios cheminės medžiagos gauto CO_2 mases, ir šių masių skirtumas yra masė CO_2, susidariusio vien tik iš bandomosios cheminės medžiagos.

Pavyzdžiui, jei vien tik sėjimo kultūros bandinio titravimas duoda 48 ml, o sėjimo terpės ir bandomosios cheminės medžiagos bandinio titravimas duoda 45 ml,

CO_2 iš sėjimo kultūros = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

CO_2 iš sėjimo kultūros ir bandomosios cheminės medžiagos = 1,1 x (50-45) = 5,5 mg

taigi, iš bandomosios cheminės medžiagos susidariusio CO_2 masė lygi 3,3 mg.

Procentine biologinio skaidymo vertė skaičiuojama pagal formulę:

$$\text{skaidymo \%} = \frac{\text{išsiskyrusio } CO_2 \text{ (mg)}}{\text{Th}CO_2 \times \text{mg pridėtos bandomosios cheminės medžiagos}}$$

Arba

$$\text{skaidymo \%} = \frac{\text{išsiskyrusio } CO_2 \text{ (mg)}}{\text{pridėtos bandyme TOC kiekis (mg)} \times 3{,}67}$$

3,67 yra anglies masės perskaičiavimo į anglies dvideginio masę (44/12) faktorius.

Skaidymo po bet kurio laiko intervalo procentinę vertę gaukite, pridėdami procentines $ThCO_2$ vertes, apskaičiuotas kiekvienai parai, iki to laiko, kuriuo jis buvo išmatuotas.

Absorberiams su natrio hidroksidu susidariusio anglies dioksido kiekį, išreikštą IC (mg), skaičiuokite daugindami IC koncentraciją absorbente iš absorbento tūrio.

Procentinę skaidymo vertė skaičiuokite pagal:

$$\%\ ThCO_2 = \frac{\text{IC kolboje su bandomąja medžiaga (mg) - IC kolboje su tuščiuoju bandiniu (mg)}}{\text{TOC, pridėtos kaip bandomoji medžiaga, masė (mg)}} \times 100$$

Apskaičiuokite DOC šalinimą (neprivaloma), kaip aprašyta I.7. Užrašykite šiuos ir visus kitus rezultatus pridėtose specifikacijose.

IV.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Bandomosios cheminės medžiagos suspensijos mineralinėje terpėje IC kiekis bandymo pradžioje turi būti mažesnis kaip 5 % TC, ir tuščiajame bandinyje bandymo pabaigoje viso išsiskyrusio CO_2 kiekis paprastai neturi būti didesnis kaip 40 mg/l terpės. Jei gaunamos didesnės kaip 70 mg CO_2/litre vertės, duomenys ir eksperimento metodika turi būti kritiškai ištirti.

Žr. dar I.5.2.

IV.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

IV.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

ANGLIES DIOKSIDO IŠSISKYRIMO BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: mg/l, kaip cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje: mg/l, kaip cheminės medžiagos

Bendrasis į kolbą įdėtos C kiekis: mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje: mg/l

5. **ANGLIES DIOKSIDO SUSIDARYMAS IR SKAIDOMUMAS**

Metodas: $Ba(OH)_2$/NaOH/kitas

Laikas (paros)	CO_2 susidaręs bandinyje (mg)		CO_2 susidaręs tuščiajame bandinyje (mg)		CO_2 susidaręs bendras (mg) (bandinio vidutinė vertė minus tuščiojo bandinio vidutinė vertė)		$\frac{\text{bendras } CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 2	vidutinė vertė	3 4	vidutinė vertė	1	2	1	2	vidutinė vertė
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams bandiniams.

6. **ANGLIES ANALIZĖ (neprivaloma)**

Anglies analizatorius:

Laikas (paros)	Tuščiasis bandinys, mg/l	Bandomoji cheminė medžiaga, mg/l
0	$C_{b(0)}$	C_0
28 ([1])	$C_{b(t)}$	C_1
([1]) arba inkubavimo pabaigoje		

$$\text{pašalintos DOC \%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTINIS SKAIDYMAS (neprivalomas)**

$$\text{abiotinio skaidymo \%} = \frac{CO_2 - \text{susidaro } CO_2 \text{ sterilioje kolboje po 28 parų (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

V DALIS. MANOMETRINIS RESPIROMETRINIS BANDYMAS (C.4-D METODAS)

V.I. METODO ESMĖ

Išmatuotas mineralinės terpės su sėjimo kultūra tūris, turintis žinomos koncentracijos bandomąją cheminę medžiagą (100 mg/litre bandomosios medžiagos, duodančios bent 50-100 mg ThOD/litre), kuri nominaliai yra vienintelis organinės anglies šaltinis, pastovioje temperatūroje (± 1°C arba tiksliau) maišomas graduotoje kolboje iki 28 parų. Deguonies suvartojimas nustatomas arba matuojant deguonies (elektrolitiškai pagaminto) kiekį, kurio reikia pastoviam dujų tūriui respirometro kolboje palaikyti, arba pagal tūrio arba slėgio (arba abiejų kartu) kitimą aparate. Išsiskyręs anglies dioksidas sugeriamas kalio hidroksido tirpalu arba kitu tinkamu absorbentu. Bandomąja chemine medžiaga suvartoto deguonies kiekis (darant pataisą kiekiui deguonies, suvartotam lygiagrečiai daromame tuščiajame bandyme su sėjimo kultūra) yra reiškiamas procentine ThOD arba COD verte. Neprivalomai, iš papildomos specifinės analizės, daromos bandymo pradžioje ir pabaigoje, duomenų galima apskaičiuoti pirminį biologinį skaidymą, o darant DOC analizę – biologinį suskaidymą.

V.2. METODO APRAŠYMAS

V.2.1. **Aparatūra**

a) tinkamas respirometras;

b) termostatas, palaikantis temperatūrą ± 1 °C tikslumu arba geriau;

c) membraninio filtravimo įtaisas (neprivalomas);

d) anglies analizatorius (neprivalomas).

V.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą, žr. I.6.2.

Sumaišykite 10 ml (a) tirpalo su 800 ml skiedimo vandens, įpilkite po 1 ml (b) - (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

V.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas ir pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūrą galima ruošti iš įvairių šaltinių: aktyvusis dumblas; nuotekų ištakiai; paviršiniai vandenys; dirvožemiai arba mišiniai iš šių šaltinių.

Žr. I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. ir I.6.5.

V.2.4. **Kolbų ruošimas**

Mineraline terpe skiesdami pradinius tirpalus, ruoškite atskiras serijas bandomosios ir etaloninės cheminių medžiagų tirpalų, kuriuose cheminės medžiagos koncentracija paprastai būtų 100 mg/litre (gauti ThOD bent 50-100 mg/litre).

ThOD skaičiuokite pagal amonio druskų susidarymą, jei nesitikite nitrifikavimo, kai skaičiuoti reikia pagal nitratų susidarymą (žr. II.2 priedą).

Nustatykite pH vertes ir prireikus nustatykite 7,4 ± 0,2.

Mažai tirpios medžiagos turi būti pridedamos vėlesnėje pakopoje (žr. toliau).

Jei reikia nustatyti bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą, ruoškite dar vieną tirpalą mineralinėje terpėje, kuriame būtų ir bandomoji ir etaloninė medžiagos tokios koncentracijos, kokios yra atskiruose tirpaluose.

Jei reikia matuoti fizikocheminį deguonies suvartojimą, ruoškite bandomosios cheminės medžiagos tirpalą, paprastai 100 mg ThOD/litre, kuris buvo sterilizuotas pridedant tinkamos nuodingos medžiagos (žr. I.6.6.).

Įpilkite reikiamus bandomosios ir etaloninės medžiagos tirpalų tūrius, atitinkamai, bent į dvi kolbas. Į kitas kolbas įpilkite tik mineralinės terpės (sėjimo kultūros kontroliniai bandiniai) ir, jei reikia, maišytą bandomosios ir etaloninės cheminių medžiagų tirpalą ir sterilų tirpalą.

Jei bandomoji medžiaga mažai tirpi, dėkite jos pagal masę arba tūrį tiesiai šioje pakopoje arba apdorokite, kaip aprašyta III priede. Į CO_2-absorberio sekcijas įpilkite kalio hidroksido, natrio kalkių granulių arba kito absorbento.

V.2.5. **Kolbų skaičius tipiškame bandyme**

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

7 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

V.2.6. **Bandymų eiga**

Leiskite kolboms pasiekti tinkamą temperatūrą ir į atitinkamas kolbas įdėkite tiek sėjimo kultūros iš paruošto aktyviojo dumblo arba kitokio jos šaltinio, kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų ne didesnė kaip 30 mg/litre. Surinkite įrangą, įjunkite purtyklę, patikrinkite hermetiškumą ir pradėkite matuoti deguonies suvartojimą. Paprastai toliau prižiūrėti nereikia, išskyrus tai, kad užrašote būtinus rodmenis ir darote kasdienius tikrinimus, norėdami įsitikinti, arba teisinga temperatūra ir atitinkamas maišymas.

Pagal dažnai ir reguliariais tarpais užrašomus rodmenis skaičiuokite deguonies suvartojimą, taikydami įrangos gamintojo nurodytus metodus. Inkubavimo pabaigoje, paprastai po 28 parų, matuokite kolbų turinio pH, ypač jei deguonies suvartojimas yra mažas arba didesnis nei $ThODNH_4$ (azoto turintiems junginiams).

Jei reikia, bandymo pradžioje ir pabaigoje iš respirometrinių kolbų paimkite bandinius DOC analizei arba specifinei cheminei analizei (žr. II.4 priedą). Imdami bandymo pradžioje užtikrinkite, kad kolboje likusios bandomosios suspensijos tūris būtų žinomas. Kai deguonį vartoja azoto turinti bandomoji medžiaga, nustatykite nitrito ir nitrato koncentracijos didėjimą per 28 paras ir apskaičiuokite pataisą dėl deguonies, suvartoto nitrifikavimui (V priedas).

V.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

V.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Padalinkite kiekį (mg) deguonies, suvartoto bandomąja chemine medžiaga per tam tikrą laiką (pataisytą kiekiu deguonies, suvartoto per tą patį laiką tuščiajame sėjimo kultūros bandinyje) iš paimtos bandomosios cheminės medžiagos masės. Taip gausite BOD, skaičiuojamą mg deguonies/mg bandomosios cheminės medžiagos, taigi:

$$BOD = \frac{O_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga (mg) - } O_2 \text{ suvartojimas tuščiajame bandinyje (mg)}}{\text{bandomosios medžiagos kolboje (mg)}}$$

= mg O_2 vienam mg bandomosios cheminės medžiagos

biologinio skaidymo procentinę vertę skaičiuokite pagal:

$$\text{biologinio skaidymo \%} = ThOD\ \% = \%ThOD = \frac{BOD\ ((\text{mg } O_2/\text{mg cheminės medžiagos}))}{ThOD\ ((\text{mg } O_2 \text{ cheminei medžiagai}))} \times 100$$

arba pagal:

$$\%\ COD = \frac{BOD\ ((\text{mg } O_2/\text{mg cheminės medžiagos}))}{COD\ ((\text{mg } O_2/\text{mg cheminės medžiagos}))} \times 100$$

Reikia pažymėti, kad šie du metodai nebūtinai duoda tą pačią vertę; geriau naudoti pirmesnį metodą.

Azoto turinčioms medžiagoms naudokite atitinkamas ThOD vertes (NH_4 arba NO_3) pagal tai, kas yra žinoma apie nitrifikavimo galimybę arba ko iš jo laukiama (II.2 priedas). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (V priedas).

Kai neprivalomai daroma organinės anglies ir (arba) specifinė analizė, apskaičiuokite skaidymo procentinę vertę, kaip tai aprašyta I.7.

Visus rezultatus užrašykite į pridedamas specifikacijas.

V.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Paprastai deguonies suvartojimas sėjimo kultūros tuščiajame bandinyje per 28 paras yra 20-30 mg O_2/litre ir neturi būti didesnis kaip 60 mg/litre. Jei vertės didesnės kaip 60 mg/litre, būtina kritiškai ištirti duomenis ir eksperimento metodikas. Jei pH vertė nepatenka į 6-8,5 intervalą, o bandomoji medžiaga deguonies suvartoja mažiau kaip 60 %, bandymas turi būti pakartotas su mažesne bandomosios cheminės medžiagos koncentracija.

Žr. dar I.5.2.

V.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

V.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

MANOMETRINĖS RESPIROMETRIJOS BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: mg/litre

Pradinė koncentracija terpėje, C_0: mg/litre

Tūris bandymų kolboje (V): ml

ThOD arba COD: mg O_2/mg bandomosios medžiagos (NH_4, NO_3)

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje: mg/l

5. **DEGUONIES SUVARTOJIMAS: BIOLOGINIS SKAIDOMUMAS**

		Trukmė (paros)											
		0		7		14			21			26	
O_2 suvartojimas. (mg) bandomoji cheminė medžiaga	1												
	2												
	a, vidutinė vertė												
O_2 suvartojimas (mg) tuščiasis bandinys	3												
	4												
	b, vidutinė vertė												
Pataisyta BOD vertė (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD vienam mg bandomosios cheminės medžiagos	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												
skaidymo % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D, (a,)												
	Vidutinė vertė [1]												
V = terpės tūris bandymų kolboje													

[1] D_1 ir D_2 vidutinė vertė neturi būti skaičiuojama, jei tarp verčių yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams bandiniams.

6. **PATAISA DĖL NITRIFIKAVIMO (žr. V priedą)**

Para	0	28	Skirtumas
i) Nitrato koncentracija (mg N/litre)			(N)
ii) Deguonies ekvivalentas (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii) Nitrito koncentracija (mg N/litre)			(N)
iv) Deguonies ekvivalentas (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii + iv) Bendrasis deguonies ekvivalentas	—	—	

7. **ANGLIES ANALIZĖ (neprivaloma)**

Anglies analizatorius:

Laikas (paros)	Tuščiasis bandinys, mg/litre	Bandomoji cheminė medžiaga, mg/litre
0	(C_{blo})	(C_0)
28 [1]	(C_{blt})	(C_t)
[1] arba inkubavimo pabaigoje		

$$\text{DOC pašalinimas } \% = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFINĖ CHEMINĖ ANALIZĖ (neprivaloma)**

S_b = koncentracija fizikocheminių procesų (steriliame) kontroliniame bandinyje po 28 parų

S_a = koncentracija kolboje su sėjimo kultūra po 28 parų.

$$\text{biologinio skaidymo } \% = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTINIS SKAIDYMAS (neprivalomas)**

a = deguonies suvartojimas steriliose kolbose po 28 parų, (mg)

$$\text{deguonies suvartojimas mg bandomosios cheminės medžiagos} = \frac{a}{C_o V}$$

(žr. 1 ir 3 skyrius)

$$\text{abiotinio skaidymo } \% = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

VI DALIS. UŽDAROSIOS KOLBOS BANDYMAS (C.4-E METODAS)

VI.1. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Į bandomosios cheminės medžiagos tirpalą mineralinėje terpėje, paprastai 2-5 mg/litre, dedama sėjimo kultūra, turinti palyginti mažai mikroorganizmų iš mišrios populiacijos, ir laikomas tamsoje visiškai pilnose ir uždarytose kolbose pastovios temperatūros sąlygomis. Skaidymas sekamas 28 paras analizuojant ištirpusį deguonį. Bandomąja medžiaga suvartotas deguonies kiekis, padarius pataisą deguoniui, suvartotam lygiagrečiai daromame tuščiajame bandyme su sėjimo kultūra, yra išreikiamas procentine ThOD arba COD verte.

VI.2. METODO APRAŠYMAS

VI.2.1. **Aparatūra**

a) BOD kolbos, su šlifo kamščiais, pvz., 250-300 ml;

b) Vandens vonia arba inkubatorius, kolboms laikyti pastovioje temperatūroje (± 1 °C arba geriau) ir be apšvietimo;

c) Didelės stiklinės kolbos (2-5 litrų) terpei ruošti ir BOD kolboms pildyti;

d) Deguonies elektrodas ir matuoklis, arba įranga ir reagentai titruoti Winkler'io metodu.

VI.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą, žr. I.6.2.

Sumaišykite po 1 (vieną) ml (a) – (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

VI.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas**

Sėjimo kultūra paprastai gaunama iš nuotekų valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio, į kuriuos daugiausia patenka buitinės nuotekos, antrinio ištakio. Alternatyvus sėjimo kultūros šaltinis yra paviršinis vanduo. Paprastai 1 litrui terpės naudokite nuo vieno lašo (0,05 ml) iki 5 ml filtrato; gali tekti daryti bandymus, kad galėtumėte nustatyti tam tikram ištakiui optimalų tūrį (žr. I.6.4.2 ir I.6.5).

VI.2.4. **Kolbų ruošimas**

Stipriai aeruokite mineralinę terpę bent 20 min. Darykite kiekvieną bandymų grupę su mineraline terpe, pagaminta vienoje partijoje. Dažniausiai terpė yra tinkama naudoti po 20 h laikymo bandymo temperatūroje. Kontrolės tikslams nustatykite ištirpusio deguonies koncentraciją; jos vertė 20 °C temperatūroje turi būti apie 9 mg/litre. Visus oru prisotintos terpės pernešimo ir užpildymo veiksmus darykite, neleisdami susidaryti oro burbuliukams, pvz., naudodami sifonus.

Paruoškite lygiagrečias BOD kolbų grupes bandomajai ir etaloninei cheminei medžiagai nustatyti tuo pat metu daromų eksperimentų serijose. Surinkite pakankamą skaičių BOD kolbų, įskaitant kolbas tuščiajam bandiniui su sėjama kultūra, kad galėtumėte daryti bent po du deguonies suvartojimo matavimus tinkamais laiko tarpais, pvz., po 0, 7, 14, 21 ir 28 parų. Norint užtikrinti galimybę identifikuoti 10 parų langą, kolbų gali reikėti daugiau.

Į dideles kolbas įpilkite visiškai aeruotos mineralinės terpės, kad ji užimtų maždaug trečdalį kolbos tūrio. Tuomet į atskiras dideles kolbas įpilkite pakankamą kiekį bandomosios ir etaloninės cheminių medžiagų pradinių tirpalų, taip kad galutinė cheminių medžiagų koncentracija paprastai būtų ne didesnė kaip 10 mg/litre. Į vieną didelę kolbą su tuščiojo kontrolinio bandinio terpę cheminių medžiagų nedėkite.

Norint užtikrinti, kad sėjimo kultūros aktyvumas nebūtų ribojamas, deguonies koncentracija BOD kolbose neturi sumažėti daugiau kaip iki 0,5 mg/litre. Tai nustato maždaug 2 mg/litre ribą bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai. Tačiau sunkiai skaidomų junginių ir tų junginių, kurių ThOD mažas, koncentracija gali būti 5-10 mg/litre. Kai kuriais atvejais būtų patartina daryti lygiagrečias bandymų serijas su dviem bandomosios cheminės medžiagos koncentracijomis, pvz., 2 ir 5 mg/litre. Paprastai ThOD skaičiuokite pagal amonio druskų susidarymą, tačiau, jei manoma arba žinoma, kad gali vykti nitrifikavimas, skaičiuokite remdamiesi nitrato susidarymu ($ThOD_{NO3}$: žr. II.2 priedą). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (V priedas)

Jei turi būti ištirtas bandomosios medžiagos toksiškumas (pvz., jei anksčiau buvo nustatytos mažos biologinio skaidomumo vertės), reiki turėti dar vieną kolbų seriją.

Paruoškite dar vieną didelę kolbą, kurioje būtų aeruota mineralinė terpė (maždaug trečdalis kolbos tūrio) ir bandomoji bei etaloninė cheminės medžiagos, kurių galutinė koncentracija būtų tokia pati, kaip ir kitose didelėse kolbose.

Į tirpalus didelėse kolbose įpilkite sėjimo kultūros iš antrinio ištakio (nuo vieno lašo arba apie 0,05 ml iki 5 ml/litre) arba iš kito šaltinio, pvz., upės vandens (žr. I.6.4.2). Pabaigoje tirpalus skieskite aeruota mineraline terpe iki žymės ant kolbos, naudodami į jos dugną nuleistą žarną, kad būtų atitinkamas maišymas.

VI.2.5. **Kolbų skaičius tipiškame bandyme**

Tipiškame bandyme naudojamos tokios kolbos:

bent 10 su bandomąja chemine medžiaga ir sėjimo kultūra (bandomoji suspensija),

bent 10 tik su sėjimo kultūra (tuščiasis sėjimo kultūros bandinys),

bent 10 su etalonine chemine medžiaga ir sėjimo kultūra (metodikos tikrinimo bandinys),

ir, kai būtina, 6 kolbos su bandomąja chemine medžiaga, etalonine chemine medžiaga ir sėjimo kultūra (toksiškumo kontrolinis bandinys). Tačiau, norint užtikrinti galimybę identifikuoti 10 parų langą, kolbų reikėtų maždaug du kartus daugiau.

VI.2.6. **Bandymų eiga**

Naudodami žarną, nuleistą į apatinį atitinkamos didelės kolbos ketvirtį (ne į dugną), iš karto išpilstykite kiekvieną paruoštą tirpalą į atitinkamą BOD kolbų grupę, taip kad visos BOD kolbos būtų visiškai užpildytos. Švelniai patapšnokite kolbas, kad būtų pašalinti visi oro burbuliukai. Neatidėliojant nustatykite pradinę deguonies koncentraciją kolbose, taikydami Winkler'io arba elektrodo metodą. Kolbų turinį galite išsaugoti analizei Winkler'io metodu vėliau, pridėdami mangano (II) sulfato ir natrio hidroksido (pirmasis Winkler'io reagentas). Gerai užkimštas kolbas su deguonimi, surištu į rudą mangano (III) hidratuotą oksidą, laikykite tamsoje 10-20 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 24 valandas prieš darydami likusius veiksmus pagal Winkler'io metodą. Likusias lygiagrečiai paruoštas kolbas užkimškite taip, kad į jas nepatektų oro burbuliukų, ir inkubuokite tamsoje 20 °C temperatūroje. Kiekvieną seriją turi lydėti pilna lygiagreti serija, skirta tuščiojo bandinio terpės su sėjimo kultūra analizei. Paimkite iš kiekvienos serijos bent po dvi kolbas ištirpusio deguonies analizei tam tikrais laiko tarpais (bent kas savaitę) per 28 inkubavimo paras.

Savaitiniai bandiniai turi leisti įvertinti šalinimo procentinę vertę 14 parų lange, tuo tarpu bandinių analizė kas 3-4 paras turi leisti identifikuoti 10 parų langą, o tam reikėtų maždaug du kartus daugiau kolbų.

Azoto turinčioms medžiagoms turi būti daroma pataisa dėl deguonies suvartojimo bet kokiame nitrifikavimo procese. Tai padaryti taikykite O_2-elektrodo metodą ištirpusio deguonies koncentracijai nustatyti, o po to iš BOD kolbos paimkite bandinį nitrito ir nitrato analizei. Pagal nitrito ir nitrato koncentracijos padidėjimą apskaičiuokite suvartotą deguonį (žr. V priedą).

VI.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

VI.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Iš pradžių apskaičiuokite BOD, kuris pasireiškia per kiekvieną laiko periodą, atimdami deguonies suvartojimo tuščiajame bandinyje vertę (mg O_2/litre) iš deguonies suvartojimo bandomąja medžiaga. Gauti savitajai BOD vertei, skaičiuojamai mg deguonies vienam mg bandomosios cheminės medžiagos, šią pataisytą suvartojimo vertę dalinkite iš bandomosios medžiagos koncentracijos (mg/litre). Biologinio skaidomumo procentinę vertę skaičiuokite dalindami savitąjį BOD iš savitojo ThOD (apskaičiuoto pagal II.2 priedą) arba COD (nustatyto analizės būdu, žr. II.3 priedą), taigi:

$$\text{BOD} = \frac{\text{O}_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga (mg) - O}_2 \text{ suvartojimas tuščiajame bandinyje (mg)}}{\text{bandomosios medžiagos kiekis kolboje (mg)}}$$

= kiekis O_2 (mg) vienam mg bandomosios cheminės medžiagos

$$\text{skaidymo \%} = \frac{\text{BOD ((mg O}_2\text{/mg bandomosios cheminės medžiagos))}}{\text{ThOD ((mg O}_2\text{/mg bandomosios cheminės medžiagos))}} \times 100$$

Arba

$$\text{skaidymo \%} = \frac{\text{BOD ((mg O}_2\text{/mg bandomosios cheminės medžiagos))}}{\text{COD ((mg O}_2\text{/mg bandomosios cheminės medžiagos))}} \times 100$$

Reikia pažymėti, kad šie du metodai nebūtinai duoda tą pačią vertę; geriau naudoti pirmesnį metodą.

Azoto turinčioms medžiagoms naudokite atitinkamas ThOD vertes (NH_4 arba NO_3) pagal tai, kas yra žinoma apie nitrifikavimo galimybę arba ko iš jo laukiama (II.2 priedas). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (V priedas).

VI.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Deguonies suvartojimas tuščiajame bandinyje su sėjimo kultūra po 28 parų turi būti ne didesnis kaip 1,5 mg/litre ištirpusio deguonies. Jei vertės didesnės, reikia tikrinti eksperimento metodikas. Likutinė deguonies koncentracija bet kuriuo momentu bandymo kolbose neturi sumažėti daugiau kaip iki 0,5 mg/litre. Tokių mažų deguonies lygių nustatymas yra tinkamas tik tokiu atveju, jei ištirpusio deguonies nustatymo metodu įmanoma tiksliai juos matuoti.

Žr. dar I.5.2.

VI.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

VI.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

UŽDAROSIOS KOLBOS BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: mg/litre

Pradinė koncentracija kolboje: mg/litre

ThOD arba COD: mg O_2/mg bandomosios medžiagos

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Koncentracija reakcijos mišinyje: mg/litre

5. **DO NUSTATYMAS**

Metodas: Winkler'io elektrodas

Kolbų turinio analizė

Inkubavimo trukmė (paros)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Tuščiasis bandinys (be cheminės medžiagos)	1	C_1				
	2	C_2				
Vidutinė vertė	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Bandomoji cheminė medžiaga	1	a_1				
	2	a_2				
Vidutinė vertė	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Pastaba. Panašus formatas gali būti taikomas etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniam bandiniui.

6. **PATAISA DĖL NITRIFIKAVIMO (žr. V priedą)**

Inkubavimo trukmė (paros)	0	n_1	n_2	n_3
i) Nitrato koncentracija (mg N/litre)				
ii) Nitrato koncentracijos pokytis (mg N/litre)	—			
iii) Deguonies ekvivalentas (mg/litre)	—			
iv) Nitrito koncentracija (mg N/litre)				
v) Nitrito koncentracijos pokytis (mg N/litre)	—			
vi) Deguonies ekvivalentas (mg/litre)	—			
iii +vi) Bendrasis deguonies ekvivalentas (mg/litre)	—			

7. **DO SUVARTOJIMAS. % SKAIDYMO**

	Suvartota per n parų (mg/litre)			
	n_1	n_2	n_3	
KOLBA 1: $(m_{t0} - m_{tx})$ - $(m_{b0} - m_{bx})$				
KOLBA 2: $(m_{t0} - m_{tx})$ - $(m_{b0} - m_{bx})$				
KOLBA 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{bandymo koncentracija} \times \text{cheminės medžiagos} \times \text{ThOD}}$				
KOLBA 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{bandymo koncentracija} \times \text{cheminės medžiagos} \times \text{ThOD}}$				
D % vidutinė vertė([1]) $= \frac{D_1 + D_2}{2}$				

([1]) Jei tarp lygiagrečių nustatymų yra didelis skirtumas, vidutinės vertės neskaičiuokite.

m_{t0} = vertė bandymo kolboje laiku 0

m_{tx} = vertė bandymo kolboje laiku x

m_{b0} = tuščiojo bandinio vidutinė vertė laiku 0

m_{bx} = tuščiojo bandinio vidutinė vertė laiku x

Taip pat darykite pataisą dėl nitrifikavimo, naudodami 6 skyriaus iii + vi.

8. **DO SUVARTOJIMAS TUŠČIAME BANDINYJE**

Deguonies suvartojimas tuščiajame bandinyje: $(m_{b0} - m_{b28})$ mg/litre. Šis suvartojimas svarbus bandymo tinkamumui. Suvartojimas turi būti mažesnis kaip 1,5 mg/litre.

VII DALIS. M.I.T.I. BANDYMAS (C.4-F METODAS)

VII.1. METODO ESMĖ

Deguonies suvartojimas maišomu bandomosios medžiagos tirpalu arba suspensija mineralinėje terpėje, į kurį dedama specialiai auginta neadaptuotų mikroorganizmų kultūra, 28 paras automatiškai matuojamas tamsoje ir 25 ± 1 °C temperatūroje laikomame uždarame respirometre. Išsiskyręs anglies dioksidas absorbuojamas natrio kalkėmis. Biologinis skaidomumas reiškiamas deguonies suvartojimo (pataisyto dėl suvartojimo tuščiajame bandinyje) procentine teorinio suvartojimo (ThOD) dalimi. Be to, pirminio biologinio skaidomumo procentinė vertė skaičiuojama pagal papildomos specifinės cheminės analizės, daromos inkubavimo pradžioje ir pabaigoje, duomenis ir, neprivalomai, pagal DOC analizės duomenis.

VII.2. METODO APRAŠYMAS

VI1.2.1. **Aparatūra**

a) Automatinis elektrolitinis BOD matuoklis arba respirometras. paprastai su 6 kolbomis, kurių kiekvienos tūris 300 ml, ir su indu CO_2 absorbentui laikyti;

b) Patalpa su pastovia temperatūra ir (arba) vandens vonia 25 °C ± 1 °C arba geriau;

c) Membraninio filtravimo įtaisas (neprivalomas);

d) Anglies analizatorius (neprivalomas).

VII.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Paruoškite šiuos pradinius tirpalus, naudodami analiziškai grynus reagentus ir vandenį (I.6.1.):

a)	Kalio dihidrofosfatas, KH_2PO_4	8,50 g
	Kalio hidrofosfatas, K_2HPO_4	21,75 g
	Natrio hidrofosfatas, dodekahidratas, $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$	44,60 g
	Amonio chloridas, NH_4Cl	0,50 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	
	Tirpalo pH turi būti 7,2.	
b)	Magnio sulfatas, heptahidratas, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$	22,50 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	
c)	Kalcio chloridas, bevandenis, $CaCl_2$	27,50 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	
d)	Geležies (III) chloridas, heksahidratas, $FeCl_3 \times 6\ H_2O$	0,25 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.	

Imkite 3 ml kiekvieno (a), (b), (c) ir (d) tirpalo ir praskieskite iki 1 litro.

VII.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas**

Surinkite šviežius bandinius iš ne mažiau kaip dešimties vietų, daugiausia iš tokių, kuriose naudojamos ir šalinamos įvairios cheminės medžiagos. Iš įvairiausių vietų, pvz., nuotekų valymo įrenginių, pramoninių nuotekų valymo įrenginių, upių, ežerų, jūrų, surinkite 1 l dumblo, paviršiaus dirvožemio, vandens ir t.t. bandinių ir gerai juos kartu sumaišykite. Pašalinkite paviršiuje plaukiojančias medžiagas ir palikite nusistoti, po to natrio hidroksidu arba fosforo rūgštimi nustatykite skysčio virš nuosėdų pH vertę 7 ± 1.

Atitinkamą filtruoto skysčio virš nuosėdų tūrį naudokite užpildyti aktyviojo dumblo užpildymo ir išleidimo (fill-and-draw) indą ir aeruokite skystį maždaug 23½ h. Trisdešimt minučių po aeravimo pabaigos maždaug trečdalį viso skysčio virš nuosėdų išpilkite lauk ir ant nusodintos medžiagos užpilkite tokį pat tūrį tirpalo (pH 7), kuriame būtų po 0,1 % gliukozės, peptono ir kalio dihidrofosfato, ir vėl aeruokite. Kartokite šią procedūrą kartą per dieną. Dumblo įrenginys turi būti eksploatuojamas, laikantis geros praktikos: ištakiai turi būti skaidrūs, turi būti palaikoma 25 ± 2 °C temperatūra, pH turi būti 7 ± 1, dumblas turi gerai nusistoti, turi būti pakankamas aeravimas, kad mišinys visą laiką būtų aerobinis, turi būti paprasčiausių vienaląsčių ir dumblo aktyvumas turi būti tikrinamas pagal etaloninę medžiagą bent kas tris mėnesius. Dumblo kaip sėjamos kultūros nenaudokite anksčiau kaip po mėnesio nuo proceso pradžios, bet ne vėliau kaip po keturių mėnesių. Po to, imkite bandinius bent iš 10 vietų reguliariais laiko tarpais, kartą per tris mėnesius.

Norint, kad senojo ir naujojo dumblo aktyvumas būtų toks pat, sumaišykite vienodus tūrius filtruoto skysčio virš naudojamo aktyviojo dumblo ir filtruoto skysčio virš šviežiai surinkto dešimties šaltinių mišinio ir auginkite mikroorganizmus supiltuose skysčiuose, kaip tai aprašyta aukščiau. Imkite dumblą naudoti kaip sėjimo kultūrą 18-24 h po to, kai įrenginys buvo įkrautas.

VII. **2.4. Kolbų ruošimas**

Paruoškite tokias šešias kolbas:

Nr. 1: bandomosios cheminės medžiagos tirpalas skiedimo vandenyje, 100 mg/l

Nr. 2, 3 ir 4: bandomosios cheminės medžiagos tirpalas mineralinėje terpėje, 100 mg/l

Nr. 5: etaloninės cheminės medžiagos (pvz., anilino) tirpalas mineralinėje terpėje, 100 mg/l

Nr. 6: tik mineralinė terpė

Mažai tirpias medžiagas dėkite pagal masę arba pagal tūrį arba apdorokite, kaip aprašyta III priede, išskyrus tai, kad neturi būti naudojami nei tirpikliai, nei emulsikliai. Į visas kolbas specialiuose induose įdėkite CO_2 absorbento. Kolbose nr. 2, 3 ir 4 nustatykite pH vertę 7,0.

VII.2.5. **Bandymų eiga**

Į kolbas nr. 2, 3 ir 4 (bandomosios suspensijos), nr. 5 (aktyvumo kontrolinis bandinys) ir nr. 6 (tuščiasis bandinys su sėjimo kultūra) įpilkite mažą tūrį sėjimo kultūros, kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų 30 mg/l. Sėjimo kultūros nedėkite į kolbą nr. 1, kurioje yra abiotinio skaidymo kontrolinis bandinys. Surinkite įrangą, patikrinkite hermetiškumą, įjunkite purtykles ir pradėkite matuoti deguonies suvartojimą tamsoje. Kasdieną tikrinkite temperatūrą, purtyklę ir kulonometrinį deguonies suvartojimo registravimo įrenginį bei stebėkite bet kokius kolbų turinio spalvos kitimus. Deguonies suvartojimo rodmenis šešioms kolboms registruokite tiesiogiai tinkamu metodu, pvz., šešių taškų savirašiu, rašančiu BOD kreivę. Inkubavimo pabaigoje, kuris paprastai tęsiamas 28 paras, išmatuokite kolbų turinio pH ir nustatykite likusios bandomosios medžiagos ir kiekvieno tarpinio produkto koncentraciją, o vandenyje tirpios medžiagos – DOC koncentraciją (II.4 priedas). Imkitės ypatingų priemonių lakiųjų cheminių medžiagų atveju. Jei laukiate, kad gali vykti nitrifikavimas, nustatykite nitrito ir nitrato koncentraciją, jei tai įmanoma.

VII.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

VII.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Padalinkite kiekį (mg) deguonies, suvartoto bandomąja chemine medžiaga per tam tikrą laiką ir pataisytą kiekiu deguonies, suvartoto per tą patį laiką tuščiajame sėjimo kultūros bandinyje, iš paimtos bandomosios cheminės medžiagos masės. Tai duoda BOD, skaičiuojamą mg deguonies/mg bandomosios medžiagos, taigi:

$$\text{BOD} = \frac{\text{O}_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga (mg)} - \text{O}_2 \text{ suvartojimas tuščiajame bandinyje (mg)}}{\text{bandomosios medžiagos kiekis kolboje (mg)}}$$

= kiekis O_2 (mg) vienam mg bandomosios cheminės medžiagos

Tuomet biologinio skaidymo procentinė vertė gaunama pagal lygtį:

$$\text{skaidymo \%} = \text{ThOD \%} = \frac{\text{BOD } ((\text{mg } O_2/\text{mg cheminės medžiagos}))}{\text{ThOD } ((\text{mg } O_2/\text{mg cheminės medžiagos}))} \times 100$$

Mišiniams ThOD skaičiuokite pagal elementinę analizę, kaip paprastam junginiui. Naudokite atitinkamas ThOD ($ThOD_{NH4}$, arba $ThOD_{NO3}$) vertes pagal tai, ar nitrifikavimas nevyksta, ar jis yra visiškas (II.2 priedas). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (V priedas).

Pirminio biologinio skaidymo procentinę vertę skaičiuokite pagal specifinės (pradinės) cheminės medžiagos kiekio mažėjimą (žr. I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Nurodykite ataskaitoje, jei sumažėjo bandomosios medžiagos koncentracija kolboje nr. 1, kurioje matuojamas fizikocheminis pašalinimas, o bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją (S_b,) šioje kolboje po 28 parų naudokite apskaičiuoti biologinio skaidymo procentinę vertę.

Kai daromi DOC nustatymai (neprivalomi), apskaičiuokite biologinio suskaidymo procentinę vertę pagal:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

kaip aprašyta I.7.1 punkte. Jei kolboje nr. 1, kurioje matuojamas fizikocheminis DOC šalinimas, DOC kiekis sumažėjo, DOC koncentraciją šioje kolboje naudokite apskaičiuoti biologinio skaidymo procentinę vertę.

Visus rezultatus užrašykite pateiktose specifikacijose.

VII.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Paprastai deguonies suvartojimas sėjimo kultūros tuščiajame bandinyje per 28 paras yra 20-30 mg O_2/litre ir neturi būti didesnis kaip 60 mg/litre. Jei vertės didesnės kaip 60 mg/litre, būtina kritiškai ištirti duomenis ir eksperimento metodikas. Jei pH vertė nepatenka į 6-8,5 intervalą, o bandomoji medžiaga deguonies suvartoja mažiau kaip 60 %, bandymas turi būti pakartotas su mažesne bandomosios cheminės medžiagos koncentracija.

Žr. dar I.5.2.

Jei anilino skaidymo procentinė vertė, apskaičiuota pagal deguonies suvartojimą, po 7 parų ne didesnė kaip 40 % ir po 14 parų ne didesnė kaip 65 %, laikoma, kad bandymas nevalidus.

VII.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

VII.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

MITI (I) BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: mg/l kaip cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje, C_0: mg/l kaip cheminės medžiagos

Reakcijos mišinio tūris, V: ml

ThOD: mg O_2/l

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Dumblo bandinių ėmimo vietos:

1) ... 8) ...

6) ... 4) ...

2) ... 9) ...

7) ... 5) ...

3) ... 10) ...

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija aktyviajame dumble po aklimatizavimo sintetinėmis nuotekomis =... mg/l

Aktyviojo dumblo tūris vienam litrui galutinai paruoštos terpės =... ml.

Dumblo koncentracija galutinai paruoštoje terpėje =... mg/l

5. **DEGUONIES SUVARTOJIMAS. BIOLOGINIS SKAIDOMUMAS**

Naudoto respirometro tipas:

			Laikas (paros)				
			0	7	14	21	28
O_2 suvartojimas (mg) bandomąja medžiaga	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 suvartojimas (mg) tuščiajame bandyme	b						
Pataisyta O_2 suvartojimo vertė (mg)	(a_1-b) (a_2-b) (a_3-b)						
BOD vienam mg bandomosios cheminės medžiagos	$\frac{(a-b)}{C_oV}$	1 kolba					
		2 kolba					
		3 kolba					
skaidymo % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		vidutinė vertė ([1])					

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai.

([1]) Vidutinių verčių neskaičiuokite, jei tarp lygiagrečių nustatymų yra dideli skirtumai.

6. **ANGLIES ANALIZĖ (neprivaloma):**

Anglies analizatorius:

Kolba	DOC				pašalintos DOC %	Vidutinė vertė
	Matuota		Pataisyta			
Vanduo + bandomoji medžiaga	a				—	—
Dumblas + bandomoji medžiaga	b_1		b_1-c			
Dumblas + bandomoji medžiaga	b_2		b_2-c			
Dumblas + bandomoji medžiaga	b_3		b_3-c			
Kontrolinis tuščiasis bandinys	c		—		—	—

$$\text{pašalintos DOC \%} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **SPECIFINĖS CHEMINĖS ANALIZĖS DUOMENYS**

	Likutinis bandomosios medžiagos kiekis bandymo pabaigoje	Skaidymo %
Tuščiasis bandinys su vandeniu	S_b	
Terpė su sėjimo kultūra	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\text{skaidymo \%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Apskaičiuokite skaidymo %, atitinkamai, kolbose al, a2 ir a3.

8. **PASTABA**

Turi būti pridedama BOD kitimo laike kreivė, jei yra.

I PRIEDAS

SANTRUMPOS IR APIBRĖŽIMAI

DO: Ištirpęs deguonis (mg/l) yra vandeniniame bandinyje ištirpusio deguonies koncentracija.

BOD: Biocheminis deguonies poreikis (g) yra deguonies kiekis, kurį suvartoja mikroorganizmai, įsisavindami bandomąją medžiagą; taip pat skaičiuojamas g suvartoto deguonies g bandomosios medžiagos. (žr. C.5 metodą).

COD: Cheminis deguonies poreikis (g) yra deguonies kiekis, suvartotas bandomąją medžiagą oksiduojant karštu, rūgščiu dichromato tirpalu; COD yra turimo oksiduojamos medžiagos kiekio matas; taip pat skaičiuojamas g deguonies, suvartoto g bandomosios medžiagos. (žr. C.6 metodą).

DOC: Ištirpusi organinė anglis yra organinė anglis tirpale arba organinė anglis, kuri praeina per 0,45 μm filtrą arba lieka skystyje virš nuosėdų po 15 min centrifugavimo 40000 $m \times s^2$ (apie 4000 *g*) pagreičiu.

ThOD: Teorinis deguonies poreikis (mg) yra bendras deguonies kiekis, kurio reikia visiškai oksiduoti cheminę medžiagą; jis skaičiuojamas pagal molekulinę formulę (žr. II.2priedą), dar kitaip skaičiuojamas mg deguonies, suvartojamo oksiduoti 1 mg bandomosios medžiagos.

$ThCO_2$: Teorinis anglies dioksido kiekis (mg) yra apskaičiuotas anglies dioksido, kuris susidaro iš žinomo arba išmatuoto anglies kiekio bandomojoje medžiagoje, kai ji visiškai mineralizuojama, kiekis; taip pat skaičiuojamas mg anglies dioksido, kuris susidaro iš 1 mg bandomosios medžiagos.

TOC: Bendroji bandinio organinė anglis yra ištirpusios ir suspenduotos organinės anglies kiekių suma.

IC: Neorganinės anglies kiekis.

TC: Bendrasis anglies kiekis yra bandinio organinės ir neorganinės anglies bendras kiekis.

Pirminis biologinis skaidymas

yra biologiškai veikiamos medžiagos cheminės sandaros pokytis, kai ji netenka tai medžiagai būdingų savybių.

Biologinis skaidymas (aerobinis):

tai pasiektas skaidymo lygis, kai mikroorganizmai bandomąją medžiagą visiškai suvartoja, susidarant anglies dioksidui, vandeniui, mineralinėms druskoms ir naujoms mikrobiologinėms ląstelinėms sudedamosioms dalims (biomasei).

Lengvai biologiškai skaidomas:

cheminių medžiagų, kurioms buvo daromi kai kurie apibrėžti atrankos pagal biologinį skaidymą bandymai, sutartinis klasifikavimas; šie bandymai yra tokie tikslūs, kad laikoma, kad vandens terpėse aerobinėmis sąlygomis tokie junginiai greitai ir visiškai biologiškai suyra.

Natūraliai biologiškai skaidomas:

cheminių medžiagų, apie kurių biologinį suskaidymą (pirminį arba visišką) bet kokiame pripažintame biologinio skaidomumo bandyme yra neabejotinų duomenų, klasifikavimas.

Apdorojamumas:

yra galimybė medžiagas paversti šalinamais junginiais biologinio nuotekų valymo metu, neigiamai neveikiant normalios valymo procesų eigos. Dažniausiai lengvai biologiškai skaidomos medžiagos yra tinkamos apdoroti, bet ne visi junginiai iš prigimties yra biologiškai skaidomi. Gali vykti ir abiotiniai procesai.

Vėlavimo trukmė

yra laikas nuo sėjimo kultūros įdėjimo DOC išnykimo bandyme iki skaidymo procentinė vertė pasiekia bent 10 %. Vėlavimo trukmė dažnai yra labai kintamas dydis ir jo atkuriamumas blogas.

Skaidymo trukmė

yra laikas nuo vėlavimo laikotarpio pabaigos iki to laiko, kai skaidymas pasiekia 90 % didžiausios vertės lygį.

10 parų langas

10 parų iš karto po to, kai skaidymo vertė pasiekė 10 %.

II PRIEDAS

ATITINKAMŲ BENDRŲJŲ PARAMETRŲ SKAIČIAVIMAS IR NUSTATYMAS

Nuo pasirinkto metodo priklauso, kokie bus reikalingi bendrieji parametrai. Šiame skyriuje aprašomas šių dydžių išvedimas. Šių parametrų taikymas aprašomas skyriuose apie atskirus metodus.

1. **Anglies kiekis**

Anglies kiekis skaičiuojamas pagal žinomą cheminę sudėtį arba nustatomas bandomosios medžiagos elementine analize.

2. **Teorinis deguonies poreikis (ThOD)**

Teorinis deguonies poreikis (ThOD) gali būti apskaičiuotas, ji žinoma elementinė sudėtis, arba jis gali būti nustatytas, darant elementinę analizę. Junginio:

$$C_cH_hCl_{Cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$$

jei nitrifikavimas nevyksta,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16[2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW} mg/mg$$

kai nitrifikavimas vyksta.

$$ThOD_{NH3} = \frac{16[2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW} mg/mg$$

3. **Cheminis deguonies poreikis (COD)**

Cheminis deguonies poreikis (COD) nustatomas pagal C.6 metodą.

4. **Ištirpusi organinė anglis (DOC)**

Ištirpusi organinė anglis (DOC) pagal apibrėžimą yra bet kurios cheminės medžiagos arba medžiagų mišinio vandenyje organinė anglis, praeinanti per 0,45 μm filtrą.

Bandiniai iš bandymo indų siurbiami ir iš karto filtruojami filtravimo įtaisu, naudojant atitinkamą membraninį filtrą. Pirmuosius 20 ml (kiekis gali būti mažesnis, kai naudojami maži filtrai) filtrato pilama lauk. 10-20 ml tūrio arba mažesnius bandinius, jei jie įpurškiami (tūris priklauso nuo anglies analizatoriui reikalingo tūrio) paliekama anglies kiekiui analizuoti. DOC koncentracija nustatoma organinės anglies analizatoriumi, kuriuo būtų galima tiksliai nustatyti anglies koncentraciją, atitinkančią 10 % bandyme naudotos pradinės DOC koncentracijos arba mažesnę.

Filtruotus bandinius, kurių negalima analizuoti tą pačią darbo dieną, 48 h galima laikyti šaldytuve 2-4 °C temperatūroje, arba žemiau -18 °C, jei laikoma ilgiau.

Pastabos.

Membraniniai filtrai, kad būtų hidrofiliški, dažnai impregnuojami paviršinio aktyvumo medžiagomis. Todėl filtre gali būti iki kelių mg ištirpusios organinės anglies, kuri trukdytų biologinio skaidomumo nustatymams. Paviršinio aktyvumo medžiagos ir kitos tirpios organinės medžiagos iš filtrų šalinamos juos virinant tris kartus po vieną valandą dejonizuotame vandenyje. Filtrai toliau gali būti savaitę laikomi vandenyje. Jei naudojamos vienkartės filtravimo tūtos, kiekviena partija turi būti patikrinta, norint įsitikinti, kad nesusidaro ištirpusi organinė anglis.

Atsižvelgiant į membraninio filtro tipą, bandomoji cheminę medžiaga gali būti sulaikyta dėl jos adsorbavimo. Todėl būtų patartiną tikrinti, ar filtras neadsorbuoja cheminės medžiagos.

Kai norima lyginti TOC ir DOC, vietoje filtravimo gali būti taikomas 15 min centrifugavimas 40000 $m \times sec^{-2}$ (4000 *g*) pagreičiu. Metodas nepatikimas, jei DOC pradinė koncentracija yra < 10 mg/l, nes arba pašalinamos ne visos bakterijos, arba anglis vėl ištirpsta kaip bakterijų plazmos dalis.

NUORODOS

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 - Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Nonnenausschuß 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 PRIEDAS

MAŽAI TIRPIŲ MEDŽIAGŲ BIOLOGINIO SKAIDOMUMO VERTINIMAS

Mažai tirpių medžiagų biologinio skaidomumo bandymuose ypatingas dėmesys turi būti kreipiamas į šiuos aspektus.

Jei homogeniniai skysčiai retai kelia bandinio ėmimo problemų, tai kietąsias medžiagas rekomenduojama homogenizuoti tinkamu būdu, kad būtų išvengta paklaidų dėl nehomogeniškumo. Reikalingos specialios atsargumo priemonės, kai reikia paimti kelių miligramų reprezentatyvius cheminių medžiagų mišinių arba daug priemaišų turinčių medžiagų bandinius.

Bandymuose galima taikyti įvairius maišymo būdus. Reikia stengtis užtikrinti tik tokį maišymą, kad medžiaga būtų disperguotoje būsenoje, ir vengti perkaitinimo, per didelio putojimo ir per didelių šlyties jėgų.

Galima naudoti emulsiklį, su kuriuo gaunama patvari cheminės medžiagos dispersiją. Jis neturi būti nuodingas bakterijoms ir neturi būti biologiškai skaidomas arba bandymo sąlygomis putoti.

Emulsikliams taikomi kriterijai tinka ir tirpikliams.

Kietosioms bandomosioms medžiagoms nerekomenduojama naudoti kietuosius nešiklius, tačiau jie gali tikti aliejingoms medžiagoms.

Kai naudojamos pagalbinės medžiagos, pvz., emulsikliai, tirpikliai ir nešikliai, turi būti bandomas tuščiasis bandinys, kuriame būtų pagalbinė medžiaga.

Bet kuris iš trijų respirometrinių bandymų, CO_2, BOD, MITI, gali būti taikomas tirti mažai tirpių junginių biologinį skaidomumą.

NUORODOS

— 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 PRIEDAS

CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ, KURIOS GALI BŪTI NUODINGOS SĖJIMO KULTŪRAI, BIOLOGINIO SKAIDOMUMO VERTINIMAS

Kai tiriant cheminę medžiagą lengvo biologinio skaidomumo bandymuose paaiškėja, kad ji biologiškai neskaidoma, tai, jei norima atskirti, ar tai inhibuojamasis veikimas ar medžiagos inertiškumas, rekomenduojama tokia procedūra (Reynolds et al., 1987).

Toksiškumo ir biologinio skaidomumo bandymuose turi būti naudojama panaši arba identiška sėjimo kultūra.

Norint įvertinti toksiškumą cheminių medžiagų, tiriamų lengvo biologinio skaidomumo bandymuose, tiktų, kaip manoma, atskirai arba kartu taikyti dumblo kvėpavimo intensyvumo inhibavimo (aktyviojo dumblo kvėpavimo inhibavimo bandymas - direktyva 88/302/EEC), BOD ir (arba) augimo inhibavimo metodus.

Manoma, kad, jei reikia išvengti inhibavimo dėl medžiagos toksiškumo, bandomųjų medžiagų, naudojamų lengvo biologinio skaidomumo bandymuose, koncentracija turėtų būti mažesnė nei 1/10 EC_{50} vertės (arba mažesnė nei EC_{20} vertė), gautos toksiškumo bandymuose. Nepanašu, kad junginiai, kurių EC_{50} vertė yra didesnė kaip 300 mg/l, būtų toksiški biologinio skaidomumo bandymuose.

Mažesnės kaip 20 mg/l EC_{50} vertės greičiausiai turėtų kelti problemų toliau atliekamiems bandymams. Turi būti naudojamos mažos bandymo koncentracijos, dėl ko reikia taikyti tikslų ir jautrų uždarosios kolbos metodą arba naudoti ^{14}C žymėtas mežiagas. Kitaip dar būtų galima naudoti aklimatizuotą sėjimo kultūrą, kuri, galbūt, leistų naudoti bandomąją medžiagą didesnės koncentracijos. Tačiau šiuo atveju prarandamas specifiškas lengvo biologinio skaidomumo bandymo kriterijus.

NUORODOS

Reynolds, L. et al.. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 225.

V PRIEDAS

DEGUONIES SUVARTOJIMO PATAISA DĖL NITRIFIKAVIMO KELIAMŲ TRUKDŽIŲ

Jei nekreipti dėmesio į nitrifikavimą, kai biologinis skaidomumas vertinamas pagal deguonies suvartojimą bandomosiomis medžiagomis, tai paklaidos medžiagoms, kuriose nėra azoto, yra nežymios (ne didesnės kaip 5 %), net jei terpės amonio azoto oksidavimas bandomojo ir tuščiojo bandinio induose vyksta nevienodai. Tačiau, jei bandomosios medžiagos turi azoto, paklaidos gali būti didelės.

Jei nitrifikavimas įvyko, tačiau nevisiškas, stebimas deguonies suvartojimas reakcijos mišiniu gali būti pataisytas deguonies kiekiu, suvartotu amonio jonui oksiduoti į nitritą ir nitratą, jei nitrito ir nitrato koncentracijų pokytis inkubavimo metu nustatomas atsižvelgiant į tokias reakcijų lygtis:

$$2\ NH_4C1 + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Suminė reakcija:

$$2\ NH_4C1 + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (3)$$

Pagal 1) lygtį, 28 g azoto, kuris yra amonio chloride (NH_4Cl), oksiduoti į nitritą, reikia 96 g deguonies, t.y. faktorius lygus 3,43 (96/28). Tokiu pat būdu pagal 3) lygtį 28 g azoto, kai jis oksiduojamas į nitratą, suvartoja 128 g deguonies, t.y. faktorius lygus 4,57 (128/28).

Kadangi reakcijos yra nuoseklios ir vyksta dėl tam tikrų ir skirtingų bakterijų rūšių veiklos, įmanomas dalykas, kad nitrito koncentracija gali kaip didėti, taip ir mažėti; pastaruoju atveju susidarytų ekvivalentiškas kiekis nitrato. Taigi, deguonies, suvartoto nitratui susidaryti, kiekis lygus 4,57 ir nitrato koncentracijos padidėjimo sandaugai, o deguonies kiekis nitritui susidaryti lygus 3,43 ir nitrito koncentracijos padidėjimo sandaugai arba -3,43 ir nitrito koncentracijos sumažėjimo sandaugai, kai nitrito koncentracija mažėja.

T.y.:

O_2 suvartotas nitratui susidaryti = 4,57 × nitrato koncentracijos padidėjimo (4)

Ir

O_2 suvartota nitritui susidaryti = 3,43 × nitrito koncentracijos padidėjimo (5)

Ir

O_2 netenkama dėl nitrito išnykimo = -3,43 × nitrito koncentracijos padidėjimo (6)

Taigi

O_2 suvartojimas dėl nitrifikavimo = ± 3,43 × nitrito konc. pokyčio. + 4,57 × nitrato konc. padidėjimo (7)

ir todėl

O_2, suvartotas C oksiduoti = bendrasis stebėtas suvartotas kiekis – nitrifikavimui suvartotas kiekis (8)

Kitaip, jei nustatytas tik bendrasis oksiduoto azoto kiekis, tai kaip pirminė aproksimacija galima laikyti, kad deguonies suvartojimas dėl nitrifikavimo lygus 4,57 × oksiduoto N koncentracijos padidėjimo.

Toliau angliai oksiduoti suvartoto deguonies kiekio pataisyta vertė lyginama su ThOD NH_3 verte, kuri skaičiuojama II priede.

C.5. SKAIDYMAS. BIOCHEMINIS DEGUONIES POREIKIS

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šio metodo tikslas yra išmatuoti kietųjų arba skystųjų organinių medžiagų biocheminį deguonies poreikį (BOD).

Šiame bandyme gauti duomenys taikomi vandenyje tirpioms medžiagoms; tačiau taip pat galima bandyti, bent iš esmės, lakiąsias medžiagas arba medžiagas, kurios mažai tirpsta vandenyje.

Metodas tinka tik toms bandomosioms organinėms medžiagoms, kurios, būdamos bandyme naudojamos koncentracijos, neinhibuotų bakterijų veiklos. Jei bandomoji medžiaga nėra tiek tirpi, kad galima būtų pasiekti bandymo koncentraciją, gerai bandomosios medžiagos dispersijai gauti galima taikyti specialias priemones, pvz., dispergavimą ultragarsu.

Kai reikia aiškinti mažus rezultatus ir parinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, gali būti naudinga informacija apie cheminės medžiagos toksiškumą.

1.2. APIBRĖŽIMAS IR VIENETAI

BOD apibrėžiamas kaip masė ištirpusio deguonies, suvartoto biocheminio oksidavimo procesui nustatytame tirpalo tūryje vykti apibrėžtomis sąlygomis.

Rezultatai skaičiuojami BOD gramais vienam gramui bandomosios medžiagos.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Pageidautina naudoti atitinkamą etaloninę medžiagą, skirtą tikrinti sėjimo kultūros aktyvumą.

1.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Gerai aeruojamoje tinkamoje terpėje ištirpinta arba disperguota medžiaga, kurios kiekis žinomas, veikiama mikroorganizmų kultūra ir tamsoje inkubuojama apibrėžtos pastovios temperatūros sąlygomis.

BOD yra nustatomas pagal ištirpusio deguonies kiekio skirtumą bandymo pradžioje ir pabaigoje. Bandymo trukmė turi būti ne mažesnė kaip penkios paros ir ne didesnė kaip 28 paros.

Lygiagrečiai turi būti daromas nustatymas tuščiajame bandinyje, kuriame nebūtų bandomosios medžiagos.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Negalima laikyti, kad BOD nustatymas yra validus medžiagos biologinio skaidomumo nustatymas. Į šį bandymą galima žiūrėti tik kaip į atrankos bandymą.

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

Ruošiamas pradinis medžiagos tirpalas arba dispersija gauti BOD koncentracijai, atitinkančiai taikomą metodą. Tuomet pagal bet kurį atitinkamą nacionalinį arba tarptautinį standartizuotą metodą nustatomas BOD.

2. **DUOMENYS IR ĮVERTINIMAS**

BOD pradiniame tirpale skaičiuojamas pagal parinktą standartinį metodą, ir verčiamas į BOD gramus vienam gramui bandomosios medžiagos.

3. **ATASKAITA**

Turi būti nurodytas taikytas metodas.

Biocheminis deguonies poreikis turi būti vidurkis bent trijų tinkamų matavimų.

Turi būti pateikta visa rezultatams aiškinti reikalinga informacija ir pastabos, ypač apie priemaišas, fizinę būseną, toksiškumo įtaką ir medžiagai būdinga sudėtį, kuri turėtų įtakos rezultatams.

Turi būti nurodyta, ar buvo naudotas biologinio nitrifikavimo inhibavimo priedas.

4. **NUORODOS**

Standartizuotų metodų sąrašas, pavyzdžiui:

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. SKAIDYMAS. CHEMINIS DEGUONIES POREIKIS

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šio metodo tikslas yra standartiniu sutartu būdu išmatuoti kietųjų arba skystųjų organinių medžiagų cheminį deguonies poreikį (COD) nustatytomis laboratorinėmis sąlygomis.

Darant šį bandymą ir aiškinant gautus rezultatus, bus naudinga informacija apie medžiagos formulę (pvz., halogenų druskos, organinių junginių geležies (II) druskos, chloro organiniai junginiai).

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Cheminis deguonies poreikis yra medžiagos oksiduojamumo matas, reiškiamas oksidavimo agento, kurį suvartoja medžiaga nustatytomis laboratorinėmis sąlygomis, kiekiui ekvivalentiniu deguonies kiekiu.

Rezultatas skaičiuojamas COD gramais vienam gramui bandomosios medžiagos.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nebūtina kiekvienu atveju, kai tiriama nauja medžiaga, naudoti etalonines medžiagas. Jas daugiausia reikia naudoti tuomet, kai kartkartėmis daroma metodo veiksmingumo patikrą ir norint lyginti rezultatus, kai taikomas kitas metodas.

1.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Iš anksto nustatytas vandenyje ištirpintos arba disperguotos medžiagos kiekis dvi valandas oksiduojamas su grįžtamuoju šaldytuvu kalio dichromatu stipriai rūgščioje sieros rūgšties terpėje, kai katalizatorius sidabro sulfatas. Likusio dichromato kiekis nustatomas titruojant standartizuotu geležies (II) amonio sulfato tirpalu.

Jei medžiaga turi chloro, nustatymui trukdančio chlorido įtakai mažinti dedama gyvsidabrio (II) sulfato (*).

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Dėl to, kad tai sutartinis nustatymo būdas, COD yra ‘oksiduojamumo indikatorius’ ir naudojamas, kaip praktinis organinės medžiagos kiekio nustatymo metodas.

Bandyme gali trukdyti chloridas; taip pat nustatant COD gali trukdyti neorganinės redukuojančios arba oksiduojančios medžiagos.

Kai kurie cikliniai junginiai ir didelis skaičius lakiųjų medžiagų (pvz., mažesnės molekulinės masės sočiosios rūgštys) šiame bandyme nėra visiškai oksiduojamos.

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

Ruošiamas pradinis medžiagos tirpalas arba suspensija COD vertei nuo 250 mg iki 600 mg litre gauti.

Pastabos.

Mažai tirpių ir nedisperguojamų medžiagų atveju, galima pasverti tam tikrą kiekį į labai smulkius miltelius sumaltos medžiagos arba skystos medžiagos, atitinkančios maždaug 5 mg COD, ir įdėti ją į eksperimento indą su vandeniu.

Dažnai, ir ypač mažai tirpių medžiagų atveju, cheminį deguonies poreikį (COD) geriau nustatyti taikant metodo pakeitimą, t.y., uždaroje sistemoje su slėgio lygintuvu(H. Kelkenberg, 1975). Taikant šį metodo keitimą, dažnai galima sėkmingai kiekybiškai nustatyti medžiagas, pvz., acto rūgštį, kurias standartiniu metodu nustatyti sunku. Tačiau ir šiuo metodu nepasiseka nustatyti piridino. Jei kalio dichromato koncentraciją, kaip nurodyta 1) nuorodoje, padidinti iki 0,25 N (0,0416 M), palengvėja tiesioginis 5-10 mg medžiagos svėrimas, kas yra svarbu nustatant mažai vandenyje tirpių medžiagų COD ((2) nuoroda).

Šiaip COD nustatomas pagal bet kurį atitinkamą nacionalinį arba tarptautinį standartizuotą metodą.

2. **DUOMENYS IR VERTINIMAS**

Bandymų kolboje turimas COD skaičiuojamas pagal pasirinktą standartizuotą metodą ir verčiamas į COD gramus vienam gramui bandomosios medžiagos.

(*)) Norint išvengti gyvsidabrio išsisklaidymo aplinkoje, panaudoti tirpalai su gyvsidabrio druskomis turi būti apdoroti.

3. **ATASKAITA**

Turi būti nurodytas taikytas etaloninis metodas.

Cheminis deguonies poreikis turi būti vidurkis bent trijų validžių matavimų. Turi būti pateikta visa rezultatams aiškinti reikalinga informacija ir pastabos, ypač apie priemaišas, fizinę būseną, ir medžiagai būdingas savybes (jei žinomos), kurios turėtų įtakos rezultatams.

Ataskaitoje turi būti nurodyta apie gyvsidabrio (II) sulfato naudojimą nustatymui trukdančio chlorido įtakai mažinti.

4. **NUORODOS**

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.

Sąrašas standartizuotų metodų, pvz.:

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. SKAIDYMAS. ABIOTINIO HIDROLIZINIO SKAIDYMO KAIP pH FUNKCIJOS NUSTATYMAS

1. **METODAS**

Šis metodas remiasi OECD bandymo rekomendacijomis 1).

1.1. ĮVADAS

Hidrolizė yra svarbi reakcija, kuri reguliuoja abiotinį skaidymą. Ši reakcija yra ypač svarbi medžiagoms, kurių biologinis skaidomumas yra mažas; ši reakcija gali turėti įtakos medžiagos išsilaikymui aplinkoje.

Daugiausia hidrolizės reakcijų yra *pseudo* pirmojo laipsnio, taigi, jų puslaikio trukmė nepriklauso nuo koncentracijos. Todėl rezultatus, gautus su laboratorijoje naudojamomis koncentracijomis, paprastai galima ekstrapoliuoti į aplinkos sąlygas.

Be to, buvo pateikta keletas atvejų 2), kuriuose nurodoma, kad keliems cheminių medžiagų tipams sutapimas tarp rezultatų, gautų gryname vandenyje ir gamtiniuose vandenyse, yra pakankamai geras.

Norint daryti šį bandymą, yra naudinga turėti išankstinę informaciją apie cheminės medžiagos garų slėgį.

Šis metodas taikytinas tik vandenyje tirpioms medžiagoms. Įtakos rezultatams gali turėti priemaišos.

Cheminių medžiagų elgesys hidrolizės reakcijoje turi būti tiriamas pH verčių sąlygomis, kurios atitiktų aplinkoje dažniausiai pasitaikančias sąlygas (pH nuo 4 iki 9).

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Hidrolizės reakcija vadinama cheminės medžiagos RX reakcija su vandeniu. Šią reakciją galima pavaizduoti sumine X grupės mainų su OH grupe lygtimi:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \quad [1]$$

Greitis, kuriuo mažėja RX koncentracija, aprašomas lygtimi:

$$\text{greitis} = k\ [H_2O] \cdot [RX] \quad [2]$$

Kadangi vandens perteklius lyginant su cheminės medžiagos kiekiu yra labai didelis, šio tipo reakcija paprastai aprašoma kaip *pseudo* pirmojo laipsnio reakcija, kurioje stebimoji greičio konstanta išreiškiama lygtimi:

$$k_{obs} = k \times [H_2O] \quad [3]$$

Ši konstanta vienai pH vertei ir vienai temperatūrai, T, gali būti rasta pagal lygtį:

$$k_{obs}\ \frac{2{,}303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

čia:

t = laikas,

C_0 = medžiagos koncentracija laike 0,

C_t = medžiagos koncentracija laike t, ir

2,303 = perėjimo nuo natūraliųjų prie dešimtainių logaritmų faktorius.

Koncentracijos skaičiuojamos gramais litre arba moliais litre.

Šios konstantos k_{obs} dimensija yra (laikas)$^{-1}$

Puslaikio trukmė, $t_{½}$, yra apibrėžiama kaip laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %, būtent:

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

Taikant lygtis 4) ir 5), galima parodyti, kad:

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{obs} \quad [6]$$

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nebūtina kiekvienu atveju, kai tiriama nauja medžiaga, naudoti etalonines medžiagas. Jas daugiausia reikia naudoti tuomet, kai kartkartėmis daroma metodo veiksmingumo patikrą ir norint lyginti rezultatus, kai taikomas kitas metodas.

Etaloninėmis medžiagomis buvo naudotos šios medžiagos 1):

Acetilsalicilo rūgštis (aspirinas)

Fosforotioninės rūgšties O,O-dietil O-(6-metil-2-(1-metiletil) 4-pirimidinil) esteris. (Dimpilatas, diazinonas)

1.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Ruošiamas nedidelės koncentracijos medžiagos tirpalas vandenyje; pH ir temperatūra kontroliuojami.

Medžiagos koncentracijos mažėjimas laike nustatomas, taikant bet kokią tinkamą analizės metodiką.

Brėžiamas koncentracijos logaritmo kitimo laike grafikas, ir, jei šis grafikas yra tiesė, pirmojo laipsnio reakcijos greičio konstantą galima apskaičiuoti pagal tiesės krypties koeficientą (žr. 1.2 punktą).

Jei konkrečiai temperatūrai greičio konstantos nustatyti tiesiogiai nėra galimybės, paprastai būna įmanoma greičio konstantą įvertinti, taikant Arrhenius lygtį, kuri aprašo greičio konstantos priklausomybę nuo temperatūros. Tiesinę reakcijos greičio konstantos nuo atvirkštinės absoliučios temperatūros, K, priklausomybę galima ekstrapoliuoti į greičio konstantos vertę, kurios tiesiogiai išmatuoti neįmanoma.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nuorodoje 2) pranešama, kad 13 klasių organinių junginių hidrolizės greičio konstantas galima matuoti dideliu tikslumu.

Pakartojamumas ypač priklauso nuo pH ir temperatūros reguliavimo, ir gali būti veikiamas mikroorganizmų buvimo bei, tam tikrais atvejais, ištirpusio deguonies koncentracijos.

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Reagentai**

1.6.1.1. *Buferiniai tirpalai*

Bandymas daromas trijų pH verčių sąlygomis: 4,0, 7,0 ir 9,0.

Šiam tikslui turi būti ruošiami buferiniai tirpalai, naudojant analiziškai grynas chemines medžiagas ir distiliuotą arba dejonizuotą vandenį. Kai kurios buferinių tirpalų sistemos pateiktos papildyme.

Naudojama buferinė sistema gali turėti įtakos hidrolizės greičiui; jei tai yra akivaizdu, reikia naudoti kitą buferinę sistemą. Vietoje fosfato buferio 2) nuorodoje rekomenduojama naudoti borato arba acetato buferinį tirpalą.

Jei buferinių tirpalų pH vertė bandymų temperatūroje nėra žinoma, ji pasirinktoje temperatūroje gali būti išmatuota kalibruotu pH-metru ± 0,1 pH vieneto tikslumu.

1.6.1.2. *Bandomieji tirpalai*

Bandomoji medžiaga turi būti ištirpinta parinktame buferiniame tirpale ir jos koncentracija neturi būti didesnė kaip 0,01 M arba pusė sočiojo tirpalo koncentracijos, žiūrint, kuri koncentracija yra mažesnė.

Naudoti su vandeniu susimaišančius organinius tirpiklius rekomenduojama tik mažai vandenyje tirpioms medžiagoms.

Tirpiklio kiekis turi būti mažesnis kaip 1 %, ir neturi trukdyti hidrolizės procesui.

1.6.2. **Aparatūra**

Turi būti naudojamos stiklinės kolbos su šlifo kamščiais, tačiau ant šlifo neturi būti tepalo.

Jei cheminė medžiaga arba buferinė sistema yra lakios, arba, jei bandymas daromas aukštesnėje temperatūroje, geriau naudoti užlydytus arba pertvara uždarytus mėgintuvėlius ir virš tirpalo reikia vengti neužimtos erdvės.

1.6.3. **Analizės metodas**

Metodas turi būti specifinis, kad būtų galima nustatyti bandomąją medžiagą bandyme naudojamos koncentracijos, ir jis gali būti tam tikras analizės metodikų derinys.

Taikomas analizės metodas priklausys nuo medžiagos prigimties ir turi būti pakankamai tikslus ir jautrus, kad būtų galima nustatyti pradinės koncentracijos mažėjimą 10 %.

1.6.4. **Bandymų sąlygos**

Bandymai turi būti atliekami naudojat termostatuojamą kamerą arba vonią su pasirinkta pastovia temperatūra, nustatytą ± 0,5 °C tikslumu. Temperatūra turi būti palaikoma ir matuojama ± 0,1 °C tikslumu. Fotolizės trukdančios įtakos reikia vengti, naudojant atitinkamas priemones.

Jei medžiagos lengvai oksiduojamos, būtina šalinti ištirpusį deguonį (pvz., prieš ruošiant tirpalą 5 minutes barbotuoti azotą arba argoną).

1.6.5. **Bandymų eiga**

1.6.5.1. *Parengiamasis bandymas*

Visoms medžiagoms 50 ± 0,5 °C temperatūroje ir trims pH vertėms: 4,0, 7,0 ir 9,0 turi būti daromas parengiamasis bandymas. Daroma pakankamai matavimų, kad 50 °C temperatūroje kiekvienai pH vertei būtų galima įvertinti, ar puslaikio trukmė ($t_{½}$) yra mažesnė kaip 2,4 valandos, ar po penkių parų išmatuotos hidrolizės laipsnis yra mažesnis kaip 10 %. (Galima apytikriai apskaičiuoti, kad sąlygomis, labiau panašiomis į aplinkos sąlygas (25 °C), šios vertės prilygtų puslaikio trukmei, atitinkamai, mažesnei nei vieną para arba didesnei nei vieneri metai).

Jei parengiamasis bandymas rodo, kad visų trijų pH verčių (4, 7 ir 9) ir 50 °C temperatūros sąlygomis per 2,4 valandas hidrolizuojasi 50 % bandomosios medžiagos arba daugiau, arba per penkias paras medžiagos hidrolizės laipsnis mažesnis kaip 10 %, toliau bandyti nebūtina.

Kitais atvejais ir atskiroms pH vertėms, kurioms ši sąlyga nebuvo įvykdyta, daromas 1 bandymas.

1.6.5.2. *1 bandymas*

1 bandymas daromas vienoje temperatūroje; geriau 50 ± 0,5 °C, ir, jei įmanoma, steriliomis sąlygomis bei tokioms pH vertėms, kurioms parengiamasis bandymas parodė, kad būtina bandyti toliau.

Norint patikrinti, ar hidrolizę nustatytų pH verčių sąlygomis yra *pseudo* pirmojo laipsnio, turi būti pasirinktas pakankamas skaičius bandinių (ne mažiau kaip keturi), kad būtų apimtas hidrolizės intervalas nuo 20 % iki 70 %.

Kiekvienai pH vertei, kurioje daromas 1 bandymas, nustatomas reakcijos laipsnis.

Greičio konstantos 25 °C temperatūroje įvertis:

Sprendimas, kaip tęsti eksperimentą, priklausys nuo to, ar iš 1 bandymo rezultatų galima daryti išvadą, kad reakcija yra *pseudo* pirmojo laipsnio arba taip nėra.

Jei po 1 bandymo negalima daryti neabejotinos išvados, kad reakcija yra *pseudo* pirmojo laipsnio, eksperimentai turi būti daromi toliau, kaip aprašyta 2 bandyme.

Jei pagal 1 bandymo rezultatus galima užtikrintai tvirtinti, kad reakcija yra *pseudo* pirmojo laipsnio, tolesni eksperimentai turi būti daromi, kaip aprašyta 3 bandyme. (Antraip, tam tikromis aplinkybėmis pagal greičio konstantas 50 °C temperatūroje, apskaičiuotas naudojant 1 bandymo rezultatus (žr. 3.2), gali būti įmanoma apskaičiuoti greičio konstantas 25 °C temperatūroje).

1.6.5.3. *2 bandymas*

Šis bandymas daromas kiekvienai pH vertei, kuriai 1 bandymo rezultatai parodė, kad tai būtina daryti:

— arba vienoje temperatūroje, mažesnėje kaip 40 °C,

— arba dvejose temperatūrose, didesnėse kaip 50 °C, kurios tarpusavyje skiriasi bent 10 °C.

Kiekvienai pH vertei ir temperatūrai, kuriose daromas 2 bandymas, turi būti nustatyti bent šeši atitinkamai išdėstyti duomenų taškai, taip kad hidrolizės laipsnis būtų išmatuotas intervale nuo 20 % iki 70 %.

Vienai pH vertei ir vienai temperatūrai matavimas daromas du kartus. Kai 2 bandymas daromas dvejose temperatūrose virš 50 °C, kartoti bandymą geriau mažesnėje iš tų dviejų temperatūroje.

Kiekvienai pH vertei ir temperatūrai, kuriose daromas 2 bandymas, pateikiamas grafinis puslaikio trukmės ($t_{½}$) įvertinimas, kai tai yra įmanoma.

1.6.5.4. *3 bandymas*

Šis bandymas daromas kiekvienai pH vertei, kuriai 1 bandymo rezultatai rodo, kad tai daryti būtina.

— arba vienoje temperatūroje, mažesnėje kaip 40 °C,

— arba dvejose temperatūrose, didesnėse kaip 50 °C, kurios tarpusavyje skiriasi bent 10 °C.

Kiekvienai pH ir temperatūros vertei, kuriose daromas 3 bandymas, parenkami trys duomenų taškai, pirmasis laike 0, o antrasis ir trečiasis – kai hidrolizės laipsnis yra didesnis kaip 30 %; turi būti apskaičiuoti k_{obs} ir $t_{½}$.

2. **DUOMENYS**

Pseudo pirmojo laipsnio reakcijai k_{obs} vertės kiekvienai bandymuose naudotai pH vertei ir kiekvienai temperatūrai gali būti gautos iš koncentracijos logaritmo kitimo laike grafiko pagal tokią lygtį:

$$k_{obs} = - \text{ krypties koeficientas} \times 2{,}303 \qquad [7]$$

Be to, $t_{½}$ gali būti apskaičiuotas pagal [6] lygtį.

Jei tinka, gaukite k_{25} o_C įvertį, taikydami Arėnijaus (Arrhenius) lygtį.

Jei reakcija yra ne *pseudo* pirmojo laipsnio, žr. 3.1.

3. **ATASKAITA**

3.1. ATASKAITOS DUOMENYS

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— medžiagos specifikacija;

— visi rezultatai, gauti etaloninėms medžiagoms;

— taikyto analizės metodo esmė ir detalės;

— kiekvieno bandymo: temperatūra, pH vertė, buferinio tirpalo sudėtis ir duomenų lentelė su visais koncentracijos kitimo laike taškais;

— *pseudo* pirmojo laipsnio reakcijai: k_{obs} ir $t_{½}$ vertės bei jų skaičiavimo metodika;

— ne *pseudo* pirmojo laipsnio reakcijai rezultatai pateikiami, brėžiant koncentracijos logaritmo priklausomybės nuo laiko grafiką;

— visa informacija ir pastabos, kurių reikia rezultatams interpretuoti.

3.2. DUOMENŲ INTERPRETAVIMAS

Gali būti įmanoma apskaičiuoti priimtinas cheminių medžiagų hidrolizės reakcijos greičio konstantos vertes (25°C temperatūroje), jei yra žinomos bandomosios medžiagos homologų aktyvacijos energijos eksperimentinės vertės ir jei galima pagrįstai daryti prielaidą, kad bandomosios medžiagos aktyvacijos energija yra tos pačios eilės dydis.

4. **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) W. Mabey and T. Mill, 'Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions', J. Phys. Chem. Ref. Data, 1978, vol. 7 2), 383-415.

Priedėlis

BUFERINIAI MIŠINIAI

A. **CLARK ir LUBS**

Šiose lentelėse pateiktos pH vertės buvo apskaičiuotos pagal potencialo matavimus, taikant standartines lygtis pagal Sörensen'ą. Tikroji pH vertė yra 0,04 vieneto didesnė nei nurodyta lentelėje.

Sudėtis	pH
0,1 M kalio hidroftalatas + 0,1 N HC1 20 °C temperatūroje	
2,63 ml 0,1 N HC1 + 50 ml ftalato iki 100 ml	3,8
0,1 M kalio hidroftalatas + 0,1 N NaOH 20 °C temperatūroje	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato iki 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato iki 100 ml	4,2
0,1 M kalio dihidrofosfatas + 0,1 N NaOH 20 °C temperatūroje	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki o 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,2

0,1 M H_3BO_3 tirpalas 0,1 M KCI + 0,1 N NaOH 20 °C temperatūroje	
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,2

B. **KOLTHOFF ir VLEESHOUWER**

Sudėtis	pH
0,1 M kalio dihidrocitratas ir 0,1 N NaOH 18 °C temperatūroje (tirpalą nuo pelėsių apsaugoti, įdėkite nedidelį kristaliuką timolio)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,2

C. **SÖRENSEN**

0,05 M borakso + 0,1 N HC1

Sudėtis		pH			
ml borakso	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 borakso + 0,1 N NaOH

Sudėtis		pH			
ml borakso	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