31992L0069

29.12.1992. *EIROPAS KOPIENU OFICIĀLAIS VĒSTNESIS* L 383/113

KOMISIJAS DIREKTĪVA 92/69/EEK

(1992. gada 31. jūlijs),

ar ko septiņpadsmito reizi tehnikas attīstībai pielāgo Padomes Direktīvu 67/548/EEK par normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz bīstamu vielu klasifikāciju, iepakošanu un marķēšanu

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Ekonomikas kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes Direktīva 67/548/EEK (1967. gada 27. jūnijs) par normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz bīstamu vielu klasifikāciju, iepakošanu un marķēšanu ([1]), kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Direktīvu 92/32/EEK ([2]), un jo īpaši tās 28. un 29. pantu,

tā kā saskaņā ar 3. panta 1. punktu Direktīvā 67/548/EEK un 3. pantu Padomes Direktīvā 88/379/EEK (1988. gada 7. jūnijs) par dalībvalstu normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu, kas attiecas uz bīstamu preparātu klasifikāciju, iepakošanu un marķēšanu ([3]), kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Komisijas Direktīvu 90/492/EEK ([4]), vielu un preparātu fizikāli ķīmiskās īpašības, toksicitāti un ekotoksicitāti nosaka, izmantojot Direktīvas 67/548/EEK V pielikumā norādītās metodes;

tā kā pašlaik Direktīvas 67/548/EEK V pielikums ir publicēts divās daļās, kuras attiecīgi atbilst Komisijas Direktīvas 84/449/EEK ([5]) pielikumam un Komisijas Direktīvas 88/302/EEK ([6]) pielikumam;

tā kā, ņemot vērā tehnikas attīstību, jāpārskata Komisijas Direktīvas 84/449/EEK pielikumā iekļautās testēšanas metodes;

tā kā, ņemot vērā tehnikas attīstību, jāpārskata arī pašlaik Komisijas Direktīvas 88/302/EEK pielikumā iekļautā metode aļģu augšanas inhibīcijas noteikšanai, un šajā gadījumā šī testa metode jāiekļauj Direktīvas 84/449/EEK pielikumā;

tā kā saskaņā ar Padomes Direktīvu 86/609/EEK par dalībvalstu normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz to dzīvnieku aizsardzību, kurus izmanto izmēģinājumiem ([7]), ieteicams, cik vien iespējams, samazināt izmēģinājumos izmantoto dzīvnieku skaitu;

tā kā šīs direktīvas noteikumi ir saskaņā ar atzinumu, ko sniegusi Komiteja, kas atbild par to, kā tehnikas attīstībai pielāgot direktīvas par tehnisko šķēršļu novēršanu bīstamu vielu un preparātu tirdzniecībā,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Direktīvas 84/449/EEK pielikumu aizstāj ar šīs direktīvas pielikumu.

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

2. pants

Ar šo svītro metodi aļģu augšanas inhibīcijas noteikšanai, kas izklāstīta Direktīvas 88/302/EEK pielikumā.

3. pants

Dalībvalstīs stājas spēkā normatīvie un administratīvie akti, kas vajadzīgi, lai ne vēlāk kā 1993. gada 30. oktobrī izpildītu šīs direktīvas prasības. Dalībvalstis par to tūlīt informē Komisiju.

Pieņemot šos tiesību aktus, dalībvalstis tajos ietver atsauci uz šo direktīvu vai arī šādu atsauci pievieno to oficiālajai publikācijai.

Dalībvalstis nosaka procedūru, kas jāievēro, izdarot šādas atsauces.

4. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 1992. gada 31. jūlijā

Komisijas vārdā —

Komisijas loceklis

Karel VAN MIERT

PIELIKUMS

Pielikums Komisijas Direktīvai 92/69/EEK (1992. gada 31. jūlijs), ar ko septiņpadsmito reizi tehnikas attīstībai pielāgo Padomes Direktīvu 67/548/EEK par normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz bīstamu vielu klasifikāciju, iepakošanu un marķēšanu [1]

[1] OV L 383, 29.12.1992., 113. lpp.

IEVADS

A DAĻA	FIZIKĀLI ĶĪMISKO ĪPAŠĪBU NOTEIKŠANAS METODES	5
A.1.	Kušanas/sasalšanas temperatūra	5
A.2.	Viršanas temperatūra	15
A.3.	Relatīvais blīvums	21
A.4.	Tvaika spiediens	26
A.5.	Virsmas spraigums	47
A.6.	Šķīdība ūdenī	54
A.8.	Sadalīšanās koeficients	63
A.9.	Uzliesmošanas temperatūra	74
A.10.	Uzliesmošanas spēja (cietas vielas)	76
A.11.	Uzliesmošanas spēja (gāzes)	79
A.12.	Uzliesmošanas spēja (kontaktā ar ūdeni)	81
A.13.	Cietvielu un šķidrumu piroforās īpašības	85
A.14.	Sprādzienbīstamība	87
A.15.	Pašaizdegšanās temperatūra (šķidrumi un gāzes)	98
A.16.	Cietvielu pašaizdegšanās relatīvā temperatūra	99
A.17.	Oksidējošās īpašības (cietvielas)	102
B DAĻA	METODES TOKSICITĀTES NOTEIKŠANAI	111
Vispārīgs ievads		107
B.I.	Akūtā toksicitāte (pēc perorālas ievadīšanas)	110
B.I bis	Akūtā toksicitāte (pēc perorālas ievadīšanas). Fiksēto devu metode	113
B.2.	Akūtā toksicitāte (pēc ieelpošanas)	117
B.3.	Akūtā toksicitāte (ādas)	121
B.4.	Akūtā toksicitāte (ādas kairinājums)	124
B.5.	Akūtā toksicitāte (acu kairinājums)	127
B.6.	Ādas sensibilizācija	131
B.7.	Atkārtotās devas (28 dienu) toksicitāte (orālā)	136
B.8.	Atkārtotās devas (28 dienu) toksicitāte (ieelpošanas)	140
B.9.	Atkārtotās devas (28 dienu) toksicitāte (ādas)	144
B.10.	Mutagenitāte (zīdītāju citoģenētikas *in vitro* tests)	148
B.11.	Mutagenitāte (zīdītāju kaulu smadzeņu *in vivo* tests, hromosomu analīze)	151
B.12.	Mutagenitāte (mikrokodola tests)	154
B.13.	Mutagenitāte (*Escherichia coli* — reversās mutācijas tests)	157
B.14.	Mutagenitāte (*Salmonella typhimurium* — reversās mutācijas tests)	160

C DAĻA. METODES EKOTOKSICITĀTES NOTEIKŠANAI..... 163

C.1 Akūtā toksicitāte zivīm..... 163
C.2. Akūtā toksicitāte dafnijām..... 172
C.3. Aļģu augšanas kavēšanas tests..... 179
C.4. Biodegradācija: "vieglas" bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšana..... 187
C.4-A: Izšķīduša organiskā oglekļa (IOO) atkrāsošanas metode..... 194
C.4-B: Modificētā ESAO skrīninga pārbaude..... 197
C.4-C: Oglekļa dioksīda (CO_2) izdalīšanās..... 202
C.4-D: Manometriskā respirometrija..... 207
C.4-E: Slēgto pudeļu metode..... 211
C.4-F: MITI (Japānas Ārējās tirdzniecības un rūpniecības ministrijas) metode..... 216
Pielikumi..... 221
C.5. Noārdīšanās: bioķīmiskais skābekļa patēriņš..... 226
C.6. Noārdīšanās: ķīmiskais skābekļa patēriņš..... 227
C.7. Noārdīšanās: abiotiskā degradācija: hidrolīze atkarībā no vides reakcijas pH..... 229

IEVADS

Šajā pielikumā aplūkotas metodes fizikāli ķīmisko, toksisko un ekotoksisko īpašību noteikšanai saskaņā ar Direktīvas 79/831/EEK VII un VIII pielikumu. Metožu pamatā ir kompetentu starptautisko organizāciju (jo īpaši ESAO) atzītās un ieteiktās metodes.

Ja šādu metožu nav, izmantoti valsts standarti vai metodes, ko vienprātīgi atzīst zinātnieki. Parasti testēšana jāveic direktīvā noteiktajām vielām. Jāpievērš uzmanība tam, ka noteikšanas rezultātus var ietekmēt piemaisījumi.

Ja metodes, kas norādītas šajā pielikumā, neder kādas īpašības izpētei, iesniedzējam jāpamato citas izmantotās metodes izvēle.

Izmēģinājumus ar dzīvniekiem veic saskaņā ar attiecīgās valsts tiesību aktiem, ievērojot humānas attieksmes principus un pasaules jaunākos sasniegumus dzīvnieku labturības jomā.

No līdzvērtīgām pārbaudes metodēm izvēlas metodi, kas paredz pēc iespējas mazākus dzīvnieku upurus.

A DAĻA: FIZIKĀLI ĶĪMISKO ĪPAŠĪBU NOTEIKŠANAS METODES

A.1. KUŠANAS/SASALŠANAS TEMPERATŪRA

1. **METODE**

Aprakstīto metožu lielākās daļas pamatā ir ESAO Testēšanas norādījumi (1). Pamatprincipi aprakstīti izmantotās literatūras avotos (2) un (3).

1.1. IEVADS

Šeit aprakstītās metodes un ierīces izmantojamas vielu kušanas temperatūras noteikšanai neatkarīgi no to tīrības pakāpes.

Izvēloties noteikšanas metodi, jāņem vērā attiecīgās vielas īpašības. Rezultātā ierobežojošais faktors ir tas, vai viela ir viegli saberžama pulvera veidā, saberžama ar grūtībām, vai arī tā pulvera veidā nav saberžama.

Dažām vielām labāk noteikt sasalšanas vai sacietēšanas temperatūru, tāpēc šajā metodē iekļauti noteikumi par to noteikšanas kārtību.

Ja vielas īpašību dēļ nav ērti nosakāms neviens no iepriekšminētajiem rādītājiem, to vietā var noteikt sastingšanas temperatūru.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Kušanas temperatūra ir tāda temperatūra, kurā pie atmosfēras spiediena notiek fāžu pāreja no cieta agregātstāvokļa šķidrā, un šī temperatūra pilnīgi sakrīt ar sasalšanas temperatūru.

Tā kā daudzām vielām fāžu pāreja notiek zināmā temperatūras intervālā, to parasti norāda kušanas temperatūras intervāla veidā.

Mērvienību pārvēršana (K uz °C)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatūra pēc Celsija skalas, Celsija grādi (°C)

T: termodinamiskā temperatūra, kelvini (K)

1.3. STANDARTVIELAS

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

Dažas kalibrēšanas vielas ir uzskaitītas izmantotās literatūras sarakstā (4).

1.4. METODES PRINCIPS

Nosaka fāžu pārejas temperatūru (temperatūras intervālu) pārejai no cieta agregātstāvokļa šķidrā. Praktiski nosaka parauga kušanas/sasalšanas sākumu un beigas, paraugu sildot/dzesējot. Aprakstītas piecas dažādas metodes, konkrēti, kapilāra metode, metodes, kurās izmanto sildvirsmas, sasalšanas temperatūras noteikšanas metodes, termiskās analīzes metodes un sastingšanas temperatūras noteikšana (naftas eļļām).

Dažkārt kušanas temperatūras vietā var būt ērtāk noteikt sasalšanas temperatūru.

1.4.1. **Kapilāra metode**

1.4.1.1. *Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar šķidruma vannu*

Nelielu sīki sasmalcinātas vielas daudzumu ievieto kapilārā un sablīvē. Kapilāru kopā ar termometru silda un sildīšanas ātrumu noregulē tā, lai kušanas laikā temperatūra paaugstinātos ne vairāk par 1 K/min. Nosaka temperatūru kušanas sākumā un beigās.

1.4.1.2. *Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar metāla bloku*

Tāpat kā aprakstīts 1.4.1.1. punktā, izņemot to, ka kapilārs un termometrs ievietoti apsildāmā metāla blokā, un tos var novērot pa blokā izveidotām atverēm.

1.4.1.3. *Fotometriska noteikšana*

Paraugu, kas atrodas kapilārā, automātiski karsē metāla cilindrā. Caur cilindrā izurbtu caurumu gaismas kūli novirza uz vielu un tālāk uz precīzi kalibrētu fotoelementu. Kušanas laikā vielas lielākoties kļūst optiski caurspīdīgas. Uz fotoelementu krītošās gaismas intensitāte palielinās, un tas dod signālu ciparu indikatoram nolasīt sildīšanas kamerā ievietota platīna pretestības termometra rādījumu. Šī metode neder spilgti krāsainām vielām.

1.4.2. **Sildvirsmas**

1.4.2.1. *Koflera sildvirsma*

Koflera sildvirsma sastāv no diviem metāla stieņiem ar atšķirīgu siltuma vadītspēju, kurus karsē ar elektrības palīdzību, turklāt pats stienis ir izgatavots tā, lai temperatūras gradients visā tā garumā būtu gandrīz lineārs. Sildvirsmas temperatūru var mainīt no 283 līdz 573 K, un tā aprīkota ar īpašu temperatūras nolasīšanas ierīci, kam ir kustīga bultiņa un skala, kura pielāgota tieši šai sildvirsmai. Kušanas temperatūras noteikšanai vielu plānā slānī uzklāj tieši sildvirsmai. Pēc dažām sekundēm starp šķidro un cieto fāzi parādās skaidri redzama dalījuma līnija. Temperatūru pie dalījuma līnijas nolasa, novietojot bultiņu tieši pie līnijas.

1.4.2.2. *Kausējamais mikroskops*

Kušanas temperatūras noteikšanai, kurai vajadzīgs ļoti mazs vielas daudzums, izmanto vairāku veidu mikroskopus ar apsildāmu galdiņu. Parasti sildāmā galdiņa temperatūras mērīšanai izmanto jutīgu termopāri, tomēr dažkārt izmanto arī dzīvsudraba termometrus. Parasti kušanas temperatūras noteikšanas aparātam ar mikroskopu un sildāmu galdiņu ir sildīšanas kamera, kurā ir metāla plate, uz kura novieto priekšmetstikliņu ar paraugu. Metāla plates vidū ir atvere, caur kuru krīt gaisma no mikroskopa apgaismošanas spoguļa. Noteikšanas laikā kameru noslēdz ar stikla plāksnīti, lai izspiestu gaisu no parauga zonas.

Parauga sildīšanas ātrumu regulē ar reostatu. Augstas precizitātes instrumentos, veicot mērījumus optiski anizotropām vielām, var izmantot polarizētu gaismu.

1.4.2.3. *Meniska metode*

Šo metodi izmanto poliamīdiem.

Vizuāli nosaka temperatūru, kurā pārvietojas silikoneļļas menisks, kas atrodas starp sildvirsmu un segstiklu, ar kuru pārklāts poliamīda paraugs.

1.4.3. **Sasalšanas temperatūras noteikšanas metode**

Paraugu ievieto speciālā mēģenē, ko ievieto sasalšanas temperatūras noteikšanas aparātā. Dzesēšanas laikā paraugu pastāvīgi uzmanīgi maisa, un ar piemērotiem intervāliem nolasa temperatūru. Tiklīdz temperatūra vairāku nolasījumu laikā nemainās, šo temperatūru (kurai veic termometra kļūdas korekciju) reģistrē kā sasalšanas temperatūru.

Jāizvairās paraugu pārdzesēt, pastāvīgi uzturot līdzsvaru starp cieto un šķidro fāzi.

1.4.4. **Termiskā analīze**

1.4.4.1 *Diferenciālā termiskā analīze (DTA)*

Pēc šīs metodes reģistrē nosakāmās vielas un standartvielas temperatūras starpību atkarībā no temperatūras, uz vielu un standartvielu iedarbojoties ar vienu un to pašu regulējamas temperatūras programmu. Kad paraugam notiek fāžu pāreja ar entalpijas izmaiņām, par tām liecina endoterma (kušana) vai eksoterma (sasalšana) nobīde no reģistrētās temperatūras bāzes līnijas.

1.4.4.2 *Diferenciālā skenēšanas kolorimetrija (DSK)*

Pēc šīs metodes reģistrē nosakāmās vielas un standartvielas patērētās enerģijas starpību atkarībā no temperatūras, uz vielu un standartvielu iedarbojoties ar vienu un to pašu regulējamas temperatūras programmu. Šī ir enerģija, kas vajadzīga, lai iestātos temperatūras nulles starpība starp nosakāmo vielu un standartvielu. Kad paraugam notiek fāžu pāreja ar entalpijas izmaiņām, par tām liecina endoterma (kušana) vai eksoterma (sasalšana) nobīde no reģistrētās siltumenerģija plūsmas bāzes līnijas.

1.4.5. **Sastingšanas temperatūra**

Šī metode izstrādāta naftas eļļu analīzēm un ir piemērota eļļveida vielām ar zemu kušanas temperatūru.

Paraugu vispirms sasilda, un pēc tam ar noteiktu ātrumu atdzesē, ik pēc 3K pārbaudot plūstamību. Par sastingšanas temperatūru uzskata un reģistrē zemāko temperatūru, kurā novērojama vielas kustība.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Dati par kušanas temperatūras/kušanas temperatūras intervāla noteikšanas metožu lietojamību un precizitāti apkopoti turpmāk tabulā:

TABULA: METOŽU LIETOJAMĪBA

A. Kapilāra metodes

Mērīšanas metode	Vielas, kuras var saberzt pulverī	Vielas, kuras nevar viegli saberzt pulverī	Temperatūras diapazons	Novērtētā precizitāte [1]	Standartmetode
Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar šķidruma vannu	jā	tikai daļa	273-573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar metāla bloku	jā	tikai daļa	293 līdz >573K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Fotometriska noteikšana	jā	Der dažādām vielām, izmantojot papildierīces	253-573 K	± 0,5 K	

[1] Atkarībā no instrumenta tipa un vielas tīrības

B. Sildvirsmas metodes un sasalšanas temperatūras noteikšana

Mērīšanas metode	Vielas, kuras var saberzt pulverī	Vielas, kuras nevar viegli saberzt pulverī	Temperatūras diapazons	Novērtētā precizitāte (1)	Standartmetode
Koflera sildvirsma	jā	nē	283 līdz>573K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Kausējamais mikroskops	jā	tikai daļa	273 līdz>573K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniska metode	nē	Der tikai poliamīdiem	293 līdz>573K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Sasalšanas temperatūras noteikšanas metodes	jā	jā	223 līdz 573 K	± 0,5 K	piem., BS 4695

(1) Atkarībā no instrumenta tipa un vielas tīrības

C. Termiskā analīze

Mērīšanas metode	Vielas, kuras var saberzt pulverī	Vielas, kuras nevar viegli saberzt pulverī	Temperatūras diapazons	Novērtētā precizitāte (1)	Standartmetode
Diferenciālā termiskā analīze	jā	jā	173 līdz 1273 K	līdz 600 K± 0,5 K līdz 1 273 K± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferenciālā skenēšanas kolorimetrija	jā	jā	173 līdz 1273 K	līdz 600 K ± 0,5 K līdz 1 273 K± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Atkarībā no instrumenta tipa un vielas tīrības

D. Sastingšanas temperatūra

Mērīšanas metode	Vielas, kuras var saberzt pulverī	Vielas, kuras nevar viegli saberzt pulverī	Temperatūras diapazons	Novērtētā precizitāte (1)	Standartmetode
Sastingšanas temperatūra	naftas eļļām un eļļveida vielām	naftas eļļām un eļļveida vielām	223 līdz 543 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Atkarībā no instrumenta tipa un vielas tīrības

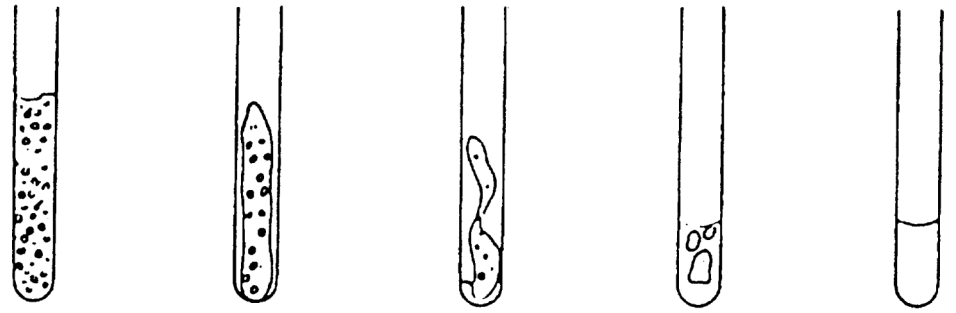
1.6. METOŽU APRAKSTI

Gandrīz visu šeit minēto metožu apraksts ir iekļauts starptautiskos un atsevišķu valstu standartos (skat. 1. papildinājumu).

1.6.1. **Kapilāra metodes**

Lēni paaugstinot temperatūru, smalka pulvera veidā sasmalcinātām vielām parasti novērojamas 1. attēlā parādītās kušanas stadijas.

1. attēls



A stadija (Kušanas sākums): sīki pilieni vienmērīgi izvietojas uz kapilāra iekšējās sienas.

B stadija kušanas sarukuma dēļ starp paraugu un kapilāra sieniņu izveidojas sprauga.

C stadija sarukušais paraugs sāk slīdēt uz leju un pārvēršas šķidrumā.

D stadija uz virsmas izveidojas menisks, tomēr ievērojams parauga daudzums nav izkusis.

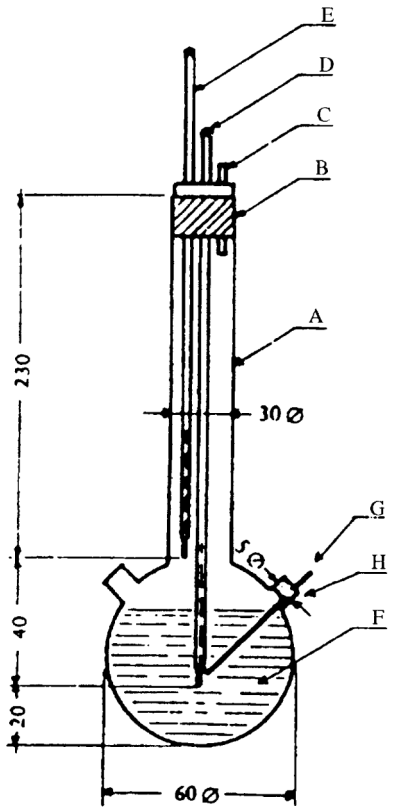
E stadija (Kušanas beigas): nav cietu neizkusušu daļiņu.

Nosakot kušanas temperatūru, reģistrē kušanas sākumā un beigās novēroto temperatūru.

1.6.1.1. *Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar šķidruma vannu*

Standartizēts kušanas temperatūras noteikšanas aparāts parādīts 2. att. (JIS K 0064); visi izmēri ir milimetros.

2. attēls



A: Mērījumu trauks
B: Aizbāznis
C: Ventilācijas atvere
D: Termometrs
E: Papildu termometrs
F: Vannas šķidrums
G: Stikla kapilārs, 80 līdz 100 mm garš, 1,0 ± 0,2 mm iekšējais diametrs, 0,2 līdz 0,3 mm sieniņu biezums
H: Sānu caurule

Vannas šķidrums

Izvēlas piemērotu šķidrumu. Šķidrumu izvēlas atkarībā no nosakāmās kušanas temperatūras, piemēram, vazelīneļļu kušanas temperatūrām līdz 473 K, silikoneļļu temperatūrām līdz 573 K.

Kušanas temperatūru noteikšanai, kuras ir lielākas par 523 K, var izmantot maisījumu, kas sastāv no trijām masas daļām sērskābes un divām daļām kālija sulfāta. Izmantojot šāda veida maisījumus, jāievēro visi vajadzīgie piesardzības pasākumi.

Termometrs

Jāizmanto tikai tādi termometri, kuri atbilst šādos vai tiem ekvivalentos standartos noteiktajām prasībām:

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

Procedūra

Sausu vielu smalki saberž piestā un ievieto kapilārā, kuram viens gals ir aizkausēts, pēc sablīvēšanas tai jāaizņem aptuveni 3 mm no kapilāra garuma. Lai iegūtu vienveidīgu parauga blīvumu, kapilāru iemet apmēram 700 mm garā stikla caurulē, kas stāvus novietota uz pulksteņstikla.

Piepildīto kapilāru ievieto vannā tā, lai termometra dzīvsudraba rezervuāra vidusdaļa pieskartos kapilāram vietā, kurā atrodas paraugs. Parasti kapilāru aparātā ievieto tad, kad vannas šķidruma temperatūra ir par apmēram 10 K zemāka par nosakāmo kušanas temperatūru.

Šķidruma temperatūru vannā paaugstina ar ātrumu apmēram 3 K/min. Šķidrums vannā jāmaisa. Kad temperatūra ir aptuveni 10 K zem kušanas temperatūras, tā nedrīkst pieaugt ātrāk par 1 K/min.

Aprēķins

Kušanas temperatūru aprēķina šādi:

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

kur:

T = koriģētā kušanas temperatūra (K);

T_D = D termometra temperatūras rādījums (K);

T_E = E termometra temperatūras rādījums (K);

n = to D termometra dzīvsudraba stabiņa iedaļu skaits, kuras atrodas virs šķidruma.

1.6.1.2. *Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar metāla bloku*

Aprīkojums

Iekārtā ietilpst:

— cilindrisks metāla bloks ar dobu augšdaļu, kas veido kameru (sk. 3. att.),

— metāla aizbāznis ar divām vai vairākām atverēm, caur kurām metāla blokā ievieto kapilārus,

— metāla bloka sildīšanas sistēma, piemēram, blokā ievietota elektriskā pretestība,

— reostats elektriskās jaudas regulēšanai, ja izmanto elektrisko sildīšanu,

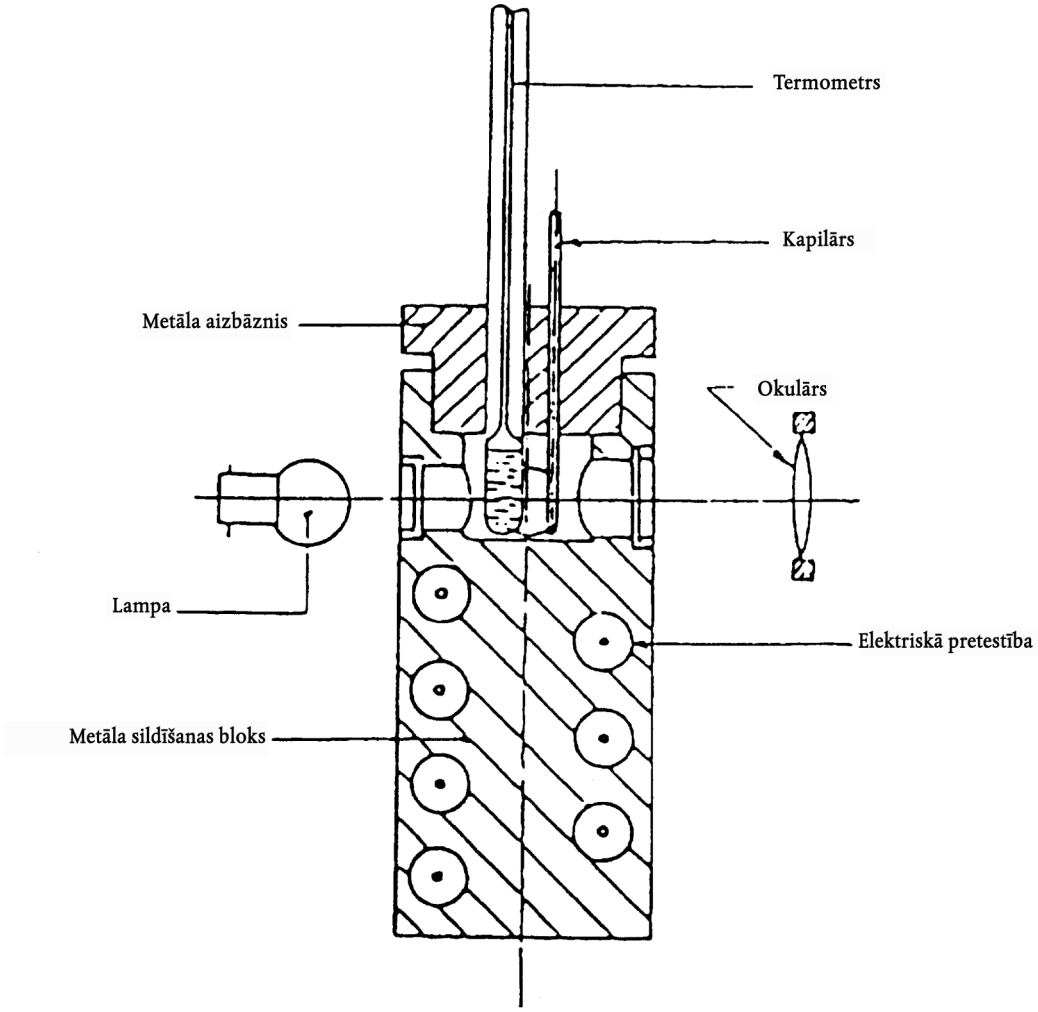
— četri termiski izturīga stikla logi kameras pretējās sānu sienās taisnā leņķī vienam pret otru. Pie viena no šiem logiem ir okulārs kapilāra novērošanai. Pārējos trīs logus izmanto iekšējās telpas apgaismošanai ar lampām;

— vienā galā noslēgts kapilārs no karstumizturīga stikla (sk. 1.6.1.1.).

Termometrs

Sk. 1.6.1.1. punktā minētos standartus. Var izmantot arī termoelektriskās mērierīces ar līdzīgu precizitāti.

3. attēls



1.6.1.3. *Fotometriska noteikšana*

Aprīkojums un procedūra

Iekārta sastāv no metāla kameras ar automātisku apsildes sistēmu. Trīs kapilārus aizpilda, kā tas norādīts 1.6.1.1. punktā, un ievieto kamerā.

Aparatūras kalibrēšanai iespējams izmantot lineāru temperatūras paaugstināšanos ar vairākiem ātrumiem, un vajadzīgo temperatūras lineāro paaugstināšanos elektriski regulē ar iepriekš izraudzītu ātrumu. Reģistrācijas ierīces rāda faktisko krāsns temperatūru un kapilāros esošo vielu temperatūru.

1.6.2. **Sildvirsmas**

1.6.2.1. *Koflera sildvirsma*

Sk. papildinājumu.

1.6.2.2. *Kausējamais mikroskops*

Sk. papildinājumu.

1.6.2.3. *Meniska metode (poliamīdiem)*

Sk. papildinājumu.

Sildīšanas ātrumam kušanas temperatūras diapazonā ap kušanas temperatūru jābūt mazākam par 1 K/min.

1.6.3. **Sasalšanas temperatūras noteikšanas metodes**

Sk. papildinājumu.

1.6.4. **Termiskā analīze**

1.6.4.1. *Diferenciālā termiskā analīze*

Sk. papildinājumu.

1.6.4.2. *Diferenciālā skenēšanas kolorimetrija*

Sk. papildinājumu.

1.6.5. **Sastingšanas temperatūras noteikšana**

Sk. papildinājumu.

2. **IEGŪTIE DATI**

Atsevišķos gadījumos jāveic termometra kalibrēšana.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— lietotā metode,

— vielas precīzs apraksts (identifikācija un tīrība), iepriekšēja attīrīšana, ja tiek veikta,

— precizitātes novērtējums.

Par kušanas temperatūru uzdod divu tādu mērījumu rezultātu vidējo vērtību, kuri ir novērtētās precizitātes (sk. tabulā) robežās.

Ja temperatūras starpība kušanas sākumā un beigās ir metodes precizitātes robežās, par kušanas temperatūru uzdod temperatūru, kas noteikta kušanas beigu stadijā; pārējos gadījumos uzdod abas temperatūras, kas noteiktas kušanas sākuma un beigu stadijās.

Ja vielas sadalās vai sublimējas, nesasniedzot kušanas temperatūru, uzdod temperatūru, kurā novēro minētās parādības.

Jāiekļauj visa informācija un piezīmes, kas saistītas ar rezultātu interpretāciju, jo īpaši attiecībā uz vielas piemaisījumiem un tās agregātstāvokli.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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

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

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

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

Papildinājums

Sīkāki tehniski dati atrodami šādos standartos.

1. **Kapilāra metodes**

1.1. Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar šķidruma vannu

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

1.2. Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar metāla bloku

DIN 53736	*Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen*
ISO 1218 (E)	*Plastics — poly amides — determination of "melting point"*

2. **Sildvirsmas**

2.1. Koflera sildvirsma

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

2.2. Kausējamais mikroskops

DIN 53736	*Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.*

2.3. Meniska metode (poliamīdiem)

ISO 1218 (E)	*Plastics — polyamides — determination of 'melting point'*
ANSI/ASTM D 2133-66	*Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials*
NF T 51-050	*Résines de polyamides. Détermination du "point de fusion" Méthode du ménisque*

3.	**Sasalšanas temperatūras noteikšanas metodes**	
	BS 4633	*Method for the determination of crystallizing point*
	BS 4695	*Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)*
	DIN 51421	*Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen*
	ISO 2207	*Cires de pétrole: détermination de la température de figeage*
	DIN 53175	*Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren*
	NF T 60-114	*Point de fusion des paraffines*
	NF T 20-051	*Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)*
	ISO 1392	*Method for the determination of the freezing point*
4.	**Termiskā analīze**	
4.1.	Diferenciālā termiskā analīze	
	ASTM E 537-76	*Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis*
	ASTM E 473-85	*Standard definitions of terms relating to thermal analysis*
	ASTM E 472-86	*Standard practice for reporting thermoanalytical data*
	DIN 51005	*Thermische Analyse, Begriffe*
4.2.	Diferenciālā skenēšanas kolorimetrija	
	ASTM E 537-76	*Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis*
	ASTM E 473-85	*Standard definitions of terms relating to thermal analysis*
	ASTM E 472-86	*Standard practice for reporting thermoanalytical data*
	DIN 51005	*Thermische Analyse, Begriffe*
5.	**Sastingšanas temperatūras noteikšana**	
	NBN 52014	*Echantillonnage et analyse des produits du petrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt*
	ASTM D 97-66	*Standard test method for pour point of petroleum oils*
	ISO 3016	*Petroleum oils — Determination of pour point.*

A.2. VIRŠANAS TEMPERATŪRA

1. **METODE**

Aprakstīto metožu lielākās daļas pamatā ir ESAO Testēšanas norādījumi (1). Pamatprincipi aprakstīti izmantotās literatūras avotos (2) un (3).

1.1. IEVADS

Šeit aprakstītās metodes un iekārtas var izmantot šķidrām vielām un vielām ar zemu kušanas temperatūru, ja ar tām par viršanas temperatūru zemākā temperatūrā nenotiek ķīmiskas reakcijas (piemēram: autooksidēšanās, pārgrupēšanās, sadalīšanās, u.c.). Šīs metodes piemērotas gan attīrītiem, gan neattīrītiem šķidrumiem.

Priekšroka dodama metodēm, kurās izmanto fotoelektrisko detektēšanu un termisko analīzi, jo pēc šīm metodēm var noteikt gan kušanas temperatūru, gan viršanas temperatūru. Turklāt mērījumus var veikt automātiskā režīmā.

"Dinamiskajai metodei" ir priekšrocības, kas saistās ar iespēju to izmantot arī tvaika spiediena noteikšanai, un nav jāveic viršanas temperatūras korekcija pēc atmosfēras spiediena normālos apstākļos (101,325 kPa), jo normālo atmosfēras spiedienu var noregulēt mērīšanas laikā ar manostatu.

Piezīmes:

Piemaisījumu ietekme uz viršanas temperatūras noteikšanas rezultātu galvenokārt atkarīga no piemaisījumu rakstura. Ja paraugā ir gaistoši piemaisījumi, kuri var ietekmēt viršanas temperatūras noteikšanas rezultātus, vielu pirms tam var attīrīt.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Parasti viršanas temperatūru definē kā temperatūru, kurā šķidruma tvaika spiediens ir 101,325kPa.

Ja viršanas temperatūru nenosaka normālā atmosfēras spiedienā, temperatūras izmaiņu aprakstīšanai atkarībā no spiediena var izmantot Klauziusa-Klapeirona vienādojumu:

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

kur:

p = vielas tvaika spiediens, paskālos

ΔH_v = vielas iztvaikošanas siltums, J mol^{-1}

R = universālā molārā gāzu konstante = 8 314 J mol^{-1} K^{-1}

T = termodinamiskā temperatūra, K

Viršanas temperatūru uzdod kopā ar atmosfēras spiedienu tās noteikšanas laikā.

Pārvēršana

Spiediens (mērvienības: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

("bar" var joprojām izmantot, lai gan tas nebūtu ieteicams)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(mērvienības "mm Hg" un "Torr" izmantot nav pieļaujams).

1 atm = standarta atmosfēra =101 325 Pa

(mērvienību "atm" izmantot nav pieļaujams).

Temperatūra (mērvienības: K)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatūra pēc Celsija skalas, Celsija grādi (°C)

T: termodinamiskā temperatūra, kelvini (K)

1.3. STANDARTVIELAS

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

Dažas kalibrēšanas vielas ir minētas papildinājumā iekļauto metožu aprakstā.

1.4. METODES PRINCIPS

Piecas viršanas temperatūras (viršanas temperatūras intervāla) noteikšanas metodes pamatojas uz viršanas temperatūras mērīšanu, bet divām citām izmanto termisko analīzi.

1.4.1. **Noteikšana ar ebulioskopu**

Ebulioskopus sākotnēji izveidoja molekulmasas noteikšanai pēc temperatūras paaugstināšanās, taču tie ir piemēroti arī precīzas viršanas temperatūras noteikšanai. Ļoti vienkārša iekārta ir aprakstīta standartā ASTM D 1120-72 (sk. papildinājumu). Šajā iekārtā līdzsvara apstākļos šķidrumu silda līdz viršanai atmosfēras spiedienā.

1.4.2. **Dinamiskā metode**

Pēc šīs metodes vārīšanās laikā ar piemērotu termometru mēra tvaika kondensācijas temperatūru attecē. Pēc šīs metodes var mainīt spiedienu.

1.4.3. **Viršanas temperatūras noteikšana ar destilācijas metodi**

Ar šo metodi veic tvaika kondensācijas temperatūras mērījumus šķidruma destilācijas laikā un nosaka destilāta daudzumu.

1.4.4. **Sivolobova metode**

Paraugu silda mēģenē, kas iegremdēta šķidrumā sildīšanas vannā. Tajā pašā mēģenē ar paraugu iegremdē aizkausētu kapilāru ar gaisa burbuli apakšējā galā.

1.4.5. **Fotometriska noteikšana**

Saskaņā ar Sivolobova principu automātiski veic fotoelektriskus mērījumus gaisa burbuļu celšanās brīdī.

1.4.6. **Diferenciālā termiskā analīze**

Pēc šīs metodes reģistrē nosakāmās vielas un standartvielas temperatūras starpību atkarībā no temperatūras, uz vielu un standartvielu iedarbojoties ar vienu un to pašu regulējamas temperatūras programmu. Kad paraugam notiek fāžu pāreja ar entalpijas izmaiņām, par tām liecina endoterma (viršana) nobīde no reģistrētās temperatūras bāzes līnijas.

1.4.7. **Diferenciālā skenēšanas kolorimetrija**

Pēc šīs metodes reģistrē nosakāmās vielas un standartvielas patērētās enerģijas starpību atkarībā no temperatūras, uz vielu un standartvielu iedarbojoties ar vienu un to pašu regulējamas temperatūras programmu. Šī ir enerģija, kas vajadzīga, lai iestātos temperatūras nulles starpība starp nosakāmo vielu un standartvielu. Kad paraugam notiek fāžu pāreja ar entalpijas izmaiņām, par tām liecina endoterma (viršana) nobīde no reģistrētās siltumenerģijas plūsmas bāzes līnijas.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Dati par viršanas temperatūras/viršanas temperatūras intervāla noteikšanas metožu lietojamību un precizitāti apkopoti 1. tabulā.

1. TABULA. METOŽU SALĪDZINĀJUMS

Mērīšanas metode	Novērtētā precizitāte	Standarti
Ebulioskopija	± 1,4 K (līdz 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (līdz 600 K) (1) (2)	ASTMD 1 120-72 (1)
Dinamiskā metode	± 0,5 K (līdz 600 K) (2)	
Destilācijas metode (viršanas diapazons)	± 0,5 K (līdz 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591 771
Sivolobova metode	± 2 K (līdz 600 K) (2)	
Fotometriska noteikšana	± 0,3 K (373 K) (2)	
Diferenciālā termiskā analīze	± 0,5 K (līdz 600 K) ± 2,0 K (līdz 1 273 K)	ASTM E 537-76
Diferenciālā skenēšanas kolorimetrija	± 0,5 K (līdz 600 K) ± 2,0 K (līdz 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Šāda precizitāte ir tikai noteikšanai ar vienkāršu ierīci, kura aprakstīta, piemēram, standartā ASTM D 1 120-72; to var uzlabot, izmantojot pilnīgākas ebulioskopijas iekārtas.
(2) Tikai tīru vielu viršanas temperatūras noteikšanai. Citos gadījumos šīs metodes izmantošana ir jāpamato.

1.6. METOŽU APRAKSTI

Dažu šeit minēto metožu apraksts ir iekļauts starptautiskos un atsevišķu valstu standartos (sk. papildinājumu).

1.6.1. **Ebulioskopija**

Sk. papildinājumu.

1.6.2. **Dinamiskā metode**

Sk. tvaika spiediena noteikšanas A.4. metodi.

Reģistrē viršanas temperatūru, kas novērota 101,325 kPa spiedienā.

1.6.3. **Destilācijas metode (viršanas temperatūras intervāls)**

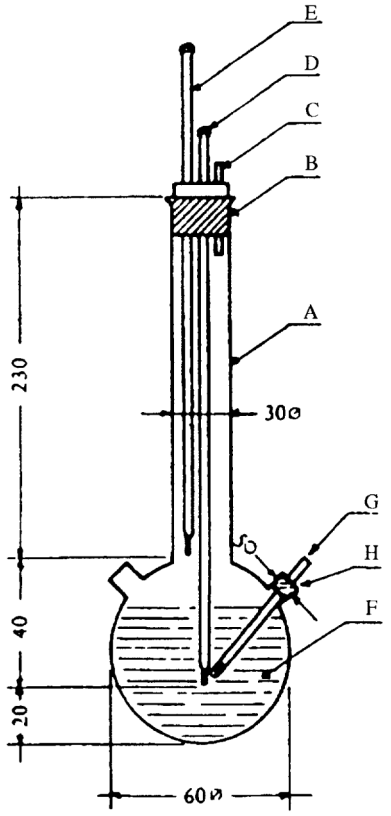
Sk. papildinājumu.

1.6.4. **Sivolobova metode**

Apmēram 5 mm diametra parauga mēģenē ievietotu paraugu silda aparātā līdz viršanas temperatūrai (1. attēls).

Standartizēts kušanas temperatūras noteikšanas aparāts parādīts 1. att. (JIS K 0064) (aparāts izgatavots no stikla, visi izmēri milimetros).

1. attēls



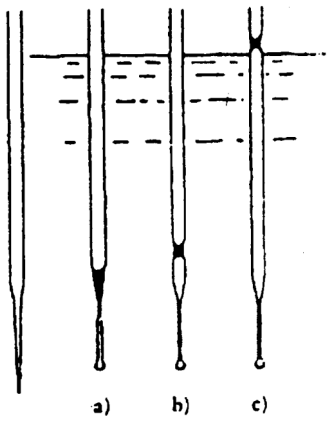
A: Mērīšanas trauks
B: Aizbāznis
C: Ventilācijas atvere
D: Termometrs
E: Papildu termometrs
F: Vannas šķidrums
G: Parauga mēģene ar ārējo diametru līdz 5 mm; tajā ievietots kapilārs – apmēram 100 mm garš, ar iekšējo diametru apmēram 1 mm, un sieniņu biezumu no 0,2 līdz 0,3 mm
H: Sānu caurule

Caurulē ar paraugu ievieto kapilāru (viršanas kapilāru), kas aizkausēts apmēram 1 cm attālumā no apakšējā gala. Pārbaudāmās vielas līmenim jābūt tādam, lai kapilāra aizkausētais posms atrastos zem šķidruma virsmas. Cauruli ar paraugu un viršanas kapilāru piestiprina pie termometra ar tievu gumiju vai šim nolūkam izmanto sānu stiprinājumu (skat. 2. attēlu).

2. attēls
Sivolobova metodes princips



3. attēls
Modificētās metodes princips



Vannas šķidrumu izvēlas atkarībā no viršanas temperatūras. Temperatūrām līdz 573 K var izmantot silikoneļļu. Šķidro parafīnu var izmantot tikai temperatūrām līdz 473 K. Sākumā šķidrums vannā jāsilda ar ātrumu 3 K/min. Šķidrums vannā jāmaisa. Apmēram 10 K zemāk par sagaidāmo viršanas temperatūru sildīšanas intensitāti samazina tā, lai temperatūra paaugstinātos ne vairāk par 1 K/min. Tuvojoties viršanas temperatūrai, viršanas kapilārā sākas strauja burbuļu veidošanās.

Viršanas temperatūra ir temperatūra, kurā sākot dzesēšanu, burbuļu veidošanās apstājas, un kapilārā sākas strauja šķidruma līmeņa celšanās. Attiecīgais termometra rādījums atbilst vielas viršanas temperatūrai.

Pēc modificētās metodes (3. att.) viršanas temperatūru nosaka, izmantojot kušanas temperatūras noteikšanai paredzēto kapilāru. To izstiepj, izveidojot apmēram 2 cm garu smailu galu (a), un tajā iesūc nelielu daudzumu parauga. Kapilāra vaļējo smailo galu aizkausē, atstājot pašā galā mazu gaisa burbuli. Sildot kušanas temperatūras noteikšanas aparātā (b), gaisa burbulis izplešas. Viršanas temperatūra atbilst temperatūrai, kurā viela sasniedz vannas šķidruma virsmu (c).

1.6.5. **Fotometriska noteikšana**

Kapilāru ar paraugu karsē, tam atrodoties sildāmā metāla blokā.

Caur attiecīgām atverēm blokā gaismas kūli caur vielu novada tālāk uz precīzi kalibrētu fotoelementu.

Paaugstinoties parauga temperatūrai, no viršanas kapilāra izdalās atsevišķi gaisa burbuļi. Sasniedzot viršanas temperatūru, ievērojami palielinās izdalījušos burbulīšu daudzums. Tas ietekmē gaismas intensitāti, ko reģistrē fotoelements, un mērierīce, kura nolasa platīna pretestības termometra temperatūru blokā, saņem stopsignālu.

Šī metode ir īpaši noderīga, jo tā ļauj veikt mērījumus, kad temperatūra ir zemāka par istabas temperatūru, līdz 253,15 K (- 20 °C), nemainot pašu iekārtu. Aparāts tikai jāievieto vannā ar dzesēšanas šķidrumu.

1.6.6. **Termiskā analīze**

1.6.6.1. *Diferenciālā termiskā analīze*

Sk. papildinājumu.

1.6.6.2. *Diferenciālā skenēšanas kolorimetrija*

Sk. papildinājumu.

2. **DATI**

Ja novirzes no normālā atmosfēras spiediena ir nelielas (ne vairāk par ± 5 kPa), viršanas temperatūru standartizē līdz T_n pēc Sidneja-Janga vienādojuma:

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

kur:

Δp = (101,325 - p) [ievērot zīmi]

p = gaisa spiediena mērījums (kPa)

f_T = viršanas temperatūras izmaiņas atkarībā no temperatūras K/kPa

T = izmērītā viršanas temperatūra (K)

T_n = viršanas temperatūra (K), kas koriģēta, ņemot vērā normālu atmosfēras spiedienu.

Temperatūras korekcijas koeficienti f, j un aproksimēšanas vienādojumi daudzām vielām norādīti iepriekšminētajos starptautiskajos un valstu standartos.

Piemēram, standartā DIN 53171 aplūkotās metodes aprakstā minēti šādi korekcijas koeficienti krāsu šķīdinātājiem.

2. TABULA: TEMPERATŪRAS KOREKCIJAS KOEFICIENTI f_T

Temperatūra T (K)	3. Korekcijas koeficients 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. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— lietotā metode,

— vielas precīzs apraksts (identifikācija un tīrība), iepriekšēja attīrīšana, ja tiek veikta,

— precizitātes novērtējums.

Par viršanas temperatūru uzdod divu tādu mērījumu rezultātu vidējo vērtību, kuri ir novērtētās precizitātes (sk. 1. tab.) robežās.

Norāda spiedienu kPa, kādā mērīta viršanas temperatūra un noteikta tās vidējā vērtība. Spiedienam jābūt iespējami tuvu normālajam atmosfēras spiedienam.

Jāiekļauj jebkura informācija un piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju, jo īpaši par vielas piemaisījumiem un tās agregātstāvokli.

4. **IZMANTOTĀ 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, Burferworths, London 1975,volume II.

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

Papildinājums

Papildu tehniskie dati ir ietverti, piemēram, šādos standartos.

1. **Ebulioskopija**

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

2. **Destilācijas metode (viršanas diapazons)**

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

3. **Diferenciālā termiskā analīze un diferenciālā skenēšanas kolorimetrija**

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

A.3. RELATĪVAIS BLĪVUMS

1. **METODE**

Aplūkotās metodes balstās uz ESAO Testēšanas norādījumiem (1). Pamatprincipi aprakstīti literatūras avotā (2).

1.1. IEVADS

Aprakstītās metodes relatīvā blīvuma noteikšanai ir derīgas cietām vielām un šķidrumiem neatkarīgi no tīrības pakāpes. Izmantojamās metodes ir uzskaitītas 1. tabulā.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Relatīvais blīvums D_4^{20} cietām vielām un šķidrumiem ir vielas tilpuma masas pie 20 °C un tāda paša tilpuma ūdens masas pie 4 °C attiecība. Relatīvais blīvums ir bezdimensiju lielums.

Vielas blīvums ρ ir tās masas m un tilpuma v attiecība.

Blīvuma ρ mērvienība SI sistēmā ir kg/m^3.

1.3. STANDARTVIELAS (1) (3)

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

1.4. METOŽU PRINCIPS

Izmanto četru veidu metodes

1.4.1. **Flotācijas metodes**

1.4.1.1. *Areometrs* (šķidrām vielām)

Pietiekami precīzi un ātri blīvumu var noteikt ar iegremdējamiem areometriem, pēc kuriem šķidruma blīvumu nolasa pēc areometra graduētās daļas skalas iegrimes.

1.4.1.2. *Hidrostatiskie svari* (šķidrumiem un cietām vielām)

Blīvuma noteikšanai var izmantot nosakāmās vielas masas starpību, kas noteikta gaisā un piemērotā šķidrumā (piemēram, ūdenī).

Cietām vielām blīvuma mērījumu rezultāti attiecināmi tikai uz vienu konkrētu paraugu. Šķidrumu blīvuma noteikšanai zināma tilpuma (v) vispirms nosver gaisā un tad šķidrumā.

1.4.1.3. *Iegremdētā ķermeņa metode* (šķidrumiem) (4)

Ar šo metodi šķidruma blīvumu nosaka pēc svērumu starpības pirms un pēc zināma tilpuma ķermeņa iegremdēšanas šķidrumā, kura blīvums jānosaka.

1.4.2. **Piknometriskās metodes**

Cietām vielām un šķidrumiem var izmantot dažādas formas un zināma tilpuma piknometrus. Blīvumu aprēķina pēc pilna un tukša piknometra masas starpības, ņemot vērā tā tilpumu.

1.4.3. **Piknometrs salīdzināšanai ar gaisu** (cietām vielām)

Jebkuras formas cietvielas blīvumu istabas temperatūrā var noteikt ar gāzu salīdzināšanas piknometru. Vielas tilpumu mēra gaisā vai inertā gāzē, to ievietojot kalibrētā cilindrā ar mainīgu tilpumu. Lai aprēķinātu blīvumu, pēc tilpuma mērījumiem paraugs vienreiz jānosver.

1.4.4. **Oscilāciju densimetrs** (5) (6) (7)

Šķidrumu blīvumu var mērīt ar oscilāciju densimetru. U-veida caurules mehānisko oscilatoru iesvārsta ar oscilatora rezonanses frekvenci, kas ir atkarīga no tā masas. Tajā ievadot paraugu, mainās oscilatora rezonanses frekvence. Šo ierīci kalibrē, izmantojot divus šķidrumus ar zināmu blīvumu. Ieteicams izvēlēties tādas vielas, kuru blīvums aptver visu mērījumu diapazonu.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Tabulā apkopotas dažādas metodes, ko izmanto relatīvā blīvuma noteikšanai, norādot to izmantošanas iespējas.

1.6. METOŽU APRAKSTI

Piemēru veidā papildinājumā minētajos standartos atrodama papildus tehniskā informācija.

Noteikšana jāveic 20 °C temperatūrā, izdarot vismaz divus mērījumus.

2. **IEGŪTIE DATI**

Sk. standartus.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— lietotā metode,

— vielas precīzs apraksts (identifikācija un tīrība), iepriekšēja attīrīšana, ja tiek veikta.

Relatīvais blīvums D_4^{20} jāuzdod saskaņā ar 1.2. punktu, norādot vielas agregātstāvokli.

Jāiekļauj visa informācija un piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju, jo īpaši par vielas piemaisījumiem un tās agregātstāvokli.

TABULA: METOŽU LIETOJAMĪBA

Mērīšanas metode	Blīvums		4. Maksimāli iespējamā dinamiskā viskozitāte	Standartmetode
	cietvielas	šķidrumi		
1.4.1.1. Areometrs		jā	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Hidrostatiskie svari				
a) cietām vielām	jā			ISO 1183 (A)
b) šķidrumiem		jā	5 Pa s	ISO 901 un 758
1.4.1.3. Iegremdētā ķermeņa metode		jā	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknometrs				ISO 3507
a) cietām vielām	jā			ISO 1183(B), NF T 20-053
b) šķidrumiem		jā	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Piknometrs salīdzināšanai ar gaisu	jā			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Oscilāciju densimetrs		jā	5 Pa s	

4. **IZMANTOTĀ 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 properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

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

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

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

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

Papildinājums

Papildu tehniskie dati ir, piemēram, šādos standartos:

1. **FLOTĀCIJAS METODES**

1.1. Areometrs

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

1.2. Hidrostatiskie svari

Cietām vielām	
ISO 1183	A metode: *Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics*
NF T 20-049	*Chemical products for industrial use — Determination of the density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method*
ASTM-D-792	*Specific gravity and density of plastics by displacement*
DIN 53479	*Testing of plastics and elastomers; determination of density*
Šķidrumiem	
ISO 901	*ISO 758*
DIN 51757	*Testing of mineral oils and related materials; determination of density*
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 un ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	*Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method*
BS 4714	*Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method*

1.3. Iegremdētā ķermeņa metode

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

2. **PIKNOMETRA METODES**

2.1. Šķidrumiem

ISO 3507	*Pycnometers*
ISO 758	*Liquid chemical products; determination of density at 20 °C*
DIN 12797	*Gay-Lussac pycnometer* (ne pārāk viskoziem negaistošiem šķidrumiem)
DIN 12798	*Lipkin pycnometer* (šķidrumiem, kuru kinemātiskā viskozitāte ir mazāka par $100 \cdot 10^{-6}$ m^2 s^{-1} pie 15 °C)

DIN 12800	*Pyknometer nach Sprengel (šķidrumiem skat. DIN 12798)*
DIN 12801	*Reischauer pycnometer* (šķidrumiem, kuru kinemātiskā viskozitāte ir mazāka par $100 \cdot 10^{-6}$ m^2 s^{-1} pie 20 °C, piemērojama jo īpaši ogļūdeņražiem un and ūdens šķīdumiem, kā arī šķidrumiem ar augstāku with higher tvaika spiedienu, aptuveni 1 bar pie 90 °C)
DIN 12806	*Hubbard pycnometer* (visu veidu viskoziem šķidrumiem, kuriem tvaika spiediens nav pārāk augsts, jo īpaši krāsām, lakām un bitumenam)
DIN 12807	*Pyknometer nach Bingham* (šķidrumiem skat. *DIN 12801)*
DIN 12808	*Jaulmes pycnometer* (jo īpaši etanola un ūdens maisījumam)
DIN 12809	*Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube* (ne pārāk viskoziem šķidrumiem)
DIN 53217	*Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer*
DIN 51757	7. punkta: *Testing of mineral oils and related materials; determination of density*
ASTM D 297	15. iedaļa: *Rubber products — chemical analysis*
ASTM D 2111	*Method C: Halogenated organic compounds*
BS 4699	*Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)*
BS 5903	*Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary— stoppered pycnometer method*
NF T 20-053	*Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method*

2.2. Cietām vielām

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

3. **PIKNOMETRS SALĪDZINĀŠANAI AR GAISU**

DIN 55990	*3. daļa: Prüfung von Anstrichstoffen und ahnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte*
DIN 53243	*Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung*

A.4. TVAIKA SPIEDIENS

1. **METODE**

Aprakstīto metožu lielākās daļas pamatā ir ESAO Testēšanas norādījumi (1). Pamatprincipi aprakstīti literatūras avotos (2) un (3).

1.1. IEVADS

Pirms noteikt tvaika spiedienu, ir lietderīgi iegūt sākotnēju informāciju par vielas struktūru, kušanas temperatūru un vārīšanās temperatūru.

Nav nevienas mērīšanas metodes, kura būtu izmantojama visā tvaika spiediena diapazonā. Tāpēc tvaika spiediena mērīšanai robežās no < 10^{-4} līdz 10^{5} Pa tiek ieteiktas vairākas metodes.

Tvaika spiedienu parasti ietekmē piemaisījumi, ietekmes lielums galvenokārt ir atkarīgs no piemaisījumu rakstura.

Ja paraugā ir gaistoši piemaisījumi, kuri var ietekmēt tvaika spiediena noteikšanas rezultātus, vielu pirms tam var attīrīt. Var būt vajadzīgs norādīt tvaika spiedienu tehniskiem produktiem.

Dažās šeit aprakstītajās metodēs izmanto aparatūru ar metāla detaļām; tas jāņem vērā, nosakot korozīvu vielu tvaika spiedienu.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Vielas tvaika spiedienu definē kā piesātināta tvaika spiedienu virs cietas vielas vai šķidruma. Iestājoties termodinamiskajam līdzsvaram, tīras vielas tvaika spiediens ir atkarīgs tikai no temperatūras.

Jālieto SI sistēmas mērvienība paskāls (Pa).

Šajā tabulā apkopotas agrāk izmantotās mērvienības un to pārvēršanas koeficienti.

1 tors (= 1 mm Hg)	= 1,333 x 10^{2} Pa
1 atmosfēra	= l,013x10^{5} Pa
1 bārs	= 10^{5} Pa

SI sistēmā temperatūras mērvienība ir kelvins (K).

Gāzu universālā konstante R ir 8,314 J mol^{-1} K^{-1}.

Temperatūras sakarību ar tvaika spiedienu izsaka ar Klauziusa-Klapeirona vienādojumu:

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

kur:

p = vielas tvaika spiediens paskālos

ΔH_v = vielas iztvaikošanas siltums J mol^{-1}

R = gāzu universālā konstante J mol^{-1} K^{-1}

T = termodinamiskā temperatūra, K

1.3. STANDARTVIELAS

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

1.4. NOTEIKŠANAS METOŽU PRINCIPS

Tvaika spiediena noteikšanai var izmantot septiņas metodes, kas lietojamas dažādos tvaika spiediena intervālos. Visas šīs metodes paredz tvaika spiediena noteikšanu noteiktā temperatūras diapazonā. Ierobežotā temperatūras diapazonā tīras vielas tvaika spiediena logaritms ir apgriezti proporcionāls temperatūrai.

1.4.1. **Dinamiskā metode**

Ar dinamisko metodi veic viršanas temperatūras mērījumus noteiktā, iepriekš izvēlētā spiedienā.

Ieteicamais diapazons:

10^3 līdz 10^5 Pa.

Šo metodi ieteicams izmantot viršanas temperatūras noteikšanai, un šim nolūkam to var izmantot viršanas temperatūrai līdz 600 K.

1.4.2. **Statiskā metode**

Ar šo metodi var noteikt tvaika spiedienu, kas rodas kādā noteiktā temperatūrā, slēgtā sistēmā iestājoties termodinamiskajam līdzsvaram. Šī metode ir izmantojama vienkomponenta un vairākkomponentu cietvielu un šķidru vielu sistēmās.

Ieteicamais diapazons:

10 līdz 10^5 Pa.

Strādājot prasmīgi, metodi var izmantot arī intervālā no 1 līdz 10 Pa.

1.4.3. **Izoteniskops**

Šī standartmetode arī pieder pie statiskām metodēm, bet to parasti nevar izmantot daudzkomponentu sistēmās. Sīkāka informācija ir atrodama standartā ASTM D-2879-86.

Ieteicamais diapazons:

no 100 līdz 10^5 Pa.

1.4.4. **Efūzijas metode: Tvaika spiediena svari**

Nosaka vielas daudzumu, kas vienā laika vienībā izplūst no kivetes caur noteikta lieluma atveri pazeminātā spiedienā apstākļos, kad atpakaļ kivetē ieplūst niecīgs vielas daudzums (piemēram, ar jutīgiem svariem mērot tvaika plūsmas radīto impulsu vai mērot masas zudumu).

Ieteicamais diapazons:

10^{-3} līdz 1 Pa.

1.4.5. **Efūzijas metode: Pēc masas zuduma vai ar tvaika uztveršanu**

Metode pamatojas uz testējamās vielas masas noteikšanu, kas tvaiku veidā laika vienībā izplūst no Knudsena šūnas [4] ultravakuumā caur mikroatveri. Izplūdušā tvaika masu var noteikt pēc šūnas masas zuduma vai tvaiku kondensējot pazeminātā temperatūrā, un iztvaikojušās vielas daudzumu nosakot ar gāzu hromatogrāfiju. Tvaika spiedienu aprēķina. izmantojot Herca-Knudsena sakarību.

Ieteicamais diapazons:

10^{-3} līdz 1 Pa.

1.4.6. **Gāzes piesātinājuma metode**

Inertas nesējgāzes plūsmu laiž pāri vielai tā, lai tā kļūtu piesātināta ar šīs vielas tvaiku. Nosaka noteikta nesējgāzes daudzuma pārnestās vielas masu, to uztverot piemērotā uztvērējā, vai izmantojot iekšēju analītisku metodi. Tad to izmanto tvaika spiediena aprēķināšanai attiecīgajā temperatūrā.

Ieteicamais diapazons:

10^{-4} līdz 1 Pa.

Strādājot prasmīgi, metodi var izmantot arī intervālā no 1 līdz 10 Pa.

1.4.7. **Rotācijas metode**

Rotora kamerā mērelements ir neliela tērauda lodīte, kas griežas lielā ātrumā un ir pacelta magnētiskajā laukā. Gāzes spiedienu atskaita no tērauda lodītes palēninājuma, kas ir atkarīgs no spiediena.

Ieteicamais diapazons:

10^{-4} līdz 0,5 Pa.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Salīdzinātas dažādas tvaika noteikšanas metodes pēc to pielietojamības, atkārtojamības, reproducējamības, noteikšanas intervāla un norādīti attiecīgie esošie standarti. Šie dati apkopoti tabulā.

KVALITĀTES KRITĒRIJI

Noteikšanas metode	Vielas		Novērtētā atkārtojamība (1)	Novērtētā reproducējamība (1)	Ieteicamais diapazons	Standartmetode
	cietvielas	šķidrumi				
1.4.1. Dinamiskā metode	Ar zemu kušanas temperatūru—	jā	Līdz 25%	Līdz 25%	10^3 Pa līdz 2×10^3 Pa	—
			1 līdz 5%	1 līdz 5%	2×10^3 Pa līdz 10^5 Pa	—
1.4.2. Statiskā metode	jā	jā	5 līdz 10%	5 līdz 10%	10 Pa līdz 10^5 Pa (2)	NFT 20-048 (5)
1.4.3. Izoteniskops	jā	jā	5 līdz 10%	5 līdz 10%	10^2 Pa līdz 10^5 Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4. Efūzijas metode: Tvaika spiediena svari	jā	jā	5 līdz 20%	Līdz 50 %	10^{-3} Pa līdz 1 Pa	NFT 20-047(6)
1.4.5. Efūzijas metode: masas zudums	jā	jā	10 līdz 30%	—	10^{-3} Pa līdz 1 Pa	—
1.4.6. Gāzes piesātinājuma metode	jā	jā	10 līdz 30%	Līdz 50 %	10^{-4} Pa līdz 1 Pa (2)	—
1.4.7. Rotācijas metode	jā	jā	10 līdz 20%	—	10^{-4} Pa līdz 0,5 Pa	—

(1) Atkarībā no tīrības
(2) Strādājot prasmīgi, metodi var izmantot arī intervālā no 1 līdz 10 Pa.

1.6. METOŽU APRAKSTI

1.6.1. **Dinamiskā metode**

1.6.1.1. *Aprīkojums*

Mēraparāts parasti sastāv no viršanas trauka ar tam pievienotu dzesinātāju no stikla vai metāla (1. att.), temperatūras mērīšanas iekārtas un iekārtas spiediena regulēšanai un mērīšanai. Attēlā redzamā parauga mēraparāts izgatavots no karstumizturīga stikla un sastāv no piecām daļām.

Platā caurule, kurai daļēji ir dubultsienas, sastāv no pieslīpēta savienojuma, dzesinātāja, dzesēšanas kolbas un ieejas.

Stikla cilindrs ar Kotrela sūkni samontēts ar caurules viršanas sekciju, un tam ir raupja virsma no sasmalcināta stikla 'grūdienu' novēršanai vārīšanās laikā.

Temperatūras mērīšanai izmanto piemērotu temperatūras sensoru (piemēram, pretestības termometru, termopāra patronu), kas caur piemērotu ieeju iegremdēts aparātā līdz mērīšanas punktam (Nr. 5, 1.att.).

Veic vajadzīgos pieslēgumus spiediena regulēšanas un mērīšanas iekārtai.

Apaļkolba, ko izmanto spiediena izlīdzināšanai, savienota ar mērierīci caur kapilāru.

Viršanas trauku silda ar sildelementu (piemēram, patronas veidā), kas ievietots stikla aparātā no apakšas. Sildīšanai vajadzīgo strāvu iestata un regulē, izmantojot termopāri.

Ar vakuumsūkni rada vajadzīgo retinājumu no 10^2 Pa līdz apmēram 10^5 Pa.

Vēdināšanai un spiediena regulēšanai vajadzīgā gaisa vai slāpekļa padevei izmanto piemērotu ventili (intervālā no apmēram 10^2 līdz apmēram 10^5 Pa).

Spiedienu mēra ar manometru.

1.6.1.2. *Mērījumu procedūra*

Tvaika spiedienu mēra, nosakot viršanas temperatūru pie dažāda spiediena, apmēram no 10^3 līdz 10^5 Pa. Temperatūras stabilizēšanās nemainīgā spiedienā liecina, ka viršanas temperatūra ir sasniegta. Šī mērīšanas metode nav izmantojama putojošu vielu tvaika spiediena noteikšanai.

Vielu pārnes tīrā un sausā parauga traukā. Problēmas var rasties ar cietvielām, kas nav pulvera veidā, taču dažkārt tās var atrisināt, sildot dzesēšanas apvalku. Kad šis trauks ir piepildīts, savienojuma vietu aparātam hermetizē un vielu atgaiso. Tad iestata zemāko vajadzīgo spiedienu un ieslēdz sildīšanu. Vienlaikus reģistrēšanas iekārtai pievieno temperatūras sensoru.

Līdzsvars ir iestājies, kad nemainīgā spiedienā tiek reģistrēta konstanta viršanas temperatūra. Īpaši jāraugās, lai vārīšanās būtu vienmērīga un bez grūdieniem. Turklāt dzesinātājā tvaikam jākondensējas pilnībā. Nosakot tvaika spiedienu cietvielām ar zemu kušanas temperatūru, jāraugās, lai netiktu nobloķēts dzesinātājs.

Pēc līdzsvara punkta reģistrēšanas iestata augstāku spiedienu. Šo procedūru turpina, līdz sasniedz 10^5 Pa spiedienu (kopumā veic apmēram 5-10 mērījumus). Drošības labad līdzsvara punktu noteikšana jāatkārto, spiedienu pakāpeniski samazinot.

1.6.2. **Statiskā metode**

1.6.2.1. *Aprīkojums*

Aparāts sastāv no parauga konteinera, sildīšanas un dzesēšanas sistēmas parauga temperatūras regulēšanai un temperatūras mērīšanas ierīces. Aparātā ietilpst arī ierīces spiediena iestatīšanai un mērīšanai. Pamatprincips parādīts 2.a un 2.b att.

Parauga kamera (2.a att.) no vienas puses savienota ar piemērotu dziļam vakuumam paredzētu ventili. No otras puses pievienota U-veida caurule, kurā ir piemērots manometriskais šķidrums. Viens U-veida caurules gals nozarojas uz vakuumsūkni, slāpekļa balonu vai ventilācijas vārstu un manometru.

U-veida caurules vietā var izmantot manometru (2.b att.).

Parauga temperatūras regulēšanai parauga trauku kopā ar ventili un U-veida cauruli vai manometru ievieto vannā, kurā ar precizitāti ± 0,2 K uztur nemainīgu temperatūru. Temperatūru mēra uz parauga trauka ārējās sienas vai tā iekšienē.

Gaisa evakuēšanai no aparāta izmanto vakuumsūkni ar dzesējamu uztvērēju pirms tā.

Pēc 2. a metodes vielas tvaika spiedienu mēra netieši, izmantojot nulles indikāciju. Tādējādi tiek ņemts vērā, ka, temperatūrai ievērojami mainoties, mainās arī šķidruma blīvums U-veida caurulē.

Atkarībā no spiediena un nosakāmās vielas ķīmiskajām īpašībām U-veida caurulē par nulles indikatoriem var izmantot šādus šķidrumus: šķidros silikonus, ftalātus. Viela, kuras tvaika spiedienu nosaka, nedrīkst kaut nedaudz šķīst U-veida caurulē iepildītajā šķidrumā vai ar to reaģēt.

Spiediena intervālā no normāla atmosfēras spiediena līdz 10^2 Pa manometram var izmantot dzīvsudrabu, savukārt silikoni un ftalāti ir piemēroti izmantošanai spiedienā zem 10^2 Pa līdz pat 10 Pa. Manometrus ar apsildāmu membrānu var izmantot pat par 10^{-1} Pa zemāka spiediena mērīšanai. Ir arī citu veidu manometri, kurus var izmantot par 10^2 Pa zemāka spiediena mērīšanai.

1.6.2.2. *Mērījumu procedūra*

Pirms mērīšanas visiem 2. att. redzamo aparātu komponentiem jābūt rūpīgi izmazgātiem un izžāvētiem.

Pēc 2.a metodes U-veida caurulē iepilda izraudzīto šķidrumu, kuram pirms nolasījumu veikšanas jābūt degazētam paaugstinātā temperatūrā.

Testējamo vielu ievieto aparātā, kuru pēc tam noslēdz un degazēšanai pazemina temperatūru. Temperatūrai jābūt pietiekami zemai, lai nodrošinātu, ka tiek izsūknēts gaiss, taču attiecībā uz daudzkomponentu sistēmām jāraugās, lai tādējādi neizmainītos maisījuma sastāvs. Ja vajadzīgs, līdzsvaru var panākt ātrāk, maisot sastāvu.

Paraugu var atdzesēt līdz ļoti zemai temperatūrai, piemēram, ar šķidro slāpekli (raugoties, lai nenotiktu gaisa vai sūkņa šķidruma kondensācija), vai ar etanola un sausā ledus maisījumu. Mērījumiem zemās temperatūrās izmanto vannu ar regulējamu temperatūru, kas pieslēgta ultrakriostatam.

Uz parauga trauku atver ventili un gaisa evakuēšanai uz dažām minūtēm ieslēdz vakuumu. Tad ventili aizver un parauga temperatūru pazemina līdz zemākajam vēlamajam līmenim. Ja vajadzīgs, degazēšanu veic vairākas reizes.

Paraugu sildot, paaugstinās tvaika spiediens. Tas izmaina šķidruma līdzsvaru U-veida caurulē. Lai to kompensētu, aparātā caur ventili laiž slāpekli vai gaisu, līdz spiediena indikatora šķidrums atkal iestājas nulles līmenī. Tam vajadzīgo spiedienu var nolasīt istabas temperatūrā ar augstas precizitātes manometru. Šis spiediens atbilst vielas tvaika spiedienam attiecīgi šajā temperatūrā.

Līdzīga ir arī 2.b metode, tikai tvaika spiediens tiek nolasīts tieši.

Temperatūras un tvaika spiediena sakarību nosaka ar pietiekami nelieliem intervāliem (mērījumus veic pavisam 5 līdz 10 punktos) līdz vajadzīgajam maksimumam. Pārbaudei jāatkārto nolasījumi, temperatūru pazeminot.

Ja atkārtotos nolasījumos iegūtās vērtības nav uz līknes, kas iegūta, temperatūru paaugstinot, tam var būt kāds no šādiem cēloņiem:

1. Paraugā (piemēram, ļoti viskozos materiālos) joprojām ir gaiss vai vielas ar zemu viršanas temperatūru, kas izdalās sildīšanas laikā, un var tikt aizvadītas ar sūknēšanu pēc papildus atdzesēšanas līdz zemai temperatūrai;

2. Dzesēšanas temperatūra nav pietiekami zema. Šādā gadījumā dzesēšanai izmanto šķidro slāpekli;

   Abos iepriekšminētajos gadījumos mērījumi ir jāatkārto.

3. Pētītajā temperatūru intervālā ar vielu notiek ķīmiskās reakcijas (piemēram, sadalīšanās, polimerizācija).

1.6.3. **Izoteniskops**

Metodes pilnīgs apraksts dots literatūras avotā (7). Mērīšanas ierīces darbības princips parādīts 3. attēlā. Līdzīgi kā 16.3. punktā aprakstītā metode, izoteniskops izmantojams gan cietvielu, gan šķidrumu tvaika spiediena noteikšanai.

Nosakot šķidras vielas tvaika spiedienu, to pašu vielu iepilda arī palīgmanometrā. Izoteniskopā iepilda tādu šķidruma daudzumu, kas ir pietiekams manometra rezervuāra un manometra daļas īsākās caurules piepildīšanai. Izoteniskopu pieslēdz vakuumam gaisa izsūknēšanai un tad piepilda ar slāpekli. Skābekļa pilnīgai aizvadīšanai gaisa izsūknēšanu un sistēmas skalošanu veic divreiz. Piepildīto izoteniskopu novieto horizontāli tā, lai paraugs izveidotu plānu slāni parauga rezervuārā un manometra daļā (U-veida caurules daļā). Spiedienu sistēmā pazemina līdz 133 Pa un uzmanīgi silda tā, lai tas sāktu nedaudz vārīties (izšķīdušo un saistīto gāzu aizvadīšanai). Pēc tam izoteniskopu novieto tā, lai paraugs satecētu atpakaļ un šķidrums pilnīgi piepildītu rezervuāru un manometra īsāko cauruli. Šādu spiedienu uztur degazēšanai; parauga rezervuāra izvilkto galu silda uz nelielas uguns, līdz parauga izdalītais tvaiks pietiekami izplešas, izspiežot daļu parauga no rezervuāra augšējās daļas un manometra caurules izoteniskopa manometra daļā, izveidojot ar tvaiku piepildītu telpu, kurā nav slāpekļa.

Tad izoteniskopu ievieto termostatētā vannā un slāpekļa spiedienu noregulē tā, lai tas būtu vienāds ar parauga tvaika spiedienu. Spiedienu līdzsvaru rāda izoteniskopa manometra daļa. Līdzsvara stāvoklī slāpekļa tvaika spiediens ir vienāds ar vielas tvaika spiedienu.

Nosakot cietvielu tvaika spiedienu, atkarībā no spiediena un temperatūras intervāliem izmanto 1.6.2.1. punktā uzskaitītos šķidrumus manometriem. Degazētu manometra šķidrumu iepilda izoteniskopa paresninājumā un garākajā caurulē. Tad rezervuārā ievieto cietvielu, kurai jānosaka tvaika spiediens nosaka, un rezervuāru degazē paaugstinātā temperatūrā. Pēc tam izoteniskopu pieliec tā, lai manometra šķidrums ieplūstu U-veida caurulē. Tvaika spiediena mērījumus, mainot temperatūru, veic, kā norādīts 1.6.2. punktā.

1.6.4. **Efūzijas metode: Tvaika spiediena svari**

1.6.4.1. *Aprīkojums*

Literatūrā (1) aprakstīti dažādi aparatūras varianti. Šeit aprakstītais aparāts ilustrē izmantojamo vispārīgo principu (4. att.). 4. att. parādītas galvenās sastāvdaļas aparātam, kas sastāv no dziļam vakuumam pieslēdzama nerūsējoša tērauda vai stikla konteinera, vakuumiekārtas un iekārtas tās radītā retinājuma mērīšanai un iebūvētiem komponentiem tvaika spiediena noteikšanai ar spiediena svariem. Aparātā ir šādi iebūvētie komponenti:

— iztvaicēšanas krāsns ar uzmalu un rotācijas ieeju. Iztvaicēšanas krāsns ir cilindrisks trauks, kas izgatavots, piemēram, no vara vai ķīmiski izturīga sakausējuma ar labu siltuma vadītspēju. Var izmantot arī stikla trauku ar vara sienu. Krāsns diametrs ir 3 līdz 5 cm, un tās augstums ir 2 līdz 5 cm. Tai ir no vienas līdz trijām dažāda izmēra atverēm tvaika plūsmai. Krāsni silda uz tai apakšā novietotas sildvirsmas vai ar tai pa ārpusi apvītu sildelementu. Lai siltumenerģija neizkliedētos pamatplatē, sildītāju pamatplatei piestiprina ar metālu, kuram ir zema siltumvadītspēja (alpaka vai hromniķeļa tērauds), piemēram, alpaka cauruli piestiprina pie rotācijas ieejas, ja izmanto krāsni ar vairākām atverēm. Šādai konstrukcijai ir priekšrocības, ievietojot vara stieni. Tas ļauj dzesēt no ārpuses, izmantojot dzesēšanas vannu,

— ja vara krāsns vākam ir trīs dažāda diametra atveres 90° leņķī vienai pret otru, var aptvert visa mērījumu diapazona dažādus intervālus (atveru diametrs aptuveni no 0,30 līdz 4,50 mm). Lielākās atveres izmanto zemākajiem tvaika spiedieniem un otrādi. Krāsni pagriežot, tvaika plūsmā (krāsns atvere – vairogs – svaru kauss) var iestatīt vajadzīgo atveri vai starpstāvokli, un molekulu plūsma caur krāsns atveri tiek izlaista vai novirzīta uz svaru kausu. Vielas temperatūras mērīšanai piemērotā punktā ievieto termopāri vai pretestības termometru,

— virs vairoga ir ļoti jutīgu mikrosvaru svaru kauss (sk. turpmāk). Svaru kausa diametrs ir apmēram 30 mm. Piemērotākais materiāls ir alumīnijs ar zelta pārklājumu,

— svaru kausam apkārt ir cilindriska dzesēšanas kamera no misiņa vai vara. Atkarībā no svaru veida tajā ir atveres svaru plecam un vairoga atvere molekulu plūsmai, un tai jānodrošina tvaika kondensācija svaru kausā. Sliduma vadīšanu uz ārieni nodrošina, piemēram, ar vara stieni, kas savienots ar dzesēšanas kameru. Stieni izvada cauri pamatplatei un no tās termiski izolē, piemēram, ar hromniķeļa tērauda cauruli. Stieni iegremdē zem pamatplates novietotā Djuāra traukā ar šķidru slāpekli, vai šķidro slāpekli laiž caur stieni. Dzesēšanas kamerā tādējādi tiek uzturēta aptuveni –120 °C temperatūra. Svaru kausa dzesēšana notiek tikai ar starošanu, un tā ir pietiekama nosakāmajam spiedienu intervālam (dzesē apmēram 1 stundu pirms mērījuma sākšanas),

— svarus novieto virs dzesēšanas kameras. Piemērotākie svari ir, piemēram, ļoti jutīgi divplecu elektroniskie mikrosvari (8) vai ļoti jutīgi svari ar kustīgu spoli (sk. ESAO 104. testēšanas norādījumus, 12.05.81 izdevums),

— pamatplatē iekļauti arī elektriskie savienojumi termopāriem (vai pretestības termometriem) un sildelementiem,

— vakuumu traukā rada, izmantojot parasto vakuumsūkni vai vakuumsūkni dziļa retinājuma iegūšanai (vajadzīgais vakuums ir apmēram 1 līdz $2 \cdot 10^{-3}$ Pa, ko iegūst pēc aptuveni 2 stundu sūknēšanas). Spiedienu regulē ar piemērotu jonizācijas manometru.

1.6.4.2 *Mērījumu procedūra*

Trauku piepilda ar nosakāmo vielu un noslēdz vāku. Krāsnij pievieno vairogu un dzesēšanas kameru. Aparātu aizver un ieslēdz vakuumsūkņus. Galīgajam spiedienam, pirms sākt mērījumus, ir jābūt apmēram 10^{-4} Pa. Dzesēšanas kameras dzesēšanu sāk pie 10^{-2} Pa.

Pēc vajadzīgā vakuuma sasniegšanas sāk kalibrēšanu zemākajā vajadzīgajā temperatūrā. Uz vāka iestata vajadzīgo atvērumu, tvaika plūsma iziet caur vairogu tieši virs atveres un atsitas pret svaru kausu, kas tiek dzesēts. Svaru kausam jābūt pietiekami lielam, lai nodrošinātu, ka uz tā nonāk visa caur vairogu virzītā tvaika plūsma. Tvaika plūsmas kinētiskā enerģija rada spēku, kas iedarbojas uz svaru kausu, un molekulas kondensējas uz tā aukstās virsmas.

Kinētiskā enerģija un vienlaicīgi notiekošā kondensācija dod signālu uz reģistrēšanas ierīci. Signālus izvērtējot, iegūst divu veidu informāciju:

1. Šeit aprakstītajā aparātā tvaika spiedienu nosaka tieši pēc kinētiskās enerģijas iedarbības uz svaru kausu (nav jāzina molekulmasa (2)). Izvērtējot mērījumu rezultātus, jāņem vērā ģeometriskie izmēri, piemēram, krāsns atveres lielums un molekulu plūsmas leņķis;

2. Vienlaicīgi var noteikt kondensāta masu, pēc kuras aprēķina iztvaikošanas ātrumu. Tvaika spiedienu var aprēķināt arī pēc Herca vienādojuma (2), zinot iztvaikošanas ātrumu un molekulmasu.

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

kur

G = iztvaikošanas ātrums (kg s^{-1} m^{-2})

M = molmasa (g mol^{-1})

T = temperatūra (K)

R = gāzu universālā konstante (J mol^{-1} K^{-1})

p = tvaika spiediens (Pa);

Pēc vajadzīgā vakuuma sasniegšanas mērījumu sēriju sāk no zemākās vajadzīgās temperatūras.

Tālākos mērījumus veic, ikreiz nedaudz paaugstinot temperatūru, kamēr sasniedz maksimālo izraudzīto temperatūras līmeni. Tad paraugu atkal atdzesē un vajadzības gadījumā reģistrē vēl vienu tvaika spiediena līkni. Ja otrās mērījumu sērijas rezultāti nesakrīt ar pirmās sērijas rezultātiem, tad iespējams, ka temperatūrā, kurā veic mērījumus, notiek vielas sadalīšanās.

1.6.5. **Efūzijas metode – pēc masas zuduma**

1.6.5.1. *Aprīkojums*

Efūzijas iekārta sastāv no šādām galvenajām daļām:

— termostatējama tvertne, no kuras var izsūknēt gaisu un kurā atrodas efūzijas šūnas,

— vakuumsūknis dziļa vakuuma iegūšanai (piemēram, difūzijas sūknis vai turbomolekulārais sūknis ar vakuummetru),

— uztvērējs, kurā dzesēšanai izmanto šķidru slāpekli vai sauso ledu.

Piemērā 5. att. parādīta alumīnija vakuumtvertne ar elektrisko sildīšanu, kurā ir 4 nerūsējošā tērauda efūzijas šūnas. Nerūsējošā tērauda folijā, kuras biezums ir 0,3 mm, efūzijas atvere 0,2 līdz 1,0 mm diametrā, un tā ir piestiprināta efūzijas šūnai ar uzskrūvējamu vāku.

1.6.5.2. *Mērījumu procedūra*

Standartvielu un vielu, kuras tvaika spiedienu nosaka, iepilda katrā efūzijas šūnā, metāla diafragmu, kurā ir atvere, nostiprina ar uzskrūvējamu vāku, un katru šūnu nosver ar precizitāti līdz 0,1 mg. Šūnu ievieto termostatējamā iekārtā, no kuras izsūknē gaisu līdz retinājumam, kas ir mazāks nekā viena desmitdaļa no sagaidāmā tvaika spiediena. Noteiktos laika intervālos, kas ir 5 līdz 30 stundas, iekārtā ielaiž gaisu, un efūzijas šūnas masas zudumu nosaka ar atkārtotu svēršanu.

Lai rezultātus neietekmētu gaistoši piemaisījumi, šūnu ar noteiktiem laika intervāliem sver atkārtoti, lai pārbaudītu, vai iztvaikošanas ātrums ir nemainīgs divu pēdējo šādu intervālu laikā.

Tvaika spiedienu p efūzijas šūnā aprēķina šādi:

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

kur

p = tvaika spiediens (Pa)

m = vielas masa, kas izplūst no šūnas laikā t (kg)

t = laiks (s)

A = atveres laukums (m^2)

K = korekcijas koeficients

R = gāzu universālā konstante (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatūra (K)

M = molmasa (kg mol^{-1})

Korekcijas koeficienta K vērtība ir atkarīga no cilindriskās atveres garuma attiecības pret rādiusu:

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

Iepriekšējo vienādojumu var pārveidot šādi:

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

kur $E = \frac{1}{KA}\sqrt{2\,\pi\,R}$ efūzijas šūnas konstante.

Efūzijas šūnas konstanti E var noteikt ar standartvielām (2,9), to aprēķinot pēc šāda vienādojuma:

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

kur

p(r) = standartvielas tvaika spiediens (Pa)

M(r) = standartvielas molmasa ($kg.mol^{-1}$)

1.6.6. **Gāzes piesātinājuma metode**

1.6.6.1. *Aprīkojums*

Parastajā iekārtā, kuru izmanto noteikšanai pēc šīs metodes, ietilpst vairākas sastāvdaļas, kas parādītas 6.a att. un turpmāk aprakstītas (1).

Inerta gāze

Nesējgāze nedrīkst ķīmiski reaģēt ar vielu. Parasti šim nolūkam pietiekami piemērots ir slāpeklis, taču dažkārt var būt jāizmanto citas gāzes (10). Izmantojamajai gāzei jābūt sausai (sk. 6.a att. 4. pozīcija: relatīvā mitruma sensors).

Gāzes plūsmas regulēšana un kontrole

Jābūt pienācīgai regulēšanas un kontroles sistēmai, kas nodrošina gāzes konstantu noteikta lieluma plūsmu caur piesātināšanas kolonnu.

Tvaika uztvērēji

Tvaika uztvērēju izvēle ir atkarīga no konkrētā parauga īpašībām un no izraudzītās analīzes metodes. Tvaiki jāuztver kvantitatīvi un tādā veidā, lai tos varētu turpmāk analizēt. Daļai vielu izmantošanai tvaika uztvērējos ir piemēroti tādi šķidrumi kā heksāns vai etilēnglikols. Daļai citu var izmantot cietus absorbentus.

Alternatīva tvaika uztveršanai un tai sekojošai analīzei ir iekšēju analītisko metožu, piemēram, hromatogrāfijas, izmantošana ar konkrētu nesējgāzes daudzumu pārnestā vielas daudzuma kvantitatīvai noteikšanai. Turklāt, parauga masas zudumu var izmērīt.

Siltummainis

Ja mērījumus izdara dažādās temperatūrās, iekārta var būt jāpapildina ar siltummaini.

Piesātināšanas kolonna

Vielu, kuras tvaika spiedienu nosaka, no šķīduma izgulsnē uz piemērota inerta nesēja. Pārklāto nesēju iepilda piesātināšanas kolonnā, kuras izmēri un plūsmas ātrums nodrošina pilnīgu nesējgāzes piesātinājumu. Piesātināšanas kolonnai jābūt termostatējamai. Veicot mērījumus par istabas temperatūru augstākā temperatūrā, lai novērstu vielas kondensāciju, iekārtas daļa starp piesātināšanas kolonnu un uztvērējiem jāsilda.

Lai samazinātu vielas pārnesi difūzijas veidā, aiz piesātināšanas kolonnas var ievietot kapilāru (6.b att.).

1.6.6.2. *Mērījumu procedūra*

Piesātināšanas kolonnas sagatavošana

Pārbaudāmās vielas šķīdumu ļoti gaistošā šķīdinātājā pievieno piemērotam daudzumam nesēja. Pārbaudāmā viela jāpievieno pietiekamā daudzumā, lai nodrošinātu piesātinājumu noteikšanas laikā. Šķīdinātāju pilnībā iztvaicē gaisā vai rotācijas ietvaicētājā, un piesātināšanas kolonnā iepilda rūpīgi samaisīto materiālu. Paraugu termostatē un iekārtai cauri laiž sausu slāpekli.

Mērījumu veikšana

Uztvērējus vai iekšējā analizatora detektoru savieno ar kolonnas efluenta līniju un reģistrē laiku. Plūsmas ātrumu pārbauda pašā sākumā un pēc tam periodiski izmēģinājuma gaitā ar burbuļu skaitītāju (vai nepārtraukti ar caurteces mērītāju).

Jāveic spiediena mērījumi piesātināšanas kolonnas izejā. Tas ir izdarāms:

a) starp piesātināšanas kolonnu un uztvērējiem pieslēdzot manometru (tas var nebūt piemērotākais risinājums, jo tādējādi palielinās brīvais tilpums un adsorbējošā virsma); vai,

b) atsevišķā eksperimentā nosakot spiediena kritumus izmantotajā uztveršanas sistēmā atkarībā no plūsmas ātruma (tas var nebūt piemērotākais risinājums uztvērējos ar šķidrumu).

Laiku, kas vajadzīgs, lai iegūtu nepieciešamo pārbaudāmās vielas daudzumu tās noteikšanai ar dažādām metodēm, nosaka orientējošos izmēģinājumos vai pēc aptuveniem aprēķiniem. Alternatīva vielas uztveršanai turpmākām analīzēm ir iekšēja analizatora izmantošana (piemēram, hromatogrāfija). Pirms aprēķināt tvaika spiedienu noteiktā temperatūrā, jāveic orientējoši izmēģinājumi, lai noteiktu maksimālo plūsmas ātrumu, kas nodrošina nesējgāzes pilnīgu piesātinājumu ar vielas tvaiku. Tas tiek nodrošināts, ja nesējgāzi laiž cauri piesātināšanas kolonnai tik lēni, lai pie vēl lēnākas plūsmas iegūtā aprēķinātā tvaika spiediena vērtība vairs nepalielinās.

Konkrētas analītiskās metodes (piemēram, gāzu hromatogrāfijas vai gravimetrijas) izvēle ir atkarīga no pārbaudāmās vielas īpatnībām.

Nosaka vielas daudzumu, ko pārnes noteikta tilpuma nesējgāze.

1.6.6.3. *Tvaika spiediena aprēķināšana*

Tvaika spiedienu aprēķina pēc tvaika blīvuma (W/V), izmantojot vienādojumu:

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

kur

p = tvaika spiediens (Pa)

W = iztvaikojušās vielas masa (g)

V = piesātinātās gāzes tilpums (m^3);

R = gāzu universālā konstante (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatūra (K)

M = molmasa (g mol^{-1})

Tilpuma mērījumu rezultāti jākoriģē, ņemot vērā spiediena un temperatūras starpību caurplūdes mērītājā un termostatējamajā piesātināšanas kolonnā. Ja caurplūdes mērītājs uzstādīts aiz tvaika uztvērēja, jāveic attiecīgā korekcija, ņemot vērā sastāvdaļu iztvaikošanu tvaika uztvērējā (1).

1.6.7. **Rotācijas metode (8, 11, 13)**

1.6.7.1. *Aprīkojums*

Noteikšanu pēc rotācijas metodes var veikt, izmantojot rotora viskozimetru, kā parādīts 8. att. Iekārtas shematisks attēls parādīts 7. att.

Mēraparatūra sastāv no mērierīces ar rotoru, kura novietota termostatējamā kamerā (kurā temperatūru regulē 0,1 °C robežās). Parauga konteineru ievieto termostatējamā kamerā (kurā temperatūru regulē 0,01 °C robežās), un, lai novērstu kondensāciju, visām pārējām iekārtas daļām jāuztur augstāka temperatūra. Sistēmai caur dziļa vakuuma ventiļiem pievieno vakuumsūkņa ierīci dziļa retinājuma nodrošināšanai.

Rotācijas mērierīce sastāv no tērauda lodītes (4 līdz 5 mm diametrā), kas ievietota caurulē. Lodīte peld piekarē magnētiskajā laukā, galvenokārt izmantojot pastāvīgos magnētus un vadības indukcijas spoles.

Lodīte tiek iegriezta ar rotējošu magnētisko lauku, ko rada indukcijas spoles. Pacēlējas spoles un mērīšana vienmēr rada lodītes nelielu laterālu magnetizēšanos, kas ļauj izmērīt tās rotācijas ātrumu.

1.6.7.2. *Mērījumu procedūra*

Kad lodīte ir sasniegusi vajadzīgo rotācijas ātrumu v(o) (parasti apmēram 400 apgr./s), tai pārtrauc pievadīt enerģiju, un gāzes berzes dēļ sākas rotācijas palēninašanās.

Rotācijas ātruma samazināšanos mēra atkarībā no laika. Magnētiskās piekares radītā berze ir neliela salīdzinājumā ar gāzes radīto berzi, un gāzes spiediens ir:

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

kur

c = gāzes molekulu vidējais ātrums

r = lodītes rādiuss

p = lodītes masas blīvums

σ = tangencialās kinētiskās enerģijas pārneses koeficients (ε= 1 ideāli sfēriskai lodītes virsmai)

t = laiks

v(t) = rotācijas ātrums pēc laika t

v(o) = rotācijas sākuma ātrums

Vienādojumu var pārveidot šādi:

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

kur t_n, t_{n-1} ir laiks, kas vajadzīgs dotajam apgriezienu skaitam N. Šie laika intervāli t_n un t_{n-} seko viens otram, un $t_n > t_{n-1}$.

Gāzes molekulas c vidējais ātrums ir:

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

kur:

T = temperatūra

R = gāzu universālā konstante

M = molmasa

2. **DATI**

Neatkarīgi no izmantotās metodes tvaika spiediena mērījumi jāveic vismaz divās temperatūrās. Tvaika spiediena līknes linearitātes pārbaudei ieteicams veikt trīs vai vairāk mērījumus temperatūru intervālā no 0 līdz 50 °C.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— lietotā metode,

— vielas precīzs apraksts (identifikācija un tīrība), iepriekšēja attīrīšana, ja tiek veikta,

— vismaz divas tvaika spiediena un temperatūras vērtības, vēlams temperatūru intervālā no 0 līdz 50 °C,

— visi izejas dati,

— log p vērtības atkarībā no 1/T līknes,

— 20 vai 25 °C temperatūrai aprēķinātais tvaika spiediens.

Ja noteikšanas laikā novēro, ka ar vielu notiek kādas izmaiņas (agregātstāvokļa maiņa, sadalīšanās), jānorāda arī:

— izmaiņu veids,

— temperatūra, kādā šīs izmaiņas notiek pie atmosfēras spiediena,

— tvaika spiediens 10 un 20 °C zemāk par šo pārejas temperatūru un 10 un 20 °C augstāk par šo temperatūru (ja nenotiek pāreja no cieta agregātstāvokļa gāzveida stāvoklī).

Jāiekļauj visa informācija un piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju, jo īpaši par vielas piemaisījumiem un tās agregātstāvokli.

4. **IZMANTOTĀ 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 10^{5} Pa – Static method.

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

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

8) G. Messer, P. Rohl, 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. Frerherey 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. papildinājums

Aprēķinu metode

IEVADS

Tvaika spiediena aprēķinātās vērtības var izmantot:

— piemērotāko eksperimentālo metožu izvēlei,

— lai noteiktu orientējošu vērtību vai robežvērtību gadījumos, kad tehnisku iemeslu dēļ (arī gadījumos, kad tvaika spiediens ir ļoti zems) nav iespējams izmantot eksperimentālo metodi,

— lai identificētu tos gadījumus, kad eksperimentāli mērījumi netiek veikti tāpēc, ka iespējamais tvaika spiediens istabas temperatūrā ir < 10^{-5} Pa.

APRĒĶINU METODE

Šķidru vielu un cietvielu tvaika spiedienu var aprēķināt pēc modificētās Vatsona korelācijas (a). Šim nolūkam vienīgie vajadzīgie eksperimentālie dati ir viršanas temperatūra normālos apstākļos. Metode izmantojama tvaika spiediena intervālā no 10^{5} Pa līdz 10^{-5} Pa.

Šī metode sīki aprakstīta rokasgrāmatā "*Handbook of Chemical Property Estimation Methods*" (b).

APRĒĶINĀŠANAS PROCEDŪRA

Saskaņā ar (b) tvaika spiedienu aprēķina šādi:

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

kur:

T = temperatūra, kurai veic aprēķinus

T_b = viršanas temperatūra normālos apstākļos

P_{vp} = tvaika spiediens temperatūrā T

ΔH_{vp} = iztvaikošanas siltums

ΔZ_b = saspiežamība (pieņemta 0,97)

m = empīrisks koeficients, kas atkarīgs no vielas agregātstāvokļa un temperatūras, kurai veic aprēķinus

Bez tam

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

kur K_F ir empīrisks koeficients, kas raksturo vielas polārās īpašības. Vairākiem savienojumu tipiem koeficienta K_F vērtības norādītas literatūras avotā (b).

Bieži ir pieejami dati par viršanas temperatūru pazeminātā spiedienā. Saskaņā ar (b) šādā gadījumā tvaika spiedienu aprēķina šādi:

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

kur T_1 ir viršanas temperatūra pazeminātā spiedienā P_1.

PĀRSKATS

Izmantojot aprēķinu metodi, testēšanas pārskatā pilnīgi dokumentē aprēķinus.

LITERATŪRA

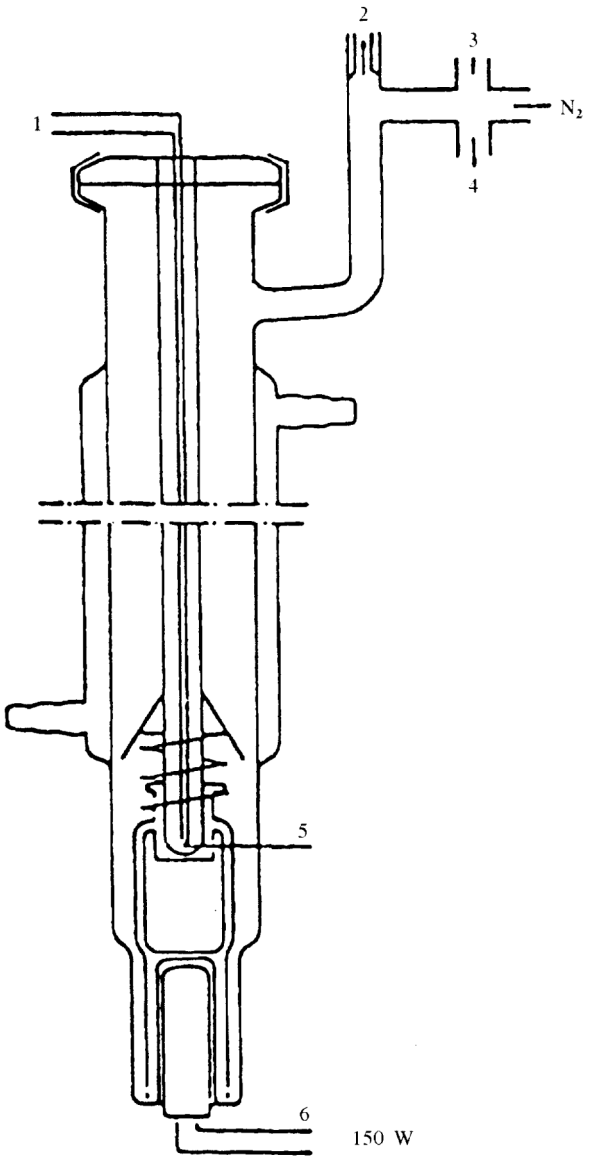
a) K.M. Watson, Ind. Eng. Chem; 1943, vol. 35, 398.

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

2. papildinājums

1. attēls

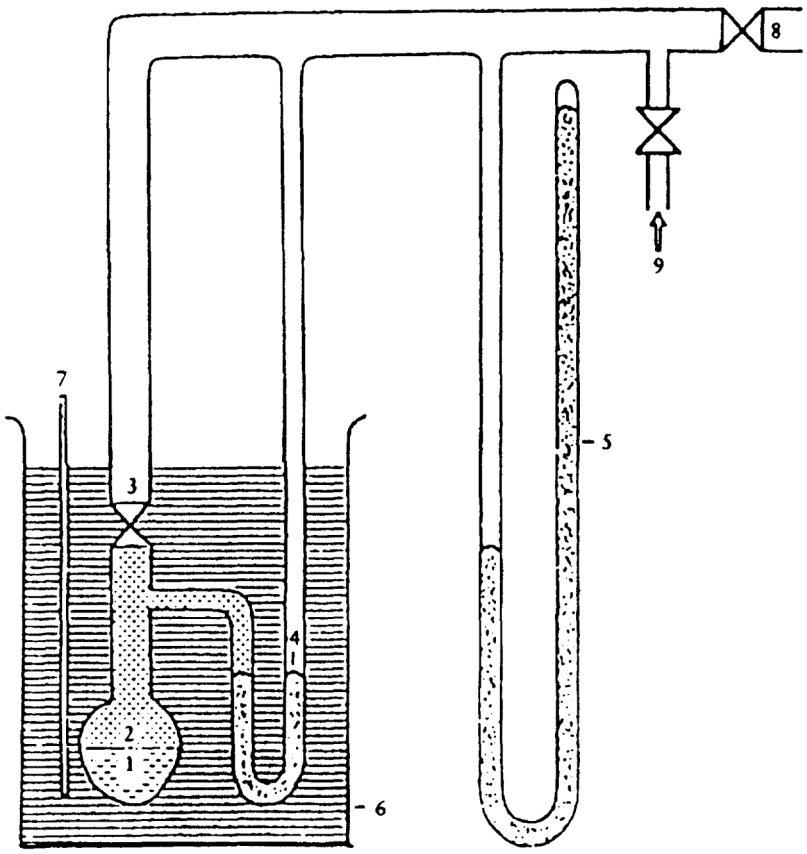
Iekārta tvaika spiediena līknes noteikšanai ar dinamisko metodi



1 = Termopāris
2 = Vakuuma buferis
3 = Manometrs
4 = Vakuums
5 = Mērīšanas punkts
6 = Sildelements apm. 150 W

2.a attēls

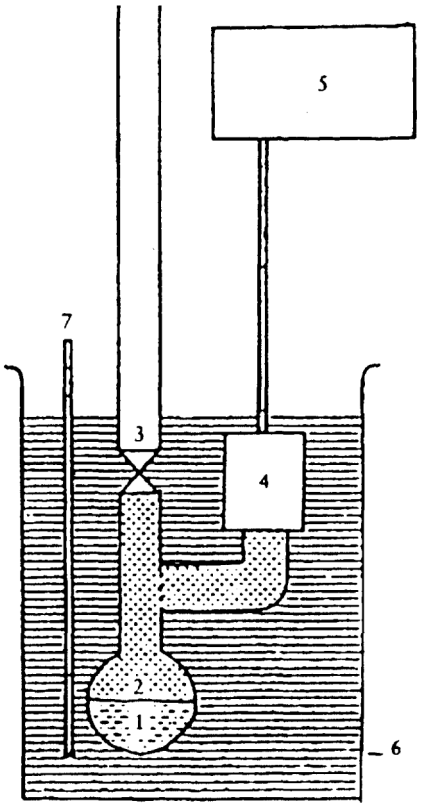
Aparāts tvaika spiediena līknes noteikšanai pēc statiskās metodes (izmantojot U-veida caurules manometru)



1. Testējamā viela
2. Tvaika fāze
3. Dziļa vakuuma ventilis
4. U-veida caurule (papildmanometrs)
5. Manometrs
6. Termostats
7. Temperatūras mērīšanas ierīce
8. Uz vakuumsūkni
9. Ventilācija

2.b attēls

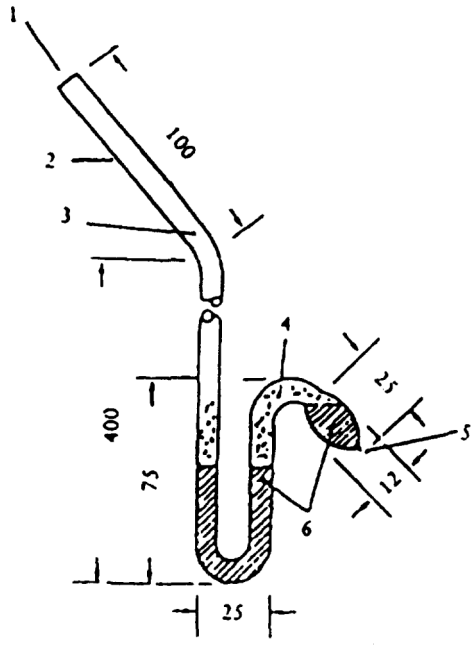
Aparāts tvaika spiediena līknes noteikšanai pēc statiskās metodes (izmantojot spiediena indikatoru)



1. Testējamā viela
2. Tvaika fāze
3. Dziļa vakuuma ventilis
4. Manometrs
5. Spiediena indikators
6. Termostats
7. Temperatūras mērīšanas ierīce

3. attēls

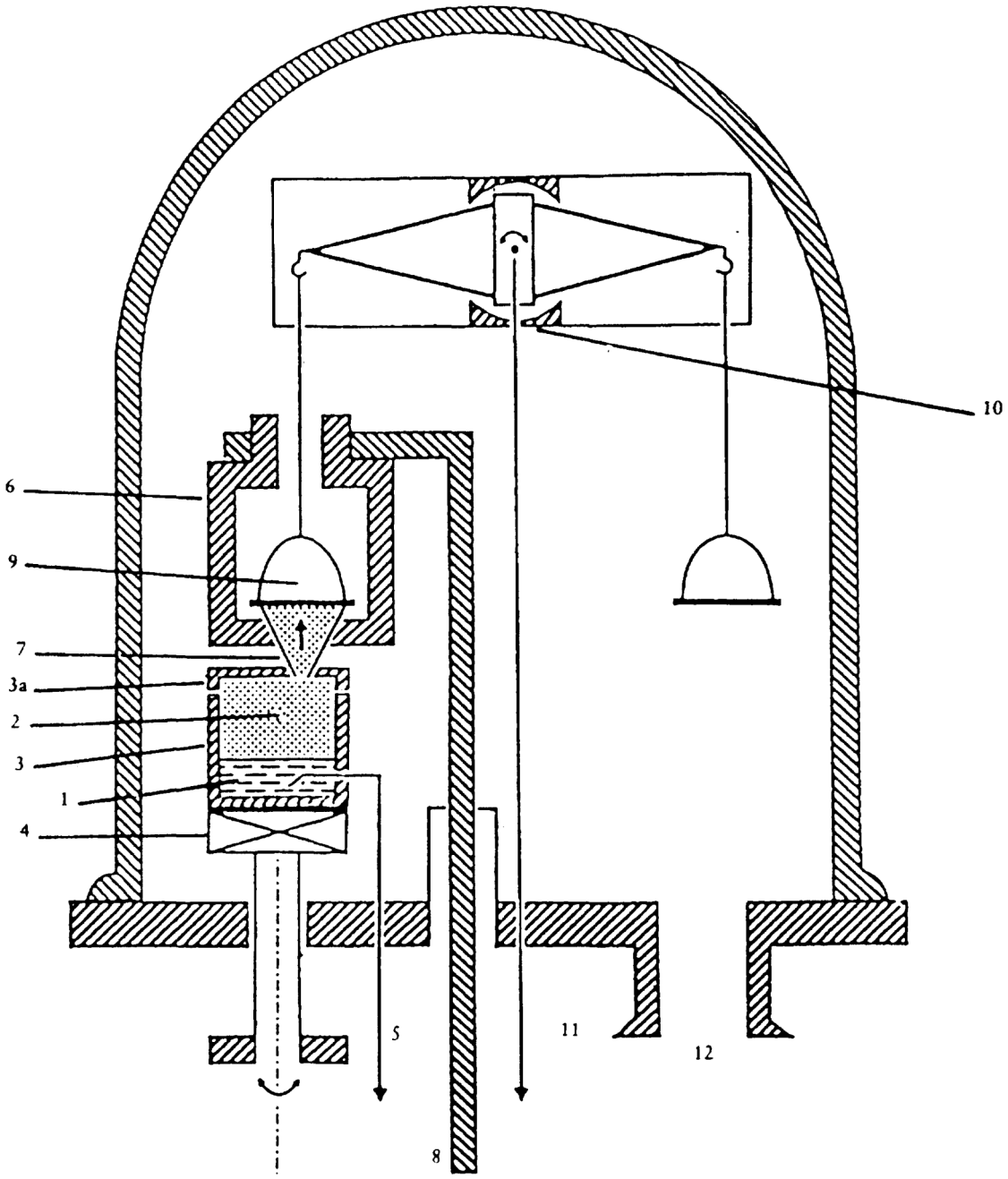
Izoteniskops (skat. 7. norādi)



1. Uz spiediena regulēšanas un mērīšanas sistēmu
2. 8 mm pārplūdes caurule
3. Sauss slāpeklis spiediena sistēmā
4. Parauga tvaiks
5. Neliels paresnājums
6. Šķidrs paraugs

4. attēls

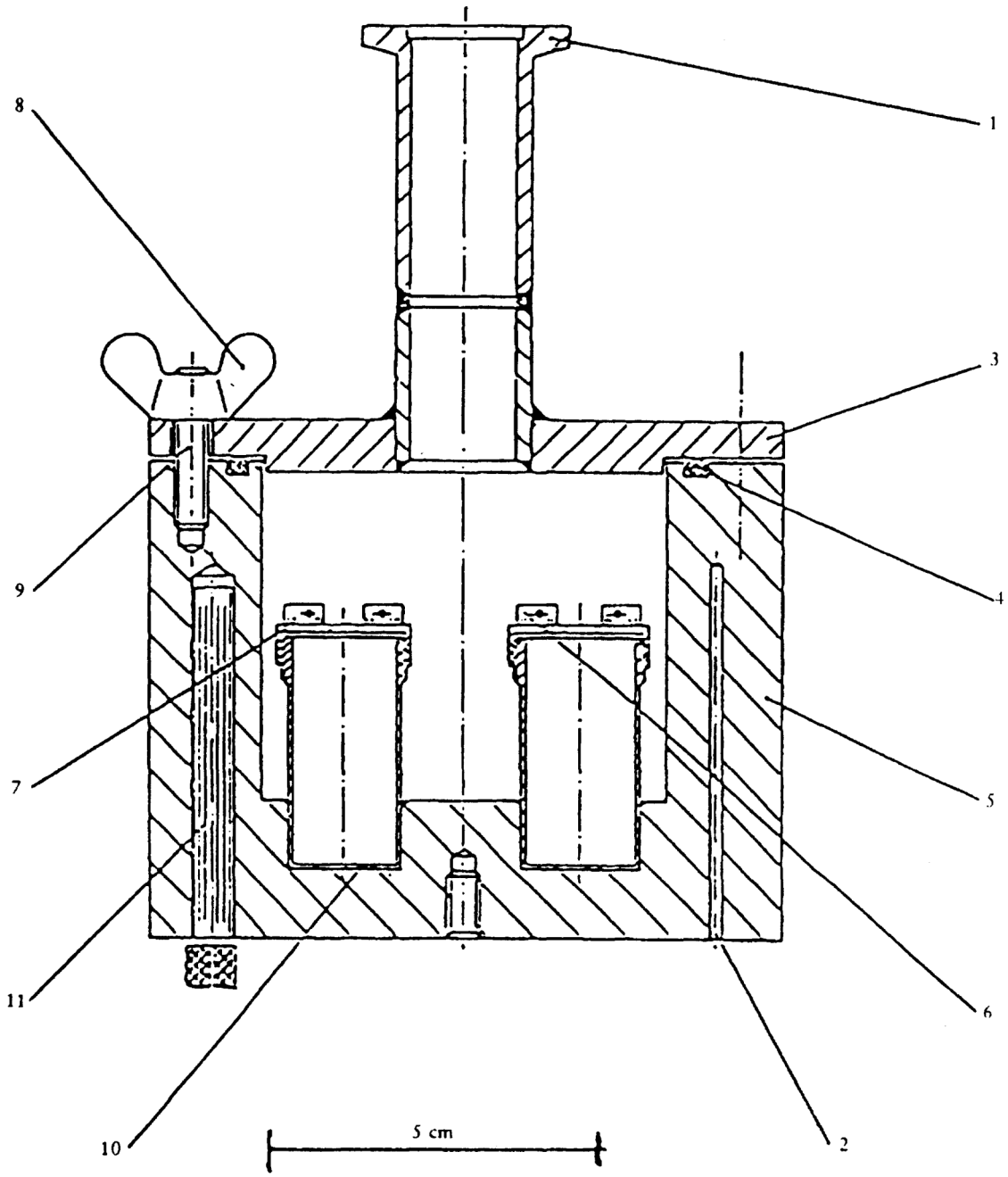
Iekārta tvaika spiediena līknes noteikšanai ar tvaika spiediena svariem



1. Pārbaudāmā viela
2. Tvaika fāze ar tvaika plūsmu
3. Iztvaicēšanas krāsns ar rotācijas ieeju
3a. Krāsns vāks ar atveri
4. Krāsns sildīšana (dzesēšana)
5. Parauga temperatūras mērīšana
6. Dzesēšanas kamera
7. Ekrāns
8. Dzesēšanas kameras dzesinātāja stienis
9. Svaru kauss
10. Mikrosvari
11. Uz reģistrēšanas ierīci
12. Uz vakumsūkni dziļa retinājuma iegūšanai

5. attēls

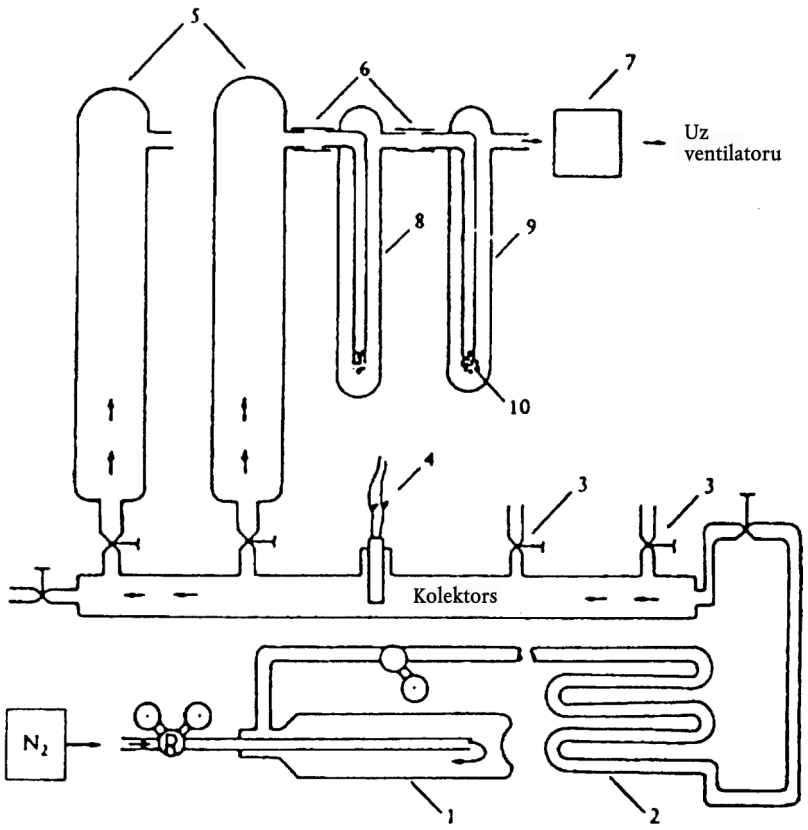
Aparāta paraugs iztvaicēšanai pazeminātā spiedienā ar efūzijas metodi; efūzijas šūnas tilpums 8 cm^3



1. Pieslēgums vakuumam
2. Urbumi platīna pretestības termometram vai temperatūras mērīšanas un regulēšanas ierīcēm
3. Vakuumtvertnes vāks
4. Blīve
5. Vakuumtvertne no alumīnija
6. Ierīce efūzijas šūnu ievietošanai un izņemšanai
7. Uzskrūvējams vāks
8. Spārnuzgriežņi (6)
9. Bultskrūves (6)
10. Nerūsējošā tērauda efūzijas šūnas
11. Sildītāja patronas (6)

6.a attēls

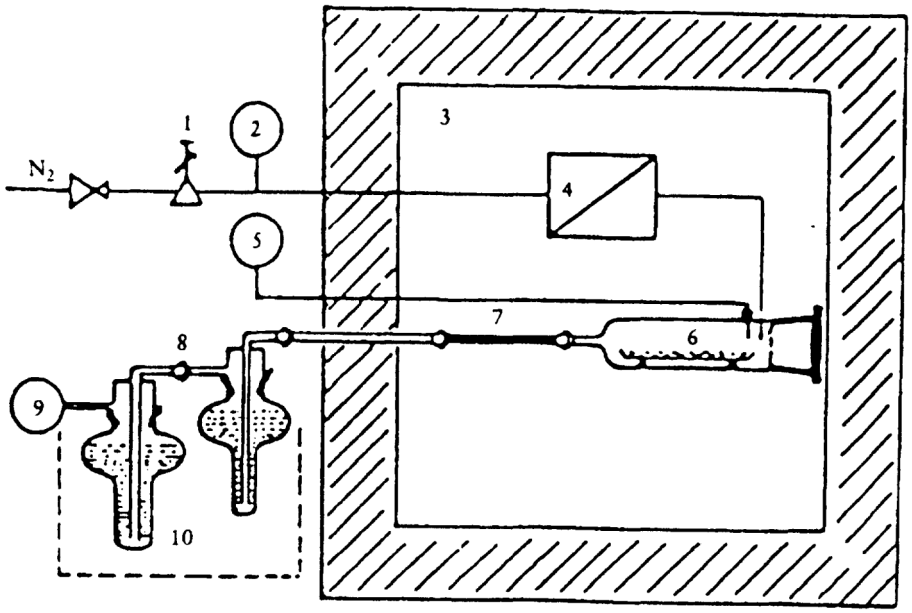
Caurplūdes sistēmas paraugs tvaika spiediena noteikšanai ar gāzes piesātinājuma metodi



1. Plūsmas regulators
2. Siltummainis
3. Adatventilis
4. Relatīvā mitruma sensors
5. Piesātināšanas kolonnas
6. Politetrafluoretilēna savienojumi
7. Plūsmas mērītājs
8. Uztvērējs (absorbers)
9. Eļļas uztvērējs
10. Poraina stikla barbotieris

6.b attēls

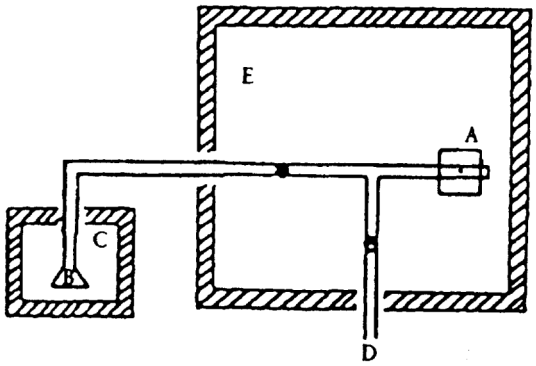
Sistēmas paraugs tvaika spiediena noteikšanai pēc gāzes piesātināšanas metodes ar kapilāru, kas ievietots aiz piesātināšanas kameras



1. Temperatūras masas plūsmas mērītājs
2. Manometrs
3. Termostatējama kamera
4. Termostatējama spirāle nesējgāzei
5. Termometrs (Pt 100)
6. Gāzes piesātināšanas kamera
7. Kapilārs
8. Absorbcijas trauki
9. Gāzes daudzuma mērītājs
10. Izsaldētājs

7. attēls

Eksperimentālās iekārtas shēmas paraugs noteikšanai pēc rotācijas metodes

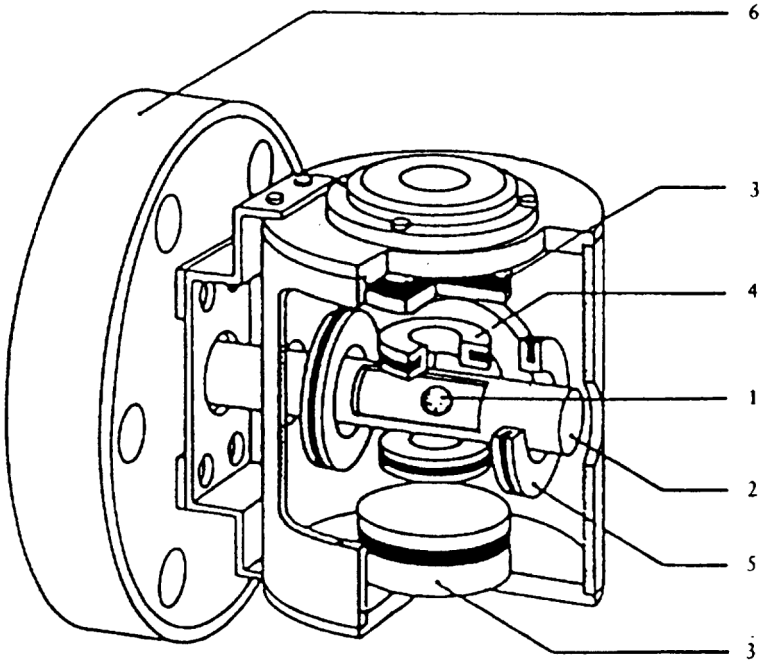


Tvaika spiediena aparāts

A. rotora sensora mērierīce
B. parauga šūna
C. termostats
D. vakuumlīnija (turbosūknis)
E. gaisa termostats

8. attēls

Rotācijas mērierīces paraugs



1. Lodīte
2. Caurules paplašinājums, no kuras izsūknēts gaiss
3. Pastāvīgie magnēti (2)
4. Vertikālās stabilizācijas spoles (2)
5. Vadības spoles (4)
6. Savienojuma atloks

A.5. VIRSMAS SPRAIGUMS

1. **METODE**

Aprakstīto metožu pamatā ir ESAO Testēšanas norādījumi (1). Pamatprincipi aprakstīti literatūras avotā (2).

1.1. IEVADS

Aplūkotās metodes paredzētas ūdens šķīdumu virsmas spraiguma mērīšanai.

Pirms šo pārbaužu veikšanas ir lietderīgi jau iepriekš ievākt datus par pārbaudāmās vielas šķīdību ūdenī, tās uzbūvi, hidrolīzes īpašībām un micellu veidošanās robežkoncentrāciju.

Šeit aprakstītās metodes izmantojamas gandrīz visām ķīmiskajām vielām neatkarīgi no to tīrības.

Ar gredzenveida tenzometru var noteikt virsmas spraigumu tikai tādiem ūdens šķīdumiem, kuru dinamiskā viskozitāte ir zemāka par 200 mPa s.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Virsmas spraigums ir virsmas brīvā entalpija uz virsmas laukuma vienību.

Virsmas spraigumam ir šādas mērvienības:

N/m (SI mērvienība) vai

mN/m (SI apakšmērvienība),

1 N/m = 10^3 dynes/cm

1 mN/m = 1 dyne/cm novecojušajā cgs mērvienību sistēmā

1.3. STANDARTVIELAS

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

Standartvielas, kuru virsmas spraigums aptver plašu diapazonu, ir uzskaitītas izmantotās literatūras sarakstā (1) un (3).

1.4. METOŽU PRINCIPS

Ar šīm metodēm nosaka maksimālo spēku, kas vertikāli jāpieliek cilpai vai gredzenam, kurš ir saskarē ar pārbaudāmā šķidruma virsmu mērtraukā, lai to atrautu no šīs virsmas, vai spēku, kas jāpieliek plātnei, kuras mala pieskaras šķidruma virsmai, lai pievilktu izveidojušos virsmas slāni.

Vielas, kuras ir šķīstošas ūdenī koncentrācijā vismaz līdz 1 mg/l, testē ūdens šķīdumā vienā koncentrācijā.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Šīm metodēm ir augstāka precizitāte par vides novērtējumam vajadzīgo.

1.6. METOŽU APRAKSTI

Vielu izšķīdina destilētā ūdenī. Šķīduma koncentrācijai jābūt 90 % no vielas piesātināta šķīduma koncentrācijas; ja šī koncentrācija ir lielāka par 1 g/l, noteikšanu veic šķīdumam ar koncentrāciju 1 g/l. Virsmas spraigums nav jānosaka vielām, kuru šķīdība ir mazāka par 1 mg/l.

1.6.1. **Plātnes metode**

Sk. ISO 304 un NF T 73-060 (Virsmaktīvās vielas — virsmas spraiguma noteikšana, izmantojot šķidrumu plēvītes).

1.6.2. **Cilpas metode**

Sk. ISO 304 un NF T 73-060 (Virsmaktīvās vielas — virsmas spraiguma noteikšana, izmantojot šķidrumu plēvītes).

1.6.3. **Gredzena metode**

Sk. ISO 304 un NF T 73-060 (Virsmaktīvās vielas — virsmas spraiguma noteikšana, izmantojot šķidrumu plēvītes).

1.6.4. **ESAO gredzena metode**

1.6.4.1. *Aprīkojums*

Šo mērījumu veikšanai der pārdošanā esošie tenzometri. Šīs ierīces sastāv no šādiem mezgliem:

— grozāma parauga plate,

— dinamometrs,

— mērierīce (gredzens),

— mērtrauks.

1.6.4.1.1. Grozāma parauga plate

Grozāmo plati izmanto kā paliktni termostatējamam mērtraukam, kurā iepilda pārbaudāmo šķidrumu. Tas ir piestiprināts pie statīva kopā ar dinamometru.

1.6.4.1.2. Dinamometrs

Dinamometrs (sk. att.) atrodas virs parauga plates. Spēka mērījumu kļūda nedrīkst būt lielāka par ± 10 $^{-6}$ N, kas atbilst masas mērījumu kļūdai ± 0,1 mg. Pārdošanā esošo tenzometru mērījumu skala lielākoties kalibrēta mN/m mērvienībās, kas ļauj nolasīt virsmas spraiguma rādījumus tieši mN/m ar 0,1 mN/m precizitāti.

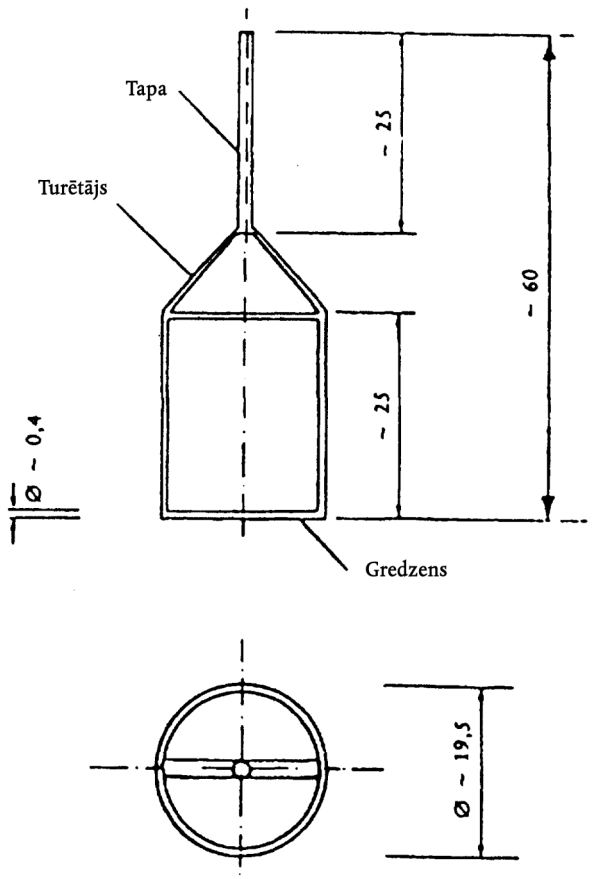
1.6.4.1.3. Mērierīce (gredzens)

Gredzenu parasti izgatavo no platīna-indija sakausējuma 0,4 mm stieples, un tā vidējais apkārtmērs ir 60 mm. Stieple parasti ir pacelta horizontālā virzienā no metāla tapas un stieples turētāja, lai izveidotu savienojumu ar dinamometru (sk. att.).

Attēls

Mērierīce

[Visi izmēri norādīti milimetros]



1.6.4.1.4. Mērtrauks

Mērtraukam, kurā ir pārbaudāmais šķīdums, jābūt izgatavotam no stikla un tam jābūt termostatējamam. Mērījumu laikā tā konstrukcijai jānodrošina nemainīga temperatūra pārbaudāmā šķīduma šķidrajā fāzē un gāzes fāzē (virs tās) un jānovērš parauga iztvaikošana. Šim nolūkam der stikla cilindri ar iekšējo diametru ne mazāku par 45 mm.

1.6.4.2. *Iekārtas sagatavošana*

1.6.4.2.1. Tīrīšana

Rūpīgi jāgādā par stikla trauku tīrību. Vajadzības gadījumā tos mazgā ar bihromāta šķīdumu un pēc tam ar sīrupveidīgu fosforskābi (83-98 masas % H_3PO_4), tad rūpīgi skalo ūdensvada ūdenī un visbeidzot skalo ar bidestilātu, kamēr iegūst neitrālu reakciju, un tad traukus žāvē vai skalo ar pārbaudāmo šķidrumu.

Gredzenu vispirms rūpīgi skalo ūdenī, lai atbrīvotos no ūdenī šķīstošām vielām, tad uz īsu brīdi to iegremdē bihromāta šķīdumā, skalo bidestilātā, kamēr iegūst neitrālu reakciju, un visbeidzot īslaicīgi karsē virs degoša metanola liesmas.

Piezīme:

No tādiem piemaisījumiem, kas nešķīst un nesadalās bihromāta šķīdumā vai fosforskābē, piemēram, no silikoniem, atbrīvojas, izmantojot piemērotu organisku šķīdinātāju.

1.6.4.2.2. Iekārtas kalibrēšana

Iekārtu sagatavojot mērīšanai, pārbauda nulles punktu un to noregulē tā, lai instrumenta rādījumi ļautu iegūt ticamus virsmas spraiguma mērījumu rezultātus mN/m.

Uzstādīšana

Iekārtu novieto horizontāli uz tenzometra pamatnes, piemēram, izmantojot līmeņrādi un regulējot līmeņotājskrūves pamatnē.

Nulles punkta iestatīšana

Pēc gredzena uzstādīšanas un pirms tā iegremdēšanas šķidrumā tenzometram iestata nulles punktu un pārliecinās, ka gredzena plakne ir paralēla šķidruma virsmai. Šim nolūkam šķidruma virsmu var izmantot kā spoguli.

Kalibrēšana

Iekārtas kalibrēšanu var veikt divējādi.

a) Ar atsvariem: izmantojot uz gredzena novietotus atsvaru jātnieciņus ar masu no 0,1 g līdz 1,0 g. Kalibrēšanas koeficientu $\Phi_{a,}$ ar kuru jāreizina visi instrumenta rādījumi, aprēķina pēc vienādojuma (1):

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

kur:

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

m = svaru jātnieciņa masa (g);

g = brīvās krišanas paātrinājums (981 cm s^{-2} jūras līmenī);

b = gredzena vidējais apkārtmērs (cm);

σ = tenzometra rādījums pēc jātnieciņa novietošanas uz gredzena (mN/m).

b) Ar ūdeni: izmantojot tīru ūdeni, kura virsmas spraigums, piemēram, 23 °C temperatūrā ir 72,3 mN/m. Šī procedūra ir vienkāršāka un ātrāka nekā kalibrēšana ar atsvariem, tomēr vienmēr pastāv iespēja, ka ūdens virsmas spraigums mainījies neliela virsmaktīvo vielu izraisīta piesārņojuma dēļ.

Kalibrēšanas koeficientu $\Phi_{b,}$ ar kuru jāreizina visi instrumenta rādījumi, aprēķina pēc vienādojuma (2):

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

Kur

σ_0 = ūdens virsmas spraiguma vērtība pēc literatūras avotu datiem (mN/m)

σ_g = ūdens virsmas spraiguma izmērītā vērtība (mN/m)

tajā pašā temperatūrā.

1.6.4.3. *Paraugu sagatavošana*

Analizējamās vielas izšķīdina ūdenī vajadzīgajā koncentrācijā, turklāt šķīdumā nedrīkst būt neizšķīdušas vielas daļiņas.

Šķīdumi jāuzglabā nemainīgā (± 0,5 °C) temperatūrā. Tā kā šķīduma virsmas spraigums mērtraukā mainās laika gaitā, jāveic vairāki mērījumi dažādā laikā un grafiski jāattēlo līkne, kas raksturo virsmas spraiguma izmaiņas laika ritumā. Ja izmaiņas vairs nenotiek, tad ir sasniegts līdzsvara stāvoklis.

Putekļi vai gāzveida vielu piemaisījumi ietekmē mērījumu rezultātus. Tāpēc mērījumi jāveic zem aizsargkupola.

1.6.5. **Testēšanas apstākļi**

Mērījumus veic aptuveni 20 °C temperatūrā, tās svārstības nedrīkst pārsniegt ± 0,5 °C.

1.6.6. **Testēšana**

Šķīdumu, kura virsmas spraigums jānosaka, pārnes rūpīgi izmazgātā mērtraukā, raugoties, lai tas neputotos, un pēc tam mērtrauku novieto uz mēraparāta galdiņa. Galdiņu ar mērtrauku paceļ, līdz gredzens iegrimst zem šķidruma, kura virsmas spraigums jānosaka. Tad plates virsu pakāpeniski un vienmērīgi nolaiž (ar ātrumu ap 0,5 cm/min), mēģinot atraut gredzenu no šķīduma virsmas, līdz sasniegts maksimālais spēks. Šķidruma slāni, kas saskaras ar gredzenu, nedrīkst atraut no gredzena. Pabeidzot mērījumu, gredzenu atkal iegremdē šķidrumā un atkārto mērījumus, kamēr iegūst nemainīgu virsmas spraiguma lielumu. Katram mērījumam jāatzīmē kopš šķīduma pārnešanas mērtraukā pagājušais laiks. Rezultātus nolasa brīdī, kad pielietots maksimālais spēks, mēģinot atraut gredzenu no šķidruma virsmas.

2. **DATI**

Virsmas spraiguma aprēķināšanai aparāta nolasījuma vērtību (mN/m) vispirms reizina ar kalibrēšanas koeficientu Φ_a vai Φ_b (atkarībā no izmantotās kalibrēšanas procedūras). Šādi iegūst tikai aptuvenu lielumu, kas ir jākoriģē.

Hārkinss un Džordans (4), veicot mērījumus ar gredzena metodi, empīriski noteica virsmas spraiguma korekcijas koeficientus, kas atkarīgi no gredzena izmēriem, šķidruma blīvuma un tā virsmas spraiguma.

Tā kā katram mērījumam noteikt korekcijas koeficientu pēc Hārkinsa un Džordana tabulām ir sarežģīti, ūdens šķīdumu virsmas spraiguma aprēķināšanai var izmantot vienkāršotu koriģēto virsmas spraiguma vērtību nolasīšanas procedūru tieši no tabulām. (Rādījumiem, kas nav atrodami tabulā, koriģēto vērtību iegūst interpolējot.)

TABULA: VIRSMAS SPRAIGUMA MĒRĪJUMU KOREKCIJA

Tikai ūdens šķīdumiem, $\rho \equiv 1$ g/cm^3

R = 9,55 mm (gredzena rādiusa vidējā vērtība)

r = 0,185 mm (gredzena stieples rādiuss)

Eksperimentāli noteiktā vērtība (mN/m)	Koriģētā vērtība (mN/m)	
	Kalibrēšana ar atsvariem (sk. 1.6.4.2.2. a))	Kalibrēšana ar ūdeni (sk. 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	—

Šī tabula sastādīta pēc Hārkinsa un Džordana korekcijas metodes. Tā ir līdzīga standartā DIN 53914 dotajai tabulai ūdenim un ūdens šķīdumiem (blīvums p = 1 g/cm^3) un gataviem nopērkamiem gredzeniem ar gredzena rādiusa vidējo vērtību R = 9,55 mm un gredzena stieples rādiusu r = 0,185 mm. Šajā tabulā ir iekļauti koriģētās virsmas spraiguma vērtības mērījumiem, ko veic pēc kalibrēšanas ar atsvariem vai pēc kalibrēšanas ar ūdeni.

Pastāv arī iespēja aprēķināt virsmas spraigumu bez iepriekšējas kalibrēšanas pēc šādas formulas:

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

kur

F = spēks, kas iedarbojas uz šķidruma virsmas slāni tā atraušanās brīdī (dinamometra rādījums);

R = gredzena rādiuss

f = korekcijas koeficients (1)

3. **PĀRSKATS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— lietotā metode,

— izmantotais ūdens vai šķīdums,

— vielas apraksts (identifikācija un piemaisījumi),

— — mērījumu rezultāti: virsmas spraigums (nolasījums), norādot gan atsevišķos nolasījumus, gan to vidējo aritmētisko vērtību, kā arī vidējā aritmētiskā koriģēto vērtību (ņemot vērā iekārtas koeficientu un korekcijas tabulu),

— šķīduma koncentrācija,

— temperatūra noteikšanas laikā,

— izmantotā šķīduma vecums; jo īpaši no šķīduma pagatavošanas līdz mērījumu veikšanai pagājušais laiks,

— virsmas spraiguma izmaiņas laikā pēc šķīduma pārnešanas mērtraukā,

— visa informācija un piezīmes, kas vajadzīgas uzdoto rezultātu interpretēšanai, jo īpaši dati par piemaisījumiem un vielas agregātstāvokli.

3.2. REZULTĀTU INTERPRETĒŠANA

Ņemot vērā, ka destilēta ūdens virsmas spraigums 20 °C temperatūrā ir 72,75 mN/m, vielas, kuru virsmas spraigums, kas noteikts pēc šīs metodes, ir mazāks par 60 mN/m, ir uzskatāmas par virsmaktīvām vielām.

4. **IZMANTOTĀ 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. ŠĶĪDĪBA ŪDENĪ

1. **METODE**

Aprakstīto metožu pamatā ir ESAO Testēšanas norādījumi (1).

1.1. IEVADS

Pirms šīs pārbaudes veikšanas ir lietderīgi jau iepriekš iegūt informāciju par pārbaudāmās vielas struktūrformulu, tvaika spiedienu, disociācijas konstanti un hidrolīzi (atkarībā no pH līmeņa).

Nav nevienas metodes, kas būtu izmantojama visā šķīdības diapazonā.

Abas turpmāk aprakstītās metodes aptver visu šķīdības diapazonu, taču nav izmantojamas gaistošu vielu šķīdības noteikšanai:

— no tām izmantojama praktiski tīru, ūdenī stabilu, slikti šķīstošu vielu šķīdības noteikšanai (< 10^{-2} grami litrā) – "kolonnas eluēšanas metode",

— otra izmantojama praktiski tīru, ūdenī stabilu, nedaudz labāk šķīstošu vielu šķīdības noteikšanai (> 10^{-2} grami litrā) – "kolbas metode".

Vielas šķīdība ūdenī var būtiski mainīties piemaisījumu ietekmē.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Vielas šķīdību ūdenī nosaka pēc vielas piesātinājuma masas koncentrācijas ūdenī kādā noteiktā temperatūrā. Šķīdību ūdenī norāda masas vienībās uz vienu šķīduma tilpuma vienību. SI mērvienība ir kg/m^3 (var izmantot arī g/l).

1.3. STANDARTVIELAS

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Aptuveno parauga daudzumu un laiku, kas vajadzīgs, lai sasniegtu piesātinājuma masas koncentrāciju, nosaka vienkāršotā orientējošā izmēģinājumā.

1.4.1. **Kolonnas eluēšanas metode**

Šīs metodes pamatā ir testējamās vielas eluēšana ar ūdeni no mikrokolonnas, kurā uz inerta nesēja, piemēram, stikla lodītēm vai smiltīm, ir testējamās vielas pārākuma pārklājums. Šķīdību ūdenī nosaka tad, kad eluāta masas koncentrācija kļūst nemainīga. Par to liecina koncentrācijas plato, kas uz šķīdības līknes iestājas pēc noteikta laika.

1.4.2. **Kolbas metode**

Ja izmanto šo metodi, vielu (cietas vielas jāsaberž pulverī) izšķīdina ūdenī temperatūrā, kas ir nedaudz augstāka par temperatūru, kurā nosaka šķīdību. Pēc piesātināta šķīduma iegūšanas maisījumu maisot atdzesē un tur testēšanas temperatūrā, līdz iestājas līdzsvars. Noteikšanu var veikt arī tieši tajā temperatūrā, kurai nosaka šķīdību, ja ar pienācīgu paraugu ņemšanas programmu var nodrošināt piesātinājuma līdzsvara sasniegšanu. Pēc tam ar piemērotu analīzes metodi nosaka vielas masas koncentrāciju ūdens šķīdumā, kas nedrīkst saturēt neizšķīdušas daļiņas.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

1.5.1. **Atkārtojamība**

Kolonnas eluēšanas metodei var sasniegt atkārtojamību < 30 %; pēc kolbas metodes atkārtojamībai jābūt < 15 %.

1.5.2. **Jutība**

Jutība ir atkarīga no noteikšanas metodes, tomēr ir iespējams noteikt masas koncentrācijas līdz pat 10^{-6} gramiem litrā.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Testēšanas apstākļi**

Testēšanu vēlams veikt 20 ± 0,5 °C temperatūrā. Ja šķīdība, iespējams, ir atkarīga no temperatūras (> 3 % per °C), šķīdība jānosaka arī temperatūrā, kas ir vismaz 10°C virs un vismaz 10°C zem sākotnēji izraudzītās noteikšanas temperatūras. Šādā gadījumā temperatūra jāmēra un jāuztur ar precizitāti ± 0,1 °C. Izraudzītā temperatūra pastāvīgi jāuztur visās attiecīgajās iekārtas daļās.

1.6.2. **Orientējoša noteikšana**

Pie apmēram 0,1 g parauga (cietvielas jāsaberž pulverī) graduētā cilindrā ar stikla aizbāzni istabas temperatūrā pievieno pieaugošā daudzumā destilētu ūdeni saskaņā ar tabulu:

0,1 g vielas, kas izšķīst "x" mililitros ūdens	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Aptuvenā šķīdība (grami litrā)	> 1000	1 000—2-00	200—100	100—50	50—10	10—1	< 1

Pēc katra norādītā ūdens daudzuma pievienošanas maisījumu enerģiski krata 10 minūtes un vizuāli konstatē, vai tajā vēl ir neizšķīdušas parauga daļiņas. Ja pēc 10 ml ūdens pievienošanas viss paraugs vai tā daļas nav izšķīdušas, noteikšana jāatkārto 100 ml cilindrā, ņemot lielākus ūdens daudzumus. Vielām ar zemāku šķīdību pilnīgai izšķīšanai vajadzīgais laiks var būt ievērojami lielāks (jāatstāj vismaz uz 24 stundām). Aptuvenā šķīdība ir norādīta tabulā zem tā pievienotā ūdens daudzuma, kurā notiek parauga pilnīga izšķīšana. Ja arī pēc tam viela ir acīmredzami pilnīgi neizšķīdusi, to atstāj uz ilgāku laiku par 24 h (ne vairāk kā līdz 96 stundām) vai atšķaidīšanu turpina, lai pārliecinātos par to, vai šķīdības noteikšana nebūs jāveic pēc kolonnas eluēšanas metodes.

1.6.3. **Kolonnas eluēšanas metode**

1.6.3.1. *Nesējs, šķīdinātājs un eluents*

Eluēšanas kolonnās jāizmanto inerts nesējs. Šim nolūkam var izmantot tādus materiālus kā stikla lodītes un smiltis. Pārbaudāmās vielas adsorbēšanai uz nesēja izmanto piemērotu analītiski tīru gaistošu šķīdinātāju. Par eluentu izmanto bidestilētu ūdeni, kas iegūts destilācijas aparātā no stikla vai kvarca.

Piezīme:

Nedrīkst izmantot ūdeni, kas iegūts, tieši izmantojot organiskos jonu apmaiņas sveķus.

1.6.3.2. *Nesēja uzpildīšana*

Apaļkolbā (50 ml) iesver apmēram 600 mg nesēja.

Iesver vajadzīgo pārbaudāmās vielas daudzumu un to izšķīdina izvēlētajā šķīdinātājā. Šo šķīdumu vajadzīgajā daudzumā pievieno nesējam. Šķīdinātāju pilnīgi iztvaicē, piemēram, rotācijas vakuumietvaicētājā; citādi sadalīšanās dēļ uz nesēja virsmas netiek panākta nesēja piesātināšanās ar ūdeni.

Nesēja uzpildīšana var radīt grūtības (kļūdainus rezultātus), ja pārbaudāmā viela nogulsnējas līdzīgi eļļai vai veido citu kristālisko fāzi. Šīs grūtības jāpārbauda eksperimentāli un rezultāti jāatspoguļo pārskatā.

Sagatavoto nesēju apmēram divas stundas mērcē aptuveni 5 ml ūdens, pēc tam suspensiju iepilda mikrokolonnā. Otra iespēja ir sausu sagatavotu nesēju ievadīt mikrokolonnā, kurā iepildīts ūdens, un apmēram divas stundas uzbriedināt.

Testēšanas gaita:

Vielas eluēšanu no nesēja var veikt divējādi:

— ar cirkulācijas sūkni (sk. 1. att.),

— ar savienoto trauku (sk. 4. att.).

1.6.3.3. *Eluēšanas kolonna ar cirkulācijas sūkni*

Aprīkojums

Parastā sistēma shematiski attēlota 1. att. Piemērota mikrokolonna redzama 2. att., lai gan var izmantot dažādu izmēru kolonnas, ja tās atbilst reproducējamības un atkārtojamības kritērijiem. Kolonnas augšdaļai jābūt neaizpildītai vismaz par pieciem ūdens slāņa tilpumiem un tajā jāietilpst vismaz pieciem paraugiem. Pastāv arī iespēja samazināt izmērus, ja sākotnējo piecu eluāta tilpumu papildināšanai, kuri izvadīti kopā ar piemaisījumiem, no jauna ievada šķīdinātāju.

Kolonnu pievieno cirkulācijas sūknim, ar kuru var regulēt šķidruma plūsmas līdz 25 ml/h. Sūkni pievieno, izmantojot politetrafluroetilēna (PTFE) un/vai stikla savienojumus. Pēc kolonnas un sūkņa uzstādīšanas jānodrošina iespēja ņemt efluenta paraugus un līdzsvarot augšgala tilpuma spiedienu ar atmosfēras spiedienu. Nesēju kolonnā palīdz saturēt neliels (5 mm) stikla vates tampons, kas vienlaicīgi aiztur arī neizšķīdušās daļiņas. Par cirkulācijas sūkni var izmantot, piemēram, peristaltisko sūkni vai membrānas sūkni (jāraugās, lai nenotiktu piesārņošana ar caurulīšu materiālu un/vai tā absorbcija.

Mērījumu procedūra

Kolonna sāk darboties. Ieteicamais plūsmas ātrums ir apmēram 25 ml/h (kas atbilst aprakstītās kolonnas 10 slāņa tilpumiem). (Vismaz) piecus pirmos slāņa tilpumus atmet, lai atdalītu ūdenī šķīstošos piemaisījumus. Tad iedarbina cirkulācijas sūkni, kamēr iestājas līdzsvars, par ko liecina pieci secīgi paraugi, kuru koncentrācija neatkarīgi no paraugu secības neatšķiras vairāk par ± 30 %. Šos paraugus ņem ar tādu laika intervālu, lai tajā pagūtu iziet tāds eluenta daudzums, kas atbilst vismaz 10 kolonnas slāņa tilpumiem.

1.6.3.4. *Eluēšanas kolonna ar savienoto trauku*

Aprīkojums (skat. 4. un 3. att.)

Savienotais trauks: Savienoto trauku kolonnai pievieno, izmantojot pieslīpēta stikla savienojumu, kas pievienots PTFE caurulei. Ieteicams izmantot plūsmas ātrumu ap 25 ml/h. Pēc secīgu eluāta frakciju savākšanas tās analizē, izmantojot izraudzīto metodi.

Mērījumu procedūra

Vielas šķīdības noteikšanai ūdenī ņem tās eluāta piecas secīgās vidējās frakcijas, kurās vielas koncentrācija nemainās (± 30 %).

Pēc abām metodēm (ar cirkulācijas sūkni un ar savienoto trauku) jāsagatavo otra paraugu sērija, ko iegūst ar divreiz mazāku eluēšanas ātrumu nekā pirmo. Ja pēc abām paraugu sērijām iegūtie rezultāti sakrīt, noteikšana veikta pareizi; ja ar mazāku plūsmas ātrumu noteiktā šķīdība ir lielāka, tad plūsmas ātrums divkārt jāsamazina tik ilgi, kamēr pēc divām secīgām paraugu sērijām iegūtie rezultāti sakrīt.

Abos gadījumos (izmantojot cirkulācijas sūkni vai savienoto trauku) jāpārbauda, vai frakcijas nesatur koloīdus, par ko liecina Tindala efekts (gaismas izkliede). Šādu daļiņu klātbūtne padara rezultātus neizmantojamus, un noteikšana jāatkārto pēc kolonnas filtrācijas spējas uzlabošanas.

Jāreģistrē katra parauga pH līmenis. Pārbaudi atkārto tādā pašā temperatūrā.

1.6.4. **Kolbas metode**

1.6.4.1. *Aprīkojums*

Kolbas metodei nepieciešams šāds aprīkojums:

— parastie laboratorijas trauki un iekārtas,

— pastāvīgā regulējamā temperatūrā šķīdumu maisīšanai piemērota ierīce,

— centrifūga (vēlams termostatējama), ja vajadzīga emulsijām, un

— iekārta analītiskai noteikšanai.

1.6.4.2. *Mērījumu procedūra*

Pārbaudāmās vielas daudzumu, kas nepieciešams vajadzīgā ūdens tilpuma piesātināšanai, vispirms nosaka orientējošā izmēģinājumā. Vajadzīgais ūdens daudzums ir atkarīgs no analīzes metodes un šķīdības. Katrā no trim stikla traukiem ar stikla aizbāzni (piemēram, centrifūgas mēģenēs vai kolbās) iesver apmēram piecreiz lielāku vielas daudzumu, nekā noteikts iepriekš. Katrā traukā iepilda izvēlēto ūdens tilpumu un traukus cieši noslēdz. Pēc tam noslēgto trauku saturu maisa 30 °C temperatūrā. (Jāizmanto kratītājs vai maisītājs, kas var darboties pastāvīgā temperatūrā, piemēram, jāmaisa ar magnētisko maisītāju termostatējamā ūdens vannā). Pēc vienas dienas vienu no traukiem izņem un atstāj uz 24 stundām izmēģinājuma temperatūrā, to periodiski sakratot, kamēr atkal iestājas līdzsvara stāvoklis. Trauka saturu tad centrifugē temperatūrā, kurā nosaka šķīdību, un ar piemērotu analītisko metodi nosaka vielas koncentrāciju dzidrajā ūdens šķīdumā. Līdzīgi rīkojas ar pārējām divām kolbām, kad attiecīgi divu un triju dienu laikā ir iestājies līdzsvars 30 °C temperatūrā. Ja iegūtie rezultāti vismaz pēdējos divos traukos atbilst vajadzīgajai reproducējamībai, uzskata, ka noteikšanas rezultāti ir apmierinoši. Izmēģinājums pilnībā jāatkārto, izmantojot ilgāku līdzsvara iestāšanās laiku, ja ar 1., 2. un 3. trauku iegūtajiem rezultātiem ir tendence paaugstināties.

Noteikšanu var veikt arī bez iepriekšējas inkubēšanas 30 °C temperatūrā. Lai noteiktu piesātinājuma iestāšanās ātrumu, paraugus ņem līdz laikam, kamēr analizējamā šķīduma koncentrācija vairs nav atkarīga no maisīšanas ilguma.

Jāreģistrē katra parauga pH līmenis.

1.6.5. **Analīze**

Šim nolūkam ieteicams izmantot analīzes metodi, kas piemērota tieši šai vielai, jo piemaisījumi pat nelielā daudzumā var radīt nopietnas kļūdas šķīdības mērījumu rezultātos. Kā piemēru var minēt šādas metodes: gāzes šķidruma hromatogrāfija, titrēšanas metodes, fotometriskās metodes, voltampērmetriskās metodes.

2. **DATI**

2.1. KOLONNAS ELUĒŠANAS METODE

Katrā izmēģinājumā jāaprēķina vismaz piecu secīgu paraugu vidējā vērtība, kuri ņemti nemainīgā piesātinājuma fāzē, kā arī standartnovirze. Rezultātus uzdod masas vienībās uz šķīduma tilpumu.

Salīdzinot divu noteikšanu rezultātu vidējās vērtības, kuri iegūti ar dažādiem plūsmas ātrumiem, to atkārtojamībai jābūt ne lielākai par 30 %.

2.2. KOLBAS METODE

Uzdod atsevišķi noteikšanas rezultātus no visām trijām kolbām un pēc rezultātiem, kuri uzskatāmi par vienādiem (atkārtojamība ne lielāka par 15 %), aprēķina vidējo vērtību, ko izsaka masas vienībās uz šķīduma tilpumu. Šajā gadījumā var gadīties, ka masas vienības jāpārvērš tilpuma vienībās, bet ja šķīdība ir ļoti augsta (> 100 g/l), jāizmanto blīvums.

3. **PĀRSKATS**

3.1. KOLONNAS ELUĒŠANAS METODE

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— iepriekšēja testa rezultāti,

— precīzs vielas apraksts (identifikācija un piemaisījumi),

— atsevišķi katram paraugam noteiktās koncentrācijas, plūsmas ātrumi un pH,

— no katras paraugu sērijas pēc vismaz pieciem paraugiem no piesātinājuma plato noteiktās vidējās vērtības un standartnovirzes,

— divu secīgu pieņemamu rezultātu sēriju vidējās vērtības,

— ūdens temperatūra piesātināšanas procesa laikā,

— izmantotā analīzes metode,

— izmantotais nesējs,

— nesēja sagatavošana noteikšanai,

— izmantotais šķīdinātājs,

— pierādījumi par vielas ķīmisko nestabilitāti noteikšanas laikā un izmantotā metode,

— visa informācija un piezīmes, kas vajadzīgas uzdoto rezultātu interpretēšanai, īpaši dati par piemaisījumiem un vielas agregātstāvokli.

3.2. KOLBAS METODE

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— iepriekšēja testa rezultāti,

— precīzs vielas apraksts (identifikācija un piemaisījumi),

— atsevišķo paraugu analīžu rezultāti un vidējās vērtības gadījumos, kad no vienas kolbas iegūti vairāki rezultāti, to vidējā vērtība,

— katra parauga reakcija pH,

— no vairākām kolbām iegūto sakrītošo rezultātu vidējā vērtība,

— noteikšanas temperatūra;

— izmantotā analītiskā metode,

— pierādījumi par vielas ķīmisko nestabilitāti noteikšanas laikā un izmantotā metode,

— visa informācija un piezīmes, kas vajadzīgas uzdoto rezultātu interpretēšanai, īpaši dati par piemaisījumiem un vielas agregātstāvokli.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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

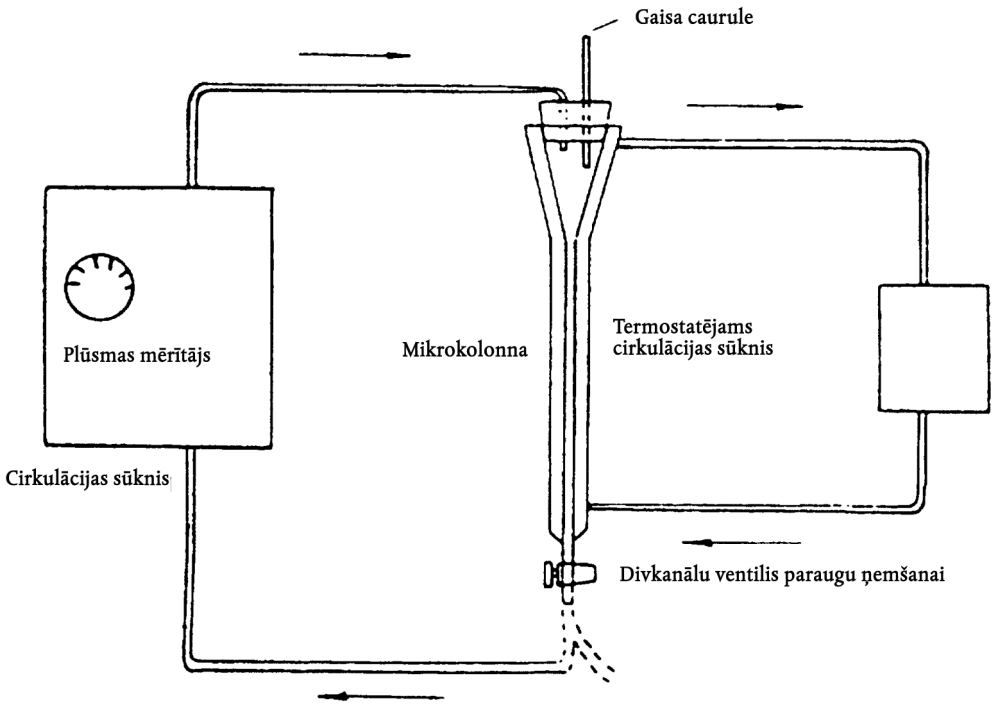
2) NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method

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

Papildinājums

1. attēls

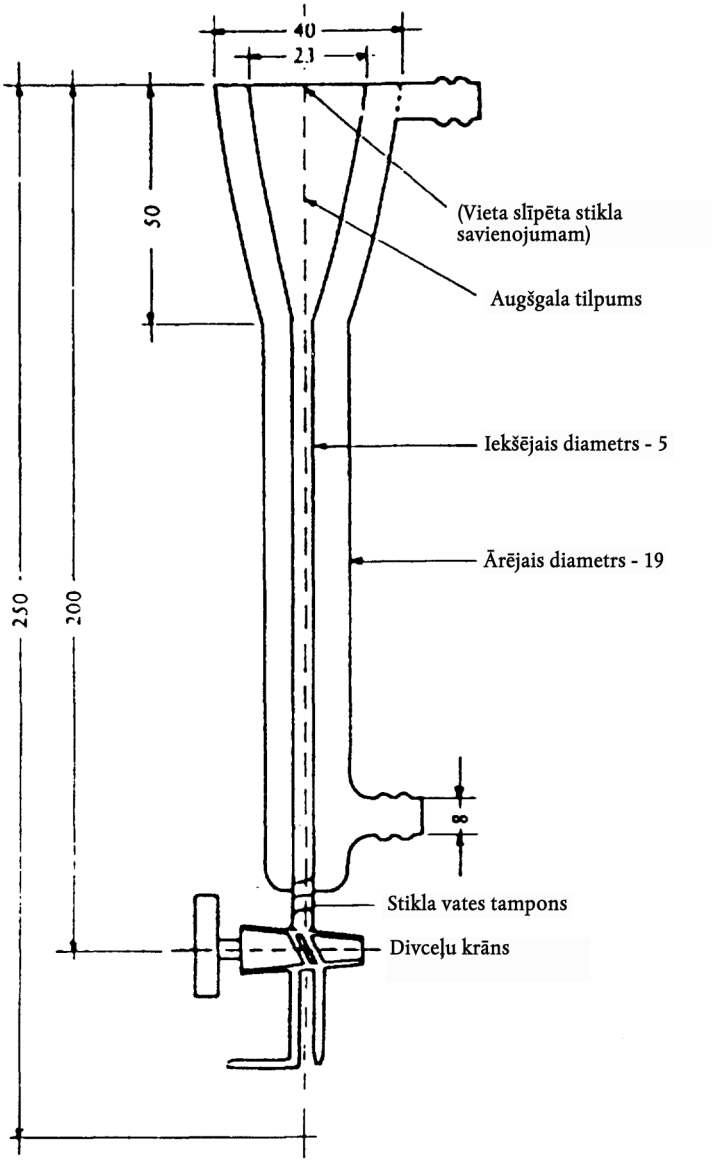
Eluēšanas kolonna ar cirkulācijas sūkni



2. attēls

Mikrokolonnas paraugs

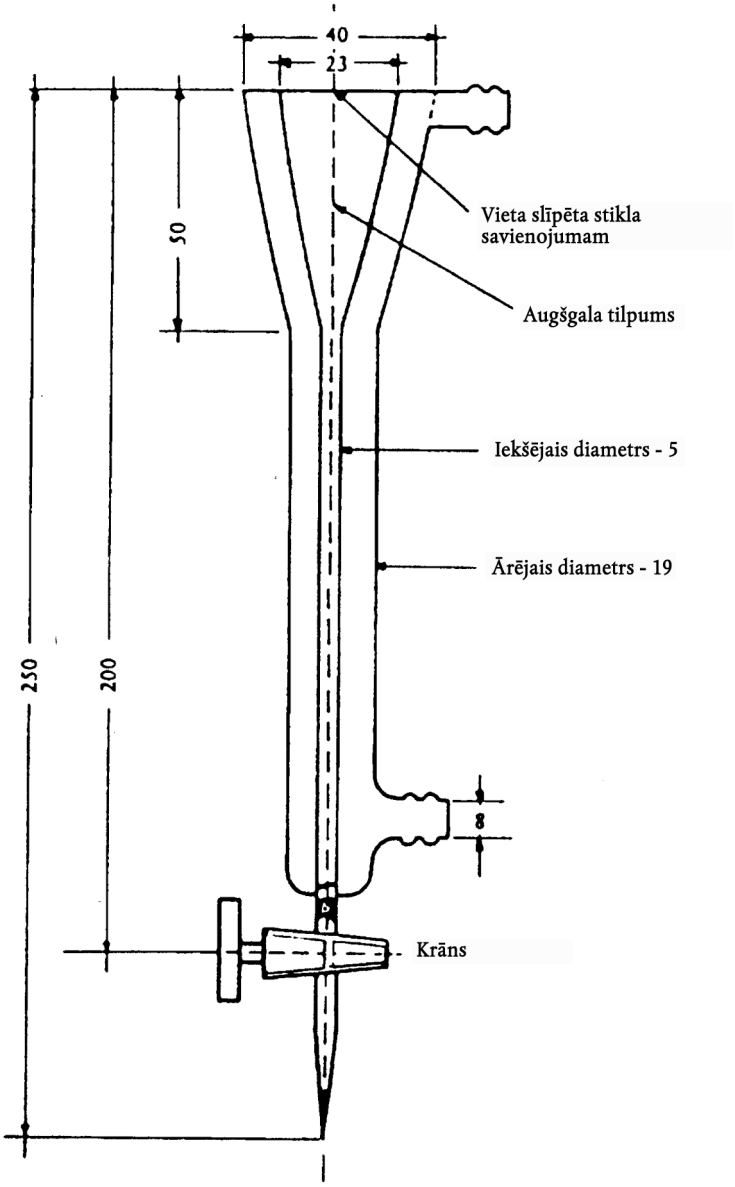
(Visi izmēri norādīti milimetros)



3. attēls

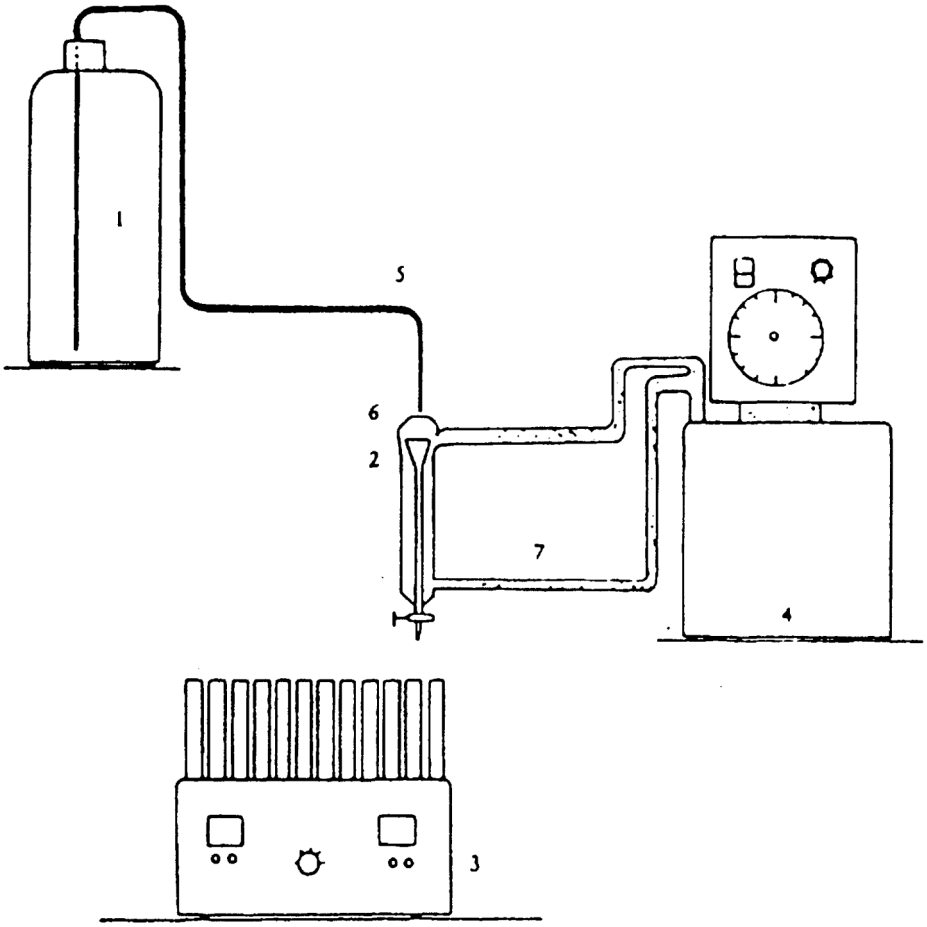
Mikrokolonnas paraugs

(Visi izmēri norādīti milimetros)



4. attēls

Eluēšanas kolonna ar līdzsvarošanas trauku



1 = Līdzsvarošanas trauks (piemēram, 2,5 l kolba)
2 = Kolonna (skat. 3. attēlu)
3 = Frakciju savācējs
4 = Termostats
5 = Teflona caurules
6 = Slīpēta stikla savienojums
7 = Ūdens līnija (starp termostatu un kolonnu, iekšējais diametrs: aptuveni 8 mm)

A.8. SADALĪŠANĀS KOEFICIENTS

1. **METODE**

Aprakstītās "kolbu kratīšanas" metodes pamatā ir ESAO Testēšanas norādījumi (1).

1.1. IEVADS

Pirms noteikt sadalīšanās koeficientu, ir lietderīgi iegūt sākotnēju informāciju par vielas struktūru, disociācijas konstanti, šķīdību ūdenī, hidrolīzi, šķīdību n-oktanolā un virsmas spraigumu.

To nosaka tikai jonizējamu vielu nejonizētajām formām (brīvām skābēm vai bāzēm), kas rodas, izmantojot piemērotu buferšķīdumu ar pH, kas ir vismaz vienu pH vienību zem (brīvām skābēm) vai vienu pH vienību virs (brīvām bāzēm) tās pK.

Šajā noteikšanās metodē ietilpst divas atsevišķas procedūras: "kolbu kratīšanas" metode un augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfija. Pirmo izmanto gadījumos, kad lg P_{ow} vērtība (sk. definīcijas turpmāk) ir no –2 līdz 4, bet otro – ja tā ir no 0 līdz 6. Pirms veikt eksperimentālu noteikšanu pēc kādas no minētajām metodēm, vispirms jāveic sadalīšanās koeficienta orientējoši aprēķini.

"Kolbu kratīšanas" metode izmantojama tikai praktiski tīrām vielām, kuras šķīst ūdenī un n-oktanolā. Tā nav izmantojama virsmaktīvām vielām (kurām norāda aprēķināto vērtību vai novērtējumu pēc šķīdības atsevišķi n-oktanolā un ūdenī).

Augstas izšķirtspējas šķidrumu hromatogrāfijas metode nav izmantojama stiprām skābēm un bāzēm, metālu kompleksajiem savienojumiem, virsmaktīvajām vielām un vielām, kuras reaģē ar eluentu. Šīm vielām uzdod sadalīšanās koeficenta aprēķināto vērtību vai pēc šķīdības atsevišķi n-oktanolā un ūdenī novērtēto vērtību.

Augstas izšķirtspējas šķidrumu hromatogrāfijas metode ir mazāk jutīga pret nosakāmās vielas piemaisījumiem nekā "kolbu kratīšanas" metode. Tomēr dažos gadījumos piemaisījumi apgrūtina rezultātu interpretāciju, jo ne vienmēr ir iespējama visu signālu identificēšana. Maisījumiem, kuri dod neidentificētu signālu, jānorāda lg P augšējās un apakšējās robežas.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Sadalīšanās koeficientu (P) definē kā izšķīdušās vielas līdzsvara koncentrāciju attiecību (q), iestājoties līdzsvaram divfāžu sistēmā, ko veido divi šķīdinātāji, kam ir savstarpēji ierobežota šķīdība. *n*-Oktanols/ūdens sistēmā

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{n-oktanols}}}{C_{\text{ūdens}}}$$

Tātad sadalīšanās koeficients (P) ir divu koncentrāciju attiecība, kas parasti izteikta decimāllogaritma veidā (lg P).

1.3. STANDARTVIELAS

"Kolbu kratīšanas" metode

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un pēc dažādām metodēm iegūto rezultātu salīdzināšanai.

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metode

Lai saistītu savienojuma hromatogrāfijas datus ar tā P vērtību, pēc vismaz 6 punktiem jāizveido kalibrēšanas grafiks par lg P vērtību atkarībā no hromatogrāfijas datiem. Piemērotas standartvielas izraugās pats metodes lietotājs. Visos iespējamajos gadījumos vismaz vienas standartvielas P_{ow} jābūt zemākai par šā rādītāja vērtību nosakāmajai vielai, bet otras – par to augstākai. Ja lg P ir mazāks par 4, kalibrēšanai izmanto pēc "kolbu kratīšanas" metodes iegūtos datus. Ja lg P ir lielāks par 4, kalibrēšanai var izmantot apstiprinātus literatūras datus, ja tie atbilst aprēķinātajām vērtībām. Precizitātes paaugstināšanai ir ieteicams izmantot standartvielas, kuru struktūra ir līdzīga nosakāmās vielas struktūrai.

Par daudzām ķīmisko vielu grupām ir publicēti (2) (3) plaši lg P_{ow} saraksti. Ja nav datu par sadalīšanās koeficientu vērtībām savienojumiem ar līdzīgu struktūru, var izmantot vispārīgāku kalibrēšanu pēc citām standartvielām.

Ieteicamo standartvielu saraksts un to P_{ow} vērtības dotas 2. papildinājumā.

1.4. METODES PRINCIPS

1.4.1. **"Kolbu kratīšanas" metode**

Lai noteiktu sadalīšanās koeficientu, jāiestājas līdzsvaram starp visiem mijiedarbībā esošiem sistēmas komponentiem un jānosaka abās fāzēs izšķīdušo vielu koncentrācija. Attiecīgās literatūras norādes liecina par to, ka šo problēmu var atrisināt ar dažādiem tehniskiem paņēmieniem, proti, atdalot abas fāzes pēc to rūpīgas sajaukšanas, lai noteiktu analizējamās vielas koncentrāciju, iestājoties līdzsvaram.

1.4.2. **Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metode**

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijai izmanto kolonnas ar gatavas nopērkamas cietās fāzes pildījumu, kas satur garas ogļūdeņražu virknes (piemēram, C_8, C_{18}), kas ķīmiski saistītas ar silīcija dioksīdu. Šādā kolonnā ievadītās vielas tajā pārvietojas ar dažādu ātrumu atšķirīgas sadalīšanās dēļ starp kustīgo fāzi un ogļūdeņražu nekustīgo fāzi. Ķīmisko vielu maisījumi eluējas to hidrofobitātes secībā, vispirms eluējas ūdenī šķīstošās vielas, bet pēc tam – eļļās šķīstošās vielas proporcionāli to sadalīšanās koeficientam ogļūdeņražos/ūdenī. Tas rada iespējas noteikt aiztures laika sakarību šādā (apgriezto fāžu) kolonnā ar sadalīšanās koeficientu n-oktanolā/ūdenī. Sadalīšanās koeficientu nosaka pēc ietilpības koeficienta k, kuru aprēķina šādi:

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

kur t_R = nosakāmās vielas aiztures laiks un t_o = vidējais laiks, kādā šķīdinātāja molekula iziet cauri kolonnai (tukšais laiks).

Kvantitatīva noteikšana nav vajadzīga, un ir jānosaka tikai eluēšanās laiki.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

1.5.1. **Atkārtojamība**

"Kolbu kratīšanas" metode

Lai nodrošinātu precīzu sadalīšanās koeficienta noteikšanu, jāveic divi mērījumi trīs dažādos režīmos, turklāt var mainīt pārbaudāmās vielas daudzumu un šķīdinātāju tilpumu attiecību. Eksperimentāli noteiktā sadalīšanās koeficienta decimāllogaritmu atšķirības nedrīkst pārsniegt ± 0,3 lg vienības.

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metode

Lai paaugstinātu mērījumu rezultātu ticamību, noteikšana jāveic divos atkārtojumos. Pēc atsevišķiem mērījumiem noteikto lg P vērtību atšķirības nedrīkst pārsniegt ± 0,1 lg vienības.

1.5.2. **Jutība**

"Kolbu kratīšanas" metode

Metodes mērījumu diapazons ir atkarīgs no analītiskās metodes noteikšanas robežas. Tai jādod iespējas noteikt lg P_{ow} vērtības robežās no −2 līdz 4 (atsevišķos gadījumos šo intervālu var paplašināt līdz lg P_{ow} vērtībām līdz pat 5), ja izšķīdušās vielas koncentrācija kādā no fāzēm nepārsniedz 0,01 mol/l.

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metode

Pēc augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metodes var noteikt sadalīšanās koeficientu lg P_{ow} vērtības intervālā no 0 līdz 6.

Parasti vielas sadalīšanās koeficientu var noteikt ar precizitāti ± 1 lg vienība salīdzinājumā ar "kolbu kratīšanas" metodi. Korelācijas norādītas literatūras avotos (4)(5)(6)(7)(8). Parasti augstāku precizitāti panāk, ja korelācijas grafikiem izmanto līdzīgas struktūras savienojumus (9).

1.5.3. **Specifiskums**

"Kolbu kratīšanas" metode

Nernsta sadalījuma likums attiecas tikai uz atšķaidītiem šķīdumiem, kuru temperatūra, spiediens un pH līmenis ir nemainīgi. To var droši piemērot tīrai vielai, kas sadalījusies starp diviem tīriem šķīdinātājiem. Ja vienā vai abās fāzēs vienlaicīgi atrodas vairākas izšķīdušas vielas, tas var ietekmēt iegūtos rezultātus.

Šķīdumā esošo molekulu disociācijas vai asociācijas dēļ novēro atkāpes no Nernsta sadalījuma likuma. Par šādām atkāpēm liecina tas, ka sadalījuma koeficients kļūst atkarīgs no šķīduma koncentrācijas.

Tā kā vienlaikus iestājas vairāki sadalījuma līdzsvari, šī metode bez attiecīgas korekcijas nav izmantojama jonizējamiem savienojumiem. Šajā gadījumā var mēģināt ūdens vietā izmantot buferšķīdumus; buferšķīduma pH vismaz par 1 pH vienību jāatšķiras no vielas pK_a, un jāņem vērā šā pH ietekme uz vidi.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sadalīšanās koeficienta orientējoša noteikšana**

Sadalīšanās koeficientu vēlams noteikt pēc aprēķinu metodes (sk. 1. papildinājumu) vai attiecīgos gadījumos pēc testējamās vielas šķīdības tīros šķīdinātājos (10).

1.6.2. **"Kolbu kratīšanas" metode**

1.6.2.1. *Sagatavošana*

n-Oktanols: Sadalīšanās koeficienta noteikšanai izmanto ļoti tīru analītisko reaģentu.

Ūdens: izmanto stikla vai kvarca destilācijas aparātā iegūtu destilētu vai bidestilētu ūdeni. Piemērotos gadījumos jonizējamu vielu sadalīšanās koeficienta noteikšanai ūdens vietā jāizmanto buferšķīdumi.

Piezīme:

Nedrīkst izmantot ūdeni, kas tieši iegūts, izmantojot jonu apmaiņas sveķus.

1.6.2.1.1. Šķīdinātāju iepriekšēja piesātināšana

Pirms noteikt sadalīšanās koeficientu, šķīdinātāju sistēmas fāzes tiek savstarpēji piesātinātas, kratot noteikšanas temperatūrā. Šim nolūkam iesaka mehāniskajā kratītājā uz 24 stundām ievietot divas lielas pudeles ar analītiski ļoti tīru *n*-oktanolu vai ūdeni, kam pietiekamā daudzumā pievienots arī otrs šķīdinātājs, un pēc tam nostādina, lai fāzes sadalītos un iestātos piesātinājums.

1.6.2.1.2. Sagatavošanās noteikšanai

Divfāžu sistēma pēc tilpuma piepilda gandrīz visu izmēģinājuma trauku. Šādi var novērst vielas iztvaikošanas zudumus. Izmantojamo vielu tilpumu attiecību un daudzumu izvēlas, pamatojoties uz:

— sadalīšanās koeficienta orientējošu novērtējumu (sk. iepriekš),

— nosakāmās vielas minimālo daudzumu, kas nepieciešams analīzes veikšanai,

— maksimālās koncentrācijas ierobežojumiem abām fāzēm, kas ir 0,01 mols/l.

Jāveic trīs izmēģinājumi. Pirmajā izmanto aprēķināto n-oktanola un ūdens attiecību; otrajā šo attiecību samazina uz pusi; trešajā to divas reizes palielina (piemēram, 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Pārbaudāmā viela

Pagatavo vielas standartšķīdumu n-oktanolā, kas piesātināts ar ūdeni. Standartšķīduma faktisko masas koncentrāciju nosaka precīzi, pirms to izmanto sadalīšanās koeficienta noteikšanai. Šo šķīdumu glabā apstākļos, kuros tiek nodrošināta to stabilitāte.

1.6.2.2. *Testa apstākļi*

Testēšanas laikā jānodrošina nemainīga (± 1 °C) temperatūra no 20 līdz 25 °C diapazonā.

1.6.2.3. *Mērījumu procedūra*

1.6.2.3.1. Sadalījuma līdzsvara iestāšanās

Izmantošanai katrā noteikšanas režīmā sagatavo divus izmēģinājuma traukus, kas satur abus šķīdinātājus precīzi nomērītā daudzumā, kā arī standartšķīdumu vajadzīgā daudzumā.

n-oktanola fāzes mēra pēc tilpuma. Abi izmēģinājuma trauki jāievieto kratītājā vai tie jākrata ar roku. Izmantojot centrifūgas mēģenes, tās ieteicams ātri griezt par 180° ap šķērsasi tā, lai tajās esošais gaiss paceltos cauri abām fāzēm. Pieredze liecina, ka sadalīšanās līdzsvars iestājas pēc apmēram 50 šādiem apgriezieniem. Precizitātes labad ieteicams izdarīt 100 šādus apgriezienus piecu minūšu laikā.

1.6.2.3.2. Fāžu atdalīšana

Lai atdalītu fāzes, maisījums jācentrifugē. Šim nolūkam izmanto laboratorijas centrifūgu istabas temperatūrā vai, ja centrifūgai nav termostata, centrifūgas stobriņi pirms analīzes vismaz vienu stundu jāuzglabā noteikšanas temperatūrā, lai atkal iestātos līdzsvars.

1.6.2.4. *Analīze*

Lai iegūtu sadalījuma koeficientu, jānosaka pārbaudāmās vielas koncentrācija abās fāzēs. To var izdarīt, paņemot no katras mēģenes visos pārbaudes režīmos alikvoto daļu no abām fāzēm un analizējot tās pēc izvēlētās metodes. Aprēķina vielas kopējo daudzumu abās fāzēs un salīdzina to ar sākotnēji ievadīto vielas daudzumu.

Ūdens fāzes paraugi jāņem tā, lai samazinātu iespējas paraugā iekļūt n-oktanolam: ūdens fāzes paraugu ņemšanai var izmantot stikla šļirci ar maināmu adatu. Sākumā šļircei jābūt daļēji piepildītai ar gaisu. Gaisu lēni izspiež, adatu vadot caur oktanola slāni. Šļircē iesūc vajadzīgo ūdens fāzes daudzumu. Šļirci ātri izvelk no šķīduma un noņem adatu. Šļirces saturu var izmantot par ūdens fāzes paraugu. Vielas koncentrāciju abās atdalītajās fāzēs vēlams noteikt ar attiecīgajai vielai piemērotu metodi. Iespējamās analīžu metodes ir:

— fotometriskās metodes,

— gāzu hromatogrāfija,

— augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfija.

1.6.3. **Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metode**

1.6.3.1. *Sagatavošana*

Aprīkojums

Ar sūkni, kas nerada pulsācijas, aprīkots šķidruma hromatogrāfs ar piemērotu detektēšanas ierīci. Ieteicams izmantot inžekcijas vārstu ar inžektora cilpu. Polāru grupu klātbūtne nekustīgajā fāzē var nopietni pasliktināt kolonnas darbības efektivitāti. Tāpēc nekustīgajā fāzē jābūt iespējami mazam polāro grupu saturam (11). Var izmantot gatavas nopērkamas kolonnas ar pildījumu vai mikrodaļiņu apgrieztās fāzes pildījumu. Starp inžekcijas sistēmu un analītisko kolonnu var uzstādīt aizsargkolonnu.

Kustīgā fāze

Eluentu pirms lietošanas degazē, un tā pagatavošanai izmanto HPLC tīrības pakāpes metanolu un HPLC tīrības pakāpes ūdeni. Izmanto izokrātisko eluēšanu. Jāizmanto metanola/ūdens maisījumi ar minimālo ūdens saturu 25 %. Parasti ar metanola-ūdens maisījumu 3:1 (v/v) stundas laikā ar plūsmas ātrumu 1 ml/min eluējas savienojumi, kuru lg P ir 6. Savienojumiem ar augstu lg P vērtību (un arī standartvielām) eluēšanas laiks var būt jāsamazina, samazinot kustīgās fāzes polaritāti vai kolonnas garumu.

Vielām ar ļoti zemu šķīdību n-oktanolā pēc augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metodes nosaka stipri pazeminātas lg P_{ow} vērtības; šādu vielu signāli dažkārt ir kopā ar šķīdinātāja fronti. Iespējams, tas ir tādēļ, ka sadalīšanās process notiek pārāk lēni, lai sasniegtu līdzsvaru laikā, kādā parasti augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijā notiek sadalīšanās pa fāzēm. Šādos gadījumos ticamas vērtības noteikšanai var noderēt plūsmas ātruma un vai metanola/ūdens attiecības samazināšana.

Lai nosakāmo vielu un standartvielu varētu detektēt, tām jābūt pietiekamā koncentrācijā šķīstošām kustīgajā fāzē. Piedevas metanola-ūdens maisījumam izmanto tikai izņēmuma gadījumos, jo piedevu ietekmē mainās kolonnas īpašības. Hromatogrammām ar piedevām obligāti jāizmanto tāda paša veida atsevišķa kolonna. Ja metanola-ūdens maisījumu izmantot nevar, var lietot citus maisījumus, piemēram, etanola ūdens vai acetonitrila- ūdens maisījumu.

Jonizējamiem savienojumiem ļoti svarīgs eluenta pH. Tam jābūt kolonnas pH darbības intervālā, kas parasti ir no 2 līdz 8. Ieteicams izmantot buferšķīdumus. Jāraugās, lai nenotiktu sāļu nogulsnēšanās un kolonnas bojāšanās, kuru izraisa daži organiskās fāzes/buferu maisījumi. Nav ieteicams augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijai izmantot nekustīgās fāzes uz silīcija dioksīda bāzes ar pH virs 8, jo bāziska kustīgā fāze var izraisīt strauju kolonnas efektivitātes pasliktināšanos.

Šķīdumi

Jāizmanto iespējami tīras standartvielas. Kalibrēšanai izmantojamās vielas, ja iespējams, jāšķīdina kustīgajā fāzē.

Testēšanas apstākļi

Mērījumu laikā temperatūra nedrīkst mainīties vairāk par ± 2 K.

1.6.3.2. *Mērījumi*

Tukšā laika t_0 aprēķināšana

Tukšo laiku t_0 var noteikt, izmantojot homologu sērijas (piemēram, n-alkilmetilketonus) vai organiskos savienojumus, kas netiek aizturēti (piemēram, tiourīnviela vai formamīds). Tukšā laika t_0 aprēķināšanai, izmantojot homologus, injicē vismaz septiņus homologus un nosaka to aiztures laikus. Neapstrādātus aiztures laikus $t_r(n_c+ 1)$ izsaka kā $t_r(n_c)$ funkciju, izmantojot regresijas vienādojuma brīvo locekli a un virziena koeficientu b:

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

(n_c = ir oglekļa atomu skaits). Tukšo laiku t_0 tad aprēķina šādi:

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

Kalibrēšanas līkne

Nākamais posms ir attiecīgajām standartvielām noteikt lg k korelāciju ar lg P vērtībām. Praktiski vienlaicīgi injicē un nosaka aiztures laikus 5 līdz 10 tādām standartvielām, kuru lg P ir sagaidāmajā intervālā, vēlams izmantot reģistrējošu integratoru, kas savienots ar detektēšanas sistēmu. Aprēķina ietilpības koeficientu k attiecīgos logaritmus, kurus izsaka kā lg P funkciju, kas noteikta pēc "kolbu kratīšanas" metodes. Kalibrēšanu veic regulāri vismaz reizi dienā, tā lai varētu ņemt vērā iespējamās kolonnas efektivitātes izmaiņas.

Testējamās vielas ietilpības koeficienta noteikšana

Testējamo vielu injicē iespējami mazā kustīgās fāzes daudzumā. Nosaka aiztures laiku (divos atkārtojumos), pēc kura aprēķina ietilpības koeficientu k. Pēc standartvielu korelācijas grafika interpolē nosakāmās vielas sadalīšanās koeficientu. Ļoti zemas un ļoti augstas sadalīšanās koeficienta vērtības ir jānosaka ekstrapolējot. Šādos gadījumos īpaša vērība jāveltī regresijas līnijas ticamības robežām.

2. **DATI**

"Kolbu kratīšanas" metode

Noteikto P vērtību ticamību var pārbaudīt, salīdzinot divu mērījumu vidējo vērtību ar kopējo vidējo vērtību.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi);

— gadījumos, kad aprakstītās metodes nav izmantojamas (piemēram, virsmaktīvām vielām), norāda aprēķināto vērtību vai novērtējumu pēc šķīdības atsevišķi n-oktanolā un ūdenī,

— visa informācija un piezīmes, kas vajadzīgas uzdoto rezultātu interpretēšanai, īpaši dati par piemaisījumiem un vielas agregātstāvokli.

"Kolbu kratīšanas" metodei:

— orientējošas noteikšanas rezultāti, ja tā veikta,

— temperatūra noteikšanas laikā,

— dati par analītisko metodi, kas izmantota koncentrācijas noteikšanai,

— centrifugēšanas ilgums un ātrums, ja to izmanto,

— noteiktās koncentrācijas abās fāzēs katrai noteikšanai (tas nozīmē, ka pavisam jānorāda 12 koncentrācijas),

— nosakāmās vielas masa, katras fāzes tilpums katrā izmēģinājuma traukā un pārbaudāmās vielas kopējais aprēķinātais daudzums katrā fāzē pēc līdzsvara iestāšanās,

— pārskatā jāiekļauj aprēķinātās sadalīšanās koeficienta (P) vērtības katrā testa režīmā, kā arī mērījumu rezultātu vidējās vērtības. Ja var secināt, ka sadalīšanās koeficients ir atkarīgs no koncentrācijas, tas jānorāda pārskatā,

— jānorāda atsevišķo P vērtību standartnovirzes no vidējās vērtības;

— jānorāda arī visu mērījumu vidējās P vērtības decimāllogaritms,

— aprēķinātā teorētiskā P_{ow} vērtība, ja tāda ir noteikta vai ja mērījumu rezultāts ir > 10^4;

— izmantotā ūdens un ūdens fāzes pH līmenis eksperimenta laikā;

— ja izmanto buferšķīdumus, jāpamato, kāpēc tie izmantoti ūdens vietā, buferšķīdumu sastāvs, koncentrācija un pH, ūdens fāzes pH noteikšanas sākumā un beigās.

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metodei:

— orientējošas noteikšanas rezultāti, ja tā veikta,

— nosakāmā viela, standartvielas, to tīrība,

— noteikšanas temperatūru intervāls,

— pH, kādā veikta noteikšana,

— analītiskās kolonnas un aizsargkolonnas, kustīgās fāzes un detektēšanas līdzekļu apraksts,

— kalibrēšanai izmantoto standartvielu aiztures laiku un literatūrā norādītās lg P vērtības,

— regresijas (lg k atkarībā no lg P) dati,

— testējamās vielas vidējais aiztures laiks un interpolētā lg P vērtība,

— iekārtas un tās darbības režīma apraksts,

— eluēšanās raksturojums,

— kolonnā ievadītie testējamās vielas un standartvielu daudzumi,

— tukšais laiks un tā noteikšanas paņēmiens.

4. **IZMANTOTĀ 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 and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. papildinājums

Aprēķinu/novērtēšanas metodes

IEVADS

Vispārīgs aprēķinu metožu apskats, dati un piemēri ir atrodami rokasgrāmatā *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (a).

P_{ow} aprēķinātās vērtības var izmantot:

— piemērotāko eksperimentālo metožu izvēlei ("kolbu kratīšanas" metode: lg P_{ow}: –2 līdz 4, HPLC metode: lg P_{ow}: 0 līdz 6),

— piemērotāko noteikšanas apstākļu izvēlei (piemēram, lai izraudzītos standartvielas HPLC metodei, n-oktanola/ūdens tilpuma attiecības noteikšanai "kolbu kratīšanas" metodei),

— laboratorijas iekšējai pārbaudei iespējamo eksperimentālo kļūdu noteikšanai,

— gadījumos, kad tehnisku iemeslu dēļ P_{ow} nav iespējams noteikt eksperimentāli, tā novērtētās vērtības noteikšanai.

NOVĒRTĒJUMA METODE

Sadalīšanās koeficienta orientējoša novērtēšana

Sadalīšanās koeficienta vērtību var novērtēt pēc testējamās vielas šķīdības tīros šķīdinātājos.

Šajā gadījumā: aptuvenais P novērtējums = piesātinājuma koncentrācija *n*-oktanolā (C)/piesātinājuma koncentrācija ūdenī (C).

$$P_{\text{novērtētais}} = \frac{\text{piesātinājuma koncentrācija } c_{\text{n-oktanolā}}}{\text{piesātinājuma koncentrācija } c_{\text{ūdenī}}}$$

APRĒĶINA METODES

Aprēķinu metožu būtība

Visu aprēķina metožu pamatā ir molekulas formāla sadalīšana struktūrelementos ar zināmu lg P_{ow}. Visas molekulas lg P_{ow} aprēķina kā attiecīgo struktūrelementu summu, kurai pieskaita iekšmolekulārās mijiedarbības korekciju.

Struktūrelementu fragmentu konstantes un korekcijas atrodamas (b)(c)(d)(e). Daļa no tiem tiek regulāri atjaunināti un papildināti (b).

Kvalitātes kritēriji

Parasti aprēķinu metodes ticamība pazeminās, paaugstinoties testējamā savienojuma struktūras sarežģītībai. Vienkāršām molekulām ar nelielu molekulmasu un vienu vai divām funkcionālajām grupām pēc dažādām sadalīšanās metodēm noteiktās lg P_{ow} vērtības var atšķirties no eksperimentāli noteiktajām par 0,1 līdz 0,3 vienībām. Sarežģītākas struktūras savienojumiem šīs atšķirības var būt lielākas. Tās ir atkarīgas no struktūrfragmentu konstanšu pieejamības un to ticamības, kā arī iespējām ņemt vērā iekšmolekulāro mijiedarbību (piemēram, ūdeņraža saites), un korekciju pareizu ieviešanu (šī problēma ir mazāka, izmantojot datorprogrammu CLOGP-3) (b). Savienojumiem, kas jonizējas, svarīgi ir pareizi ņemt vērā lādiņu vai jonizācijas pakāpi.

Aprēķināšanas procedūras

Henša π-metode

Sākotnēji hidrofobā aizvietotāja konstanti π_x ieviesa *Fujita* u.c. π_x definē šādi:

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

kur P_{ow} (PhX) ir aromātiskā atvasinājuma sadalīšanās koeficients un P_{ow} (PhH) izejas savienojuma sadalīšanās koeficients

$$(\text{e.g. } \pi_{Cl} = \lg P_{ow} (C_6H_5Cl) - \lg P_{ow} (C_6H_6)$$

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

Saskaņā ar definīciju π-metode galvenokārt izmantojama aizvietotajiem aromātiskajiem savienojumiem. Ļoti lielam skaitam aizvietotāju π vērības apkopotas tabulu veidā (b)(c)(d). Tās izmantojamas aromātisko savienojumu vai struktūrelementu lg P_{ow} aprēķināšanai.

Rekera metode

Pēc Rekera (g) lg P_{ow} vērtību aprēķina šādi:

$$\log P_{ow} \sum_i a_i f_i \sum_i (\text{korekcijas locekļi})$$

kur f_i ir dažādu molekulas fragmentu konstantes un a_i ir to parādīšanās biežums pētamajā molekulā. Korekcijas locekļus var izteikt vienas konstantes C_m (t.s. "maģiskās konstantes") veselu skaitļu daudzkārtņu veidā. Struktūras fragmentu konstantes f_i un C_m noteiktas pēc 1 054 eksperimentāli iegūtām P_{ow} vērtībām (825 savienojumi), izmantojot daudzfaktoru regresijas analīzi (c)(h). Korekcijas locekļus nosaka pēc literatūrā (e)(h)(i) aprakstītajiem noteikumiem.

Henša-Leo metode

Pēc Henša un Leo (c) lg P_{ow} vērtību aprēķina šādi:

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

kur f_i ir dažādu molekulas fragmentu konstantes, F_i ir korekcijas locekļi, bet a_i b_j to parādīšanās biežums. Ar mēģinājumu un kļūdu metodi, izmantojot eksperimentāli noteiktās P_{ow} vērtības, sastādīts atomu un grupu fragmentu vērtību korekcijas locekļu F_j (t.s. "koeficientu") saraksts. Korekcijas locekļi iedalīti vairākās klasēs (a)(c). Ņemt vērā visus noteikumus un korekcijas locekļus ir diezgan sarežģīti, un tas prasa daudz laika. Šim nolūkam ir izstrādāta īpaša programmatūra (b).

Kombinētā metode

Sarežģītām molekulām lg P_{ow} aprēķinus var ievērojami uzlabot, ja molekulu dala lielākos struktūras fragmentos, kuriem noteiktas ticamas lg P_{ow} vērtības, pēc tabulām (b) (c) vai pašu veiktos eksperimentos. Šādus fragmentus (piemēram, heterocikli, antrahinons, azobenzols) pēc tam var apvienot ar Henša π vērtībām vai Rekera vai Leo fragmentu konstantēm.

Piezīmes

i) Aprēķinu metodes var izmantot tikai daļēji vai pilnīgi jonizētiem savienojumiem, kad ir iespējams ņemt vērā vajadzīgos korekcijas koeficientus.

ii) Ja iespējams, ka savienojumā ir iekšmolekulāras ūdeņraža saites, jāpievieno attiecīgie korekcijas locekļi (apmēram + 0,6 līdz + 1,0 lg P_{ow} vienības) (a). Norādes par šādu saišu esamību var iegūt pēc molekulu struktūras telpiskajiem modeļiem vai spektroskopijas datiem.

iii) Ja savienojumam iespējamas vairākas tautomērās formas, aprēķinus izdara pēc iespējamākās no tām.

iv) Uzmanīgi jāseko struktūrfragmentu konstanšu tabulu pārskatīšanai.

Pārskats

Izmantojot aprēķinu/novērtēšanas metodes, testēšanas pārskatā, ja iespējams, iekļauj šādu informāciju:

— vielas apraksts (maisījums, piemaisījumi, u.c.),

— norādes uz iespējamajām iekšmolekulārajām saitēm, disociāciju, lādiņu un dažādiem citiem neraksturīgiem efektiem (piemēram, tautomēriju),

— aprēķinu metodes apraksts,

— datubāzes identifikācija vai izmantotie dati,

— struktūrfragmentu izraudzīšanās īpatnības,

— aprēķinu sīka dokumentēšana.

LITERATŪRA

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. papildinājums

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijai ieteicamās standartvielas

Nr.	Standartviela	lg P_{ow}	pKa
1	2-Butanons	0,3	
2	4-Acetilpiridīns	0,5	
3	Anilīns	0,9	
4	Acetanilīds	1,0	
5	Benzilspirts	1,1	
6	p-Metoksifenols	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoksietiķskābe	1,4	pKa = 3,12
8	Fenols	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrofenols	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitrils	1,6	
11	Fenilacetonitrils	1,6	
12	4-Metilbenzilspirts	1,6	
13	Acetofenons	1,7	
14	2-Nitrofenols	1,8	pKa = 7,17
15	3-Nitrobenzoskābe	1,8	pKa = 3,47
16	4–Hloranilīns	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzols	1,9	
18	Kanēļspirts	1,9	
19	Benzoskābe	1,9	pKa = 4,19
20	*p*-Krezols	1,9	pKa = 10,17
21	Kanēļskābe	2,1	pKa = 3,89 *cis* 4,44 *trans*
22	Anizols	2,1	
23	Metilbenzoāts	2,1	
24	Benzols	2,1	
25	3-Metilbenzoskābe	2,4	pKa = 4,27
26	4-Hlorfenols	2,4	pKa = 9,1
27	Trihloretilēns	2,4	
28	Atrazīns	2,6	
29	Etilbenzoāts	2,6	
30	2,6-Dihlorbenzonitrils	2,6	
31	3-Hlorbenzoskābe	2,7	pKa = 3,82
32	Toluols	2,7	
33	1-Naftols	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Dihloranilīns	2,8	
35	Hlorbenzols	2,8	
36	Alilfenilēteris	2,9	
37	Brombenzols	3,0	
38	Etilbenzols	3,2	
39	Benzofenons	3,2	
40	4-Fenilfenols	3,2	pKa = 9,54
41	Timols	3,3	
42	1,4-Dihlorbenzols	3,4	
43	Difenilamīns	3,4	pKa = 0,79
44	Naftalīns	3,6	
45	Fenilbenzoāts	3,6	
46	Izopropilbenzols	3,7	
47	2,4,6-Trihlorfenols	3,7	pKa = 6
48	Bifenils	4,0	
49	Benzilbenzoāts	4,0	
50	2,4-Dinitro-6 sec. butilfenols	4,1	
51	1,2,4-Trihlorbenzols	4,2	
52	Dodekānskābe	4,2	
53	Difenilēteris	4,2	
54	n-Butilbenzols	4,5	
55	Fenantrēns	4,5	
56	Fluorantrēns	4,7	
57	Dibenzils	4,8	
58	2,6-Difenilpiridīns	4,9	
59	Trifenilamīns	5,7	
60	DDT	6,2	
	Citas standartvielas ar zemu lg P_{ow} vērtību		
1	Nikotīnskābe	-0,07	

A.9. UZLIESMOŠANAS TEMPERATŪRA

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Pirms šīs pārbaudes veikšanas ir lietderīgi jau iepriekš iegūt informāciju par vielas uzliesmojamību. Šī metode izmantojama šķidrumiem, kuru tvaiki var uzliesmot aizdegšanās avotu ietekmē. Ar šeit aplūkotajām noteikšanas metodēm var iegūt ticamus rezultātus tikai tajā uzliesmošanas temperatūras diapazonā, kas noteikts katrai atsevišķai metodei.

Izraugoties noteikšanas metodi, jāņem vērā iespējas notikt ķīmiskām reakcijām starp vielu un paraugu turētāju.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Uzliesmošanas temperatūra ir zemākā atmosfēras spiedienam 101,325 kPa koriģētā temperatūra, kurā testēšanas metodē definētajos apstākļos no šķidruma izdalās tvaiki tādā daudzumā, ka testēšanas traukā veidojas uzliesmojošs tvaika/gaisa maisījums.

Mērvienības °C

$t = T - 273{,}15$

(t atbilst °C, bet T norādīts K mērvienībās)

1.3. STANDARTVIELAS

Testējot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un pēc dažādām metodēm iegūto rezultātu salīdzināšanai.

1.4. METODES PRINCIPS

Vielu pārnes testēšanas traukā un silda vai dzesē līdz testēšanas temperatūrai konkrētajā testēšanas metodē noteiktajā kārtībā. Lai pārliecinātos, vai paraugs testēšanas temperatūrā aizdegas, veic aizdedzināšanas mēģinājumus.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

1.5.1. **Atkārtojamība**

Atkārtojamība ir atkarīga no uzliesmošanas temperatūras intervāla un izmantotās noteikšanas metodes; līdz 2 °C.

1.5.2. **Jutība**

Jutība ir atkarīga no izmantotās noteikšanas metodes.

1.5.3. **Specifiskums**

Dažas noteikšanas metodes izmantojamas tikai noteiktā uzliesmošanas temperatūras diapazonā un ir atkarīgas no vielas īpašībām (piemēram, no viskozitātes).

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanās**

Testējamās vielas paraugu ievieto noteikšanas iekārtā saskaņā ar 1.6.3.1. un/vai 1.6.3.2. punktu.

Drošības labad, testējot stipri iedarbīgas vai toksiskas vielas, ieteicams izmantot nelielu paraugu – apm. 2 cm^3.

1.6.2. **Noteikšanas apstākļi**

Ciktāl tas atbilst drošības prasībām, aparātam jāatrodas vietā, kur nedarbojas velkme un kas ir pasargāta no caurvēja.

1.6.3. **Noteikšana**

1.6.3.1. *Līdzsvara metode*

Sk. standartus ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Bezlīdzsvara metode*

Ābela iekārta

Sk. standartus BS 2000 (170. daļa), NF M07-011, NF T66-009.

Ābela-Penska iekārta

Sk. standartus EN 57, DIN 51755 1. daļu (temperatūras diapazons 5 - 65 °C), DIN 51755 2. daļu (temperatūra zem 5 °C), NF M07-036.

Taga iekārta

Sk. ASTM D 56.

Penska-Martensa iekārta

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

Piezīmes:

Ja ar 1.6.3.2. punktā minēto bezlīdzsvara metodi noteiktā uzliesmošanas temperatūra ir 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C, 55 ± 2 °C, tā jāapstiprina ar līdzsvara metodi, izmantojot to pašu iekārtu.

Publicēšanai izmantojamas tikai tādas noteikšanas metodes, pēc kurām var sasniegt uzliesmošanas temperatūru.

Uzliesmošanas temperatūras noteikšanai viskoziem šķidrumiem (krāsām, sveķiem u.c.), kas satur šķīdinātājus, jālieto tikai tādas iekārtas un noteikšanas metodes, kuras ir izmantojamas viskozu šķidrumu uzliesmošanas temperatūras noteikšanai.

Sk. standartus ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 1. daļu.

2. **IEGŪTIE DATI**

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (identifikācija un piemaisījumi);

— jānorāda izmantotā metode, kā arī pieļautās atkāpes no tajā noteiktajām prasībām;

— rezultāti un papildus piezīmes, kas vajadzīgas rezultātu interpretācijai.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Nav.

A.10. UZLIESMOŠANAS SPĒJA (CIETAS VIELAS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Pirms šīs pārbaudes veikšanas ir lietderīgi jau iepriekš iegūt informāciju par testējamās vielas iespējamo sprādzienbīstamību.

Šī metode izmantojama tikai pulverveida, granulu un pastveida vielu uzliesmošanas spējas noteikšanai.

Lai nebūtu jāiekļauj visas vielas, kas var aizdegties, bet tikai tās, kuras ātri uzliesmo vai kuru degšanas process ir īpaši bīstams, uzskata, ka pie viegli uzliesmojošām vielām pieskaitāmas tikai tādas vielas, kuru degšanas ātrums pārsniedz noteiktu robežvērtību.

Tas var būt īpaši bīstami, ja kvēlošana izplatās cauri metāla pulverim tāpēc, ka uguns ir grūti nodzēšama. Metālu pulveri jāuzskata par ļoti uzliesmojošiem, ja to masā noteiktu laiku notiek kvēlošana.

1.2. DEFINĪCIJA UN MĒRVIENĪBAS

Degšanas ilgumu norāda sekundēs.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav norādītas.

1.4. METODES PRINCIPS

Vielu izveido vismaz 250 mm garas nepārtrauktas sloksnes vai pulvera joslas veidā, un vispirms veic orientējošu testu, aizdedzinot ar gāzes degļa liesmu, lai noteiktu, vai uguns izplatās ar liesmu vai gruzdot. Ja uguns 200 mm attālumā izplatās noteiktā laikā, testēšanu veic pēc pilnas programmas, lai noteiktu degšanas ātrumu.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav noteikti.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Orientējoša noteikšana**

Uz nedegošas pamatplates no materiāla bez porām un zemu siltumvadītspēju vielu izveido vismaz 250 mm garas, 20 mm platas un 10 mm nepārtrauktas sloksnes vai pulvera joslas veidā.

Pulvera joslu vienā galā dedzina ar karstu gāzes degļa liesmu (minimālais diametrs 5 mm) līdz pulveris aizdegas, bet ne ilgāk par 2 minūtēm (5 minūtes metālu vai metālu sakausējumu pulveriem). Jānovēro, vai uguns 200 mm joslā izplatās 4 minūšu laikā (40 minūšu laikā metālu pulveriem). Ja viela neaizdegas un uguns neizplatās, degot ar liesmu vai gruzdot 200 mm garumā 4 minūšu (vai 40 minūšu) testēšanas laikā, viela nav uzskatāma par viegli uzliesmojošu, un tā vairs nav jātestē. Ja vielā izplatās uguns pulvera joslā 200 mm garumā par 4 minūtēm īsākā laikā vai ātrāk nekā 40 minūtēs metāla pulveros, jāveic turpmāk aprakstītā procedūra (1.6.2. punktā un turpmākajos punktos).

1.6.2. **Degšanas ātruma noteikšana**

1.6.2.1. *Sagatavošana*

Pulverveida vielas vai vielas granulu veidā nesablīvējot iepilda 250 mm garā veidnē ar trijstūra šķērsgriezumu, kuras iekšējais augstums ir 10 mm, bet platums – 20 mm. Veidnes abās pusēs garenvirzienā sānu norobežošanai piestiprina divas metāla plāksnes, kuras izvirzītas 2 mm virs trijstūra šķērsgriezuma (sk. att.). Tad veidni ar pārbaudāmo vielu trīs reizes met uz cietas virsmas no 2 cm augstuma. Vajadzības gadījumā veidni pēc tam atkal piepilda. Tad noņem sānu norobežojumus un vielas pārākumu noņem. Veidnei uzliek pamatplati no nedegama materiāla bez porām un zemu siltuma vadītspēju, apgriež otrādi un veidni noņem.

Pastveida vielas izlīdzina uz pamatplates no nedegama materiāla bez porām un zemu siltuma vadītspēju 250 mm gara valnīša veidā ar apmēram 1 cm^2 šķērsgriezumu.

1.6.2.2. *Pārbaudes apstākļi*

Higroskopiskas vielas pārbauda cik vien ātri iespējams, uzreiz pēc izņemšanas no taras.

1.6.2.3. *Pārbaudes norise*

Pārbaudāmās vielas valnīti ievieto velkmes skapī perpendikulāri gaisa plūsmai.

Gaisa plūsmas ātrumu noteikšanas laikā izmainīt nedrīkst, un tam jābūt pietiekami lielam, lai dūmi neiekļūtu laboratorijā. Ap iekārtu jānovieto ekrāns, kas to aizsargā no gaisa plūsmas.

Valnīti no viena gala aizdedzina ar karstu gāzes degļa liesmu (minimālais diametrs 5 mm). Kad valnītis nodedzis 80 mm garumā, reģistrē nākamo 100 mm degšanas ilgumu. Noteikšanu veic sešos reizes, katru reizi ņemot jaunu tīru plati, ja pozitīvs rezultāts netiek novērots ātrāk.

2. **DATI**

Novērtēšanai izmanto orientējošā izmēģinājumā (1.6.1.) noteikto degšanas ilgumu un īsāko no sešās noteikšanas reizēs (1.6.2.3.) noteiktajiem degšanas ilgumiem.

3. **PĀRSKATS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi),

— testējamās vielas apraksts, tās fizikālais stāvoklis un mitruma saturs,

— skrīninga orientējošās testēšanas rezultātus un degšanās ātrumu, ja tas noteikts,

— visas papildus piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

3.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Pulverveida, granulētas un pastveida vielas uzskatāmas par viegli uzliesmojošām, ja degšanas laiks, kas noteikts pēc 1.6.2. punktā aprakstītās procedūras, ir mazāks par 45 sekundēm. Metālu vai to sakausējumu pulveri ir pieskaitāmi pie viegli uzliesmojošām vielām, ja tie spēj aizdegties un liesma vai reakcijas zona aptver visu paraugu ne ilgāk kā 10 minūtēs.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

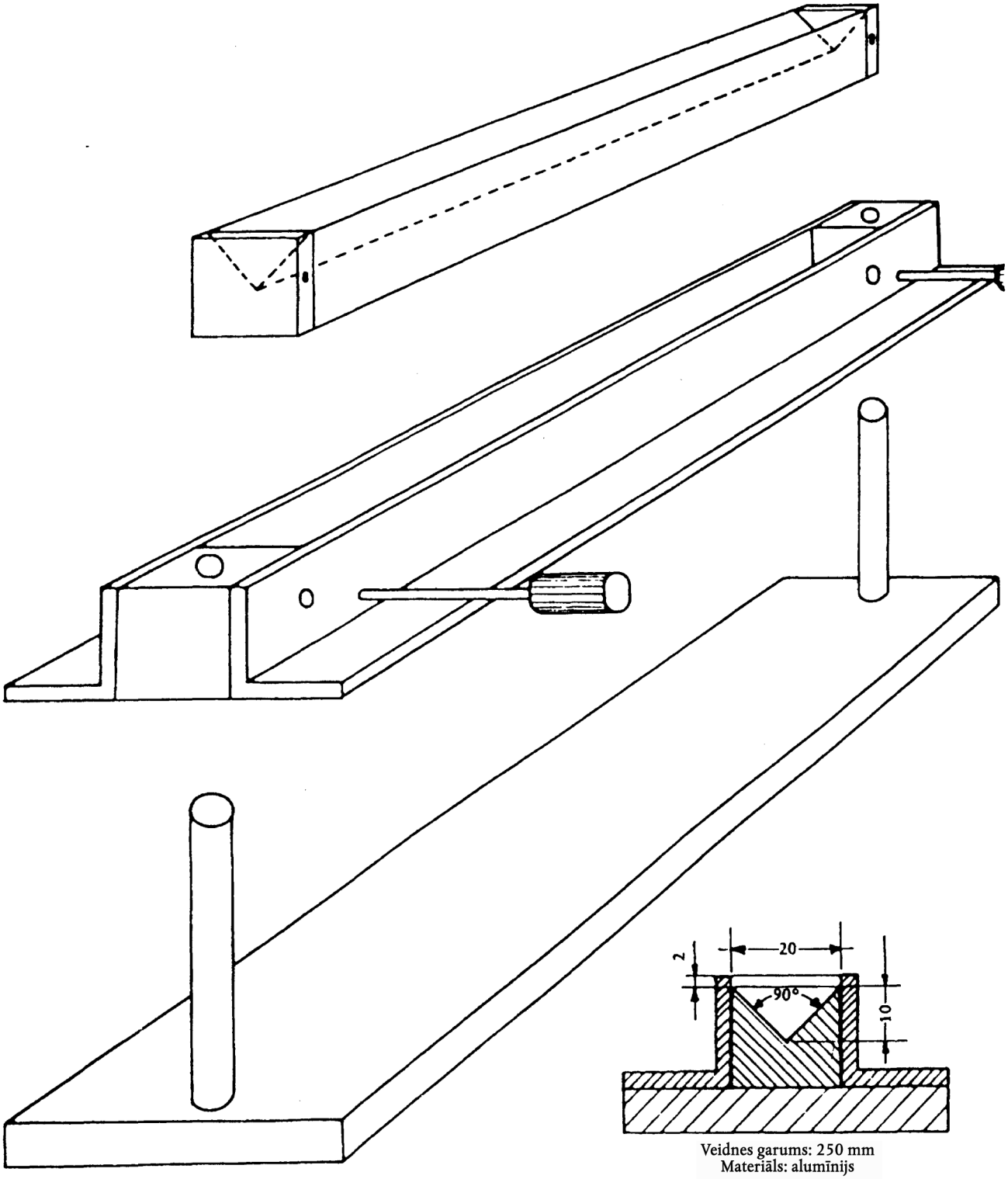
1) *NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.*

Papildinājums

Attēls

Veidne un papildu aprīkojums degšanas ilguma noteikšanai

(Visi izmēri norādīti milimetros)



A.11. UZLIESMOŠANAS SPĒJA (GĀZĒM)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Pēc šīs metodes nosaka, vai gāzu maisījumi ar gaisu istabas temperatūrā (apm. 20 °C) un atmosfēras spiedienā ir uzliesmojoši, un, ja tie ir uzliesmojoši, tad kādā koncentrāciju intervālā. Palielinot testējamās gāzes koncentrāciju gaisā, pārbauda, kā maisījums reaģē uz elektrisku dzirksteli, un novēro, vai notiek aizdegšanās.

1.2. DEFINĪCIJA UN MĒRVIENĪBAS

Uzliesmošanas intervāls ir koncentrāciju intervāls starp apakšējo un augšējo sprādzienbīstamības robežu. Apakšējā un augšējā sprādzienbīstamības robeža ir uzliesmojošas gāzes tāda robežkoncentrācija gaisā, kurā liesma tālāk neizplatās.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav noteiktas.

1.4. METODES PRINCIPS

Gāzes koncentrāciju gaisā pakāpeniski palielina un pēc katras palielināšanas pārbauda, kā maisījums reaģē uz elektrisku dzirksteli

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav noteikti.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Aprīkojums**

Testēšanas trauks ir otrādi apgriezts stikla cilindrs ar minimālo iekšējo diametru 50 mm un minimālo augstumu 300 mm. Attālums starp aizdedzināšanas elektrodiem ir 3 līdz 5 mm, un tie novietoti 60 mm attālumā no cilindra apakšas. Cilindrs ir aprīkots ar liekā spiediena vārstuli. Iekārta ir jānodrošina ar aizsargvairogu, lai samazinātu sprādziena radītos bojājumus.

Kā aizdegšanās avots kalpo indukcijas dzirkstele, kuras ilgums ir 0,5 sek. un ko ģenerē augstsprieguma transformators ar izejas spriegumu 10-15 kV (maksimālā ieejas jauda 300 W). Noteikšanai piemērota aparatūra aprakstīta (2).

1.6.2. **Pārbaudes apstākļi**

Testēšanu veic istabas temperatūrā (apm. 20 °C).

1.6.3. **Pārbaudes norise**

Ar dozētājsūkņa palīdzību stikla cilindrā ievada noteiktas koncentrācijas gāzes un gaisa maisījumu. Maisījumā uzšķiļ dzirksteli un novēro, vai liesma spēj atdalīties no aizdegšanās avota un patstāvīgi izplatīties tālāk. Gāzes koncentrāciju pakāpeniski palielina par 1 tilp. %, līdz notiek aizdegšanās iepriekš aprakstītajā veidā.

Ja gāzveida vielas ķīmiskā struktūra liecina, ka tā varētu nebūt uzliesmojoša, un ir iespējams aprēķināt stehiometrisko attiecību maisījumam ar gaisu, pakāpeniski ar soli 1 tilp. % testē maisījumus, kuru koncentrācija ir 10 % virs un zem stehiometriskās attiecības.

2. **DATI**

Liesmas izplatīšanās ir vienīgais drošais rādītājs šīs īpašības noteikšanai.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi),

— izmantotās iekārtas apraksts, norādot tās izmērus,

— temperatūra, kurā veikta testēšana,

— pārbaudītās koncentrācijas un iegūtie rezultāti;

— pārbaudes rezultāts: gāze nav uzliesmojoša vai ir viegli uzliesmojoša,

— ja izdarīts secinājums, ka gāze nav uzliesmojoša, norāda koncentrāciju intervālu, kurā tā testēta ar soli 1 tilp.%,

— pārskatā jānorāda informācija un piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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.-Ing.-Tech. 1984, vol 56, 2, 126-127.*

A.12. UZLIESMOŠANAS SPĒJA (KONTAKTĀ AR ŪDENI)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Ar šo metodi var noteikt, vai, vielai reaģējot ar ūdeni, bīstamā daudzumā izdalās viegli uzliesmojošas gāzes.

Šo metodi var izmantot gan cietu vielu, gan šķidrumu uzliesmošanas spējas noteikšanai. Šī metode nav izmantojama tādu vielu testēšanai, kuras spontāni aizdegas saskarē ar gaisu.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Viegli uzliesmojošas vielas: vielas, kas saskarē ar ūdeni vai mitru gaisu izdala viegli uzliesmojošas gāzes bīstamā daudzumā vismaz 1 litrs/kg stundā.

1.3. METODES PRINCIPS

Vielu testē posmos turpmāk aprakstītajā secībā; ja notiek aizdegšanās, testēšana nākamajos posmos nav jāturpina. Ja zināms, ka viela ar ūdeni strauji nereaģē, testēšanu veic, kā aprakstīts 4. posmā (1.3.4.).

1.3.1. **1. posms**

Testējamo vielu ievieto tvertnē ar destilētu ūdeni 20 °C temperatūrā un pārbauda, vai izdalījusies gāze aizdegas.

1.3.2. **2. posms**

Testējamo vielu uzliek uz filtrpapīra, kas peld traukā ar destilētu ūdeni 20 °C temperatūrā, un pārbauda, vai izdalījusies gāze aizdegas. Filtrpapīru izmanto tikai tāpēc, lai viela būtu vienkopus, kas palielina aizdegšanās iespējamību.

1.3.3. **3. posms**

No testējamās vielas izveido apmēram 2 cm augstu kaudzīti 3 cm diametrā. Uz kaudzītes uzpilina ūdeni un pārbauda, vai izdalījusies gāze aizdegas.

1.3.4. **4. posms**

Testējamo vielu sajauc ar destilētu ūdeni 20 °C temperatūrā un septiņu stundu laikā ik pēc stundas mēra gāzes izdalīšanās ātrumu. Ja gāze izdalās nevienmērīgi vai izdalīšanās ātrums pēc 7 stundām palielinās, mērījumu ilgums jāpagarina, bet ne vairāk kā līdz piecām dienām. Testēšanu var pārtraukt jebkurā laikā, kad gāzes izdalīšanās ātrums kļūst lielāks par 1 litrs/kg stundā.

1.4. STANDARTVIELAS

Nav noteiktas.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav noteikti.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **1. posms**

1.6.1.1. *Pārbaudes apstākļi*

Testēšanu veic istabas temperatūrā (apm. 20 °C).

1.6.1.2. *Pārbaudes norise*

Nelielu daudzumu (ap 2 mm diametrā) testējamās vielas ievieto tvertnē ar destilētu ūdeni. Novēro, vai i) izdalās gāze un vai ii) notiek gāzes aizdegšanās. Ja novēro gāzes aizdegšanos, turpmāka vielas testēšana nav nepieciešama, jo tad tā ir pieskaitāma bīstamām vielām.

1.6.2. **2. posms**

1.6.2.1. *Aprīkojums*

Jebkurā piemērotā traukā, piemēram, iztvaicēšanas bļodiņā (diametrs 100 mm) ar destilētu ūdeni, uz ūdens virsmas uzliek filtrpapīru.

1.6.2.2. *Pārbaudes apstākļi*

Testēšanu veic istabas temperatūrā (apm. 20 °C).

1.6.2.3. *Pārbaudes norise*

Nelielu daudzumu testējamās vielas (ap 2 mm diametrā) novieto filtrpapīra vidū. Novēro, vai i) izdalās gāze un vai ii) notiek gāzes aizdegšanās. Ja novēro gāzes aizdegšanos, turpmāka vielas testēšana nav nepieciešama, jo tad tā ir pieskaitāma bīstamām vielām.

1.6.3. **3. posms**

1.6.3.1. *Pārbaudes apstākļi*

Testēšanu veic istabas temperatūrā (apm. 20 °C).

1.6.3.2. *Pārbaudes norise*

No testējamās vielas izveido apmēram 2 cm augstu kaudzīti (3 cm diametrā) ar iedobi virsējā daļā. Šajā iedobē iepilina ūdeni un novēro, vai i) izdalās gāze un vai ii) notiek gāzes aizdegšanās. Ja novēro gāzes aizdegšanos, turpmāka vielas testēšana nav nepieciešama, jo tad tā pieskaitāma bīstamām vielām.

1.6.4. **4. posms**

1.6.4.1. *Aprīkojums*

Sastāda attēlā parādīto aparātu.

1.6.4.2. *Pārbaudes apstākļi*

Jāpārliecinās, ka pārbaudāmās vielas iepakojums nesatur pulveri (daļiņu lielums < 500 μm). Ja pulveris veido vairāk nekā 1 tilp. % no kopējā daudzuma vai ja paraugs ir sagulējies, tas pirms testēšanas jāsaberž pulverī, lai samazinātu daļiņu lielumu uzglabāšanas laikā un pirms izmantošanas; citādi viela jātestē veidā, kādā tā saņemta bez papildus sagatavošanas. Testēšana jāveic istabas temperatūrā (20 °C) un atmosfēras spiedienā.

1.6.4.3. *Pārbaudes norise*

Aparāta pilināmajā piltuvē ielej 10 līdz 20 ml ūdens, bet koniskajā kolbā pārnes 10 g testējamās vielas. Ar jebkuriem piemērotiem līdzekļiem mēra izdalījušās gāzes tilpumu. Koniskajā kolbā ielaiž ūdeni, atverot pilināmās piltuves krānu, un iedarbina hronometru. Izdalījušās gāzes daudzumu septiņu stundu laikā mēra ik pēc stundas. Ja šajā laikā izdalītais gāzes daudzums mainās vai arī minētā perioda beigās gāzes izdalīšanās ātrums palielinās, mērījumi jāturpina līdz piecām dienām. Ja mērījumu laikā gāzes izdalīšanās ātrums pārsniedz 1 l/kg stundā, testēšanu var pārtraukt. Testēšana jāveic trīs reizes.

Ja gāzes ķīmiskais sastāvs nav zināms, jāveic tās analīze. Ja gāze satur viegli uzliesmojošus komponentus un nav zināms, vai arī pats maisījums ir viegli uzliesmojošs, jāpagatavo tāda paša sastāva maisījums un tas jāpārbauda pēc A.11. nodaļā aprakstītās metodes.

2. **DATI**

Viela uzskatāma par bīstamu, ja:

— ja kādā testēšanas posmā notiek tā pašaizdegšanās,

vai

— izdalās uzliesmojoša gāze ar ātrumu, kas ir lielāks par 1 l/kg vielas stundā.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi),

— sīkas ziņas par testējamās vielas sagatavošanu uzliesmošanas spējas noteikšanai,

— testēšanas rezultāti (1., 2., 3. un 4. posmā),

— izdalījušās gāzes sastāvs,

— gāzes izdalīšanās ātrums, ja veikts testēšanas 4. posms (1.6.4.),

— jebkuras papildus piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

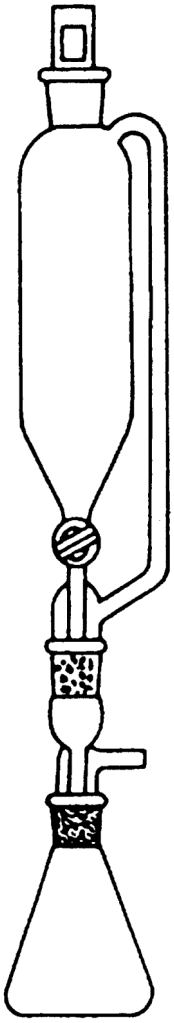
1) *Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.*

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.*

Papildinājums

Attēls

Aprīkojums



A.13. CIETVIELU UN ŠĶIDRUMU PIROFORĀS ĪPAŠĪBAS

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Testēšanas metode izmantojama cietvielām un šķidrām vielām, kurām nelielos daudzumos pēc saskares ar gaisu istabas temperatūrā (apm. 20 °C), notiek to pašaizdegšanās.

Šo metodi neizmanto vielām, kurām, lai notiku pašaizdegšanās, jāatrodas kontaktā ar gaisu istabas temperatūrā vai paaugstinātā temperatūrā vairākas stundas vai dienas.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Uzskata, ka vielas ir piroforas, ja tās 1.6. punktā aprakstītajos apstākļos aizdegas vai izraisa pārogļošanos.

Var būt vajadzīgs noteikt šķidrumu pašaizdegšanās spēju pēc metodes A.15. "Pašaizdegšanās temperatūra (šķidrumiem un gāzēm)".

1.3. STANDARTVIELAS

Nav norādītas.

1.4. METODES PRINCIPS

Cietvielu vai vielu, kas ir šķidruma veidā, pievieno inertam nesējam un uz piecām minūtēm istabas temperatūrā novieto saskarē ar gaisu. Ja vielas, kas ir šķidrumi, neaizdegas, tas absorbē uz filtrpapīra un piecas minūtes istabas temperatūrā (apm. 20 °C) novieto saskarē ar gaisu. Ja cietviela vai šķidrums aizdegas vai pārogļo filtrpapīru, viela uzskatāma par piroforu.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Atkārtojamība: drošības apsvērumu dēļ viela tiek uzskatīta par piroforu, ja tiek iegūts viens pozitīvs rezultāts.

1.6. TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

1.6.1. **Aprīkojums**

Istabas temperatūrā porcelāna bļodiņā (diametrs apm. 10 cm) iepilda diatomītu, lai tā augstums būtu aptuveni 5 mm.

Piezīme:

Diatomītu vai kādu citu līdzīgu, viegli pieejamu inertu vielu izmanto par augsnes aizstājēju, modelējot augsnes piesārņošanu ar pārbaudāmo vielu avārijas gadījumā.

Sauss filtrpapīrs vajadzīgs tādu šķidrumu testēšanai, kuri uz inerta nesēja neaizdegas kontaktā ar gaisu.

1.6.2. **Noteikšana**

a) *Pulverveida cietvielas*

Pulverveida vielu (1 - 2 cm^3) ber no aptuveni 1 m augstuma uz ugunsdrošas virsmas un novēro, vai tā aizdegas krītot vai piecu minūšu laikā pēc nosēšanās.

Ja nenotiek aizdegšanās, mēģinājumu atkārto sešas reizes.

b) *Šķidrumi*

Pārbaudāmo šķidrumu (apm. 5 cm^3) lej iepriekš sagatavotā porcelāna bļodiņā un piecas minūtes novēro, vai šī viela aizdegas.

Ja sešos mēģinājumos aizdegšanās nenotiek, veic šādas pārbaudes:

Ar šļirci 0,5 ml testējamā parauga pārnes uz robota filtrpapīra un novēro, vai pēc tam piecu minūšu laikā notiek filtrpapīra aizdegšanās vai pārogļošanās. Ja nenotiek aizdegšanās vai pārogļošanās, mēģinājumu atkārto trīs reizes.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Pārbaudi var pārtraukt, tiklīdz kādā no pārbaudēm iegūst pozitīvu rezultātu.

2.2. NOVĒRTĒŠANA

Viela uzskatāma par piroforu, ja viela piecu minūšu laikā pēc pievienošanas inertam nesējam gaisā aizdegas, vai šķidra viela pārogļo vai aizdedzina filtrpapīru gaisa klātienē piecās minūtēs pēc tās uznešanas filtrpapīram.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi),

— testēšanas rezultāti,

— jebkuras papildus piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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. SPRĀDZIENBĪSTAMĪBA

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Metodē aprakstīta testēšanas shēma, pēc kuras nosaka cietvielu un pastveida vielu sprādzienbīstamību, uz tām iedarbojoties liesmai (termiskā jutība) vai triecieniem vai berzei (jutība uz mehānisku iedarbību), un šķidru vielu sprādzienbīstamību, uz tām iedarbojoties ar liesmu vai triecienu.

Metode paredz trīs dažādas pārbaudes:

a) termiskās jutības pārbaudi (1);

b) trieciena iedarbības mehāniskās jutības pārbaudi (1);

c) berzes iedarbības mehāniskās jutības pārbaudi (1).

Ar šo metodi var iegūt datus, kas ļauj novērtēt eksplozijas iespējamību dažu plaši izplatītu faktoru ietekmē. Metode nav paredzēta, lai noteiktu, vai viela ir sprādzienbīstama jebkuros apstākļos.

Metode piemērota lai noteiktu vielas sprādzienbīstamību (termisko jutību un jutību uz mehānisko iedarbību) konkrētos apstākļos, kas norādīti direktīvā. Tā pamatojas uz pasaulē plaši (1) izmantotiem vairāku veidu aparātiem, ar kuriem iegūst ticamus rezultātus. Tajā pašā laikā ir jāatzīst, ka šī metode nesniedz galīgu atbildi. Var izmantot ne tikai šeit noteiktos, bet arī citus aparātus, ja tie ir starptautiski atzīti un ar tiem iegūtie rezultāti korelē ar rezultātiem, kuri iegūti ar šeit noteiktajiem aparātiem.

Testēšana nav jāveic gadījumos, kad ir pieejami termodinamiskie dati (piemēram, rašanās siltums, sadalīšanās siltums) un/vai molekulā nav dažas reaģētspējīgas grupas (2), kas dod pietiekamu pamatu uzskatīt, ka viela nevar strauji sadalīties, izdalot gāzes vai siltumenerģiju (t.i., viela nav sprādzienbīstama). Šķidrumiem nav jāveic mehāniskā jutība uz berzes iedarbību.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Sprādzienbīstamas vielas:

Vielas, kuras var eksplodēt, uz tām iedarbojoties liesmai, vai kas ir jutīgas pret trieciena vai berzes iedarbību noteiktajā aparatūrā (vai kas ir jutīgākas uz mehānisko iedarbību nekā 1,3- dinitrobenzols alternatīvā aparatūrā).

1.3. STANDARTVIELAS

Berzes un trieciena iedarbības noteikšanai: 1,3-dinitrobenzols, tehnisks kristālisks produkts, kas iziet cauri 0,5 mm sietam.

Berzes un trieciena iedarbības testēšanas otrajai sērijai: perhidro-l,3,5-trinitro-l,3,5-triazīns (RDX, heksogēns, ciklonīts — CAS 121-82-4), pārkristalizēts no cikloheksanona šķīduma ūdenī, un kas mitrā veidā sijājot iziet cauri a 250 μm sietam un paliek uz 150 μm sieta, žāvēts 103 ± 2 °C temperatūrā (4 stundas).

1.4. METODES PRINCIPS

Drošu apstākļu noskaidrošanai, testējot jutību pret triju veidu iedarbību, vispirms jāveic orientējošas pārbaudes.

1.4.1. **Drošas apiešanās pārbaudes (3)**

Pirms veikt galvenās pārbaudes drošības apsvērumu dēļ ļoti mazus vielas paraugus (apm. 10 mg) vaļējā veidā silda gāzes degļa liesmā, pakļauj trieciena iedarbībai, izmantojot āmuru un laktu, un berzes iedarbībai jebkāda veida berzes iekārtā. Tas nepieciešamas, lai noskaidrotu, vai viela ir tik jutīga un sprādzienbīstama, ka noteiktie jutības testi, jo īpaši jutība pret paaugstinātas temperatūras iedarbību ir tik liela, ka jāveic piesardzības pasākumi, lai to laikā neciestu operators.

1.4.2. **Termiskā jutība**

Pēc šīs metodes vielu karsē tērauda caurulē, kas noslēgta ar plāksnēm, kurās ir dažāda diametra atveres, lai noteiktu, vai viela var eksplodēt, intensīvi sildot definēti norobežotā telpā.

1.4.3. **Mehāniskā jutība (pret triecienu)**

Pēc šīs metodes vielu pakļauj trieciena iedarbībai, ko rada noteikta lieluma masa, krītot no noteikta augstuma.

1.4.4. **Mehāniskā jutība (pret berzi)**

Pēc šīs metodes cietvielu vai pastveida vielu pakļauj berzei starp standartvirsmām, ievērojot norādītos slodzes un savstarpējās kustības apstākļus.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav noteikti.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Termiskā jutība (pret liesmas iedarbību)**

1.6.1.1. *Aprīkojums*

Aparāts sastāv no vienreizlietojamas tērauda caurules un atkārtoti izmantojamas noslēgierīces (1. att.) kas uzstādīta sildierīcei un aizsargierīcei. Caurule ir izvilkta no lokšņu tērauda (sk. papildinājumu), un tās iekšējais diametrs ir 24 mm, garums 75 mm un sieniņu biezums 0,5 mm. Caurules vaļējam galam ir atloks, pie kura stiprina mezglu, kurā ietilpst plāksne ar atverēm. Tas sastāv no spiedienizturīgas plāksnes ar atverēm, kurā ir centrālā atvere un kura stingri piestiprināta caurulei ar divdaļīgu skrūvju savienojumu (uzgrieznis un vītņsavienojums). Uzgrieznis un vītņsavienojums izgatavoti no hroma-mangāna tērauda (sk. papildinājumu), kas nerada dzirksteles līdz 800 °C. Atveres plates ir 6 mm biezas, izgatavotas no karstumizturīga tērauda (sk. papildinājumu) un ir ar dažādu atveres diametru.

1.6.1.2. *Testēšanas apstākļi*

Parasti vielu testē tādā paša veidā, kādā tā saņemta, lai gan dažkārt, piemēram, ja tā ir sapresēta, kausēta vai citādi sablīvēta, var būt vajadzīgs vielu pirms testēšanas sasmalcināt.

Cietvielu testēšanai izmantojamā materiāla masu nosaka, izmantojot divpakāpju procedūru pēc sausā paņēmiena. Tarētā caurulē iepilda 9 cm^3 vielas, ko sablīvē ar 80 N spēku, ko pieliek visam caurules šķērsgriezumam. Drošības apsvērumu dēļ vai gadījumos, kad parauga fizikālais stāvoklis pēc saspiešanas var izmainīties, var lietot citus uzpildīšanas paņēmienus; piemēram, ja viela ir ļoti jutīga pret berzes iedarbību, to blīvēt nedrīkst. Ja materiāls ir saspiežams, pieliek un sablīvē tā papildus daudzumu, līdz caurule ir piepildīta līdz 55 mm no caurules augšmalas. Nosaka kopējo vielas masu, kas vajadzīga caurules piepildīšanai līdz 55 mm līmenim, un pievieno vēl divas papildus parauga daļas, kuras katru sablīvē ar 80 N spēku. Tad materiālu pēc vajadzības pievieno sablīvējot vai izņem ārā tā, lai caurule būtu piepildīta līdz 15 mm līmenim no augšmalas. Tad veic otru noteikšanu pēc sausā paņēmiena, sākot ar trešdaļu kopējās masas, kas noteikta pirmajā reizē, un to sablīvējot. Pievieno vēl divas parauga daļas, sablīvējot ar 80 N spēku, un vielas līmeni caurulē noregulē līdz 15 mm no augšmalas, pēc vajadzības vielu pievienojot vai izņemot. Katram izmēģinājumam izmanto cietvielas daudzumu, kas noteikts otrajā mēģinājumā pēc sausā paņēmiena; piepildīšanu veic trijās vienādās daļās, katru no tām saspiežot līdz 9 cm^3 ar spēku, kas vajadzīgs šādam nolūkam. (To var veikt, izmantojot atstarpes gredzenus.)

Šķidrumus un gēlus caurulē iepilda līdz 60 mm augstumam, īpaši raugoties, lai gēlos neizveidotos tukšumi. Vītņsavienojumu caurulei uzliek no apakšas, ievieto plāksni ar vajadzīgā lieluma atveri, un pēc ieziešanas ar nelielu daudzumu molibdēna disulfīda ziedes pievelk uzgriezni. Noteikti jāpārbauda, vai testējamā viela nav nokļuvusi starp plāksni un atloku, vai uz vītnēm.

Karsēšanai izmanto propānu no gāzes balona, kas aprīkots ar spiediena reduktoru (60 līdz 70 mbar) un plūsmas mērītāju un tiek vienādi padots uz četriem gāzes degļiem (vizuāli novērtējot pēc degļu liesmas). Degļus novieto apkārt testēšanas kamerai, kā parādīts 1. att. Visu četru degļu kopējais propāna patēriņš ir apmēram 3,2 litri propāna minūtē. Var izmantot citas gāzes un citādus degļus, tomēr karsēšanas ātrumam jāatbilst 3. att. norādītajam. Visiem aparātiem periodiski jāpārbauda karsēšanas ātrums, izmantojot caurules ar dibutilftalāta pildījumu, kā parādīts 3. att.

1.6.1.3. *Pārbaužu norise*

Katru noteikšanu veic tik ilgi, līdz caurule pārsprāgst, vai caurule ir karsēta piecas minūtes. Tests, kurā caurule sasprāgst vismaz trijās daļās, kuras dažkārt var turēties kopā ar šaurām metāla sloksnēm, kā parādīts 2. att., tiek novērtēts par sprādzienu. Tests, kurā rodas mazāk caurules gabalu vai tā nesaplīst, netiek novērtēts par sprādzienu.

Vispirms trīs reizes testu veic, izmantojot plāksni ar atveri 6,0 mm diametrā, un, ja šādā veidā sprādzieni nenotiek, testu veic vēl trīs reizes, izmantojot plāksni ar atveri 2,0 mm diametrā. Jebkurā izmēģinājumu sērijā notiekot sprādzienam, testēšanu turpināt nav vajadzīgs.

1.6.1 *A. Vērtēšana*

Testēšanas rezultāts uzskatāms par pozitīvu, ja sprādziens notiek kādā no iepriekšminēto izmēģinājumu sērijām.

1.6.2. **Mehāniskā jutība (pret triecienu)**

1.6.2.1. *Aparatūra (4. att.)*

Svarīgākās krītošā āmura iekārtas sastāvdaļas ir liets tērauda bloks ar pamatni, lakta, statnis, vadotnes, krītoši atsvari, palaišanas ierīce un parauga turētājs. Tērauda lakta 100 mm (diametrs) x 70 mm (augstums) ir pieskrūvēta tērauda blokam 230 mm (garums) x 250 mm (platums) x 200 mm (augstums) uz lietas pamatnes 450 mm (garums) x 450 mm (platums) x 60 mm (augstums). Statnis, kas izgatavots no izvilktas bezšuves tērauda caurules, tiek iestiprināts turētājā, kas pieskrūvēts tērauda blokam. Ar četrām enkurskrūvēm iekārta piestiprināta masīvam betona blokam 60 x 60 x 60 cm tā, lai vadotņu sliedes būtu pilnīgi vertikālas un krītošie atsvari brīvi kristu. Lietošanai izmantojami 5 un 10 kg masīva tērauda atsvari. Atsvaru triecienvirsma ir no rūdīta tērauda, HRC 60 līdz 63, ar minimālo diametru 25 mm.

Testējamo paraugu ievieto triecienierīcē, kura sastāv no diviem vienam virs otra novietotiem koaksiāliem masīva tērauda cilindriem dobā tērauda cilindrveida vadotnē. Masīva tērauda cilindru diametrs ir 10 (–0,003, –0,005) mm un augstums 10 mm, ar pulētām virsmām, noapaļotām šķautnēm (noapaļojuma rādiuss 0,5 mm) un cietību HRC 58 līdz 65. Dobā cilindra ārējam diametram jābūt 16 mm, pulētu urbumu ar izmēru 10 (+0,005, +0,010) mm un augstumu 13 mm. Triecienierīce samontēta uz starplaktas (diametrs 26 mm un augstums 26 mm), kas izgatavota no tērauda un centrēta, izmantojot gredzenu ar izgriezumiem, pa kuriem izplūst dūmiem.

1.6.2.2. *Pārbaudes apstākļi*

Parauga tilpums ir 40 mm^3 vai jebkurš tilpums, kas piemērots attiecīgajām alternatīvajām iekārtām. Cietvielas jātestē sausā veidā, un tās sagatavojamas šādi:

a) vielas pulvera veidā sijā (caur 0,5 mm sietu); testēšanai izmanto visu caur sietu izgājušo materiālu;

b) presētas, kausētas vai citādi sablīvētas vielas sasmalcina gabaliņos un sijā; testēšanai izmanto daļiņu frakciju ar izmēru 0,5 līdz 1 mm, un tai jābūt sākotnējai vielai reprezentatīvai.

Vielas, kuras parasti piegādā pastveidā, ja iespējams, jātestē sausas, vai jebkurā gadījumā iespējami pilnīgi atdalot atšķaidītāju. Šķidras vielas testē ar 1 mm atstarpi starp augšējo un apakšējo cilindru.

1.6.2.3. *Pārbaužu norise*

Veic sešu izmēģinājumu sēriju, metot 10 kg lielu masu no 0,40 m augstuma (40 J). Ja sešos izmēģinājumos ar 40 J iegūst eksploziju, jāveic vēl seši izmēģinājumi, metot 5 kg masu no 0,15 m augstuma (7,5 J). Citos aparātos paraugu salīdzina ar izraudzīto standartvielu, ievērojot noteiktu procedūru (piemēram, turp un atpakaļ paņēmienu, u.c.).

1.6.2.4. *Novērtēšana*

Testēšanas rezultāts uzskatāms par pozitīvu, ja eksplozija (ar aizdegšanos un/vai novērojums, kas uzskatāms par eksploziju) notiek vismaz vienreiz jebkurā no izmēģinājumiem, izmantojot iepriekš noteikto iekārtu, vai paraugs ir jutīgāks pret trieciena iedarbību nekā 1,3-dinitrobenzolu vai RDX (heksogēnu) alternatīvā izmēģinājumā.

1.6.3. **Mehāniskā jutība (pret berzi)**

1.6.3.1. *Aparatūra (5. att.)*

Berzes iekārta sastāv no lietas tērauda pamatplates, kurai uzmontēta berzes ierīce. Tā sastāv no nekustīgas porcelāna kājas un kustīgas plates no porcelāna. Porcelāna plate ir nostiprināta rāmī, kas pārvietojas divās vadotnēs. Rāmi caur savienotājstieni, ekscentra mehānismu un piemērotu pārvadu piedzen elektromotors tā, ka plāksni tikai vienreiz pārvieto turp un atpakaļ un uz priekšu aiz porcelāna kājas 10 mm. Porcelāna kāju var slogot ar, piemēram, 120 vai 360 N.

Līdzenās porcelāna plates ir izgatavotas no tehniskā porcelāna (raupjums 9 līdz 32 μm) un to izmēri ir 25 mm (garums) x 25 mm (platums) x 5 mm (augstums). Cilindriskā porcelāna kāja arī ir izgatavota no baltā tehniskā porcelāna, un tā ir 15 mm gara, 10 mm diametrā un raupjām sfēriskām galu virsmām ar noapaļojuma rādiusu 10 mm.

1.6.3.2. *Pārbaudes apstākļi*

Parauga tilpums ir 10 mm^3, vai jebkurš tilpums, kas piemērots attiecīgajām alternatīvajām iekārtām.

Cietvielas jātestē sausā veidā, un tās sagatavojamas šādi:

a) vielas pulvera veidā sijā (caur 0,5 mm sietu); testēšanai izmanto visu caur sietu izgājušo materiālu;

b) presētas, kausētas vai citādi sablīvētas vielas sasmalcina gabaliņos un sijā; testēšanai izmanto frakciju ar daļiņu izmēru < 0,5 mm.

Ja iespējams, vielas pastu veidā ir jātestē sausas. Ja vielas testēšanai nevar sagatavot sausā veidā, pastas (pēc iespējami pilnīgas atšķaidītāja atdalīšanas) testē ar šablonu sagatavotas plēves veidā, kuras biezums ir 0,5 mm, platums 2 mm, bet garums 10 mm.

1.6.3.3. *Pārbaužu norise*

Porcelāna kāju novieto uz testējamā parauga un slogo. Porcelāna plāksnītē sūkļa atstātajām švīkām pārbaudes laikā jābūt vērstām šķērsvirzienā attiecībā pret kustības virzienu. Jāpārliecinās, ka kāja atspiežas pret paraugu, ka zem kājas ir pietiekami daudz pārbaudāmās vielas un ka plate zem kājas kustas pareizā virzienā. Pastveida vielas platei uzklāj ar 0,5 mm biezuma kalibru, kura spraugas izmērs ir 2 x 10 mm. Porcelāna platei zem porcelāna kājas 0,44 sekunžu laikā jāpārvietojas turp un atpakaļ 10 mm. Plates virsmas daļas un kāju drīkst izmantot tikai vienreiz; katras kājas abi gali izmantojami diviem izmēģinājumiem, bet katra no abām plates virsmām trijiem izmēģinājumiem.

Veic sešu izmēģinājumu sērijas ar 360 N slodzi. Ja šo sešu izmēģinājumu laikā tiek konstatēts pozitīvs rezultāts, veic vēl sešu izmēģinājumu sēriju ar 120 N slodzi. Citos aparātos paraugu salīdzina ar izraudzīto standartvielu, ievērojot noteiktu procedūru (piemēram, turp un atpakaļ paņēmienu, u.c.).

1.6.3.4. *Novērtēšana*

Testēšanas rezultāts uzskatāms par pozitīvu, ja eksplozija (krakšķēšana un/vai aizdegšanās novērojums uzskatāmi par eksploziju) notiek vismaz vienreiz jebkurā no izmēģinājumiem, izmantojot iepriekš noteikto berzes iekārtu, vai atbilst ekvivalentiem kritērijiem alternatīvā berzes izmēģinājumā.

2. **DATI**

Viela principā uzskatāma par sprādzienbīstamu direktīvas nozīmē, ja pozitīvs testēšanas rezultāts iegūts termiskajā, trieciena vai berzes izmēģinājumā.

3. **PĀRSKATS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— testējamās vielas identifikācija, sastāvs, tīrība, mitruma saturs u.c.,

— parauga fizikālais stāvoklis, norādes par tā sasmalcināšanu un/vai sijāšanu,

— termiskās jutības testēšanas laikā veiktie novērojumi (piemēram, parauga masa, fragmentu skaits u.c.),

— mehāniskās jutības testēšanas laikā veiktie novērojumi (piemēram, dūmu veidošanās ievērojamā daudzumā, pilnīga sadalīšanās bez atlikuma, uzliesmošana, dzirksteļošana, krakšķēšana u.c.),

— visos testēšanas veidos iegūtie rezultāti,

— ja izmantota cita iekārta, šādas izvēles zinātniskais pamatojums, kā arī pierādījums tam, ka iegūtie rezultāti ir salīdzināmi ar rezultātiem, kas iegūti ar iekārtu, kura ieteikta šīs pārbaudes veikšanai,

— jebkuras noderīgas piezīmes, piemēram, atsauces uz līdzīgu produktu pārbaudēm, kas var noderēt pienācīgai rezultātu interpretācijai.

— jebkuras papildus piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

3.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA.

Testēšanas pārskatā jānorāda visi rezultāti, kas uzskatāmi par kļūdainiem, netipiskiem vai nereprezentatīviem. Ja kādi rezultāti nav iekļaujami pārskatā, tas jāpaskaidro, kā arī jānorāda visi citos vai papildus izmēģinājumos iegūtie rezultāti. Ja netipisku rezultātu izskaidrot nevar, tas jāpieņem pēc nominālvērtības un pēc tā viela attiecīgi jāklasificē.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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.*

Papildinājums

Termiskās jutības testēšanai vajadzīgo materiālu specifikācija (sk. DIN 1623)

1) Caurule: Materiāla specifikācija Nr. 1.0336.505 g

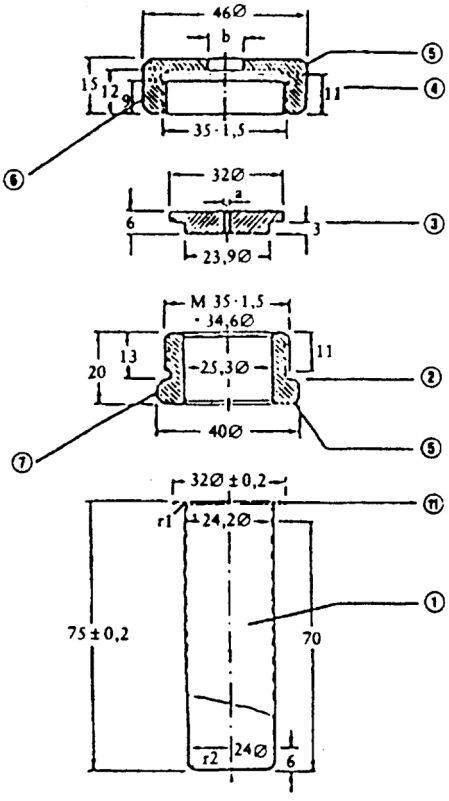
2) Plate ar atveri: Materiāla specifikācija Nr. 1.4873

3) Vītņsavienojums un uzgrieznis: Materiāla specifikācija Nr. 1.3817

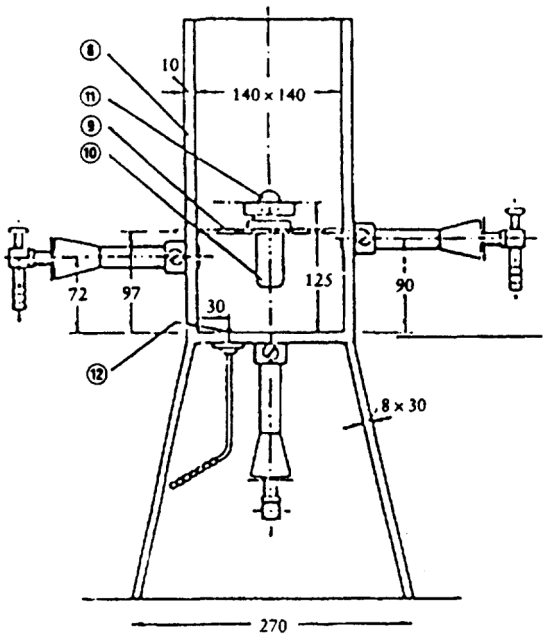
1. attēls

Termiskās jutības testēšanas iekārta

(Visi izmēri norādīti milimetros)



1.a att. Tērauda caurule ar piederumiem



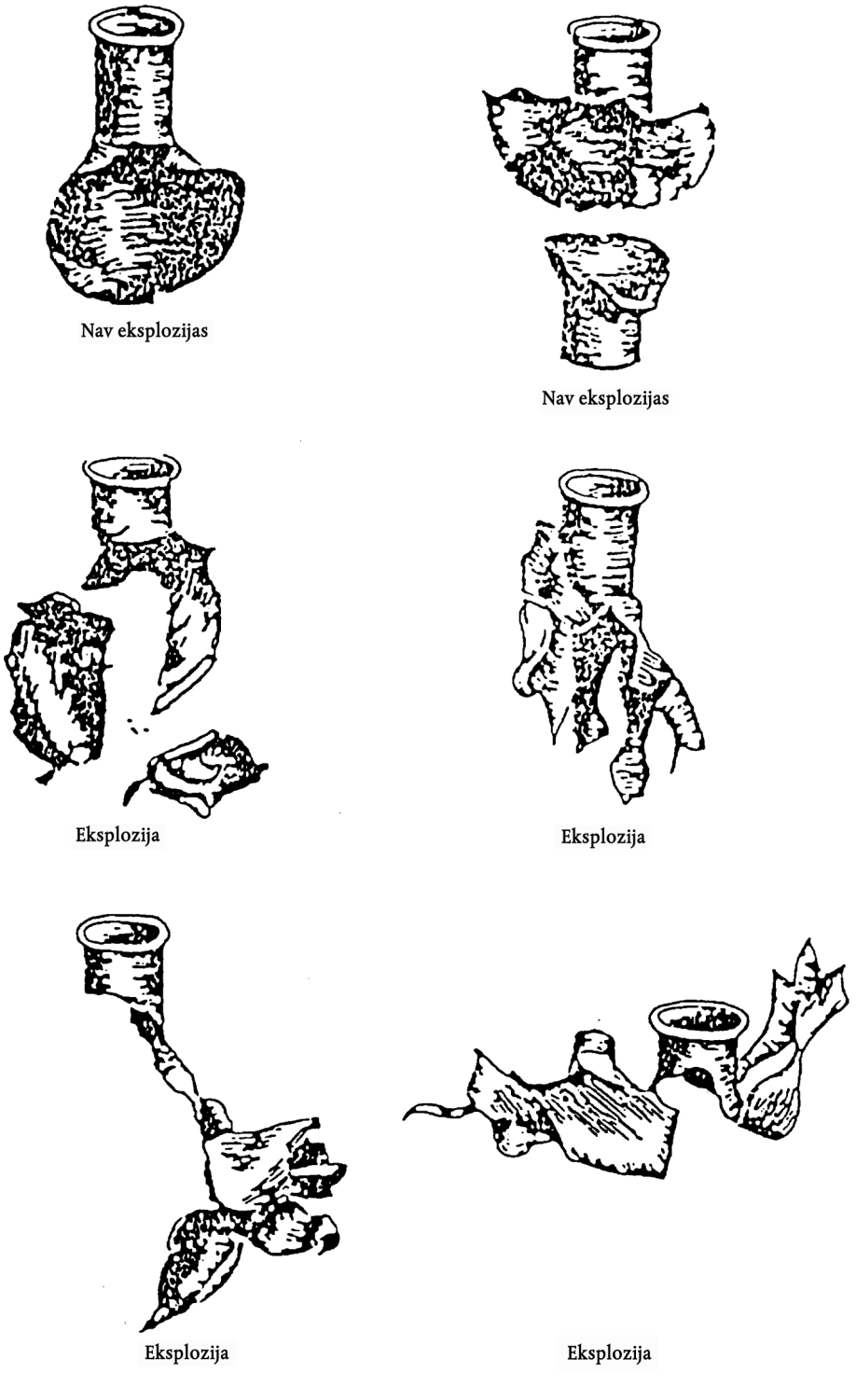
1.b att. Sildīšanas un aizsargierīce

(1) caurule
(1a) ārējais atloks
(2) vītņsavienojums; vītne ar mazu berzi
(3) plate ar atveri a = 2,0 vai 6,0 mm diam.
(4) uzgrieznis b = 10 mm diam.
(5) slīpa virsma
(6) 2 plakanas virsmas 41. izmēra uzgriežņu atslēgai
(7) 2 plakanas virsmas 36. izmēra uzgriežņu atslēgai
(8) pret plaisāšanu izturīga kamera
(9) 2 balsta stieņi caurulei
(10) samontēta caurule
(11) vieta aizmugurējam deglim; pārējie degļi attēlā redzami
(12) žikleris

2. attēls

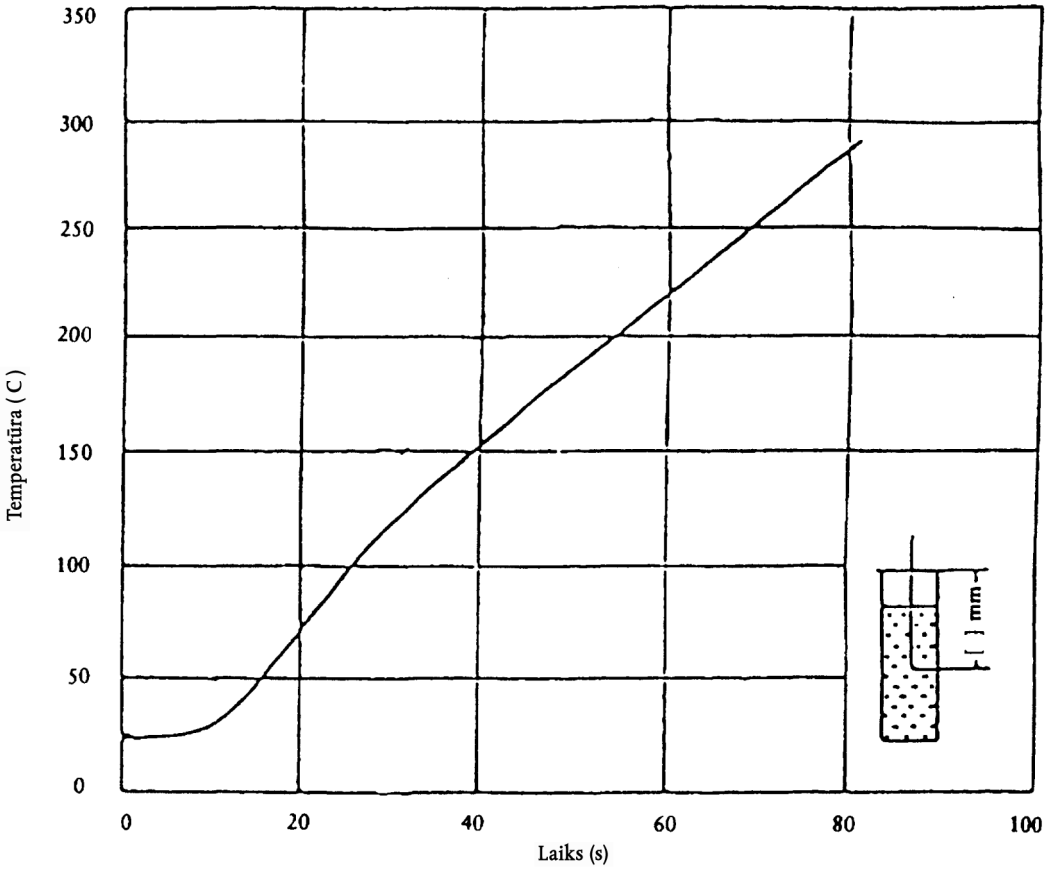
Termiskās jutības tests

Fragmentācijas paraugi



3. attēls

Sildīšanas ātruma kalibrēšana termiskās jutības testēšanai

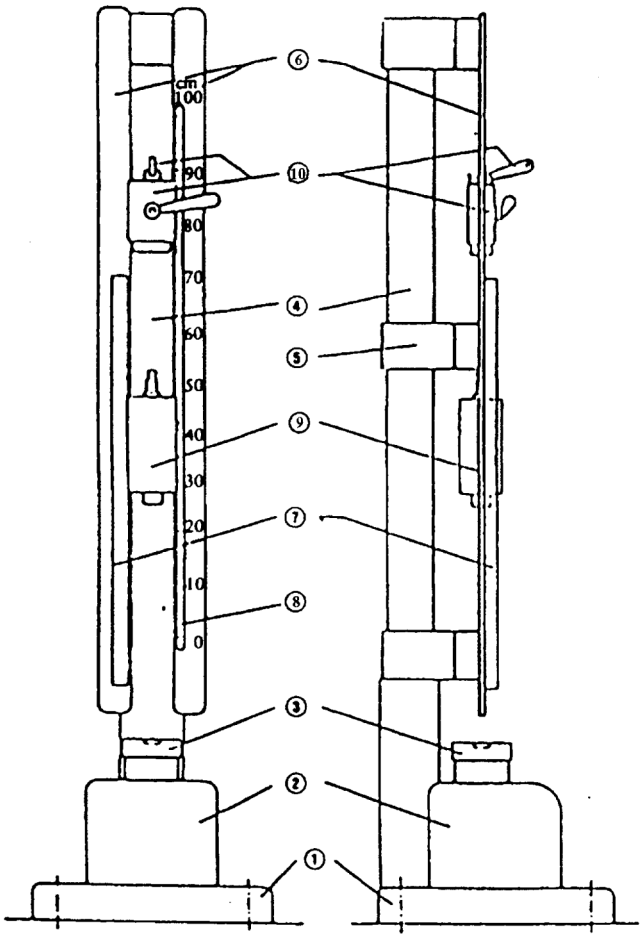


Temperatūras/laika grafiks, kas iegūts, sildot dibutilftalātu (27 cm3) slēgtā caurulē (atveres izmērs 1,5 mm), izmantojot propāna plūsmas ātrumu 3,2 l/min. Temperatūru mēra ar 1 mm diametra hromela/alumela termopāri tērauda apvalkā, kas novietots centrā 43 mm zem caurules atloka. Sildīšanas ātrumam no 135 °C līdz 285 °C ir jābūt no 185 līdz 215 K/min.

4. attēls

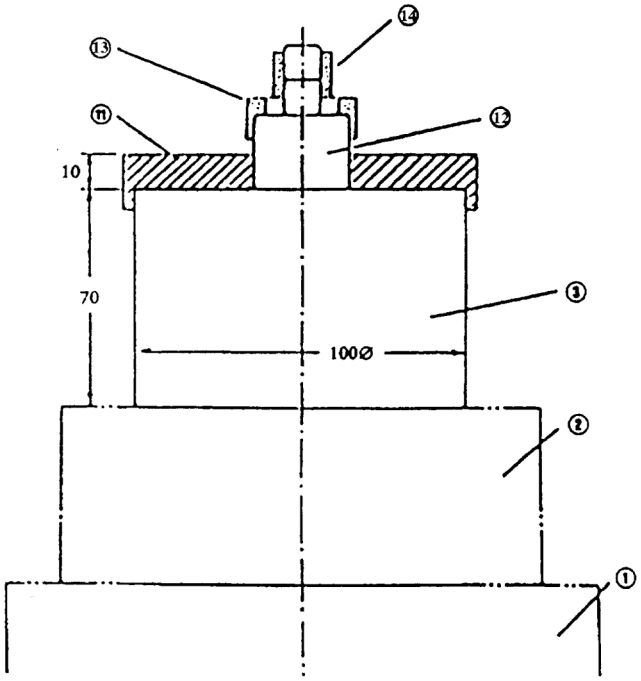
Trieciena testa aparāts

(Visi izmēri norādīti milimetros)



4.a att. Krītošais āmurs, priekšskats un sānskats, kopskats

(1) pamatne, 450 x 450 x 60
(2) tērauda bloks, 230 x 250 x 200
(3) lakta, 100 diam. x 70
(4) statnis
(5) vidējais šķērsis
(6) 2 vadotnes
(7) zobstienis

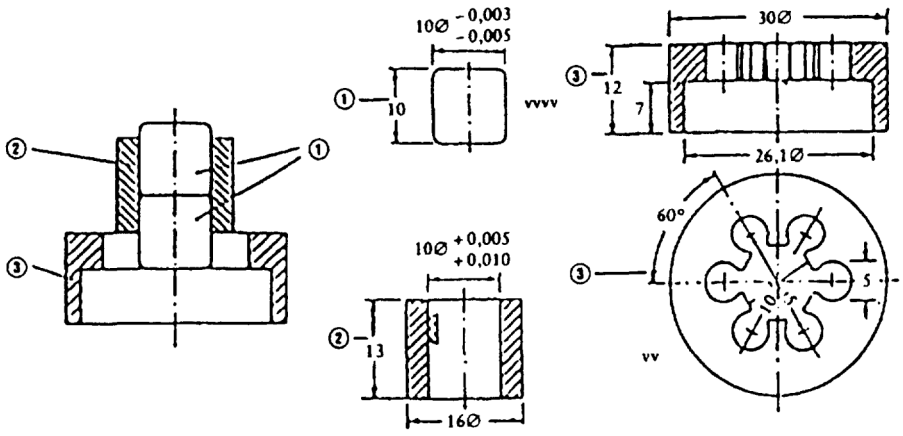


4.b att. Krītošais āmurs, apakšdaļa

(8) graduēta skala
(9) krītošais āmurs (krītošā masa)
(10) turēšanas un palaišanas ierīce
(11) pozicionēšanas plate
(12) starplakta (maināma) 26 diam. x 26
(13) pozicionēšanas gredzens ar atverēm
(14) triecienierīce

4. attēls

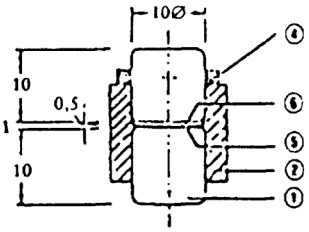
(turpinājums)

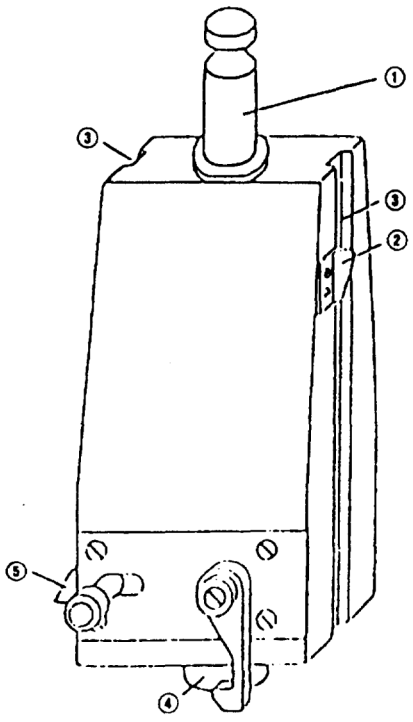


4.c att. Triecienierīce pulverveida vai pastveida vielu testēšanai

(1) tērauda cilindri
(2) tērauda cilindru vadotne
(3) pozicionēšanas gredzens ar atverēm
(a) šķērsgriezums
(b) augšskats
(4) gumijas gredzens
(5) šķidra viela (40 mm³)
(6) no šķidruma brīva telpa

4.d att. Triecienierīce šķidru vielu testēšanai



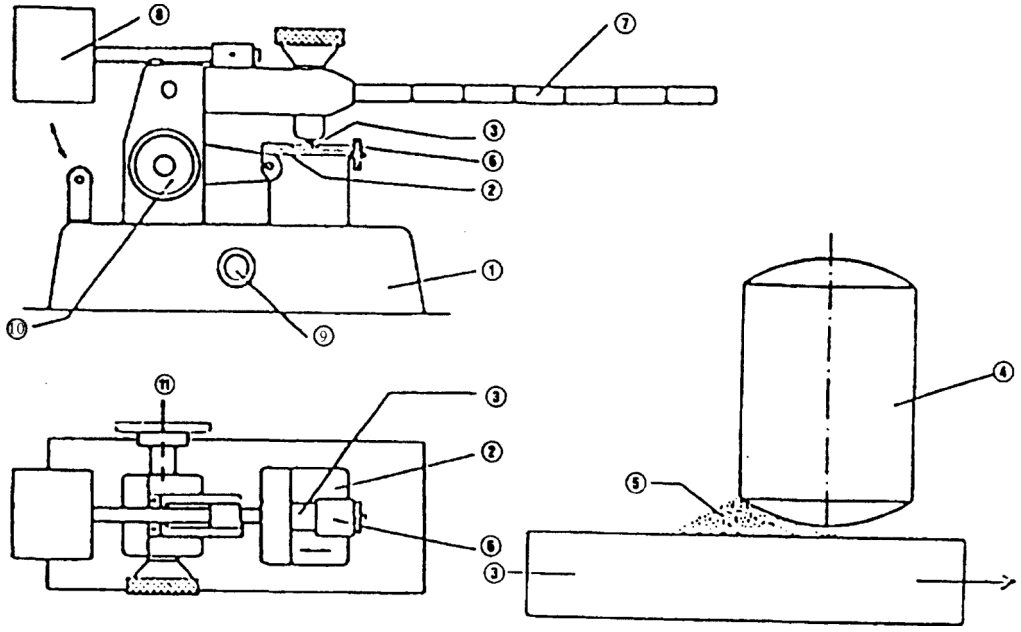


4.e att. Āmurs (masa 5 kg)

(1) piekārtais ieliktnis
(2) augstuma atzīme
(3) pozicionēšanas rieva
(4) cilindrisks belznis
(5) atsitiena uztvērējs

5. attēls

Berzes jutības testēšanas iekārta



5.a att. Berzes aparāts; pretskats un augšskats

(1) tērauda pamatne
(2) kustīgs rāmis
(3) porcelāna plate, 25 x 25 x 5 mm, nostiprināta uz rāmja
(4) nekustīga porcelāna kāja, 10 diam. x 15 mm
(5) testējamais paraugs, apm. 10 mm^3

5.b att. Kājas sākumstāvoklis uz plates

(6) kājas turētājs
(7) slodzes svira
(8) pretsvars
(9) slēdzis
(10) rokturis rāmja iestatīšanai sākumstāvoklī
(11) elektromotora griešanās virziens

A.15. PAŠAIZDEGŠANĀS TEMPERATŪRA (ŠĶIDRUMI UN GĀZES)

1. **METODE**

1.1. IEVADS.

Šai pārbaudei pakļauj sprādzienbīstamas vielas un vielas, kas saskarē ar gaisu spontāni aizdegas apkārtējā temperatūrā. Testēšanas procedūra izmantojama gāzēm, šķidrumiem un tvaikiem, kuri gaisa klātbūtnē var aizdegties no karstas virsmas.

Pašaizdegšanās temperatūra var ievērojami pazemināties katalītisku piemaisījumu klātbūtnē, no virsmas materiāla vai palielinot testēšanas trauka tilpumu.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Pašaizdegšanās spēju raksturo ar pašaizdegšanās temperatūru. Pašaizdegšanās temperatūra ir zemākā temperatūra, kurā testējamā viela aizdegas, kad to sajauc ar gaisu, ievērojot pārbaudes metodē paredzētos apstākļus.

1.3. STANDARTVIELAS

Standartvielas norādītas attiecīgajos standartos (sk. 1.6.3.). Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

1.4. METODES PRINCIPS

Pēc šīs metodes nosaka kameras iekšējās virsmas minimālo temperatūru, kurā notiek kamerā ievadītās gāzes, tvaika vai šķidruma aizdegšanās.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Atkārtojamība ir atkarīga no pašaizdegšanās temperatūras intervāla un izmantotās noteikšanas metodes.

Jutība un specifiskums ir atkarīgi no izmantotās metodes.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Aprīkojums**

Šī iekārta ir aplūkota 1.6.3. punktā minētās metodes aprakstā.

1.6.2. **Pārbaudes apstākļi**

Vielas paraugu pārbauda pēc metodes, kas minēta 1.6.3. punktā.

1.6.3. **Pārbaudes norise**

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

2. **DATI**

Reģistrē temperatūru pārbaudes laikā, atmosfēras spiedienu, izmantotā parauga lielumu, laika sprīdi līdz aizdegšanās brīdim.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi),

— izmantotā parauga lielums, atmosfēras spiediens,

— izmantotā iekārta,

— mērījumu rezultāti (temperatūra pārbaudes laikā, rezultāti, kas raksturo aizdegšanos, laika sprīdis līdz aizdegšanās brīdim),

— jebkuras papildus piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Nav.

A.16. RELATĪVĀS PAŠAIZDEGŠANĀS TEMPERATŪRAS NOTEIKŠANA CIETVIELĀM

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Šai pārbaudei pakļauj sprādzienbīstamas vielas un vielas, kas saskarē ar gaisu spontāni aizdegas apkārtējā temperatūrā.

Šīs pārbaudes mērķis ir iegūt orientējošu informāciju par cietu vielu pašaizdegšanos paaugstinātā temperatūrā.

Ja siltumu, kas rodas, vielai reaģējot ar skābekli vai tai eksotermiski sadaloties, pietiekami ātri neuzņem apkārtējā vide, pašsasilšana izraisa pašaizdegšanos. Tāpēc pašaizdegšanās notiek tad, ja siltuma rašanās ātrums pārsniedz siltuma izkliedēšanās ātrumu.

Šī metode ir noderīga, veicot cietu vielu orientējošu testēšanu. Ņemot vērā cietu vielu aizdegšanās un degšanas procesa sarežģīto raksturu, pašaizdegšanās temperatūra, ko nosaka ar šo metodi, ir izmantojama tikai salīdzināšanai.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Pašaizdegšanās temperatūra, ko nosaka ar šo metodi, ir viszemākā apkārtējā temperatūra (°C), kurā aizdegas konkrēts vielas daudzums, kas pakļauts iepriekš noteiktiem apstākļiem.

1.3. STANDARTVIELA

Nav.

1.4. METODES PRINCIPS

Noteiktu daudzumu testējamās vielas ievieto krāsnī istabas temperatūrā; parauga centrā uzņem temperatūras izmaiņu līkni atkarībā no laika, līdz krāsns temperatūra sasniedz 400 °C, vai līdz kušanas temperatūrai, ja tā ir zemāka, sildot ar ātrumu 0,5 °C/min. Šajā testā par pašaizdegšanās temperatūru uzskata krāsns temperatūru, kurā parauga temperatūra sasniedz 400 °C pašsakaršanas dēļ.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Aprīkojums**

1.6.1.1. *Krāsns*

Laboratorijas krāsns ar programmējamu temperatūru (tilpums ap 2 l) ir aprīkota ar gaisa apmaiņas sistēmu un pretesplozijas vārstu. Lai novērstu iespējamo sprādzienu, vielas sadalīšanās procesā radušās gāzes nedrīkst nonākt kontaktā ar sildelementiem.

1.6.1.2. *Stiepļu pinuma kubs*

Nerūsējoša tērauda stiepļu pinuma sietu ar acu izmēru 0,045 mm sagriež pēc 1.att. dotā parauga. Sietu saloka un nostiprina ar stiepli, izveidojot kubu ar vaļēju augšdaļu.

1.6.1.3. *Termopāri*

Piemēroti termopāri.

1.6.1.4. *Pašrakstītājs*

Der jebkurš divkanālu pašrakstītājs, kas kalibrēts 0-600 °C temperatūrai vai attiecīgajam spriegumam.

1.6.2. **Pārbaudes apstākļi**

Vielas testē veidā, kādā tās saņem.

1.6.3. **Pārbaudes norise**

Kubā iepilda pārbaudāmo vielu un pēc vieglas sakratīšanas to papildina, kamēr kubs ir pilns līdz augšai. Paraugu iekar krāsns vidū istabas temperatūrā. Vienu termoelementu novieto krāsns vidū un otru – krāsns temperatūras reģistrēšanai – starp kubu un krāsns sienu.

Kamēr krāsns temperatūra pieaug ar ātrumu 0,5 °C/min līdz 400 °C vai līdz cietās vielas kušanas temperatūrai, nepārtraukti reģistrē krāsns un parauga temperatūru.

Vielai aizdegoties, parauga termoelements uzrāda ļoti strauju temperatūras pieaugumu virs krāsns temperatūras.

2. **DATI**

Novērtējumam izmanto krāsns temperatūru, kurā paraugs ir sasniedzis 400 °C pašsakaršanas rezultātā (skat. 2. att.).

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— pārbaudāmās vielas apraksts,

— mērījumu rezultāti kopā ar temperatūras līkni,

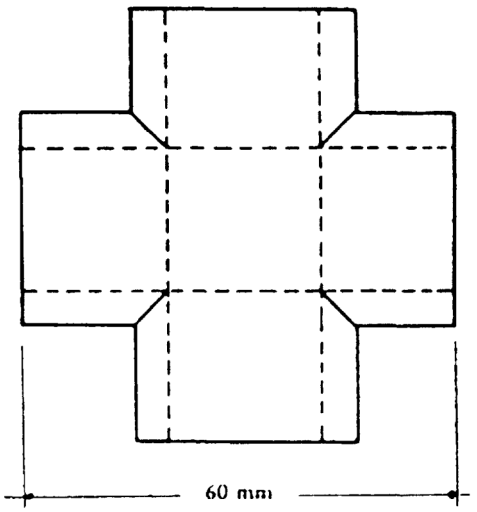
— jebkuras papildu piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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

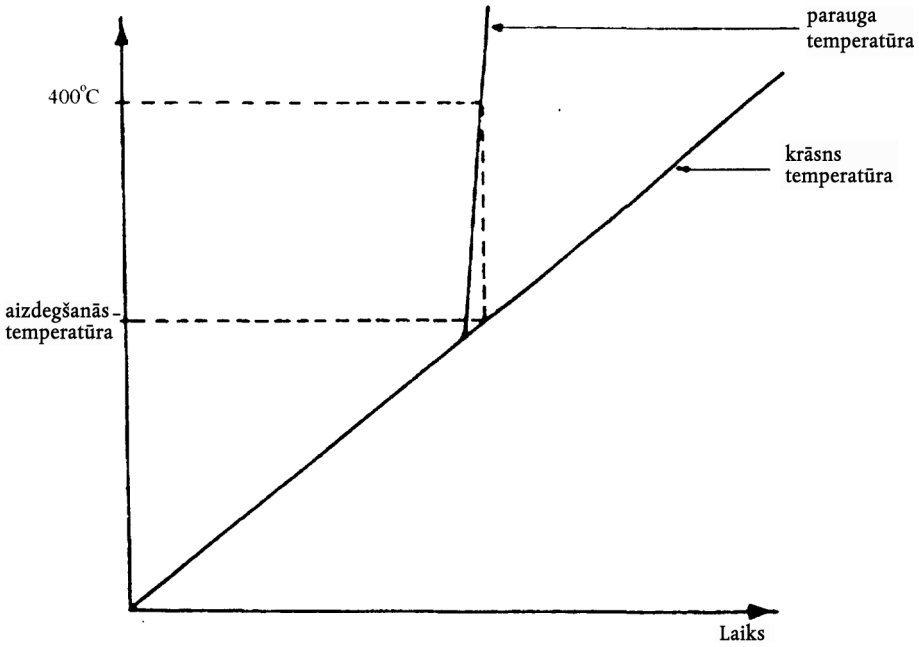
1. attēls

Pārbaudē izmantojamā 20 mm kuba piegrieztne



2. attēls

Raksturīga temperatūras/laika līkne



A.17. OKSIDĒJOŠĀS ĪPAŠĪBAS (CIETVIELAS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Pirms šīs pārbaudes veikšanas ir lietderīgi jau iepriekš iegūt informāciju par pārbaudāmās vielas iespējamo sprādzienbīstamību.

Šī metode nav izmantojama šķidrumiem, gāzēm, sprādzienbīstamām vai viegli uzliesmojošām vielām un organiskajiem peroksīdiem.

Šis tests nav jāveic gadījumos, kad vielas struktūrformula nepārprotami liecina, ka viela nevar stāties eksotermiskās reakcijās ar viegli uzliesmojošiem materiāliem.

Lai noskaidrotu, vai pārbaudes gaitā būtu jāievēro īpaša piesardzība, ir jāveic orientējoši izmēģinājumi.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Degšanas ilgums ir reakcijas ilgums sekundēs, kurā reakcijas zona aptver visu paraugu saskaņā ar 1.6. punktā aprakstīto metodi.

Degšanas ātrums: izteikts milimetros sekundē.

Maksimālais degšanas ātrums: lielākais degšanas ātrums, kas noteikts maisījumiem, kuros ir 10 līdz 90 masas % oksidētāja.

1.3. STANDARTVIELA

Testēšanai un orientējošiem izmēģinājumiem par standartvielu izmanto analītiski tīru bārija nitrātu.

Par standartmaisījumu izmanto bārija nitrāta (parasti izmanto 60 masas % bārija nitrāta) maisījumu ar celulozes pulveri, kas pagatavots, kā norādīts 1.6. punktā, un kam piemīt maksimālais degšanas ātrums.

1.4. METODES PRINCIPS

Orientējošu izmēģinājumu veic drošības apsvērumu dēļ. Papildus testēšana nav jāveic gadījumos, kad orientējošos izmēģinājumos skaidri redzams, ka vielai ir oksidētāja īpašības. Ja tā nenotiek, testēšanu veic pēc pilnas programmas.

Šajā gadījumā pārbaudāmo vielu sajauc ar labi zināmu ugunsnedrošu vielu dažādās attiecībās. Pēc tam no katra maisījuma izveido valnīti un no viena gala to aizdedzina. Iegūto maksimālo degšanas ātrumu salīdzina ar standartmaisījuma maksimālo degšanas ātrumu.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Vajadzības gadījumā var izmantot jebkuru smalcināšanas un sajaukšanas paņēmienu, lai panāktu, ka maksimālais degšanas ātrums sešās atsevišķās pārbaudēs neatšķiras no aritmētiskā vidējā vairāk par 10 %.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošana**

1.6.1.1. *Pārbaudāmā viela*

Samazina pārbaudāmā parauga daļiņu lielumu līdz < 0,125 mm, kā tas norādīts tālāk: vielu sijā un rupjo frakciju sasmalcina, šo procedūru atkārto, līdz viss testējamais vielas daudzums iziet caur sietu.

Var izmantot jebkuru smalcināšanas un sijāšanas paņēmienu, kas atbilst kvalitātes kritērijiem.

Pirms maisījuma pagatavošanas vielu žāvē 105 °C temperatūrā, līdz tās svars kļūst nemainīgs. Ja pārbaudāmās vielas sadalīšanās temperatūra ir zemāka par 105 °C, tā attiecīgi jāžāvē zemākā temperatūrā.

1.6.1.2. *Ugunsnedrošā viela*

Kā ugunsnedrošo vielu izmanto celulozes pulveri. Šim nolūkam der celuloze, kas paredzēta izmantošanai plānslāņa hromatogrāfijā vai kolonnu hromatogrāfijā. Kā rāda pieredze, tā var būt celuloze, kurai 85 % šķiedru ir garumā no 0,020 līdz 0,075 mm. Celulozes pulveri izsijā caur sietu ar acu izmēru 0,125 mm. Visai testēšanai jāizmanto celulozes no vienas un tās pašas partijas.

Pirms maisījuma pagatavošanas celulozes pulveri žāvē 105 °C temperatūrā, līdz tās svars kļūst nemainīgs.

Ja orientējošam izmēģinājumam izmanto koksnes putekļus, ņem skujkoku koksnes putekļus, kas izsijāti caur sietu ar acu lielumu 1,6 mm, rūpīgi tās samaisa un tad žāvē četras stundas 105 °C temperatūrā, izklājot tās 25 mm biezā kārtā. Pēc atdzesēšanas tās līdz izmantošanas brīdim (vēlams 24 stundu laikā pēc žāvēšanas) glabā hermētiskā tvertnē, ko piepilda iespējami pilnu.

1.6.1.3. *Aizdegšanās avots*

Par uguns avotu izmanto gāzes degļa karstu liesmu (minimālais diametrs 5 mm). Ja izmanto citu uguns avotu (piemēram, veicot testēšanu inertā atmosfērā), tas attiecīgi jāapraksta un jāpamato.

1.6.2. **Pārbaudes norise**

Piezīme:

Oksidētāju maisījumi ar celulozi vai koksnes putekļiem ir sprādzienbīstami, tāpēc ir jāievēro piesardzības pasākumi.

1.6.2.1. *Iepriekšējs tests*

Izžāvēto vielu sajauc ar sausu celulozi vai koksnes putekļiem, lai pārbaudāmās vielas un celulozes vai koksnes putekļu masas attiecība būtu 2:1, un, iepildot koniskas formas traukā, (piemēram, stikla piltuve ar aizbāztu kātu) no maisījuma nepieblīvējot izveido nelielu konisku kaudzīti, kuras izmēri ir 3,5 cm (apakšējais diametrs) x 2,5 cm (augstums).

Kaudzīti novieto uz vēsas nedegoša materiāla plātnes ar zemu siltumvadītspēju. Pārbaudi veic velkmes skapī, kā norādīts 1.6.2.2. punktā.

Ar uguns avotu pieskaras konusam. Novēro un reģistrē notiekošās reakcijas intensitāti un ilgumu.

Ja reakcija noris spēji, uzskata, ka vielai ir oksidētāja īpašības.

Ja rezultāti vieš šaubas, katrreiz jāveic pilna pārbaude, kā tas norādīts tālāk.

1.6.2.2. *Sliedes tests*

Sagatavo oksidētāja/celulozes maisījumus, kas satur no 10 līdz 90 masas % oksidētāja, ar 10 % palielinājumu. Strīdīgos gadījumos izmanto oksidētāja/celulozes maisījumus ar mazāku palielinājumu, lai precīzāk noteiktu maksimālo degšanas ātrumu.

No pārbaudāmas vielas ar veidnes palīdzību izveido valnīti. Veidne ir izgatavota no metāla, tās garums ir 250 mm un trijstūra šķērsgriezumu ar augstumu iekšpusē 10 mm, bet platumu iekšpusē 20 mm. Veidnes abās pusēs garenvirzienā sānu norobežošanai piestiprina divas metāla plāksnes, kuras izvirzītas 2 mm virs trijstūra šķērsgriezuma (sk. att.). To nesablīvējot piepilda ar maisījumu nelielā pārākumā. Pēc veidnes kritiena uz cietas virsmas no 2 cm augstuma lieko vielu noņem ar slīpi novietotu skārda sloksni. Tad noņem norobežotājplāksnes un atlikušo pulveri izlīdzina ar veltni. Veidnei uzliek pamatplati no nedegoša materiāla bez porām un zemu siltuma vadītspēju, apgriež otrādi un veidni noņem.

Pārbaudāmās vielas valnīti ievieto velkmes skapī perpendikulāri gaisa plūsmai.

Gaisa plūsmas ātrumam jābūt pietiekami lielam, lai dūmi neiekļūtu laboratorijā, un to nedrīkst mainīt pārbaudes gaitā. Ap iekārtu jānovieto ekrāns, kas to aizsargā no gaisa plūsmas.

Ņemot vērā celulozes un pārbaudāmo vielu higroskopiskumu, pārbaude jāveic cik iespējams ātri.

Valnīti no viena gala aizdedzina, pieskaroties ar liesmu.

Reakcijas ilgumu reģistrē 200 mm posmā pēc tam, kad reakcijas zona ir aptvērusi pirmos 30 mm.

Testēšanu veic, izmantojot standartvielu un vismaz vienreiz ar katru no testējamās vielas maisījumiem ar celulozi.

Ja tiek konstatēts, ka maksimālais degšanas ātrums ir ievērojami lielāks par standartvielas degšanas ātrumu, testēšanu var neturpināt; citādi izmēģinājums ar trijiem maisījumiem, kuriem ir lielākais degšanas ātrums, ir jāatkārto piecas reizes.

Ja ir aizdomas, ka iegūtais rezultāts ir šķietami pozitīvs, tests jāatkārto ar inertu vielu celulozes vietā, kurai ir līdzīgs daļiņu izmērs, piemēram, ar kizelgūru. Otra iespēja ir inertā atmosfērā (< 2 % v/v skābekļa) atkārtoti testēt to testējamās vielas/celulozes maisījumu, kuram ir lielākais degšanas ātrums.

2. **DATI**

Drošības apsvērumu dēļ uzskata, ka pārbaudāmās vielas oksidējošās īpašības raksturo maksimālais degšanas ātrums un nevis tā vidējā vērtība.

Novērtēšanai pietiek ar maksimālo degšanas ātrumu, kas noteikts sešu pārbaužu sērijā ar vienu izvēlēto maisījumu.

Katram maisījumam konstruē maksimālā degšanas ātruma grafiku atkarībā no oksidētāja koncentrācijas tajā. Pēc šā grafika nosaka maksimālo degšanas ātrumu.

Izmēģinājumu sērijā noteiktās sešas noteiktās degšanas ātruma vērtības maisījumam ar maksimālo degšanas ātrumu nedrīkst atšķirties vairāk par 10 % no to vidējās aritmētiskās vērtības; citādi jāpilnveido sasmalcināšanas un maisījumu sagatavošanas metodes.

Iegūto maksimālo degšanas ātrumu salīdzina ar standartmaisījuma maksimālo degšanas ātrumu (skat. 1.3. punktu).

Ja testēšanu veic inertā atmosfērā, maksimālo reakcijas ātrumu salīdzina ar standartvielas maksimālo reakcijas ātrumu inertā atmosfērā.

3. **PĀRSKATS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— testējamās vielas identifikācija, sastāvs, tīrība, mitruma saturs u.c.,

— analizējamā parauga sagatavošana (piemēram, smalcināšana, žāvēšana u.tml.),

— izmēģinājumos izmantotais uguns avots,

— mērījumu rezultāti,

— reakcijas veids (piemēram, virsējās kārtas uzliesmošana, visa parauga degšana, jebkuri dati par sadegšanas produktiem u.tml.),

— jebkuras papildu piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju, tostarp dati par pārbaudāmās vielas un standartvielas reakcijas intensitāti (uzliesmošana, dzirksteļošana, dūmu rašanās, lēna gruzdēšana utt.) un aptuveno ilgumu, kas gūti sākotnējā drošības pārbaudē vai orientējošā izmēģinājumā,

— testēšanas rezultāti ar inertu vielu, ja tie veikti,

— testēšanas rezultāti ar inertā atmosfērā, ja tie veikti.

3.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA.

Uzskata, ka vielai piemīt oksidējošas īpašības, ja:

a) iepriekšējā testā tā izraisa intensīvu reakciju;

b) analizējamo maisījumu maksimālais degšanas ātrums pārbaudes laikā pārsniedz vai ir vienāds ar standartmaisījuma (celuloze un bārija nitrāts) maksimālo degšanas ātrumu.

Lai neiegūtu šķietami pozitīvu rezultātu, rezultātus interpretējot ņem vērā rezultātus, kuri iegūti, testējamo vielu sajaucot ar inertu materiālu un/vai veicot testēšanu inertā atmosfērā.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

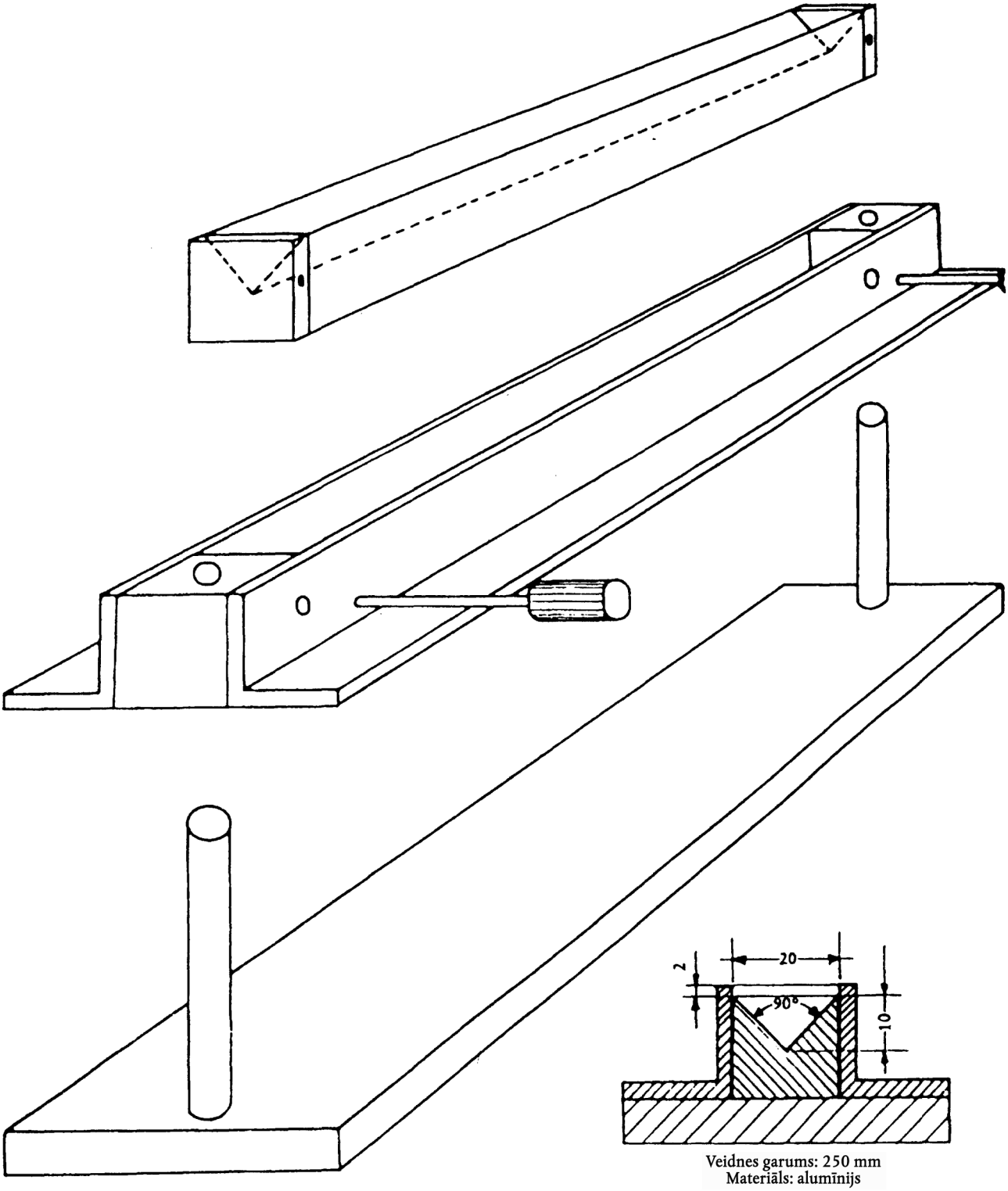
1) *NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.*

Papildinājums

Attēls

Veidne un papildu aprīkojums degšanas ilguma noteikšanai

(Visi izmēri norādīti milimetros)



B DAĻA: METODES TOKSICITĀTES NOTEIKŠANAI

VISPĀRĪGS IEVADS: B DAĻA

A. IEVADS

Skat. Vispārīgo ievadu.

B. DEFINĪCIJAS

i) **Akūtā toksicitāte** izpaužas kā nelabvēlīga ietekme, ko novēro konkrētā (parasti 14 dienu) laikā pēc vienas vielas devas ievadīšanas.

ii) **LD_{50}** (vidējā letālā deva) ir viena statistiski iegūta vielas deva, pēc kuras ievadīšanas parasti iestājas 50 % dzīvnieku nāve. LD_{50} norāda kā pārbaudāmās vielas masu attiecībā pret izmēģinājumu dzīvnieka ķermeņa masu (mg/kg ķermeņa masas).

iii) **LC_{50}** (vidējā letālā koncentrācija) ir statistiski iegūta vielas koncentrācija, pēc kuras iedarbības, kas ilgst noteiktu laiku, parasti iestājas 50 % dzīvnieku nāve ekspozīcijas laikā vai noteiktā laikā pēc ekspozīcijas. LC_{50} norāda kā pārbaudāmās vielas koncentrāciju gaisa standarttilpumā (mg/l).

iv) **Nekaitīguma līmenis** ir maksimālā deva vai iedarbības līmenis, kas izmantots izmēģinājumam, kurā nekonstatē manāmas toksiskuma pazīmes.

v) **Subakūtā/subhroniskā toksicitāte** izpaužas kā nelabvēlīga ietekme uz izmēģinājumu dzīvniekiem pēc ķīmiskas vielas atkārtotas ikdienas ievadīšanas vai iedarbības, kura ilgst īsu brīdi, salīdzinot ar dzīvnieku mūža ilgumu.

vi) **Maksimālā panesamā deva** (*MTD*) ir augstākais devas līmenis, kas dzīvniekiem izraisa toksicitātes pazīmes, neradot būtisku ietekmi uz izdzīvošanu saistībā ar testu, kurā šī deva lietota.

vii) **Ādas kairinājums** izpaužas kā atgriezeniskas izmaiņas, kas rodas pēc pārbaudāmās vielas aplikācijas, attīstoties ādas iekaisumam.

viii) **Acu kairinājums** izpaužas kā atgriezeniskas izmaiņas, kas rodas acīs pēc pārbaudāmās vielas aplikācijas uz acs ārējās virsmas.

ix) **Ādas sensibilizācija** (alerģiskais kontaktdermatīts) ir ķīmiskas vielas izraisīta imunoloģiski pastarpināta ādas reakcija.

Inhalācijas toksicitātes definīcijas

— **aerosols** ir gaisā homogēni disperģētas (cietvielu un/vai šķidrumu) daļiņas,

— **aerodinamiskais diametrs** ir sfēras diametrs, kuras blīvums ir viena vienība (1 g/cm^3), kurai ir tāds pats nosēšanās beigu ātrums kā attiecīgajai daļiņai,

— **aerodinamiskā diametra masas mediāna** (*MMAD*) ir aprēķinātais aerodinamiskais diametrs, kas aerosola daļiņu izmēra sadalījumu pēc masas dala uz pusēm,

— **ģeometriskā standartnovirze** (*GSD*) ir aprēķinātās 84. procentiles attiecība pret 50. procentili, kas norāda kumulatīvās daļiņu sadalījuma līknes virziena koeficientu pieņemot, ka daļiņas ir logaritmiski normāli sadalītas.

Definīcijas akūtās orālās toksicitātes noteikšanas procedūrai ar fiksēto devu paņēmienu

— **izteikta toksicitāte** ir toksiskā iedarbība, kas novērojama pēc pārbaudāmās vielas ievadīšanas, kas ir tik spēcīga, ka nākamā lielākā deva var izraisīt nāves iestāšanos,

— **kritiskā deva** ir lielākā no četrām fiksētajām devām, ko var ievadīt, neizraisot ar vielu saistītu mirstību (iekļaujot humānu nogalināšanu).

C. MUTAGENITĀTE (ieskaitot kancerogenitātes priekšizpēti)

Veicot vielas iespējamās mutagēnās iedarbības iepriekšēju novērtēšanu, ir jāiegūst informācija par diviem iespējamiem mehānismiem, proti, gēnu mutācijām un hromosomu aberācijām.

Šos abus mehānismus novērtē, veicot šeit norādītās pārbaudes.

i) Gēnu mutāciju jeb punktmutāciju noteikšana šādu prokariotu šūnās kā, piemēram, *Salmonella typhimurium*; šim nolūkam var izmantot arī *Escherichia coli*. Kuru no šiem organismiem izvēlēties, var būt atkarīgs no pārbaudāmās ķīmiskās vielas īpašībām.

ii) Hromosomu aberāciju noteikšana zīdītāju šūnu kultūrās *in vitro*; var izmantot arī *in vivo* metodes (mikrokodola tests vai kaula smadzeņu šūnu analīze metafāzes laikā). Tomēr, ja nav kontrindikāciju, *in vitro* metodēm noteikti jādod priekšroka.

D. NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Rezultātus, kas iegūti izmēģinājumos ar dzīvniekiem un *in vitro*, tikai ar zināmām atrunām var tieši attiecināt uz cilvēkiem, un tas ir jāņem vērā, izvērtējot un interpretējot izmēģinājumu rezultātus.

Ja iespējams, nosakot ķīmisko vielu iespējamo iedarbību uz cilvēkiem, var izmantot pierādījumus par kaitīgo iedarbību uz cilvēka organismu.

E. LITERATŪRAS NORĀDES

Eksperimentālās toksikoloģijas straujā attīstība nodrošina plašu literatūras klāstu par jebkuru tēmu. Noderīga informācija atrodama ESAO Testēšanas norādījumos.

Papildu piezīmes

Dzīvnieku kopšana

Stingrai apkārtējo apstākļu kontrolei un pienācīgai dzīvnieku kopšanai ir svarīga nozīme, veicot toksicitātes pārbaudi.

i) Turēšanas apstākļi

Telpās, kur izmitina izmēģinājumu dzīvniekus, katrai sugai nodrošina piemērotus apkārtējos apstākļus. Žurkām, pelēm un jūrascūciņām piemēroti apstākļi ir telpas temperatūra 22 ± 3°C ar relatīvo mitrumu 30 līdz 70 %; trušiem temperatūrai jābūt 20 C ± 3°C ar relatīvo mitrumu 30 līdz 70 %.

Dažas eksperimentālās metodes ir īpaši jutīgas pret temperatūras svārstībām, tāpēc šādos gadījumos pārbaudes metodes aprakstā sīki jāatrunā attiecīgie nosacījumi. Visos toksiskas iedarbības pētījumos jāuzrauga un jāreģistrē temperatūra un gaisa mitrums, šie rādījumi jāiekļauj pētījuma beigu ziņojumā.

Ja izmanto mākslīgo apgaismojumu, gaisma un tumsa parasti mainās ik pēc 12 stundām. Apgaismojuma režīma dati ir jāpieraksta un jāietver pētījuma beigu ziņojumā.

Veicot izmēģinājumus ar dzīvniekiem, protokolā ir svarīgi norādīt izmantoto būru tipu un katrā būrī izmitināto dzīvnieku skaitu ķīmiskās vielas iedarbības laikā, kā arī vēlākajā novērošanas laikā.

ii) Barošanas apstākļi

Jāizvēlas tāda barība, kas atbilst katras sugas prasībām attiecībā uz uzturu. Ja pārbaudāmo vielu dzīvniekiem ievada ar barību, tās uzturvērtība var samazināties, vielai mijiedarbojoties ar kādu barības komponentu.

Šādas reakcijas varbūtība jāņem vērā, interpretējot pārbaužu rezultātus.

Barība nedrīkst saturēt iedarbīgā koncentrācijā piemaisījumus, par kuriem ir zināms, ka tie ietekmē toksicitāti.

Dzīvnieku labturība

Izstrādājot testu metodes, pienācīga vērība ir piegriezta dzīvnieku labturībai. Turpmāk ir doti daži piemēri, bet to uzskaitījums nav pilnīgs. Precīzs formulējums un/vai apstākļi ir jāmin metožu tekstos.

— Akūtas perorālās toksicitātes noteikšanai ieviesta alternatīva "Fiksēto devu metode" Pēc šīs metodes kā īpašu galīgo punktu neizmanto nāves iestāšanos. Pēc tās izmanto mazāk dzīvnieku, ir mazāk sāpju un ciešanu nekā nosakot perorālo toksicitāti pēc klasiskās metodes.

— Izmantojamo dzīvnieku skaitu samazina līdz zinātniski pieņemamam minimumam: izmantojot B.1. un B.3. metodi, vienam devas līmenim izmanto tikai 5 viena un tā paša dzimuma dzīvniekus; tikai 10 dzīvniekus (un negatīvās kontroles grupā tikai 5) izmanto, lai noteiktu ādas sensibilizāciju ar maksimizācijas testu jūrascūciņām (B.6. metode); ir samazināts arī pozitīvajai kontrolei vajadzīgais dzīvnieku skaits mutagenitātes testā *in vivo* (B.11. un B.12. metode)

— Dzīvnieku sāpes un ciešanas testa laikā iespējami samazina: dzīvniekus, kuriem ilgstoši ir smagas ciešanas un sāpes, var būt humāni jānogalina; testa vielu dozēšana nav jāizdara veidā, par ko ir zināms, ka tas izraisa izteiktas sāpes un ciešanas kodīgo un kairinošo īpašību dēļ (B.1., B.2. un B.3. metode).

— No testēšanas ar neatbilstīgi lielām devām izvairās, ieviešot pieļaujamā daudzuma testus ne tikai akūtās toksicitātes testos (B. 1., B. 2. un B. 3. metode), bet arī *in vivo* mutagenitātes testos (B.11. un B.12. metode).

— Kairinošo īpašību testēšanas stratēģija tagad ļauj testu neizdarīt vai to samazināt līdz izmēģinājumam ar vienu dzīvnieku, ja var nodrošināt pietiekamus zinātniskos pierādījumus.

Šādi zinātniskie pierādījumi var pamatoties uz vielas fizikāli ķīmiskajām īpašībām, iepriekš citur veiktu izmēģinājumu rezultātiem vai labi novērtētiem *in vitro* testiem. Piemēram, ja ar vielu ir izdarīts akūtās toksicitātes pētījums, izmantojot pieļaujamā daudzuma testa devas rezorbciju caur ādu (B.3. metode), un ja ādas kairinājums nav novērots, turpmāka ādas kairinājuma testēšana (B.4. metode) var nebūt vajadzīga; materiāli, kas ādas kairinājuma pētījumā ir uzrādījuši izteikti kodīgu vai smagu ādas kairinājumu (B.4. metode), nav turpmāk jāpārbauda acu kairinājuma testā (B.5. metode).

B.1. AKŪTA TOKSICITĀTE (PĒC PERORĀLAS IEVADĪŠANAS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Sk. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Pārbaudāmo vielu dažādās devās ar zondes palīdzību ievada orāli vairākām izmēģinājumu dzīvnieku grupām, katrai grupai saņemot vienādu devu. Dozas var izraudzīties pēc diapazona noteikšanas testa rezultātiem. Pēc tam novēro toksisko iedarbību un reģistrē nāves gadījumus. Pārbaudes laikā mirušos dzīvniekus secē, beidzoties pārbaudei, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus. Šī metode galvenokārt paredzēta pētījumiem ar grauzējiem.

Dzīvniekus, kas uzrāda smagas un ilgstošas ciešanu un sāpju pazīmes, var būt humāni jānogalina. Testa vielu dozēšana nav jāizdara veidā, par ko ir zināms, ka tas izraisa izteiktas sāpes un ciešanas kodīgo un kairinošo īpašību dēļ.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Dzīvniekus pirms izmēģinājuma vismaz piecas dienas pieradina pie izmitināšanas un barošanas apstākļiem. Veselus un jaunus pieaugušus dzīvniekus pēc nejaušības principa sadala izmēģinājumu grupās. Vajadzības gadījumā pārbaudāmo vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā šķīdinātājā. Vielu ieteicams vispirms izšķīdināt ūdenī un tikai tad, ja tas neizdodas, izmanto tās šķīdumu augu eļļā vai kādā citā piemērotā šķīdinātājā, vai arī suspendē. Ja izmanto nevis ūdeni, bet citu šķīdinātāju, ir jāzina tā toksikoloģiskās īpašības vai tās jānosaka pirms izmēģinājuma vai izmēģinājuma laikā. Parasti grauzējiem ievada ne vairāk kā 10 ml šķīduma uz kg ķermeņa svara, bet ja izmanto ūdens šķīdumu, var ievadīt 20 ml/kg. Pārbaudāmā šķīduma tilpumam jābūt pēc iespējas vienādam, tā koncentrāciju pielāgo tā, lai visām devām būtu nemainīgs tilpums.

1.6.2. **Pārbaudes apstākļi**

1.6.2.1. *Eksperimenta dzīvnieki*

Ja nav citu ieteikumu, vēlams izmantot žurkas.

Jāizmanto plaši pazīstamas laboratorijas dzīvnieku līnijas. Abu dzimumu grupās dzīvnieku masas atšķirības izmēģinājuma sākumā nedrīkst būt lielākas par ± 20 % no attiecīgās vidējās vērtības.

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits un dzimums*

Katras devas iedarbību pārbauda uz vismaz pieciem grauzējiem. Tiem visiem jābūt viena dzimuma. Ja izmanto mātītes, tās nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja ir informācija, kas liecina par to, ka viens no dzimumiem ir ievērojami jutīgāks pret vielas iedarbību, izmēģinājumiem jāizmanto šā dzimuma dzīvnieki.

Piezīme: Akūtās toksicitātes izmēģinājumiem izmantojot par grauzējiem augstāk attīstītus dzīvniekus, jāapsver iespējas izmantot to mazāku skaitu.

Devas jāizraugās ļoti rūpīgi, un jācenšas nepārsniegt devas, kurām ir vidēji toksiska iedarbība. Šādos izmēģinājumos izvairās ievadīt tādas pārbaudāmās vielas devas, kurām ir letāla iedarbība.

1.6.2.3. *Devu līmeņi*

Jāizvēlas vairākas devas, vismaz trīs devas pietiekami plašā diapazonā, lai izmēģinājumu grupās būtu iespējams novērot atšķirīgu toksisko iedarbību un mirstību. Jāiegūst pietiekami daudz datu, lai varētu noskaidrot iedarbības atkarību no devas un, ja iespējams, pienācīgi noteikt LD_{50}.

1.6.2.4. *Pieļaujamā daudzuma tests*

Izmantojot grauzējus, pieļaujamā daudzuma testu var veikt iepriekš aprakstītajā kārtībā ar dzīvnieku grupu, kurā ir pieci tēviņi un piecas mātītes, izmantojot vienu devas līmeni, kas ir vismaz 2000 mg/kg ķermeņa masas. Ja novērojama ar savienojumu saistāma mirstība, var būt jāveic izmēģinājumi pēc pilnas programmas.

1.6.2.5. *Novērošanas periods*

Dzīvniekus novēro vismaz 14 dienas. Tomēr novērošanas ilgumu var ietekmēt dažādi apstākļi. To nosaka novērotās toksiskās reakcijas, to iestāšanās ātrums un dzīvnieku atveseļošanās ilgums; tāpēc vajadzības gadījumā to var pagarināt. Svarīgi zināt brīdi, kad parādās un izzūd toksiskuma pazīmes, un brīdi, kurā iestājas nāve, jo īpaši tad, ja tā iestājas novēloti.

1.6.3. **Procedūra**

Pirms vielas ievadīšanas dzīvniekus nedrīkst barot. Žurkas nesaņem barību visu iepriekšējo nakti; dzīvniekus ar straujāku vielmaiņu atstāj bez barības uz īsāku laiku; ūdens netiek ierobežots. Nākamajā dienā dzīvniekus nosver un vienā paņēmienā ar mākslīgo barošanu ievada pārbaudāmo vielu. Ja nav iespējams uzreiz ievadīt visu devu, to sadala un ievada pa daļām laika posmā, kas nepārsniedz 24 stundas. Pēc vielas ievadīšanas dzīvniekus var atstāt bez barības vēl uz trijām līdz četrām stundām. Ja vielas devu ievada pa daļām kādā laika posmā, atkarībā no tā ilguma var gadīties, ka dzīvnieki jānodrošina ar barību un ūdeni.

Pēc vielas ievadīšanas regulāri veic novērojumus un tos protokolē, atsevišķi reģistrējot datus par katru dzīvnieku. Pirmajā dienā novērošanu veic biežāk.

Katru darbdienu vismaz vienreiz veic rūpīgu klīnisko izmeklēšanu, pārējos novērojumus veic ik dienas, pienācīgi gādājot par to, lai samazinātu izmēģinājumu dzīvnieku zudumus, piemēram, mirušos dzīvniekus uzšķērž vai ievieto ledusskapī, bet vārgus un mirstošus īpatņus nošķir vai nokauj. Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar to ādu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas. Īpaša vērība jāpievērš trīcei, konvulsijām, salivācijai, caurejai, miegainībai, miegam un komas stāvoklim. Iespējami precīzi reģistrē nāves iestāšanās laiku.

Izmēģinājuma laikā mirušos dzīvniekus uzšķērž; beidzoties izmēģinājumam, veic sekciju arī to pārdzīvojušajiem dzīvniekiem. Reģistrē visas novērotās patoloģiskās izmaiņas. Vajadzības gadījumā ņem audu paraugus histopatoloģiskai izmeklēšanai.

Toksicitātes novērtēšana pretējam dzimumam

Pēc izmēģinājumu pabeigšanas ar viena dzimuma dzīvniekiem, lai noskaidrotu, vai pretējais dzimums nav ievērojami jutīgāks pret pārbaudāmās vielas iedarbību, veic papildus izmēģinājumus ar otra dzimuma vismaz vienu piecu dzīvnieku grupu. Konkrētos apstākļos var izmantot mazāku skaitu dzīvnieku. Ja ir pietiekama informācija par to, ka tā dzimuma dzīvnieki, kas izmantoti izmēģinājumiem, ir ievērojami jutīgāki par otra dzimuma dzīvniekiem, izmēģinājumus ar tiem var neveikt.

2. **DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā grupā pirms izmēģinājuma, nāves iestāšanās brīdi katram dzīvniekam, to dzīvnieku skaitu, kuriem novērotas citas toksiskuma pazīmes, toksiskās iedarbības izpausmes un sekcijas rezultātus. Katra dzīvnieka masu reģistrē īsi pirms pārbaudāmās vielas ievadīšanas, nedēļu vēlāk un iestājoties nāvei. Ja dzīvnieki izdzīvo ilgāk nekā vienu dienu, jāaprēķina un jāpieraksta svara izmaiņas. Dzīvnieki, kuri humānu apsvērumu dēļ nonāvēti ar savienojumu saistītu sāpju un ciešanu dēļ, tiek uzskaitīti kā miruši no vielas iedarbības. LD_{50} var aprēķināt pēc atzītas metodes. Izvērtējot datus, jānoskaidro, vai pastāv korelācija starp pārbaudāmās vielas iedarbību un novēroto anomāliju biežumu un smagumu, ieskaitot uzvedības izmaiņas, klīniskās novirzes, makropatoloģiskās izmaiņas, ķermeņa masas svārstības, mirstību un pārējos toksikoloģiskos rādītājus.

3. **PĀRSKATS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas un barošanas apstākļi, barība u.tml.,

— pārbaudes apstākļi,

— izmantotās devas (vajadzības gadījumā arī šķīdinātāja koncentrācija),

— izmēģinājumiem izmantoto dzīvnieku dzimums,

— datu apkopojums pēc dzimuma un devas līmeņa (t.i., izmēģinājuma laikā mirušo vai nonāvēto dzīvnieku skaits, dzīvnieku skaits, kuriem konstatēta toksiskā iedarbība, izmantoto dzīvnieku skaits),

— nāves iestāšanās laiks pēc devas ievadīšanas, iemesli un kritēriji nonāvēšanai humānu apsvērumu dēļ,

— visi novērojumi,

— LD_{50} vērtība dzimumam, ar kuriem veikti izmēģinājumi pēc pilnas programmas, pēc 14 dienām (pēc norādītās noteikšanas metodes),

— LD_{50} 95 % ticamības intervāls (ja var aprēķināt);

— devas/mirstības līkne un tās virziena koeficients (ja to pieļauj noteikšanas metode),

— sekcijas rezultāti,

— histopatoloģiskās izmeklēšanas dati,

— ar pretējā dzimuma dzīvniekiem veiktā papildus izmēģinājuma rezultāti,

— rezultātu novērtējums (īpašu vērību veltot tam, kā dzīvnieku nonāvēšana izmēģinājumu laikā humānu apsvērumu dēļ varējusi ietekmēt aprēķināto LD_{50} vērtību),

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Sk. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Sk. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.I bis AKŪTA TOKSICITĀTE (ORĀLI) - FIKSĒTU DEVU METODE

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Sk. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Akūtās orālās toksicitātes izmēģinājumos iegūst datus par kaitīgo iedarbību, kāda var būt neilgi pēc vienas pārbaudāmās vielas devas ievadīšanu organismā caur gremošanas traktu.

Izmēģinājumus pēc fiksēto devu metodes veic divos posmos.

Orientējošos devu diapazona atrašanas izmēģinājumos secīgi izpēta dažādu orāli ar mākslīgo barošanu ievadītu devu iedarbību uz atsevišķiem viena dzimuma dzīvniekiem. Devu diapazona izmēģinājumos iegūst informāciju par toksicitāti atkarībā no devas, kā arī novērtēto minimālo letālo devu. Parasti izmēģinājumu posmā izmanto ne vairāk par pieciem dzīvniekiem.

Galvenajā izmēģinājumā vielu ievada orāli ar mākslīgo barošanu dzīvnieku grupām no pieciem tēviņiem un piecām mātītēm vienā iepriekš noteiktā devas līmenī (5, 50, 500 vai 2 000 mg/kg). Izmantoto devu nosaka diapazona izmēģinājumā, un tā ir deva, kura var izraisīt "izteiktu toksicitāti" (sk. 1.2. Definīcijas), tomēr ne nāvi.

Pēc ievadīšanas veic iedarbības novērojumus.

Ja sākotnēji izraudzītajam devas līmenim ir izteikta toksicitāte, tomēr tas nerada ar savienojumu saistītu mirstību, izmēģinājumi nav jāturpina.

Ja izraudzītajam devas līmenim netiek konstatēta izteikta toksicitāte, vielu izmēģina vēlreiz, izmantojot nākamo augstāko devas līmeni. Ja dzīvnieki nobeidzas vai gadījumos, kad spēcīgas toksiskās iedarbības dēļ dzīvnieki jānonāvē aiz humāniem apsvērumiem, izmēģinājumi jāatkārto ar nākamo zemāko devas līmeni.

Šādi var noteikt "kritisko devu" (sk. 1.2. Definīcijas), t.i., augstāko no iepriekš noteiktajiem devu līmeņiem, kuru var ievadīt, neizraisot nobeigšanos (ieskaitot nonāvēšanu humānu apsvērumu dēļ).

Dzīvniekus, kas uzrāda smagas un ilgstošas ciešanu un sāpju pazīmes, var humānu apsvērumu dēļ var būt jānonāvē. Testa vielu dozēšana nav jāizdara veidā, par ko ir zināms, ka tas izraisa izteiktas sāpes un ciešanas kodīgo un kairinošo īpašību dēļ.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

1.6.1.1. *Eksperimenta dzīvnieki*

Ja nav citu ieteikumu, vēlams izmantot žurkas.

Jāizmanto plaši pazīstamas laboratorijas dzīvnieku līnijas. Abu dzimumu grupās dzīvnieku masas atšķirības izmēģinājuma sākumā nedrīkst būt lielākas par ± 20 % no attiecīgās vidējās vērtības.

Dzīvniekus pirms izmēģinājuma vismaz piecas dienas pieradina pie izmitināšanas un barošanas apstākļiem. Pirms izmēģinājumiem jauni pieauguši veselīgi dzīvnieki pēc gadījuma izvēles principa diapazona izmēģinājumu un galvenā izmēģinājuma grupās. Praktiski galvenajam izmēģinājumam var būt vajadzīga tikai viena katra dzimuma dzīvnieku grupa.

1.6.1.2. *Devu sagatavošana un ievadīšana*

Vajadzības gadījumā pārbaudāmo vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā šķīdinātājā. Vielu ieteicams vispirms izšķīdināt ūdenī un tikai tad, ja tas neizdodas, izmanto tās šķīdumu augu eļļā vai kādā citā piemērotā šķīdinātājā, vai arī suspendē. Ja izmanto nevis ūdeni, bet citu šķīdinātāju, ir jāzina tā toksikoloģiskās īpašības vai tās jānosaka pirms izmēģinājuma vai izmēģinājuma laikā. Parasti grauzējiem ievada ne vairāk kā 10 ml šķīduma uz kg ķermeņa svara, bet ja izmanto ūdens šķīdumu, var ievadīt 20 ml/kg. Pārbaudāmā šķīduma tilpumam jābūt pēc iespējas vienādam, tā koncentrāciju pielāgo tā, lai visām devām būtu nemainīgs tilpums.

Pirms vielas ievadīšanas dzīvniekus nedrīkst barot. Žurkas nesaņem barību visu iepriekšējo nakti; ūdens netiek ierobežots. Nākamajā dienā dzīvniekus nosver un vienā paņēmienā ar mākslīgo barošanu ievada pārbaudāmo vielu. Ja nav iespējams uzreiz ievadīt visu devu, to sadala un ievada pa daļām laika posmā, kas nepārsniedz 24 stundas. Pēc vielas ievadīšanas dzīvniekus var atstāt bez barības vēl uz trīs līdz četrām stundām. Ja vielas devu ievada pa daļām kādā laika posmā, atkarībā no tā ilguma var gadīties, ka dzīvnieki ir jānodrošina ar barību un ūdeni.

1.6.2. **Procedūra**

1.6.2.1. *Devu diapazona izmēģinājums*

Uz atsevišķiem dzīvniekiem izmēģina dažādu devu iedarbību. Ja nav informācijas, ka pret iedarbību jutīgāki ir vīriešu dzimuma īpatņi, parasti izmēģinājumiem izmanto sieviešu dzimuma dzīvniekus. Ievadīšana notiek pakāpeniski, nākamajam dzīvniekam devu ievadot ne ātrāk par 24 stundām. Visiem dzīvniekiem toksiskās iedarbības pazīmes novēro vismaz septiņas dienas; ja pēc septiņām dienām saglabājas mērenas toksicitātes pazīmes, dzīvnieks papildus jānovēro vēl līdz septiņām dienām. Sākotnējie devu līmeņi ir 5, 50, 500 un 2 000 mg/kg. Ja sākotnēji izraudzītā deva neizraisa spēcīgu toksisku iedarbību un nākamajam augstākajam devas līmenim ir letāla iedarbība, var būt vajadzīgs veikt izmēģinājumus ar vienu vai vairākiem starpdevu līmeņiem. Šādi var iegūt informāciju par devu līmeņiem, kuriem ir toksiskas iedarbības pazīmes, kā arī devu līmeņiem, kuriem ir letāla iedarbība.

Jāmēģina izraudzīties sākotnējo devu, izmantojot datus par līdzīgām vielām. Ja šādas informācijas nav, pirmajā gadījumā var izmantot devu 500 mg/kg. Ja sākotnējai devai nav toksiskas iedarbības, izdara izmēģinājumus ar nākamo augstāko devas līmeni. Ja devai 2000 mg/kg nav letālas iedarbības, devu diapazona izmēģinājumu pārtrauc, un no šā devas līmeņa sāk galveno izmēģinājumu. Ja iedarbība ir tik stipra, ka tās dēļ nepieciešams izmēģinājuma dzīvnieku nonāvēt aiz humāniem apsvērumiem (piemēram, 500 mg/kg), citam dzīvniekam ievada nākamo zemāko devu (piemēram, 50 mg/kg). Ja šīs dzīvnieks izdzīvo, nākamajiem dzīvniekiem var ievadīt attiecīgus devu līmeņus, kuru lielums ir intervālā starp abiem iepriekšējiem. Parasti šim nolūkam neizmanto vairāk par pieciem dzīvniekiem.

1.6.2.2. *Galvenais izmēģinājums*

Katram devas līmenim jāizmanto vismaz 10 dzīvnieki (pieci sieviešu dzimuma un pieci vīriešu dzimuma). Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas.

Pēc fiksēto devu metodes galvenajam izmēģinājumam izmanto tikai vidēji toksiskas devas. Jāizvairās ievadīt tādas pārbaudāmās vielas devas, kurām ir letāla iedarbība.

Devas līmeni, ko izmanto kā sākuma devu, izvēlas kā vienu no četriem līmeņiem, t.i., 5, 50, 500 un 2000 mg/kg ķermeņa svara. Sākotnēji izraudzītajam devu līmenim jābūt tādam, lai tam varētu būt izteikta toksicitāte, taču tas neizraisītu ar savienojumu saistītu mirstību (arī nonāvēšanu humānu apsvērumu dēļ; neietver netīšus nobeigšanās gadījumus, taču tie ir jāuzskaita). Ja sākotnēji izraudzītajam devas līmenim ir izteikta toksicitāte, tomēr tas nerada ar savienojumu saistītu mirstību, izmēģinājumi nav jāturpina.

Ja izraudzītajam devas līmenim netiek konstatēta izteikta toksicitāte, vielu izmēģina vēlreiz, izmantojot nākamo augstāko devas līmeni. Tomēr izmēģinājuma dzīvnieku jāturpina līdz novērošanas perioda beigām. Ja spēcīgas toksiskas iedarbības dēļ dzīvnieki aiz humāniem apsvērumiem jānonāvē, vai tiek konstatēti ar savienojumu saistīti nobeigšanās gadījumi, vielas izmēģinājumi jāveic atkārtoti, izmantojot nākamo zemāko devu līmeni. Arī šajā gadījumā dzīvniekus, kurus humānu apsvērumu dēļ nav jānonāvē, novēro līdz novērošanas perioda beigām.

Pēc vielas ievadīšanas sistemātiski veic novērojumus atzīmē to rezultātus. Atsevišķi pieraksta datus par katru dzīvnieku.

Dzīvniekus novēro vismaz 14 dienas. Tomēr novērošanas ilgumu var ietekmēt dažādi apstākļi. To nosaka novērotās toksiskās reakcijas, to iestāšanās ātrums un dzīvnieku atveseļošanās laiks; tāpēc vajadzības gadījumā to var pagarināt. Svarīgi zināt brīdi, kad parādās un izzūd toksiskuma pazīmes, un brīdi, kurā iestājas nāve, jo īpaši tad, ja tā iestājas novēloti.

Rūpīga klīniska izmeklēšana jāveic divas reizes dienā, kad vielu ievada, un vismaz vienreiz dienā katru nākamo dienu. Dzīvnieki, kuri acīmredzami cieš lielas sāpes vai kuriem ir smagas ciešanas, ir jānonāvē humānu apsvērumu dēļ. Ja dzīvnieki turpina uzrādīt toksiskas iedarbības pazīmes vairākas dienas pēc vielas ievadīšanas, ir vajadzīgi papildus novērojumi. Izmēģinājumu vai izbeigt, ja kļūst acīmredzamais, ka sākotnēji izraudzītā deva ir pārlieku augsta.

Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar to ādu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas. Īpaša vērība jāpievērš trīcei, konvulsijām, salivācijai, caurejai, miegainībai, miegam un komas stāvoklim.

Katra dzīvnieka masa jānosaka neilgi pirms pārbaudāmās vielas ievadīšanas, katrā no trijām nākamajām dienām pēc tās, un pēc tam reizi nedēļā. Dzīvniekus, kas nobeidzas izmēģinājumu laikā, kā arī tos dzīvniekus, kas izdzīvo pēc izmēģinājumu pārtraukšanas nosver un uzšķērž. Reģistrē visas novērotās patoloģiskās izmaiņas. Vajadzības gadījumā ņem audu paraugus histopatoloģiskai izmeklēšanai.

Atkarībā no iepriekšējā devu līmeņa izmēģinājumu rezultātiem var būt vajadzīgi otrā, bet izņēmuma gadījumos arī trešā devu līmeņa izmēģinājumi.

Ja vielai ir letāla iedarbība pie devu līmeņa 5 mg/kg ķermeņa masas (vai ja diapazona atrašanas izmēģinājuma rezultāti liecina, ka pie attiecīgā devas līmeņa tai ir letāla iedarbība), var būt vajadzīgs sīkāk izpētīt tās akūto toksicitāti.

2. DATI

Devu diapazona izmēģinājuma un galvenā izmēģinājuma rezultātus apkopo tabulas formā, norādot dzīvnieku skaitu katra devu līmeņa izmēģinājumu sākumā; dzīvnieku skaitu, kuriem novērotas toksiskas iedarbības pazīmes; izmēģinājuma laikā nobeigušos un humāni apsvērumu dēļ nonāvēto dzīvnieku skaits; toksiskās iedarbības apraksts, un galvenajā izmēģinājumā arī tas, vai konstatēta ar savienojumu saistīta izteikta toksicitāte; dažāda veida toksiskās iedarbības ilgums; sekcijas rezultāti. Ja dzīvnieki izdzīvo ilgāk nekā vienu dienu, jāaprēķina un jāpieraksta svara izmaiņas.

Dzīvnieki, kuri humānu apsvērumu dēļ nonāvēti ar savienojumu saistītu sāpju un ciešanu dēļ, tiek uzskaitīti par mirušiem no vielas iedarbības.

3. PĀRSKATS

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, gan par devu diapazona izmēģinājumu, gan galveno izmēģinājumu attiecīgi iekļauj šādu informāciju:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas un barošanas apstākļi, barība u.tml.,

— izmēģinājuma apstākļi,

— izmantotās devas (vajadzības gadījumā arī šķīdinātāja koncentrācija, ja to izmanto),

— pilnīgi rezultāti par visiem devu līmeņiem, ar kuriem izdarīti izmēģinājumi,

— dati par toksisko atbildes reakciju pa dzimumiem un devu līmeņiem (t.i., izmantoto dzīvnieku skaits; ķermeņa masas izmaiņas; attiecīgos gadījumos izmēģinājuma laikā nobeigušos vai nonāvēto dzīvnieku skaits; dzīvnieku skaits, kuriem novērotas toksiskas iedarbības pazīmes; iedarbības raksturs, smagums un ilgums),

— toksiskās iedarbības pazīmju ilgums, un vai tās ir bijušas atgriezeniskas,

— nāves iestāšanās laiks pēc devas ievadīšanas, iemesli un kritēriji nonāvēšanai humānu apsvērumu dēļ gadījumos, kad dzīvnieki nobeigušies vai nonāvēti,

— sekcijas rezultāti,

— histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti,

— rezultātu izvērtējums,

— rezultātu interpretācija, ieskaitot izmēģinājumā noteikto devu, kurai ir izteikta toksicitāte, un kritisko devu.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

DEVA	REZULTĀTI.	INTERPRETĀCIJA
5 mg/kg ķermeņa masas	Mazāk nekā 100 % izdzīvojušo	ĻOTI TOKSISKI savienojumi
	100 % izdzīvojušo; tomēr vielai izteikta toksicitāte	TOKSISKI savienojumi.
	100 % izdzīvojušo; nav izteiktas toksicitātes	Sk. rezultātus 50 mg/kg.
50 mg/kg ķermeņa masas	Mazāk nekā 100 % izdzīvojušo	Savienojumi, kas var būt TOKSISKI vai ĻOTI TOKSISKI. Sk. rezultātus 5 mg/kg.
	100 % izdzīvojušo; tomēr vielai izteikta toksicitāte	KAITĪGI savienojumi.
	100 % izdzīvojušo; nav izteiktas toksicitātes	Sk. rezultātus 500 mg/kg.
500 mg/kg ķermeņa masas	Mazāk nekā 100 % izdzīvojušo	Savienojumi, kas var būt TOKSISKI vai KAITĪGI. Sk. rezultātus 50 mg/kg.
	100 % izdzīvojušo; tomēr vielai izteikta toksicitāte	Savienojumi, kuriem nav akūtas toksiskas iedarbības.
	100 % izdzīvojušo; nav izteiktas toksicitātes	Sk. rezultātus 2 000 mg/kg.
2 000 mg/kg ķermeņa masas	Mazāk nekā 100 % izdzīvojušo	Sk. rezultātus 500 mg/kg.
	100 % izdzīvojušo; ar izteiktu toksicitāti vai bez tās	Savienojumi, kuriem nav ievērojamas akūtas toksiskas iedarbības.

Sk. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Sk. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.2. AKŪTA TOKSICITĀTE (PĒC IEELPOŠANAS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Lietderīgi iegūt orientējošu informāciju par vielas daļiņu izmēru sadalījumu, tvaika spiedienu, kušanas temperatūru, viršanas temperatūru, uzliesmošanas temperatūru un sprādzienbīstamību (ja vajadzīgs).

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. METODES PRINCIPS

Vairākas izmēģinājumu dzīvnieku grupas noteiktu laiku pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai dažādā koncentrācijā, katrai grupai saņemot vienādu koncentrāciju. Pēc tam novēro toksisko iedarbību un reģistrē nāves gadījumus. Izmēģinājuma laikā mirušos dzīvniekus uzšķērž, beidzoties izmēģinājumam, sekciju izdara arī izdzīvojušajiem dzīvniekiem.

Dzīvniekus, kas uzrāda smagas un ilgstošas ciešanu un sāpju pazīmes, var būt jānonāvē humānu apsvērumu dēļ. Pārbaudāmo vielu dozēšana nav jāizdara veidā, par ko ir zināms, ka tas izraisa izteiktas sāpes un ciešanas kodīgo un kairinošo īpašību dēļ.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Dzīvniekus pirms izmēģinājuma vismaz piecas dienas pieradina pie izmitināšanas un barošanas apstākļiem. Veselus un jaunus dzīvniekus pēc nejaušības principa sadala izmēģinājumu grupās. Ekspozīcijas apstākļu simulāciju veic tikai tad, ja šādu nepieciešamību nosaka izmantojamās iekārtas īpatnības.

Pārbaudāmās cietvielas var būt ļoti smalki jāsasmalcina, lai iegūtu vajadzīgā izmēra daļiņas.

Vajadzības gadījumā pārbaudāmo vielu sajauc ar piemērotu nesējvielu, kas palīdz iegūt vajadzīgo vielas koncentrāciju atmosfērā, vienlaikus paredzot kontroles grupu, kuru pakļauj nesējvielas iedarbībai. Ja vieglākai dozēšanai izmanto šķīdinātāju vai citas piedevas, jāpārliecinās par to netoksiskumu. Vajadzības gadījumā var izmantot agrāk iegūtus datus.

1.6.2. **Pārbaudes apstākļi**

1.6.2.1. *Izmēģinājumu dzīvnieki*

Ja nav citu ieteikumu, vēlams izmantot žurkas. Jāizmanto plaši pazīstamas laboratorijas dzīvnieku līnijas. Abu dzimumu grupās dzīvnieku masas atšķirības izmēģinājuma sākumā nedrīkst būt lielākas par ± 20 % no attiecīgās vidējās vērtības.

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits un dzimums*

Katru koncentrāciju izmēģina vismaz uz 10 grauzējiem (piecas mātītes un pieci tēviņi). Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas.

Piezīme: Akūtās toksicitātes izmēģinājumiem izmantojot par grauzējiem augstāk attīstītus dzīvniekus, jāapsver iespējas izmantot to mazāku skaitu.

Devas jāizraugās ļoti rūpīgi, un jācenšas nepārsniegt devas, kurām ir vidēji toksiska iedarbība. Šādos izmēģinājumos izvairās ievadīt tādas pārbaudāmās vielas devas, kurām ir letāla iedarbība.

1.6.2.3. *Pārbaudāmās koncentrācijas*

Jāizvēlas vairākas devas, vismaz trīs devas pietiekami plašā diapazonā, lai izmēģinājumu grupās būtu iespējams novērot atšķirīgu toksisko iedarbību un mirstību. Jāiegūst pietiekami daudz datu, lai varētu noskaidrot mirstības atkarību no koncentrācijas un, ja iespējams, pienācīgi noteikt LD_{50}.

1.6.2.4. *Pieļaujamā daudzuma tests*

Ja iedarbojoties uz pieciem vīriešu un pieciem sieviešu dzimuma dzīvniekiem ar 5 mg/l gāzes, šķidruma vai cietvielas aerosola (vai gadījumos, kad šī 2s nav iespējama fizikālo, ķīmisko, tostarp arī sprādzienbīstamības īpašību dēļ sasniegt nav iespējams, ar maksimāli sasniedzamo koncentrāciju) pēc četru stundu ekspozīcijas neizraisa ar savienojumu saistītu mirstību 14 dienu laikā, izmēģinājumus turpināt var nebūt nepieciešams.

1.6.2.5. *Ekspozīcijas ilgums*

Minimālais ekspozīcijas ilgums ir četras stundas.

1.6.2.6. *Iekārta*

Izmēģinājumos ar dzīvniekiem izmanto inhalācijas iekārtu, kas nodrošina dinamisku gaisa plūsmu un stundas laikā vismaz 12 reizes apmaina gaisu, lai būtu pietiekams skābekļa saturs un vienmērīga atmosfēra ekspozīcijas laikā. Ja izmanto inhalācijas kameru, tās konstrukcijai jābūt tādai, kas neļauj dzīvniekiem drūzmēties un maksimāli nodrošina pārbaudāmās vielas iedarbību ekspozīcijas laikā. Lai kamerā būtu noturīga atmosfēra, izmēģinājumu dzīvnieku kopējais "tilpums" parasti nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma. Var izmantot kameras, kas ļauj vielai iedarboties tikai uz mutes un deguna dobumu, galvu vai visu ķermeni; pirmos divos gadījumos līdz minimumam samazināta pārbaudāmās vielas uzņemšana citādā veidā.

1.6.2.7. *Novērošanas periods*

Dzīvniekus novēro vismaz 14 dienas. Tomēr novērošanas ilgumu var ietekmēt dažādi apstākļi. To nosaka novērotās toksiskās reakcijas, to iestāšanās ātrums un dzīvnieku atveseļošanās ilgums; tāpēc vajadzības gadījumā to var pagarināt. Svarīgi zināt brīdi, kad parādās un izzūd toksiskuma pazīmes, un brīdi, kurā iestājas nāve, jo īpaši tad, ja tā iestājas novēloti.

1.6.3. **Procedūra**

Dzīvniekus nosver tieši pirms izmēģinājuma un, kad pārbaudāmās vielas koncentrācija izvēlētajā iekārtā sasniedz līdzsvaru, tos vismaz četras stundas pakļauj vajadzīgās koncentrācijas iedarbībai. Koncentrācijas līdzsvaram jāiestājas īsā laikā. Izmēģinājuma laikā jāuztur 22 ± 3 °C temperatūra. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt robežās no 30 % līdz 70 %, tomēr dažkārt (piemēram, veicot izmēģinājumus ar daļu aerosolu) tas var nebūt iespējams. Kamerā uzturot nedaudz pazemināto spiedienu (būris, 5 mm ūdens staba) novērš iespējas vielai izplūst apkārtējā vidē. Ekspozīcijas laikā dzīvniekus nebaro un nedzirda. Izmēģinājumu laikā jāizmanto piemērotas atmosfēras temperatūras uzturēšanas un kontroles sistēmas. Sistēmai pēc iespējas ātrāk jānodrošina nemainīgi ekspozīcijas apstākļi. Kameras konstrukcijai un ekspluatācijai jābūt tādiem, lai tajā tiktu uzturēta viendabīga testējamā atmosfēra.

Jāmēra un jāuzrauga:

— gaisa plūsmas ātrums (nepārtraukti)

— testa vielas faktiskā koncentrācija, kas mērīta elpošanas zonā vismaz trīs reizes iedarbības laikā (dažām atmosfērām, piem., aerosoliem lielās koncentrācijās, var būt vajadzīga biežāka uzraudzība). Vielas koncentrācijas svārstības iedarbības laikā nedrīkst pārsniegt ± 15 % no vidējās vērtības. Tomēr, ja izmanto dažus aerosolus, to nevar panākt, un tad ir pieļaujams plašāks svārstību diapazons. Aerosolu daļiņu lieluma analīze jāveic tik bieži, cik nepieciešams (vismaz vienreiz uz testa grupu).

— temperatūra un mitrums, ja iespējams, nepārtraukti.

Iedarbības laikā novērojumus veic un reģistrē sistemātiski; atsevišķi pieraksta datus par katru dzīvnieku. Pirmajā dienā novērošanu veic biežāk. Katru darbdienu vismaz vienreiz veic rūpīgu klīnisko izmeklēšanu, pārējos novērojumus veic ik dienas, pienācīgi gādājot par to, lai samazinātu izmēģinājumu dzīvnieku zudumus, piemēram, mirušos dzīvniekus secē vai ievieto ledusskapī, bet vārgus un mirstošus īpatņus nošķir vai nogalina.

Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar to ādu un apmatojumu, acis, gļotādas, elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas. Īpaša vērība jāpievērš elpošanas orgānu darbībai, trīcei, konvulsijām, salivācijai, caurejai, letarģijai, miegam un komas stāvoklim. Nāves iestāšanās brīdi reģistrē cik vien precīzi iespējams. Beidzoties iedarbības laikam, katru dzīvnieku nosver vienreiz nedēļā un pēc nāves iestāšanās.

Dzīvniekus, kas miruši testa laikā, un izdzīvojušos dzīvniekus testa beigās secē, īpašu uzmanību pievēršot izmaiņām augšējos un apakšējos elpošanas ceļos. Reģistrē visas novērotās patoloģiskās izmaiņas. Vajadzības gadījumā ņem audu paraugus histopatoloģiskai izmeklēšanai.

2. IEGŪTIE DATI

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā grupā pirms testa, nāves iestāšanās brīdi katram dzīvniekam, to dzīvnieku skaitu, kuriem novērotas citas toksiskuma pazīmes, toksiskās ietekmes izpausmes un autopsijas rezultātus. Ja dzīvnieki izdzīvo ilgāk nekā vienu dienu, jāaprēķina un jāpieraksta svara izmaiņas. Dzīvniekus, kas ir humāni nogalināti ar savienojumu saistīto briesmu sajūtu un sāpju dēļ, reģistrē kā mirušus saistībā ar savienojumu. LD_{50} aprēķina pēc atzītas metodes. Izvērtējot datus, jānoskaidro, vai pastāv korelācija starp testa vielas iedarbību un novēroto anomāliju biežumu un smagumu, ieskaitot uzvedības izmaiņas, klīniskās novirzes, makropatoloģiskās izmaiņas, ķermeņa svara izmaiņas, mirstību un pārējos toksikoloģiskos rādītājus.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, vides apstākļi, barība u.tml.,

— testa apstākļi: inhalācijas iekārtas apraksts,

iekļaujot konstrukciju, tipu, izmērus, gaisa avotu, aerosolu ģenerēšanas sistēmu, gaisa kondicionēšanas metodi un dzīvnieku ievietošanas metodi testa kamerā, ja to izmanto. Jāapraksta temperatūras, mitruma, aerosola koncentrāciju un daļiņu lieluma mērīšanas aprīkojums.

Iedarbības režīms

Šie dati jāapkopo tabulā, norādot vidējās vērtības, kā arī svārstību diapazonu (piemēram, standartnovirzi) un, ja iespējams, jāiekļauj

a) gaisa plūsmas ātrums caur inhalācijas aprīkojumu;

b) gaisa temperatūra un mitrums;

c) nominālās koncentrācijas (inhalācijas iekārtā ievadītais testa vielas kopējais daudzums, kas izdalīts ar gaisa daudzumu);

d) nesēja veids, ja to izmanto;

e) faktiskās koncentrācijas testa elpošanas zonā;

f) masas vidējais aerodinamiskais diametrs (MVAD) un ģeometriskā standartnovirze (ĢSN);

g) līdzsvara iestāšanās ilgums;

h) iedarbības ilgums;

— atbildes reakcijas datu tabula pēc dzimuma un iedarbības līmeņa (t.i., testa laikā mirušo vai nogalināto dzīvnieku skaits); dzīvnieku skaits, kam parādās toksiskuma pazīmes; iedarbībai pakļauto dzīvnieku skaits,

— nāves brīdis iedarbības laikā vai pēc tās, dzīvnieku humānās nogalināšanas iemesli un kritēriji,

— visi novērojumi,

— LC_{50} katra dzimuma dzīvniekiem, beidzoties novērošanas laikam (norādot aprēķina metodi),

— LD_{50} 95 % ticamības intervāls (ja var aprēķināt),

— devas/mirstības līkne un slīpuma koeficients (ja to ļauj noteikšanas metode),

— autopsijas konstatācijas,

— histopatoloģiskas konstatācijas,

— rezultātu apspriešana (īpaša uzmanība jāpievērš, kāda ietekme dzīvnieku humānai nogalināšanai testa laikā varētu būt uz aprēķināto LC_{50} lielumu),

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.3. AKŪTĀ TOKSICITĀTE (ĀDAS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Ar testa vielu pakāpeniskās devās apstrādā ādu vairāku izmēģinājumu grupu dzīvniekiem, katrai grupai saņemot vienādu devu. Pēc tam novēro toksisko iedarbību un reģistrē nāves gadījumus. Testa laikā mirušos dzīvniekus secē, beidzoties testam, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus.

Dzīvniekus, kas uzrāda smagas un ilgstošas briesmu sajūtu un sāpju pazīmes, var būt humāni jānogalina. Tāda testa devu došana, par ko ir zināms, ka tā izraisa izteiktas sāpes un briesmu sajūtas kodīgo vai kairinošo īpašību dēļ, nav jāveic.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Dzīvniekus eksperimenta būros pirms testa vismaz piecas dienas pieradina pie izmitināšanas un barošanas apstākļiem. Pirms testa veselus un jaunus pieaugušus dzīvniekus pēc nejaušības principa sadala izmēģinājumu grupās. Apmēram 24 stundas pirms testa dzīvniekiem nocērp vai noskuj apmatojumu uz muguras. Cērpot vai skujot apmatojumu, nedrīkst nobrāzt ādu, jo tas var izmainīt ādas caurlaidību. Testa vielas uzlikšanai jāsagatavo vismaz 10 % ķermeņa virsmas. Pārbaudot cietas vielas, kuras vajadzības gadījumā var saberzt pulverī, testa viela jāsamitrina ar pietiekamu daudzumu ūdens vai, ja nepieciešams, ar piemērotu nesēju, lai tai būtu laba saskare ar ādu. Ja izmanto nesēju, ir jāņem vērā, ka tas var izmainīt ādas caurlaidību attiecībā pret testa vielu. Analizējamos šķidrumus parasti neatšķaida.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Izmēģinājuma dzīvnieki*

Var izmantot pieaugušas žurkas vai trušus. Var izmantot arī citas sugas dzīvniekus, bet tad šī izvēle jāpamato. Jāizmanto parasti lietojamās laboratorijas dzīvnieku līnijas. Katra dzimuma dzīvnieku svara atšķirības testa sākumā nedrīkst pārsniegt ± 20 % no attiecīgā vidējā lieluma.

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits un dzimums*

Katrā devas līmenī izmanto vismaz 5 dzīvniekus. Visiem jābūt viena dzimuma. Ja izmanto mātītes, tās nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja ir pieejama informācija, kas rāda, ka viens dzimums ir izteikti jutīgāks, devas ir jādod šā dzimuma dzīvniekiem.

Piezīme: Akūtās toksicitātes testā ar dzīvniekiem, kas ir augstāki par grauzējiem, ir jāapsver mazāka skaita izmantošana. Devas ir rūpīgi jāizvēlas un jāpieliek visas pūles, lai nepārsniegtu vidēji toksiskas devas. Tādos testos ir jāizvairās dot testa vielu letālās devās.

1.6.2.3. *Devu līmeņi*

Jāizvēlas vairākas devas, vismaz trīs devas pietiekami plašā diapazonā, lai testa grupās būtu iespējams novērot atšķirīgu toksisko iedarbību un mirstību. Izvēloties devu līmeņus, jāņem vērā tas, ka vielas var būt kairinošas vai kodīgas. Jāiegūst pietiekami daudz datu, lai varētu noskaidrot iedarbības atkarību no devas un, ja iespējams, pienācīgi noteikt LD_{50}.

1.6.2.4. *Pieļaujamības tests*

Pieļaujamības testu pie viena devas līmeņa, kas ir vismaz 2000 mg/kg ķermeņa svara, var izdarīt 5 vīriešu dzimuma un 5 sieviešu dzimuma dzīvnieku grupai, izmantojot turpmāk aprakstīto procedūru. Ja rodas ar savienojumu saistīta mirstība, var būt jāapsver pilns pētījums.

1.6.2.5. *Novērošanas laika posms*

Dzīvniekus novēro vismaz 14 dienas. Tomēr novērošanas ilgumu var ietekmēt dažādi apstākļi. To nosaka novērotās toksiskās reakcijas, to iestāšanās ātrums un dzīvnieku atveseļošanās ilgums; tāpēc vajadzības gadījumā to var pagarināt. Svarīgi zināt brīdi, kad parādās un izzūd toksiskuma pazīmes, to ilgumu un brīdi, kurā iestājas nāve, jo īpaši tad, ja tā iestājas novēloti.

1.6.3. **Procedūra**

Katru dzīvnieku tur atsevišķā būrī. Testa vielu vienmērīgi uztriepj uz ādas, kuras platība veido apmēram 10 % no kopējās ķermeņa virsmas. Ja vielas ir ļoti toksiskas, apstrādājamo ādas platību var samazināt, bet tai jābūt pēc iespējas lielākai, un viela jāuztriepj cik vien var plāni un vienmērīgi.

Testa vielas saskari ar ādu visā 24 stundu garajā iedarbības laikā nodrošina ar porainas marles pārsēju un nekairinošu plāksteri. Apstrādātā vieta pēc tam vēl jāpārklāj tā, lai nostiprinātu marles pārsēju ar testa vielu un lai dzīvnieki nevarētu to norīt. Lai testa viela nenonāktu barības vadā, var daļēji ierobežot dzīvnieku kustību, taču pilnīga imobilizācija nebūtu vēlama.

Beidzoties iedarbības laikam, testa vielas atlikumu, ja praktiski iespējams, noņem ar ūdeni vai kādu citu piemērotu ādas mazgāšanas līdzekli.

Jāveic regulāri novērojumi un tie uzreiz jāprotokolē. Atsevišķi pieraksta datus par katru dzīvnieku. Pirmajā dienā novērošanu veic biežāk. Katru darbdienu vismaz vienreiz veic rūpīgu klīnisko izmeklēšanu, pārējos novērojumus veic ik dienas, pienācīgi gādājot par to, lai samazinātu izmēģinājumu dzīvnieku zudumus, piemēram, mirušos dzīvniekus secē vai ievieto ledusskapī, bet vārgus un mirstošus dzīvniekus nošķir vai nogalina.

Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar apmatojumu, apstrādāto ādu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas. Īpaša vērība jāpievērš trīcei, konvulsijām, salivācijai, caurejai, letarģijai, miegam un komas stāvoklim. Nāves iestāšanās brīdi reģistrē cik vien precīzi iespējams. Dzīvniekus, kas miruši testa laikā, secē; beidzoties testam, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus. Reģistrē visas novērotās patoloģiskās izmaiņas. Vajadzības gadījumā ņem audu paraugus histopatoloģiskai izmeklēšanai.

Toksicitātes novērtēšana otram dzimumam

Pēc pētījuma pabeigšanas ar vienu dzimumu vismaz vienai otra dzimuma 5 dzīvnieku grupai dod devu, lai noskaidrotu, vai šā dzimuma dzīvnieki nav izteikti jutīgāki pret testa vielu. Mazāka dzīvnieku skaita izmantošana var būt pamatota konkrētos apstākļos. Ja ir pieejama pietiekama informācija, lai parādītu, ka testētā dzimuma dzīvnieki ir izteikti jutīgāki, var iztikt bez otra dzimuma dzīvnieku testēšanas.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā grupā pirms testa, nāves iestāšanās brīdi katram dzīvniekam, to dzīvnieku skaitu, kuriem novērotas citas toksiskuma pazīmes, toksiskās iedarbības izpausmes un autopsijas rezultātus. Katra dzīvnieka svaru reģistrē īsi pirms testa vielas pielietošanas, pēc nedēļas un nāves iestāšanās brīdī; ja dzīvnieki izdzīvo ilgāk nekā vienu dienu, jāaprēķina un jāpieraksta svara izmaiņas. Dzīvniekus, kas ir humāni nogalināti ar savienojumu saistīto briesmu sajūtu un sāpju dēļ, reģistrē kā mirušus saistībā ar savienojumu. LC_{50} aprēķina pēc atzītas metodes.

Izvērtējot datus, jānoskaidro, vai pastāv korelācija starp testa vielas iedarbību un novēroto anomāliju biežumu un smagumu, ieskaitot uzvedības izmaiņas, klīniskās novirzes, makropatoloģiskās izmaiņas, ķermeņa svara svārstības, mirstību un pārējos toksikoloģiskos rādītājus.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas un barošanas apstākļi, barība u.tml.,

— testa apstākļi (iekļaujot ādas notīrīšanas metodi un pārsējuma veidu okluzīvs vai neokluzīvs),

— izmantotās devas (vajadzības gadījumā arī nesējs un koncentrācija),

— devu saņēmušo dzīvnieku dzimums,

— atbildes reakcijas datu tabula pēc dzimuma un devu līmeņa (t.i., testa laikā nobeigušos vai nogalināto dzīvnieku skaits; dzīvnieku skaits, kam parādās toksiskuma pazīmes; iedarbībai pakļauto dzīvnieku skaits),

— nāves brīdis pēc devas saņemšanas, dzīvnieku humānās nogalināšanas iemesli un kritēriji,

— visi novērojumi,

— LD_{50} lielums, kas noteikts pēc 14 dienām dzimumam, kam izdarīts pilns pētījums, un noteikšanas metode,

— LD_{50} 95 % ticamības intervāls (ja var aprēķināt),;

— devas/mirstības līkne un slīpuma koeficients (ja to ļauj noteikšanas metode),

— autopsijas konstatācijas,

— histopatoloģiskas konstatācijas,

— testa rezultāti ar otru dzimumu,

— rezultātu apspriešana (īpaša uzmanība jāpievērš tam, kāda ietekme dzīvnieku humānai nogalināšanai testa laikā varētu būt uz aprēķināto LD_{50} lielumu),

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.4. AKŪTĀ TOKSICITĀTE (ĀDAS KAIRINĀJUMS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Sākotnēji apsvērumi

Lai iespējami samazinātu vielu testēšanu apstākļos, kas, sagaidāms, varētu izraisīt smagu iedarbību, ir rūpīgi jāapsver visa pieejamā informācija par vielu. Turpmāk norādītā informācija var būt noderīga, apsverot, vai lietderīgs ir pilns tests, viena dzīvnieka pētījums vai turpmāka testēšana nav vajadzīga.

i) Fizikāli ķīmiskās īpašības un reaģētspēja. Stipri skābām vai sārmainām vielām (piemēram, ja pH ir 2 vai mazāks, vai 11,5 vai lielāks) var nebūt vajadzīgs primārā ādas kairinājuma tests, ja kodīgās īpašības ir sagaidāmas. Ir jāņem vērā arī sārmainības vai skābuma rezerve.

ii) Ja ir pieejami pārliecinoši nopietnu bojājumu pierādījumi labi apstiprinātos *in vitro* testos, pilns tests var būt nevajadzīgs.

iii) Akūtā toksiskuma pētījumu rezultāti. Ja ar vielu ir veikts akūtā toksiskuma tests caur ādu ar pieļaujamības testa devas līmeni (2 000 mg/kg ķermeņa svara) un ādas kairinājums nav novērots, turpmāki ādas kairinājuma testi var nebūt vajadzīgi. Turklāt nav jātestē materiāli, kuru augstais toksiskums caur ādu ir jau zināms.

Testējamās vielas devu vienreiz uztriepj uz ādas vairākiem izmēģinājumu dzīvniekiem, turklāt katrs dzīvnieks kalpo sev kā kontrole. Pēc noteikta laika nosaka un novērtē kairinājuma pakāpi un turpmāk apraksta, lai veiktu vispusīgu ietekmes novērtējumu. Novērošana jāveic pietiekami ilgi, lai varētu droši spriest par novēroto ietekmju atgriezeniskumu.

Dzīvniekus, kas uzrāda smagas un ilgstošas briesmu sajūtu un sāpju pazīmes, var būt humāni jānogalina.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Apmēram 24 stundas pirms testa dzīvniekiem nocērp vai noskuj apmatojumu uz muguras.

Cērpot vai skujot apmatojumu, jāuzmanās, lai nenobrāztu ādu. Izmanto tikai dzīvniekus ar veselu un neskartu ādu.

Dažām trušu līnijām ir blīva apmatojuma vietas, kas dažos gadalaikos ir izteiktākas. Minētajās blīva apmatojuma augšanas vietās testa vielas nav jāuzklāj.

Pārbaudot cietas vielas (kuras vajadzības gadījumā var saberzt pulverī), testa viela jāsamitrina ar pietiekamu daudzumu ūdens vai, ja nepieciešams, ar piemērotu nesēju, lai tai būtu laba saskare ar ādu. Ja izmanto nesēju, ir jāņem vērā, ka tas var ietekmēt testa vielas spēju izraisīt ādas kairinājumu. Analizējamos šķidrumus parasti neatšķaida.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Izmēģinājumu dzīvnieki*

Var izmantot dažādas zīdītāju sugas, tomēr vispiemērotākā suga ir albīnie truši.

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits*

Ja *in vitro* skrīninga rezultāti vai citi apsvērumi liek domāt, ka viela varētu izraisīt nekrozi (t.i., būt kodīga), ir jāapsver viena dzīvnieka tests. Ja šā testa rezultāti nenorāda uz kodīgumu, tests ir jāpabeidz, izmantojot vismaz divus papildu dzīvniekus.

Pilnam testam izmanto vismaz trīs veselus pieaugušus dzīvniekus. Neapstrādātu kontroles dzīvnieku grupa nav vajadzīga. Var gadīties, ka jāizmanto papildu dzīvnieki, lai ieviestu skaidrību rezultātos.

1.6.2.3. *Devu līmeņi*

Ja nav kontrindikāciju, sagatavoto vietu apstrādā ar 0,5 ml šķidruma vai 0,5 g cietas vai pussķidras vielas. Ādas virsma ap apstrādāto vietu kalpo šajā testā kā kontrole.

1.6.2.4. *Novērošanas laika posms*

Novērošanas ilgumu var ietekmēt dažādi apstākļi. Tam jābūt pietiekami garam, lai varētu droši noteikt, ka novērotais kairinājums ir atgriezenisks vai neatgriezenisks, bet parasti tas nepārsniedz 14 dienas pēc pielietošanas.

1.6.3. **Procedūra**

Katru dzīvnieku tur atsevišķā būrī. Testa vielu uztriepj uz nelielas ādas virsmas platības (apmēram 6 cm^2) un šo vietu pārklāj ar marles gabaliņu, ko piestiprina ar nekairinošu plāksteri. Ja izmanto šķidrumus vai pastas, marles gabaliņu var piesūcināt ar testa vielu un tad uzlikt uz ādas. Marlei jābūt ne pārāk ciešā saskarē ar ādu, ko panāk, iedarbības laikā izmantojot piemērotu okluzīvu vai pusokluzīvu pārsēju. Jāpanāk, lai dzīvnieki nevarētu aiztikt marli, tādējādi izslēdzot iespēju, ka testa viela nonāk barības vadā vai elpošanas ceļos.

Beidzoties iedarbības laikam, testa vielas atlikums, ja praktiski iespējams, jānoņem ar ūdeni vai citu piemērotu šķīdinātāju, kas neietekmē izraisīto reakciju un nebojā virsādas slāni.

Iedarbības ilgums parasti ir četras stundas.

Ja pastāv bažas, ka viela var izraisīt nekrozi (proti, tā ir kodīga), iedarbības ilgums ir jāsamazina (piemēram, līdz vienai stundai vai līdz trim minūtēm). Tādu testēšanu pirmajā posmā var izmantot arī vienam dzīvniekam un, ja nekavē testa vielas akūtā ādas toksicitāte, attiecīgajam dzīvniekam var vienlaicīgi uzklāt trīs marles gabaliņus. Pirmo marles gabaliņu noņem pēc trim minūtēm. Ja ievērojama ādas reakcija nav novērojama, otro gabaliņu noņem pēc vienas stundas. Ja novērojumi šajā posmā norāda, ka ir vajadzīga četru stundu iedarbība un ka to var humāni izdarīt, trešo gabaliņu noņem pēc četrām stundām un atbildes reakcijas sakārto pēc pakāpēm.

Tādā gadījumā (t.i., ja ir iespējama četru stundu iedarbība) tests ir jāpabeidz, izmantojot vismaz divus papildu dzīvniekus, ja vien uzskata, ka tas ir humāni (piem., ja pēc četru stundu iedarbības nav novērojama nekroze).

Ja ievērojama ādas reakcija (piem., nekroze) ir novērota pēc trim minūtēm vai pēc vienas stundas, testu nekavējoties izbeidz.

Ilgāka iedarbība ir ieteicama atsevišķos gadījumos, piemēram, zinot, kādos apstākļos cilvēki nonāk saskarē ar testa vielu.

1.6.3.1. *Novērošana un izvērtēšana*

Dzīvnieki jānovēro un jāizvērtē tiem eritēmas un tūskas pazīmes dažādos termiņos pēc pārsēja noņemšanas – pēc 60 minūtēm un tad pēc 24, 48 un 72 stundām. Ādas kairinājumu izvērtē un reģistrē saskaņā ar 1. tabulā norādīto sistēmu. Ja atgriezenība nav pilnīgi izveidojusies 72 stundu laikā, var būt vajadzīgi turpmāki novērojumi. Bez ādas kairinājuma novērošanas sīki jāapraksta jebkuri nopietni bojājumi, piemēram, ādas korozija (neatgriezeniska ādas audu bojāeja) un citas toksiskas reakcijas.

Lai noskaidrotu apšaubāmas reakcijas, ko maskē ādas nokrāsošana ar testa vielu, var izmantot tādas metodes kā histopatoloģiskie izmeklējumi vai ādas krokas biezuma mērījumi.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot katram dzīvniekam kairinājuma smagumu pēc eritēmas un tūskas pakāpes novērošanas laikā. Jāreģistrē visi nopietni bojājumi, kairinājuma pakāpe un raksturojums, ādas korozija un citas toksiskas ietekmes, kā arī to atgriezeniskums.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jāiekļauj šāda informācija:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas un barošanas apstākļi, barība u.tml.,

— testa apstākļi (iekļaujot vielas attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības, ādas sagatavošanas un notīrīšanas metodi un pārsēja veidu okluzīvs vai pusokluzīvs),

— tabulā apkopoti dati par katra dzīvnieka atbildes reakciju uz kairinājumu katrā novērošanas laika posmā pēc pārsēja noņemšanas (piemēram, pēc 1, 24, 48 un 72 stundām utt.),

— visu novēroto nopietno bojājumu apraksts, ieskaitot ādas koroziju,

— novērotās kairinājuma pakāpes un veida apraksts, kā arī histopatoloģiskās konstatācijas,

— jebkuras toksiskas ietekmes, kas nav ādas kairinājums, apraksts,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

Papildinājums

TABULA: ĀDAS REAKCIJAS IZVĒRTĒŠANA

Eritēmas un kreveļu veidošanās

	Punkti
Eritēmas nav	0
Ļoti viegla eritēma (tikko pamanāma)	1
Izteikta eritēma	2
Mērena līdz smaga eritēma	3
Smaga eritēma (biešu sarkana) vai kreveļu veidošanās (dziļi bojājumi), kas kavē novērtēt eritēmu	4

Tūskas veidošanās

Tūskas nav	0
Ļoti viegla tūska (tikko pamanāma)	1
Viegla tūska (skarto vietu var viegli noteikt pēc izteikta pietūkuma)	2
Mērena tūska (pietūkums apmēram 1 mm augstumā)	3
Smaga tūska (pietūkums ir augstāks par 1 mm un skar arī apkārtējo ādu)	4

B.5. AKŪTĀ TOKSICITĀTE (ACU KAIRINĀJUMS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Sākotnēji apsvērumi

Lai iespējami samazinātu vielu testēšanu apstākļos, kas, sagaidāms, varētu izraisīt smagu iedarbību, ir rūpīgi jāapsver visa pieejamā informācija par vielu. Šajā ziņā var būt noderīga šāda informācija.

i) Fizikāli ķīmiskās īpašības un reaģētspēja. Stipri skābām vai sārmainām vielām, piemēram, ja sagaidāmais pH acī ir 2 vai mazāks, vai 11,5 vai lielāks var nebūt vajadzīgs tests, ja ir sagaidāmi smagi bojājumi. Ir jāņem vērā arī sārmainības vai skābuma rezerve.

ii) Labi apstiprinātu alternatīvu pētījumu rezultāti; materiāli, kuru iespējamās kodīgās vai stipri kairinošās īpašības ir parādītas, nav turpmāk jātestē attiecībā uz acu kairinājumu, pieņemot, ka tādas vielas izraisīs stipru ietekmi uz acīm testā, kurā izmanto šo metodi.

iii) Akūtā toksiskuma pētījumu rezultāti. Materiāli, kuru kodīgās vai stipri ādu kairinošās īpašības ir parādītas ādas kairinājuma pētījumā, nav turpmāk jātestē attiecībā uz acu kairinājumu, pieņemot, ka tādas vielas var izraisīt stipru ietekmi uz acīm.

Testa vielas devu iepilina katram izmēģinājumu dzīvniekam vienā acī; neapstrādātā acs sniedz kontroles informāciju. Pēc noteikta laika nosaka un novērtē kairinājuma pakāpi un pēc tam apraksta, lai veiktu vispusīgu ietekmes novērtējumu. Novērošanu veic pietiekami ilgi, lai varētu droši spriest par to, vai novērotais kairinājums ir pilnīgi atgriezenisks vai ne.

Dzīvniekus, kas uzrāda smagas un ilgstošas briesmu sajūtu un sāpju pazīmes, var būt humāni jānogalina.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Katram iepriekš izraudzītam izmēģinājumu dzīvniekam 24 stundas pirms testa pārbauda abas acis. Nedrīkst izmantot dzīvniekus, kam jau iepriekš konstatēts acu iekaisums, citi defekti vai radzenes bojājumi.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Izmēģinājumu dzīvnieki*

Kaut arī izmanto dažādus izmēģinājuma dzīvniekus, ieteicams veikt pārbaudi ar veseliem un pieaugušiem albīnajiem trušiem.

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits*

Ja ir sagaidāma ievērojama ietekme, ir jāapsver viena dzīvnieka tests. Ja testa ar vienu trusi rezultāti liek domāt, ka viela ir stipri kairinoša (atgriezeniska ietekme) vai kodīga (neatgriezeniska ietekme) acīm, izmantojot aprakstīto procedūru, turpmāka acu kairināmības testēšana ar citiem dzīvniekiem var būt nevajadzīga. Dažkārt turpmāka testēšana ar papildu dzīvniekiem var būt lietderīga, lai izpētītu konkrētus aspektus.

Testos, kas nav viena dzīvnieka testi, ir jāizmanto vismaz 3 dzīvnieki. Var gadīties, ka jāizmanto papildu dzīvnieki, lai ieviestu skaidrību rezultātos.

1.6.2.3. *Devu līmeņi*

Šķidrumu pārbaudei izmanto 0,1 ml devu. Pārbaudot cietas vielas, pastas un vielu daļiņas, izmanto daudzumu, kas aizņem 0,1 ml tilpumu vai sver aptuveni 0,1 g (svars vienmēr jāreģistrē). Ja pārbauda cietas vai granulētas vielas, tās jāsamaļ smalkos putekļos. Pirms noteikt daļiņu tilpumu, tās viegli jāsapresē, piemēram, piesitot pie mērtrauka.

Vielām, ko izsmidzina ar sūkņiem vai no aerosolu baloniem zem spiediena, šķidrums ir jāizspiež, jāsavāc 0,1 ml un jāiepilina acī, kā ir aprakstīts attiecībā uz šķidrumiem.

1.6.2.4. *Novērošanas laika posms*

Novērošanas ilgumu var ietekmēt dažādi apstākļi. Tam jābūt pietiekami ilgam, lai varētu noteikt, ka novērotais kairinājums ir atgriezenisks vai neatgriezenisks, bet parasti tas nepārsniedz 21 dienas pēc iepilināšanas.

1.6.3. **Procedūra**

Katru dzīvnieku tur atsevišķā būrī. Testa vielu katram dzīvniekam ievada acs konjunktīvas maisiņā, pirms tam viegli pavelkot apakšējo plakstiņu nost no acs ābola. Pēc tam plakstiņus apmēram vienu sekundi viegli tur kopā, lai viela neizplūstu. Otrā acs paliek neapstrādāta un kalpo kā kontrole.

Ja domā, ka viela var izraisīt nevajadzīgas sāpes, pirms testa vielas iepilināšanas var lietot vietējo anestēziju. Vietējās anestēzijas veids, koncentrācija un pielietošanas laiks ir rūpīgi jāizvēlas, lai nodrošinātu, ka tās lietošana neizraisa nozīmīgas atšķirības reakcijā uz testa vielu. Kontroles acs ir jāanestezē tāpat.

Izmēģinājumu dzīvniekiem acis nedrīkst skalot 24 stundas pēc testa vielas ievadīšanas. Vajadzības gadījumā pēc 24 stundām acis var izskalot.

Dažām vielām, kas minētajā testā ir izrādījušās kairinošas, var indicēt papildu testus, kuros izmanto trušus, kuriem drīz pēc vielas iepilināšanas acis izskalo. Tādā nolūkā iesaka izmantot trīs trušus. Pusminūti pēc iepilināšanas trušu acis pusminūti skalo, izmantojot tilpumu un plūsmas ātrumu, kas nerada bojājumu.

1.6.3.1. *Novērošana un izvērtēšana*

Acis apskata pēc 1, 24, 48 un 72 stundām. Ja pēc 72 stundām nekas neliecina par acu bojājumu, pārbaudi var izbeigt.

Ja nepārejoši skarta radzene vai ir cits nepārejošs acs kairinājums, lai noskaidrotu, kā tālāk norisinās šis process un vai tas ir atgriezenisks, var būt nepieciešama ilgāka novērošana. Bez izmaiņām, kas skar radzeni, varavīksneni un konjunktīvu, jāreģistrē un jāprotokolē arī visi citi novērotie bojājumi. Pēc katras apskates jāreģistrē acs reakcijas pakāpe pēc tabulā norādītās skalas. (Acs reakcijas novērtēšana pieļauj dažādas interpretācijas. Pārbaudes laboratorijas un citas iestādes, kas veic novērojumus un izvērtē tos, var izmantot ilustrētu metodisko līdzekli acs kairinājuma noteikšanai.)

Novēroto reakciju izvērtēšanu var atvieglot binokulārā lupa, pārnēsājamā spraugas lampa, biomikroskops vai cita piemērota ierīce. Novērojumiem, kas reģistrēti pēc 24 stundām, var sekot acu izmeklēšana ar fluoresceīnu dažiem vai visiem trušiem.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā, atsevišķi katram dzīvniekam norādot kairinājuma smaguma pakāpi noteiktā novērošanas brīdī. Reģistrē kairinājuma smaguma pakāpi un veidu, smagus bojājumus un jebkuras novērotas izmaiņas, arī tādas, kas neskar acis.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— dati par dzīvniekiem (suga, līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs u.tml.),

— testa apstākļi (tostarp testa vielas būtiskās fizikāli ķīmiskās īpašības),

— tabulā apkopoti dati par vielas kairinošo/kodīgo iedarbību uz katru dzīvnieku katrā novērošanas brīdī (piemēram, pēc 1, 24, 48 un 72 stundām),

— jebkura novērota nopietna bojājuma apraksts,

— novērotā kairinājuma vai bojājuma pakāpes un veida aprakstošs izklāsts, iekļaujot skarto radzenes laukumu un procesa atgriezenību,

— tās metodes apraksts, kas izmantota kairinājuma pakāpes novērtēšanai pēc 1, 24, 48 un 72 stundām (piemēram, pārnēsājamā spraugas lampa, biomikroskops, fluoresceīns),

— jebkuras novērotas vietējas izmaiņas, kas tieši neskar acis,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

Papildinājums

ACS BOJĀJUMU IZVĒRTĒŠANA

Radzene

Apduļķojums: blīvuma pakāpe (vērtēšanai izvēlas visblīvāko laukumu)

Nav novērota čūlu veidošanās vai apduļķojums 0

Izkaisīts vai difūzs apduļķojums (nejaukt ar nelielu spīduma pavājināšanos), varavīksnenes struktūra ir skaidri saredzama 1

Viegli saskatāms caurspīdīgs laukums, varavīksnenes struktūra nedaudz aizēnota 2

Perlamutrveidīgs laukums, varavīksnenes struktūra nav saredzama, zīlītes lielums gandrīz nenosakāms 3

Necaurspīdīga radzene, varavīksneni nevar atšķirt necaurspīdīguma dēļ 4

Varavīksnene

Norma 0

Izteikti padziļinātas rievas, sastrēgums, pietūkums, mērena perikorneālā hiperēmija jeb piepildījums, viens no šiem simptomiem vai simptomu kopums; varavīksnene joprojām reaģē uz gaismu (gausa reakcija ir pozitīva) 1

Nav reakcijas uz gaismu, hemorāģija, nopietni bojājumi (visi vai viens no simptomiem) 2

Konjunktīva

Sarkanums (attiecas uz palpebrālās un bulbārās konjunktīvas vissmagākajiem rādītājiem, salīdzinot ar kontroles aci)

Asinsvadi atbilst normai 0

Daži asinsvadi izteikti hiperēmiski (piepildīti) 1

Difūza, koši sārta krāsa, atsevišķi asinsvadi grūti atšķirami 2

Difūza tumši sarkana krāsa 3

Hemoze: plakstiņu un/vai acs ābola saistaudu membrānu

Pietūkuma nav 0

Jebkurš pietūkums virs normas (arī acs ābola saistaudu membrānas pietūkums) 1

Izteikts pietūkums ar plakstiņu daļēju izvērsumu (ektropijs) 2

Pietūkums, plakstiņi gandrīz pusaizvērti 3

Pietūkums, plakstiņi vairāk nekā pusaizvērti 4

B.6. ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Piezīmes:

Testu jutīgumu un to spēju noteikt potenciālos cilvēku ādas sensibilizatorus uzskata par svarīgu toksicitātes klasifikācijas sistēmā, kas attiecas uz sabiedrības veselības aizsardzību.

Nav atsevišķas pārbaudes metodes, ar kuras palīdzību būtu iespējams efektīvi identificēt jebkuru vielu, kas spēj sensibilizēt cilvēka ādu, un kura būtu piemērojama visām vielām.

Izvēloties testu, jāņem vērā tādi faktori kā vielas fizikālās īpašības, iekļaujot tās spēju iekļūt ādā.

Testus ar jūrascūciņām var iedalīt divās grupās: ar adjuvanta izmantošanu, kad alerģisko reakciju stimulēšanai testa vielu izšķīdina vai suspendē Froinda pilnajā adjuvantā (*FCA*), un bez adjuvanta izmantošanas.

Testi ar adjuvantiem parasti precīzāk paredz vielas iespējamo sensibilizējošo ietekmi uz cilvēku nekā metodes, kurās neizmanto Froinda pilno adjuvantu, un tādēļ tie ir ieteicamākie testi.

Maksimizācijas tests ar jūras cūciņām (*GPMT*) ir plaši izplatīta metode, kas paredz adjuvanta izmantošanu. Kaut arī, lai noteiktu vielas spēju izraisīt ādas sensibilizācijas reakciju, var izmantot vairākas citas metodes, par ieteicamāko metodi ar adjuvantiem uzskata *GPMT*.

Daudzām ķīmisko vielu klasēm testus bez adjuvantiem (ieteicamākais no tiem ir Bīlera tests) uzskata par mazāk jutīgiem.

Dažos gadījumos var būt pamatoti iemesli izvēlēties Bīlera testu, kas saistīts ar pielietošanu uz ādas, nevis ar intradermālu injekciju, kuru izmanto jūrascūciņu maksimizācijas testā. Ja izmanto Bīlera testu, jāsniedz zinātnisks pamatojums.

Jūrascūciņu maksimizācijas tests (*GPMT*) un Bīlera tests ir aprakstīts šajā metodē. Var izmantot citas metodes ar nosacījumu, ka tās ir labi novērtētas un ir dots zinātnisks pamatojums.

Neatkarīgi no izvēlētās metodes periodiski (ik pēc 6 mēnešiem) jāpārbauda ādas sensibilizācijas testā izmantojamās jūrascūciņu līnijas jutīgums pret labi zināmiem iedarbīgiem un mēreni iedarbīgiem sensibilizatoriem un jāiegūst pozitīvi rezultāti pietiekami lielā skaitā.

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Ir ieteicamas šādas pēc vajadzības atšķaidītas vielas, kā arī citas sensibilizējošas vielas, kas ir zināmas no literatūras vai kas pieder pārbaudāmās vielas grupai.

— *p*-fenilēndiamīns	*CAS* Nr. 106-50-3
— 2,4-dinitrohlorbenzols	*CAS* Nr. 97-00-7,
— kālija dihromāts	*CAS* Nr. 7778-50-9
— neomicīna sulfāts	*CAS* Nr. 1405-10-3
— niķeļa sulfāts	*CAS* Nr. 7786-81-4

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Pēc sākotnējas testa vielas iedarbības ("indukcijas" fāze), beidzoties divu nedēļu laikam pēc testa vielas pēdējās iedarbības, dzīvniekiem atkārtoti ievada testa vielu (kontroliedarbība), lai konstatētu, ka ir panākts paaugstināts jutīgums. Par sensibilizāciju spriež pēc ādas reakcijas uz vielas atkārtotu iedarbību (kontroliedarbību).

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Jūras cūciņu maksimizācijas tests (GPMT)**

1.6.1.1. *Sagatavošanas darbi*

Veselas jaunas albīnas jūrascūciņas pēc nejaušās izvēles iedala testa un kontroles grupās. Pirms vielas ievada, dzīvniekiem uz pleca nocērp vai noskuj apmatojumu. Tas jādara uzmanīgi, lai nesavainotu ādu.

1.6.1.2. *Testa apstākļi*

1.6.1.2.1. Izmēģinājuma dzīvnieki

Izmanto parastās laboratorijas līniju albīnas jūrascūciņas, kas sver mazāk par 500 g.

1.6.1.2.2. Dzīvnieku skaits un dzimums

Var izmantot viena vai abu dzimumu dzīvniekus. Ja izmanto mātītes, tās nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Apstrādes grupā izmanto ne mazāk par 10 dzīvniekiem un kontroles grupā ne mazāk par 5 dzīvniekiem. Ja dzīvnieku skaits ir mazāks, tas jāpamato. Neviennozīmīgu rezultātu gadījumā histopatoloģiskie izmeklējumi var palīdzēt izlemt, vai tests jāatkārto ar citu dzīvnieku grupu.

Ja nav iespējams skaidri secināt, vai testa viela ir sensibilizators, ir ieteicams veikt testu ar papildu dzīvniekiem, lai kopā būtu vismaz 20 apstrādes dzīvnieku un 10 kontroles dzīvnieku.

1.6.1.2.3. Devu līmeņi

Testa vielas koncentrāciju pielāgo līmenī, kas izraisa ādas kairinājuma pazīmes, bet ko dzīvnieki labi panes katrā indukcijas posmā.

Kontroliedarbības koncentrācijai jābūt maksimālajai, kas nesensibilizētiem dzīvniekiem neizraisa ādas kairinājuma pazīmes.

Šo koncentrāciju var noteikt nelielā ievadpētījumā ar diviem vai trim dzīvniekiem.

1.6.1.2.4. Novērošanas laika posms

Indukcijas posma laikā veic novērojumus, lai konstatētu iespējamo kairinošo ietekmi. Pēc kontroliedarbības ādas reakcijas reģistrē 24 stundas un 48 stundas pēc kompreses noņemšanas.

1.6.1.3. *Procedūra*

Dzīvniekus nosver pirms testa un testa beigās. Ādu uz pleca atbrīvo no apmatojuma. Pārbaude noris divos posmos.

1.6.1.3.1. Indukcija

0. diena – apstrādes grupa

Dzīvnieki saņem šādus intradermālu injekciju pārus pleca apvidū, katru injekciju 0,1 ml, vienu ķermeņa kreisajā pusē, otru labajā pusē:

1. injekcija:	0,1 ml Froinda pilnā adjuvanta (*FCA*), sajaukta ar ūdeni vai fizioloģisko šķīdumu attiecībā 1:1,
2. injekcija:	0,1 ml testa vielas, vajadzības gadījumā piemērotā nesējā,
3. injekcija:	0,1 ml testa vielas kopā ar *FCA*.

3. injekcijā ūdenī šķīstošas vielas izšķīdina 0,05 ml ūdens un 0,05 ml neatšķaidīta *FCA*. Ja tests ir jāizdara taukos šķīstošām vai nešķīstošām vielām, tās sajauc ar neatšķaidītu *FCA*.

3. injekcijā testa vielas galīgā koncentrācija ir vienāda ar koncentrāciju 2. injekcijā.

1. un 2. injekciju izdara citu citai blakus, tuvāk galvai, bet 3. injekciju testa vietā nedaudz tuvāk astei.

0. diena – kontroles grupa

Tajā pašā vietā, kā tas norādīts iepriekš, izdara šādus intradermālu injekciju pārus:

1. injekcija:	0,1 ml Froinda pilnā adjuvanta (*FCA*), sajaukta ar ūdeni vai fizioloģisko šķīdumu attiecībā 1:1,
2. injekcija:	0,1 ml tikai nesēja,
3. injekcija:	0,1 ml nesēja *FCA* šķīdumā.

6. diena — kontroles un apstrādes grupa

Ja viela ādu nekairina, testa vietu pēc nocirpšanas un/vai noskūšanas noziež ar 0,5 ml nātrija laurilsulfāta vazelīnā, lai izraisītu vietēju kairinājumu.

7. diena – apstrādes grupa

Testa vietu atkal atbrīvo no apmatojuma. Testa vielu piemērotā nesējā (nesēja izvēle ir jāpamato; cietas vielas sasmalcina smalkā pulverī un iejauc piemērotā nesējā; šķidrumus attiecīgā gadījumā var uzlikt tieši) uzziež filtrpapīram (2x4 cm) un uzliek testa vietai un, izmantojot okluzīvu pārsēju, tur saskarē ar ādu 48 stundas.

7. diena — kontroles grupa

Testa vietu atkal atbrīvo no apmatojuma. Testa laukumā līdzīgi pielieto tikai nesēju un tur saskarē ar ādu 48 stundas, izmantojot okluzīvu pārsēju.

1.6.1.3.2. Kontroliedarbība

21. diena

Apstrādātiem un kontroles dzīvniekiem atbrīvo sānus no apmatojuma. Kompresi vai kameru ar testa vielu pieliek pie apstrādāto dzīvnieku viena sāna, bet pie otra sāna pieliek kompresi vai kameru, kas satur tikai nesēju.

Kompreses tur saskarē ar ādu 24 stundas, izmantojot okluzīvu pārsēju.

Tādā pašā veidā rīkojas ar kontroles grupu.

23. un 24. diena

— 21 stundu pēc kompreses noņemšanas notīra kontroliedarbības vietu un vajadzības gadījumā atbrīvo no apmatojuma,

— pēc trim stundām (48 stundas pēc kontroliedarbības sākuma) pārbauda un reģistrē ādas reakcijas,

— 24 stundas vēlāk novērošanu atkārto (72 stundas) un reģistrē rezultātus.

Lai ieviestu skaidrību rezultātos, kas gūti pēc pirmās kontroliedarbības, apmēram nedēļu vēlāk var paredzēt vēl vienu kontroliedarbību, vajadzības gadījumā kontroles grupā izmantojot citu šķīdinātāju.

1.6.1.3.3. Novērošana un izvērtēšana

Jāreģistrē un jāprotokolē visas ādas reakcijas un visi netipiski novērojumi pēc indukcijas un kontroliedarbības procedūrām.

Lai noskaidrotu neskaidras reakcijas, ko maskē ādas nokrāsošana ar testa vielu, var izmantot tādas metodes kā histopatoloģiskie izmeklējumi vai ādas krokas biezuma mērījumi.

1.6.2. **Bīlera tests**

1.6.2.1. *Sagatavošanas darbi*

Veselas jaunas albīnas jūrascūciņas pēc nejaušās izvēles iedala apstrādes un kontroles grupās. Pirms devas ievadīšanas no viena sāna nocērpot un/vai noskujot noņem apmatojumu. Tas jādara uzmanīgi, lai nesavainotu ādu.

1.6.2.2. *Testa apstākļi*

1.6.2.2.1. Izmēģinājumu dzīvnieki

Izmanto parastās laboratorijas līniju albīnas jūrascūciņas, kas sver mazāk par 500 g.

1.6.2.2.2. Dzīvnieku skaits un dzimums

Var izmantot viena vai abu dzimumu dzīvniekus. Ja izmanto mātītes, tās nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Vismaz 20 dzīvniekus izmanto apstrādes grupā un vismaz 10 dzīvniekus kontroles grupā. Ja dzīvnieku skaits ir mazāks, tas jāpamato. Neviennozīmīgu rezultātu gadījumā histopatoloģiskie izmeklējumi var palīdzēt izlemt, vai tests ir jāatkārto ar citu dzīvnieku grupu.

1.6.2.2.3. Devu līmeņi

Katrā indukcijas posmā testa vielas koncentrāciju pielāgo augstākajam līmenim, ko dzīvnieki sistēmiski labi panes un kas kairinošu vielu gadījumā testa dzīvnieku lielākajai daļai izraisa vieglu līdz mērenu kairinājumu. Kontroliedarbības koncentrācijai jābūt maksimālajai, kas nesensibilizētiem dzīvniekiem neizraisa ādas kairinājuma pazīmes. Šo koncentrāciju var noteikt nelielā ievadpētījumā ar diviem vai trim dzīvniekiem.

1.6.2.2.4. Novērošanas laika posms

Indukcijas posma laikā veic novērojumus, vai nav parādījušās ādas kairinājuma pazīmes. Pēc kontroliedarbības ādas reakcijas reģistrē 24 un 48 stundas pēc kompreses noņemšanas, t.i., 30 un 54 stundas pēc vielas pielietošanas sākuma.

1.6.2.3. *Procedūra*

Dzīvniekus nosver pirms testa un testa beigās.

Procedūra noris divās fāzēs.

1.6.2.3.1. Indukcija

0. diena – apstrādes grupa

Vienam sānam notīra apmatojumu. 0,5 ml testa vielas piemērotā nesējā (nesēja izvēle ir jāpamato; šķidrumus attiecīgā gadījumā var uzlikt tieši) uzklāj vates gabaliņam. To uzliek testa vietai un 6 stundas tur saskarē ar ādu, izmantojot okluzīvu kompresi vai kameru un piemērotu pārsēju.

0. diena — kontroles grupa

Vienam sānam notīra apmatojumu. Līdzīgā veidā testa vietai uzliek tikai nesēju. To 6 stundas tur saskarē ar ādu, izmantojot okluzīvu kompresi vai kameru un piemērotu pārsēju.

7. un 14. diena

Tajā pašā testa vietā un tāpat kā 0. dienā to pašu uzliek 7. un 14. dienā (vajadzības gadījumā notīrot apmatojumu).

1.6.2.3.2. Kontroliedarbība

28. diena

Apstrādes un kontroles dzīvniekiem notīra otra sāna apmatojumu. Apstrādes dzīvnieku sāna aizmugures daļā uzliek okluzīvu kompresi vai kameru, kas satur 0,5 ml testa vielas maksimālajā nekairinošajā koncentrācijā. Sāna priekšējā daļā uzliek arī okluzīvu kompresi vai kameru, kas satur tikai nesēju.

Okluzīvās kompreses atstāj saskarē ar ādu uz 6 stundām, izmantojot piemērotu pārsēju.

Tādā pašā veidā rīkojas ar kontroles grupu.

29. un 30. diena

— 21 stundu pēc kompreses noņemšanas notīra kontroliedarbības vietu un vajadzības gadījumā atbrīvo no apmatojuma,

— pēc trim stundām (30 stundas pēc kontroliedarbības sākuma) pārbauda un reģistrē ādas reakcijas,

— 24 stundas vēlāk novērošanu atkārto (54 stundas) un pieraksta rezultātus.

1.6.2.3.3. Novērošana un novērtēšana

Jāreģistrē un jāprotokolē visas ādas reakcijas un visi neparasti novērojumi pēc indukcijas un kontroliedarbības procedūrām.

Lai noskaidrotu neskaidras reakcijas, ko maskē ādas nokrāsošana ar testa vielu, var izmantot tādas metodes kā histopatoloģiskie izmeklējumi vai ādas krokas biezuma mērījumi.

2. **DATI (GPMT un Bīlera tests)**

Dati jāapkopo tabulā, norādot, kādas ādas reakcijas novērotas katram dzīvniekam katrā novērošanas reizē.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA (GPMT un Bīlera tests)**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS (GPMT un Bīlera tests)

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— izmantotā jūrascūciņu līnija,

— testa apstākļi, nesējs un testa vielas koncentrācijas, kas izmantotas indukcijās un kontroliedarbībās,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— katra dzīvnieka svars testa sākumā un beigās,

— visas dzīvniekiem novērotās reakcijas un to novērtēšanas sistēma, ja tādu izmanto,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA (GPMT un Bīlera tests)

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.7. ATKĀRTOTĀS DEVAS (28 DIENU) TOKSICITĀTE (ORĀLĀ)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Katru dienu 28 dienu laikā testa vielu pakāpeniskās devās ievada perorāli vairāku izmēģinājumu grupu dzīvniekiem, vienas grupas dzīvnieki saņem vienādu devu. Testa laikā dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes. Testa laikā mirušos dzīvniekus secē, beidzoties testam, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Dzīvniekus pirms testa vismaz piecas dienas pieradina pie izmitināšanas un barošanas apstākļiem. Dzīvniekus pirms testa pēc nejaušības principa sadala apstrādes grupās. Testa vielu var pievienot barībai, ievadīt ar zondi, kapsulās vai pievienot dzeramajam ūdenim. Visu testa laiku testa viela dzīvniekiem jāsaņem ar vienu metodi. Ja vieglākai dozēšanai izmanto nesēju vai citas piedevas, jāpārliecinās par to netoksiskumu. Vajadzības gadījumā var izmantot agrāk iegūtus datus.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Izmēģinājumu dzīvnieki*

Ja nav noteikts citādi, vēlams izmantot žurkas. Izmanto jaunas un veselas parasti izmantojamu laboratorijas līniju žurkas, vēlams līdz 6 nedēļu vecumam, jebkurā gadījumā to vecums nedrīkst pārsniegt 8 nedēļas.

Uzsākot pētījumu, dzīvnieku ķermeņa svara atšķirības nedrīkst pārsniegt ± 20 % no vidējā svara.

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits un dzimums*

Vienu un to pašu vielas devu ievada vismaz 10 (5 sieviešu un 5 vīriešu dzimuma) dzīvniekiem. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja paredzēts nogalināt dzīvniekus arī testa laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kuri tiks nogalināti pirms testa beigām. Turklāt 10 dzīvnieku papildu grupai (pieci katra dzimuma dzīvnieki) var ievadīt augsta līmeņa devu 28 dienas un novērot 14 dienas pēc vielas ievadīšanas attiecībā uz toksisko ietekmju atgriezeniskumu, noturību vai aizkavētu parādīšanos. Izmanto arī 10 kontroles dzīvnieku papildu grupu (piecus katra dzimuma dzīvniekus).

1.6.2.3. *Devu līmeņi*

Jāizmanto vismaz trīs dažādas devas un jābūt kontroles grupai. Izņemot testa vielas došanu, ar kontroles grupas dzīvniekiem rīkojas tāpat kā ar pārējiem dzīvniekiem. Ja izmanto nesēju, lai atvieglotu testa vielas ievadīšanu vajadzīgajā devā, kontroles dzīvnieki saņem tādu pašu daudzumu nesēja kā dzīvnieki, kas saņem lielāko vielas devu. Jāizvēlas tāda lielākā deva, kas ir toksiska, bet kas neizraisa vai reti izraisa dzīvnieku nāvi. Vielas mazākā deva nedrīkst izraisīt toksicitātes pazīmes. Ja ir pieejami provizoriskie dati par to, ar kādām devām saskaras cilvēki, vismazākajai devai jābūt lielākai par tām. Būtu vēlams, ka vidēji lielas devas izraisītu minimālas toksicitātes pazīmes. Ja izmanto vairākas vidējā intervāla devas, to toksiskajai iedarbībai jābūt manāmi atšķirīgai. Dzīvnieku grupās pēc mazās un vidēji lielās devas, kā arī kontroles grupā jābūt zemai mirstībai, lai iegūtu statistiski nozīmīgus novērtēšanas rezultātus.

Ja testa vielu pievieno uzturam, vielas koncentrācijai barībā (ppm vai mg/kg barības) jābūt nemainīgai vai jāizmanto deva, kas ir nemainīga attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa svaru; jebkura atkāpe no šīs shēmas ir jāpamato. Ja vielu ievada ar zondes palīdzību, tā katru dienu jāievada vienādā laikā un izmantotās devas periodiski (ik pēc nedēļas vai ik pēc divām nedēļām) jāpielāgo, lai tās būtu nemainīgas attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa svaru.

1.6.2.4. *Pieļaujamības tests*

Ja 28 dienu ilgajā pētījumā, ko veic pēc turpmāk aplūkotās metodes, izmanto vienu devu, kas ir 1000 mg/kg ķermeņa svara dienā vai lielāka, un tā atbilst devai, ar kādu parasti saskaras cilvēki (ja tāda deva ir zināma), un vielai šajā devā nav novērota toksiska iedarbība, var uzskatīt, ka tālākā pārbaude nav vajadzīga. Ja maztoksiskas vielas pievieno uzturam, ir svarīgi pārliecināties, ka testa vielas daudzums vai citas tās īpašības neiespaido ierastās prasības attiecībā uz uzturu.

1.6.2.5 *Novērošanas laika posms*

Dzīvnieki jānovēro katru dienu, reģistrējot toksiskuma pazīmes, iekļaujot to parādīšanās brīdi, smaguma pakāpi un ilgumu. Reģistrē nāves iestāšanās brīdi un laiku, kad parādās vai izzūd toksiskuma pazīmes.

1.6.3. **Procedūra**

Dzīvnieki parasti saņem testa vielu 7 dienas nedēļā 28 dienu laikā. Dzīvnieki papildu grupā, kas paredzēti tālākai novērošanai, turpmākās 14 dienas nesaņem testa vielu, lai varētu izsekot, kā tie atveseļojas un cik ilgi saglabājas toksiskā iedarbība.

Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar to ādu un apmatojumu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas Katru nedēļu jānosaka barības patēriņš (un ūdens patēriņš, ja testa vielu pievieno dzeramajam ūdenim) un dzīvnieki katru nedēļu jānosver.

Pastāvīga dzīvnieku novērošana ir nepieciešama, lai iespēju robežās samazinātu dzīvnieku zudumus testa laikā kanibālisma, audu autolīzes vai nepiemērotu turēšanas apstākļu dēļ. Beidzoties testam, visus izdzīvojušos dzīvniekus, izņemot papildu grupas dzīvniekus, secē. Mirstoši dzīvnieki un dzīvnieki, kam ir stipras baiļu sajūtas vai sāpes, ja tie ievēroti, ir jāizņem, humāni jānogalina un jāizdara autopsija.

Testa beigās visiem dzīvniekiem, arī kontroles dzīvniekiem, veic šādas pārbaudes:

1) hematoloģiskās pārbaudes, kas paredz vismaz hematokrīta, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaita un leikocitārās formulas noteikšanu, kā arī asins recēšanas mērījumus;

2) klīnisko asins bioķīmiju, tais skaitā vismaz vienu aknu un nieru funkcijas parametru: alanīna aminotransferāzi (agrāk pazīstama kā glutamīnpirovīnogskābes transaminmāze), seruma aspartāta aminotransferāzi (agrāk pazīstama kā glutamīnskābeņetiķskābes transaminmāze), urīnvielas slāpekli, albumīnu, asins kreatinīnu, kopējo bilirubīnu un kopējo seruma proteīnu.

Citas analīzes, kas var būt nepieciešamas pienācīgai toksikoloģiskai novērtēšanai, iekļauj kalcija, fosfora, hlorīdu, nātrija, kālija, tukšas dūšas glikozes, lipīdu, hormonu, skābju/bāzu līdzsvara, methemoglobīna un holīnesterāzes aktivitātes noteikšanu.

Vajadzības gadījumā var veikt arī citus klīniskās bioķīmijas izmeklējumus, lai padziļināti izpētītu novēroto ietekmi.

1.6.3.1. *Autopsija*

Visiem izmēģinājumu dzīvniekiem veic pilnu autopsiju. Aknas, nieres, virsnieru dziedzerus un sēkliniekus nosver uzreiz pēc sekcijas, lai izvairītos no sažūšanas. Orgāni un audi (aknas, nieres, liesa, sēklinieki, virsnieru dziedzeri, sirds un pārējie orgāni, ja tiem novēro makroskopiskus bojājumus vai izmaiņas izmēros) jāsaglabā piemērotā vidē iespējamai turpmākai histopatoloģiskai izmeklēšanai.

1.6.3.2. *Histopatoloģiskā izmeklēšana*

Histoloģiski jāizmeklē uzglabātie orgāni un audi, kas iegūti no lielāko devu saņēmušajiem dzīvniekiem un no kontroles dzīvniekiem. Ja testa viela lielākajā devas līmenī rada bojājumus orgānos un audos, tie jāizmeklē arī visiem mazāko devu grupas dzīvniekiem. Histoloģiski izmeklējot papildu grupas dzīvniekus, īpašu uzmanību pievērš tiem orgāniem un audiem, kuros novērotas toksiskuma pazīmes pārējās vielu saņēmušajās grupās.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā grupā testa sākumā un to dzīvnieku skaitu, kam ir novēroti vienādi bojājumi.

Visi iegūtie rezultāti jāizvērtē ar piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas un barošanas apstākļi, barība u.tml.,

— testa apstākļi,

— izmantotās devas (jānorāda arī nesējs, ja tādu izmanto) un koncentrācijas,

— dati par toksiskajām atbildes reakcijām atkarībā no dzimuma un devas,

— netoksiska deva, ja var noteikt,

— nāves iestāšanās brīdis testa laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,

— toksiska vai cita ietekme,

— atsevišķu anomālu pazīmju parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,

— barības patēriņš un ķermeņa svara dati,

— hematoloģiskie izmeklējumi un to rezultāti,

— klīniskās bioķīmijas izmeklējumi un to rezultāti,

— autopsijas konstatācijas,

— visu histopatoloģisko konstatāciju sīki izstrādāts apraksts,

— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.8. ATKĀRTOTĀS DEVAS (28 DIENU) TOKSICITĀTE (IEELPOŠANAS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Ir lietderīgi, ja ir iepriekšēja informācija par vielas daļiņu lieluma sadalījumu, tvaika spiedienu, kušanas temperatūru, viršanas temperatūru, uzliesmošanas temperatūru un sprādzienbīstamību (attiecīgā gadījumā).

Skat. arī Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Uz vairākām izmēģinājumu dzīvnieku grupām katru dienu noteiktā laika posmā iedarbojas ar atšķirīgām testa vielas koncentrācijām, kopumā 28 dienas, vienas grupas dzīvnieki saņem vielu vienādā koncentrācijā. Ja izmanto nesēju, kas palīdz iegūt vajadzīgo testa vielas koncentrāciju atmosfērā, jābūt kontroles grupai, uz kuru iedarbojas nesējs. Testa laikā dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes. Pārbaudes laikā mirušos dzīvniekus secē, beidzoties pārbaudei, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Dzīvniekus pirms testa vismaz piecas dienas pieradina pie izmitināšanas un barošanas apstākļiem. Veselus un jaunus dzīvniekus pirms testa pēc nejaušības principa sadala vajadzīgajā skaitā grupu. Ja nepieciešams, testa vielu var sajaukt ar piemērotu nesēju, kas palīdz iegūt vajadzīgo vielas koncentrāciju atmosfērā. Ja izmanto nesēju vai citu piedevu, kas atvieglo dozēšanu, ir jāpārliecinās, ka tās nav toksiskas. Vajadzības gadījumā var izmantot agrāk iegūtus datus.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Izmēģinājumu dzīvnieki*

Ja nav noteikts citādi, vēlams izmantot žurkas. Jāizmanto jauni un veseli parasti izmantojamu laboratorijas līniju dzīvnieki.

Uzsākot testus, dzīvnieku ķermeņa svara atšķirību diapazons nedrīkst pārsniegt ± 20 % no vidējā svara.

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits un dzimums*

Katrā testu grupā jābūt vismaz 10 (5 sieviešu un 5 vīriešu dzimuma) dzīvniekiem. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja dzīvnieku nonāvēšana paredzēta arī testa laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kuri tiks nonāvēti testa gaitā. Bez tam var izveidot papildu grupu no 10 dzīvniekiem (pa 5 no katra dzimuma), kas 28 dienas saņem lielāko koncentrāciju, un 14 dienu laikā pēc apstrādes novēro, vai toksiskā iedarbība ir atgriezeniska, noturīga vai iestājas novēloti. Izmanto arī 10 kontroles dzīvnieku papildu grupu (piecus katra dzimuma dzīvniekus).

1.6.2.3. *Koncentrācija, ar ko iedarbojas uz dzīvniekiem*

Jāizmanto vismaz trīs dažādas koncentrācijas, kā arī jābūt kontroles grupai, bet, ja izmanto nesēju, jābūt arī kontroles dzīvniekiem, kas saņem tikai nesēju (tā lielākajā koncentrācijā). Izņemot apstrādi ar testa vielu, ar kontroles grupas dzīvniekiem rīkojas tāpat kā ar pārējiem dzīvniekiem. Jāizvēlas tāda lielākā koncentrācija, kam ir toksiska ietekme, bet kas neizraisa vai reti izraisa dzīvnieku nāvi. Viela vismazākajā koncentrācijā nedrīkst izraisīt toksisku ietekmi. Ja pieejami provizoriskie dati par to, ar kādu koncentrāciju saskaras cilvēki, vismazākajai koncentrācijai jābūt lielākai par to. Būtu vēlams, ka vidēji lielās koncentrācijas toksicitāte izpaužas minimāli. Ja izmanto vairākas vidējā intervāla koncentrācijas, to toksiskajai iedarbībai jābūt manāmi atšķirīgai. Mazās un vidēji lielās devas grupās, kā arī kontroles grupā jābūt zemai mirstībai, lai iegūtu statistiski nozīmīgus novērtēšanas rezultātus.

1.6.2.4. *Iedarbības laiks*

Iedarbības ilgums katru dienu ir 6 stundas, bet to var mainīt atkarībā no konkrētām prasībām.

1.6.2.5. *Iekārta*

Testos ar dzīvniekiem izmanto inhalācijas iekārtu, kas nodrošina dinamisku gaisa plūsmu ar vismaz 12 gaisa nomaiņām stundā, pietiekamu skābekļa koncentrāciju un vienmērīgu atmosfēras sadalījumu iedarbības laikā. Ja izmanto kameru, tās konstrukcijai jābūt tādai, kas neļauj dzīvniekiem drūzmēties un nodrošina maksimālo testa vielas iedarbību inhalācijas laikā. Lai kamerā būtu noturīga atmosfēra, izmēģinājumu dzīvnieku kopējais "tilpums" parasti nedrīkst pārsniegt 5 % no testa kameras tilpuma. Var izmantot kameras, kas ļauj vielai iedarboties tikai uz mutes un deguna dobumu, galvu vai visu ķermeni; divas pirmās minētās iespējami samazina vielas uzņemšanu citos veidos.

1.6.2.6. *Novērošanas laika posms*

Visā iedarbības un atveseļošanās laikā izmēģinājumu dzīvniekus katru dienu apskata un reģistrē toksiskuma pazīmes. Tiem reģistrē nāves iestāšanās brīdi, kā arī laiku, kad parādās vai izzūd toksiskuma pazīmes.

1.6.3. **Procedūra**

Dzīvniekus 28 dienu laikā katru dienu no piecām līdz septiņām dienām nedēļā pakļauj testa vielas iedarbībai. Papildu grupu dzīvnieki, kas paredzēti tālākai novērošanai, turpmākās 14 dienas nesaņem testa vielu, lai varētu izsekot tam, kā tie atveseļojas un cik ilgi saglabājas toksiskā ietekme. Testa laikā jānodrošina 22 ± 3 °C temperatūra.

Parasti jānodrošina 30 līdz 70 % relatīvais mitrums, lai gan atsevišķos gadījumos (piemēram, aerosolu testos) to nav iespējams panākt. Neliela negatīva spiediena (<= 5 mm ūdens) uzturēšana kamerā novērsīs testa vielas izplūdi apkārtējā vidē. Iedarbības laikā dzīvniekus nebaro un nedzirda.

Jāizmanto dinamiska inhalācijas sistēma, kas nodrošina pienācīgu koncentrācijas kontroli. Lai noteiktu vajadzīgo vielas koncentrāciju, iesaka veikt priekšizmēģinājumu. Gaisa plūsma jānoregulē tā, lai visā inhalācijas kamerā būtu nodrošināti viendabīgi apstākļi. Sistēmai pēc iespējas ātrāk jānodrošina nemainīgi iedarbības apstākļi.

Jāmēra un jāuzrauga:

a) gaisa plūsmas ātrums (nepārtraukti);

b) testa vielas faktiskā koncentrācija inhalācijas zonā. Vielas koncentrācijas svārstības iedarbības laikā nedrīkst pārsniegt ± 15 % no vidējās vērtības. Tomēr dažu aerosolu gadījumā to nevar panākt, un tad ir pieļaujams plašāks svārstību diapazons. Visu testa laiku, katru dienu jācenšas nodrošināt pēc iespējas nemainīgu vielas koncentrāciju. Katru nedēļu jāveic vismaz viena aerosolu daļiņu lieluma analīze katrai testa grupai;

c) temperatūra un mitrums, ja iespējams, jāanalizē nepārtraukti.

Iedarbības laikā un pēc tās novērojumus veic un reģistrē sistemātiski; atsevišķi pieraksta datus par katru dzīvnieku. Dzīvniekus novēro katru dienu, reģistrējot toksiskuma pazīmes, kā arī to parādīšanās brīdi, smaguma pakāpi un ilgumu. Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar ādu un apmatojumu, acis, gļotādas, elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas Dzīvnieki katru nedēļu jānosver. Ieteicams arī katru nedēļu noteikt barības patēriņu. Sistemātiska dzīvnieku novērošana ļauj testa laikā novērst dzīvnieku zudumus kanibālisma, audu autolīzes vai nepiemērotu turēšanas apstākļu dēļ. Beidzoties izmēģinājumam, visus izdzīvojušos dzīvniekus, izņemot papildu grupas dzīvniekus, secē. Mirstoši dzīvnieki un dzīvnieki, kam ir stipras baiļu sajūtas vai sāpes, ja tie ievēroti, ir jāizņem, humāni jānogalina un jāizdara autopsija.

Testa beigās visiem dzīvniekiem, arī kontroles dzīvniekiem, veic šādas pārbaudes:

i) hematoloģiskās pārbaudes, kas iekļauj vismaz hematokrīta, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaita, leikocītu skaita un leikocitārās formulas noteikšanu, kā arī asins recēšanas mērījumus;

ii) klīnisko asins bioķīmiju, tais skaitā vismaz vienu aknu un nieru funkcijas parametru: seruma alanīna aminotransferāzes (agrāk pazīstama kā glutamīnpirovīnogskābes transaminināze), seruma aspartāta aminotransferāzes (agrāk pazīstama kā glutamīnskābeņetiķskābes transaminināze), urīnvielas slāpekļa, albumīna, asins kreatinīna, kopējā bilirubīna un kopējo seruma proteīnu mērījumus.

Citas analīzes, kas var būt nepieciešamas pienācīgai toksikoloģiskai novērtēšanai, paredz kalcija, fosfora, hlorīdu, nātrija, kālija, tukšas dūšas glikozes, lipīdu, hormonu, skābju/bāzu līdzsvara, methemoglobīna un holīnesterāzes aktivitātes noteikšanu.

Vajadzības gadījumā var veikt arī citus klīniskās bioķīmijas izmeklējumus, lai padziļināti izpētītu vielas toksisko ietekmi.

1.6.3.1. *Autopsija*

Visiem izmēģinājumu dzīvniekiem veic pilnu autopsiju. Vismaz aknas, nieres, virsnieru dziedzerus un sēkliniekus nosver uzreiz pēc sekcijas, lai tie nesažūtu. Orgāni un audi (elpošanas orgāni, aknas, nieres, liesa, sēklinieki, virsnieru dziedzeri, sirds, kā arī pārējie orgāni, ja tiem novēro makroskopiskus bojājumus vai izmaiņas izmēros) jāsaglabā piemērotā vidē turpmākai histopatoloģiskai izmeklēšanai. Plaušas jāizņem neskartas, tās jānosver un jāapstrādā ar piemērotu fiksatoru, kas ļauj saglabāt plaušu struktūru.

1.6.3.2. *Histopatoloģiskā izmeklēšana*

Histoloģiski izmeklē uzglabātos orgānus un audus, kas iegūti no lielākās koncentrācijas grupas dzīvniekiem un no kontroles dzīvniekiem. Ja testa viela lielākajā devā rada bojājumus orgānos un audos, tie jāizmeklē arī visiem pārējiem mazāku devu grupu dzīvniekiem. Histoloģiski izmeklējot papildu grupu dzīvniekus, īpašu uzmanību pievērš tiem orgāniem un audiem, kuros novērotas toksiskuma pazīmes pārējās apstrādes grupās.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā grupā testa sākumā un to dzīvnieku skaitu, kam ir novēroti vienādi bojājumi.

Visi iegūtie rezultāti jāizvērtē ar piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas un barošanas apstākļi, barība u.tml.,

— testa apstākļi:

Inhalācijas iekārtas apraksts, norādot tās konstrukciju, modeli, izmērus, gaisa avotu, aerosolu ģenerēšanas sistēmu, gaisa kondicionēšanas paņēmienu, izplūdes gaisa apstrādi un dzīvnieku izmitināšanas metodi izmēģinājumu kamerā, ja to izmanto. Jāapraksta iekārtas temperatūras, gaisa mitruma un vajadzības gadījumā aerosolu koncentrācijas noturīguma vai daļiņu lielumu sadalījuma noteikšanai.

Iedarbības dati

Šie dati jāapkopo tabulā, norādot vidējos lielumus, kā arī svārstību diapazonu (piemēram, standartnovirzi) un, ja iespējams, minot

a) gaisa plūsmas ātrumu caur inhalācijas iekārtu;

b) gaisa temperatūru un mitrumu;

c) nominālo koncentrāciju (inhalācijas iekārtā ievadītais testa vielas kopējais daudzums, kas izdalīts ar gaisa tilpumu);

d) nesēja veidu, ja to izmanto;

e) faktiskās koncentrācijas testa elpošanas zonā;

f) masas vidējo aerodinamisko diametru (MVAD) un ģeometrisko standartnovirzi (ĢSN);

— datus par toksiskajām reakcijām atkarībā no dzimuma un koncentrācijas,

— nāves iestāšanās brīdi testa laikā vai norādi, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,

— toksiskās ietekmes vai citas ietekmes raksturojumu; netoksisko devas līmeni,

— atsevišķu anomālu pazīmju parādīšanās brīdi un to tālāko attīstību,

— barības patēriņu un ķermeņa svara izmaiņas,

— hematoloģiskos izmeklējumus un to rezultātus,

— klīniskās bioķīmijas izmeklējumus un to rezultātus,

— autopsijas konstatācijas,

— visu histopatoloģisko konstatāciju sīki izstrādātu aprakstu,

— rezultātu statistisko apstrādi, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājumu,

— rezultātu interpretāciju.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.9. ATKĀRTOTĀS DEVAS (28 DIENU) TOKSICITĀTE (ĀDAS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Testa vielu dažādās devās katru dienu 28 dienu laikā uztriepj uz ādas vairāku grupu izmēģinājumu dzīvniekiem; vienas grupas dzīvnieki saņem vienādu devu. Vielas pielietošanas laikā dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes. Pārbaudes laikā mirušos dzīvniekus secē, beidzoties pārbaudei, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Dzīvniekus pirms testa vismaz piecas dienas pieradina pie izmitināšanas un barošanas apstākļiem. Veselus un jaunus dzīvniekus pirms testa pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās. Neilgi pirms testa nocērp apmatojumu uz izmēģinājumu dzīvnieku muguras. Ādu var arī noskūt, bet tas jādara 24 stundas pirms testa. Parasti cirpšanu vai skūšanu apmēram ik pēc nedēļas atkārto. Cērpot vai skujot apmatojumu, jāuzmanās, lai nenobrāztu ādu. Testa vielas uzlikšanai jāsagatavo ne mazāk kā 10 % no ķermeņa virsmas. Lemjot par to, cik lielai ādas virsmai jābūt brīvai no apmatojuma, lai to apstrādātu ar vielu, ņem vērā dzīvnieku svaru. Pārbaudot cietas vielas, kuras vajadzības gadījumā var saberzt pulverī, testa viela jāsamitrina ar pietiekamu daudzumu ūdens vai, ja nepieciešams, ar piemērotu nesēju, lai tai būtu laba saskare ar ādu. Testa šķidrumus parasti neatšķaida. Parasti vielu pielieto vienreiz dienā 5 līdz 7 dienas nedēļā.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Izmēģinājumu dzīvnieki*

Var izmantot pieaugušas žurkas, trušus vai jūrascūciņas. Var izmantot arī citas sugas dzīvniekus, bet šī izvēle jāpamato.

Uzsākot testus, dzīvnieku ķermeņa svara svārstības nedrīkst pārsniegt ± 20 % no vidējā svara.

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits un dzimums*

Vienu un to pašu devas līmeni izmanto vismaz 10 (5 sieviešu un 5 vīriešu dzimuma) dzīvniekiem ar veselu ādu. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja dzīvnieku nonāvēšana paredzēta arī testa laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kuri tiks nogalināti testa gaitā. Turklāt 10 dzīvnieku papildu grupai (pieci katra dzimuma dzīvnieki) var ievadīt augsta līmeņa devu 28 dienas un novērot 14 dienas pēc vielas ievadīšanas attiecībā uz toksisko ietekmju atgriezeniskumu, noturību vai aizkavētu parādīšanos. Izmanto arī 10 kontroles dzīvnieku papildu grupu (piecus katra dzimuma dzīvniekus).

1.6.2.3. *Izmantotās devas*

Jāizmanto vismaz trīs devas, kā arī jābūt kontrolei, un, ja lieto nesēju, kontroles dzīvniekiem jāsaņem tikai nesējs. Iedarbības laikam jābūt vismaz 6 stundas dienā. Testa vielu pielieto katru dienu vienādā laikā un devas periodiski pielāgo (ik pēc nedēļas vai divām nedēļām), lai tās būtu nemainīgas attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa svaru. Ar kontroles dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar pārējiem dzīvniekiem, tie tikai nesaņem testa vielu. Ja izmanto nesēju, kas atvieglo dozēšanu, kontroles dzīvnieki saņem tādu pašu daudzumu nesēja kā dzīvnieki, kuri saņem lielāko testa vielas devu. Jāizvēlas tāda lielākā deva, kas ir toksiska, bet kas neizraisa vai reti izraisa dzīvnieku nāvi. Vielas mazākā deva nedrīkst izraisīt toksiskuma pazīmes. Ja pieejami provizoriskie dati par to, ar kādām devām saskaras cilvēki, vismazākajai devai jābūt lielākai par tām. Būtu vēlams, ka vidēji lielās devas toksiskums izpaužas minimāli. Ja izmanto vairākas vidējā intervāla devas, to toksiskajai iedarbībai jābūt manāmi atšķirīgai. To dzīvnieku grupās, kas saņem mazo un vidēji lielo devu, jābūt zemam mirstības līmenim, lai varētu statistiski novērtēt rezultātus.

Ja testa vielas lietošana izraisa smagu ādas kairinājumu, tās koncentrācija jāsamazina, un tāpēc var samazināties vai neizpausties citas toksiskas reakcijas, lietojot lielo devu. Turklāt, ja āda ir nopietni bojāta, var gadīties, ka ir jāpārtrauc tests un jāizvēlas mazāka koncentrācija.

1.6.2.4. *Pieļaujamības tests*

Ja iepriekšējā pārbaudē izmanto 1000 mg/kg devu vai vēl lielāku devu, kas atbilst devai, ar kādu parasti saskaras cilvēki, ja tāda ir zināma, un nenovēro toksisku ietekmi, var uzskatīt, ka turpmākā pārbaude nav nepieciešama.

1.6.2.5. *Novērošanas laika posms*

Izmēģinājumu dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes. Tiem reģistrē nāves iestāšanās brīdi un laiku, kad parādās vai izzūd toksiskuma pazīmes.

1.6.3. **Procedūra**

Katru dzīvnieku tur atsevišķā būrī. Dzīvnieki parasti saņem testa vielu 7 dienas nedēļā, 28 dienu laikā. Dzīvnieki papildu grupās, kas paredzēti tālākai novērošanai, turpmākās 14 dienas nesaņem testa vielu, lai varētu izsekot tam, kā tie atveseļojas un cik ilgi saglabājas toksiskā iedarbība. Iedarbības ilgums ir vismaz 6 stundas dienā.

Testa vielu vienmērīgi uztriepj uz ādas, kuras platība veido apmēram 10 % no kopējās ķermeņa virsmas. Ja vielas ir ļoti toksiskas, apstrādājamās ādas laukumu var samazināt, bet tam jābūt pietiekami lielam, un viela jāuztriepj pēc iespējas plānāk un vienmērīgāk.

Testa vielas saskari ar ādu iedarbības laikā nodrošina ar poraina marles pārsēja un nekairinoša plākstera palīdzību. Apstrādātā vieta pēc tam vēl jāpārklāj tā, lai nostiprinātu marles pārsēju ar testa vielu un lai dzīvnieki nevarētu to norīt. Lai testa viela nenonāktu barības vadā, var daļēji ierobežot dzīvnieku kustību, taču pilnīga imobilizācija nav ieteicama. Kā alternatīvu var izmantot apkakles veida aizsargierīci.

Beidzoties iedarbības laikam, testa vielas atlikumu, ja iespējams, noņem ar ūdeni vai izmanto kādu citu piemērotu ādas notīrīšanas paņēmienu.

Visus dzīvniekus novēro katru dienu, reģistrējot toksiskuma pazīmes, to parādīšanās brīdi, smaguma pakāpi un ilgumu. Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar to ādu un apmatojumu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas Dzīvnieki katru nedēļu jānosver. Ieteicams arī katru nedēļu noteikt barības patēriņu. Sistemātiska dzīvnieku novērošana ļauj testa laikā novērst dzīvnieku zudumus kanibālisma, audu autolīzes vai nepiemērotu turēšanas apstākļu dēļ. Beidzoties izmēģinājumam, visus izdzīvojušos dzīvniekus, izņemot papildu grupas dzīvniekus, secē. Mirstoši dzīvnieki un dzīvnieki, kam ir stipras baiļu sajūtas vai sāpes, ja tie ievēroti, ir jāizņem, humāni jānogalina un jāizdara autopsija.

Testa beigās visiem dzīvniekiem, arī kontroles dzīvniekiem, veic šādas pārbaudes:

1) hematoloģiskās pārbaudes, kas paredz vismaz hematokrīta, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaita, leikocītu skaita un leikocitārās formulas noteikšanu, kā arī asins recēšanas mērījumus;

2) klīnisko asins bioķīmiju, tais skaitā vismaz vienu aknu un nieru funkcijas parametru: seruma alanīna aminotransferāzes (agrāk pazīstama kā glutamīnpirovīnogskābes transaminmāze), seruma aspartāta aminotransferāzes (agrāk pazīstama kā glutamīnskābeņetiķskābes transaminmāze), urīnvielas slāpekļa, albumīna, asins kreatinīna, kopējā bilirubīna un kopējo seruma proteīnu mērījumus.

Citas analīzes, kas var būt nepieciešamas pienācīgai toksikoloģiskai novērtēšanai, paredz kalcija, fosfora, hlorīdu, nātrija, kālija, tukšas dūšas glikozes, lipīdu, hormonu, skābju/bāzu līdzsvara, methemoglobīna un holīnesterāzes aktivitātes noteikšanu.

Vajadzības gadījumā var veikt arī citus klīniskās bioķīmijas izmeklējumus, lai padziļināti izpētītu vielas novēroto ietekmi.

1.6.4. **Autopsija**

Visiem izmēģinājumu dzīvniekiem veic pilnu autopsiju. Vismaz aknas, nieres, virsnieru dziedzerus un sēkliniekus nosver uzreiz pēc sekcijas, lai novērstu sažūšanu. Orgāni un audi, proti, vesela un apstrādāta āda, aknas, nieres, liesa, sēklinieki, virsnieru dziedzeri, sirds un mērķorgāni (orgāni, kuros novēroti makroskopiski bojājumi vai izmaiņas izmēros) jāsaglabā piemērotā vidē turpmākai histopatoloģiskai izmeklēšanai.

1.6.5. **Histopatoloģiskā izmeklēšana**

Histoloģiski izmeklē saglabātos orgānus un audus, kas iegūti no lielās devas grupas un no kontroles grupas dzīvniekiem. Ja testa viela lielākajā devā rada bojājumus orgānos un audos, tie jāizmeklē arī visiem pārējiem mazāku devu saņēmušo grupu dzīvniekiem. Histoloģiski izmeklējot papildu grupas dzīvniekus, īpašu uzmanību pievērš tiem orgāniem un audiem, kuros novērotas toksiskuma pazīmes pārējās grupās pēc apstrādes.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā grupā testa sākumā un to dzīvnieku skaitu, kam ir novēroti vienādi bojājumi.

Visi iegūtie rezultāti jāizvērtē ar piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— dati par dzīvniekiem (suga, līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs u.tml.),

— testa apstākļi (iekļaujot pārsēja veidu — okluzīvs vai neokluzīvs),

— devu līmeņi (jānorāda arī nesējs, ja tādu izmanto) un koncentrācijas,

— netoksiskas devas līmenis, ja var noteikt,

— dati par toksiskajām reakcijām atkarībā no dzimuma un devas,

— nāves iestāšanās brīdis testa laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,

— toksiska vai cita ietekme,

— katras anomālas pazīmes parādīšanās brīdis un tālākā attīstība,

— barības patēriņš un ķermeņa svara izmaiņas,

— hematoloģiskie izmeklējumi un to rezultāti,

— klīniskās bioķīmijas izmeklējumi un to rezultāti,

— autopsijas konstatācijas,

— visu histopatoloģisko konstatāciju sīki izstrādāts apraksts,

— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.10. MUTAGENITĀTE (ZĪDĪTĀJU CITOĢENĒTIKAS IN VITRO TESTS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas C iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Ar citoģenētisko *in vitro* testu nosaka vielas mutagenitāti īslaicīgas iedarbības dēļ, nosakot strukturālas hromosomu aberācijas zīdītāju šūnu kultūrās. Šim nolūkam var izmantot pastāvīgās šūnu līnijas, kā arī primārās šūnu kultūras. Pēc testa vielu iedarbības ar piemērotu metaboliskās aktivācijas sistēmu vai bez tās šūnu kultūras apstrādā ar vārpstas inhibitoriem, piemēram, kolhicīnu, lai uzkrātu šūnas mitozes metafāzei līdzīgā stadijā (c-metafāze). Šūnas vajadzīgos termiņos savāc un izgatavo hromosomu preparātus. Preparātus krāso un pēc tam analizē metafāzes šūnas un reģistrē hromosomu aberācijas.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

1.6.1.1. *Šūnas*

Izmanto pastāvīgās šūnu līnijas vai primārās šūnu kultūras, piemēram, Ķīnas kāmja šūnas vai cilvēka limfocītus. Testa vielas pirms šūnu apstrādes sajauc ar barotni vai izšķīdina piemērotā nesējā.

1.6.1.2. *Metaboliskās aktivācijas sistēma*

Uz šūnām iedarbojas ar testa vielu gan kopā ar piemērotu metaboliskās aktivācijas sistēmu, gan bez tās. Visbiežāk izmantotā sistēma ir postmitohondriālā frakcija ar kofaktoru, kas sagatavota no grauzēju aknām, kuras apstrādātas ar fermentus inducējošiem aģentiem.

1.6.2. **Testa apstākļi**

Kultūru skaits

Viena eksperimenta punkta iegūšanai izmanto vismaz divus šūnu kultūras paraugus.

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Kā negatīvo kontroli izmanto šķīdinātāju (ja viela nešķīst barotnē vai ūdenī), aknu fermentu aktivācijas maisījumu, aknu fermentu aktivācijas maisījumu kopā ar šķīdinātāju un neapstrādātu kontroli.

Katrā izmēģinājumā izmanto arī pozitīvo kontroli; ja testa vielas aktivēšanai izmanto aknu fermentu aktivācijas maisījumu, kā pozitīvā kontrole jāizmanto kāds zināms savienojums, kuram vajadzīga metaboliska aktivācija.

Devu līmeņi

Izmanto vismaz trīs testa savienojuma devas vismaz vienas logaritmiskās devas intervālā. Lielākajai devai jākavē mitotiskā aktivitāte aptuveni par 50 % vai citādi jāuzrāda citotoksicitāte. Ja testa viela neuzrāda toksicitāti, tā jāpārbauda līdz šķīdības robežai vai līdz maksimālajai koncentrācijai 5 mg/ml.

Šūnu kultivēšanas apstākļi

Izmanto piemērotu barotni un kultivēšanas apstākļus (piemēram, temperatūru, kultivēšanas traukus, CO_2 koncentrāciju un gaisa mitrumu).

1.6.3. **Procedūra**

1.6.3.1. *Kultūru sagatavošana*

Pastāvīgās šūnu līnijas. Šūnas iegūst no pamatkultūrām (piemēram, tripsinizējot vai nokratot šūnas), kuras iesēj inkubācijas traukos vajadzīgā blīvumā un kultivē 37 °C temperatūrā.

Cilvēka limfocīti. Ar heparīnu apstrādātas asinis sajauc ar barotni, kas satur fitohemaglutinīnu, teļu embrionālo serumu un antibiotikas, un kultivē 37 °C temperatūrā.

1.6.3.2. *Kultivēto šūnu apstrāde ar testa vielu*

i) Apstrāde bez aknu fermentu aktivācijas maisījuma

Jebkura apstrāde, ja iespējams, aptver vismaz vienu pilnu šūnas ciklu, un fiksāciju veic tā, lai būtu iespējams analizēt pirmo pēcapstrādes mitozi šūnās, kas apstrādātas dažādās cikla stadijās.

Ja apstrāde neaptver vienu pilnu šūnas ciklu, fiksācijas laikus izvēlas tā, lai varētu atlasīt šūnas, kas apstrādes laikā atrodas dažādās šūnas cikla stadijās, t.i., G_1, S un G_2.

Ja izmanto pastāvīgās šūnu līnijas, testa vielu pievieno tad, kad tās atrodas eksponenciālajā vairošanās fāzē. Cilvēka limfocītu kultūras apstrādā tad, kad tās ir pussinhronā stāvoklī.

ii) Apstrāde ar aknu fermentu aktivācijas maisījumu

Ja šūnu apstrādei izmanto testa vielu kopā ar aktivācijas maisījumu, tā jāveic cik vien ilgi iespējams, neizraisot šūnās toksiskumu. Ja toksiskuma dēļ šī apstrāde neaptver vienu pilnu šūnas ciklu, fiksācijas laikus izvēlas tā, lai varētu atlasīt šūnas, kas apstrādes laikā atrodas dažādās šūnas cikla stadijās, t.i., G_1, S un G_2.

Šūnu savākšana

Pirms savākšanas šūnu kultūras noteiktu laiku apstrādā ar vārpstas inhibitoru. Katra parauga šūnas savāc atsevišķi un izgatavo hromosomu preparātus. Ir vajadzīgas vismaz divas savākšanas reizes. Ir ieteicams, lai viena būtu aptuveni vienā šūnas ciklā un otra vēlāk. Tam ir jānodrošina, lai būtu iekļautas visas šūnas cikla stadijas un lai ņemtu vērā šūnas cikla aizkavēšanos.

1.6.3.3. *Hromosomu apstrāde*

Tā ietver šūnu apstrādi ar hipotonisku šķīdumu, fiksāciju, preparātu izgatavošanu uz priekšmetstikliņiem un krāsošanu.

Preparātu analīze

Analizē vismaz 100 labi izkliedētu metafāzes plātņu no katra parauga un reģistrē hromosomu aberācijas. Priekšmetstikliņus pirms analīzes kodē. Kas attiecas uz cilvēka limfocītiem, analizē tikai metafāzes plātnes ar 46 centromērām.

Pastāvīgo šūnu līnijās analizē tikai metafāzes plātnes, kurās centromēru skaits atbilst modālajam skaitlim ± 2.

Turklāt katram devas līmenim testa laikā ir jānovērtē mitozes indekss vai attiecīgā gadījumā kāda cita norāde uz citotoksicitāti.

2. **IEGŪTIE DATI**

Datus apkopo tabulā. Visām apstrādātajām un kontroles kultūrām atsevišķi norāda hromatidālās aberācijas (izlaidumi, pārrāvumi, savstarpējās apmaiņas), hromosomālās aberācijas (izlaidumi, pārrāvumi, sīkfragmenti, gredzenhromosomas, dicentriskās un policentriskās hromosomas) un anomālo metafāžu (izlaidumus ieskaitot un neieskaitot) skaitu.

Šos datus novērtē ar piemērotu statistikas metodi.

Testa rezultāti jāsalīdzina ar paralēlo negatīvo kontroli.

Izdara vismaz divus neatkarīgus eksperimentus. Tomēr, ja var zinātniski pamatot, pietiekams var būt viens eksperiments. Nav nepieciešams otro eksperimentu izdarīt identiski sākotnējam eksperimentam. Īstenībā var būt vēlams mainīt dažus testa apstākļus, lai iegūtu noderīgākus datus.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— izmantotās šūnas,

— apstākļi: barotnes sastāvs, CO_2 koncentrācija, kultivēšanas temperatūra un ilgums, Devu līmeņi, apstrādes laiks, dalīšanās vārpstas inhibitora koncentrācija un apstrādes ar to ilgums, izmantotais aknu fermentu aktivācijas maisījuma tips, pozitīvā un negatīvā kontrole,

— šūnu kultūru skaits,

— analizēto metafāzes plātņu skaits (atsevišķi norādot datus par katru kultūru),

— mitozes indekss vai citas norādes uz citotoksicitāti,

— aberāciju veids un skaits katrā apstrādātajā un kontroles kultūrā, modālais hromosomu skaits izmantotajās pastāvīgajās šūnu līnijās,

— statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.11. MUTAGENITĀTE (ZĪDĪTĀJU KAULU SMADZEŅU CITOĢENĒTISKS IN VIVO TESTS, HROMOSOMU ANALĪZE)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas C iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Ar citoģenētisko analīzi nosaka vielas mutagenitāti pēc tās īslaicīgas iedarbības, reģistrējot strukturālas hromosomu aberācijas *in vivo*. Hromosomu aberācijas parasti analizē pirmajā pēcapstrādes mitozē. Ķīmiskie mutagēni galvenokārt izraisa hromatīdālās aberācijas.

Metodē izmanto ar testa vielu apstrādātu zīdītāju kaula smadzeņu šūnas, dzīvniekus nogalina noteiktos termiņos pēc apstrādes. Pirms nogalināšanas dzīvniekiem ievada dalīšanās vārpstas inhibitoru, piemēram, kolhicīnu, kas ļauj uzkrāt šūnas mitozes metafāzei līdzīgā stadijā (c-metafāze). Gaisā žāvētus hromosomu preparātus, kas iegūti no šūnām, krāso un metafāzes plātnes analizē mikroskopā, reģistrējot hromosomu aberācijas.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Testa vielas izšķīdina fizioloģiskajā šķīdumā. Ja tās nešķīst fizioloģiskajā šķīdumā, izmanto piemērotu nesēju.

Testa vielas šķīdumam jābūt tikko sagatavotam. Ja izmanto nesēju, kas atvieglo dozēšanu, tas nedrīkst reaģēt ar testa vielu un būt toksisks.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Izmēģinājumu dzīvnieki*

Izmanto grauzējus, piemēram, žurkas, peles vai Ķīnas kāmjus. Veselus un jaunus pieaugušos dzīvniekus pēc nejaušības principa iedala apstrādes un kontroles grupās.

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits un dzimums*

Katrā izmēģinājumu un kontroles grupā jābūt vismaz pieciem katra dzimuma dzīvniekiem. Tātad ja testu plāns paredz vairākus pēcapstrādes pārbaudes termiņus, katrā pārbaudes termiņā izmanto 10 dzīvnieku grupu.

Pozitīvās kontroles grupai ir pietiekama viena paraugu ņemšanas reize.

1.6.2.3. *Ievadīšanas veids*

Testa vielu parasti ievada tikai vienreiz. Atkarībā no toksikoloģijas datiem var veikt atkārtotu apstrādi. Tomēr atkārtotu apstrādi var veikt tikai tad, ja testa viela neiedarbojas citotoksiski uz kaula smadzeņu šūnām. Parasti vielas ievada perorāli vai intraperitoniāli. Var izmantot arī citus ievadīšanas veidus.

1.6.2.4. *Negatīvā un pozitīvā kontrole*

Plānojot katru testu, kā pozitīvo kontroli izvēlas kādu zināmu vielu, kas izraisa hromosomu aberācijas *in vivo*, bet kā negatīvo kontroli izmanto dzīvniekus, kuriem ievada šķīdinātāju.

1.6.2.5. *Devu līmeņi*

Pamatizmēģinājumā izmanto vienu testa vielas devu, kas atbilst maksimāli pieļaujamai devai vai devai, kura ir nedaudz citotoksiska (piemēram, daļēji inhibē mitozi).

Netoksiskiem savienojumiem maksimālā (robežas) deva, kas ir jāizpēta pēc vienas devas ievadīšanas, ir 2000 mg/kg ķermeņa svara.

Ja izmanto atkārtotās devas testa plānu, robeždeva ir 1000 mg/kg ķermeņa svara dienā.

Pastāv iespēja izvēlēties papildu devas, ja to var zinātniski pamatot.

Ja testu veic pārbaudes nolūkā, jābūt vismaz divām papildu devām.

1.6.3. **Procedūra**

Testu var veikt divējādi.

i) Dzīvniekiem vienreiz ievada testa vielu maksimāli pieļaujamajā devā. Pirmoreiz paraugus ņem 24 stundas pēc vielas ievadīšanas. Ja rezultāti šajā stadijā ir nepārprotami pozitīvi, turpmāka paraugu ņemšana nav vajadzīga. Tomēr, ja rezultāti ir negatīvi vai neskaidri, tā kā testa viela var ietekmēt šūnu cikla kinētiku, izmanto vienu agrāku un otru vēlāku paraugu ņemšanas intervālu, starp kuriem atbilstoši ir sešas līdz 48 stundas.

   Ja izmanto papildu devas, paraugus ņem termiņos, kad šūnas ir sevišķi jutīgas pret vielas iedarbību, vai, ja tie nav zināmi, pēc 24 stundām.

ii) Ja farmakokinētikas un metabolisma izpētes dati liecina par labu atkārtotai apstrādei, vielu var ievadīt atkārtoti, un paraugus ņem 6 un 24 stundas pēc pēdējās ievadīšanas.

Kaula smadzeņu šūnu sagatavošana

Pirms nogalināšanas dzīvniekiem intraperitoniāli ievada dalīšanās vārpstas inhibitoru vajadzīgajā devā, lai iegūtu pietiekami daudz šūnu c-metafāzes stadijā. Tikko nogalinātiem dzīvniekiem no ciskas kaula ar izotonisku šķīdumu izskalo kaula smadzeņu šūnas. Pēc pienācīgas apstrādes ar hipotonisku šķīdumu šūnas fiksē un uztriepj uz priekšmetstikliņiem. Pēc žāvēšanas gaisā preparātus krāso.

Preparātu analīze

Pirms preparātu mikroskopiskās apskates tos kodē. Analizē vismaz 50 labi izkliedētas metafāzes plātnes no katra dzīvnieka, kurām netrūkst centromēru. Bez tam katram dzīvniekam var noteikt mitozes indeksu.

2. **IEGŪTIE DATI**

Datus apkopo tabulā. Katram apstrādātajam un kontroles dzīvniekam atsevišķi norāda hromatidālās un izohromatidālās aberācijas (izlaidumi, pārrāvumi, savstarpējās apmaiņas) un mitozes indeksu, ja tas ir zināms. Tāpat katrai testu un kontroles grupai norāda vidējās vērtības un standartnovirzes. Šos datus novērtē ar piemērotu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— izmantoto dzīvnieku suga, līnija un vecums,

— katra dzimuma dzīvnieku skaits testu un kontroles grupās,

— testa apstākļi — sīks devu ievadīšanas un paraugu ņemšanas grafika apraksts, izmantotās devas, izmantotā dalīšanās vārpstas inhibitora koncentrācija un ievadīšanas ilgums,

— analizēto metafāzes plātņu skaits uz vienu dzīvnieku,

— mitozes indekss, ja noteikts,

— aberāciju veids un skaits, ko norāda atsevišķi katram apstrādātajam un kontroles dzīvniekam,

— toksicitātes pazīmes pētījuma gaitā,

— statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.12. MUTAGENITATE (MIKROKODOLA TESTS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas C iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Izmantojot mikrokodola testu, var īsā laikā noteikt ķīmisku vielu radītus bojājumus zīdītāju hromosomās un mitotiskajā aparātā *in vivo*. Šī metode pamatojas uz to, ka apstrādāto dzīvnieku polihromatiskie eritrocīti satur vairāk mikrokodolu, salīdzinot ar kontroles grupu.

Mikrokodolus veido hromosomu fragmenti vai veselas hromosomas šūnu dalīšanās laikā. Eritroblastiem pārvēršoties par eritrocītiem, pamatkodols tiek izgrūsts no šūnas, turpretim mikrokodols var palikt citoplazmā. Šajā pārbaudē izmanto polihromatiskos eritrocītus, kas iegūti no zīdītāju kaulu smadzenēm pēc attiecīgas testa vielas iedarbības. No iegūtajām kaula smadzeņu šūnām gatavo uztriepes un krāso. Mikroskopā polihromatiskajiem eritrocītiem skaita mikrokodolus un nosaka polihromatisko un normohromatisko eritrocītu attiecību.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Testa vielas izšķīdina fizioloģiskajā šķīdumā. Ja tās nešķīst fizioloģiskajā šķīdumā, izmato piemērotu nesēju. Ja izmanto nesēju, tas nedrīkst reaģēt ar testa vielu un būt toksisks. Parasti izmanto tikko sagatavotu testa vielas šķīdumu.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Izmēģinājumu dzīvnieki*

Ieteicams izmantot peles, bet var izmantot arī citus zīdītājus. Veselus un jaunus pieaugušos dzīvniekus pēc nejaušības principa iedala apstrādes un kontroles grupās.

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits un dzimums*

Katrā izmēģinājumu un kontroles grupā jābūt vismaz pieciem katra dzimuma dzīvniekiem. Tātad ja izmēģinājumu plāns paredz vairākus pēcapstrādes testa termiņus, katrā termiņā izmanto 10 dzīvnieku grupu. Pozitīvās kontroles grupai ir pietiekama viena paraugu ņemšanas reize.

1.6.2.3. *Ievadīšanas veids*

Testa vielu parasti ievada tikai vienreiz. Atkarībā no toksikoloģijas datiem var veikt atkārtotu ievadīšanu. Tomēr atkārtotu ievadīšanu var veikt tikai tad, ja testa viela neiedarbojas citotoksiski uz kaula smadzeņu šūnām. Parasti vielas ievada perorāli vai intraperitoniāli. Var izmantot arī citus ievadīšanas veidus.

1.6.2.4. *Negatīvā un pozitīvā kontrole*

Katrā izmēģinājumā jāizmanto pozitīvā un negatīvā (ar šķīdinātāju) kontrole.

1.6.2.5. *Devu līmeņi*

Pamatizmēģinājumā izmanto vienu testa vielas devu, kas atbilst maksimāli pieļaujamai devai vai devai, kura ir nedaudz citotoksiska, piemēram, maina polihromatisko un normohromatisko eritrocītu attiecību.

Netoksiskiem savienojumiem maksimālā (robežas) deva, kas ir jāizpēta pēc vienas devas ievadīšanas, ir 2000 mg/kg ķermeņa svara.

Ja izmanto atkārtotās devas testa plānu, robeždeva ir 1000 mg/kg ķermeņa svara dienā.

Var izmantot papildu devas, ja to var zinātniski pamatot.

Ja izmēģinājumu veic pārbaudes nolūkā, jābūt vismaz divām papildu devām.

1.6.3. **Procedūra**

Testu var veikt divējādi.

i) Testa vielu dzīvniekiem ievada vienreiz. Paraugi jāņem laikā, kad novēro maksimālo atbildes reakciju; tas ir atkarīgs no testa vielas. Tādēļ kaulu smadzeņu paraugus ņem vismaz divreiz, sākot ne agrāk par 12 stundām pēc ievadīšanas un beidzot ne vēlāk par 48 stundām.

   Ja izmanto papildu devas, paraugus ņem laikā, kad šūnas ir maksimāli jutīgas pret vielas iedarbību, vai, ja tas nav zināms, pēc 24 stundām.

ii) Ja farmakokinētikas un metabolisma izpētes dati liecina par labu atkārtotai ievadīšanai, vielu var ievadīt atkārtoti, un paraugus ņem ne agrāk par 12 stundām pēc pēdējās ievadīšanas.

Kaulu smadzeņu šūnu sagatavošana

Kaulu smadzeņu šūnas tikko nogalinātiem dzīvniekiem izskalo no abiem ciskas kauliem ar teļu embrionālo serumu. Šūnas nogulsnē centrifugējot un šķidro centrifugātu nolej. Viendabīgo šūnu suspensiju uzpilina uz priekšmetstikliņiem un gatavo uztriepi. Pēc žāvēšanas gaisā preparātus krāso.

Preparātu analīze

Pirms preparātu mikroskopiskās apskates tos kodē. Mikrokodolu sastopamību katram dzīvniekam nosaka, analizējot vismaz 1000 polihromatiskos eritrocītus.

Normohromatisko un polihromatisko eritrocītu attiecību katram dzīvniekam aprēķina, kopumā pārbaudot 1000 eritrocītu.

2. **IEGŪTIE DATI**

Datus apkopo tabulā. Tātad katram izmēģinājumu un kontroles dzīvniekam atsevišķi norāda polihromatisko eritrocītu skaitu, mikrokodolus saturošo polihromatisko eritrocītu skaitu un mikrokodolus saturošo šūnu procentuālo īpatsvaru, kā arī normohromatisko un polihromatisko eritrocītu attiecību. Tāpat katrai izmēģinājumu un kontroles grupai norāda vidējās vērtības un standartnovirzes. Uzskaitītos datus novērtē ar piemērotu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— izmantoto dzīvnieku suga, līnija un vecums,

— katra dzimuma dzīvnieku skaits izmēģinājumu un kontroles grupās,

— testa apstākļi – sīks ievadīšanas un paraugu ņemšanas grafika apraksts, izmantotās devas, toksicitātes dati, negatīvā un pozitīvā kontrole,

— mikrokodolu uzskaites kritēriji,

— ietekmes un devas sakarība, ja iespējams,

— toksicitātes pazīmes pētījuma gaitā,

— statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.13. MUTAGENITĀTE (ESCHERICHIA COLI — REVERSĀS MUTĀCIJAS TESTS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas C iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Escherichia coli triptofāna (trp) reversijas sistēma ir mikrobioloģisks tests, kas ļauj noteikt trp^- – trp^+ reversiju, ko izraisa ķīmiskas vielas un kuras pamatā ir izmaiņas organisma genomā.

Baktērijas pakļauj testa vielas iedarbībai ar metabolisko aktivāciju vai bez tās. Pēc attiecīgas inkubācijas minimālajā barotnē nosaka revertanto koloniju skaitu un salīdzina to ar spontāno revertantu skaitu neapstrādātajā kultūrā un/vai kontroles kultūrā ar šķīdinātāju.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

Veicot pārbaudi, var izmantot šādas metodes: 1) preinkubācijas metodi un 2) apvienotās plates metodi, kurā baktērijas un testa vielu sajauc augšējā slāņa agarā un ar to pārklāj selektīvā agara plati.

1.6.1. **Sagatavošana**

1.6.1.1. *Baktērijas*

Baktērijas inkubē 37 °C temperatūrā, līdz tās sasniedz eksponenciālo vai agrīno stacionāro vairošanās fāzi. Šūnu koncentrācijai jābūt ap 10^8 -10^9 šūnu mililitrā.

1.6.1.2. *Metaboliskā aktivācija*

Uz baktērijām iedarbojas ar testa vielu gan piemērotas metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Visbiežāk izmantotā sistēma ir postmitohondriālā frakcija ar kofaktoru, kas sagatavota no grauzēju aknām, kuras apstrādātas ar fermentus inducējošiem aģentiem.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Baktēriju celmi*

Izmantošanai der trīs baktēriju celmi – WP2, WP2 uvr A un WP2 uvr A pKM 101. Jāizmanto atzītas pamatkultūru kultivēšanas un uzglabāšanas metodes. Jāpārbauda baktēriju celmu prasības attiecībā uz barotnes sastāvu, to ģenētiskā identitāte un jutība pret UV starojumu vai mitomicīnu C, kā arī WP2 uvr A pKM 101 celma rezistence pret ampicilīnu. Baktēriju celmu spontāno revertantu biežumam jābūt paredzamajā svārstību intervālā.

1.6.2.2. *Barotnes*

Izmanto piemērotu selektīvo barotni mutantu augšanai un atlasei kopā ar vajadzīgo agara augšējo slāni.

1.6.2.3. *Negatīvā un pozitīvā kontrole*

Vienlaikus jābūt kontrolei bez apstrādes un kontrolei ar šķīdinātāju. Pozitīvā kontrole arī kalpo diviem mērķiem:

i) lai apstiprinātu, ka baktēriju celmi ir pietiekami jutīgi.

Izmēģinājumos bez metaboliskās aktivācijas kā pozitīvo kontroli var izmantot metilmetānsulfonātu, 4-nitrohinolīna oksīdu vai etilnitrozourīnvielu;

ii) lai pārliecinātos par attiecīgo metabolisko sistēmu aktivitāti.

Kā metaboliskās sistēmas aktivitātes pozitīvo kontroli visiem baktēriju celmiem izmanto 2-aminoantracēnu. Ja iespējams, kā pozitīvā kontrole jāizmanto ķīmiska viela no tās pašas klases, pie kuras pieder testa viela.

1.6.2.4. *Testa vielas daudzums uz vienu plati*

Jāizvēlas vismaz piecas dažādas testa vielas koncentrācijas ar puslogaritma intervālu. Vielas pārbauda līdz to šķīdības vai toksicitātes robežai. Par toksicitāti liecina spontāno revertantu skaita sarukšana, fona blīvuma samazināšanās vai apstrādāto kultūru izdzīvošanas līmenis. Netoksisku vielu koncentrācijai jābūt līdz 5 mg uz vienu plati, lai varētu uzskatīt, ka pārbaudes rezultāts ir negatīvs.

1.6.2.5. *Inkubācijas apstākļi*

Plates inkubē 48 līdz 72 stundas 37 °C temperatūrā.

1.6.3. **Procedūra**

Ja izmanto apvienotās plates metodi bez fermentu aktivācijas, augšējā slāņa agaram (2 ml) pievieno ķīmisko vielu un 0,1 ml svaigas baktēriju kultūras. Ja izmanto metabolisko aktivāciju, augšējā slāņa agaru pēc testa vielas un baktēriju pievienošanas vēl papildina ar 0,5 ml aknu fermentu aktivācijas maisījuma kopā ar pietiekamu daudzumu postmitohondriālās frakcijas. Katras mēģenes saturu samaisa un ar to pārklāj selektīvā agara plati. Augšējā slāņa agaram ļauj sarecēt un plates inkubē 37 °C temperatūrā 48 līdz 72 stundas. Beidzoties inkubācijas laikam, katrā platē saskaita revertantās kolonijas.

Ja izmanto priekšinkubācijas metodi, maisījumu, kas satur testa vielu, 0,1 ml svaigas baktērijas kultūras un vajadzīgo daudzumu aknu fermentu aktivācijas maisījuma vai tādu pašu bufera daudzumu, vēl iepriekš inkubē, pirms pievieno 2 ml augšējā slāņa agaru. Visas pārējās procedūras neatšķiras no apvienotās plates metodes.

Abas metodes paredz katru koncentrāciju pārbaudīt uz trim platēm.

2. **IEGŪTIE DATI**

Revertanto koloniju skaitu katrā platē norāda gan kontrolei, gan pēc apstrādes ar testa vielu. Revertanto koloniju skaits katrā atsevišķā platē, kā arī to vidējais skaits un standartnovirze jānorāda gan pēc apstrādes ar testa vielu, gan kontrolei.

Dati jāizvērtē ar piemērotām statistikas metodēm.

Izdara vismaz divus neatkarīgus eksperimentus. Nav nepieciešams otro eksperimentu izdarīt identiski sākotnējam eksperimentam. Īstenībā var būt vēlams mainīt dažus testa apstākļus, lai iegūtu noderīgākus datus.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— izmantotais baktēriju celms,

— testa apstākļi – izmantotās devas, toksicitāte, barotnes sastāvs; apstrādes procedūras (iepriekšēja inkubācija, inkubācija); metaboliskās aktivācijas sistēma; standartvielas, negatīvā kontrole,

— revertanto koloniju skaits katrā atsevišķā platē, to vidējais skaits, standartnovirze, devas un iedarbības sakarība, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

B.14. MUTAGENITĀTE (SALMONELLA TYPHIMURIUM — REVERSĀS MUTĀCIJAS TESTS)

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skat. Vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas C iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Salmonella typhimurium histidīna (his) reversijas sistēma ir mikrobioloģisks tests, kas ļauj noteikt *his* $^{-}$ – *his*$^{+}$ reversiju, ko izraisa ķīmiskas vielas un kuras pamatā ir bāzu nomaiņas vai fāzes nobīdes mutācijas organisma genomā.

Uz baktērijām iedarbojas ar testa vielu ar metabolisko aktivāciju vai bez tās un pēc tam inkubē minimālā barotnē. Pēc noteikta inkubācijas laika nosaka revertanto koloniju skaitu un salīdzina to ar spontāno revertantu skaitu neapstrādātajā kultūrā un/vai kontroles kultūrā ar šķīdinātāju.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

1.6.1.1. *Baktērijas*

Tikko sagatavotas baktēriju kultūras inkubē 37 °C temperatūrā, līdz tās sasniedz vēlīno eksponenciālo vai agrīno stacionāro vairošanās fāzi. Šūnu koncentrācijai jābūt ap 10^{8} līdz 10^{9} šūnu mililitrā.

1.6.1.2. *Metaboliskā aktivācija*

Uz baktērijām iedarbojas ar testa vielu gan piemērotas metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Visbiežāk izmantotā sistēma ir postmitohondriālā frakcija ar kofaktoru, kas sagatavota no grauzēju aknām, kuras apstrādātas ar fermentus inducējošiem aģentiem.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Baktēriju celmi*

Izmantošanai der vismaz četri baktēriju celmi – TA 1535, TA 1537 vai TA 97, TA 98 un TA 100; papildus ar izmantot citus celmus, tādus kā TA 1538 un TA 102. Jāizmanto atzītas pamatkultūru kultivēšanas un uzglabāšanas metodes. Jāpārbauda baktēriju celmu prasības attiecībā uz barotnes sastāvu un to ģenētiskā identitāte, kā arī jutība pret UV starojumu un kristālvioleto un rezistence pret ampicilīnu. Baktēriju celmu spontāno revertantu biežumam jābūt paredzamajā svārstību intervālā.

1.6.2.2. *Barotnes*

Izmanto piemērotu selektīvo barotni kopā ar vajadzīgo augšējā slāņa agaru.

1.6.2.3. *Negatīvā un pozitīvā kontrole*

Vienlaikus jābūt kontrolei bez apstrādes un kontrolei ar šķīdinātāju. Pozitīvā kontrole arī kalpo diviem mērķiem:

i) lai apstiprinātu, ka baktēriju celmi ir pietiekami jutīgi.

Testos bez metaboliskās aktivācijas var izmantot šādus savienojumus.

Baktēriju celms	Reversiju izraisa
TA 1535, TA 100	nātrija azīds
TA 1538, TA 98, TA 97	2-nitrofluorēns
TA 1537	9-aminoakridīns
TA 102	kumola hidroperoksīds

ii) lai pārliecinātos par attiecīgo metabolisko sistēmu aktivitāti.

Kā pozitīvo kontroli metaboliskās sistēmas aktivitātei visiem baktēriju celmiem izmanto 2-aminoantracēnu. Ja iespējams, kā pozitīvo kontroli jāizmanto ķīmiska viela no tās pašas klases, pie kuras pieder testa viela.

1.6.2.4. *Testa vielas daudzums uz vienu plati*

Jāizvēlas vismaz piecas dažādas testa vielas koncentrācijas ar puslogaritma intervālu. Vielas pārbauda līdz to šķīdības vai toksicitātes robežai. Par toksicitāti liecina spontāno revertantu skaita sarukšana, fona blīvuma samazināšanās vai apstrādāto kultūru izdzīvošanas līmenis. Netoksisku vielu koncentrācijai jābūt līdz 5 mg uz vienu plati, lai varētu uzskatīt, ka pārbaudes rezultāts ir negatīvs.

1.6.2.5. *Inkubācijas apstākļi*

Plates inkubē 48 līdz 72 stundas 37 °C temperatūrā.

1.6.3. **Procedūra**

Ja izmanto apvienotās plates metodi bez fermentu aktivācijas, 2 ml augšējā slāņa agaram pievieno testa vielu un 0,1 ml tikko sagatavotas baktēriju kultūras. Ja veic metabolisko aktivāciju, augšējā slāņa agaru pēc testa vielas un baktēriju pievienošanas vēl papildina ar 0,5 ml aknu fermentu aktivācijas maisījuma, kas satur postmitohondriālo frakciju pietiekamā daudzumā. Katras mēģenes saturu samaisa un ar to pārklāj selektīvā agara plati. Augšējā slāņa agaram ļauj sarecēt un plates inkubē 37 °C temperatūrā 48 līdz 72 stundas. Beidzoties inkubācijas laikam, katrā platē saskaita revertantās kolonijas. Ja izmanto priekšinkubācijas metodi, maisījumu, kas satur testa vielu, svaigu baktēriju kultūru (0,1 ml) un vajadzīgo daudzumu aknu fermentu aktivācijas maisījuma vai tādu pašu bufera daudzumu, vēl iepriekš inkubē, pirms pievieno 2 ml augšējā slāņa agara. Visas pārējās procedūras neatšķiras no apvienotās plates metodes.

Abas metodes paredz katru koncentrāciju pārbaudīt uz trim platēm.

2. **IEGŪTIE DATI**

Revertanto koloniju skaitu katrā platē norāda gan kontrolei, gan pēc apstrādes ar testa vielu.

Revertanto koloniju skaits katrā atsevišķā platē, kā arī to vidējais skaits un standartnovirze jānorāda gan pēc apstrādes ar testa vielu, gan kontrolei.

Dati jāizvērtē ar piemērotām statistikas metodēm.

Izdara vismaz divus neatkarīgus eksperimentus. Nav nepieciešams otro eksperimentu izdarīt identiski sākotnējam eksperimentam. Īstenībā var būt vēlams mainīt dažus testa apstākļus, lai iegūtu noderīgākus datus.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— izmantotais baktēriju celms,

— testa apstākļi – devu līmeņi, toksicitāte, barotnes sastāvs, apstrādes procedūras (priekšinkubācija, inkubācija), metaboliskās aktivācijas sistēma, standartvielas, negatīvā kontrole,

— revertanto koloniju skaits katrā atsevišķā platē, to vidējais skaits, standartnovirze, devas un iedarbības sakarība, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skat. Vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. Vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

C DAĻA METODES EKOTOKSICITĀTES NOTEIKŠANAI

C.1. AKŪTĀ TOKSICITĀTE ZIVĪM

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Šā testa nolūks ir noteikt vielas akūto letālo toksicitāti zivīm saldūdenī. Iespēju robežās ir jānodrošinās ar datiem par testa vielas šķīdību ūdenī, tvaika spiedienu, ķīmisko noturīgumu, disociācijas konstantēm un biosadalīšanos, kas var palīdzēt izvēlēties vispiemērotāko (statisko, pusstatisko vai caurplūdes) testa metodi un panākt pietiekami nemainīgu testa vielas koncentrāciju testu laikā.

Cita informācija (piemēram, struktūrformula, tīrības pakāpe, galveno piemaisījumu īpašības un procentuālais īpatsvars, piedevu daudzums un sadalījuma koeficients sistēmā *n*-oktanols/ūdens) jāņem vērā, plānojot testus un analizējot iegūtos rezultātus.

1.2. DEFINĪCIJAS UN VIENĪBAS

Akūtā toksicitāte ir redzamā kaitīgā ietekme, kas izraisīta organismā pēc vielas īslaicīgas (dažu dienu) iedarbības. Šajā testā akūtā toksicitāte ir izteikta kā vidējā letālā koncentrācija (LC_{50}), kas atbilst tādai vielas koncentrācijai ūdenī, kura norādītajā ilgstošas iedarbības laikā izraisa 50 % zivju nāvi testa grupā.

Visas testa vielas koncentrācijas ir izteiktas kā svars tilpuma vienībā (miligrami litrā). Tās var izteikt arī kā svaru uz svara vienību ($mg.kg^{-1}$).

1.3. STANDARTVIELAS

Standartvielas izmantošana ļauj pārliecināties, ka pārbaudāmās sugas reakcija laboratorijas testa apstākļos nav būtiski mainījusies.

Šim testam standartvielas vēl nav noteiktas.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Pieļaujamības testu var izdarīt ar koncentrāciju 100 mg litrā, lai parādītu, ka LC_{50} ir lielāks par minēto koncentrāciju.

Uz zivīm 96 stundas iedarbojas ar testa vielu, kas pievienota ūdenim koncentrāciju diapazonā. Vismaz ik pēc 24 stundām reģistrē zivju mirstību un, ja iespējams, aprēķina koncentrāciju, kas izraisa 50 % zivju nāvi (LC_{50}) katrā novērošanas termiņā.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Kvalitātes kritērijus piemēro pieļaujamības testam, kā arī visai testa metodei.

Kontroles grupas mirstība testa beigās nedrīkst pārsniegt 10 % (vai vienu zivi, ja izmanto mazāk par desmit zivīm).

Izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visu laiku jābūt lielākai par 60 % no gaisa piesātinājuma koncentrācijas.

Testa vielas koncentrācijas visā testa laikā saglabā 80 % robežās no sākuma koncentrācijas.

Vielām, kas viegli šķīst testa vidē, veidojot stabilus šķīdumus, t.i., tādus, kas nekādā jūtamā veidā neiztvaiko, nenoārdās, nehidrolizējas vai neadsorbējas, sākuma koncentrāciju var uzskatīt par vienādu ar nominālo koncentrāciju. Jāsniedz dati, ka koncentrācija ir saglabāta visā testa laikā un ka kvalitātes kritēriji ir izpildīti.

Vielām, kas

i) slikti šķīst testa vidē;

ii) spēj veidot stabilas emulsijas vai dispersijas vai

iii) nav stabilas ūdens šķīdumos,

par sākuma koncentrāciju pieņem šķīdumā izmērīto koncentrāciju (vai, ja tas tehniski ir iespējams, ūdens kolonnā izmērīto koncentrāciju) testa sākumā. Koncentrāciju nosaka pēc līdzsvara sasniegšanas laika posma, bet pirms testa zivju ielaišanas.

Katrā no šiem gadījumiem testa laikā jāizdara turpmāki mērījumi, lai apstiprinātu faktiskās iedarbīgās koncentrācijas vai atbilstību kvalitātes kritērijiem.

pH nedrīkst atšķirties vairāk par 1 vienību.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

Var izmantot trīs dažādas procedūras.

Statiskais tests

Toksicitātes tests, kurā nav testa šķīduma plūsmas. (Šķīdumi paliek nemainīti visā testa laikā.)

Pusstatiskais tests

Testa laikā šķīduma plūsma netiek nodrošināta, bet ilgākā laika posmā (piemēram, pēc 24 stundām) testa šķīdumu periodiski apmaina.

Tests caurplūdes apstākļos

Toksicitāti nosaka testa kamerās, kurās pastāvīgi atjauno ūdeni, un testa vielu pievieno ūdenim, ar kuru atjauno testa vidi.

1.6.1. **Reaģenti**

1.6.1.1. *Testa vielu šķīdumi*

Vajadzīgās koncentrācijas izejas standartšķīdumus gatavo, izšķīdinot vielu dejonizētā ūdenī vai ūdenī, kas iegūts saskaņā ar 1.6.1.2. punktu.

Testam vajadzīgo koncentrāciju iegūst, atšķaidot izejas standartšķīdumu. Ja pārbauda lielāku koncentrāciju, vielu var izšķīdināt tieši ūdenī, ko lieto atšķaidīšanai.

Vielas parasti jāpārbauda tikai līdz šķīdības robežai. Attiecībā uz dažām vielām (piem., vielām, kam ir maza šķīdība ūdenī vai liels P_{ow}, vai tām, kas ūdenī veido drīzāk stabilu dispersiju nekā īstu šķīdumu) ir pieņemams testa koncentrāciju palielināt virs vielas šķīdības robežas, lai nodrošinātu, ka ir iegūta maksimālās šķīdības koncentrācija/maksimālā stabilā koncentrācija. Tomēr ir svarīgi, lai minētā koncentrācija citādi neizjauktu testa sistēmu (piem., vielas plēve uz ūdens virsmas, kas kavē ūdens piesātināšanu ar skābekli, utt.).

Kā palīglīdzekli ūdenī slikti šķīstošu vielu izejas standartšķīdumu pagatavošanai vai minēto vielu disperģēšanai testa vidē var izmantot dispersiju ar ultraskaņu, organiskos šķīdinātājus, emulgatorus vai disperģētājus. Ja izmanto tādas palīgvielas, visām testa koncentrācijām jāsatur viens un tas pats palīgvielas daudzums, un papildu kontroles zivs ir jāpakļauj tādai pašai palīgvielas koncentrācijai, kādu izmanto testa sērijā. Palīgvielu koncentrācijai jābūt iespējami mazai, un nekādā ziņā tā nedrīkst pārsniegt 100 mg litrā testa vides.

Tests jāveic bez pH korekcijas. Ja novēro krasas pH izmaiņas, testu ieteicams atkārtot, veicot pH korekciju, un rezultāti jāprotokolē. Šajā gadījumā izejas standartšķīduma pH koriģē līdz pH līmenim, kāds ir ūdenim, ko izmanto atšķaidīšanai, ja nav īpašu iemeslu rīkoties citādi. Šim nolūkam vēlams izmantot HCl un NaOH. pH līmenis jākoriģē tā, lai būtiski neietekmētu testa vielas koncentrāciju izejas standartšķīdumā. Ja šāda korekcija izraisa ķīmisku reakciju vai testa vielas nogulsnēšanos, tas jāreģistrē.

1.6.1.2. *Ūdens atšķaidīšanai un zivju turēšanai*

Var izmantot dzeramo ūdeni (kas nesatur hloru, smagos metālus vai citas nevēlamas vielas bīstamā koncentrācijā), labas kvalitātes dabīgo ūdeni vai "atjaunotu" ūdeni (skat. 1. papildinājumu). Ieteicams izmantot ūdeni, kura kopējā cietība ir 10 līdz 250 mg/l (pēc $CaCO_3$) un pH līmenis 6,0-8,5.

1.6.2. **Aprīkojums**

Visam aprīkojumam jābūt no ķīmiski inerta materiāla:

— automātiskā atšķaidīšanas iekārta (caurplūdes testam),

— skābekļa mērītājs,

— iekārta ūdens cietības noteikšanai,

— piemērota temperatūras regulēšanas ierīce,

— pH metrs.

1.6.3. **Testa zivis**

Zivis nedrīkst būt slimas vai ar izteiktām kroplības pazīmēm.

Izmantojamā suga jāizvēlas, pamatojoties uz praktiskiem kritērijiem, tādiem kā viegla pieejamība visu gadu, turēšanas vieglums, ērtums testēšanai, relatīvā jutība pret ķīmiskām vielām un ekonomiskie, bioloģiskie vai ekoloģiskie faktori, kas uz to attiecas. Izvēloties zivju sugu, ir jāņem vērā arī iegūto datu salīdzināmība un esošā starptautiskā saskaņošana (1. norāde).

Šā testa veikšanai ieteicamo zivju sugu saraksts ir norādīts 2. papildinājumā; ieteicamākās sugas ir Danio zebraszivs un varavīksnes forele.

1.6.3.1. *Turēšanas apstākļi*

Ieteicams izmantot līdzīga garuma un vecuma zivis no viena sūtījuma. Vismaz 12 dienas zivis tur šeit norādītajos apstākļos.

Zivju daudzums —

atkarībā no izmantotās sistēmas (recirkulācija vai caurplūde) un zivju sugas.

Ūdens —

skat. 1.6.1.2. punktu.

Apgaismojums —

ikdienas apgaismojums 12 līdz 16 stundas.

Skābekļa koncentrācija ūdenī —

vismaz 80 % no gaisa piesātinājuma koncentrācijas.

Barošana —

trīsreiz nedēļā vai katru dienu, to pārtrauc 24 stundas pirms testa.

1.6.3.2. *Mirstība*

Beidzoties 48 stundu pierašanas laikam, reģistrē mirstību, ievērojot šādus kritērijus:

— lielāka par 10 % no populācijas septiņās dienās —

izbrāķē visu partiju,

— 5 līdz 10 % no populācijas —

turēšanas laiku turpina septiņas papildu dienas. Ja turpmāk mirstības gadījumus nenovēro, partija der izmēģinājumiem, pretējā gadījumā to izbrāķē;

— mazāk par 5 % no populācijas —

partiju pieņem.

1.6.4. **Pielāgošanās**

Vismaz 7 dienas pirms testa visas zivis jātur tādas pašas kvalitātes un temperatūras ūdenī, kādu izmantos pārbaudes laikā.

1.6.5. **Testa procedūra**

Pirms testa uzsākšanas var veikt priekšizmēģinājumu, lai noskaidrotu, kāds koncentrācijas diapazons būtu izmantojams testa laikā.

Papildus testa sērijai izdara vienu kontroles izmēģinājumu bez testa vielas un attiecīgā gadījumā vienu kontroles izmēģinājumu ar palīgvielu.

Atkarībā no testa vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām attiecīgi izvēlas statisko, pusstatisko vai caurplūdes modeli, lai atbilstu kvalitātes kritērijiem.

Zivis pakļauj vielas iedarbībai, ievērojot šādus nosacījumus:

— ilgums — 96 stundas,

— dzīvnieku skaits — vismaz 7 uz katru vielas koncentrāciju,

— rezervuāri — kuru tilpums atbilst ieteiktajam zivju skaitam,

— zivju daudzums — maksimālais ieteicamais zivju daudzums statiskos un pusstatiskos testos ir 1g litrā; caurplūdes sistēmās ir pieņemams lielāks zivju daudzums,

— testa koncentrācija — vismaz piecas koncentrācijas, kas atšķiras ar nemainīgu koeficientu, ne lielāku par 2,2, un kas cik iespējams ietver diapazonu no 0 līdz 100 % mirstībai,

— ūdens — skat. 1.6.1.2. punktu,

— apgaismojums — ikdienas apgaismojums 12 līdz 16 stundas,

— temperatūra — atkarībā no zivju sugas (2. papildinājums), bet kuras svārstības testa laikā nepārsniedz ±1 °C,

— skābekļa koncentrācija ūdenī — vismaz 60 % no gaisa piesātinājuma koncentrācijas izvēlētajā temperatūrā,

— barošana — nebaro.

Zivis pirmoreiz apskata pēc 2-4 stundām un vēlāk vismaz ik pēc 24 stundām. Uzskata, ka zivs ir nedzīva, ja, pieskaroties tās astei, tā neizrāda nekādu reakciju un elpošanas kustības. Pamanītas nedzīvas zivis izņem un reģistrē to nāvi.

Reģistrē arī citas redzamas anomālijas (piemēram, līdzsvara zudumu, peldēšanas, elpošanas, pigmentācijas izmaiņas u.tml.).

Katru dienu veic pH, ūdenī izšķīdušā skābekļa un temperatūras mērījumus.

Pieļaujamības tests

Izmantojot šajā testa metodē aprakstītās procedūras, pieļaujamības testu var izdarīt ar koncentrāciju 100 mg litrā, lai parādītu, ka LC_{50} ir lielāks par minēto koncentrāciju.

Ja vielas īpašības ir tādas, ka koncentrāciju 100 mg litrā ūdens nevar iegūt, pieļaujamības tests jāveic pie koncentrācijas, kas ir vienāda ar vielas šķīdību (vai pie maksimālās koncentrācijas, kurā veidojas stabila dispersija) izmantotajā vidē (sk. arī 1.6.1.1. punktu).

Pieļaujamības tests jāveic, izmantojot 7 līdz 10 zivis, ar tādu pašu kontroles zivju skaitu. (Binomiālā teorija nosaka, ka, izmantojot 10 zivis, pie nulles mirstības ir 99,9 % ticamība, ka LC_{50} ir lielāks par pieļaujamības testā izmantoto koncentrāciju. Izmantojot 7, 8 vai 9 zivis, nulles mirstība sniedz vismaz 99 % ticamību, ka LC_{50} ir lielāks par izmantoto koncentrāciju.

Ja mirstība pastāv, ir jāizdara pilns pētījums. Ja ir novērotas subletālas ietekmes, tās ir jāreģistrē.

2. DATI UN TO IZVĒRTĒŠANA

Par katru laika posmu, kad ir reģistrēti novērojumi (24, 48, 72 un 96 stundas), mirstību, kas izteikta procentos katrā ieteicamajā iedarbības laika posmā, atliek pret koncentrāciju logaritmiskajā/varbūtības diagrammā.

Ja ir iespējams, izmantojot standarta procedūras, katram novērošanas laikam ir jānovērtē LC_{50} un ticamības robežas ($p = 0,05$); šie lielumi jānoapaļo līdz vienam vai, lielākais, līdz diviem nozīmīgiem cipariem (noapaļošanas līdz diviem cipariem piemēri: 173,5 noapaļo līdz 170; 0,127 noapaļo līdz 0,13; 1,21 noapaļo līdz 1,2).

Ja koncentrācijas/atbildes reakcijas procentu līkne ir pārāk stāva, lai aprēķinātu LC_{50} vērtību, pietiek ar tās grafiski iegūto aptuveno vērtību.

Ja divas secīgas koncentrācijas, kas viena no otras atšķiras 2,2 reizes, izraisa tikai 0 un 100 % mirstību, ar to pietiek, lai norādītu diapazonu, kurā ietilpst LC_{50}.

Ja ir novērots, ka nevar nodrošināt testa vielas stabilitāti vai viendabīgumu, tas jāreģistrē un jāievēro piesardzība, interpretējot rezultātus.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— dati par testa zivīm (zinātniskais nosaukums, līnija, piegādātājs, pirmapstrāde, izmēri un skaits katrai testa koncentrācijai),

— norāde, kur ņem ūdeni atšķaidīšanai, un tā galvenās ķīmiskās īpašības (pH, cietība, temperatūra),

— ja viela slikti šķīst ūdenī, izejas standartšķīduma un testā izmantoto šķīdumu sagatavošanas paņēmiens,

— palīgvielu koncentrācija,

— izmantoto koncentrāciju saraksts un jebkuri pieejamie dati par testa vielas stabilitāti pārbaudāmajā koncentrācijā,

— ja veic ķīmiskās analīzes, izmantotās metodes un rezultāti,

— pieļaujamības testa rezultāti, ja tāds izdarīts,

— izvēlētās testa procedūras pamatojums un apraksts (piemēram, statiskā vai pusstatiskā metode, dozēšanas ātrums, caurplūdes ātrums, aerācijas nodrošinājums, zivju daudzums utt.),

— aprīkojuma apraksts,

— apgaismojuma režīms,

— skābekļa koncentrācija ūdenī, testā izmantoto šķīdumu pH vērtība un temperatūra ik pēc 24 stundām,

— kvalitātes kritēriju izpildes pierādījums,

— tabula, kurā parādīta kumulatīvā mirstība katrā koncentrācijā un kontroles grupā (un kontroles grupā ar palīgvielu, ja tā vajadzīga) katrā no ieteiktajiem novērošanas laikiem,

— testa beigās iegūtās koncentrācijas/atbildes reakcijas līknes grafiskais attēls,

— LC_{50} katrā ieteiktajā novērošanas termiņā (norādot 95 % ticamības robežas), ja iespējams,

— statistikas metodes LC_{50} noteikšanai,

— rezultāti, kas iegūti ar standartvielu, ja tādu izmanto,

— lielākā testa koncentrācija, kas neizraisa mirstību testa laikā,

— mazākā testa koncentrācija, kas izraisa 100 % mirstību testa laikā.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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 fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.*

6) *DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).*

7) *JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.*

8) *NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van Poecilia reticulata, 1980.*

9) *Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.*

10) *Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.*

11) *Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.*

12) *Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.*

13) *Commission of the European Communities,Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.*

14) *Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.*

15) *Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.*

16) *Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.*

17) *Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.*

18) *Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.*

19) *Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.*

20) *Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.*

I papildinājums

Atjaunotais ūdens

Atšķaidīšanai piemērots ūdens (paraugs)

Visām ķīmiskajām vielām jābūt analītiski tīrām.

Jāizmanto ļoti kvalitatīvs destilēts vai dejonizēts ūdens, kura vadītspēja ir zemāka par 5µScm^{-1}.

Ūdens destilācijas aparāts nedrīkst saturēt vara detaļas.

Pamatšķīdumi

$CaCl_2$. $2H_2O$ (kalcija hlorīda dihidrāts) izšķīdina ūdenī, lai kopējais tilpums būtu 1 litrs.	11,76 g
$MgSO_4$. $7H_2O$ (magnija sulfāta heptahidrāts) izšķīdina ūdenī, lai kopējais tilpums būtu 1 litrs.	4,93 g
$NaHCO_3$ (nātrija hidrogēnkarbonāts) izšķīdina ūdenī, lai kopējais tilpums būtu 1 litrs.	2,59 g
KCl (kālija hlorīds) izšķīdina ūdenī, lai kopējais tilpums būtu 1 litrs.	0,23 g

Atjaunotais ūdens atšķaidīšanai

No visiem četriem izejas standartšķīdumiem ņem pa 25 ml, sajauc kopā un pievieno ūdeni līdz 1 litram.

Veic aerāciju, līdz skābekļa koncentrācija ūdenī sasniedz gaisa piesātinājuma līmeni.

pH līmenim jābūt 7,8 ± 0,2.

Vajadzības gadījumā pH līmeni koriģē ar NaOH (nātrija hidroksīds) vai HCl (sālsskābe).

Šādi iegūto ūdeni atšķaidīšanai atstāj apmēram uz 12 stundām, aerācija vairs nav vajadzīga.

Kopējā Ca un Mg jonu koncentrācija šķīdumā ir 2,5 mmol/l. Ca:Mg jonu attiecība ir 4:1, un Na:K jonu attiecība ir 10:1. Šā šķīduma kopējā sārmainība ir 0,8 mmol litrā.

Gatavojot ūdeni atšķaidīšanai, atkāpes no metodikas ir pieļaujamas, ja tās neietekmē ūdens sastāvu un īpašības.

2. papildinājums

Ieteicamās zivju sugas

Ieteicamās sugas	Ieteicamais temperatūru diapazons (°C)	Ieteicamais kopējais testa dzīvnieka garums
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton — Buchanan) Danio zebraszivs	20 līdz 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), melnā platgalve	20 līdz 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), parastā karpa	20 līdz 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlegel 1850), Japānas orīzija	20 līdz 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), gupija	20 līdz 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) zilais saulesasaris	20 līdz 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988), varavīksnes forele	12 līdz 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (*Linneaus 1758*), ālants, šķaunacis	20 līdz 24	6,0 ± 2,0

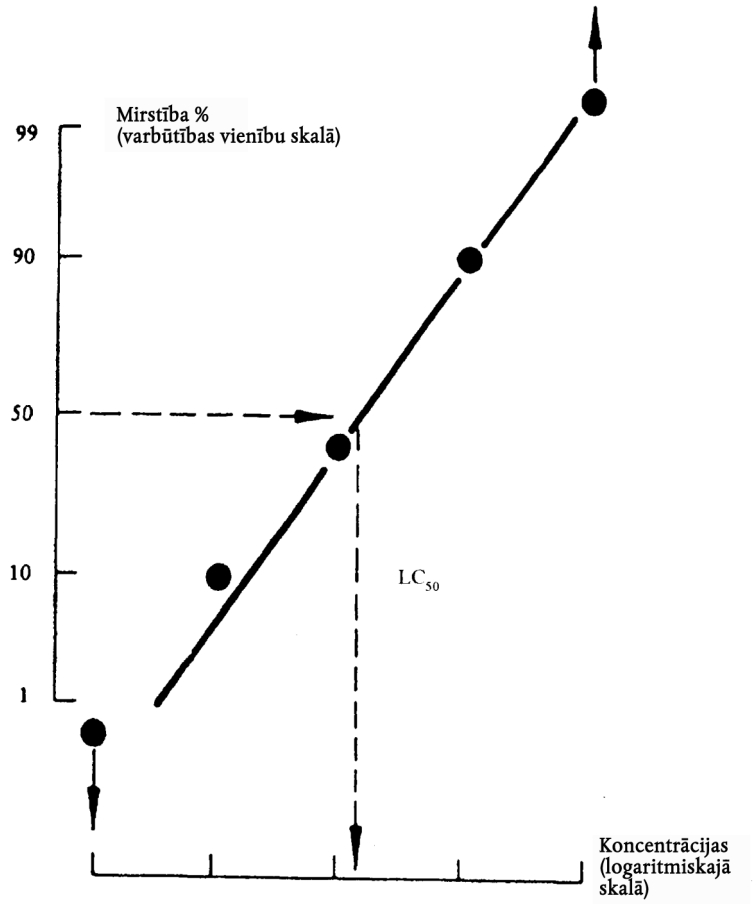
Zivju iegūšana

Iepriekš minētās zivis ir viegli audzējamas un plaši pieejamas visu gadu. Tās var pavairot un audzēt zivjaudzētavās vai laboratorijās, kas ļauj tās pasargāt no slimībām un parazītiem, tādējādi iegūstot veselas zivis, kuru izcelsme ir zināma. Šīs zivis pieejamas daudzās pasaules vietās.

3. papildinājums

Koncentrācijas piemērs — mirstības procentuālais īpatsvars

LC_{50} noteikšanas piemērs, izmantojot logaritmisko/varbūtības vienību diagrammu



C.2. AKŪTĀ TOKSICITĀTE DAFNIJĀM

1. METODE

1.1. IEVADS

Testa nolūks ir noteikt vielas dafniju imobilizācijas vidējo efektīvo koncentrāciju (EC_{50}) ūdenī. Pirms testa uzsākšanas iespēju robežās jābūt pieejamiem datiem par testa vielas šķīdību ūdenī, tvaika spiedienu, disociācijas konstantēm un biosadalīšanos.

Cita informācija (piemēram, struktūrformula, tīrības pakāpe, galveno piemaisījumu īpašības un procentuālais īpatsvars, piedevu daudzums, ja tādas izmanto, un sadalījuma koeficients sistēmā *n*-oktanols/ūdens) jāņem vērā, plānojot testus un analizējot iegūtos rezultātus.

1.2. DEFINĪCIJAS UN VIENĪBAS

Uzskata, ka direktīvā ietvertā prasība attiecībā uz LC_{50} dafnijām ir izpildīta, ja EC_{50} nosaka saskaņā ar šo testa metodi.

Šajā testā akūto toksicitāti raksturo imobilizācijas vidējā efektīvā koncentrācija (EC_{50}). Tā ir koncentrācija, izteikta kā sākotnējie lielumi, kas noteiktā laika posmā imobilizē 50 % dafniju testa partijā.

Imobilizācija

Uzskata, ka dafnijas ir nekustīgas, ja 15 sekunžu laikā pēc testa trauka vieglas sakratīšanas tās nesāk peldēt.

Visas testa vielas koncentrācijas ir izteiktas kā svars tilpuma vienībā (miligrami litrā). Tās var izteikt arī kā svaru uz svara vienību ($mg.kg^{-1}$).

1.3. STANDARTVIELAS

Standartvielas izmantošana ļauj pārliecināties, ka pārbaudāmās sugas jutība nav būtiski mainījusies laboratorijas testa apstākļos.

EEK gredzena testa kopsavilkums, kurā izmantotas četras dažādas vielas, ir 2. papildinājumā.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Pieļaujamības testu var izdarīt ar koncentrāciju 100 mg litrā, lai parādītu, ka EC_{50} ir lielāks par minēto koncentrāciju.

Uz dafnijām 48 stundas iedarbojas ar testa vielu, kas pievienota ūdenim koncentrāciju diapazonā. Ja izmanto mazāku testa laiku, testa ziņojumā jādod pamatojums.

Ja testa vielu pievieno vajadzīgajā koncentrācijas diapazonā, un pārējie testa apstākļi paliek nemainīgi, testa viela dažādās koncentrācijās dažādi ietekmē dafniju peldētspēju. Testa beigās dažādu koncentrāciju ietekmē peldētspēju zaudē procentuāli dažāds dafniju daudzums. Koncentrācijas, kas izraisa nulles vai 100 % imobilizāciju, noskaidro tieši no testa novērojumiem, bet 48 stundu EC_{50}, ja iespējams, nosaka no aprēķiniem.

Šī metode balstās uz statisko modeli, tādējādi pārbaudāmie šķīdumi iedarbības laikā netiek atjaunoti.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Kvalitātes kritērijus piemēro pieļaujamības testam, kā arī visai testa metodei.

Testa beigās imobilizācija kontroles grupā nedrīkst skart vairāk kā 10 % dafniju.

Testa kontroles grupu dafnijas nedrīkst būt notvertas uz ūdens virsmas.

Ir vēlams, lai visā testa laikā izšķīdušā skābekļa koncentrācija testa traukos paliktu virs 3 mg l^{-1}. Tomēr nekādā ziņā izšķīdušā skābekļa koncentrācija nedrīkst samazināties zem 2 mg l^{-1}.

Testa vielas koncentrācijas visā testa laikā saglabā 80 % robežās no sākuma koncentrācijas.

Vielām, kas viegli šķīst testa vidē, veidojot stabilus šķīdumus, t.i., tādus, kas nekādā jūtamā veidā neiztvaiko, nenoārdās, nehidrolizējas vai neadsorbējas, sākuma koncentrāciju var uzskatīt par vienādu ar nominālo koncentrāciju. Jāsniedz dati, ka koncentrācija ir saglabāta visā testa laikā un ka kvalitātes kritēriji ir izpildīti.

Vielām, kas

i) slikti šķīst testa vidē;

ii) spēj veidot stabilas emulsijas vai dispersijas vai

iii) nav stabilas ūdens šķīdumos,

par sākuma koncentrāciju pieņem šķīdumā izmērīto koncentrāciju (vai, ja tas tehniski ir iespējams, ūdens kolonnā izmērīto koncentrāciju) testa sākumā. Koncentrāciju nosaka pēc līdzsvara sasniegšanas laika posma, bet pirms testa organismu ielaišanas.

Katrā no šiem gadījumiem testa laikā jāizdara turpmāki mērījumi, lai apstiprinātu faktiskās iedarbīgās koncentrācijas vai atbilstību kvalitātes kritērijiem.

pH nedrīkst atšķirties vairāk par 1 vienību.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Reaģenti**

1.6.1.1. *Testa vielu šķīdumi*

Vajadzīgās koncentrācijas izejas standartšķīdumus gatavo, izšķīdinot vielu dejonizētā ūdenī vai ūdenī, kas iegūts saskaņā ar 1.6.1.2. punktu.

Izraudzīto testa koncentrāciju iegūst, atšķaidot izejas standartšķīdumu. Ja pārbauda lielāku koncentrāciju, vielu var izšķīdināt tieši ūdenī, ko lieto atšķaidīšanai.

Vielas parasti jāpārbauda tikai līdz šķīdības robežai. Attiecībā uz dažām vielām (piem., vielām, kam ir maza šķīdība ūdenī vai liels P_{ow}, vai tām, kas ūdenī veido drīzāk stabilu dispersiju nekā īstu šķīdumu) ir pieņemams testa koncentrāciju palielināt virs vielas šķīdības robežas, lai nodrošinātu, ka ir iegūta maksimālās šķīdības koncentrācija/maksimālā stabilā koncentrācija. Tomēr ir svarīgi, lai minētā koncentrācija citādi neizjauktu testa sistēmu (piem., vielas plēve uz ūdens virsmas, kas kavē ūdens piesātināšanu ar skābekli, utt.).

Kā palīglīdzekli ūdenī slikti šķīstošu vielu izejas standartšķīdumu pagatavošanai vai minēto vielu disperģēšanai testa vidē var izmantot dispersiju ar ultraskaņu, organiskos šķīdinātājus, emulgatorus vai disperģētājus. Ja izmanto tādas palīgvielas, visām testa koncentrācijām jāsatur viens un tas pats palīgvielas daudzums, un papildu kontroles dafnijas jāpakļauj tādai pašai palīgvielas koncentrācijai, kādu izmanto testa sērijā. Palīgvielu koncentrācijai jābūt iespējami mazai, un nekādā ziņā tā nedrīkst pārsniegt 100 mg litrā testa vides.

Pārbaude jāveic bez pH korekcijas. Ja novēro krasas pH izmaiņas, testu ieteicams atkārtot, veicot pH korekciju, un rezultāti jāprotokolē. Šajā gadījumā izejas standartšķīduma pH līmeni koriģē līdz pH līmenim, kāds ir ūdenim, ko izmanto atšķaidīšanai, ja nav iemesla rīkoties citādi. Šim nolūkam vēlams izmantot HCl un NaOH. pH līmeni koriģē tā, lai būtiski neietekmētu testa vielas koncentrāciju izejas standartšķīdumā. Ja šāda korekcija izraisa ķīmisku reakciju vai testa vielas nogulsnēšanos, tas jāieraksta protokolā.

1.6.1.2. *Testa ūdens*

Šajā testā izmanto atjaunoto ūdeni (sk 1. papildinājumu un 2. norādi: *ISO* 6341). Lai dafnijas nebūtu jāpieradina pirms testa, to kultivēšanai jāizmanto tādas pašas kvalitātes ūdens, kādu izmanto testa laikā.

1.6.2. **Aprīkojums**

Jāizmanto parastās laboratorijas iekārtas un aprīkojums. Iekārtām, kas nonāk saskarē ar testa vielas šķīdumiem, jābūt pilnībā izgatavotām no stikla:

— skābekļa mērierīce (ar mikroelektrodu vai cita ierīce skābekļa koncentrācijas noteikšanai maza tilpuma paraugos),

— piemērota temperatūras regulēšanas ierīce,

— pH metrs,

— ierīce ūdens cietības noteikšanai.

1.6.3. **Testa organismi**

Vēlamā testa suga ir *Daphnia magna,* kaut arī atļauta ir arī *Daphnia pulex*. Testa dzīvniekiem testa sākumā jābūt jaunākiem par 24 stundām, laboratorijā audzētiem, bez atklātām slimībām un ar zināmu vēsturi (piem., audzēšanu — iepriekšējām apstrādēm utt.).

1.6.4. **Testa procedūra**

Pirms uzsāk testu, var veikt priekšizmēģinājumu, lai noskaidrotu, kādu koncentrācijas diapazonu izmantot testa laikā.

Papildus testa sērijai izdara vienu kontroles izmēģinājumu bez testa vielas un attiecīgā gadījumā vienu kontroles izmēģinājumu ar palīgvielu.

Dafnijas pakļauj vielas iedarbībai, ievērojot šādus nosacījumus:

— *ilgums:* vēlams 48 stundas,

— *dzīvnieku skaits:* katru testa vielas koncentrāciju pārbauda vismaz ar 20 dzīvniekiem, sadalot tos četrās (5 dzīvnieki katrā) vai divās (10 dzīvnieku katrā) grupās,

— *daudzums:* katram dzīvniekam nodrošina vismaz 2 ml testa šķīduma,

— *testa koncentrācija:* testa šķīdumu gatavo tieši pirms dafniju ielaišanas tajā, kā šķīdinātāju vēlams izmantot tikai ūdeni. Vielas koncentrācijas veido ģeometrisku secību ar koeficientu 2,2. Kopā ar kontroles grupu jāpārbauda koncentrācijas, kas pēc 48 stundu iedarbības spēj izraisīt 0 un 100 % imobilizāciju, kā arī citas koncentrācijas šajā diapazonā, kuras ļauj aprēķināt EC_{50} pēc 48 stundu iedarbības,

— *ūdens:* skat. 1.6.1.2. punktu,

— *apgaismojums:* optimāls ir gaismas-tumsas cikls,

— *temperatūra:* testu veic 18-22 °C temperatūrā, bet tās svārstības testa laikā nedrīkst pārsniegt ± 1,0 °C,

— *aerācija:* testa šķīdumus nedrīkst strauji aerēt,

— *barošana:* nebaro.

Testa beigās nosaka pH līmeni un skābekļa koncentrāciju kontroles paraugos un visos testu paraugos; testa šķīdumu pH nedrīkst mainīt.

Gaistošas vielas pārbauda slēgtos un līdz augšai pilnos traukos, kas ir pietiekami lieli, lai nodrošinātos pret skābekļa trūkumu.

Dafnijas pārbauda pēc vismaz 24 stundu iedarbības un vēlreiz pēc 48 stundām.

Pieļaujamības tests

Izmantojot šajā testa metodē aprakstītās procedūras, pieļaujamības testu var izdarīt ar koncentrāciju 100 mg litrā, lai parādītu, ka EC_{50} ir lielāks par minēto koncentrāciju.

Ja vielas īpašības ir tādas, ka koncentrāciju 100 mg litrā ūdens nevar iegūt, pieļaujamības tests jāveic pie koncentrācijas, kas ir vienāda ar vielas šķīdību (vai pie maksimālās koncentrācijas, kurā veidojas stabila dispersija) izmantotajā vidē (sk. arī 1.6.1.1. punktu).

Pieļaujamības tests jāveic, izmantojot 20 dafnijas, kas sadalītas divās vai četrās partijās, ar tādu pašu kontroles dafniju skaitu. Ja imobilizācija pastāv, ir jāizdara pilns pētījums.

2. DATI UN TO IZVĒRTĒŠANA

Par katru laika posmu, kad ir reģistrēti novērojumi (24 un 48 stundas), mirstību, kas izteikta procentos, atliek pret koncentrāciju logaritmiskajā/varbūtības diagrammā.

Ja iespējams, izmantojot standarta procedūras, katram novērošanas laikam jānovērtē EC_{50} un ticamības robežas ($p = 0,05$); šie lielumi jānoapaļo līdz vienam vai, lielākais, līdz diviem nozīmīgiem cipariem (noapaļošanas līdz diviem cipariem piemēri: 173,5 noapaļo līdz 170; 0,127 līdz 0,13; 1,21 līdz 1,2).

Ja koncentrācijas/atbildes reakcijas līkne ir pārāk stāva, lai aprēķinātu EC_{50}, pietiek ar tās grafiski iegūto aptuveno vērtību.

Ja divas secīgas koncentrācijas, kas viena no otras atšķiras 2,2 reizes, izraisa 0 un 100 % imobilizāciju, ar tām pietiek, lai norādītu diapazonu, kurā ietilpst EC_{50}.

Ja novērots, ka nevar nodrošināt testa vielas stabilitāti vai viendabīgumu, tas jāieraksta protokolā un jāievēro piesardzība, interpretējot rezultātus.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— dati par testu organismu (zinātniskais nosaukums, rase, piegādātājs vai izcelsme, priekšapstrāde, kultivēšanas metode, norādot barības izcelsmi, tipu un daudzumu, barošanas biežumu),

— atšķaidīšanas ūdens izcelsme un galvenie ķīmiskie raksturlielumi (t.i., pH, temperatūra, cietība),

— ja viela slikti šķīst ūdenī, izejas standartšķīduma un testā izmantoto šķīdumu sagatavošanas paņēmiens,

— palīgvielu koncentrācija,

— izmantotās koncentrācijas un jebkuri pieejamie dati par vielas stabilitāti testa šķīdumos,

— ja veic ķīmiskās analīzes, izmantotās metodes un rezultāti,

— pieļaujamības testa rezultāti, ja tāds izdarīts,

— aprīkojuma apraksts,

— apgaismojuma režīms,

— testa šķīdumu izšķīdušā skābekļa koncentrācijas, pH lielumi un temperatūras,

— kvalitātes kritēriju izpildes pierādījums,

— tabula, kurā parādīta kumulatīvā imobilizācija katrā koncentrācijā un kontroles grupā (un kontroles grupā ar palīgvielu, ja tā vajadzīga) katrā no ieteicamajiem novērošanas laikiem (24 un 48 stundas),

— testa beigās iegūtās koncentrācijas/atbildes reakcijas līknes grafiskais attēls,

— EC_{50} katrā ieteiktajā novērošanas termiņā (norādot 95 % ticamības robežas, ja iespējams),

— izmantotās statistikas metodes EC_{50} noteikšanai,

— rezultāti, kas iegūti ar standartvielu, ja tādu izmanto,

— lielākā pārbaudāmā koncentrācija, kas neizraisa imobilizāciju testa laikā,

— mazākā pārbaudāmā koncentrācija, kas izraisa 100 % imobilizāciju testa laikā.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

1) *OECD, Paris, 1981, Test Guidelines 202, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.*

2) *International Standard ISO, Water Quality – Determination of inhibition of mobility of Daphnia magna Straus, ISO 6341-1989*

3) *AFNOR Inhibition of mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera — Crustacea) NFT 90 301 (January 1983).*

4) *Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen fur die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.*

5) *DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).*

6) *Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.*

7) *Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. and Exper. Then, 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. papildinājums

Atjaunotais ūdens

Piemērota atšķaidīšanas ūdens piemērs (saskaņā ar ISO 6341)

Visām ķīmiskajām vielām jābūt analītiski tīrām.

Jāizmanto ļoti kvalitatīvs destilēts vai dejonizēts ūdens, kura vadītspēja ir zemāka par 5 μScm^{-1}.

Ūdens destilācijas aparāts nedrīkst saturēt vara detaļas.

Rezerves šķīdumi

$CaCl_2.2\ H_2O$ (kalcija hlorīda dihidrāts): izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram	11,76 g
$MgSO_4.7H_2O$ (magnija sulfāta heptahidrāts): izšķīdina ūdenī, lai kopējais tilpums būtu 1 litrs	4,93 g
$NaHCO_3$ (nātrija hidrogēnkarbonāts) izšķīdina ūdenī, lai kopējais tilpums būtu 1 litrs	2,59g
KCl (kālija hlorīds): izšķīdina ūdenī, lai kopējais tilpums būtu 1 litrs	0,23g

Ūdens atšķaidīšanai

No visiem četriem rezerves šķīdumiem ņem pa 25 ml, sajauc kopā un pievieno ūdeni līdz 1 litram.

Veic aerāciju, līdz skābekļa koncentrācija ūdenī sasniedz gaisa piesātinājuma līmeni.

pH līmenim jābūt 7,8 ± 0,2.

Ja vajadzīgs, pH noregulē ar NaOH (nātrija hidroksīdu) vai HCl (hlorūdeņražskābi).

Ja šādi iegūto ūdeni atšķaidīšanai atstāj apmēram uz 12 stundām, tā aerācija nav vajadzīga.

Kopējā Ca un Mg jonu koncentrācija šķīdumā ir 2,5 mmol/l. Ca:Mg jonu attiecība ir 4:1, bet Na:K jonu attiecība ir 10:1. Šā šķīduma bāziskums ir 0,8 mmol/l.

Gatavojot ūdeni atšķaidīšanai, atkāpes no metodikas ir pieļaujamas, ja tās neietekmē ūdens sastāvu un īpašības.

2. papildinājums

EEK 1978. gadā sarīkotās starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultātu kopsavilkums (minēti arī 2. atsaucē)

Uzmanību: šajā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā noteica EC_{50} *24 stundās.*

Izmantotās vielas:

1) kālija dihromāts

2) tetrapropilbenzosulfoskābe

3) tetrapropilbenzoulfoskābes nātrija sāls

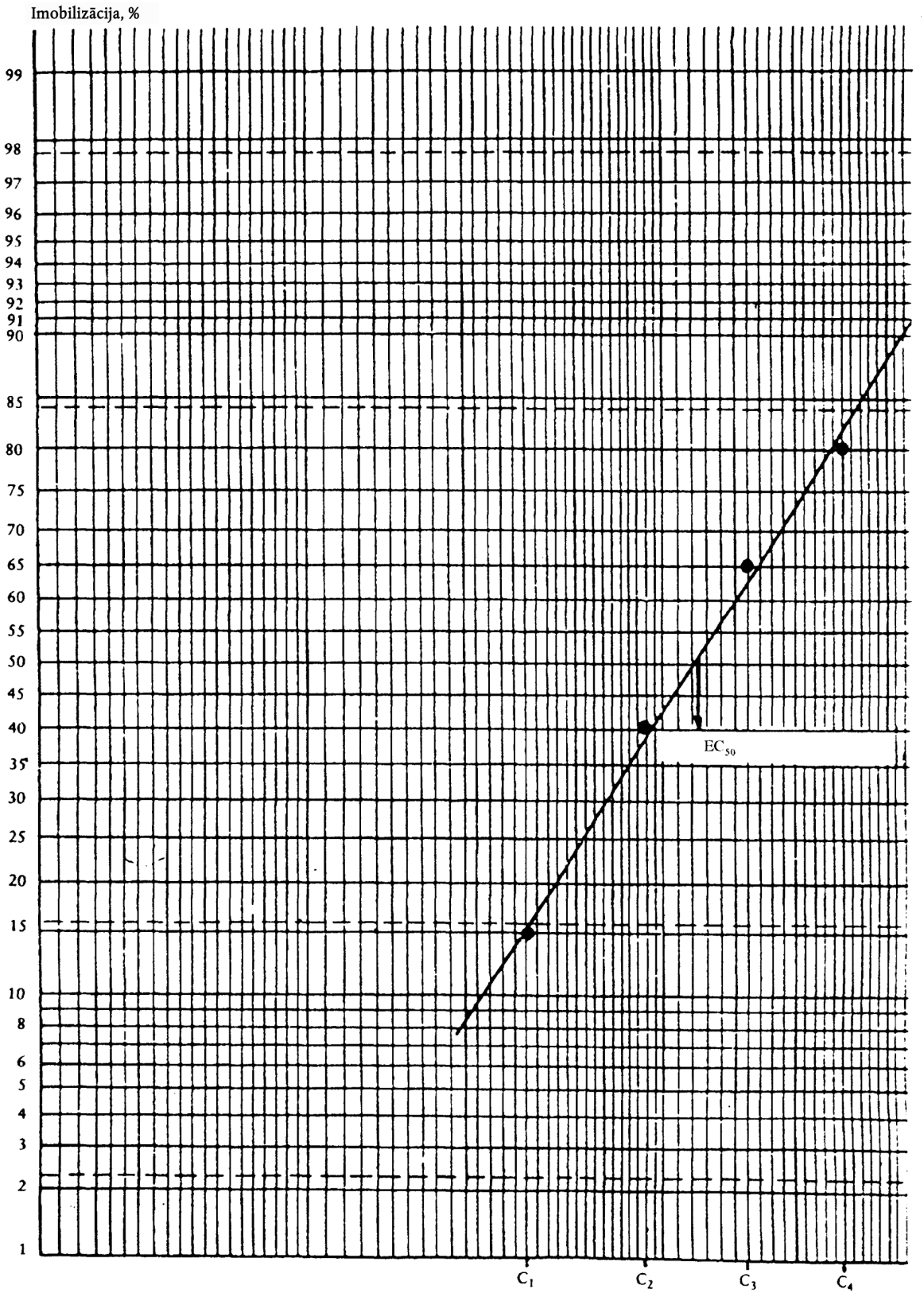
4) trihlor-2,4,5-fenoksietiķskābes kālija sāls

Viela	Dalīblaboratoriju skaits	Aprēķiniem pieņemamo rezultātu skaits	EC_{50}-24 h mg/1 vidēji
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

3. papildinājums

Koncentrācijas piemērs: imobilizācijas procents

EC_{50} noteikšanas piemērs, izmantojot logaritmisko papīru



C.3. AĻĢU AUGŠANAS KAVĒŠANAS TESTS

1. METODE

1.1. IEVADS

Šā testa mērķis ir noteikt, kā viela ietekmē vienšūnas zaļaļģu augšanu. Relatīvi īsā laikā (72 stundās) var noteikt iedarbību uz vairākām paaudzēm. Šo metodi var pielāgot vairākām vienšūnas zaļaļģu sugām, un šādā gadījumā testēšanas pārskatam jāpievieno izmantotās metodes apraksts.

Visvienkāršāk šo metodi izmantot ūdenī šķīstošām vielām, kas izmēģinājuma apstākļos visticamāk paliks ūdenī.

Šo metodi var izmantot vielām, kuru kavējošā ietekme uz aļģu augšanu ir netieša.

Pirms izmēģinājuma sākšanas iespēju robežās jābūt pieejamiem datiem par pārbaudāmās vielas šķīdību ūdenī, tvaika spiedienu, disociācijas konstantēm un bioloģisko noārdīšanos.

Izmēģinājumu plānojot un interpretējot tā rezultātus, jāņem vērā arī papildu informācija (piemēram, struktūrformula, tīrība, svarīgāko piemaisījumu īpašības un saturs, piedevas un to daudzums, sadalīšanās koeficients n-oktanolā/ūdenī).

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Šūnu blīvums: šūnu skaits vienā mililitrā;

Pieaugums: šūnu blīvuma palielināšanās izmēģinājuma laikā;

Augšanas ātrums: šūnu blīvuma palielināšanās laika vienībā;

EC_{50}: šajā metodē ir pārbaudāmās vielas koncentrācija, kuras iedarbībā salīdzinājumā ar kontroli par 50 % samazinās pieaugums (E_bC_{50}) vai augšanas ātrums (E_rC_{50});

NOEC (koncentrācija bez efekta novērojuma): šajā metodē augstākā pārbaudītā koncentrācija, kurā salīdzinājumā ar kontroli nav novērota būtiska augšanas kavēšana.

Visas pārbaudāmās vielas koncentrācijas izteiktas masas vienībās uz tilpuma vienību (miligramos litrā). Tās var izteikt arī masas vienībās uz masas vienību ($mg.kg^{-1}$).

1.3. STANDARTVIELAS

Standartvielu var pārbaudīt, lai parādītu, ka laboratorijas izmēģinājuma apstākļos testa sugas atbildes reakcijas jutība nav būtiski mainījusies.

Ja izmanto standartvielu, tad testēšanas pārskatā jānorāda attiecīgie rezultāti. Par standartvielu var izmantot kālija dihromātu, taču tā krāsa var ietekmēt šūnām pieejamās gaismas kvalitāti un apgaismojuma intensitāti, kā arī spektrofotometrisko mērījumu rezultātus gadījumos, kad tos izmanto. Kālija dihromāts izmantots starptautiskajā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (sk. [3] norādi un 2. papildinājumu).

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Ar koncentrāciju 100 mg/l var veikt robežas testu lai parādītu, ka EC_{50} ir lielāka par šo koncentrāciju.

Uz eksponenciāli augošām atlasītu zaļaļģu kultūrām vairākās paaudzēs un noteiktos apstākļos ļauj iedarboties pārbaudāmai vielai dažādās koncentrācijās.

Šķīdumus inkubē 72 stundas, kuru laikā vismaz ik pēc 24 stundām tajos mēra šūnu blīvumu. Augšanas kavēšanu salīdzina ar kontroli.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Kvalitātes kritēriji attiecas gan uz pieļaujamības testu, gan pilno testēšanas metodi.

Šūnu blīvumam kontroles kultūrās triju dienu laikā jāpalielinās vismaz 16 reizes.

Pārbaudāmās vielas koncentrācijai jāsaglabājas 80 % līmenī no sākotnējās koncentrācijas uz laiku, kas atbilst izmēģinājuma ilgumam.

Vielām, kuras testa vidē ir labi šķīstošas, dodot stabilus šķīdumus, t.i., vielām, kuras ievērojamā daudzumā neiztvaiko, nenoārdās, nehidrolizējas vai neadsorbējas, sākotnējo koncentrāciju pieņem kā vienādu ar nominālo koncentrāciju. Jāsniedz pierādījumi, ka koncentrācijas saglabājušās visu testēšanas laiku un ka kvalitātes kritēriji ir ievēroti.

Vielām, kas ir:

i) testa vidē mazšķīstošas; vai

ii) var veidot stabilas emulsijas vai dispersijas; vai

iii) ūdens vidē ir nestabilas,

par sākotnējo koncentrāciju pieņem testēšanas sākumā izmērīto koncentrāciju. Sākotnējā koncentrācija jānosaka pēc līdzsvarošanas perioda.

Visos šajos gadījumos testēšanas laikā jāveic papildu mērījumi, lai apstiprinātu iedarbības faktiskās koncentrācijas vai to, ka kvalitātes kritēriji ir ievēroti.

Apstiprinājies, ka testēšanas laikā ievērojamā daudzumā testējamā viela var tikt iekļauta aļģu biomasā. Tāpēc, lai apliecinātu, ka šis kvalitātes kritērijs ir ievērots, jāņem vērā gan aļģu biomasā ietvertais vielas daudzums, gan šķīdumā esošais vielas daudzums (vai, ja tehniski iespējams, ūdens kolonnā izmērītais). Tomēr, ja vielas koncentrācijas noteikšana aļģu biomasā var radīt ievērojamas tehniskas problēmas, kvalitātes kritēriju ievērošanu var apliecināt, izmantojot testēšanas trauku ar vielas augstāko koncentrāciju bez aļģēm un mērot šķīduma koncentrāciju (vai, ja nav tehniski iespējams, ūdens kolonnā) testēšanas perioda sākumā un beigās.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Reaģenti**

1.6.1.1. *Pārbaudāmo vielu šķīdumi*

Vajadzīgās koncentrācijas pamatšķīdumus gatavo, izšķīdinot vielu dejonizētā ūdenī vai ūdenī, kas iegūts saskaņā ar 1.6.1.2. punktu.

Izraudzītās pārbaudāmās koncentrācijas šķīdumus sagatavo, pievienojot attiecīgās alikvotas aļģu priekškultūrām (sk. 1. papildinājumu). Vielas parasti pārbauda tikai līdz šķīdības robežai. Daļai vielu (piemēram, ūdenī slikti šķīstošām vielām, vielām ar augstu P_{ow}, vai vielām, kuras veido stabilas dispersijas, nevis īstos šķīdumus ūdenī), ir pieļaujams veikt testēšanu ar koncentrācijām, kas pārsniedz šķīdības robežu, lai nodrošinātu, ka tiek iegūta stabila/maksimālās šķīdības koncentrācija. Tomēr ir svarīgi, lai šī koncentrācija citādi neizjauktu testēšanas sistēmu (piemēram, neveidotos vielas plēve uz ūdens virsmas, kavējot skābekļa šķīšanu ūdenī, u.c.).

Ūdenī slikti šķīstošu rezerves šķīdumu pagatavošanai vai šādu vielu disperģēšanai testa vidē var izmantot ultraskaņas dispersiju, organiskos šķīdinātājus, emulgatorus vai dispersantus. Gadījumos, kad tiek izmantotas šādas palīgvielas, visās pārbaudāmajās koncentrācijas jābūt vienādam attiecīgās palīgvielas daudzumam, un uz papildus kontroli iedarbojas ar tādu pašu palīgvielas koncentrāciju, kāda izmantota testēšanai. Šādu palīgvielu koncentrācijas iespējami jāsamazina, un testēšanas vidē tās nedrīkst būt augstākas par 100 mg/l.

Pārbaude jāveic bez pH korekcijas. Ja novēro krasas pH izmaiņas, izmēģinājumu ieteicams atkārtot, veicot pH korekciju, un rezultāti jāreģistrē. Šajā gadījumā pamatšķīduma pH līmeni koriģē līdz pH līmenim, kāds ir ūdenim, ko izmanto atšķaidīšanai, ja nav noteikts citādi. Šim nolūkam vēlams izmantot HCl un NaOH. pH līmeni koriģē tā, lai būtiski neietekmētu pārbaudāmās vielas koncentrāciju pamatšķīdumā. Ja šāda korekcija izraisa ķīmisku reakciju vai pārbaudāmās vielas nogulsnēšanos, tas jāieraksta ziņojumā.

1.6.1.2. *Testa vide*

Izmantotajam ūdenim jābūt labas kvalitātes destilētam vai dejonizētam ūdenim, kura elektrovadītspēja ir mazāka par 5 μS.cm $^{-1}$. Ūdens destilācijas aparāta detaļas nedrīkst būt izgatavotas no vara.

Ieteicama ir šāda vide.

Saskaņā ar tabulu turpmāk pagatavo četrus rezerves šķīdumus. Rezerves šķīdumus sterilizē ar membrānfiltrāciju vai autoklavējot, un glabā tumšā vietā 4 °C temperatūrā. Rezerves šķīdums Nr. 4 jāsterilizē tikai ar membrānfiltrāciju. Šos rezerves šķīdumus atšķaida, iegūstot barības elementu galīgo koncentrāciju testējamajos šķīdumos.

Barības elements	Koncentrācija rezerves šķīdumā		Galīgā koncentrācija testēšanas šķīdumā	
1. rezerves šķīdums: makroelementi				
NH_4C1	1,5	g/1	15	mg/1
$MgCl_2.6H_2O$	1,2	g/l	12	mg/1
$CaCl_2.2H_2O$	1,8	g/1	18	mg/1
$MgSO_4.7H_2O$	1,5	g/l	15	mg/1
$KH_2\ PO_4$	0,16	g/1	1,6	mg/1
2. rezerves šķīdums: Fe-EDTA				
$FeCl_3.6H_2$	80	mg/1	0,08	mg/1
$Na_2EDTA.2H_2O$	100	mg/1	0,1	mg/1
3. rezerves šķīdums: mikroelementi				
H_3BO_3	185	mg/1	0,185	mg/1
$MnCl_2.4H_2O$	415	mg/1	0,415	mg/1
$ZnCl_2$	3	mg/1	3×10^{-3}	mg/1
$CoCl_2.6H_2O$	1,5	mg/1	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/1
$CuCl_2.2H_2O$	0,01	mg/1	10^{-5}	mg/1
$Na_2MoO_4.2H_2O$	7	mg/1	7×10^{-3}	mg/1
4. rezerves šķīdums: $NaHCO_3$				
$NaHCO_3$	50	g/1	50	mg/1

Vides pH pēc līdzsvarošanas ar gaisu ir apmēram 8.

1.6.2. **Aprīkojums**

— Parastais laboratorijas aprīkojums.

— Kolbas ar piemērotu tilpumu (piemēram, ja testējamā šķīduma tilpums ir 100 ml, var izmantot 250 ml tilpuma koniskās kolbas). Visām testēšanai izmantojamajām kolbām jābūt vienāda izmēra un izgatavotām no viena materiāla.

— Kultūras audzēšanas iekārta: skapis vai kamera, kurā var uzturēt 21 °C līdz 25 °C temperatūru ar precizitāti ± 2 °C, ar pastāvīgu vienādu apgaismojumu spektra reģionā 400 līdz 700 nm. Ja aļģes kontroles kultūrās sasniegušas ieteicamo augšanas ātrumu, var uzskatīt, ka augšanas apstākļi, ieskaitot apgaismojuma intensitāti, ir piemēroti.

Vidējā testēšanas šķīdumu līmenī ieteicams izmantot apgaismojuma intensitāti 60 līdz 120 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (35 līdz 70 × 10^{18} $fotoni.m^{-2}.s^{-1}$), izdarot mērījumus diapazonā no 400 līdz 700 nm un izmantojot piemērotu receptoru. Apgaismojuma mērinstrumentiem, kas kalibrēti luksos, piemērots ir tam ekvivalents diapazons no 6000 līdz 10 000 lx.

Apgaismojuma intensitāti var nodrošināt, izmantojot četras līdz septiņas universālā tipa baltas gaismas 30 W luminiscences spuldzes (krāsas temperatūra apmēram 4300 K), kas novietotas 0,35 m attālumā no aļģu kultūrām.

— Šūnu blīvuma mērījumus izdara pēc dzīvo šūnu tiešas skaitīšanas metodes, piemēram, izmantojot mikroskopu ar skaitīšanas kamerām. Tomēr var izmantot arī citas metodes (fotometriskās, turbidimetriskās, u.c.), ja tās ir pietiekami jutīgas un attiecīgie mērījumu rezultāti pietiekami labi korelē ar šūnu blīvumu.

1.6.3. **Testa organismi**

Ieteicams izmantot kultūras audzēšanai un testēšanai ērtās ātraudzīgās zaļaļģu sugas. Priekšroka ir dodama šādām sugām:

— *Selenastrum capricomutum,* piemēram, ATCC 22662 vai CCAP 278/4,

— *Scenedesmus subspicatus,* piemēram, 86.81 SAG,

Piezīme:

ATCC = *American Type Culture Collection (U.S.A.)* – Amerikas tipisko kultūru krātuve (ASV)

CCAP = *Culture Centre of Algae and Protozoa (U.K.)* – Aļģu un vienšūņu kulturu centrs (Apvienotā karaliste)

SAG = *Collection of algal culture (Göttingen, F.R.G.)* – Aļģu kultūru kolekcija (Getingene, Vācija)

Ja izmanto citas sugas, jānorāda attiecīgais celms.

1.6.4. **Pārbaudes procedūra**

Koncentrācijas diapazonu, kurā varētu izpausties pārbaudāmās vielas ietekme, nosaka, pamatojoties uz iedarbības diapazona noteikšanas rezultātiem.

Abi augšanu raksturojošie lielumi (biomasa un augšanas ātrums) var dot pilnīgi nesalīdzināmus augšanas kavēšanas novērtējumus; tie abi jāizmanto diapazona noteikšanas izmēģinājumos lai nodrošinātu, ka koncentrāciju izmaiņas ģeometriskā progresijā rada iespējas aprēķināt gan E_bC_{50}, gan E_rC_{50}.

Sākotnējais šūnu blīvums

Ieteicams, lai sākotnējais šūnu blīvums *Selenastrum capricomutum* un *Scenedesmus subspicatus* izmēģinājumu kultūrās būtu apmēram 10^4 šūnas/ml. Ja izmanto citas sugas, tad to biomasai jābūt pielīdzināmai šai vērtībai.

Pārbaudāmās vielas koncentrācijas

Noteikšanai sagatavo vismaz piecas koncentrācijas ģeometriskā progresijā ar koncentrāciju attiecību, kas nepārsniedz 2,2. Zemākajai pārbaudāmajai koncentrācijai jābūt koncentrācijai, kurai nav iedarbības uz aļģu augšanu. Augstākajai pārbaudāmajai koncentrācijai jāpalēnina augšana vismaz par 50 % salīdzinājumā ar kontroli, bet vēlams, lai tā pilnīgi apturētu aļģu augšanu.

Atkārtojumi un kontroles

Eksperimenta plānā jāparedz katras testējamās koncentrācijas izmēģināšana trijos atkārtojumos. Izmanto trīs kontroles bez testējamās vielas, un, ja vajadzīgs, arī trīs kontroles, kas satur palīgvielu. Ja tam ir pamatojums, eksperimenta plānu var mainīt, palielinot pārbaudāmo koncentrāciju skaitu un samazinot vienas koncentrācijas atkārtojumu skaitu.

Pārbaudes norise

Testējamās kultūras, kas satur pārbaudāmo vielu vēlamajās koncentrācijas un vajadzīgo daudzumu aļģu inokulāta, pagatavo, pievienojot testējamās vielas rezerves šķīduma alikvotas piemērotam daudzumam aļģu priekškultūras (sk. 1. papildinājumu).

Kolbas ar kultūrām sakrata un ievieto kultūras audzēšanas iekārtā. Aļģu šūnas tur suspensijā kratot, maisot vai barbotējot gaisu, lai uzlabotu gāzu apmaiņu un samazinātu testējamo šķīdumu pH izmaiņas. Kultūrām pastāvīgi jāatrodas 21 - 25 °C temperatūrā, kas var svārstīties ± 2 °C robežās.

Visās kolbās nosaka šūnu blīvumu vismaz pēc 24, 48 un 72 stundām no testēšanas sākuma. Filtrētu aļģu vidi, kas satur attiecīgo testējamās vielas koncentrāciju, izmanto fona noteikšanai gadījumos, kad šūnu blīvumu nenosaka ar tiešās skaitīšanas, bet citām metodēm.

pH izmēra testa sākumā un 72 stundas pēc sākuma.

Kontrolē testēšanas laikā pH parasti nemainās vairāk par 1,5 vienībām.

Gaistošu vielu testēšana

Šobrīd nav vispārpieņemta veida, kā testēt gaistošas vielas. Ja zināms, ka vielai ir tendence iztvaikot, tad var izmantot slēgtas testa kolbas ar palielinātu augšējās daļas tilpumu. Aprēķinot noslēgto kolbu neaizņemto tilpumu, jāņem vērā CO_2 trūkuma iespējas. Šai metodei ir dažādas variācijas (sk. 4. norādi).

Jācenšas noteikt attiecīgās vielas daudzumu, kas paliek šķīdumā, un testu rezultātus, kas iegūti ar gaistošām ķīmiskām vielām slēgtās sistēmās, ieteicams interpretēt sevišķi piesardzīgi.

Iedarbīguma robežas noteikšana

Izmantojot šajā metodē aprakstītās procedūras, ar koncentrāciju 100 mg/l var veikt iedarbīguma robežas testu lai parādītu, ka EC_{50} ir lielāka par šo koncentrāciju.

Ja vielas īpašību dēļ koncentrācija 100 mg/l testējamajā ūdenī nav sasniedzama, iedarbīguma robežas noteikšana jāveic ar koncentrāciju, kas ir vienāda ar vielas šķīdību (vai maksimālo koncentrāciju, pie kuras veidojas stabila dispersija) izmantojamajā vidē (sk. arī 1.6.1.1. punktu).

Iedarbīguma robežas noteikšana jāveic vismaz trijos atkārtojumos ar tādu pašu kontroļu skaitu. Iedarbīguma robežu noteikšanai jāizmanto abi augšanas mēri (biomasa un augšanas ātrums).

Ja iedarbīguma robežas noteikšanā biomasa vai augšanas ātrums salīdzinājumā ar kontroli vidēji samazinās par 25 % vai vairāk, jāveic pilna pārbaude.

2. DATU IZVĒRTĒŠANA

Izmērīto šūnu blīvumu izmēģinājuma kultūrās un kontrolēs norāda kopā ar testējamās vielas koncentrācijām un mērījumu laikiem. Šūnu blīvuma vidējo vērtību katrai pārbaudāmās vielas koncentrācijai, kā arī kontrolēm atkarībā no laika (0-72 h) parāda augšanas līkņu veidā.

Koncentrācijas/ietekmes sakarības noteikšanai izmanto šādas divas metodes. Daļa vielu zemās koncentrācijās var augšanu veicināt. Ņem vērā tikai tos punktus, kas norāda uz augšanas kavēšanu no 0 līdz 100 %.

2.1. AUGŠANAS LĪKŅU IETVERTĀ LAUKUMA SALĪDZINĀŠANA

Laukumu starp augšanas līknēm un horizontālo līniju $N = N_0$ var aprēķināt pēc formulas:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \ldots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

kur

A = laukums,

N_0 = šūnu skaits/ml laikā t_0 (izmēģinājuma sākumā),

N_1 = izmērītais šūnu skaits/ml laikā t_1,

N_n = izmērītais šūnu skaits/ml laikā t_n;

t_1 = pirmā mērījuma veikšanas laiks;

t_n = n-tā mērījuma veikšanas laiks.

n = no testēšanas sākuma veikto mērījumu skaits.

Šūnu augšanas palēninājumu procentos pie katras testējamās vielas koncentrācijas (I_A) aprēķina pēc formulas:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

kur

A_c = laukums starp kontroles augšanas līkni un horizontālo līniju $N = N_0$.

A_t = laukums starp attiecīgās koncentrācijas augšanas līkni un horizontālo līniju $N = N_0$.

I_A vērtības atliek puslogaritmiskajā diagrammā vai puslogaritmiskajā varbūtības vienību diagrammā iepretim atbilstošajām koncentrācijām. Ja izmanto varbūtības vienību diagrammu, punkti veido taisnu līniju, ko novelk pēc acumēra vai aprēķinātās regresijas.

EC_{50} nosaka pēc regresijas līnijas, nolasot koncentrāciju, kas atbilst augšanas palēninājumam par 50 % (I_A = 50 %). Lai šo vērtību nepārprotami saistītu ar tās noteikšanai izmantoto metodi, ir ierosināts to apzīmēt ar simbolu E_bC_{50}. Ir svarīgi E_bC_{50} norādīt kopā ar attiecīgo ekspozīcijas laiku, piemēram, E_bC_{50}(0-72h).

2.2. AUGŠANAS ĀTRUMU SALĪDZINĀŠANA

Vidējo īpatnējos augšanas ātrumu (μ) eksponenciāli augošām kultūrām var aprēķināt pēc formulas

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

kur t_0 ir laiks testēšanas sākumā.

Cita iespēja ir konkrētā pieauguma ātruma vidējo vērtību noteikt pēc regresijas līnijas virziena koeficienta ln N vērtības izmaiņu grafikā atkarībā no laika.

Īpatnējā augšanas ātruma palēninājumu procentos pie katras testējamās vielas koncentrācijas ($I_\mu t$) aprēķina pēc formulas:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

kur

μ_c = vidējais īpatnējais augšanas ātrums kontrolē

μ_t = vidējais īpatnējais augšanas ātrums testējamajai koncentrācijai t

Konkrētā pieauguma ātruma vidējās vērtības procentuālā samazinājuma apmēru pie pārbaudāmās vielas attiecīgās koncentrācijas salīdzinājumā ar kontrolvērtību atliek diagrammā iepretim attiecīgajam koncentrācijas logaritmam. EC_{50} vērtību var nolasīt no grafika. Lai nepārprotami norādītu, ka minētā EC_{50} vērtība iegūta ar šo metodi, ieteicams izmantot simbolu E_bC_{50}. Jānorāda mērījumu veikšanas laiks, piemēram, ja attiecīgā vērtība attiecas uz laiku no 0 līdz 72 stundām, to apzīmē kā E_rC_{50} (0-72h).

Piezīme: īpatnējais pieauguma ātrums ir logaritms, un nelielas pieauguma ātruma izmaiņas var izraisīt lielas biomasas izmaiņas. Tāpēc E_bC un E_rC vērtības skaitliski salīdzināt nevar.

2.3. NOEC APRĒĶINĀŠANA

Koncentrāciju bez efekta novērojuma nosaka ar piemērotu izlases kopu salīdzināšanas statistisko procedūru (piemēram, dispersijas analīzi un *Dunnett* testu), izmantojot atsevišķās A augšanas līkņu ieslēgtā laukuma vērtības (sk. 2.1. punktu) vai īpatnējos augšanas ātrumus μ (sk. 2.2. punktu).

3. PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— pārbaudāmā viela: ķīmiskās identifikācijas dati,

— testa organismi: izcelsme, laboratorijas kultūra, celma numurs, kultivēšanas metode,

— testa apstākļi:

  — testa sākuma un beigu datums un testa ilgums,

  — temperatūra,

  — barotnes sastāvs,

  — kultūras audzēšanas iekārta,

  — šķīdumu pH testēšanas sākumā un beigās (ar paskaidrojumiem, ja pH starpība pārsniedz 1,5 vienības),

  — šķīdinātājs un metode, kas izmantota pārbaudāmās vielas šķīdināšanai, un šķīdinātāja koncentrācija testa šķīdumos,

  — gaismas intensitāte un kvalitāte,

  — testētās koncentrācijas (izmērītās vai nominālās),

— rezultāti:

  — šūnu blīvums visās kolbās katrā mērījumu punktā un šūnu blīvuma mērīšanas metodes,

  — šūnu blīvuma vidējās vērtības,

  — augšanas līknes,

  — koncentrācijas un tās ietekmes savstarpējās atkarības grafisks attēlojums,

  — EK (efektīvās koncentrācijas) vērtības un to aprēķina metode,

  — NOEC,

  — citi novērojumi.

4. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

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': 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. papildinājums

Aļģu kultivēšanas procedūras piemērs

Vispārīgi novērojumi

Šo metodi izmanto, lai iegūtu aļģu kultūras toksicitātes testiem.

Ar atbilstošām metodēm jānodrošina, lai aļģu kultūras nebūtu inficētas ar baktērijām (ISO 4833). Var būt vēlams izmantot aksēniskas kultūras, bet būtiski svarīgi ir lietot vienas sugas aļģu kultūras.

Lai novērstu kontamināciju ar baktērijām un citām aļģēm, visas darbības jāveic sterilos apstākļos. Kontaminētās kultūras izbrāķē.

Aļģu kultūru ieguves metodes

Barības šķīdumu (barotņu) gatavošana

Barotnes var pagatavot, atšķaidot barības elementu koncentrētus rezerves šķīdumus. Cietajām barotnēm pievieno 0,8 % agara. Izmantotajām barotnēm jābūt sterilām. Sterilizējot ar karsēšanu autoklāvā, var rasties NH_3 zudumi.

Izejas kultūra:

Izejas kultūras ir nelielas aļģu kultūras, kuras regulāri pārvieto svaigā barotnē un kuras izmanto par sākotnējo pārbaudāmo materiālu. Ja šīs kultūras neizmanto regulāri, tās svītrās uzsēj mēģenēs uz slīpagara. Vismaz reizi divos mēnešos tās pārsēj svaigā barotnē.

Izejas kultūras audzē koniskās kolbās ar atbilstošu barotni (tilpums aptuveni 100 ml). Ja aļģes inkubē 20 °C temperatūrā un pastāvīgā apgaismojumā, tās jāpārsēj katru nedēļu.

Pārsēšanas laikā ar sterilu pipeti veco kultūru pārvieto kolbā ar svaigu barotni tā, lai ātri augošo sugu sākotnējā koncentrācija būtu apmēram 100 reizes mazāka nekā vecajā kultūrā.

Sugas pieauguma ātrumu var noteikt pēc pieauguma līknes. Ja tas ir zināms, tad ir iespējams noteikt blīvumu, kuru sasniedzot, kultūra būtu jāpārvieto jaunā barotnē. Tas jāveic pirms kultūras bojāejas stadijas iestāšanās.

Priekškultūra:

Priekškultūra ir paredzēta tāda aļģu daudzuma iegūšanai, kas piemērots testējamo kultūru inkubēšanai. Priekškultūru inkubē attiecīgā testa apstākļos un izmanto, kamēr tā vēl aug eksponenciāli – visbiežāk pēc aptuveni trīs dienu ilga inkubācijas perioda. Ja šūnas aļģu kultūrā ir deformētas vai anormālas, tad tā nav derīga izmantošanai.

2. papildinājums

Standartā ISO 8692 — Ūdens kvalitāte. Saldūdens aļģu augšanas kavēšanas tests, izmantojot *Scenedesmus subspicatus* un *Selenastrum capricornutum* - doti šādi 16 dalīblaboratoriju veiktās starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultāti, izmantojot kālija dihromātu:

	Vidējās vērtības (mg/l)	Diapazons (mg/l)
E_rC_{50} (0-72 h)	0,84	0,60 līdz 1,03
E_bC_{50} (0-72 h)	0,53	0,20 līdz 0,75

C.4. "VIEGLAS" BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANĀS SPĒJAS NOTEIKŠANA

I DAĻA VISPĀRĪGI APSVĒRUMI

I.1. IEVADS

Aprakstītas sešas testēšanas metodes ķīmisko vielu bioloģiskās vieglas noārdīšanās spējas novērtēšanai aerobos apstākļos ūdens vidē:

a) izšķīdušā organiskā oglekļa (IOO) noteikšana. Atkrāsošanās (C.4.-A metode)

b) modificētā ESAO metode — IOO atkrāsošanās (C.4.-B metode)

c) oglekļa dioksīda (CO_2) izdalīšanās (modificēta Sturma metode) (C.4.-C metode)

d) manometriskā respirometrija (C.4.-D metode)

e) slēgto pudeļu (C.4.-E metode)

f) MITI (Japānas Ārējās tirdzniecības un rūpniecības ministrijas metode) (C.4.-F metode)

Par visām sešām metodēm to izmantošanas vispārīgie un kopīgie apsvērumi izklāstīti attiecīgās metodes I daļā. Konkrētie jautājumi, kas attiecas uz katru metodi atsevišķi, aprakstīti II līdz VII daļā. Pielikumos pievienotas definīcijas, formulas un norādījumi.

Pēc šīm metodēm iegūst salīdzināmus rezultātus, par ko liecina ESAO 1988. gadā veiktās starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultāti. Tomēr atkarībā no testējamās vielas fizikālajām īpašībām kādai no metodēm var būt dodama priekšroka.

I.2. PIEMĒROTĀKĀS METODES IZVĒLE

Lai izraudzītos piemērotāko metodi, ir svarīgi iegūt informāciju par attiecīgās vielas šķīdību, tvaika spiedienu un adsorbcijas īpašībām. Teorētisko vērtību aprēķināšanai un izmērīto parametru vērtību pārbaudei, piemēram, TSP, TCO_2, IOO, TOC, ĶSP (sk. I un II pielikumu), jāzina vielas ķīmiskā struktūra vai sastāvs.

Ķīmiskās vielas, kuru šķīdība ūdenī ir vismaz 100 mg/l, ja tās nav gaistošas un neadsorbējas, var novērtēt pēc visām metodēm. Vielām, kuras slikti šķīst ūdenī, ir gaistošas vai adsorbējas, piemērotākās metodes norādītas 1. tabulā. Kā pārbaudīt ūdenī slikti šķīstošas vielas un gaistošas vielas, aprakstīts III pielikumā. Vielas ar vidēju gaistamību var pārbaudīt pēc IOO atkrāsošanās metodes, ja testēšanas traukos (kuriem jābūt noslēdzamiem ar piemērotiem līdzekļiem) ir pietiekams tilpums gāzēm. Šādā gadījumā fizisko zudumu noteikšanai jāizveido abiotiska kontrole.

1. tabula Testēšanas metožu piemērotība

Tests	Analīzes metode	Piemērotība vielām, kuras ir:		
		slikti šķīstošas	gaistošas	adsorbējas
IOO atkrāsošanas	Izšķīdušais organiskais ogleklis	—	—	+/-
Modif. ESAO atkrāsošanās metode	Izšķīdušais organiskais ogleklis	—	—	+/-
CO_2 izdalīšanās	Respirometrija: CO_2 izdalīšanās	+	—	+
Manometriskā respirometrija	manometriskā respirometrija: skābekļa patēriņš	+	+/-	+
Slēgto pudeļu	Respirometrija: izšķīdušais skābeklis	+/-	+	+
MITI	Respirometrija: skābekļa patēriņš	+	+/-	+

Iegūto rezultātu interpretēšanai vajadzīga informācija par testējamā materiāla tīrību vai galveno sastāvdaļu saturu, īpaši gadījumos, kad rezultātu skaitliskās vērtības ir nelielas vai minimālas.

Piemērotāko pārbaudāmo koncentrāciju izvēlei var būt noderīga informācija par pārbaudāmās vielas toksisko iedarbību uz baktērijām (IV pielikums), un tā var būt ļoti svarīga bioloģiskās degradācijas spējas zemu vērtību pareizai interpretēšanai.

I.3. STANDARTVIELAS

Procedūras pārbaudei paralēli parastajām testējamo vielu pārbaužu sērijām veic izmēģinājumus ar standartvielām, kuras atbilst vieglas bioloģiskās noārdīšanās spējas kritērijiem.

Piemērotas standartvielas ir anilīns (svaigi pārdestilēts), nātrija acetāts un nātrija benzoāts. Minētās standartvielas pēc šīm metodēm noārdās pat tad, ja netiek pievienots sējmateriāls.

Izteikts priekšlikums atrast tādu standartvielu, kura gan ir viegli bioloģiski noārdāma, taču šim nolūkam ir noteikti nepieciešams pievienot sējmateriālu. Tāpēc tika ieteikts izmantot kālija hidrogēnftalātu, taču pirms šo vielu var pieņemt par standartvielu, par to ir jāiegūst vairāk attiecīgas informācijas.

Respirometriskos mērījumos skābekļa uzņemšanu nitrifikācijas dēļ var ietekmēt slāpekli saturoši savienojumi (sk. II un V pielikumu).

I.4. NOTEIKŠANAS METOŽU PRINCIPS

Testējamās vielas šķīdumu vai suspensiju minerālbarotnē inokulē un inkubē aerobos apstākļos tumsā vai izkliedētā gaismā. Ar sējmateriālu saistītais izšķīdušais organiskais ogleklis (IOO) jāuztur iespējami zemā līmenī salīdzinājumā ar IOO no testējamās vielas. Izdara sējmateriāla endogenās aktivitātes korekciju, paralēli veicot izmēģinājumus ar tukšo paraugu ar sējmateriālu, bet bez pārbaudāmās vielas, lai gan šūnu endogenā aktivitāte vielas klātbūtnē precīzi neatbilst aktivitātei endogenajā kontrolē. Paralēli veiktspējas pārbaudei veic testēšanu, izmantojot standartvielu.

Parasti degradācija notiek pēc tādu parametru kā IOO, CO_2 veidošana un skābekļa uzņemšana, un, lai noteiktu biodegradācijas sākumu un beigas, mērījumus veic pietiekami bieži. Ar automātiskajiem respirometriem mērījumus veic nepārtraukti. Dažkārt papildus citiem parametriem papildus nosaka IOO, bet parasti to dara tikai testēšanas sākumā un beigās. Īpašas ķīmiskās analīzes var veikt pārbaudāmās vielas primārās degradācijas novērtēšanai, un lai noteiktu tās laikā veidojošos starpproduktu koncentrāciju (obligāti jāveic pēc *MITI* metodes).

Parasti izmēģinājumi ilgst 28 dienas. Tomēr to var izbeigt arī drīzāk nekā pēc 28 dienām, piemēram, tiklīdz biodegradācijas līkne sasniegusi plato vismaz 3 analīzēs. Izmēģinājumus var turpināt arī ilgāk nekā 28 dienas, ja līkne liecina par to, ka biodegradācija ir sākusies, taču 28 dienu laikā nav sasniegts tās plato.

I.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

I.5.1. **Reproducējamība**

Biodegradācijas īpatnību dēļ un gadījumos, kad par sējmateriālu tiek izmantotas jauktas baktēriju populācijas, noteikšana jāveic vismaz divos atkārtojumos.

Parasti jo augstāka ir sākotnēji pievienoto mikroorganismu koncentrācija, jo mazākas ir atšķirības starp atkārtojumiem. Veiktās starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultāti liecina arī, ka dažādās laboratorijās iegūtie rezultāti var būt ievērojami atšķirīgi, taču laba sakritība tiek iegūta ar vielām, kas viegli bioloģiski noārdās.

I.5.2. **Testa rezultātu derīgums**

Izmēģinājuma rezultāti uzskatāmi par derīgiem, ja atkārtojumos iegūto rezultātu maksimālo vērtību starpība pēc vielas izdalīšanas plato izmēģinājuma beigās vai 10 dienu intervāla beigās attiecīgi nepārsniedz 20 %, un ja standartvielas degradācijas procents sasniedzis vieglas bioloģiskās noārdīšanas spējai vajadzīgo līmeni 14 dienu laikā. Ja kāds no šiem nosacījumiem nav ievērots, noteikšana jāveic atkārtoti. Metožu stingrības dēļ zemas noteiktās vērtības nebūt nenozīmē, ka testējamā viela vides apstākļos bioloģiski nenoārdās, tomēr liecina, ka biodegradācijas noteikšanai jāveic papildus darbs.

Ja toksiskuma izmēģinājumos ar testējamo vielu un standartvielu degradācijas pakāpe (pēc TOC) nepārsniedz 35 %, vai ir mazāka par 25 % (pēc TSP vai TCO_2) 14 dienu laikā, uzskata, ka pārbaudāmajām ķīmiskajām vielām ir inhibējošas īpašības (sk. arī IV pielikumu). Testēšana jāatkārto, ja iespējams izmantot pārbaudāmo vielu zemākā koncentrācijā un/vai sējmateriālu augstākā koncentrācijā, bet ne vairāk kā 30 mg cietvielu daļiņu litrā.

I.6. VISPĀRĪGAS PROCEDŪRAS UN SAGATAVOŠANA

Vispārīgi noteikumi par izmēģinājumu veikšanu apkopoti 2. tabulā. Aparatūra un citi eksperimentālie apstākļi, kas konkrēti attiecas uz katru metodi, aprakstīti turpmāk attiecīgajās iedaļās.

2. tabula Pārbaudes apstākļi

Tests	IOO atkrāsošanas	CO_2 izdalīšanās	Manometriskā respirometrija	Modificētā ESAO skrīninga	Slēgto pudeļu	MITI (I)
Testējamās vielas koncentrācija mg/1			100		2-10	100
mg DOC/1	10-40	10-20		10-40		
mg TSP/1			50-100		5-10	
Sējmateriāla koncentrācija (šūnu/1, aptuveni)	≤ 30 mg/1 SS vai ≤ 100ml efluenta/1 (10^7-10^8)			0,5ml sekundārā efluenta/1 (10^5)	≤ 5 ml efluenta/1 (10^4-10^6)	30 mg/1 SS (10^7-10^8)
Elementu koncentrācija minerālbarotnē (mg/1)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					vēlams 7,0
Temperatūra	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C
IOO = Izšķīdušais organiskais ogleklis			TSP = Teorētiskais skābekļa patēriņš		SS = Suspendētās daļiņas	

I.6.1. **Ūdens atšķaidīšanai**

Izmanto dejonizētu vai destilētu ūdeni, kas augšanu kavējošās koncentrācijas nesatur toksiskas vielas (piemēram, Cu^{++} jonus). Tajā nedrīkst būt vairāk par 10 % organiskā oglekļa no daudzuma, kas tiek ievadīts ar pārbaudāmo vielu. Ūdenim jābūt ļoti tīram, lai nebūtu lielas tukšajam paraugam noteiktās vērtības. Kontamināciju var radīt gan raksturīgi piemaisījumi, jonu apmaiņas sveķi, gan arī baktēriju un aļģu sadalīšanās produkti. Katrai izmēģinājumu sērijai izmanto ūdeni no vienas partijas, kas iepriekš pārbaudīts, veicot IOO analīzi. Šāda pārbaude nav vajadzīga noslēgto pudeļu testam, taču tad ūdenim jābūt ar zemu skābekļa patēriņu.

I.6.2. **Minerālvielu rezerves šķīdumi**

Testējamos šķīdumus pagatavo, no iepriekš sagatavotiem minerālvielu rezerves šķīdumiem. Var izmantot šādus rezerves šķīdumus (ar dažādiem atšķaidījuma koeficientiem) IOO atkrāsošanas, modificētajai ESAO skrīninga, CO_2 izdalīšanās, manometriskās respirometrijas, slēgto pudeļu metodēm. Atšķaidījuma koeficienti un minerālbarotnes MITI metodei norādīti pie attiecīgajām metodēm.

Rezerves šķīdumi: No analītiski tīriem reaģentiem pagatavo šādus rezerves šķīdumus.

a)	Monokālija dihidrogēnortofosfāts, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikālija monohidrogēnortofosfāts, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinātrija monohidrogēnortofosfāta dihidrāts $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$	33,40 g
	Amonija hlorīds, NH_4C1	0,50 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram. Šķīduma pH jābūt 7,4.	
b)	Kalcija hlorīds, bezūdens, $CaCl_2$,	27,50 g
	vai kalcija hlorīda dihidrāts, $CaCl_2 . 2 H_2O$	36,40 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram	
c)	Magnija sulfāta heptahidrāts, $MgSO_4 . 7 H_2O$	22,50 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram	
d)	Dzelzs(III) hlorīda heksahidrāts, $FeCl_3 . 6 H_2O$	0,25 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram	

Piezīme: lai šķīdums nebūtu jāgatavo tieši pirms lietošanas, uz tā vienu litru pievieno vienu pilienu konc. HCl vai 0,4 g etilēndiamīntetraetiķskābes dinātrija sāls (EDTA).

I.6.3. **Ķīmisko vielu rezerves šķīdumi**

Piemēram, izšķīdina 1 līdz 10 g pārbaudāmās vielas vai standartvielas dejonizētā ūdenī un atšķaida līdz vienam litram, ja šķīdība ir lielāka par 1 g/l. Rezerves šķīdumus var pagatavot minerālbarotnē vai pievienot vielu tieši barotnei. Par mazāk šķīstošām vielām sk. III pielikumu, bet MITI metodē (C.4-F metode) neizmanto nekādus šķīdinātājus vai emulgatorus.

I.6.4. **Sējmateriāls**

Sējmateriālu var iegūt dažādi: no aktīvajām dūņām, (nehlorētiem) attīrītiem notekūdeņiem, virszemes ūdeņiem, augsnes vai minēto materiālu maisījuma. Ja izmanto aktīvās dūņas IOO atkrāsošanās metodei, CO_2 izdalīšanās metodei un manometriskajām respirometrijas metodēm, tās jāņem no attīrīšanas iekārtām vai laboratorijas ierīces, uz kurām galvenokārt novada sadzīves notekūdeņus. Noskaidrots, ka, izmantojot citu sējmateriālu, rezultātiem ir lielāka izkliede. Modificētajai ESAO metodei un slēgto pudeļu metodei vajadzīgs vairāk atšķaidīts sējmateriāls bez aktīvo dūņu daļiņām, tāpēc tā piemērotākais avots ir attīrīti notekūdeņi no sadzīves notekūdeņu attīrīšanas iekārtas vai attiecīgas laboratorijas iekārtas. *MITI* metodei sējmateriāls ir maisījums no dažādiem avotiem, un metodes aprakstā tas aprakstīts atsevišķā iedaļā.

I.6.4.1. *Sējmateriāls no aktīvajām dūņām*

Ņem svaigu aktīvo dūņu paraugu no aerācijas tvertnes notekūdeņu attīrīšanas iekārtās vai laboratorijas iekārtās, kurās galvenokārt attīra sadzīves notekūdeņus. Ja vajadzīgs, atdala rupjās daļiņas, filtrējot caur smalku sietu, un pēc tam dūņas glabā aerobos apstākļos.

Pēc rupjo daļiņu atdalīšanas nostādina vai centrifugē (piemēram, 10 min pie 100 g). Dzidro šķīdumu izlej. Dūņas var skalot ar minerālbarotni. Koncentrētās dūņas suspendē minerālbarotnē, lai iegūtu suspendēto daļiņu koncentrāciju 3-5 g suspendēto daļiņu/1 un līdz lietošanai aerē.

Dūņas jāņem no parastām attīrīšanas iekārtām, kas darbojas pienācīgi. Ja dūņas jāņem no attīrīšanas iekārtām, kas darbojas ar pilnu jaudu, vai tās var saturēt inhibitorus, tās ir jāmazgā. Pēc rūpīgas sajaukšanas atkārtoti suspendētās dūņas[7] nostādina vai centrifugē, dzidro šķīdumu nolej un izmazgātās nogulsnes suspendē minerālbarotnē. Šo procedūru atkārto, līdz dūņas uzskatāmas par attīrītām no substrāta pārākuma vai inhibitora.

Pēc dūņu attīrīšanas vai arī no neattīrītām dūņām ņem paraugu tieši pirms lietošanas suspendēto daļiņu satura noteikšanai.

Otra alternatīva ir aktīvās dūņas homogenizēt (3-5 g suspendēto daļiņu/l). Dūņas mehāniskajā maisītājā 2 min. sajauc ar vidēju ātrumu. Sajauktās dūņas 30 min vai, ja vajadzīgs, ilgāk, nostādina, un šķidrumu dekantē izmantošanai par sējmateriālu 10 ml/l minerālbarotnes.

I.6.4.2. *Citi sējmateriāla avoti*

To var iegūt no attīrītiem notekūdeņiem, kurus aizvada no attīrīšanas iekārtām vai laboratorijas iekārtām, kurās galvenokārt attīra sadzīves notekūdeņi. Ņem svaigu paraugu un transportēšanas laikā tur aerobos apstākļos. Nostādina vienu stundu vai filtrē caur papīra filtru ar rupjām porām, un dekantātu vai filtrātu līdz lietošanai glabā aerobos apstākļos. Uz litru barotnes izmanto līdz 100 ml šāda sējmateriāla.

Vēl cits sējmateriāla avots ir virszemes ūdeņi. Šādā gadījumā ņem piemērota virszemes ūdens paraugu, piemēram, upes vai ezera ūdeni, un līdz lietošanai glabā aerobos apstākļos. Ja vajadzīgs, sējmateriālu koncentrē filtrējot vai centrifugējot.

I.6.5. **Sējmateriāla iepriekšēja kondicionēšana**

Sējmateriālu var iepriekš kondicionēt, bet ne pieradināt eksperimenta apstākļiem. Kondicionēšanu veic, aktīvās dūņas aerējot minerālbarotnē vai attīrītā notekūdenī 5-7 dienas izmēģinājuma vides temperatūrā. Iepriekšēja kondicionēšana dažkārt uzlabo noteikšanas metožu precizitāti, samazinot tukšajam paraugam noteiktās vērtības. Neuzskata par nepieciešamu kondicionēt sējmateriālu, veicot noteikšanu pēc *MITI* metodes.

I.6.6. **Abiotiskā kontrole**

Vajadzības gadījumos pārbauda testējamās vielas iespējamo abiotisko degradāciju nosakot izdalīto IOO, skābekļa uzņemšanu vai oglekļa dioksīda izdalīšanos sterilā kontrolē bez sējmateriāla. Sterilizē ar membrānfiltrāciju (0,2-0,45 mikrometri) vai vajadzīgajā koncentrācijā pievienojot piemērotu toksisku vielu. Ja izmanto membrānfiltrāciju, sterilitātes saglabāšanai paraugus ņem aseptiskos apstākļos. Ja iespējama pārbaudāmās vielas adsorbcija, bioloģiskās noārdīšanās spēju nosakot pēc IOO izdalīšanās, īpaši tad, ja par sējmateriālu izmanto aktīvās dūņas, jāiekļauj arī abiotiskā kontrole ar sējmateriālu, kas ir noindēts.

I.6.7. **Kolbu skaits**

Izmēģinājumu sērijai parasti izmantojamo kolbu skaits noteikts katras metodes aprakstā.

Var izmantot šādas kolbas:

testa suspensija: satur testējamo vielu un sējmateriālu,

sējmateriāla tukšais paraugs: satur tikai sējmateriālu,

noteikšanas kontrole: satur standartvielu un sējmateriālu,

abiotiskā sterilā kontrole: sterila, satur pārbaudāmo vielu (sk. I.6.6.),

adsorbcijas kontrole: satur pārbaudāmo vielu, sējmateriālu un sterilizējošo vielu,

toksicitātes kontrole: satur testējamo vielu, standartvielu un sējmateriālu,

Paralēli noteikti jānosaka testa suspensija un sējmateriāla tukšais paraugs. Ieteicams paralēli veikt noteikšanu arī citās kolbās.

Tomēr tas ne vienmēr ir iespējams. Jānodrošina, ka paraugs ir tik liels, lai varētu veikt noteikšanu vai nolasījumus 10 dienu intervālā.

I.7. DATI UN IZVĒRTĒŠANA

Aprēķinot degradācijas procentu D_t izmanto attiecīgā parametra vidējās vērtības, kas noteiktas pēc diviem atkārtojumiem testa suspensijai un sējmateriāla tukšajam paraugam. Formulas dotas turpmāk attiecīgo metožu aprakstos. Degradācijas procesu attēlo grafiski un norāda 10 dienu intervālu. Aprēķina izdalīšanās procentu 10 dienu intervāla beigās vai vajadzības gadījumā vērtību, kādu sasniedz noteikšanas beigās.

Respirometriskos mērījumos skābekļa uzņemšanu nitrifikācijas dēļ var ietekmēt slāpekli saturoši savienojumi (sk. II un V pielikumu).

I.7.1. **Degradācija, ko mēra, nosakot IOO**

Degradācijas procentu D_t katrām parauga ņemšanas laikam aprēķina atsevišķi kolbām ar testējamo vielu, izmantojot IOO mērījumu vidējās vērtības, kuras noteiktas pēc diviem atkārtojumiem, lai varētu novērtēt testa derīgumu (sk. I.5.2. punktu). To aprēķina pēc šāda vienādojuma:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

kur

D_t = degradācijas % laikā t,

C_0 = IOO vidējā sākuma koncentrācija barotnē ar sējmateriālu, kas satur testējamo vielu (mg IOO/l),

C_t = IOO vidējā koncentrācija barotnē ar sējmateriālu, kas satur testējamo vielu laikā t (mg IOO/l),

C_{bo} = IOO vidējā sākuma koncentrācija tukšajā paraugā ar sējmateriālu minerālbarotnē (mg IOO/l),

C_{bt} = IOO vidējā koncentrācija tukšajā paraugā ar sējmateriālu minerālbarotnē laikā t (mg IOO/l).

Visas koncentrācijas nosaka eksperimentāli.

I.7.2. **Degradācija, ko mēra ar īpašām analīzēm**

Ja ir pieejami īpaši analītiskie dati, aprēķina primāro biodegradāciju no:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kur:

D_t = degradācijas % laikā t, parasti 28 dienās,

S_a = testējamās vielas atlikušais daudzums barotnē ar sējmateriālu noteikšanas beigās (mg),

S_b = testējamās vielas atlikušais daudzums tukšajā paraugā ar ūdeni/barotni, kam pievienota tikai testējamā viela (mg).

I.7.3. **Abiotiskā degradācija**

Gadījumos, kad izmanto abiotisko sterilo kontroli, aprēķina abiotiskās degradācijas procentu pēc formulas:

$$\%\ \text{abiotiskā degradācija}\ (\%) = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kur

$C_{s(o)}$ = IOO koncentrācija sterilajā kontrolē 0-tajā dienā

$C_{s(t)}$ = IOO koncentrācija sterilajā kontrolē t dienā

I.8. PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda:

— nosakāmā viela, standartvielas, to tīrība,

— testēšanas apstākļi,

— sējmateriāls: īpašības un ņemšanas vieta(-s), koncentrācija un iepriekšēja kondicionēšana, ja tā veikta,

— rūpniecisko notekūdeņu sastāvs un daļa notekūdeņos, ja tie zināmi,

— testēšanas ilgums un temperatūra;

— par grūti šķīstošam vielām to apstrāde,

— izmantotā testēšanas metode; par visām noteikšanas procedūru izmaiņām jādod zinātnisks pamatojums,

— drošības datu lapa,;

— novērotās inhibēšanas parādības,

— novērotā abiotiskā degradācija,

— ķīmisko analīžu dati, ja ir pieejami,

— starpproduktu analīžu dati, ja pieejami,

— degradācijas procents atkarībā no laika testējamajai vielai un standartvielai diagrammas veidā; precīzi jānorāda kavējuma fāze, degradācijas fāze, 10 dienu intervāls un virziena koeficients (I pielikums). Ja tests veikts saskaņā ar derīguma kritērijiem, degradācijas procenta vidējās vērtības kolbām ar pārbaudāmo vielu var izmantot attēlošanai,

— izdalīšanās procents pēc 10 dienu intervāla, sasniedzot plato vai testēšanas beigās.

II DAĻA. IOO ATKRĀSOŠANĀS TESTS (C.4-A metode)

II.1. METODES PRINCIPS

Noteiktu tilpumu minerālās barotnes ar sējmateriālu, kas kā vienīgo oglekļa avotu satur zināmu testējamās vielas koncentrāciju (10-40 mg IOO/l) 22 ± 2 °C temperatūrā aerē tumsā vai izkliedētā apgaismojumā.

Pēc degradācijas 28 dienu periodā veic biežas IOO analīzes. Biodegradācijas pakāpi aprēķina pēc izdalītā IOO koncentrācijas (kas koriģēta pēc sējmateriāla tukšā parauga kontroles), ko izsaka procentos attiecībā pret sākuma koncentrāciju. Primārās biodegradācijas pakāpi var aprēķināt pēc inkubācijas sākumā un beigās veikto papildus ķīmisko analīžu rezultātiem.

II.2. TESTA METODES APRAKSTS

II.2.1. **Iekārta**

a) Koniskās kolbas, piemēram, 250 ml līdz 2 l tilpuma, atkarībā no IOO analīzei vajadzīgā tilpuma;

b) mehāniskais kratītājs koniskajām kolbām, ar automātisku temperatūras regulēšanu vai izmantošanai pastāvīgā telpas temperatūrā, ar pietiekamu jaudu aerobu apstākļu uzturēšanai visās kolbās;

c) filtrēšanas iekārta ar piemērotām membrānām;

d) IOO analizators;

e) aparāts izšķīdušā skābekļa noteikšanai;

f) centrifūga.

II.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

Rezerves šķīdumu sagatavošanu sk. I.6.2. punktu.

Sajauc 10 ml šķīduma a) ar 800 ml ūdens atšķaidīšanai, pievieno pa 1 ml b) līdz d) šķīduma un uzpilda līdz 1l ar ūdeni atšķaidīšanai.

II.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana un iepriekšēja kondicionēšana**

Sējmateriālu var iegūt dažādi: no aktīvajām dūņām; attīrītiem notekūdeņiem; virszemes ūdeņiem; augsnēm vai iepriekšmināto maisījuma.

Sk. I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. un I.6.5. punktu.

II.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Piemēram, 2 l tilpuma koniskajās kolbās pārnes pa 800 ml minerālbarotnes un pievieno pietiekamus tilpumus testējamās vielas un standartvielas rezerves šķīdumu atsevišķās kolbās, lai iegūtu ķīmisko vielu koncentrāciju, kas ekvivalenta 10-40 mg IOO/1. Pārbauda pH vērtības, kuras, ja vajadzīgs, noregulē līdz 7,4. Kolbās iesēj aktīvās dūņas vai sējmateriālu no cita avota (sk. I.6.4. punktu), lai iegūtu galīgo koncentrāciju, kas nepārsniedz 30 mg suspendēto daļiņu/l. Sagatavo arī sējmateriāla kontroli minerālbarotnē bez testējamās vielas vai standartvielas.

Ja vajadzīgs, vienu kolbu izmanto testējamās vielas iespējamās inhibitora iedarbības pārbaudei, apsējot šķīdumu, kurā minerālbarotnē ir salīdzināmas testējamās vielas un standartvielas koncentrācijas.

Ja vajadzīgs, vēl vienā sterilā kolbā, izmantojot ķīmisko vielu bez sējmateriāla (sk. I.6.6. punktu) pārbauda, vai notiek ķīmiskās vielas abiotiskā degradācija.

Ja testējamā viela varētu tikt ievērojamā daudzumā adsorbēta uz stikla, dūņām, u.c., papildus veic orientējošu novērtējumu, lai noteiktu iespējamo adsorbcijas pakāpi un tādējādi testa piemērotību konkrētajai vielai (sk. 1. tabulu). Vienā kolbā, kas satur testējamo vielu, pievieno sējmateriālu un sterilizējošu vielu.

Visās kolbās uzpilda kopējo tilpumu līdz 1 l ar minerālbarotni, un pēc samaisīšanas no katras kolbas ņem paraugu IOO sākuma koncentrācijas noteikšanai (sk. II.4. pielikumu). Kolbas noslēdz, piemēram, ar alumīnija foliju tā, lai notiktu kolbas satura gaisa apmaiņa ar apkārtējo atmosfēru. tad kolbas ievieto kratītājā un sāk testēšanu.

II.2.5. **Kolbu skaits parastā sērijā**

1. un 2. kolba: Testa suspensija

3. un 4. kolba: Sējmateriāla tukšais paraugs

5. kolba: Noteikšanas kontrole

vēlams, kā arī gadījumos, kad tas vajadzīgs:

6. kolba: Abiotiskā sterilā kontrole

7. kolba: Adsorbcijas kontrole

8. kolba: Toksicitātes kontrole

Sk. arī I.6.7.

II.2.6. **Darba gaita**

Visā testēšanas laikā divos atkārtojumos katrā kolbā nosaka IOO koncentrācijas pēc noteiktiem intervāliem pietiekami bieži, lai varētu noteikt 10 dienu intervāla sākumu un izdalīšanās procentu 10 dienu intervāla beigās. Katrai noteikšanai ņem minimāli nepieciešamo suspensijas daudzumu.

Pirms paraugu ņemšanas, ja vajadzīgs, kompensē iztvaikošanas zudumus, vajadzīgajā daudzumā pievienojot ūdeni atšķaidīšanai (sk. I.6.1. punktu). Barotni pirms parauga ņemšanas rūpīgi samaisa un raugās, lai kolbu sienām pielipušais materiāls tiktu izšķīdināts vai suspendēts. Paraugu tūlīt filtrē caur membrānfiltru vai centrifugē (sk. II.4. pielikums). Ja filtrētos vai centrifugētos paraugus neanalizē tajā paša dienā, 2-4 °C temperatūrā tos var glabāt līdz 48 stundām, bet 18°C temperatūrā – arī ilgāku laiku.

II.3. DATI UN PĀRSKATS

II.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Saskaņā ar I.7.1. punktu (IOO noteikšana) aprēķina degradācijas procentu laikā t, un fakultatīvi arī saskaņā ar I.7.2. punktu (īpašas analīzes).

Visus rezultātus reģistrē noteiktajās datu lapās.

II.3.2. **Rezultātu derīgums**

Sk. I.5.2. punktu.

II.3.3. **Pārskats**

Sk. I.8. punktu.

II.4. DATU LAPA

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

IOO ATKRĀSOŠANĀS TESTS

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l vielas veidā

Sākuma koncentrācija barotnē, t_0: mg/l vielas veidā

4. **SĒJMATERIĀLS**

Avots:

Attīrīšana:

Iepriekšēja kondicionēšana, ja veikta:

Suspendēto vielu koncentrācija reakcijas maisījumā: mg/1

5. **OGLEKĻA NOTEIKŠANA**

Oglekļa analizators:

	Kolbas Nr.		IOO pēc n dienām (mg/1)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testējamā viela plus sējmateriāls	1	a_1					
		a_2					
		a, vid. $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, vid. $C_{b(t)}$					
Sējmateriāla tukšais paraugs bez testējamās vielas	3	C_1					
		C_2					
		c, vid. $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, vid. $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **IZEJAS DATU NOVĒRTĒŠANA**

Kolbas Nr.		degradācijas % pēc n dienām				
		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				
Vidējā vērtība [1]	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

[1] D_1 un D_2 nevar aprēķināt vidējo vērtību, ja tie ir ievērojami atšķirīgi.

Piezīme: līdzīgus formātus var izmantot arī standartvielai un toksicitātes kontrolei.

7. **ABIOTISKĀ KONTROLE** (fakultatīvi)

	Laiks (dienas)	
	0	t
IOO konc. (mg/l) sterilajā kontrolē	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotiskā degradācija } (\%) = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFISKAS ĶĪMISKĀS ANALĪZES (fakultatīvi)**

	testējamās vielas atlikušais daudzums testēšanas beigās (mg/l)	primārā degradācija %
Sterilā kontrole	S_b	
Testa barotne ar sējmateriālu	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

III DAĻA. MODIFICĒTĀ ESAO SKRĪNINGA METODE (C.4-B metode)

III.l. METODES PRINCIPS

Noteiktu tilpumu minerālās barotnes, kas kā vienīgo oglekļa avotu satur zināmu testējamās vielas koncentrāciju (10-40 mg IOO/l) apsēj ar 0,5 ml attīrītu notekūdeņu uz litru barotnes. Maisījumu aerē tumsā vai izkliedētā apgaismojumā 22 ± 2 °C temperatūrā.

Pēc degradācijas 28 dienu periodā veic biežas IOO analīzes. Biodegradācijas pakāpi aprēķina pēc izdalītā IOO koncentrācijas (ko koriģē pēc sējmateriāla tukšā parauga kontroles), ko izsaka procentos attiecībā pret sākuma koncentrāciju. Primārās biodegradācijas pakāpi var aprēķināt pēc papildus inkubācijas sākumā un beigās veikto papildus ķīmisko analīžu rezultātiem.

III.2. TESTA METODES APRAKSTS

III.2.1. **Aprīkojums**

a) Koniskās kolbas, piemēram, no 250 ml līdz 2 1 tilpuma, atkarībā no IOO analīzei vajadzīgā tilpuma;

b) mehāniskais kratītājs koniskajām kolbām, ar automātisku temperatūras regulēšanu vai izmantošanai pastāvīgā telpas temperatūrā, ar pietiekamu jaudu aerobu apstākļu uzturēšanai visās kolbās;

c) filtrēšanas iekārta ar piemērotām membrānām;

d) IOO analizators;

e) aparāts izšķīdušā skābekļa noteikšanai;

f) centrifūga.

III.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

Rezerves šķīdumu sagatavošanu sk. I.6.2.

Sajauc 10 ml šķīduma a) ar 80 ml ūdens atšķaidīšanai, pievieno pa 1 ml b) līdz d) šķīduma un uzpilda līdz 1l ar ūdeni atšķaidīšanai.

Pēc šīs metodes par sējmateriālu izmanto tikai 0,5 ml attīrītu notekūdeņu/l, un tāpēc barotne var būt jāpastiprina ar mikroelementiem un augšanas stimulatoriem. To dara, uz litru gatavas barotnes pievienojot pa 1 ml šādu šķīdumu:

Mikroelementu šķīdums:

Mangāna sulfāta tetrahidrāts, $MnSO_4 . 4H_20$	39,9 mg
Borskābe, H_3BO_3	57,2 mg
Cinka sulfāta heptahidrāts, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Amonija heptamolibdāts $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe helāts ($FeCl_3$ ethilēndiamīntetraetiķskābe)	100,0 mg

Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram.

Vitamīnu šķīdums:

Rauga ekstrakts	15,0 mg

Rauga ekstraktu izšķīdina 100 ml ūdens. Sterilizē, filtrējot caur 0,2 mikronu membrānas filtru, vai gatavo svaigu.

III.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana un iepriekšēja kondicionēšana**

To var iegūt no attīrītiem notekūdeņiem, kurus aizvada no attīrīšanas iekārtām vai laboratorijas iekārtām, kurās galvenokārt attīra sadzīves notekūdeņus. Sk. I.6.4.2. un I.6.5. punktu.

Izmanto 0,5 ml uz litru barotnes.

III.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Piemēram, 2 l tilpuma koniskajās kolbās pārnes pa 800 ml minerālbarotnes un pievieno pietiekamus tilpumus testējamās vielas un standartvielas rezerves šķīdumu atsevišķās kolbās, lai iegūtu ķīmisko vielu koncentrāciju, kas ekvivalenta 10-40 mg IOO/1. Pārbauda pH vērtības, kuras, ja vajadzīgs, noregulē līdz 7,4. Kolbas apsēj ar attīrītiem notekūdeņiem 0,5 ml/l (sk. I.6.4.2. punktu). Sagatavo arī sējmateriāla kontroli minerālbarotnē bez testējamās vielas vai standartvielas.

Ja vajadzīgs, vienu kolbu izmanto testējamās vielas iespējamās inhibitora iedarbības pārbaudei, apsējot šķīdumu, kurā minerālbarotnē ir salīdzināmas testējamās vielas un standartvielas koncentrācijas. Ja vajadzīgs, vēl vienā sterilā kolbā, izmantojot ķīmisko vielu bez sējmateriāla (sk. I.6.6. punktu) pārbauda, vai notiek ķīmiskās vielas abiotiskā degradācija.

Ja testējamā viela varētu tikt ievērojamā daudzumā adsorbēta uz stikla, dūņām, u.c., papildus veic orientējošu novērtējumu, lai noteiktu iespējamo adsorbcijas pakāpi un tādējādi testa piemērotību konkrētajai vielai (sk. 1. tabulu). Vienā kolbā, kas satur testējamo vielu, pievieno sējmateriālu un sterilizējošu vielu.

Visās kolbās uzpilda kopējo tilpumu līdz 1 l ar minerālbarotni, un pēc samaisīšanas no katras kolbas ņem paraugu IOO sākuma koncentrācijas noteikšanai (sk. II.4. pielikumu). Kolbas noslēdz, piemēram, ar alumīnija foliju tā, lai notiktu kolbas satura gaisa apmaiņa ar apkārtējo atmosfēru. Tad kolbas ievieto kratītājā un sāk testēšanu.

III.2.5. **Kolbu skaits parastā sērijā**

1. un 2. kolba: Testa suspensija

3. un 4. kolba: Sējmateriāla tukšais paraugs

5. kolba: Noteikšanas kontrole

vēlams, kā arī gadījumos, kad tas vajadzīgs:

6. kolba: Abiotiskā sterilā kontrole

7. kolba: Adsorbcijas kontrole

8. kolba: Toksicitātes kontrole

Sk. arī I.6.7.

III.2.6. **Testa gaita**

Visā testēšanas laikā divos atkārtojumos katrā kolbā nosaka IOO koncentrācijas pēc noteiktiem intervāliem pietiekami bieži, lai varētu noteikt 10 dienu intervāla sākumu un izdalīšanās procentu 10 dienu intervāla beigās. Katrai noteikšanai ņem minimāli nepieciešamo suspensijas daudzumu.

Pirms paraugu ņemšanas, ja vajadzīgs, kompensē iztvaikošanas zudumus, vajadzīgajā daudzumā pievienojot ūdeni atšķaidīšanai. Barotni pirms parauga ņemšanas rūpīgi samaisa un raugās, lai kolbu sienām pielipušais materiāls tiktu izšķīdināts vai suspendēts. Paraugu tūlīt filtrē caur membrānfiltru vai centrifugē (sk. II.4. pielikumu). Ja filtrētos vai centrifugētos paraugus neanalizē tajā paša dienā, 2-4 °C temperatūrā tos var glabāt līdz 48 stundām, bet 18°C temperatūrā – arī ilgāku laiku.

III.3. DATI UN PĀRSKATS

III.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Saskaņā ar I.7.1. punktu (IOO noteikšana) aprēķina degradācijas procentu laikā t, un fakultatīvi arī saskaņā ar I.7.2. punktu (īpašas analīzes).

Visus rezultātus reģistrē noteiktajās datu lapās.

III.3.2. **Rezultātu derīgums**

Sk. I.5.2. punktu.

III.3.3. **Pārskats**

Sk. I.8. punktu.

III.4. DATU LAPA

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

MODIFICĒTS ESAO SKRĪNINGA TESTS

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l vielas veidā

Sākuma koncentrācija barotnē, t_0: mg/l vielas veidā

4. **SĒJMATERIĀLS**

Avots:

Attīrīšana:

Iepriekšēja kondicionēšana, ja veikta:

Suspendēto vielu koncentrācija reakcijas maisījumā: mg/l

5. **OGLEKĻA NOTEIKŠANA**

Oglekļa analizators:

	Kolbas Nr.		IOO pēc n dienām (mg/1)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testējamā viela un sējmateriāls	1	a_1					
		a_2					
		a, vid. $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, vid. $C_{b(t)}$					
Sējmateriāla tukšais paraugs bez testējamās vielas	3	C_1					
		C_2					
		c, vid. $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, vid. $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **IZEJAS DATU NOVĒRTĒŠANA**

Kolbas Nr.		degradācijas % pēc n dienām				
		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				
Vidējā vērtība ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) Pēc D_1 un D_2 nevar aprēķināt vidējo vērtību, ja tie ir ievērojami atšķirīgi.

Piezīme: līdzīgus formātus var izmantot arī standartvielai un toksicitātes kontrolei.

7. **ABIOTISKĀ KONTROLE** (fakultatīvi)

	Laiks (dienas)	
	0	t
IOO konc. (mg/1) sterilajā kontrolē	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotiskā degradācija } (\%) = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFISKAS ĶĪMISKĀS ANALĪZES** (pēc izvēles)

	testējamās vielas atlikušais daudzums testēšanas beigās (mg/l)	primārā degradācija %
Sterilā kontrole	S_b	
Testa barotne ar sējmateriālu	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV DAĻA. CO_2 IZDALĪŠANĀS TESTS (C.4-C metode)

IV.1. METODES PRINCIPS

Noteiktu tilpumu minerālās barotnes ar sējmateriālu, kas kā vienīgo oglekļa avotu satur zināmu testējamās vielas koncentrāciju (10-20 mg IOO/l) 22 ± 2 °C temperatūrā aerē tumsā vai izkliedētā apgaismojumā. Degradācija notiek 28 dienas, nosakot izdalīto oglekļa dioksīdu, ko uztver bārija vai nātrija hidroksīdā, un kuru nosaka, attitrējot hidroksīda pārākumu vai neorganiskā oglekļa veidā. No testējamās vielas izdalījušos oglekļa dioksīdu (kas koriģēts pēc sējmateriāla tukšā parauga) izsaka procentos TCO_2. Primārās biodegradācijas pakāpi var aprēķināt pēc inkubācijas sākumā un beigās veikto papildus IOO analīžu rezultātiem.

IV.2. TESTA METODES APRAKSTS

IV.2.1. **Aprīkojums**

a) Kolbas, 2-5 l tilpuma ar aerācijas cauruli, kas iet gandrīz līdz kolbas dibenam un izplūdi;

b) magnētiskie maisītāji gadījumos, kad testē mazšķīstošas vielas;

c) gāzu absorbcijas pudeles;

d) ierīce gaisa plūsmas regulēšanai un mērīšanai;

e) aparāts oglekļa dioksīda saistīšanai, ko izmanto tāda gaisa sagatavošanai, no kura izdalīts oglekļa dioksīds; var izmantot arī no CO_2 attīrīta skābekļa un slāpekļa maisījumu no gāzes baloniem pareizās attiecībās (20 % O_2:80 % N_2);

f) oglekļa dioksīda noteikšanas ierīce titrimetriski vai neorganiskā oglekļa analizatora veidā;

g) membrānfiltrēšanas ierīce (fakultatīvi);

h) IOO analizators (fakultatīvi).

IV.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

Rezerves šķīdumu sagatavošanu sk. I.6.2. punktu.

Sajauc 10 ml šķīduma a) ar 800 ml ūdens atšķaidīšanai, pievieno pa 1 ml b) līdz d) šķīduma un uzpilda līdz 1l ar ūdeni atšķaidīšanai.

IV.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana un iepriekšēja kondicionēšana**

Sējmateriālu var iegūt dažādi: no aktīvajām dūņām; attīrītiem notekūdeņiem; virszemes ūdeņiem; augsnēm vai iepriekšminēto maisījuma.

Sk. I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. un I.6.5. punktu.

IV.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Piemēra veidā turpmāk norādīti tilpumi un svērumi 5 l tilpuma kolbām, kurās ir 3 l suspensijas. Ja izmanto mazākus tilpumus, skaitļus attiecīgi modificē, taču nodrošina, lai varētu precīzi izmērīt izdalījušos oglekļa dioksīda daudzumu.

Katrā 5 l tilpuma kolbā pārnes 2400 ml minerālbarotnes. Pievieno attiecīgu daudzumu sagatavoto aktīvo dūņu (sk. I.6.4.1. un I.6.5. punktu) tā, lai suspendēto daļiņu saturs galīgajos 3 l maisījuma ar sējmateriāla nepārsniegtu 30 mg/l.

Sagatavotās dūņas var arī vispirms atšķaidīt, iegūstot 500-1000 mg/l suspensijai minerālbarotnē, un tās alikvotu pievienot 5 l tilpuma kolbas saturam, lai iegūtu koncentrāciju 30 mg/l; tādējādi tiek nodrošināta lielāka precizitāte. Var izmantot citus sējmateriāla avotus (sk. I.6.4.2. punktu).

Apsētos maisījumus līdz nākamajai dienai aerē ar gaisu, no kura attīrīts CO_2, lai no sistēmas aizvadītu oglekļa dioksīdu.

Pievieno testējamo vielu un atsevišķi standartvielu noteikta rezerves šķīduma tilpuma veidā, lai pievienotās vielas nodrošinātu 10 līdz 20 mg IOO vai TOC/l; dažās kolbām ķīmiskās vielas nepievieno sējmateriāla kontrolei. Mazšķīstošas testējamās vielas kolbās tieši pievieno pēc svara vai tilpuma, vai rīkojas, kā aprakstīts III pielikumā.

Ja vajadzīgs, vienu kolbu izmanto, lai pārbadītu testējamās vielas iespējamo inhibējošo iedarbību, gan testējamo vielu, gan standartvielu pievienojot tādās pašās koncentrācijas kā pārējās kolbās.

Ja vajadzīgs, vēl vienā sterilā kolbā, izmantojot ķīmisko vielu bez sējmateriāla (sk. I.6.6. punktu) pārbauda, vai notiek ķīmiskās vielas abiotiska degradācija. Sterilizē, vajadzīgajā koncentrācijā pievienojot toksisku vielu.

Visās kolbās suspensijas atšķaida līdz 3 l, pievienojot minerālbarotni, kas pirms tam aerēta ar gaisu, kas attīrīts no CO_2. Ja vajadzīgs, var ņemt paraugus IOO analīzei (sk. II.4. pielikumā) un/vai kādu īpašu analīzi. Gaisa izplūdē no kolbām pievieno absorbcijas pudeles.

Ja izmanto bārija hidroksīdu, visām 5 l kolbām virknē pievieno trīs absorbcijas pudeles, kurās katrā ir 100 ml 0,0125 M bārija hidroksīda šķīduma. Šķīdumā nedrīkst būt sulfātu un karbonātu nogulšņu, un tā koncentrācija jānosaka tieši pirms lietošanas. Izmantojot nātrija hidroksīdu, pievieno divus uztvērējus, no kuriem otrais tiek izmantots kontrolei, lai pārliecinātos, ka viss oglekļa dioksīds ir absorbēts pirmajā. Var izmantot ar seruma pudeļu aizbāžņiem aprīkotas absorbcijas pudeles. Katrā pudelē pārnes 200 ml 0,05 M nātrija hidroksīda šķīduma, kas ir pietiekami visa izdalītā oglekļa dioksīda daudzuma absorbēšanai, testējamajai vielai pilnīgi noārdoties. Arī tikko pagatavots nātrija hidroksīda šķīdums nelielā daudzumā satur karbonātus; to koriģē, atņemot karbonātu saturu tukšajā paraugā.

IV.2.5. **Kolbu skaits parastā sērijā**

1. un 2. kolba: Testa suspensija

3. un 4. kolba: Sējmateriāla tukšais paraugs

5. kolba: Noteikšanas kontrole

vēlams, kā arī gadījumos, kad tas vajadzīgs:

6. kolba: Abiotiskā sterilā kontrole

7. kolba: Toksicitātes kontrole

8. kolba: Toksicitātes kontrole

Sk. arī I.6.7. punktu.

IV.2.6. **Testa gaita**

Testēšanu sāk, caur suspensiju ar ātrumu 30-100 ml/min barbotējot no CO_2 attīrītu gaisu. Periodiski CO_2 satura noteikšanai ņem absorbenta paraugus. Pirmo 10 dienu laikā ieteicams analīzes izdarīt katru otro vai trešo dienu, pēc tam līdz 28. dienai katru piekto dienu tā, lai varētu noteikt 10 dienu intervālu.

Ņem paraugus 28. dienā IOO un/vai specifiskām analīzēm, mēra suspensijas pH un katrā kolbā pievieno 1 ml koncentrētas hlorūdeņražskābes; kolbas līdz nākamajai dienai aerē, lai no testējamajām suspensijām aizvadītu oglekļa dioksīdu. Pēdējo izdalītā oglekļa dioksīda analīzi veic 29. dienā.

Dienās, kad nosaka CO_2, atvieno kolbai tuvāko absorberu ar bārija hidroksīdu, un hidroksīda šķīdumu titrē ar 0,05 M HCl par indikatoru izmantojot fenolftaleīnu. Palikušos absorberus pārvieto par vienu vietu tuvāk kolbai un galā pievieno jaunu absorberu, kurā ir 100 ml svaiga 0,0125 M bārija hidroksīda. Pēc vajadzības veic titrēšanu, piemēram, gadījumos, kad pirmajā uztvērējā ievērojamā daudzumā veidojas nogulsnes un pirms tās rodas otrajā uztvērējā, vai vismaz reizi nedēļā. Ja par absorbentu izmanto NaOH, ar šļirci ņem nelielu paraugu (atkarībā no izmantotā oglekļa analizatora parametriem) nātrija hidroksīda no kolbai tuvākā absorbera. Paraugu injicē oglekļa analizatora 1C daļā izdalījušās oglekļa dioksīda tiešai noteikšanai.

Otrā uztvērēja saturu analizē tikai testēšanas beigās, lai noteiktu oglekļa dioksīda pārneses korekciju.

IV.3. DATI UN PĀRSKATS

IV.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Absorberā uztvertā CO_2 daudzumu pēc titrēšanas aprēķina šādi:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

kur:

V = 100 ml absorberā esošā tilpuma titrēšanai izmantotā HC1 daudzums (ml),

C_B = bārija hidroksīda šķīduma koncentrācija (M),

C_A = hlorūdeņražskābes šķīduma koncentrācija (M),

ja C_B ir 0,0125 M un C_A ir 0,05 M, 100 ml bārija hidroksīda titrēšanai patērē 50 ml, un CO_2 aprēķina šādi:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCL titrated} = 1.1 \times \text{ml HCL}$$

Tādējādi šajā gadījumā titrēšanai izlietoto HCl tilpumu pārvērš mg izdalītā CO_2, to reizinot ar koeficientu 1,1.

Izmantojot attiecīgos titrēšanas rezultātus, aprēķina sējmateriāla un sējmateriāla kopā ar testējamo vielu izdalītā CO_2 daudzumus, kuru starpība ir ķīmiskās vielas izdalītā CO_2 daudzums.

Piemēram, ja sējmateriāla titrēšanai patērē 48 ml, bet sējmateriāla kopā ar testējamo vielu titrēšanai – 45 ml,

CO_2 daudzums no sējmateriāla = 1,1 x (50-48) = 2,2 mg

CO_2 daudzums no sējmateriāla kopā ar testējamo vielu = 1,1 x (50-45) = 5,5 mg

un tādējādi testējamās vielas izdalītā CO_2 masa ir 3,3 mg.

Biodegradāciju procentos aprēķina, izdalījušos CO_2 daudzumu miligramos reizinot ar 100 un dalot ar TCO_2 reizinājumu ar pievienotās testējamās vielas daudzumu miligramos šādi:

$$\text{degradācija } (\%) = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ produced} \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg test chemical added}}$$

vai izdalījušos CO_2 daudzumu miligramos reizinot ar 100 un dalot ar TOC pievienoto daudzumu, kas reizināts ar 3,67

$$\text{degradācija } (\%) = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ produced} \times 100}{\text{mg TOC added in test} \times 3.67}$$

kur 3,67 pārrēķina koeficients oglekļa izteikšanai oglekļa dioksīdā (44/12).

Degradācijas procentu konkrētā laika periodā nosaka, saskaitot katrai tā dienai aprēķinātās TCO_2 vērtības līdz termiņam, kuram to nosaka.

Nātrija hidroksīda absorberiem aprēķina izdalīto oglekļa dioksīda daudzumu, ko izsaka IC (mg), reizinot IC koncentrāciju absorbentā ar absorbenta tilpumu.

Degradācijas procentu aprēķina, ņemot vērā neorganiskā oglekļa daudzumu, kas izdalījies no testa kolbas un tukšā parauga, to miligramos izteiktu starpību dalot ar TOC, kas pievienots testējamās vielas veidā, pēc formulas:

$$\% \ ThCO_2 = \frac{\text{mg IC from test flask} - \text{mg IC from black}}{\text{mg TOC added as test chemical}} \times 100$$

Pēc apraksta I.7. punktā aprēķina IOO izdalīšanos (nav obligāti) Šos un visus pārējos rezultātus reģistrē noteiktajās datu lapās.

IV.3.2. **Rezultātu derīgums**

Testējamās vielas suspensijas koncentrācija minerālbarotnē testēšanas sākumā nedrīkst būt zemāka par 5 % TC, un no sējmateriāla tukšā parauga kopējam izdalītajam CO_2 daudzumam testēšanas beigās parasti nevajadzētu pārsniegt 40 mg/l barotnes. Ja tiek noteiktas par 70 mg CO_2/l lielākas vērtības, kritiski jāizvērtē gan iegūtie dati, gan izraudzītā noteikšanas metode.

Sk. arī I.5.2. punktu.

IV.3.3. **Pārskats**

Sk. I.8. punktu.

IV.4. DATU LAPA

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

OGLEKĻA DIOKSĪDA IZDALĪŠANĀS TESTS

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums:

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l vielas veidā

Sākuma koncentrācija barotnē: mg/l vielas veidā

Kolbā pievienotais kopīgais C daudzums: mg C

TCO_2: mg CO_2

4. **SĒJMATERIĀLS**

Avots:

Attīrīšana:

Iepriekšēja kondicionēšana, ja veikta:

Suspendēto vielu koncentrācija reakcijas maisījumā: mg/l

5. **OGLEKĻA DIOKSĪDA PRODUCĒŠANA UN BIODEGRADĒJAMĪBA**

Metode: $Ba(OH)_2$/NaOH/cita

Laiks (dienas)	CO_2 veidošanās no testējamā parauga (mg)		CO_2 veidošanās no tukšā parauga (mg)		CO_2 veidošanās kumulatīvi (mg) (testējamā parauga un tukšā parauga starpība vidēji)		% $ThCO_2$ $\frac{\text{kumulatīvais } CO_2 \text{ daudzums}}{ThCO_2} \times 100$		
	1 2	vidējā vērtība	3 4	vidējā vērtība	1	2	1	2	vidējā vērtība
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Piezīme: līdzīgus formātus var izmantot arī standartvielai un toksicitātes kontrolei.

6. **OGLEKĻA ANALĪZE** (fakultatīvi)

Oglekļa analizators:

Laiks (dienas)	Tukšais paraugs (mg/l)	Testējamā viela (mg/l)
0	$C_{b(o)}$	C_0
28 ([1])	$C_{b(t)}$	C_t
([1]) vai inkubēšanas beigās		

$$\text{izdalītais DOC } (\%) = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTISKĀ DEGRADĀCIJA** (nav obligāti)

$$\text{abiotiskā degradācija } (\%) = \frac{CO_2 - \text{sterilajā kolbā pēc 28 dienām izveidojušos CO2}}{\text{daudzumu miligramos dala ar } ThCO_2 :} \times 100$$

V DAĻA. MANOMETRISKĀ RESPIROMETRIJA (C.4.-D metode)

V.l. METODES PRINCIPS

Noteiktu tilpumu apsētas minerālbarotnes, kura satur zināmu koncentrāciju testējamās vielas (100 mg/l testējamās vielas, kas rada vismaz 50 –100 mg TSP/l) kā nomināli vienīgo organiskā oglekļa avotu, līdz 28 dienām maisa noslēgtā kolbā pastāvīgā temperatūrā (± 1°C). Skābekļa patēriņu nosaka, mērot (elektrolītiski izdalītā) skābekļa daudzumu, kas vajadzīgs gāzes pastāvīga tilpuma uzturēšanai respirometra kolbā, vai pēc tilpuma vai spiediena (vai to abu) izmaiņām aparātā. Izdalījušos oglekļa dioksīdu absorbē kālija hidroksīda šķīdumā vai ar kādu citu šim nolūkam piemērotu absorbentu. Testējamās ķīmiskās vielas patērēto skābekļa daudzumu (ko koriģē pēc paralēli noteiktā tukšā parauga šķīduma patērētā daudzuma) izsaka kā TSP vai ĶSP daļu procentos. Primārās biodegradācijas pakāpi var aprēķināt arī pēc inkubācijas sākumā un beigās veikto papildus specifisko analīžu rezultātiem, bet kopējo biodegradāciju – pēc IOO analīzes rezultātiem.

V.2. METODES APRAKSTS

V.2.1. **Iekārta**

a) piemērots respirometrs;

b) temperatūras regulēšanas ierīce, kas uztur temperatūru vismaz ± 1 °C robežās vai precīzāk;

c) membrānfiltrēšanas ierīce (fakultatīvi);

d) oglekļa analizators (fakultatīvi).

V.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

Rezerves šķīdumu sagatavošanu sk. I.6.2. punktu.

Sajauc 10 ml šķīduma a) ar 800 ml ūdens atšķaidīšanai, pievieno pa 1 ml b) līdz d) šķīduma un uzpilda līdz 1l ar ūdeni atšķaidīšanai.

V.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana un iepriekšēja kondicionēšana**

Sējmateriālu var iegūt dažādi: no aktīvajām dūņām; attīrītiem notekūdeņiem; virszemes ūdeņiem un augsnēm vai iepriekšminēto maisījuma.

Sk. I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. un I.6.5. punktu.

V.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Atsevišķās sērijās no rezerves šķīdumiem sagatavo testējamās vielas un standartvielas šķīdumus minerālbarotnē, parasti 100 mg vielas litrā (kas dod vismaz 50-100 mg TSP/l).

Ja nav sagaidāma nitrifikācija, kad attiecīgos aprēķinus izdara pēc nitrātu veidošanās, TSP vērtību aprēķina, veidojoties amonija sāļiem (sk. II.2. pielikumu).

Pārbauda pH vērtības, kuras, ja vajadzīgs, noregulē līdz 7,4 ± 0,2.

Mazšķīstošas vielas pievieno vēlāk (sk. turpmāk).

Ja jānosaka testējamās vielas toksicitāte, pagatavo vēl vienu šķīdumu minerālbarotnē, kas satur testējamo vielu un standartvielu tādās pašās koncentrācijās kā to atsevišķi pagatavotie šķīdumi.

Ja jāveic skābekļa fizikāli ķīmiskā patēriņa mērījumi, sagatavo testējamās vielas šķīdumu, parasti ar koncentrāciju 100 mg TSP/l, kas sterilizēts, pievienojot piemērotu toksisku vielu (sk. I.6.6. punktu).

Kolbās vismaz divos atkārtojumos pārnes attiecīgos testējamās vielas un standartvielas šķīdumu daudzumus. Pārējās kolbās pārnes tikai minerālbarotni (sējmateriāla kontrolei) un ja vajadzīgs, testējamās vielas un standartvielas jaukto šķīdumu, un sterilo šķīdumu.

Ja testējamā viela ir mazšķīstoša, šajā noteikšanas posmā to tieši pievieno pēc svara vai tilpuma, vai rīkojas, kā aprakstīts III pielikumā. CO_2 absorberā iepilda kālija hidroksīdu, nātronkaļķus vai citu absorbentu.

V.2.5. **Kolbu skaits parastā sērijā**

1. un 2. kolba: Testa suspensija

3. un 4. kolba: Sējmateriāla tukšais paraugs

5. kolba: Noteikšanas kontrole

vēlams, kā arī gadījumos, kad tas vajadzīgs:

6. kolba: Sterilā kontrole

7. kolba: Toksicitātes kontrole

8. kolba: Toksicitātes kontrole

Sk. arī I.6.7. punktu.

V.2.6. **Testa gaita**

Kolbas iztur vajadzīgajā temperatūrā un tās, kuras vajadzīgs, apsēj ar aktīvajām dūņām vai citu sējmateriālu tā, lai suspendēto vielu koncentrācija nepārsniegtu 30 mg/l. Iekārtu samontē, iedarbina maisītāju, pārbauda aparāta hermētiskumu un sāk skābekļa patēriņa mērījumus. Parasti aparāts var darboties bez pastāvīgas uzraudzības un var veikt tikai nolasījumus un ikdienas pārbaudes, lai pārliecinātos, ka tiek uzturēta pareizs temperatūras un maisīšanas režīms.

Pēc regulāri un bieži veikto nolasījumu rezultātiem ar iekārtas ražotāja norādītajām metodēm aprēķina patērēto skābekļa daudzumu. Inkubēšanas beigās, kas parasti ir pēc 28 dienām, izmēra kolbu satura pH, īpaši tad, ja skābekļa patēriņš ir zems, vai arī tas ir lielāks par TSP_{NH4} (slāpekļa savienojumiem).

Ja vajadzīgs, sākumā un beigās no respirometra kolbām ņem paraugus IOO vai attiecīgās ķīmiskās vielas noteikšanai (sk. II.4. pielikumu). Ņemot paraugu pirmoreiz, jārīkojas tā, lai būtu zināms kolbā palikušās suspensijas daudzums. Ja skābekli patērē testējamā viela, kuras sastāvā ir slāpeklis, nosaka nitrītu un nitrātu satura palielināšanos 28 dienu laikā un aprēķina nitrifikācijai patērētā skābekļa daudzuma korekciju (V pielikums).

V.3. DATI UN PĀRSKATS

V.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Testējamās vielas skābekļa patēriņu (mg) pēc noteikta laika (kas koriģēts pēc sējmateriāla tukšā parauga patēriņu tajā pašā laikā) dala ar izmantotās testējamās vielas daudzumu. Tādējādi aprēķina BSP, kas izteikts mg skābekļa/mg testējamās vielas, t.i.,

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg } O_2\text{, ko patērē testējamā viela - mg } O_2\text{, ko patērē sējmateriāla tukšais paraugs}}{\text{mg testējamās vielas kolbā}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ uz mg testējamās vielas.}$$

degradācijas procentu aprēķina pēc formulas:

$$\text{biodegradācija (\%)} = \%\text{ThOD} = \frac{\text{BOD(mg } O_2\text{/mg BSP (mg } O_2\text{/mg vielas))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg TSP (mg}O_2 \text{ vielas))}} \times 100$$

Vai

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg BSP (mg } O_2\text{/mg vielas))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg ĶSP (mg } O_2\text{/mg vielas))}} \times 100$$

Jāpiezīmē, ka pēc šīm abām metodēm iegūto rezultātu skaitliskās vērtības ne vienmēr ir vienādas; ieteicams izmantot šo otru metodi.

Testējamajām vielām, kuras satur slāpekli, atkarībā no tā, kas ir sagaidāms vai zināms attiecībā uz nitrifikāciju, izmanto attiecīgo TSP (NH_4 vai NO_3) vērtību (II.2. pielikums). Ja nitrifikācija notiek, taču ne pilnīgi, pēc nitrītjonu un nitrātjonu koncentrāciju izmaiņām aprēķina korekciju skābeklim, kas patērēts nitrifikācijai (V pielikums).

Ja fakultatīvi nosaka arī organiskā oglekļa un/vai attiecīgās vielas saturu, degradācijas procentu aprēķina saskaņā ar I.7. punktu.

Visus rezultātus reģistrē pievienotajās datu lapās.

V.3.2. **Rezultātu derīgums**

Sējmateriāla tukšā parauga skābekļa patēriņš parasti ir 20-30 mg O_2/l, un 28 dienās tas nedrīkst pārsniegt 60 mg/l. Ja tā vērtības pārsniedz 60 mg/l, kritiski jāizvērtē eksperimentālie dati un to iegūšanas metodes. Ja pH vērtība nav robežās no 6-8,5 un testējamās vielas skābekļa patēriņš nepārsniedz 60 %, noteikšana jāatkārto ar testējamo vielu zemākā koncentrācijā.

Sk. arī I.5.2. punktu.

V.3.3. **Pārskats**

Skatīt I.8. punktu

V.4. DATU LAPA

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

MANOMETRISKĀS RESPIROMETRIJAS METODE

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums:

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l

Sākuma koncentrācija barotnē, C_0: mg/l

Testa kolbas tilpums (V): ml

TSP vai ĶSP: mg O_2/mg testējamās vielas (NH_4, NO_3)

4. **SĒJMATERIĀLS**

Avots:

Attīrīšana:

Iepriekšēja kondicionēšana, ja veikta:

Suspendēto vielu koncentrācija reakcijas maisījumā: mg/1

5. **SKĀBEKĻA PATĒRIŅŠ: BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANĀS SPĒJA**

		Laiks (dienas)											
		0		7		14			21			28	
testējamās vielas O_2 patēriņš (mg)	1												
	2												
	a, vidēji												
tukšā parauga O_2 patēriņš (mg)	3												
	4												
	b, vidēji												
Koriģētais BSP (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BSP uz mg testējamās vielas	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												
degradācija % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 $(_{a1})$												
	D_2 (a_2)												
	Vidējā vērtība [1]												
V = barotnes tilpums testa kolbā													

[1] Pēc D_1 un D_2 nevar aprēķināt vidējo vērtību, ja tie ir ievērojami atšķirīgi.

NB. Līdzīgus formātus var izmantot arī standartvielai un toksicitātes kontrolei.

6. **NITRIFIKĀCIJAS KOREKCIJA** (sk. V pielikumu)

Diena	0	28	Starpība
i) nitrātjonu koncentrācija (mg N/l)			N
ii) skābekļa ekvivalents (4,57 x N x V) (mg)	—	—	
iii) nitrītjonu koncentrācija (mg N/l)			N
iv) skābekļa ekvivalents (3,43 x N x V) (mg)	—	—	
(ii + iv) kopīgais skābekļa ekvivalents	—	—	

7. **OGLEKĻA ANALĪZE** (nav obligāti)

Oglekļa analizators:

Laiks (dienas)	Tukšais paraugs (mg/l)	Testējamā viela (mg/l)
0	(C_{blo})	(C_0)
28 [1]	(C_{bit})	(C_t)
[1] vai inkubēšanas beigās		

$$\% \text{ DOC izdalītais IOO } (\%) = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **KONKRĒTĀ VIELA (fakultatīvi)**

S_b = koncentrācija fizikāli ķīmiskajā (sterilajā) kontrolē pēc 28 dienām

S_a = koncentrācija kolbā ar sējmateriālu pēc 28 dienām.

$$\text{biodegradācija } (\%) = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTISKĀ DEGRADĀCIJA** (fakultatīvi)

a = skābekļa patēriņš sterilajās kolbās pēc 28 dienām, (mg)

$$\text{skābekļa patēriņš uz mg testējamās vielas} = \frac{a}{C_o V}$$

(sk. 1. un 3. iedaļu)

$$\text{abiotiskā degradācija } (\%) = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

VI DAĻA. SLĒGTO PUDEĻU METODE (C.4.-E metode)

VI.1. METODES PRINCIPS

Testējamās vielas šķīdumu minerālbarotnē, parasti 2-5 mg/l, apsēj ar relatīvi nelielu jauktas populācijas sējmateriāla daudzumu un pilnīgi piepildītas noslēgtās pudeles iztur tumšā vietā pastāvīgā temperatūrā. Pēc degradācijas 28 dienu periodā veic izšķīdušā skābekļa analīzes. Testējamās ķīmiskās vielas patērēto skābekļa daudzumu, ko koriģē pēc paralēli noteiktā tukšā parauga šķīduma patērētā daudzuma, izsaka kā TSP vai ĶSP daļu procentos.

VI.2. METODES APRAKSTS

VI.2.1. **Iekārta**

a) BSP noteikšanas pudeles ar stikla aizbāžņiem, piemēram, 250-300 ml;

b) ūdens vanna vai termostats, kurā pudeles iztur tumsā nemainīgā temperatūrā (± 1 °C vai precīzāk);

c) liela tilpuma (2-5 l) stikla pudeles barotņu gatavošanai un BSP pudeļu pildīšanai;

d) skābekļa elektrods un oksimetrs vai iekārtas un reaģenti titrēšanai pēc Vinklera.

VI.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

Rezerves šķīdumu sagatavošanu sk. I.6.2. punktu.

Sajauc pa 1 (vienam) mililitram a) līdz d) šķīduma un ar destilētu ūdeni atšķaida līdz 1 l.

VI.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana**

Sējmateriālu parasti iegūst no attīrītiem notekūdeņiem, kurus aizvada no attīrīšanas iekārtām vai laboratorijas iekārtām, kurās galvenokārt attīra sadzīves notekūdeņus. Vēl cits sējmateriāla avots ir virszemes ūdeņi. Parasti uz litru barotnes ņem no viena piliena (0,05 ml) līdz 5 ml filtrāta; var būt jāveic izmēģinājumi optimālā konkrēto attīrīto notekūdeņu tilpuma noteikšanai (sk. I.6.4.2. un I.6.5. punktu).

VI.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Minerālbarotni intensīvi aerē vismaz 20 min. Visai paraugu sērijai izmanto minerālbarotni no vienas ražošanas partijas. Parasti barotne ir lietošanai gatava pēc 20 h stāvēšanas noteikšanas temperatūrā. Kontroles nolūkā nosaka izšķīdušā skābekļa saturu; 20 °C temperatūrā tam jābūt apmēram 9 mg/l. Visas ar gaisu piesātinātās barotnes pārnešanas un uzpildīšanas operācijas veic tā, lai neveidotos burbuļi, piemēram, izmantojot sifonus.

Vienlaicīgai noteikšanai sagatavo paralēlas BSP pudeļu sērijas ar testējamo vielu un standartvielu. BSP pudelēm, ieskaitot sējmateriāla tukšo paraugu pudeles, jābūt pietiekamā daudzumā, lai ar vajadzīgajiem intervāliem, piemēram, pēc 0, 7, 14, 21 un 28 dienām, skābekļa patēriņu varētu mērīt vismaz divos atkārtojumos. Lai būtu iespējams noteikt 10 dienu intervālu, var būt vajadzīgs vēl lielāks skaits pudeļu.

Lielajās pudelēs apmēram līdz vienai trešdaļai to tilpuma pārnes ar gaisu pilnīgi piesātinātu minerālbarotni. Tad atsevišķās lielajās pudelēs vajadzīgajā daudzumā pievieno testējamās vielas un standartvielas rezerves šķīdumus, parasti tik daudz, lai vielu galīgā koncentrācija nepārsniegtu 10 mg/l. Lielajā pudelē, kurā ir barotne tukšā parauga kontrolei, nekādas ķīmiskās vielas nepievieno.

Lai nodrošinātu, ka netiek ierobežota sējmateriāla aktivitāte, izšķīdušā skābekļa koncentrācija BSP pudelēs drīkst pazemināties ne vairāk kā līdz 0,5 mg/l. Tāpēc testējamās vielas koncentrācija nedrīkst pārsniegt apmēram 2 mg/l. Tomēr grūti noārdāmas vielas un vielas ar zemu TSP vērtību var izmantot koncentrācijas no 5-10 mg/l. Dažkārt var būt ieteicams izveidot testējamās vielas paralēlas izmēģinājumu sērijas ar divām dažādām koncentrācijām, piemēram, 2 un 5 mg/l. Parasti aprēķina TSP vērtību, kāda ir, veidojoties amonija sāļiem, bet, ja var notikt nitrifikācija vai ir zināms, ka tā notiek, TSP aprēķina, ņemot vērā nitrātu veidošanos (TSP_{NO3}: sk. II.2. pielikumu). Taču, ja nitrifikācija nenotiek līdz galam vai nenotiek pavisam, veic korekciju pēc analītiski noteiktajām nitrītjonu un nitrātjonu koncentrāciju izmaiņām (sk. V pielikumu).

Ja jāpēta testējamās vielas toksiskā iedarbība (piemēram, gadījumos, kad sākotnēji tiek konstatēts, ka tās bioloģiskās noārdīšanās spēja ir zema), ir vajadzīgas citas pudeļu sērijas.

Citā lielajā kolbā sagatavo ar gaisu piesātinātu minerālbarotni (apmēram trešdaļu tās tilpuma), pievieno testējamo vielu un standartvielu galīgajās koncentrācijas, kas parasti ir tādas pašas kā pārējās lielajās pudelēs.

Šķīdumus lielajās pudelēs apsēj ar attīrītu notekūdeni (no viena piliena vai apmēram 0,05 ml līdz apmēram 5 ml uz litru), vai ar sējmateriālu no cita avota, piemēram, upes ūdeni (sk. I.6.4.2. punktu). Tad šķīdumus atšķaida ar aerētu minerālbarotni un sajauc, izmantojot šļūteni, kas sniedzas līdz pudeles dibenam.

VI.2.5. **Kolbu skaits parastā sērijā**

Parastā sērijā izmanto šādas kolbas:

vismaz 10 kolbas, kurās ir testējamā viela un sējmateriāls (testa suspensija),

vismaz 10 pudeles, kurās ir tikai sējmateriāls (sējmateriāla tukšais paraugs),

vismaz 10 kolbas, kurās ir standartviela un sējmateriāls (metodes kontrole),

un vajadzības gadījumos 6 pudeles, kurās ir testējamā viela, standartviela un sējmateriāls (toksicitātes kontrole). Lai būtu iespējams noteikt 10 dienu intervālu, var būt vajadzīgs apmēram divreiz lielāks skaits pudeļu.

VI.2.6. **Testa gaita**

Sagatavotos šķīdumus nekavējoties iepilda attiecīgajās BSP pudeļu grupās caur šļūteni no lielās pudeles apakšējās ceturtdaļas (nevis no apakšas) tā, lai visas BSP pudeles tiktu pilnīgi piepildītas. Uzmanīgi noslēdz, izspiežot gaisa burbuļus. Sākuma – nulles laika- paraugos tūlīt nosaka izšķīdušo skābekli pēc Vinklera vai elektrodu metodes. Pudeļu saturu var iekonservēt, lai analīzes veiktu vēlāk pēc Vinklera metodes, pievienojot mangāna(II) sulfātu un nātrija hidroksīdu (Vinklera pirmo reaģentu). Pirms veikt nākamos analīzes posmus pēc Vinklera metodes, glabā cieši noslēgtās pudelēs, kas satur brūna mangāna(III) hidroksīda veidā fiksētu skābekli, tumšā vietā 10-20 °C temperatūrā ne ilgāk kā 24 stundas. Pārējās atkārtojumu pudeles noslēdz tā, lai tajās nebūtu gaisa burbuļu, un inkubē 20 °C temperatūrā tumsā. Visām sērijām jābūt paralēlām sērijām sējmateriāla tukšā parauga noteikšanai. Izšķīdušā skābekļa analīzēm ar noteiktiem intervāliem (ne retāk kā reizi nedēļā) 28 dienu inkubēšanas perioda laikā ņem pudeles vismaz divos atkārtojumos.

Iknedēļas paraugi dod iespējas noteikt izdalīšanās procentu 14 dienu intervālā, bet paraugu ņemšana ik pēc 3-4 dienām nodrošina iespējas noteikt 10 dienu intervālu, kam var būt vajadzīgs apmēram divreiz vairāk pudeļu.

Testējamajām vielām, kas satur slāpekli, jāveic nitrifikācijai patērētā skābekļa korekcija. Šim nolūkam izšķīdušā skābekļa koncentrāciju nosaka pēc skābekļa elektroda metodes, un pēc tam no BSP pudeles ņem paraugu nitrītjonu un nitrātjonu satura noteikšanai. Pēc nitrītu un nitrātu koncentrācijas izmaiņām aprēķina nitrifikācijai patērētā skābekļa daudzumu (sk. V pielikumu).

VI.3. DATI UN PĀRSKATS

VI.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Vispirms aprēķina BSP katra perioda beigās, atņemot skābekļa patēriņu (mg O_2/l) sējmateriāla tukšajā paraugā no testējamās vielas skābekļa patēriņa. Īpatnējo BSP miligramos skābekļa uz miligramu testējamās vielas aprēķina, šo koriģēto samazinājumu dalot ar testējamās vielas koncentrāciju (mg/l). Aprēķina biodegradācijas procentu, īpatnējo BSP ar īpatnējo TSP (kuru aprēķina saskaņā ar II.2. pielikumu), vai ar ĶSP (ko nosaka analītiski, sk. II.3. pielikumu) šādi:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg } O_2\text{, ko patērē testējamā viela - mg } O_2 \text{ ko patērē sējmateriāla tukšais paraugs}}{\text{mg testējamās vielas kolbā}}$$

= mg O_2 uz mg testējamās vielas.

$$\text{biodegradācija (\%)} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg BSP (mg } O_2\text{/mg vielas))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg TSP (mg}O_2\text{/mg testējamās vielas))}} \times 100$$

vai

$$\text{degradācija \%} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg BSP (mg } O_2\text{/mg vielas))}}{\text{COD (mg } O_2\text{/mg ĶSP (mg}O_2\text{/mg testējamās vielas))}} \times 100$$

Jāpiezīmē, ka pēc šīm abām metodēm iegūto rezultātu skaitliskās vērtības ne vienmēr ir vienādas; ieteicams izmantot šo otru metodi.

Testējamajām vielām, kuras satur slāpekli, atkarībā no tā, kas ir sagaidāms vai zināms par nitrifikāciju, izmanto attiecīgo TSP (NH_4 vai NO_3) vērtību (II.2. pielikums). Ja nitrifikācija notiek, taču ne pilnīgi, pēc nitrītjonu un nitrātjonu koncentrāciju izmaiņām aprēķina korekciju skābeklim, kas patērēts nitrifikācijai (V pielikums).

VI.3.2. **Rezultātu derīgums**

Skābekļa satura samazinājums pēc 28 dienām sējmateriāla tukšajā paraugā nedrīkst pārsniegt 1,5 mg izšķīdušā skābekļa/l. Ja iegūst par minēto augstākas vērtības, jāpārbauda eksperimenta metodes. Atlikusī skābekļa koncentrācija testa pudelēs nedrīkst būt mazāka par 0,5 mg/l. Tik zemas skābekļa koncentrācijas uzskatāmas par ticamām tikai tad, ja ar izmantoto izšķīdušā skābekļa satura noteikšanas metodi tās iespējams izmērīt precīzi.

Sk. arī I.5.2. punktu.

VI.3.3. **Pārskats**

Sk. I.8. punktu.

VI.4. DATU LAPA

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

SLĒGTO PUDEĻU METODE

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums:

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l

Sākuma koncentrācija pudelē: mg/l

TSP vai ĶSP: mgO_2/mg testējamās vielas

4. **SĒJMATERIĀLS**

Avots:

Attīrīšana:

Iepriekšēja kondicionēšana, ja veikta:

Reakcijas maisījuma koncentrācija: mg/l

5. **IZŠĶĪDUŠĀ SKĀBEKĻA SATURA NOTEIKŠANA**

Metode: Vinklera/elektroda

Kolbu analīzes

Inkubēšanas laiks (dienas)			Izšķīdušais skābeklis (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Tukšais paraugs (bez vielas)	1	C_1				
	2	C_2				
Vidējais	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testējamā viela	1	a_1				
	2	a_2				
Vidējais	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Piezīme: Līdzīgus formātus var izmantot arī standartvielai un toksicitātes kontrolei.

6. **NITRIFIKĀCIJAS KOREKCIJA** (sk. V pielikums)

Inkubēšanas laiks (dienas)	0	n_1	n_2	n_3
i) nitrātjonu koncentrācija (mg N/l)				
ii) nitrātjonu koncentrācija (mg N/l)	—			
iii) Skābekļa ekvivalents (mg/l)	—			
iv) Nitrītjonu koncentrācija (mg N/l)				
v) nitrītjonu koncentrācijas izmaiņas (mg N/l)	—			
vi) Skābekļa ekvivalents (mg/l)	—			
(iii + vi) Kopējais skābekļa ekvivalents (mg/l)	—			

7. **IZŠĶĪDUŠĀ SKĀBEKĻA SATURA SAMAZINĀŠANĀS: DEGRADĀCIJA %**

	Samazinājums pēc n dienām (mg/1)			
	n_1	n_2	n_3	
1. KOLBA: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
2. KOLBA: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
1. KOLBA: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{test. vielas konc} \times \text{ThOD vielas}}$				
2. KOLBA: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{test. vielas konc} \times \text{ThOD vielas}}$				
$\%\ D\ \text{vid.}(^1) = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(1) Vidējo vērtību neaprēķina, ja atkārtojumos iegūtie rezultāti ir ievērojami atšķirīgi.

m_{to} = vērtība testa kolbā laikā 0

m_{tx} = vērtība testa kolbā laikā x

m_{bo} = tukšā parauga vērtība laikā 0

m_{bx} = tukšā parauga vērtība laikā x

Aprēķina arī nitrifikācijas korekciju iii + vi no 6. iedaļas.

8. **TUKŠĀ PARAUGA IZŠĶĪDUŠĀ SKĀBEKĻA SATURA SAMAZINĀŠANĀS**

Tukšā parauga skābekļa patēriņš: $(m_{bo} - m_{b28})$ mg/l. Pēc šā patēriņa nosaka testēšanas rezultātu derīgumu. Tam jābūt mazākam par 1,5 mg/l.

VII DAĻA. M.I.T.I. METODE (C.4.-F metode)

VII.1. METODES PRINCIPS

Automātiski 28 dienas aptumšotā noslēgtā respirometrā 25 ± 1 °C temperatūrā maisot mēra skābekļa patēriņu testējamās vielas šķīdumā vai suspensijā minerālbarotnē, kas apsēta ar īpaši izaudzētiem neadaptētiem mikroorganismiem. Izdalījušos oglekļa dioksīdu absorbē ar nātronkaļķiem. Biodegradāciju izsaka skābekļa patēriņa procentos (ar tukšā parauga korekciju) no teorētiskā skābekļa patēriņa (TSP). Primārās biodegradācijas pakāpi var aprēķināt arī pēc inkubācijas sākumā un beigās veikto papildus specifisko analīžu rezultātiem, vai pēc IOO analīzes rezultātiem.

VII.2. TESTA METODES APRAKSTS

VII.2.1. **Aprīkojums**

a) automātiskā elektrolītiskā BSP mērīšanas ierīce vai respirometrs, kas parasti aprīkots ar 6 pudelēm, kuru tilpums ir 300 ml, ar vāciņu CO_2 absorbentam;

b) termostatējama kamera un/vai ūdens vanna ar 25 °C ± 1 °C vai precīzāk regulējamu temperatūru;

c) membrānfiltrēšanas ierīce (fakultatīvi);

d) oglekļa analizators (nav obligāti).

VII.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

No analītiski tīriem reaģentiem pagatavo šādus rezerves šķīdumus (I.6.1. punkts):

a)	monokālija dihidrogenortofosfāts, KH_2PO_4	8,50 g
	dikālija monohidrogenortofosfāts, K_2HPO_4	21,75 g
	dinātrija monohidrogenortofosfāta dodekahidrāts Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	amonija hlorīds, NH_4C1	1,70 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram	
	Šķīduma pH jābūt 7,2.	
b)	magnija sulfāta heptahidrāts, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram	
c)	kalcija hlorīds, bezūdens, $CaCl_2$	27,50 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram	
d)	dzelzs(III) hlorīda heksahidrāts, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram	

Ņem pa 3 ml no šķīdumiem a), b), c) un d) un atšķaida līdz 1 l.

VII.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana**

Ņem svaigus paraugus no vismaz desmit vietām, galvenokārt teritorijās, kur lietotas un izplūdušas dažādas ķīmiskās vielas. No tādām vietām kā notekūdeņu attīrīšanas iekārtas, ražošanas notekūdeņu attīrīšanas iekārtas, upes, ezeri, jūras, ņem 1 l dūņu, augsnes virskārtas, ūdens, u.c. un rūpīgi sajauc. Pēc peldošo daļiņu atdalīšanas un nostādināšanas ar nātrija hidroksīdu vai fosforskābi noregulē dzidrā šķīduma pH līdz 7 ± 1.

Ar dzidro šķīdumu pilnīgi piepilda aktīvo dūņu trauku un šķidrumu aerē apmēram 23 1/2/h. Trīsdesmit minūtes pēc aerācijas pārtraukšanas izlej apmēram trešdaļu no visa dzidrā šķīduma daudzuma, un nostādinātajam materiālam pievieno tikpat daudz šķīduma (pH 7), kas satur pa 0,1 % glikozes, peptona un monokālija ortofosfāta, un atsāk aerāciju. Šo procedūru atkārto vienreiz dienā. Aktīvo dūņu iekārtas jāekspluatē saskaņā ar labu praksi: attīrītajiem notekūdeņiem jābūt dzidriem, to temperatūrai 25 ± 2° C, vides reakcijai pH 7 ± 1, dūņām viegli jānogulsnējas, ar pietiekamu aerāciju maisījumam pastāvīgi jānodrošina aerobi apstākļi, tajās jābūt vienšūņiem, un dūņu aktivitāte vismaz reizi trijos mēnešos jāpārbauda ar standartvielu. Par sējmateriālu neizmanto dūņas, ja iekārta darbojas mazāk nekā mēnesi vai ilgāk par četriem mēnešiem. Pēc tam ņem paraugus ar regulāriem intervāliem reizi trijos mēnešos ņem paraugus no vismaz 10 vietām.

Lai uzturētu svaigo un veco dūņu aktivitāti vienā līmenī, sajauc vienādus tilpumus filtrētā dzidrā šķīduma no lietošanā esošajām aktīvajām dūņām un filtrētā dzidrā šķīduma no desmit vietām paņemtā maisījuma un maisījumu kultivē, kā noteikts iepriekš. Dūņas lietošanai par sējmateriālu ņem 18-24 h pēc iekārtas palaišanas.

VII.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Sagatavo šādas sešas kolbas:

Nr. 1: testējamā viela ūdens šķīdumā koncentrācijā 100 mg/l

Nr. 2, 3 un 4: testējamā viela minerālbarotnē koncentrācijā 100 mg/l

Nr. 5: standartviela (piemēram, anilīns) minerālbarotnē koncentrācijā 100 mg/l

Nr. 6: tikai minerālbarotne.

Mazšķīstošas testējamās vielas pievieno tieši pēc masas vai tilpuma, vai ar tām rīkojas, kā aprakstīts HI pielikumā, tomēr nedrīkst lietot ne šķīdinātājus, ne emulgatorus. Visām kolbām speciālajos aizbāžņos ievieto CO_2 absorbentu. Kolbās nr. 2, 3 un 4 noregulē pH līdz 7,0.

VII.2.5. **Testa gaita**

Apsēj kolbas nr. 2, 3, un 4 (testējamās suspensijas), nr. 5 (aktivitātes kontrole) un nr. 6 (sējmateriāla tukšais paraugs) ar nelielu daudzumu sējmateriāla, lai iegūtu koncentrāciju 30 mg/l suspendēto vielu. Sējmateriālu nepievieno kolbā nr. 1, ko izmanto par abiotisko kontroli. Iekārtu samontē, pārbauda aparāta hermētiskumu, iedarbina maisītāju un sāk skābekļa patēriņa mērījumus tumsas apstākļos. Katru dienu pārbauda temperatūru, maisītāja un skābekļa patēriņa kulonometriskās reģistrēšanas ierīces darbību un novēro kolbu satura krāsas izmaiņas. Nolasa skābekļa patēriņu sešās kolbās, izmantojot piemērotu tiešo mērījumu metodi, piemēram, no sešpunktu pašrakstītāja diagrammas, kas zīmē BSP patēriņa līkni. Inkubēšanas beigās, parasti pēc 28 dienām, mēra kolbu satura pH un nosaka testējamās vielas atlikuma un no tiem veidojušos starpproduktu koncentrāciju, IOO koncentrāciju (II.4. pielikums). Īpaši uzmanīgi strādā ar gaistošām vielām. Ja sagaidāms, ka notiks nitrifikācijas process, ja iespējams, nosaka nitrātjonu un nitrītjonu koncentrāciju.

VII.3. DATI UN PĀRSKATS

VII.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Testējamās vielas skābekļa patēriņu (mg) pēc noteikta laika, kas koriģēts pēc sējmateriāla tukšā parauga patēriņa tajā pašā laikā, dala ar izmantotās testējamās vielas daudzumu. Tādējādi aprēķina BSP, kas izteikts mg skābekļa/mg testējamās vielas, t., i.,

$$\text{BOD} = \frac{\text{O}_2\text{, ko patērē testējamā viela - mg O}_2\text{ ko patērē sējmateriāla tukšais paraugs}}{\text{mg testējamās vielas kolbā}}$$

$$= \text{mg O}_2\text{ uz mg testējamās vielas.}$$

Biodegradāciju procentos aprēķina šādi:

$$\text{biodegradācija (\%)} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD(mg } O_2\text{BSP (mg } O_2\text{/mg vielas))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{TSP (mg } O_2 \text{ uz mg testējamās vielas))}} \times 100$$

Maisījumiem TSP aprēķina pēc elementanalīzes rezultātiem tāpat kā individuālām vielām. Izmanto attiecīgo TSP (TSP_{NH4} vai TSP_{NO3}) atkarībā no tā, vai nitrifikācija nenotiek vai norit līdz galam (II.2. pielikums). Ja nitrifikācija notiek, taču ne pilnīgi, pēc nitrītjonu un nitrātjonu koncentrāciju izmaiņām aprēķina korekciju skābeklim, kas patērēts nitrifikācijai (V pielikums).

Primāro degradāciju procentos aprēķina pēc konkrētās (sākotnējās) vielas zudumiem (sk. I.7.2. punktu).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Ja testējamās vielas zudumi konstatēti kolbā nr. 1, kurā mēra fizikāli ķīmisko izdalīšanos, to reģistrē un testējamās vielas koncentrāciju (S_b) šajā kolbā pēc 28 dienām izmanto biodegradācijas procentu aprēķināšanai.

Ja veic IOO noteikšanu (fakultatīvi), aprēķina kopējo biodegradāciju no:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

kā aprakstīts I.7.1. punktā. Ja kolbā nr. 1 ir samazinājies IOO, mērot fizikāli ķīmisko izdalīšanos, biodegradācijas procenta aprēķināšanai izmanto IOO koncentrāciju šajā kolbā.

Visus rezultātus reģistrē pievienotajās datu lapās.

VII.3.2. **Rezultātu derīgums**

Sējmateriāla tukšā parauga skābekļa patēriņš parasti ir 20-30 mg O_2/l, un 28 dienās tas nedrīkst pārsniegt 60 mg/l. Ja tā vērtības pārsniedz 60 mg/l, kritiski jāizvērtē eksperimentālie dati un to iegūšanas metodes. Ja pH vērtība nav robežās no 6-8,5 un testējamās vielas skābekļa patēriņš nepārsniedz 60 %, noteikšana jāatkārto ar testējamo vielu zemākā koncentrācijā.

Sk. arī I.5.2. punktu.

Ja anilīna degradācijas procents, kas aprēķināts pēc skābekļa patēriņa, pēc 7 dienām nepārsniedz 40 %, bet pēc 14 dienām 65 %, iegūtie rezultāti uzskatāmi par nederīgiem.

VII.3.3. **Pārskats**

Sk. I.8. punktu.

VII.4. DATU LAPA

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

M.I.T.I. (I) METODE

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums:

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l vielas veidā

Sākuma koncentrācija barotnē, C_0: mg/l vielas veidā

Reakcijas maisījums, V: ml

TSP: mg O_2/1

4. **SĒJMATERIĀLS**

Dūņu paraugu ņemšanas vietas:

1) …
2) …
3) …
4) …
5) …
6) …
7) …
8) …
9) …
10) …

Suspendēto vielu koncentrācija aktīvajās dūņās pēc aklimatizācijas sintētiskajā notekūdenī mg/l

Aktīvo dūņu tilpums uz litru gatavas barotnes =... ml

Dūņu koncentrācija gatavajā barotnē =... mg/l

5. **SKĀBEKĻA PATĒRIŅŠ: BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANĀS SPĒJA**

Izmantotā respirometra veids:

			Laiks (dienas)				
			0	7	14	21	28
testējamās vielas O_2 patēriņš (mg)	a_1						
	a_2						
	a_3						
tukšā parauga O_2 patēriņš (mg)	b						
koriģētais O_2 patēriņš (mg)	(a_1-b) (a_2-b) (a_3-b)						
BSP uz mg testējamās vielas	$\frac{(a-b)}{C_oV}$	1. kolba					
		2. kolba					
		3. kolba					
degradācija % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		vidējā vērtība [1]					

Piezīme: Līdzīgas formas tabulu var izmantot standartvielai.

[1] Vidējo vērtību neaprēķina, ja atkārtojumos iegūtie rezultāti ir ievērojami atšķirīgi.

6. **OGLEKĻA ANALĪZE** (fakultatīvi)

Oglekļa analizators:

Kolba	IOO				Izdalītais IOO %	Vidējais
	Mērītā vērtība		Koriģētā vērtība			
Ūdens + testējamā viela	a				—	—
Dūņas + testējamā viela	bl		b1-c			
Dūņas + testējamā viela	b2		b2-c			
Dūņas + testējamā viela	b3		b3-c			
Tukšā parauga kontrole	c		—		—	—

$$\text{Izdalītais IOO \%}: \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **ĪPAŠU ĶĪMISKO ANALĪŽU DATI**

	Testējamās vielas atlikušais daudzums testēšanas beigās (mg/l)	degradācija %
tukšais paraugs ar ūdeni	Sb	
barotne ar sējmateriālu	$S._{a1}$	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\text{degradācija \%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Attiecīgi kolbām a1, a2 un a3 aprēķina degradācijas %.

8. **PIEZĪMES**

Ja iespējams, jāpievieno BSP izmaiņu līkne laikā.

I PIELIKUMS

SAĪSINĀJUMI UN DEFINĪCIJAS

DO: Izšķīdušais skābeklis ir ūdens paraugā izšķīdušā skābekļa koncentrācija (mg/l).

BSP: Bioķīmiskais skābekļa patēriņš ir skābekļa daudzums (g), ko mikroorganismi patērē testējamā savienojuma metabolizēšanai; izsaka arī kā skābekļa uzņemšanu uz 1g testējamā savienojuma. (Sk. C.5. metodi).

ĶSP: Ķīmiskais skābekļa patēriņš ir testējamā savienojuma oksidēšanai ar kālija dihromātu vidē patērētais skābekļa daudzums (g); tas ir oksidējamas vielas daudzuma mērs; izsaka arī kā skābekļa patēriņu uz 1g testējamā savienojuma. (Sk. C.6. metodi).

IOO: Izšķīdušais organiskais ogleklis ir organisko savienojumu veidā saistītā oglekļa saturs ūdens šķīdumā, vai iziet cauru 0,45 mikrometru filtram vai paliek centrifugātā pēc centrifugēšanas 15 min 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g).

TSP: Teorētiskais skābekļa patēriņš ir kopējais skābekļa patēriņš (mg), kas vajadzīgs ķīmiskās vielas pilnīgai oksidēšanai; to aprēķina pēc ķīmiskās formulas (sk.II.2. pielikumu) un to arī izsaka mg skābekļa, ko patērē uz miligramu testējamā savienojuma.

$TCO_{2.}$ Teorētiskais oglekļa dioksīds ir aprēķinātais oglekļa dioksīda daudzums (mg), kuram jāveidojas no zināma vai izmērīta oglekļa daudzuma, kas ir testējamā savienojuma sastāvā, to pilnīgi mineralizējot; izsaka arī miligramos oglekļa dioksīda, kas izdalās uz miligramu testējamā savienojuma.

TOC: Kopējais organiskais ogleklis ir summārais oglekļa saturs paraugā, kas ir šķīdumā un suspensijā esošā organiskā oglekļa summa.

IC: Neorganiskais ogleklis

TC: Kopējais ogleklis ir organisko un neorganisko savienojumu veidā saistītais ogleklis, kuru satur paraugs.

Primārā biodegradācija:

ir vielas ķīmiskās struktūras izmaiņas, bioloģiskas iedarbības rezultātā tai zaudējot specifiskās īpašības.

Pilnīga biodegradācija (aerobos apstākļos):

ir degradācijas līmenis, kādā testējamo savienojumu pilnībā izmanto mikroorganismi, izdalot oglekļa dioksīdu, ūdeni, minerālsāļus un jaunas mikroorganismu šūnu sastāvdaļas (biomasu).

Viegli bioloģiski noārdāmi:

noteiktas drošības pārbaudes uz pilnīgu biodegradāciju izgājušu ķīmisko vielu pieņemta klasifikācija; šīs pārbaudes ir tik stingras, ka var pieņemt, ka aerobos apstākļos ūdens vidē šie savienojumi noārdīsies ātri un pilnīgi.

Būtībā bioloģiski noārdāmi:

tādu ķīmisko vielu klasifikācija, par kurām ar atzītām bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšanas metodēm ir iegūtas neapšaubāmas liecības par to (primāru vai pilnīgu) biodegradāciju.

Attīrāmība:

iespējas savienojumus atdalīt notekūdeņu bioloģiskās attīrīšanas procesā, nelabvēlīgi neietekmējot attīrīšanas procesu darbību. Parasti attīrāmi ir viegli bioloģiski noārdāmi savienojumi, taču ne vienmēr attīrāmi ir visi būtībā bioloģiski noārdāmie savienojumi. Var izmantot arī abiotiskus procesus.

Kavējuma laiks

ir laiks no inokulācijas atkrāsošanas testā līdz vismaz 10 % degradācijai. Kavējuma laiks ir parasti ir ļoti mainīgs rādītājs, kuram ir slikta reproducējamība.

Degradācijas laiks

ir periods no kavējuma laika beigām līdz laikam, kamēr tiek sasniegti 90 % no maksimālā degradācijas līmeņa.

10 dienu intervāls

10 dienas tieši pēc 10 % degradācijas sasniegšanas.

II PIELIKUMS

PIEMĒROTU SUMMĀRO PARAMETRU NOTEIKŠANA UN APRĒĶINĀŠANA

Atkarībā no izraudzītās metodes var būt vajadzīgi kādi summārie parametri. Turpmāk aprakstīta šo vērtību noteikšanas kārtība. Šo parametru izmantošana noteikta attiecīgo metožu aprakstos.

1. **Oglekļa saturs**

Testējamās vielas oglekļa saturu aprēķina pēc tās elementu sastāva vai nosaka ar elementanalīzi.

2. **Teorētiskais skābekļa patēriņš (TSP)**

Teorētisko skābekļa patēriņu (TSP) var aprēķināt, ja ir zināms elementu sastāvs, vai tas noteikts ar elementanalīzi. Savienojumam

$$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$$

bez nitrifikācijas

$$ThOD_{NH4} = \frac{16[2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

vai ar nitrifikāciju

$$ThOD_{NH3} = \frac{16[2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Ķīmiskais skābekļa patēriņš (ĶSP)**

Ķīmisko skābekļa patēriņu nosaka pēc C.6. metodes.

4. **Izšķīdušais organiskais ogleklis (IOO)**

Pēc definīcijas izšķīdušais organiskais ogleklis ir ķīmiskās vielas vai vielu maisījuma ūdenī esošais organiskais ogleklis, kas iziet caur filtru ar poru izmēru 0,45 mikrometri.

Paraugus no testēšanas traukiem izlej un nekavējoties filtrē filtrācijas aparātā, izmantojot piemērotu membrānas filtru. Filtrāta pirmos 20 ml (daudzumu var samazināt, izmantojot mazus filtrus) izlej. Oglekļa analīzei saglabā 10-20 ml tilpuma vai mazāk, ja injicē (tilpums atkarīgs no oglekļa analizatoram vajadzīgā daudzuma). IOO koncentrāciju nosaka ar organiskā oglekļa satura analizatoru, ar kuru iespējams noteikt oglekļa koncentrāciju, kas ir vienāds vai mazāks par 10 % no sākotnējās noteikšanai izmantotās IOO koncentrācijas.

Nofiltrētos paraugus, kurus nav iespējams izanalizēt tajā pašā darba dienā, var 48 stundas uzglabāt 2-4 °C temperatūrā, vai –18 °C temperatūrā ilgāku laiku.

Piezīmes:

Membrānfiltru hidrofilizēšanai tos parasti piesūcina ar virsmaktīvām vielām. Tāpēc filtrs var saturēt vairākus miligramus šķīstoša organiska oglekļa, kas var traucēt bioloģiskās noārdīšanas spējas noteikšanai. Virsmaktīvās vielas un citus šķīstošus organiskos savienojumus no filtriem izdala, tos trīs reizes pa vienai stundai vārot dejonizētā ūdenī. Pēc tam filtrus vienu nedēļu var glabāt ūdenī. Ja izmanto vienreizlietojamās filtrpatronas, katra to partija jāpārbauda, lai pārliecinātos, vai no tiem neizdalās šķīstošais organiskais ogleklis.

Atkarībā no membrānfiltra veida pārbaudāmā viela uz tās var tikt saistīta absorbcijas rezultātā. Tāpēc var būt vēlams nodrošināt, lai testējamā viela netiktu adsorbēta uz filtra.

Filtrācijas vietā IOO atdalīšanai no *TOC* var izmantot 15 minūtes ilgu centrifugēšanu 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g). Metode nav droša, ja sākuma koncentrācija ir < 10 mg IOO/l, jo netiek atdalītas visas baktērijas, vai arī atkārtoti izšķīst ogleklis, ko satur baktēriju plazma.

BIBLIOGRĀFIJA

— *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), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.*

— *Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.*

III PIELIKUMS

SLIKTI ŠĶĪSTOŠU VIELU BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANAS SPĒJAS NOTEIKŠANA

Nosakot bioloģiskās noārdīšanas spēju grūti šķīstošām vielām, īpaša vērība jāveltī šādiem aspektiem.

Viendabīgi parasti nerada ar paraugu ņemšanu saistītas problēmas, taču, lai izvairītos no noteikšanas kļūdām, kas saistītas ar paraugu neviendabīgumu, cietvielas ir ieteicams homogenizēt ar attiecīgi piemērotām metodēm. Īpaši uzmanība tam jāveltī, ja vajadzīgi tikai dažus miligramus lieli paraugi no vielām vai vielu maisījumiem ar augstu piemaisījumu saturu.

Noteikšanas laikā var izmantot dažādu veidu maisīšanu. Jāmaisa tikai tik daudz, lai viela būtu disperģētā stāvoklī, taču tā nekarstu, pārlieku neputotos un uz to neiedarbotos pārāk lieli bīdes spēki.

Vielas stabilas dispersijas veidošanai var izmantot emulgatoru. Testēšanas apstākļos tas nedrīkst būt baktērijām toksisks, bioloģiski degradēties vai veicināt putu veidošanos.

Uz šķīdinātājiem attiecas tādi paši kritēriji kā uz emulgatoriem.

Pārbaudāmām cietvielām nav ieteicams izmantot cietus nesējus, lai gan šādi nesēji var būt piemēroti eļļainām vielām.

Gadījumos, kad izmanto tādas palīgvielas kā emulgatori, šķīdinātāji vai nesēji, jāveic attiecīgo palīgvielu saturoša tukšā parauga analīze.

Slikti šķīstošu vielu bioloģiskās degradācijas noteikšanai var izmantot CO_2, BSP, *MITI* respirometriskās metodes.

BIBLIOGRĀFIJA

— *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 PIELIKUMS

BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANĀS SPĒJAS NOVĒRTĒŠANA ĶĪMISKAJĀM VIELĀM, KURAS VARĒTU BŪT SĒJMATERIĀLAM TOKSISKAS

Ja nosakot, vai ķīmiskā viela ir bioloģiski viegli noārdāma, izrādās, ka tā nav bioloģiski degradējama, ieteicams izmantot šādu procedūru, ja jāizšķir, vai tā nenoārdās vai arī kavē aļģu augšanu (*Reynolds et al.*, 1987).

Jāizmanto līdzīgs vai tāds pats sējmateriāls, kā nosakot toksiskumu vai bioloģiskās noārdīšanas spēju.

Lai novērtētu ķīmisko vielu toksiskumu, kurām jau veikta bioloģiskās noārdīšanas spējas noteikšana, var būt jāizmanto dūņu respirācijas ātruma (aktīvo dūņu respirācijas inhibēšanas – Direktīva 88/302/EEK), BSP un/vai augšanas kavēšanas noteikšanas metodes vai to kombinācija.

Ja jānovērš ar toksiskumu saistītā augšanas kavēšana, testējamās vielas pārbaudāmās koncentrācijas, kuras izmanto bioloģiskās degradācijas spējas noteikšanai, nedrīkstētu būt lielākas par 1/10 no EC_{50} vērtības (mazākas par EC_{20} vērtībām), kuras noteiktas, novērtējot attiecīgās vielas toksicitāti. Savienojumiem, kuru EC_{50} vērtība pārsniedz 300 mg/l, vieglas bioloģiskās noārdīšanās spējas izmēģinājumos parasti toksisku iedarbību nenovēro.

Ja EC_{50} vērtības mazākas par 20 mg/l, tās turpmākajos izmēģinājumos var radīt nopietnas problēmas. Izmēģinājumiem izmato vielas zemās koncentrācijas, kuras nosaka nepieciešamību precīzo un jutīgo noslēgto pudeļu testu vai ar ^{14}C iezīmētu materiālu. Var lietot arī aklimatizēti sējmateriālu, kas var paciest augstāku testējamās vielas koncentrāciju iedarbību. Šādā gadījumā tomēr tiek zaudēts vieglas bioloģiskās noārdīšanas spējas kritērijs.

BIBLIOGRĀFIJA

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

V PIELIKUMS

AR NITRIFIKĀCIJAS RADĪTAJIEM TRAUCĒJUMIEM SAISTĪTĀ SKĀBEKĻA PATĒRIŅA KOREKCIJA

Novērtējot skābekļa uzņemšanu, nosakot pārbaudāmās vielas bioloģiskās degradācijas spēju, bet neņemot vērā nitrifikāciju, vielām, kuras nesatur slāpekli, ar to saistītās kļūdas ir nelielas (līdz 5%) arī tad, ja amonija slāpekļa oksidēšana vidē notiek kļūdas dēļ, sajaucot testa un tukšā mēģinājuma traukus. Tomēr testējamajām vielām, kuras satur slāpekli, var rasties nopietnas kļūdas.

Ja nitrifikācija ir notikusi, bet šis process nav beidzies, reakcijas maisījumā novēroto skābekļa uzņemšanu var koriģēt par skābekļa daudzumu, kas patērēts amonija jonu oksidēšanai līdz nitrītam un nitrātam gadījumos, kad inkubācijas laikā noteiktas nitrīta un nitrāta koncentrācijas izmaiņās pēc šādiem vienādojumiem:

$$2\ NH_4C1 + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Summārais vienādojums:

$$2\ NH_4C1 + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (3)$$

Pēc vienādojuma (1) 28 g slāpekļa amonija hlorīda (NH_4C1) veidā oksidējoties par nitrātu, saista 96 g skābekļa, t.i., koeficients ir 3,43 (96/28). Tādā pašā veidā pēc vienādojuma (3) 28 g slāpekļa, oksidējoties par nitrātu, saista 128 g skābekļa, t.i., koeficients ir 4,57 (128/28).

Tā kā šīs reakcijas ir secīgas un notiek ar noteiktām un dažādām baktēriju sugām, nitrītu koncentrācijai ir iespējas gan paaugstināties, gan pazemināties; pēdējā gadījumā būtu jāveidojas ekvivalentai nitrātu koncentrācijai. Tādējādi skābeklis, kas patērēts nitrātu veidošanai, ir nitrātu koncentrācijas palielinājuma reizinājums ar 4,57, bet ar nitrītu veidošanos saistāmā slāpekļa patēriņš ir 3,43, reizināts ar nitrītu koncentrācijas pieaugumu vai, tā koncentrācijai samazinoties, skābekļa zudumi ir -3,43, reizināts ar koncentrācijas samazinājumu.

Tas ir:

O_2, kas patērēts nitrātu veidošanai = 4,57 x nitrātu koncentrācijas pieaugums (4)

un

O_2, kas patērēts nitrītu veidošanai = 3,43 x nitrītu koncentrācijas pieaugums (5)

un

O_2, kas zaudēts nitrītiem samazinoties = -3,43 x nitrītu koncentrācijas samazinājums (6)

Tātad

O_2 patēriņš nitrifikācijas dēļ = ± 3,43 x nitrītjona koncentrācijas izmaiņas + 4,57 x nitrātjonu koncentrācijas pieaugums (7)

un tādējādi

O_2 patēriņš C oksidēšanai = kopējais novērotais patēriņš - patēriņš nitrifikācijas dēļ (8)

Ja nosaka tikai oksidēto N, nitrifikācijai patērētā skābekļa daudzumu pirmajā tuvinājumā aprēķina kā 4,75 x oksidētā n satura palielinājums.

C oksidēšanai koriģēto vērtību tad salīdzina ar TSP, ko aprēķina saskaņā ar II pielikumu.

C.5. DEGRADĀCIJA – BIOĶĪMISKAIS SKĀBEKĻA PATĒRIŅŠ

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Ar šo metodi nosaka cietu vai šķidru organisko vielu bioķīmisko skābekļa patēriņu (BSP).

Pēc šīs metodes iegūtie dati attiecas uz ūdenī šķīstošām vielām; taču vismaz principā pēc tās var testēt arī gaistošas un mazšķīstošas vielas.

Šī metode izmantojama tikai tādu organisko vielu testēšanai, kurām šim nolūkam izmantotajā koncentrācijā nav inhibējošas iedarbības uz baktērijām. Ja pārbaudāmā viela nešķīst līdz testējamajai koncentrācijai, jāveic īpaši pasākumi, piemēram, testējamās vielas disperģēšanai jāizmanto ultraskaņa.

Informācija par toksiskumu attiecībā pret mikroorganismiem var noderēt, izvērtējot neviennozīmīgus rezultātus un izvēloties vajadzīgo koncentrācijas diapazonu.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Ar BSP saprot izšķīdušā skābekļa masu, kas konkrētos apstākļos nepieciešama noteikta tilpuma vielas šķīduma bioķīmiskās oksidēšanās procesa nodrošināšanai.

Iegūtos rezultātus norāda BSP gramos uz vienu gramu pārbaudītās vielas.

1.3. STANDARTVIELAS

Sējmateriāla aktivitātes pārbaudei ieteicams izmantot piemērotu standartvielu.

1.4. METODES PRINCIPS

Iepriekš noteiktu vielas daudzumu, kas izšķīdināts vai disperģēts piemērotā un labi aerētā barotnē, kas apsēta ar mikroorganismu sējmateriālu, inkubē tumsā nemainīgā apkārtējā temperatūrā.

BSP nosaka pēc izšķīdušā skābekļa koncentrācijas starpības testēšanas sākumā un beigās. Noteikšanas ilgums ir vismaz piecas dienas, bet ne vairāk par 28 dienām.

Vienlaikus paralēli jāveic tukšā parauga analīze, kurā nav pārbaudāmās vielas.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

BSP noteikšanu nevar uzskatīt par pilnīgi drošu vielas biosadalīšanās rādītāju. Tā ir izmantojama tikai kā iepriekšēja pārbaude.

1.6. METODES APRAKSTS

Pārbaudāmo vielu iepriekš izšķīdina ūdenī vai disperģē, lai iegūtu BSP noteikšanai vajadzīgo koncentrāciju. Nosaka BSP pēc jebkuras piemērotas valsts vai starptautiskas standartmetodes.

2. **DATI UN IZVĒRTĒŠANA**

BSP sākotnējā šķīdumā aprēķina pēc izvēlētās standartmetodes un norāda BSP gramos uz vienu testējamās vielas gramu.

3. **PĀRSKATS**

Jānorāda izmantotā metode.

Bioķīmiskais skābekļa patēriņš ir vidējais rādītājs, kas iegūts vismaz no trim derīgiem mērījumiem.

Pārskatā jāiekļauj visa informācija un piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju, jo īpaši par testējamās vielas piemaisījumiem, agregātstāvokli, toksisko iedarbību un sastāvu, kas var ietekmēt rezultātus.

Ja izmanto piedevu, kas inhibē bioloģisko nitrifikāciju, tas jānorāda.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Standartmetožu saraksts, piemēram:

NF T 90 - 103: Bioķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana.

NBN 407: Bioķīmiskais skābekļa patēriņš.

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: Bioloģiskā skābekļa patēriņa noteikšana pēc n dienām.

C.6. DEGRADĀCIJA – ĶĪMISKAIS SKĀBEKĻA PATĒRIŅŠ

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Pēc šīs metodes nosaka cietu vai šķidru organisko vielu ķīmisko skābekļa patēriņu (ĶSP) iepriekš noteiktos, standartizētos laboratorijas apstākļos.

Testēšanai un rezultātu interpretācijai var būt noderīga informācija par vielas sastāvu (piemēram, organisko savienojumu halogēnsāļi, dzelzs sāļi, hlororganiskie savienojumi).

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Ķīmiskais skābekļa patēriņš raksturo vielas oksidējamību, kas ir ekvivalenta oksidējošā reaģenta skābekļa daudzumam, kuru noteiktos laboratorijas apstākļos patērē pārbaudāmā viela.

Iegūtos rezultātus norāda ĶSP gramos uz vienu gramu pārbaudītās vielas.

1.3. STANDARTVIELAS

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metožu periodiskai kalibrēšanai un dod iespēju salīdzināt pēc citas metodes iegūtus rezultātus.

1.4. METODES PRINCIPS

Iepriekš noteiktu vielas daudzumu, kas izšķīdināts vai disperģēts ūdenī, oksidē ar kālija dihromātu, divas stundas vārot koncentrētā sērskābes vidē ar atteci, par katalizatoru izmantojot sudraba sulfātu. Dihromāta atlikumu nosaka, titrējot ar standartizētu dzelzs (II) amonija sulfātu.

Testējot hloru saturošas vielas, hlorīdu traucējošās ietekmes samazināšanai pievieno dzīvsudraba sulfātu (*).

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

ĶSP tā noteikšanas veida dēļ ir oksidēšanās spējas rādītājs, un kā tādu to var izmantot kā praktisku paņēmienu organiskās vielas daudzuma noteikšanai.

Noteikšanu var traucēt hlorīdjoni; ĶSP noteikšanu var traucēt arī neorganiskas vielas ar reducētāju vai oksidētāju īpašībām.

Daļa ciklisko savienojumu un gaistošu vielu (piemēram, zemākās taukskābes) šīs metodes apstākļos pilnībā neoksidējas.

1.6. METODES APRAKSTS

Pārbaudāmo vielu izšķīdina vai disperģē, lai ĶSP būtu 250-600 mg/l.

Piezīmes:

Mazšķīstošas un grūti disperģējamas vielas smalki saberzta pulvera vai šķidruma veidā daudzumā, kas atbilst apmēram 5 mg ĶSP, nosver un pārnes noteikšanas iekārtā ar ūdeni.

Bieži vien ķīmisko skābekļa patēriņu (ĶSP), jo īpaši mazšķīstošām vielām, ērtāk noteikt pēc metodes varianta, t.i., slēgtā sistēmā ar spiediena izlīdzināšanas ierīci (*H. Kelkenberg*, 1975). Bieži vien pēc šīs modifikācijas var iegūt labus rezultātus tādiem savienojumiem, piemēram, etiķskābei, kas pēc parastās metodes ir grūti analizējami. Tomēr šī metode neder piridīnam. Ja (1) noteikto kālija dihromāta koncentrāciju paaugstina līdz 0,25 N (0,0416 M), var izmantot tiešu 5-10 mg iesvaru, kas ir būtiski ūdenī mazšķīstošu vielu ĶSP noteikšanai (sk. (2) norādi).

Pārējos gadījumos ĶSP nosaka pēc jebkuras piemērotas valsts vai starptautiskas standartmetodes.

2. **DATU IZVĒRTĒŠANA**

Pārbaudes laikā kolbā novēroto ĶSP aprēķina pēc izvēlētās standartmetodes un norāda ĶSP gramos uz vienu testējamās vielas gramu.

(*) Lai novērstu dzīvsudraba izplūdes vidē, šķīdumus, kuri satur dzīvsudraba sāļus, pēc lietošanas attīra.

3. **PĀRSKATS**

Jānorāda izmantotā standartmetode.

Ķīmiskais skābekļa patēriņš ir vidējais rādītājs, kas iegūts vismaz no trim mērījumiem. Pārskatā jāiekļauj visa informācija un piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju, jo īpaši, par testējamās vielas piemaisījumiem, agregātstāvokli un īpašībām (ja tādas ir zināmas), kas var ietekmēt noteikšanas rezultātus.

Ja hlorīdjonu traucējošās ietekmes samazināšanai izmanto dzīvsudraba sulfātu, tas ir jānorāda.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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.*

Standartmetožu saraksts, piemēram:

NBN T 91-201: Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana.

ISBN O 11 7512494: Piesārņotu ūdeņu un notekūdeņu ķīmiskais skābekļa patēriņš (dihromāta skaitlis).

NF T 90-101: Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana.

DS 217 = ūdens analīze: Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana.

DIN 38409-H-41: Ķīmiskā skābekļa patēriņa (ĶSP) noteikšana virs 15 mg litrā.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Ūdens kvalitāte: Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšanas dihromāta metodes.

C.7. DEGRADĀCIJA – ABIOTISKA NOĀRDOŠA HIDROLĪZE ATKARĪBĀ NO pH

1. **METODE**

Šī metode balstās uz ESAO Testēšanas norādījumiem (1).

1.1. IEVADS

Hidrolīze ir svarīga abiotiskas noārdīšanās reakcija. Šī reakcija ir īpaši svarīga vielām ar zemu bioloģiskās noārdīšanās spēju; un tā var ietekmēt vielas saglabāšanos vidē.

Hidrolīzes reakcijas lielākoties pieder neīstās pirmās kārtas reakcijām, un tādēļ to pussadalīšanās periods nav atkarīgs no koncentrācijas. Tas parasti ļauj ekstrapolēt rezultātus, kas iegūti ar laboratorijā izmantoto koncentrāciju, uz apstākļiem dabas vidē.

Turklāt aprakstīti gadījumi (2), kad vairāku veidu vielām ir pietiekami laba sakritība ar tīros un dabīgos ūdeņos noteiktajiem rezultātiem.

Pirms noteikt šo rādītāju, ir lietderīgi iegūt sākotnēju informāciju par testējamās vielas tvaika spiedienu.

Šī metode izmantojama tikai ūdenī šķīstošām vielām. Rezultātus var ietekmēt piemaisījumi.

Ķīmisko vielu hidrolīzes īpašības jāpēta apstākļos, kādi parasti ir dabas vidē (pH 4-9).

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Hidrolīze ir reakcija, kurā ķīmiskā viela RX reaģē ar ūdeni. Šo reakciju, kuras gaitā X grupu nomaina OH grupa, var attēlot šādi:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \quad [1]$$

Ātrumu, ar kādu samazinās RX koncentrācija, apzīmē šādi:

$$\text{ātruma konstante} = k\,[H_2O]\cdot[RX] \quad [2]$$

Tā kā salīdzinot ar ķīmiskās vielas daudzumu, ūdens ir ļoti lielā pārākumā, šādas reakcijas parasti apzīmē par neīstās pirmās kārtas reakcijām, kuru konkrētos apstākļos novēroto ātruma konstanti k_{obs} aprēķina šādi:

$$k_{obs} = k \times [H_2O] \quad [3]$$

Šo konstanti var aprēķināt konkrētai pH vērtībai un temperatūrai (T), izmantojot šādu izteiksmi:

$$k_{obs}\ \frac{2{,}303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

kur

t = laiks,

C_o = vielas sākuma koncentrācija laikā 0,

C_t = vielas koncentrācija laikā t un

2,303 = naturālo logaritmu pārrēķina koeficients decimāllogaritmos.

Koncentrācijas izsaka g/l vai mol/l.

Konstantes k_{obs} mērvienība ir (laiks)$^{-1}$.

"Pussadalīšanās periods" $t_{1/2}$ ir laiks, kādā testējamās vielas koncentrācija samazinās par 50 %, t.i.:

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

No vienādojuma (4) un (5) izriet, ka

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{obs} \quad [6]$$

1.3. STANDARTVIELAS

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un pēc dažādām metodēm iegūtu rezultātu salīdzināšanai.

Par standartvielām izmantotas šādas vielas (1):

acetilsalicilskābe (aspirīns)

fosfortioskābes 0,0-dietil 0-(6-metil-2-(l-metiletil)4-pirimidinil) esteris (dimpilāts, diazinons).

1.4. METODES PRINCIPS

Vielu zemā koncentrācijā izšķīdina ūdenī; regulē pH un temperatūru.

Vielas koncentrācijas samazināšanos laikā nosaka ar piemērotu analīzes metodi.

Koncentrācijas logaritmu kā laika funkciju attēlo grafiski un, ja iegūst taisnu līniju, pēc tās virziena koeficienta var noteikt pirmās pakāpes ātruma konstanti (sk. 2. punktu).

Ja nav iespējams tiešā veidā noteikt ātruma konstanti konkrētajā temperatūrā, šo konstanti parasti var aprēķināt pēc Areniusa vienādojuma, kas apraksta ātruma konstantes atkarību no temperatūras. Pēc ātruma konstantes lineārā grafika attiecīgajā temperatūrā kā funkciju no absolūtās temperatūras apgrieztās vērtības var ekstrapolēt ātruma konstantes vērtību, ko tieši noteikt nevar.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Saskaņā ar otrajā norādē (2) sniegtajām ziņām hidrolīzes ātruma konstantes mērījumos 13 organisko savienojumu klasēs var iegūt ļoti precīzus rezultātus.

Atkārtojamība jo īpaši ir atkarīga no pH un temperatūras regulēšanas precizitātes, un to var nelabvēlīgi ietekmēt mikroorganismu klātbūtne, bet atsevišķos gadījumos arī izšķīdušā skābekļa koncentrācija.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Reaģenti**

1.6.1.1. *Buferšķīdumi*

Noteikšanu izdara pie trijām pH vērtībām: 4,0, 7,0 un 9,0.

Buferšķīdumus šim nolūkam gatavo no analītiski tīriem reaģentiem un sterila destilēta vai dejonizēta ūdens. Papildinājumā norādīti daži bufersistēmu paraugi.

Bufersistēma var ietekmēt hidrolīzes ātrumu; ja tas apstiprinās, jāizmanto cita bufersistēma. Otrajā norādē (2) fosfātbuferu vietā iesaka izmantot borātu vai acetātu buferšķīdumus.

Ja nav zināma buferšķīdumu pH vērtība noteikšanas temperatūrā, to izraudzītajā temperatūrā var izmērīt ar kalibrētu pH metru, kas nodrošina ± 0,1 pH vienību precizitāti.

1.6.1.2. *Analizējamie šķīdumi*

Testējamo vielu izšķīdina izraudzītajā buferšķīdumā un 0,01 M vai pusi no piesātināta šķīduma koncentrācijas, atkarībā no tā, kura no minētajām koncentrācijām ir zemāka.

Organiskos šķīdinātājus, kas sajaucas ar ūdeni, ieteicams izmantot tikai tad, ja vielas slikti šķīst ūdenī.

Šķīdinātāja daudzums nedrīkst sasniegt 1 % un nedrīkst kavēt hidrolīzi.

1.6.2. **Aprīkojums**

Izmanto stikla kolbas ar aizbāzni, bet slīpēta stikla savienojumiem jābūt bez ziedes.

Ja ķīmiskā viela vai bufersistēma ir gaistoša un ja pārbaudi veic paaugstinātā temperatūrā, ieteicams izmantot hermētiski noslēgtas mēģenes vai mēģenes ar blīvi, neatstājot vietu gaisam.

1.6.3. **Analīzes metode**

Metodei jābūt selektīvai, kas ļauj noteikt pārbaudāmo vielu vajadzīgajā šķīduma koncentrācijā, var vienlaicīgi izmantot vairākus piemērotus analīzes paņēmienus.

Analīzes metodi izvēlas atkarībā no vielas īpašībām, tai jābūt precīzai un jutīgai, kas ļauj reģistrēt sākotnējās koncentrācijas samazinājumu par 10 %.

1.6.4. **Noteikšanas apstākļi**

Noteikšanu veic pastāvīgā temperatūrā termostatā vai ūdens vannā, kuras svārstības nepārsniedz ± 0,5 °C no izvēlētās temperatūras. Temperatūru regulē un mēra ar precizitāti līdz ± 0,1 °C. Ar piemērotiem līdzekļiem jānovērš iespējamie traucējumi, ko var radīt fotolīze.

Testējot vielas, kas viegli oksidējas, jāaizvada izšķīdušais skābeklis (piemēram, pirms šķīduma pagatavošanas piecas minūtes barbotējot ar slāpekli vai argonu).

1.6.5. **Testa gaita**

1.6.5.1. *Priekšizmēģinājums*

Ar visām vielām jāveic orientējoši izmēģinājumi 50 ± 0,5 °C temperatūrā pie trijām pH vērtībām: 4,0, 7,0 un 9,0. Izdara pietiekami lielu skaitu mērījumu lai varētu noteikt, vai katrai pH vērtībai un 50 °C pussadalīšanās laiks ($t_{1/2}$) nepārsniedz 2,4 stundas vai mazāk par 10 % no hidrolīzes pēc piecām dienām. (Var pieļaut, ka šie rezultāti attiecīgi atbilst pussadalīšanās laikam, kas ir īsāks par vienu dienu vai garāks par vienu gadu, apstākļos, kuri vairāk atgādina dabas vides apstākļus (25 °C)).

Ja orientējoši izmēģinājumi liecina, ka testējamās vielas 50 % vai vairāk ir hidrolizējušies 2,4 stundu laikā 50 °C temperatūrā, vai mazāk nekā 10 % hidrolizējušies pēc piecām dienām pie katras no trijām pH vērtībām (4, 7 un 9), precīzāka noteikšana nav vajadzīga.

Citos gadījumos, un izmantojot dažas pH vērtības, attiecībā uz kurām šis priekšnoteikums nav izpildīts, veic pārbaudi Nr. 1.

1.6.5.2. *Pārbaude Nr. 1*

Pārbaudi Nr. 1 veic vienā temperatūrā; vēlams 50 ± 0,5 °C, un ja iespējams, sterilos apstākļos pie tām pH vērtībām, par kurām orientējošu izmēģinājumu rezultāti liecina par vajadzību veikt precīzāku noteikšanu.

Jāizvēlas pietiekams skaits paraugu (ne mazāk par četriem), lai aptvertu 20 līdz 70 % hidrolīzi, lai novērtētu neīstās pirmās kārtas reakcijas pie noteiktām pH vērtībām.

Katrai pH vērtībai, kurai veikta pārbaude Nr. 1, nosaka reakcijas kārtu.

Ātruma konstantes noteikšana 25 °C temperatūrā

Lēmums par turpmāko pārbaudes gaitu ir atkarīgs no tā, vai pārbaude Nr. 1 ļauj secināt, vai reakcija ir neīstās pirmās kārtas reakcija.

Ja pēc pārbaudes Nr. 1 rezultātiem nevar izdarīt noteiktu secinājumu par to, ka reakcija ir neīstās pirmās kārtas reakcija, jāveic papildus eksperimenti, kas aprakstīti pārbaudē Nr. 2.

Ja pēc pārbaudes Nr. 1 rezultātiem var droši secināt, ka reakcija ir neīstās pirmās kārtas reakcija, jāveic eksperimenti, kas aprakstīti pārbaudē Nr. 3. (Īpašos gadījumos var būt iespējams aprēķināt ātruma konstantes pie 25 °C, izmantojot konstantes 50 °C temperatūrā, kas aprēķinātas pēc pārbaudes Nr. 1 rezultātiem (sk. 3.2. punktu)).

1.6.5.3. *Pārbaude Nr. 2*

Šajā gadījumā pārbauda katru pH vērtību, kura ir jāpārbauda saskaņā ar pārbaudes Nr. 1 rezultātiem:

— vienā temperatūrā, kas zemāka par 40 °C,

— vai divās temperatūrās virs 50 °C, kas viena no otras atšķiras par vismaz 10 °C.

Katrai pH vērtībai un temperatūrai, veicot pārbaudi Nr. 2, iegūst datus vismaz sešos vienādos attālumos izvietotos punktos tā, lai hidrolīzes pakāpes būtu no 20 līdz 70 %.

Katrai pH vērtībai un temperatūrai mērījumi jāatkārto divas reizes. Ja pārbaudi Nr. 2 veic divās temperatūrās virs 50 °C, mērījumu vēlams atkārtot zemākajā temperatūrā.

Katrai pH vērtībai un temperatūrai, veicot pārbaudi Nr. 2, ja iespējams, grafiski jānosaka pussadalīšanās laiks ($t_{1/2}$).

1.6.5.4. *Pārbaude Nr. 3*

Šo pārbaudi veic pie visām pH vērtībām, par kurām attiecīgo nepieciešamību apliecina pārbaudes Nr. 1 rezultāti

— vienā temperatūrā, kas zemāka par 40 °C,

— vai divās temperatūrās virs 50 °C, kas viena no otras atšķiras par vismaz 10 °C.

Katrai pH vērtībai un temperatūrai, ja veic pārbaudi Nr.3, izraugās trīs punktus, pirmo sākumā laikā 0, bet otro un trešo laikā, kad hidrolīzes pakāpe ir lielāka par 30 %; aprēķina konstanti k_{obs} un $t_{1/2}$.

2. **IEGŪTIE DATI**

Neīstās pirmās kārtas reakcijām k_{obs} t_{obs} visām izmēģinājumu pH vērtībām un temperatūrām var noteikt pēc koncentrācijas logaritma izmaiņām laikā pēc izteiksmes:

$$k_{obs} = - \text{ virziena koeficients} \times 2{,}303 \quad [7]$$

Bez tam pēc vienādojuma [6] var aprēķināt $t_{1/2}$.

Attiecīgā gadījumā pēc Areniusa vienādojuma nosaka $k_{25°C.}$

Par neīstās pirmās kārtas reakcijām sk.

3. **ZIŅOJUMS**

3.1. PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, iekļauj šādu informāciju:

— vielas raksturojums,

— ar standartvielām iegūtie testēšanas rezultāti,

— izmantotās analīzes metodes princips un sīks raksturojums,

— par katru pārbaudi: temperatūra, pH vērtība, bufersistēmas sastāvs un tabula, kurā apkopoti visi mērījumu dati par koncentrācijas izmaiņām laikā,

— neīstās pirmās kārtas reakcijām $t_{1/2}$ novērotās k_{obs} vērtības un to aprēķinu procedūra,

— pirmās kārtas reakcijām koncentrācijas logaritma izmaiņu grafiks atkarībā no laika,

— visa informācija un novērojumi, kas vajadzīgi rezultātu interpretācijai.

3.2. REZULTĀTU INTERPRETĒŠANA

Ar pieņemamu precizitāti var aprēķināt testējamo vielu reakcijas ātruma konstantes (25 °C temperatūrā), ja ir noteiktas vielas homologu aktivācijas enerģijas vērtības, un var pietiekami pamatoti uzskatīt, ka testējamās vielas aktivācijas enerģija ir tādas pašas kārtas lielums.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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.*

Papildinājums

BUFERŠĶĪDUMU MAISĪJUMI

A. **KLĀRKS UN LUBSS**

Tabulās norādītās pH vērtības aprēķinātas pēc potenciāla mērījumu rezultātiem, izmantojot standarta Sērensena vienādojumus. Faktiskās pH vērtības ir par 0,04 vienībām lielākas nekā tabulās norādītās vērtības.

Sastāvs	pH
0,1 M kālija hidrogenftalāts + 0,1 N HC1 20 °C temperatūrā	
2,63 ml 0,1 N HC1 + 50 ml ftalāts līdz 100 ml	3,8
0,1 M kālija hidrogēnftalāts -I -0,1 N NaOH 20 °C temperatūrā	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalāts līdz 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalāts līdz 100 ml	4,2
0,1 M monokālija fosfāts +.0,1 N NaOH pie 20 °C temperatūrā	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāts līdz 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāts līdz 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāts līdz 100 ml	7,20

1 M H_3BO_3 šķīdums 0,1 M KC1 + 0,1 N NaOH 20 °C temperatūrā	
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes līdz 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes līdz 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes līdz 100 ml	9,2

B. **KOLTHOFS UN FLĒSHAUERS**

Sastāvs	pH
0,1 M monokālija citrāta un 0,1 N NaOH 18 °C temperatūrā (lai neveidotos pelējums, pievieno mazu kristāliņu timola)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta līdz 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta līdz 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta līdz 100 ml	4,2

C. **SĒRENSENS**

0,05 M boraka šķīdums + 0,1 N HCl šķīdums

Sastāvs		pH			
boraka šķīduma (ml)	HCl šķīduma (ml)	Sērensens, 18°C	Valbums		
			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 boraka šķīdums + 0,1 N NaOH šķīdums

Sastāvs		PpH			
boraka šķīduma (ml)	NaOH šķīduma (ml)	Sērensens, 18°C	Valbums		
			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