

## **ДИРЕКТИВА 84/449/ЕИО НА КОМИСИЯТА**

**от 25 април 1984 година**

**относно шесто адаптиране към ехническия прогрес на  
Директива 67/548/ЕИО на Съвета относно  
сближаването на законовите, подзаконови и  
административни разпоредби относно класификацията,  
опаковката и етикетирването на опасни вещества**

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива 67/548/ЕИО на Съвета, от 27 юни 1967 относно сближаването на законовите, подзаконови и административни разпоредби относно класификацията, опаковката и етикетирването на опасни вещества <sup>1</sup>, изменена за шести път от Директива 79/831/ЕИО на Съвета <sup>2</sup> и по-специално членове 19, 20 и 21 от нея,

като има предвид, че член 3, параграф 1 от Директива 79/831/ЕИО предвижда определянето на физико-химичните свойства, токсичността и екотоксичността на веществата и препаратите да бъде извършвано според методите, предвидени в приложение V;

като има предвид, че член 19 от Директива 79/831/ЕИО, от 18 септември 1979 г., предвижда, че приложение V произтича от процедурата на Комитета за адаптиране към техническия прогрес и, че по-специално е необходимо да бъдат вземани под внимание методите, признати и препоръчвани от компетентните международни органи;

като има предвид, че разпоредбите на настоящата директива са в съответствие с становището на Комитета за адаптиране към техническия прогрес на директивите за премахване на техническите бариери за търговията с опасни вещества и препарати;

**ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:**

*Член 1*

---

<sup>1</sup> ОВ L196, 16.8.1967 г., стр. 1.

<sup>2</sup> ОВ L 259, 15.10.1979 г., стр. 10.

Текстът на приложение V от Директива 67/548/ЕИО се заменя с текста на приложението на настоящата директива.

*Член 2*

Държавите-членки приемат и публикуват, преди 1 юли 1985, разпоредбите, необходими за привеждане на законодателството си в съответствие с настоящата директива и незабавно информират Комисията за това. Те прилагат тези разпоредби считано от 1 юли 1986г.

*Член 3*

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 25 април 1984 година.

*За Комисията:*

**Karl-Heinz NARJES**

*Член на Комисията*

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Настоящото приложение излага методите на изпитване за определяне на физико-химичните, токсикологичните и екотоксикологични свойства, изброени в приложения VII и VIII на Директива 79/831/ЕИО. Тези методи се основават върху работи и препоръки на компетентни международни органи (по-специално ОИСР).

Когато такива методи не съществуват се използват националните стандарти или методи, общопризнати в научните среди. Като основно правило опитите трябва да бъдат извършвани с веществата, в търговския им вид. Трябва да бъде обръщано внимание на възможното влияние на примесите върху резултатите от изпитванията.

Когато методите от настоящото приложение не са приложими за изпитването на дадено вещество, деклараторът трябва да обоснове използването на други методи.

Изпитванията и изследванията върху животни трябва да бъдат в съответствие с националната нормативна уредба и да се държи сметка за принципите на хуманност, както и за последните международни разработки в областта на хуманното отношение към животните.

Измежду различни еквивалентни методи на изпитване трябва да бъде избран този, който изисква най-малък брой животни.

## СЪДЪРЖАНИЕ

Стр.

Част А: Методи за определяне на физикохимичните свойства.....	
А. 1. Температура на топене/интервал на топене .....	
А. 2. Температура на кипене/интервал на кипене .....	
А. 3. Относителна плътност .....	
А. 4. Парно налягане.....	
А. 5. Повърхностно напрежение.....	
А. 6. Разтворимост във вода.....	
А. 7. Разтворимост в мазнини.....	
А. 8. Коефициент на разпределение.....	
А. 9. Температура на възпламеняване .....	
А. 10. Възпламенимост (твърди тела).....	
А. 11. Възпламенимост (газове).....	
А. 12. Възпламенимост (вещества и препарати, които при контакт с вода или влажен въздух образуват лесно запалими газове в опасни количества)...	
А. 13. Възпламенимост (твърди тела и течности) .....	
А. 14. Опасност от експлозия.....	
А. 15. Самовъзпламенимост (определяне на температурата на самовъзпламенимост на летливи течности и газове) .....	
А. 16. Самовъзпламенимост (твърди тела – определяне на относителната температура на спонтанно възпламеняване) .....	
А. 17. Оксидиращи свойства .....	
Част Б: Методи за определяне на токсичността .....	
Общ увод.....	
Б. 1. Остра токсичност – орално прилагане .....	
Б. 2. Остра токсичност – инхалаторно прилагане .....	
Б. 3. Остра токсичност – кожно прилагане.. .....	
Б. 4. Остра токсичност – кожно дразнене .....	
Б. 5. Остра токсичност – очно дразнене .....	
Б. 6. Остра токсичност –кожна сензибилизация.....	
Б. 7. Подостра токсичност – орално прилагане .....	
Б. 8. Подостра токсичност – инхалаторно прилагане .....	
Б. 9. Подостра токсичност – кожно прилагане.. .....	
Б. 10. Други ефекти : мутагенност – цитогенетичен ин-витро анализ върху бозайници .....	
Б. 11. Други ефекти : мутагенност – цитогенетичен ин-виво анализ върху костен мозък на бозайници, хромозомен анализ .....	
Б. 12. Други ефекти : мутагенност –микронуклеус (микроядрен) тест.....	
Б. 13. Други ефекти : мутагенност –опит за реверсивна мутация върху <i>Escherichia coli</i> .....	
Б. 14. Други ефекти : мутагенност –опит за реверсивна мутация върху <i>Salmonella typhimurium</i> .....	

Част В: Методи за определяне на екоотоксичността .....	
В. 1.	Остра токсичност при риби.....
В. 2.	Остра токсичност при водни безгръбначни (дафнии) .....
В. 3.	Разграждане: биотично разграждане: модифициран ОИСП скрининг тест .....
В. 4.	Разграждане : биотично разграждане : модифицирано изпитване AFNOR NF T 90/302.....
В. 5.	Разграждане : биотично разграждане : модифицирано изпитване Sturm.....
В. 6.	Разграждане : биотично разграждане : изпитване в затворена колба.....
В. 7.	Разграждане : биотично разграждане : модифицирано изпитване MITI .....
В. 8.	Разграждане : биохимична потребност от кислород .....
В. 9.	Разграждане : химична потребност от кислород .....
В. 10.	Разграждане : абиотично разграждане : хидролиза в зависимост от рН .....

## **ЧАСТ А. МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФИЗИКО-ХИМИЧНИТЕ СВОЙСТВА**

### **А.1. ТЕМПЕРАТУРА НА ТОПЕНЕ/ ИНТЕРВАЛ НА ТОПЕНЕ**

#### **1. МЕТОДИ**

Описаните методи се базират на ръководните указания на ОИСП (1).

##### **1.1. Увод**

Описаните по-долу методи и апарати позволяват определянето на температурата на топене на химични вещества, независимо от степента им на чистота.

Изборът на метод зависи от природата на изследваното вещество.

Следователно, ограничителният фактор е пряко свързан с факта дали веществото е лесно, трудно или не е разпрашващо се.

За някои вещества е по-подходящо да бъде определена температурата на замръзване или на втвърдяване. По тази причина ръководните указания съдържат също така стандартите за тяхното определяне.

##### **1.2. Определение и единици**

Температура на топене е температурата, при която се извършва преход от твърда към течна фаза, при нормално атмосферно налягане.

В идеалния случай тази температура съвпада с температурата на втвърдяване или замръзване.

Тъй като при голяма част от веществата фазовият преход протича в широка температурна област, той често се описва като интервал на топене.

Превръщане на единиците (К в °С)

$$t = T - 273,15$$

където  $t$  е температурата, изразена в градуси Целзий, а  $T$  – в градуси Келвин.

##### **1.3. Сравнителни вещества**

Използването на сравнителни вещества не е необходимо във всички случаи при изследване на ново вещество. Те трябва основно да служат за калибриране на метода през определен период от време и за сравнение на резултатите, когато се използва друг метод.

Някои сравнителни вещества са изброени в литература (2).

##### **1.4. Принцип на метода за изпитване**

Определя се температурата (температурния интервал) на прехода от твърда към течна фаза. На практика, по време на загряване на изследваното вещество, при атмосферно налягане, се определят температурите на начало и край на топенето.

Три типа методи са описани : метод на капилярната тръба, метод на загрятата плочка и определяне на температурата на замръзване.

#### 1.4.1. Метод на капилярната тръба

##### 1.4.1.1. Устройство с течна баня

Малко количество от фино разпрашеното вещество се поставя в капилярна тръба и внимателно се притиска. Тръбата се загрява едновременно с термометър и по време на процеса температурата се повишава със скорост малко по-ниска от 1 К за минута. Отчитат се температурите, съответстващи на началото и на края на топенето.

##### 1.4.1.2. Устройство с метален блок

Протоколът е същият, като този в случая, описан в 1.4.1.1, само че капилярната тръба и термометърът се поставят в нагриващ се метален блок и се наблюдават през отвори, направени в блока.

##### 1.4.1.3. Фотоелектрична регистрация

Пробата, съдържаща се в капилярната тръба, се загрява автоматично в метален цилиндър. През отвор направен в него, сноп светлина се изпраща през изследваното вещество до прецизно калибрирана фотоелектрична клетка. В момента на топене оптичните свойства на по-голяма част от веществата се променят от светонепроницаеми към прозрачни. Това води до повишаване на интензитета на светлината, която достига до фотоелектричната клетка и изпращане на сигнал за изключване към цифровия индикатор, регистриращ температурата на платиновия съпротивителен термометър, намиращ се в нагривателната камера. Този метод е неприложим при някои силно оцветени вещества.

#### 1.4.2. Методи със загрята повърхност

##### 1.4.2.1. Метод на загрятата плочка на Кофлер (Kofler)

Загрятата плочка на Кофлер (Kofler) се състои от две метални части с различна термична проводимост, които се загряват електрично. Тя е направено така, че температурния градиент е почти линеен по цялата дължина. Температурата на тази загрята плочка може да бъде променяна в интервала от 283 до 543 К и се отчита с помощта на устройство, състоящо се от плъзгач със стрелка и градуирана скала, специално създадени за въпросната плочка. За определяне на температурата на топене е достатъчно да се отложи фин слой от вещество директно върху повърхността на плочката. След няколко секунди се образува фина разделителна линия между твърдата и течната фаза. Температурата на нивото на тази линия се отчита, като се постави стрелката срещу линията.

##### 1.4.2.2. Микроскоп за определяне температурата на топене

За определяне на температурата на топене на много малки количества вещество се използват различни микроскопи със загряваща се подложка. Основно температурата се мери с помощта на чувствителна термодвойка, но понякога се използва и живачен термометър. Устройството се състои от нагривателна камера, съдържаща метална подложка, върху която е поставена стъклена

пластинка, предназначена да приеме пробата. В центъра на металната подложка е пробита дупка, позволяваща преминаването на светлина, идваща от огледалото, осветяващо микроскопа. По време на използване камерата се затваря чрез стъклена плоча, за да не бъде допуснато движението на въздух в работното поле. Загряването на пробата се регулира чрез реостат.

За много прецизни измервания, по време на анализ на оптично анизотропни вещества, е възможно използването на поляризирана светлина.

#### 1.4.2.3. Метод на менискуса

Този метод се прилага специално за полиамиди.

Определя се температурата, при която визуално се наблюдава преместване на менискус от силиконово масло, намиращ се между топла повърхност и капак, поставен над изследваната полиамидна проба.

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

Пробата се зарежда в специална епруветка и се поставя в апарат, позволяващ определянето на температурата на кристализация.

Пробата се разбърква внимателно през цялото време на охлаждане, докато температурата се отчита и записва на всеки тридесет секунди.

Когато няколко последователни отчитания показват постоянна температура, стойността на последната се смята за температура на кристализация (след внасяне на корекция за грешката на термометъра).

### 1.5. Критерии за качество

Условията за прилагане и точността на различните методи за определяне на температурата на топене/интервала на топене са посочени в следващата таблица.

**ТАБЛИЦА : ПРИЛОЖИМОСТ НА МЕТОДИТЕ**  
**А. Методи на капиллярната тръба**

Метод на измерване	Лесно разпрашващи се вещества	Трудно разпрашващи се вещества	температурни обхвати	Приблизителна максимална точност ( <sup>1</sup> )	Бележки
Устройство с течна баня	а	амо някои	т 273 до 573 К	± 0,3 К	Съществуващ гандарт: JIS K 0064
Устройство с метален блок	а	амо някои	т 293 до 573 К	± 0,5 К	Съществуващ гандарт: ISO 1218 (E)
Фотоелектрична регистрация	а	олям брой устройства	т 253 до 573 К	± 0,1 К	



риложение

(<sup>1</sup>) Стойност, зависеща от типа апарат и от степента на чистота на веществата.

### Б. Методи на загряната повърхност и на температурата на замръзване

Метод на измерване	Лесно разпръсващи се вещества	Трудно разпръсващи се вещества	температурни обхвати	Приблизителна максимална точност ( <sup>1</sup> )	ележки
Гореща плочка на Кофлер (Kofler)	Да	Не	от 283 до 543 К	± 1,0 К	Съществуващ стандарт: ANSI/ASTM D 345 1-76
Микроскоп за определяне на температурата на топене	Да	Само някои	от 273 до 573 (до 1 773 К)	± 0,2 К	Съществуващ стандарт: DIN 53736
Метод на менискуса	Не	Специално за полиамиди	от 293 до 573 К	± 0,5 К	Съществуващ стандарт: ISO 1218 (E)
Метод на температурата на замръзване	За течни вещества	За течни вещества	от 223 до 573 К	± 0,5 К	Съществуващ стандарт: като BS 4695

(<sup>1</sup>) Стойност, зависеща от типа апарат и от степента на чистота на веществата.

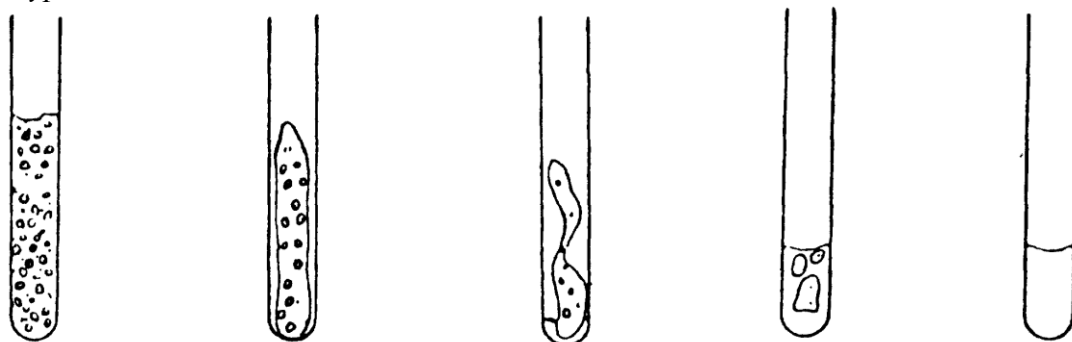
#### 1.6. Описание на методите

Процедурите за почти всички описани методи на изпитване са описани в международните и национални стандарти (виж допълнението).

##### 1.6.1. Метод на капилярната тръба

При бавно повишаване на температурата, фино разпръшените вещества обикновено преминават през описаните на фигура 1 стадии.

Фигура 1



- Стадий А  
Стадий А  
Стадий Б  
Стадий В
- Стадий Б  
(начало на топене; температура на овлажняване): фини капки прилепват равномерно към вътрешната стена на капилярната тръба;
- Стадий Б  
(температура на свиване): появява се празно пространство между пробата и вътрешната стена, поради свиване на топящия се продукт;
- Стадий В  
(температура на размекване): свитата проба започва да омеква и да се

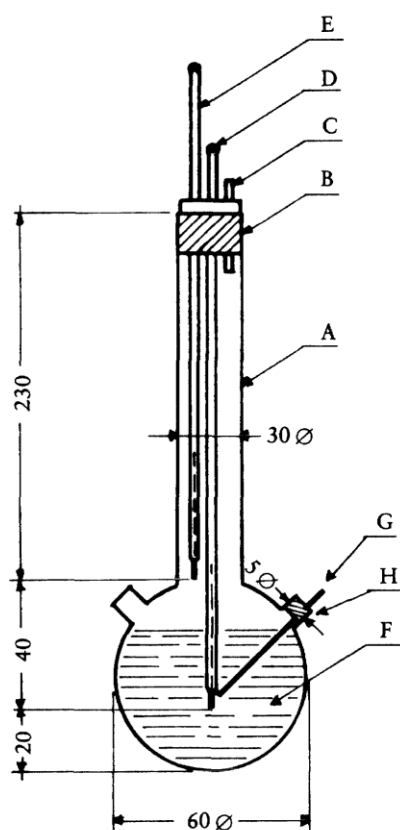
- втечнява;
- Стадий Г (температура на втечняване): на повърхността се образува пълен менискус, но все още има известно количество твърди частици;
- Стадий Д (край на процеса на топене): няма нито една твърда частица.

По време на определянето на температурата на топене трябва да бъде отчитана температурата в началото и в края на процеса на топене.

#### 1.6.1.1. Устройства с течна баня

На фигура 2 е описан стандартизиран тип апарат (JIS K 0064). Всички размери са изразени в милиметри, апаратът е стъклен.

Фигура 2



- A: Мерителна колба  
 B: Коркова тапа  
 C: Вентилационна тръба  
 D: Термометър  
 E: Допълнителен термометър  
 F: Водна баня  
 G: Стъклена капиларна тръба (дължина - 80 до 100 мм, вътрешен диаметър -  $1,0 \pm 0,2$  мм, дебелина на стената - 0,2 до 0,3 мм)  
 H: Странична тръба

Течна баня:

Използваната течност се избира в зависимост от температурата на топене. При температури на топене не превишаващи 473 К се използва течен парафин, при температури на топене не по-високи от 573 К се използва концентрирана сярна киселина или силиконово масло.

При температури на топене по-високи от 523 К може да бъде използвана смес, състояща се от три части сярна киселина и две части калиев сулфат (в тегловно отношение).

Термометър:

Могат да бъдат използвани единствено термометри, отговарящи на изискванията на следните или на еквивалентни стандарти: ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Процес:

Сухото вещество се стрива фино в хаванче и се внася в запоена от единия край капилярна тръба. Височината на запълване е фиксирана на приблизително 3 милиметра след притискане. За получаване на равномерно пресована проба, трябва капилярната тръба да бъде оставена да падне от височина приблизително равна на 700 милиметра във вътрешността на стъклена тръба, поставена вертикално върху часовниково стъкло.

Напълнената по този начин капилярна тръба се поставя в банята така, че централната част на живачния резервоар на термометъра да е в контакт с частта от капиляра съдържаща пробата. По принцип капилярната тръба се поставя в апарата в момента, когато банята е загрята около 10 К под температурата на топене.

Загряването на банята се регулира по такъв начин, че повишаването на температурата да достигне 3 К в минута. Течността трябва да бъде разбърквана. На около 10 К под очакваната температура на топене, скоростта на повишаване на температурата се регулира на максимум 1 К в минута.

Изчисление:

Изчислението на температурата на топене се извършва с помощта на следната формула:

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

където:

T – коригираната температура на топене, изразена в К

T<sub>D</sub> – температурата, отчетена от термометър D, изразена в К

T<sub>E</sub> – температурата, отчетена от термометър E, изразена в К

n – брой деления на живачния стълб от показващата се част на термометър D.

#### 1.6.1.2. Метален блок

Апарат:

Апаратът съдържа:

- цилиндричен метален блок, чиято горна част е куха и представлява нагревателна камера (виж фигура 3).
- метален капак с пробити две или повече дупки, позволяващи внасянето на тръбите в блока,
- система за загряване на металния блок, която може да се състои от електрично съпротивление в блока,
- реостат за регулиране на мощността в случая на електрично нагряване,

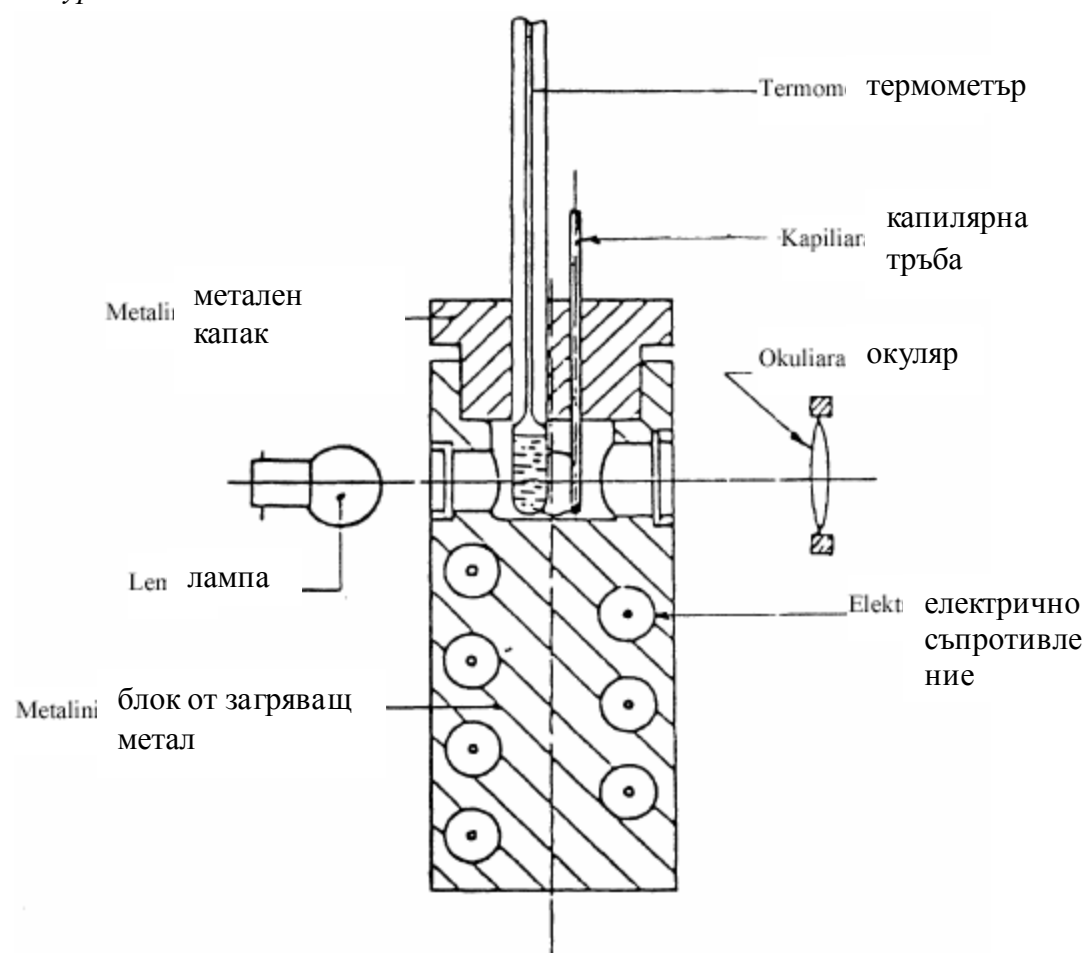
- страничните стени на камерата са с четири, диаметрално противоположни прозорци от термоустойчиво стъкло. Срещу един от тези прозорци е инсталиран окуляр за наблюдаване на капилярната тръба. Останалите три прозорца позволяват да бъде осветена вътрешността на камерата с лампи.
- капилярна тръба от термоустойчиво стъкло, запоена в единия край (виж точка 1.6.1.1).

Термометър:

Виж точка 1.6.1.1.

Могат също така да бъдат използвани термоелектрични елементи с еквивалентна точност.

Фигура 3



Процес:

Виж точка 1.6.1.1. При настоящото устройство не е необходима корекция на термометъра. Регистрираната температура на топене се приема за температурата на топене.

### 1.6.1.3. Фотоелектрична регистрация

Апарат и процес:

Апаратът се състои от метална камера, снабдена с автоматична система за нагриване. Три капилярни тръби се напълват както е описано в точка 1.6.1.1 и се поставят в пещта.

Апарата се калибрира с пет линейни повишения на температурата. Подходящото повишение на температурата се регулира електрично с предварително избрана постоянна линейна скорост. Регистриращи устройства показват реалната температура на пещта и температурата на топене на веществото в капилярните тръби.

#### 1.6.2. Методи със загрята повърхност

##### 1.6.2.1. Загрята плочка на Кофлер (K o f l e r)

Виж допълнението.

##### 1.6.2.2. Микроскоп за определяне температурата на топене

Виж допълнението.

##### 1.6.2.3. Метод на меникуса (полиамиди)

Виж допълнението.

В близост до температурата на топене, скоростта на повишаването на температурата трябва да бъде малко по-ниска от 1 К в минута.

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

Виж допълнението.

## 2. ДАННИ

В някои случаи е необходима корекция на термометъра.

## 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНИЯТА

Трябва да бъде указан използваният метод.

Температурата на топене, посочена в протокола трябва да бъде средна стойност от най-малко две измервания, не превишаващи границите на приблизителна точност (виж таблицата). Трябва да бъде представена оценка на точността. Ако разликата между температурата в началото и температурата в края на процеса на топене е в границите на точността на метода, температурата, отчетена в крайната фаза на топене се счита за температура на топене. В противен случай се указват и двете температури.

Някои вещества могат да се разложат или да сублимират преди да е достигната температурата на топене. В този случай това трябва да бъде съобщено.

Всички информации и наблюдения, интересни за интерпретацията на резултатите трябва да бъдат представени, особено що се отнася до примесите и физичното състояние на веществото.

#### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 102*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- 2) IUPAC, Physicochemical measurements : Catalogue of reference materials from national laboratories, *Pure and applied chemistry*, vol. 48, 1976, p. 505 - 515.

## Допълнение

За повече технически детайли могат да бъдат консултирани следните стандарти:

### 1. Метод на капилярната гръба

#### 1.1. Устройства с течна баня

ASTM E 324-69	Standart Test Method 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. Устройство с метален блок

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics-Polyamides-Determination of « Melting Point »

### 2. Методи със загрята повърхност

#### 2.1. Загрята плочка на Кофлер (Kofler)

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard Recommended Practices for Testing Polymeric Powder Coatings
---------------------	--

#### 2.2. Микроскоп за определяне на температурата на топене

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
-----------	---

#### 2.3. Методи на меникуса (полиамиди)

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	Полиамидни смоли. Определяне на „температурата на топене“. Метод на меникуса

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

BS 4633	Method for the Determination of Chrystallising Point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (Cooling Curve)
DIN 10319	Bestimmung des Gefrierpunktes von Milch
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen

DIN 51556	Bestimmung des Erstarrungspunktes am rotierenden Thermometer
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	<i>Температура на топене на парафини</i>



## А.2. ТЕМПЕРАТУРА НА КИПЕНЕ/ИНТЕРВАЛ НА КИПЕНЕ

### 1. Методи

Описаните методи се базират на ръководните указания на ОИСП (1).

#### 1.1. Увод

Описаните тук методи и устройства са приложими за течни вещества, които при температури, по-ниски от температурата на кипене не претърпяват химична реакция (например автоокисление, преподреждане, разлагане и др.). Методите са приложими за чисти течни вещества, както и за течни вещества съдържащи примеси.

Значението, отдадено на описанието на метода, използващ фотоелектрична регистрация се дължи на факта, че той позволява определянето не само на температурата на кипене, но също така и на температурата на топене. Освен това измерванията могат да бъдат извършвани автоматично.

„Динамичният метод“ има предимството, че може също да бъде използван за определяне на парно налягане и не е необходимо температурата на кипене да бъде коригирана за нормално налягане (101,325 kPa), тъй като нормално налягане може да бъде поддържано по време на измерванията. Но този метод все още не е автоматизиран.

#### *Забележки:*

Влиянието на примесите при определяне на температурата на кипене зависи много от природата на примеса. Това влияние е значително, когато пробата съдържа силно летлив разтворител.

Съдържанието на изследваната проба се променя при всяко измерване поради изпаряване на съставките с ниска температура на кипене. При тези условия се получават все по-големи стойности.

#### 1.2. Определение и единици

Температура на кипене е температурата, при която налягането на наситените пари на дадена течност е равно на нормалното налягане.

Измерената температура на кипене зависи от атмосферното налягане. Тази зависимост може да бъде изчислена количествено чрез следното уравнение на Клапейрон-Клаузиус (Clapeyron - Clausius):

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

където:

$p$  – парен натиск на веществото в Паскали

$\Delta H_v$  – топлина на изпарение в  $J \times \text{mol}^{-1}$

$R$  – универсална моларна газова константа =  $8,314 J \times \text{mol}^{-1} \times K^{-1}$

$T$  – температурата, изразена в К.

Температурата на кипене се дава за атмосферното налягане, при което е измерена.

*Преобразуване:*

Налягане (единици: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa (използването на „bar“ е все още разрешено, но не се препоръчва).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr (използването на „mm Hg“ и „Torr“ не се разрешава).

Температура (единици: K)

$$t = T - 273,15$$

(t е в °C и T в K)

### 1.3. Сравнителни вещества

Използването на сравнителни вещества не е необходимо във всички случаи при изследване на ново вещество. Те трябва основно да служат за калибриране на метода през определен период от време и за сравнение на резултатите.

Някои сравнителни вещества могат да бъдат намерени в методите, изброени в допълнението.

### 1.4. Принцип на метода на изпитване

Всички методи за определяне на температурата на кипене (или на интервала на кипене) се основават на измерване на температурата на кипене. По-долу са описани пет метода.

#### 1.4.1. Метод на ебулиометъра

Въпреки, че първоначално ебулиометрите са създадени за определяне на молекулното тегло чрез повишаване на температурата на кипене, с тях е възможно и определянето на температурата на кипене. Един много прост апарат е описан в стандарт ASTM D 1120-72 (виж допълнението). В този апарат течността се нагрява до кипене при атмосферно налягане (равновесни условия).

#### 1.4.2. Динамичен метод

При този метод, по време на кипене, с помощта на термодвойка, поставена в обратния поток, се измерва температурата на рекондензация на парите. При този метод налягането може да бъде променено.

#### 1.4.3. Дестилационен метод за определяне на температурата и интервала на кипене

При този метод течността се дестилира, измерва се температурата на рекондензация на парите и се определя количеството дестилат.

#### 1.4.4. Метод на Сиволобов (Siwoloboff)

Пробата се загрява в епруветка, потопена в баня от загрята течност. Запоена капиляра, съдържаща въздушно балонче в долната си част се потапя в епруветката.

Определя се температурата, при която поредица от балончета излиза от капиляра или температурата, при която поредицата от балончета спира вследствие на моментно охлаждане и флуида започва рязко да се издига в капиляра (Siwoloboff).

#### 1.4.5. Фотоелектрична регистрация

Следвайки принципа на Сиволобов (Siwoloboff), автоматично фотоелектрично измерване се извършва като се използва издигането на балончетата.

#### 1.5. Критерии за качество

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

#### 1.6. Описание на методите

Процедурите за някои методи на изпитване са описани в международни и национални стандарти (виж допълнението).

##### 1.6.1. Ебулиометър

Виж допълнението.

##### 1.6.2. Динамичен метод

За определяне на парното налягане виж метод на изпитване А.4.

Отчита се температурата на кипене при налягане 101,325 kPa.

##### 1.6.3. Дестилационен метод (интервал на кипене)

Виж допълнението.

**ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ НА МЕТОДИТЕ**

Метод на измерване	Приблизителна точност	Забележки
Ебулиометър	$\pm 1,4$ К (до 373 К) <sup>(1)(2)</sup> $\pm 2,5$ К (над 373 К) <sup>(1)(2)</sup>	Съществуващ стандарт ASTM D 1120-72 <sup>(1)</sup>
Динамичен метод	$\pm 0,5$ К <sup>(2)</sup>	
Дестилационен метод (интервал на кипене)	$\pm 0,5$ К	Съществуващи стандарти пример ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Метод на Сиволобов (Siwoloboff)	$\pm 1,0$ К до $\pm 2,0$ К <sup>(2)</sup>	
Фотоелектрична регистрация	$\pm 0,3$ К (до 373 К) <sup>(2)</sup>	

<sup>(1)</sup> Тази точност важи само за прости апарати, като този, описан в стандарт ASTM D 1120-72; възможно е да бъде подобрена като се използват по-усъвършенствани ебулиометри.

<sup>(2)</sup> Валидна е само за чисти вещества.

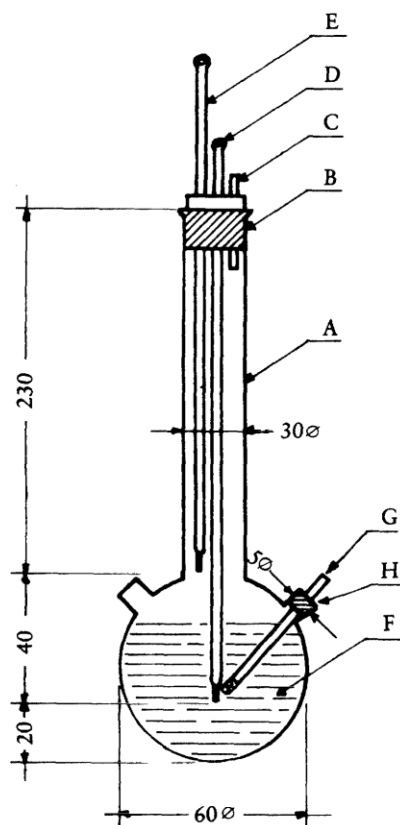
##### 1.6.4. Метод на Сиволобов (Siwoloboff)

Пробата се поставя в епруветка с диаметър приблизително 5 милиметра и се нагрива в апарат, служещ за определяне на температурата на топене (виж фигура 1).

На фигура 1 е даден пример за стандартизиран апарат, служещ за определяне на температурата на топене и на температурата на кипене (JIS K 0064).

Размерите са дадени в милиметри, апаратът е стъклен.

Фигура 1



- A: Измервателна колба
- B: Тапа
- C: Вентилационна тръба
- D: Термометър
- E: Допълнителен термометър
- F: Течна баня
- G: Епруветка (външен диаметър - максимум 5 мм)  
Капилярна тръба (дължина приблизително 100 мм, вътрешен диаметър от 1 мм, дебелина на стените между 0,2 и 0,3 мм)
- H: Странична тръба

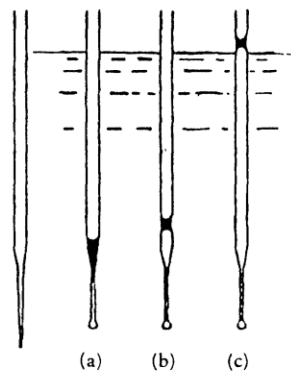
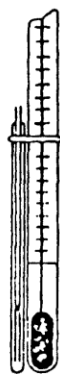
Капилярна тръба (капиляра на кипене), запоена на около 1 сантиметър над долния си край се потапя в епруветка, съдържаща изследваното вещество. Запоената част на капилярата трябва да се намира под повърхността на течността. Епруветката трябва да бъде завързана за термометъра (виж фигура 2).

Фигура 2

Метод на Сиволобов (Siwoloboff)

Фигура 3

Модифициран метод



Течността в банята се избира според температурата на кипене. За температури до 573 К може да бъде използвана сярна киселина или силиконово масло. Течният парафин е подходящ само за температури по-ниски от 473 К. В началото нагриването на банята трябва да бъде регулирано така, че скоростта на повишаване на температурата да е 3К в минута. Течността в банята трябва да бъде разбърквана. Около 10 К под очакваната температура на кипене, нагриването се намалява така, че скоростта на повишаване на температурата да не надминава 1 К в минута. В близост до температурата на кипене от капиларата започват да излизат балончета.

Температурата на кипене се определя като температурата, при която, при моментно охлаждане, поредицата от балончета спира и течността в капилара се надига. Отчетената от термометъра температура в този момент отговаря на температурата на кипене на изследваното вещество.

При модифицирания метод (виж фигура 3), температурата на кипене се определя в капилара за определяне на температура на топене. Долният край на последната се издължава до много фино връхче с дължина около 2 сантиметра (а) и малко количество от изследваното вещество се всмуква във вътрешността. Тогава крайт се запоява като вътре се вкарва и въздушно балонче. При загреване в апарата за определяне на температурата на топене (b), въздушното балонче се разширява. Температурата на кипене съответства на температурата, при която пробата от веществото стига до повърхността на течната баня (c).

#### 1.6.5. Фотоелектрична регистрация

Проба от изследваното вещество се загрева в капиларна тръба, поставена в нагриващ се метален блок.

Чрез отворите, направени в блока, сноп светлина се изпраща през веществото към много прецизно калибрирана фотоелектрична клетка.

По време на повишаване на температурата на пробата, от капилара се отделят въздушни мехурчета. При достигане на температурата на кипене количеството балончета силно нараства. Последващата промяна на интензивността на светлината се регистрира от клетката, която изпраща сигнал за спиране към температурния индикатор (платинов съпротивителен термометър, поместен в металния блок).

Този метод е изключително полезен, защото позволява извършването на измервания при температури по-ниски от стайната, до 253,15 К (-20 °С) и то без каквото и да е модифициране на апарата. Той трябва само да бъде поставен в студена стая или в охлаждаща баня. Техническите инструкции, давани с апарата, съдържат цялата необходима информация за коректното определяне на температурата на кипене.

## 2. ДАННИ

За слаби отклонения от нормалното налягане (максимум  $\pm 5$  kPa), температурите на кипене могат да бъдат коригирани с помощта на уравнението на Сидни-Юнг (Sidney-Young):

$$T_n = T + f_T \times \Delta p,$$

където:

$\Delta p = (101,325 - p)$  внимание за знака;

$p$  – барометрично налягане в kPa;

$f_T$  – скорост на промяна на температурата на кипене с налягането, в К/kPa;

$T$  – измерена стойност на температурата на кипене в К;

$T_n$  – коригирана стойност на температурата на кипене при нормално налягане, в К.

Коефициентите на корекция на температурата  $f_T$  и уравненията за тяхното приближение се намират в международните и национални стандарти, цитирани в текста (в сила за много вещества).

Например, метода DIN 53171 дава корекциите за разтворителите, съдържащи се в боите:

**ТАБЛИЦА 2. КОЕФИЦИЕНТИ НА КОРЕКЦИЯ НА ТЕМПЕРАТУРАТА,  $f_T$**

Температура (К)	Корекционен коефициент $f_T$ , (К/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. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Трябва да бъде посочен използвания метод. Определената температура на кипене трябва да бъде средната от най-малко две измервания, намиращи се в границите на приблизителна точност посочени в таблица 1. Ако няма повтораемост в определянията е необходимо да бъдат търсени други методи.

Трябва да бъдат посочени измерените стойности на температурите на кипене и средните им аритметични, както и налягането (наляганията), при които са извършени измерванията, регистрирани в кРа.

За предпочитане е налягането да бъде близко до нормалното налягане. Когато кипенето на дадено вещество се простира върху широк обхват от температури, този интервал на кипене трябва да фигурира в отчета. Трябва да се дават оценки за точността на всички резултати.

Всички информации и наблюдения, интересни за интерпретацията на резултатите трябва да бъдат представени, особено що се отнася до примесите и физичното състояние на веществото.

### 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

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

*Допълнение*

За повече технически детайли могат да бъдат консултирани следните стандарти:

1. **Ебулиометър**

1. ASTM D 1120-72 Standard test method for boiling point of engine antifreezes

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

ISO/R 918 Test method for distillation (distillation yield and distillation range)

BS 4349/68 Method for determination of distillation of petroleum products

BS 4591/71 Method for the determination of distillation characteristics

DIN 53171 Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes



## **А.3. ОТНОСИТЕЛНА ПЛЪТНОСТ**

### **1. МЕТОД**

Описаните методи се базират на ръководните указания на ОИСП (1).

#### **1.1. Увод**

Описаните методи за определяне на относителната плътност се прилагат за твърди и течни вещества, независимо от степента им на чистота. Различните методи, които се прилагат, са изброени в таблицата.

#### **1.2. Определение и единици**

Относителна плътност ( $D_4^{20}$ ) на твърди тела или течности е отношението между масата на даден обем изследвано вещество, определена при температура 20 °С, и масата на същия обем вода, определена при температура 4 °С. Относителната плътност е безмерно число.

Плътност ( $\rho$ ) на дадено вещество е частното на неговата маса  $m$  към неговия обем  $V$ .

В SI система, плътността се измерва в килограми за кубичен метър ( $\text{кг}/\text{м}^3$ ).

#### **1.3. Сравнителни вещества (1) (2)**

Използването на сравнителни вещества не е необходимо във всички случаи при изследване на ново вещество.

Те трябва основно да служат за калибриране на метода през определен период от време и за сравнение на резултатите.

#### **1.4. Принцип на методите**

Прилагат се четири метода.

##### *1.4.1. Метод на плавателност*

###### **1.4.1.1. Ареометър (за течности)**

Достатъчно точни и бързи определяния на плътността могат да бъдат получени с помощта на плаващите ареометри, където за плътността на течността се съди по дълбочината на потъване, отчетена върху градуирана скала.

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

Разликата между теглото на изследваната проба, измерено във въздух и теглото, измерено във вода, може да служи за определяне на плътността.

За твърди тела, определената плътност се отнася само за конкретната изследвана проба. За определяне на плътността на дадена течност, тяло с известен обем  $V$  се тегли първо във въздух и после – в течността.

###### **1.4.1.3. Метод на потопената сфера (за течни вещества) (3)**

При този метод плътността на дадена течност се определя от разликата в теглата на течността преди и след потапянето на сфера с известен обем в нея.

#### 1.4.2. Пикнометрични методи

За твърди тела и течности могат да бъдат използвани пикнометри с различни форми, чиито обеми са известни. Плътноста се изчислява от разликата в теглото между пълен и празен пикнометър, от една страна, и на известния му обем, от друга страна.

#### 1.4.3. Сравнителен въздушен пикнометър (за твърди тела).

Плътноста на твърдо тяло с каква да е форма може да бъде измерена при стайна температура с помощта на сравнителен газов пикнометър. Обема на дадено вещество във въздух или в инертен газ се измерва в градуиран цилиндър с променлив обем. За пресмятане на плътността след измерване на обема се извършва измерване на масата.

#### 1.4.4. Осцилиращ денситометър (4) (5) (6)

Плътноста на дадена течност може да бъде измерена с помощта на осцилиращ денситометър, т.е. на осцилатор с форма на тръба U, който трепти със специфична честота, зависеща от масата.

Вкарването на проба променя резонансната честота на осцилатора. Последният трябва да бъде еталониран с помощта на две вещества с известни плътности.

Веществата трябва да бъдат избирани така, че техните плътности да покриват интервала от измервания.

### 1.5. Критерии за качество

Приложението на различните използвани методи за определяне на относителната плътност е представено в таблицата.

Точността, цитирана в стандарт ISO се отнася единствено за чисти вещества.

### 1.6. Описание на методите

Литературата с цитираните като пример стандарти, които могат да бъдат консултирани за получаване на допълнителни технически детайли, е добавена към допълнението.

Опитите трябва да бъдат извършвани при температура 20 °C и да съдържат най-малко две измервания.

## 2. ДАННИ

Виж стандартите.

## 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Използваният метод или стандарт трябва да бъдат посочени в протокола.

Относителната плътност ( $D_4^{20}$ ) трябва да бъде посочена според дефиницията от точка 1.2, заедно с физичното състояние на изследваното вещество. Всички информации и наблюдения, интересни за интерпретацията на резултатите трябва да бъдат представени, особено що се отнася до примесите и физичното състояние на веществото.

**ТАБЛИЦА. ПРИЛОЖИМОСТ НА МЕТОДИТЕ**

Методи на измерване	Плътност		Максимален възможен динамичен визкозитет	Бележки
	Твърди тела	Течности		
1.4.1.1. Аерометър		×	5 Pa s	ISO 387; ISO/R 649 ISO/R 1185 (A) ISO/R 91 и R 758 DIN 53217
1.4.1.2. Хидростатична везна а) твърди тела б) течности	×	×	5 Pa s	
1.4.1.3. Метод на потопената сфера		×	20 Pa s	
1.4.2. Пикнометър а) твърди тела б) течности	×	×	500 Pa s	ISO/R 3507 ISO/R 1183 (B) ISO/R 758 DIN 55990 Част 3 DIN 53243
1.4.3. Сравнителен въздушен пикнометър	×			
1.4.4. Осцилиращ денситометър		×	5 Pa s	

#### 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 109*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- 2) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, *Pure and applied chemistry*, vol. 48, 1976, p. 508.
- 3) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, *Technisches Messen tm*, vol. 11, 1979, p. 427 - 430.
- 4) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, *Elektronik*, vol. 19, 1970, p. 297 - 302.
- 5) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen - Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, *Die Pharmazeutische Industrie*, vol. 37, 1975, p. 717 - 726.
- 6) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, *Brauwissenschaft*, vol. 9, 1976, p. 253 - 255.

## Допълнение

За повече технически детайли може да бъдат консултирани следните стандарти:

### 1. Метод на плавателност

#### 1.1. Ареометър

DIN 12790, ISO 387           Hydrometer: general instructions

ISO 387

DIN 12791                   Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use

Part II: Density hydrometers: standardised sizes, designation

ISO/R 649

DIN 12793                   Laboratory glassware: range find hydrometers

#### 1.2. Хидростатична везна

За твърди вещества:

ISO R 1183                   Method A. Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics

ASTM D 792                   Specific Gravity and Density of Plastics by Displacement

DIN 53479                   Testing of plastics and elastomers; determination of density

За течни вещества:

ISO R 91                     ISO R 758

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

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 or ASTM D 1481-62

ASTM D 1298                   Density, Specific gravity or API gravity of crude Petroleum and liquid Petroleum Products by Hydrometer Method

BS 4714                     Density, Specific gravity or API gravity of crude Petroleum and liquid Petroleum Products by Hydrometer Method

#### 1.3. Метод на потопената сфера

DIN 53217                   Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer (enlargement for immersed ball method to be published in 1981)

### 2. Пикнометрични методи

#### 2.1. За течни вещества

ISO 3507                     Pycnometers

ISO/R 758	Liquid chemical products: determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \times \text{s}^{-1}$ at 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \times \text{s}^{-1}$ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)
DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have a too high vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol-water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products: determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber Products – Chemical Analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for Determination of Specific Gravity and Density of Petroleum Products (Graduated Bicapillary Pycnometer Method)
BS 5903	Method for determination of Relative Density and Density of Petroleum Products by the Capillary-Store Pycnometer Method

### 2.2. За твърди вещества

ISO 1183	Methods B. Methods for Determining the Density and Relative Density of Plastics excluding Cellular Plastics
DIN 19683	Determination of the Density of Soils

### 3. Сравнителен въздушен пикнометър

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

## **А.4. ПАРНО НАЛЯГАНЕ**

### **1. МЕТОД**

Описаните методи се базират на ръководните указания на ОИСП (1).

#### **1.1. Увод**

Преди да се започне това изпитване е препоръчително е да се притежава предварителна информация относно структурата, температурата на топене и температурата на кипене на даденото вещество.

Не съществува измервателен метод, който да е приложим за целия обхват от парни налягания. Ето защо се препоръчва използването на няколко метода за измерване на парни налягания, простиращи се в интервала от  $< 10^{-3}$  до  $10^5$  Pa.

Обикновено наличието на примеси влияе на парното налягане. Това влияние при определяне на парното налягане зависи до голяма степен от природата на примеса. Ефекта може да бъде значителен при наличие на силно летлив разтворител в пробата.

#### **1.2. Определения и единици**

Парното налягане на дадено вещество е налягането на насищане над течното или твърдо вещество. При термодинамично равновесие парното налягане на дадено чисто вещество зависи единствено от температурата.

В система SI използваната единица за налягане е Паскал (Нютон/м<sup>2</sup>).

Използвани преди единици, заедно с коефициентите им на превръщане :

$$1 \text{ Torr (1 mm Hg)} = 1,333 \times 10^2 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ атмосфера (физична, atm)} = 1,013 \times 10^5 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ атмосфера (технична, at)} = 9,81 \times 10^4 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$$

В система SI единицата за температура е градус Келвин (K).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Използването на сравнителни вещества не е необходимо във всички случаи при изследване на ново вещество. Те трябва да служат най-вече за проверка през определен период от време на надеждността на метода и за сравнение на получените резултатите с тези, получени при използване на друг метод.

#### **1.4. Принцип на методите**

В настоящия параграф са описани пет метода за определяне на парното налягане, приложими при различни обхвати от парни налягания. При всеки метод парното налягане се определя при различни температури. В ограничен температурен обхват, логаритъма от парното налягане на дадено чисто вещество е обратнопропорционален на температурата.

#### 1.4.1. *Динамичен метод*

При динамичния метод се измерва температурата на кипене, съответстваща на определено налягане.

Препоръчителен обхват:

От  $10^3$  до  $10^5$  Pa, между  $20\text{ }^\circ\text{C}$  и  $100\text{ }^\circ\text{C}$ .

Настоящият метод се препоръчва също за определяне на температури на кипене не надвишаващи  $350\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 1.4.2. *Статичен метод*

При статичния метод се определя парното налягане, което се установява в затворена система при термодинамично равновесие и определена температура.

Този метод е приложим при едно или многокомпонентни твърди тела и течности.

Препоръчителен обхват:

От  $10$  до  $10^5$  Pa, между  $0\text{ }^\circ\text{C}$  и  $100\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 1.4.3. *Изотенископ*

Този стандартизиран метод е статичен метод, но обикновено не се прилага за многокомпонентни системи. Допълнителна информация може да бъде намерена в стандарт ASTM D-2879-75.

Препоръчителен обхват:

От  $100$  до  $10^5$  Pa, между  $0\text{ }^\circ\text{C}$  и  $100\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 1.4.4. *Везна за парно налягане*

Количеството изпарено за единица време вещество в апарат с известен обем се определя при намалено налягане, такова, че връщането на вещество в резервоарната клетка е пренебрежимо малко (например, чрез измерване на импулс, генериран от парна струя в чувствителна везна или чрез измерване на загубата на тегло на резервоарната клетка).

Препоръчителен обхват:

От  $10^{-3}$  до  $1$  Pa, между  $0\text{ }^\circ\text{C}$  и  $100\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 1.4.5. *Метод на газово насищане*

Поток от инертен газ преминава през веществото, по такъв начин, че той излиза наситен с парите на веществото. Тези пари кондензират в подходящ колектор. Измерването на количеството вещество, пренесено от известен обем газов носител позволява да бъде изчислено парното налягане при дадена температура.

Препоръчителен обхват:

До  $1$  Pa.

### 1.5. **Критерии за качество**

В следващата таблица е показано сравнение на различни методи за определяне на парното налягане по отношение на област на приложение, повтаряемост, възпроизводимост, обхват на измервания и съществуващи стандарти.

**ТАБЛИЦА. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО**

Метод на измерване	сещество		ценка на повторяемостта ( <sup>1</sup> )	ценка на възпроизводимостта ( <sup>1</sup> )	Препоръчителен обхват	стандарти
	Твърдо	Течно				
1.4.1. Динамичен метод		×	до 25 % 1 - 5 %	до 25 % 1 - 5 %	От $10^3$ Pa до $2 \times 10^3$ Pa От $2 \times 10^3$ Pa до $10^5$ Pa	
1.4.2. Статичен метод	×	×	5 - 10 %	5 - 10 %	От 10 Pa до $10^5$ Pa	
1.4.3. Изотенископ	×	×	5 - 10 %	5 - 10 %	От $10^2$ Pa до $10^5$ Pa	ASTM D 2879-75
1.4.4. Везна за парно налягане	×	×	5 - 20 %	до 50 %	От $10^{-3}$ Pa до 1 Pa	
1.4.5. Метод на газово насищане	×	×	10 - 30 %	до 50 %	От $< 10^{-3}$ Pa до 1 Pa	

(<sup>1</sup>) Зависи от степента на чистота.

## 1.6. Описание на методите

### 1.6.1. Динамичен метод

#### 1.6.1.1. Апарат

Измерителният уред съдържа дестилационен апарат с обратен хладник (стъклен или метален) (виж фигура 1), устройство за регулиране и измерване на температурата и устройство за регулиране и измерване на налягането. Апаратът, представен на схемата е стъклен и се състои от пет основни части:

Тръба, частично с двойна стена, имаща шлифован накрайник, охладител, съд за охлаждане и входен отвор.

Стъклен цилиндър, свързан с помпа Cottrell, монтиран върху частта от тръбата, където се осъществява кипенето и който е с грапава повърхност за да се избегнат резките подскачания по време на кипене.

Температурата се измерва с термодвойка или съпротивителен термометър, потопен в малко количество масло. Той се поставя в тръбата за зареждане, която има мъжки шиф в горния си край и е запоена в долния си край.

Тръбна система, съединяваща устройството за регулиране и измерване на налягането.

Буферен обем, който е свързан с измерващия апарат посредством капилярна тръба.



Нагревателен елемент, който е поставен от външната страна в долната част на стъкления апарат и се използва за загряване на съда за кипене. Необходимият ток се получава с регулиращ трансформатор и се контролира с амперметър.

За получаване на желания вакуум (между  $10^2$  Pa и приблизително  $10^5$  Pa) се използва маслена помпа.

Бутилка с азот се използва за установяване на желаното налягане. Тя се свързва с апарата посредством винтил, който се използва също за вентилиране на апарата.

Прецизен датчик за налягане, свързан с тръбната система, служи за извършване на измерванията.

#### 1.6.1.2. Процес на измерване

Парното налягане се измерва като се определя температурата на кипене на пробата при различни налягания от  $10^3$  до  $10^5$  Pa приблизително. Температурата на кипене (или равновесието в случай на смес) се достига, когато температурата се запазва постоянна (за дадено налягане). Този процес на измерване е неприменим при пенливи вещества.

Преди измерване всички стъклени елементи на апарата трябва да бъдат добре почистени и изсушени под вакуум. Тогава веществото се вкарва в апарата. Когато твърдите тела не са в прахова форма, зареждането може да доведе до проблеми. Все пак те могат да бъдат избегнати като се загрее водата в хладника. След зареждане, апаратът се сглобява и веществото се дегазира. Установява се най-ниското от желаните налягания, нагревателната система се включва и термодвойката или съпротивителният термометър се свързва към регистриращ уред. Равновесието е достигнато, когато последния показва постоянна температура на кипене при постоянно налягане. След отчитане на тази равновесна точка се установява по-високо налягане. Процесът продължава аналогично, до достигане на налягане от  $10^5$  Pa (приблизително 5 - 10 измервания общо, които за проверка трябва да бъдат повторени при намаляващи налягания).

#### 1.6.2. Статичен метод

##### 1.6.2.1. Апарат

Апаратът за измерване (виж фигура 2) съдържа не само системи за нагряване и охлаждане от метал и стъкло за довеждане на пробата до желаната температура, но също така и устройство за регулиране и измерване на налягането и температурата.

Клетката, съдържаща пробата е свързана от една страна с високовакуумен кран от неръждаема стомана и от друга страна с U-видна тръба, напълнена с подходяща манометрична течност. Другият край на U-видната тръба е свързан с тръбна система, чиито три клона водят съответно към вакуумна помпа, бутилка с азот и прецизен датчик за налягане.

За довеждане на пробата до избраната температура, резервоарната клетка, както и тялото на крана и достатъчно голяма част от U-видната тръба (на практика до

височината на тялото на крана), се потапят в баня с постоянна температура. Температурата се измерва и регистрира чрез термодвойка или съпротивителен термометър, поставен в близост до външната страна на клетката.

За много силно охлаждане на пробата се използва течен азот или смес от сух лед и алкохол. В този случай, измерванията се извършват чрез ултракриостат.

Подходяща помпа се използва за достигане на желаното налягане в апарата.

Обикновено парното налягане на дадено вещество се измерва индиректно чрез нулев индикатор. Този индикатор може да представлява U-видна тръба, съдържаща течност, както е описано по-долу, или например мембранен манометър. В баня с контролирана температура, парното налягане нарушава равновесието на течността, намираща се в U-видната тръба. Равновесието на налягането се възстановява чрез вкарване на азот в апарата. Налягането на използвания азот се измерва чрез прецизен датчик, намиращ се при стайна температура. Това налягане съответства на парното налягане на даденото вещество при съответната постоянна температура. В зависимост от обхвата от налягания и химичното поведение на веществото различни течности (живак, силиконови масла или фталати) могат да бъдат използвани в U-видната тръба за регулиране на нулата.

Живак може да бъде използван при атмосферно налягане до  $10^2$  Pa, силиконови масла и фталати от  $10^2$  Pa до 10 Pa. Що се отнася до мембранный манометър, той може да бъде използван даже при налягания по-ниски от  $10^{-1}$  Pa.

#### 1.6.2.2. Метод на измерване

Преди измерване всички части на апарата, чията схема е показана на фигура 2, трябва да бъдат добре почистени с разтворители и изсушени под вакуум.

U-видната тръба се напълва с желаната течност, която трябва предварително да бъде дегазирана при висока температура.

След напълване на изследваното вещество, апаратът се свързва и клетката се охлажда достатъчно. Намиращият се над нея кран се отваря и в апарата се създава вакуум. След няколко минути кранът се затваря, пробата се довежда до желаната температура и отместването на колоните с течност на U-видната тръба се компенсира чрез вкарване на азот. След това клетката отново се охлажда. Всяка остатъчно налягане, наблюдавано при това охлаждане се дължи или на наличието на известно количество въздух в пробата, освободено от по време на процеса на нагряване (би могло да бъде премахнато чрез ново създаване на вакуум в клетката) или на недостатъчно охлаждане. Тогава като охладител трябва да бъде използван течен азот.

Когато пробата е достатъчно дегазирана, зависимостта на парното налягане от температурата се определя при достатъчно малки температурни интервали.

#### 1.6.3. Изотенископ

Пълно описание на метода е дадено в литература (2), а принципа на апарата за измерване е показан на фигура 3. Подобно на статичния метод, описан в точка 1.6.2, изотенископа е приложим за изследване на твърди тела и течности.

В случая на течности, самото вещество служи за течност в спомагателния манометър. В случая на твърди тела, в зависимост от обхвата на налягания и температури, се избира един от течните манометри, изброени в точка 1.6.2. Сферата на изотенископа за течности се напълва с изследваното вещество, което се дегазира при висока температура по време на кипене.

Частта от веществото, която се дестилира по време на това дегазиране се кондензира в горната охладена сфера, откъдето се връща отново в U-видната тръба. Когато последната съдържа достатъчно количество дегазирано вещество, се потапя заедно с долната сфера в термостатична баня. При достигане на желаната температура, парното налягане се измерва по индиректен метод, описан в точка 1.6.2.

В случая на твърди тела, ампулата от страна на най-дългия край на изотенископа се запълва с дегазираната течност на манометъра. Изследваното твърдо тяло се вкарва в долната сфера и се дегазира при висока температура. Изотенископа се накланя по такъв начин, че манометричната течност да може да изтече в U-видната тръба. Измерването на зависимостта на парното налягане от температурата, се извършва според описанието, дадено в точка 1.6.2.

#### 1.6.4. Везна за парно налягане

##### 1.6.4.1. А п а р а т

В литературата са описани голям брой модели на апарати (1). Показаният на фигура 4 апарат, илюстрира добре принципите на настоящия метод. Той се състои от основна плоча със защитен капак, помпа с устройство за мерене на вакуум и устройство за определяне на парното налягане чрез показване на отклонението на стрелката. Върху основната плоча са монтирани следните елементи:

- изпарителна пещ с фланец и ротационна зареждаща тръба. Пещта представлява плосък цилиндричен меден (или понякога стъклен съд, ограден с медна стена) съд, поставен в медна скоба, завинтена върху държател от неръждаема стомана на височината на долния му изпъкнал край. От своя страна държателят е монтиран върху основната плоча по такъв начин, че да е възможно въртенето му около оста на пещта. Нагриването става чрез загряващо съпротивление, поставено в частта от неръждаема стомана и следователно изолирано от вакуумната камера,
- капакът на пещта е меден и притежава три изпарителни отвора с различно сечение, разположени на 90° един от друг. Чрез завъртане на пещта избраният отвор или междинно положение се довежда под процепа на охладителя, разположен ексцентрично спрямо пещта, което позволява или да се носочи молекулния поток към блюдото на везната или да се избегне това. За измерване на температурата се използва термодвойка или съпротивителен термометър, монтиран върху стената на пещта.

- везната е уред с подвижна бобина. Стрелката е заменена от тръбичка, върху която са монтирани кобилицата и противотежестта. Кобилицата съдържа заменяемо блюдо от фина алуминиева пластина, покрита със злато. Приблизително в центъра на кобилицата е закрепена нишка от константан с дебелина 0,1 милиметра, върху която могат да бъдат поставени еталонни тежести. Парното налягане може да бъде регистрирано чрез фотоелектричен метод за регистрация на нулевата точка,
- месингов цилиндър обгражда от всички страни блюдото на везната, с изключение на два процепа, позволяващи движението на кобилицата и един тесен отвор за влизане на молекулния сноп. Външното разсейване на топлината се осигурява от медна пръчка, която тръгва от върха на цилиндъра и преминава основната плоча през термоизолирана тръба от неръждаема стомана. Под основната плоча, пръчката е потопена в Дюаров съд с течен азот.

#### 1.6.4.2. Метод на измерване

Медната пещ се напълва с даденото вещество; капакът се затваря; отворите в плочата, защитната преграда и охладителя са разположени над пещта. Капакът се поставя на място и вакуумните помпи се включват. Налягането, което трябва да бъде достигнато преди започване на измерването, е приблизително  $10^{-4}$  Pa. От  $10^{-2}$  Pa започва охлаждането на охладителната камера.

След известно време везната достига до температура, достатъчно ниска за да може излизащата парна струя да кондензира върху блюдото на везната. Тази кондензация произвежда сигнал върху регистриращото устройство, свързано с везната. Този сигнал може да бъде използван по два различни начина: що се отнася до описания тук апарат, парното налягане се определя директно от налягането, упражнено върху блюдото на везната (молекулната маса не се изисква). В същото време кондензираната маса се определя и оттам скоростта на изпарение може да бъде изчислена от времето на отлагане. Това се отнася до общите апарати. Парното налягане тогава се изчислява от скоростта на изпарение и молекулната маса, с помощта на уравнението на Херц (Hertz):

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

където:

G – скорост на изпарение ( $\text{kg/s} \times \text{m}^2$ );

M – молекулна маса ( $\text{g/mol}$ );

T – температура (K);

R – моларна константа за идеален газ ( $\text{J/mol} \times \text{K}$ );

p – парно налягане (Pa).

Когато се достигне необходимия вакуум, се започва серия от измервания при най-ниската от избраните температури. Необходимият отвор се отваря, парната струя пресича защитната преграда, директно монтирана върху капака и удря изстуденото блюдо на везната. Последната е така оразмерена, че се събира цялата струя. Под влияние на натиска на парната струя се упражнява сила върху блюдото, където в контакт със студената повърхност молекулите кондензират.

Тази сила отклонява кобилицата на везната от равновесното ѝ положение. В края на кобилицата има пластинка, която се наблюдава оптично чрез система от призма и два фотодиода.

Тогава управляваща верига премества кобилицата в равновесното ѝ положение. Необходимият въртящ момент се регистрира и отговаря, след калибриране с тежести, на парното налягане на веществото.

За следващите измервания температурата се повишава през малки интервали, докато се достигне най-високата избрана стойност. Тогава пробата отново се охлажда и може да бъде регистрирана втора крива на парното налягане. Двете серии от измервания са възпроизводими само, ако пробата е достатъчно чиста. Ако третият опит не потвърждава резултатите от втория, тогава твърде възможно е веществото да се разлага при избраните температури на измерване.

#### 1.6.5. Метод на газово насищане

##### 1.6.5.1. А п а р а т

Използваният при този метод апарат се състои от елементите, които са показани на фигура 5 и са описани по-долу (1).

##### Инертен газ:

Газът носител не трябва да реагира с изследваното вещество. В повечето случаи азотът е подходящ, но и други газове могат да бъдат използвани. При всички случаи избраният газ трябва да е сух (Виж фигура 5, номер 4: сонда за относителна влажност).

##### Контрол на газовия поток:

За да се осигури постоянен и достатъчен поток през колоната на насищане е необходима подходяща система за контрол на газовия поток.

##### Парни колектори :

Техният избор зависи от характеристиките на пробата, както и от използвания метод за анализ. Парите трябва да бъдат събрани количествено и под форма, позволяваща по-нататъшен анализ. За някои вещества се използват колектори, съдържащи течности като хексан или етилен гликол. При други се прибегва до твърди абсорбенти.

##### Топлообменник:

За определяния при различни температури е необходимо да бъде предвиден топлообменник.

##### Колона на насищане:

След разтварянето му, веществото се нанася върху инертен носител, който се поставя в колоната. Нейните размери и скоростта на протичане се избират така, че да осигурят пълно насищане на носещия газ. Освен това колоната трябва да бъде термостатирана. За измерванията, извършвани при температури над 20 °C пространството между колоната и колекторите трябва да бъде загряно за да попречи на кондензацията на веществото.

##### 1.6.5.2. М е т о д н а и з м е р в а н е

Подготовка на колоната на насищане:

След разтваряне в силно летлив разтворител, част от изследваното вещество се нанася върху подложка с известен обем. Количеството нанесено вещество трябва да бъде достатъчно за поддържане на насищането през целия опит. Разтворителят се изпарява напълно на въздух или в ротационен изпарител и добре хомогенизираното вещество се поставя в колоната. След термостатиране на пробата, през апарата се пропуска поток от сух азот.

Измерване:

Колекторите се свързват с изходните тръби на колоната и се записва времето. Дебитът се проверява в началото на експеримента и през равни интервали по време на експеримента, чрез дебитометър с балончета (или непрекъснато чрез масов дебитометър).

Налигането на входа на колоната на насищане се измерва:

а) вкарвайки прецизен датчик между сатуратора и колекторите (това се извършва поради нарастване на мъртвото пространство и на повърхността на адсорбция)

или

б) определяйки пониженията на налягане през използваната колекторна система, в зависимост от дебита в отделен експеримент (този метод може да се окаже незадоволителен за течните барботьори).

Времето, необходимо за събиране на необходимото за различните методи на анализ количество вещество се определя с предварителни опити или оценки. Преди да бъде изчислено парното налягане при дадена температура трябва да бъдат извършени предварителни опити за определяне на максималния дебит, който напълно ще насити газа носител с парите от веществото. За това газът носител трябва да премине през сатуратора достатъчно бавно, но така че пониски скорости да не водят до завишаване на изчислените стойности на парното налягане.

Методът на анализ се избира в зависимост от природата на изследваното вещество (например газова хроматография или гравиметрия).

Определя се количеството вещество, пренесено от даден известен обем на газа носител.

#### 1.6.5.3. Изчисление на парното налягане

Парното налягане се изчислява от плътността на парите ( $m/V$ ) чрез следното уравнение:

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

където:

$p$  = парно налягане в (Pa);

$m$  = маса на адсорбираното вещество в (g);

$V$  = обем на наситения газ в ( $m^3$ );

$R$  = моларна константа на идеалния газ ( $J/mol \times K$ );

$T$  = температура в (K);

$M$  = молекулна маса (g/mol).

Измерените обеми трябва да бъдат коригирани за разликите в налягането и температурата между дебитометъра и термостатирания сатуратор. Ако дебитометъра е разположен на изхода на парния колектор, може да се наложат корекции за отчитане на евентуалното изпарение на продуктите намиращи се в колекторите (1).

## 2. ДАННИ

Независимо от избрания метод, парното налягане трябва да бъде определяно най-малко за две температури. В интервала 0 °C - 50 °C е за предпочитане да бъдат извършени измервания при три или повече температури за да бъде проверена линейността на кривата на парното налягане.

## 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Ако е възможно в протокола трябва да бъде включена следната информация:

- точно описание на веществото (идентичност и примеси),
- най-малко две стойности за парното налягане и температурата, за предпочитане в интервала 0 °C - 50 °C. Също така трябва да бъдат включени всички необработени данни и крива на зависимостта на  $\log p$  от  $1/T$ . Освен това е необходима оценка на парното налягане при температури 20 °C и 25 °C.

В случай на изменение (промяна на състоянието, разлагане):

- описание на изменението,
- температура, при която се извършва изменението, при атмосферно налягане,
- парно налягане при 10°C и 20 °C под температурата на трансформация, както и при 10 °C и 20 °C над тази температура (с изключение на случая, когато прехода е от твърдо в газово състояние).

Трябва да бъдат описани всички информации и бележки, полезни за тълкуване на резултатите.

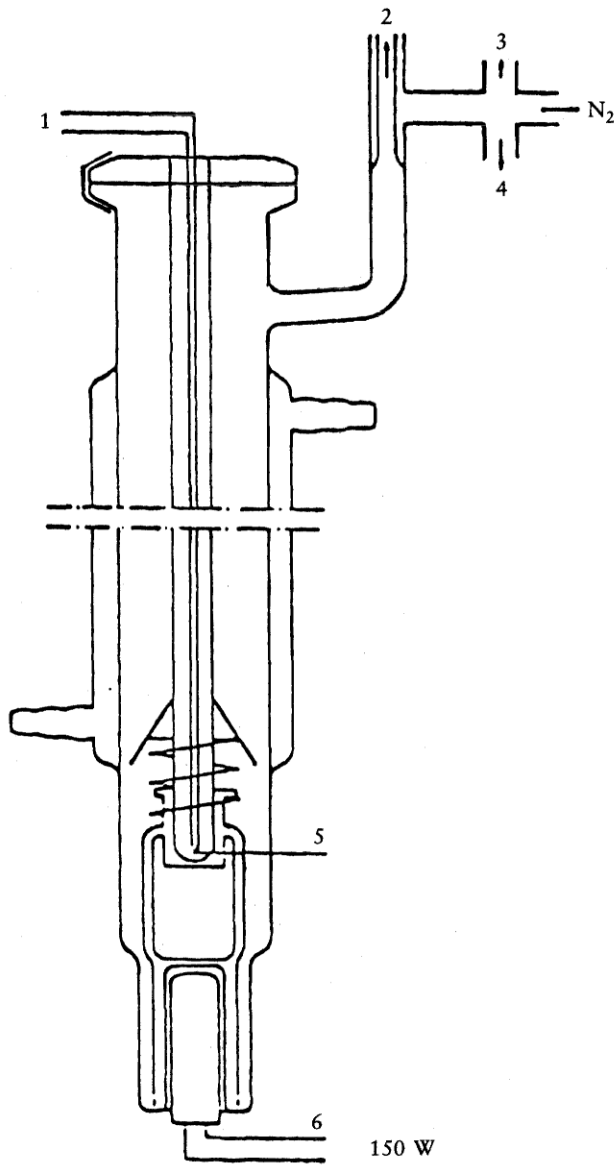
Трябва да бъде уточнен използвания метод.

## 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 104*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- 2) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 104*, reference 4, Decision of the Council C(81) 30 Final.

Допълнение  
Фигура 1

Апарат за определяне на парното налягане по динамичен метод

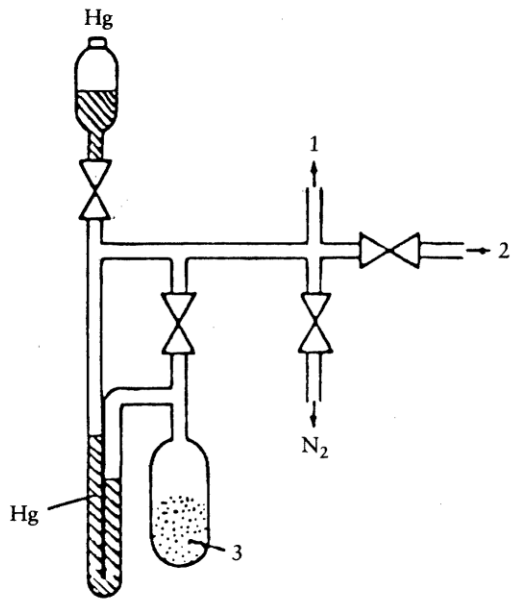


1. Термодвойка
2. Буферен обем
3. Датчик за налягане
4. Вакуум
5. Точка на измерване
6. Нагревателен елемент около 150 W



Фигура 2

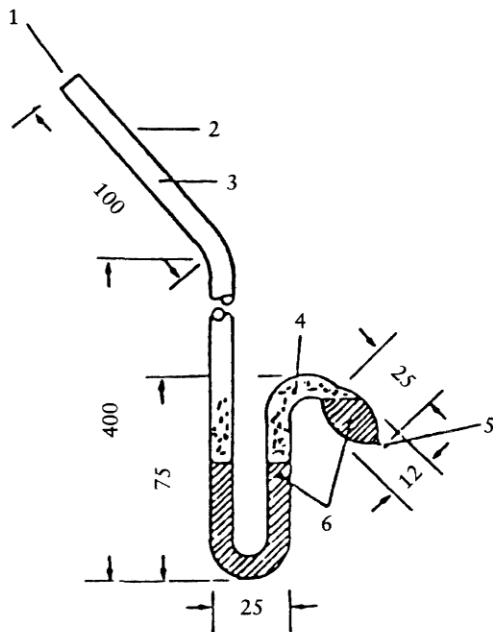
Апарат за определяне на парното налягане по статичен метод



- 1. Датчик за налягане
- 2. Вакуум
- 3. Проба

Фигура 3

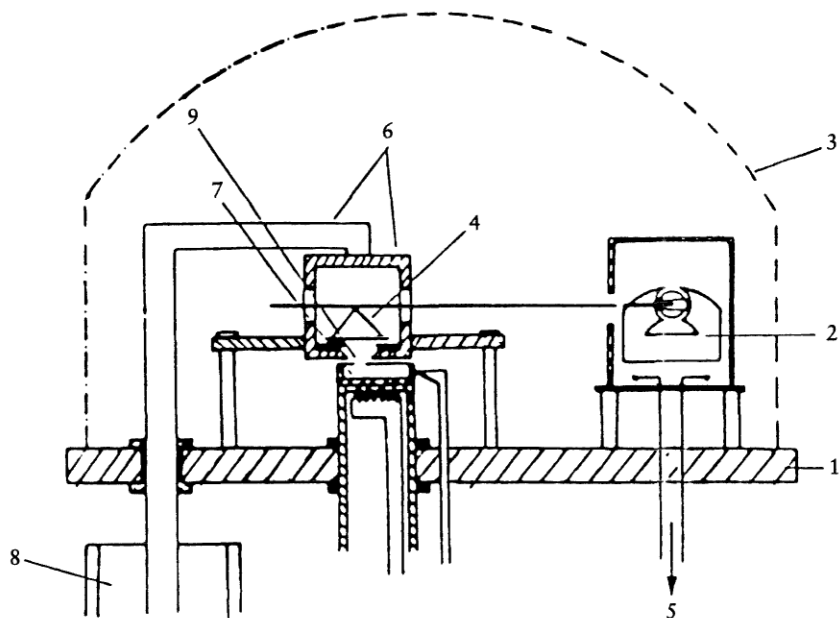
Изотенископ  
Литература (2)



- 1 Система за контрол на налягането
- 2 Тръба с външен диаметър 8 mm
- 3 Сух азот
- 4 Пара на пробата
- 5 Малко връхче
- 6 Течна проба

Фигура 4

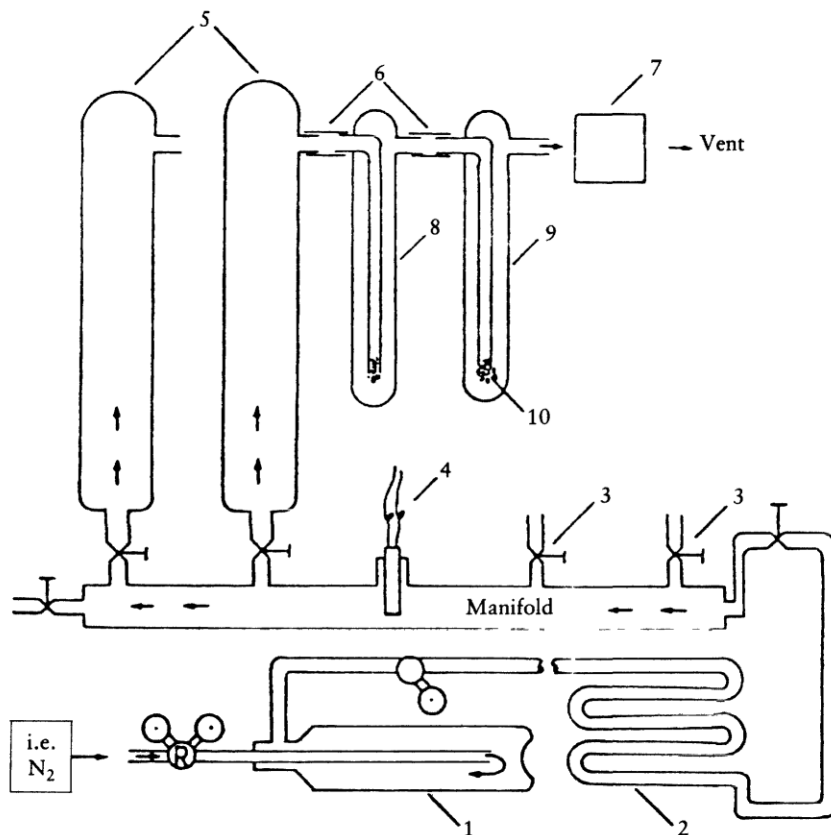
Апарат за определяне на кривата на парното налягане по метода на везната за парно налягане



- 1 Основна плоча
- 2 Уред с подвижна пружина
- 3 Предпазен капак
- 4 Платформена везна
- 5 Устройство за мерене на вакуум
- 6 Охлаждаща камера
- 7 Изпарителна пещ
- 8 Дюаров съд с течен азот
- 9 Екран

Фигура 5

Апарат за определяне на парното налягане по метода на газово насищане



- 1 Регулатор на потока
- 2 Теплообменник
- 3 Иглести вентили
- 4 Сонда за относителна влажност
- 5 Колони на насищане
- 6 PTFE съединения
- 7 Дебитометър
- 8 Колектор (абсорбиращ)
- 9 Колектор (масло)
- 10 Дебитометър с балончета от газ (барботьор)

## **A.5. ПОВЪРХНОСТНО НАПРЕЖЕНИЕ**

### **1. МЕТОД**

Описаните методи се базират на ръководните указания на ОИСП (1).

#### **1.1. Увод**

Описаните методи се прилагат за измерване на повърхностното напрежение на течни разтвори.

Преди провеждане на тези изпитвания е полезно да се знае каква е структурата на веществото, разтворимостта му във вода, хидролизните му свойства, както и критичната концентрация за образуване на мицели.

Методите са приложими за повечето химични вещества, без ограничение относно степента им на чистота.

Измерването на повърхностното напрежение чрез метода на пръстенния тензиметър се ограничава до водни разтвори, имащи динамичен вискозитет по-малък от 200 mPa S приблизително.

#### **1.2. Определения и единици**

Повърхностното напрежение представлява повърхностната свободна енталпия за единица повърхност. То се измерва с:

N/m (в SI единици) или

mN/m (в SI под-единици)

1 N/m = 10<sup>3</sup> din/cm

1 mN/m = 1 din/cm, в CGS система, чиято употреба повече не се разрешава.

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Използването на сравнителни вещества не е необходимо във всички случаи при изследване на ново вещество. Те трябва основно да служат за калибровка на метода през определен период от време и за сравнение на резултатите, когато се използва друг метод.

Сравнителни вещества, покриващи широк обхват от повърхностни налягания са дадени в литература (1) и (2).

#### **1.4. Принцип на методите**

Методите се основават на измерване на максималната сила, която трябва да бъде упражнена вертикално върху скоба или пръстен, намиращ се в контакт с повърхността на изследваната течност, поставена в подходящ съд, за да го отдели от тази повърхност или върху плочка, на която единия край е в контакт с повърхността, за да бъде отделен образувания филм.

#### **1.5. Критерии за качество**

Методът дава по-голяма точност от тази, която вероятно се изисква за контрол на опазването на околната среда.

#### **1.6. Описание на методите**

#### 1.6.1. Метод на плочката

Виж ISO 304 (Повърхностно-активни вещества – определяне на повърхностното напрежение чрез отделяне на течните филми).

#### 1.6.2. Метод на скобата

Виж ISO 304 (Повърхностно-активни вещества – определяне на повърхностното напрежение чрез отделяне на течните филми).

#### 1.6.3. Метод на пръстена

Виж ISO 304 (Повърхностно-активни вещества – определяне на повърхностното напрежение чрез отделяне на течните филми).

#### 1.6.4. Метод на пръстена, съгласуван с ОИСП

##### 1.6.4.1. А п а р а т

Подходящи за това измерване са търговските тензиметри. Те се състоят от следните части:

- подвижен прободържател,
- динамометър,
- мерещо тяло (пръстен),
- съд за измерване.

##### 1.6.4.1.1. Подвижен прободържател

Подвижният прободържател служи за подложка на термостатирания съд за измерване, в който се намира изследваната течност. Той е монтиран на една и съща поставка с динамометъра.

##### 1.6.4.1.2. Динамометър

Динамометърът (виж фигурата) се поставя над прободържателя. Грешката при определянето на силата не трябва да бъде по-голяма от  $\pm 10^{-6}$  N, което съответства на граница на грешката от  $\pm 0,1$  mg при измерване на маса. В повечето случаи измерителната скала на тензиметрите, продавани в търговската мрежа се градуира в mN/m, така че повърхностното напрежение може директно да бъде отчетено в mN/m, с точност от 0,1 mN/m.

##### 1.6.4.1.3. Мерещо тяло (пръстен)

Пръстенът обикновено представлява платинова или платинородиева жичка с дебелина приблизително 0,4 мм и средна окръжност от 60 мм. Този пръстен е хоризонтално окачен за монтажна скоба, която чрез метална ос е свързана с динамометъра (виж фигурата).

##### 1.6.4.1.4. Съд за измерване (мерителен съд)

Съдът за измерване, съдържащ изследваната течност трябва да бъде стъклен термостатиран съд. Той трябва да бъде проектиран така, че по време на определянето температурата на течността и на газовата фаза над повърхността да се запазват постоянни и да няма изпарение. На тези изисквания отговарят цилиндрични стъклени съдове с минимален вътрешен диаметър 45 мм.

#### 1.6.4.2. Подготовка на апарата

#### 1.6.4.2.1. Почистване

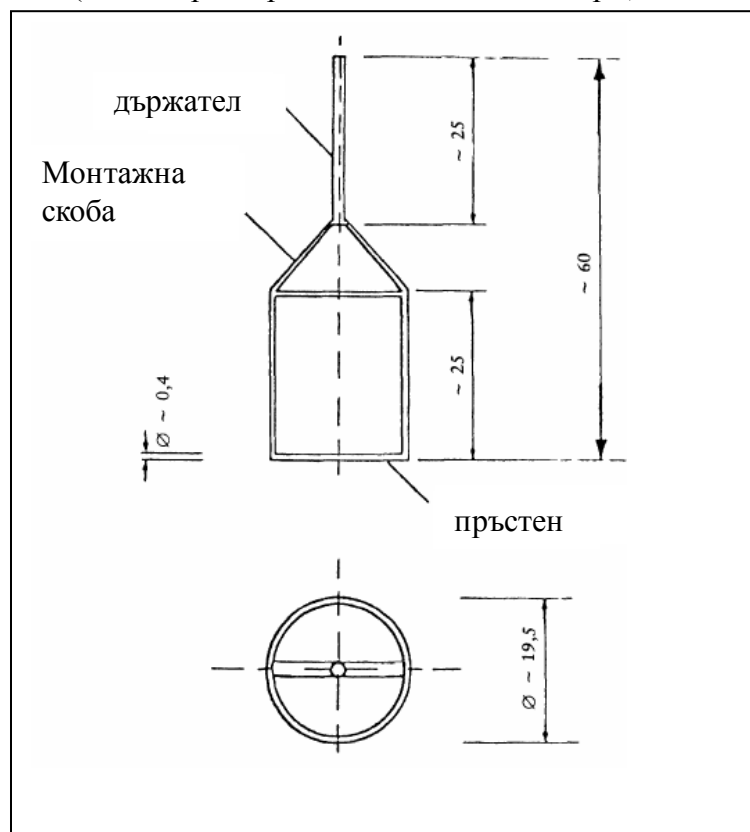
Стъклените съдове трябва да бъдат почистени много добре. При нужда трябва да бъдат измити с бихромна смес и след това със сироповидна (концентрирана) фосфорна киселина (83 до 98 тегловни процента  $H_3PO_4$ ), да бъдат изплакнати обилно с течаща вода, а след това с бидестилирана вода до момента на получаване на неутрална реакция, накрая да бъдат изсушени или добре да бъдат изплакнати с част от течността, която ще бъде изследвана.

Пръстенът първо се изплаква обилно с течаща вода за да бъдат отстранени следите от водоразтворимите вещества, после се потапя няколко секунди в бихромната смес и се изплаква с бидестилирана вода до получаване на неутрална реакция и накрая се суши бързо над метанолов пламък.

Фигура

#### Мерещо тяло

(Всички размери са дадени в милиметри)



*Бележка.*

Следите от веществата, които не са се разтворили или разрушили от сулfoxромната смес или фосфорната киселина, каквито са силиконите, трябва да бъдат отстранени с подходящ органичен разтворител.

#### 1.6.4.2.2. Калибриране на апарата

Проверката на апарата се състои в проверка на нулата и в регулирането ѝ по такъв начин, че показаната от апарата стойност да позволява надеждно определяне в mN/m.

Монтиране:

Апаратът се нивелира с регулиращи винтове, като се използва нивелир с мехурче, намиращ се в основата.

Регулиране на нулевата точка:

След монтиране на пръстена и преди потапянето му в течността, индикатора на тензиметъра трябва да бъде настроен на нула; паралелността на пръстена се проверява чрез използване на повърхността на течността като огледало.

Калибриране:

Калибриране на апарата може да бъде извършено по един от следните два метода:

а) с маса : при този този процес се използват ламели с известна маса (между 0,1 и 1,0 g), които последователно се поставят върху пръстена. Калибрационният коефициент  $\Phi_a$ , чрез който трябва да бъдат умножени всички стойности, изписани на апарата, се определя чрез уравнение (1):

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

където:

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

m – маса на ламелата (g);

g – гравитационно ускорение ( $981 \text{ cm} \times \text{s}^{-2}$  на морско ниво);

b – средна окръжност на пръстена (cm);

$\sigma_a$  – стойности, показани на тензиметъра след поставяне на ламелата върху пръстена (mN/m).

б) с вода: при този този процес се използва чиста вода, чието повърхностно напрежение, например при 23 °C, е равно на 72,3 mN/m. Този процес е по-бърз от калибрирането с помощта на ламели, но винаги съдържа риск повърхностното напрежение на водата да бъде променено от следи от повърхностно-активни вещества.

Калибрационният коефициент  $\Phi_b$ , чрез който трябва да бъдат умножени всички стойности, изписани на апарата, се определя чрез уравнение (2):

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

където:

- $\sigma_0$  – литературна стойност на повърхностното напрежение на водата (mN/m), при избраната температура на изпитване;
- $\sigma_g$  – измерена стойност на повърхностното напрежение на водата (mN/m), при същата температура.

#### 1.6.4.3. Приготвяне на пробите

Приготвят се водни разтвори на даденото вещество с необходимите концентрации. Изключително важно е веществото да бъде напълно разтворено.

Така приготвеният разтвор трябва да бъде държан при постоянна температура ( $\pm 0,5$  °C). Имайки предвид, че повърхностното напрежение на даден разтвор, поставен в измерителния съд, се променя с времето, трябва да бъдат извършени много измервания в различни моменти и да се начертае крива на зависимостта на повърхностното напрежение от времето. Равновесно състояние е достигнато, когато не се наблюдават повече промени.

Прах или пари от други вещества водят до грешки в измерванията. Следователно трябва да се работи с предпазен капак.

#### 1.6.5. Условия на изпитване

Измерванията трябва да бъдат извършвани при температура приблизително 20 °C, като промените в температурата не трябва да бъдат по-големи от  $\pm 0,5$  °C.

#### 1.6.6. Провеждане на изпитването

В добре измития съд за измерване се налива изследваната течност, като се внимава да не се образува пяна. След това мерителният съд се поставя върху прободържателя, който се повдига докато пръстена се потопи под повърхността на разтвора. Тогава прободържателят се смъква постепенно и равномерно (с приблизителна скорост 0,5 cm в минута) за да отдръпне пръстена от повърхността на течността и това се извършва докато се достигне максимална сила. Пръстенът не трябва да бъде откъсван от слоя течност. След края на измерването пръстенът отново се потапя под повърхността и измерванията се повтарят докато се получи постоянно повърхностно напрежение. При всяко определяне се записва времето, изминало от наливането на течността в съда. Отчитания се правят при максимална стойност на силата, необходима за отдръпване на пръстена от повърхността на течността.

## 2. ДАННИ

За изчисление на повърхностното напрежение, стойността отчетена от апарата в mN/m се умножава първо с калибрационния коефициент  $\Phi_a$  или  $\Phi_b$  (в зависимост от използвания метод за калибриране). Така се получава стойност, която е само едно приближение и трябва след това отново да бъде коригирана.

Харкинс и Джордан (Harkins и Jordan) (3) са определили емпирично корекционните коефициенти за стойностите на повърхностното напрежение, получени по метода на пръстена, коефициенти зависещи от размерите на пръстена, от плътността на течността и повърхностното ѝ напрежение.



Тъй като определянето на корекционния коефициент за всяко едно измерване, използвайки таблиците на Харкинс и Джордан (Harkins и Jordan) е много трудоемко, за водни разтвори се разрешава използването на опростена процедура за директно четене на коригираното повърхностно напрежение от показаната по-долу таблица. (За отчитания, чиито стойности се намират между две стойности на таблицата се прибегва до интерполация).

**ТАБЛИЦА. КОРЕКЦИЯ НА ИЗМЕРЕНИТЕ СТОЙНОСТИ НА ПОВЪРХНОСТНО НАПРЕЖЕНИЕ**

Валидна само за водни разтвори,  $\rho \approx 1 \text{ g/cm}^3$

$R = 9,55 \text{ мм}$  (среден радиус на пръстена)

$r = 0,185 \text{ мм}$  (радиус на жичката, образуваща пръстена)

Експериментална стойност (mN/m)	Коригирана стойност (mN/m)	
	Калибриране с ламели (виж т. 1.6.4.2.2, а)	Калибриране с вода (виж т. 1.6.4.2.2, б)
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	-

Тази таблица е изработена на основата на корекцията на Харкинс и Джордан (Harkins и Jordan) и съответства на таблицата от стандарт DIN (DIN 53914), отнасяща се до вода и водни разтвори (плътност  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ ) и за пръстен, продаван в търговската мрежа с размери  $R = 9,55$  милиметра (среден радиус на пръстена) и  $r = 0,185$  милиметра (радиус на жичката, от която е направен пръстена). Таблицата дава коригираните стойности на измерванията на повърхностното напрежение, направени след калибриране с ламели или чиста вода.

Съществува и друг начин за изчисление на повърхностното напрежение при който не е необходимо предварително калибриране и при който се използва следната формула:

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

където:

$F$  – силата, измерена от динамометъра в точката на разкъсване на слоя;

$R$  – радиус на пръстена;

$f$  – корекционен коефициент (1).

### 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът трябва да съдържа, по възможност, следната информация:

- използван метод: съгласуван метод на тензиметър с пръстен, ISO или ОИСП,
- вид използвана вода или разтвор,
- подробно описание на изследваното вещество (идентичност и примеси),
- резултати от измерванията: повърхностното напрежение (отчетено), съдържащо едновременно различните отчитания и средната им аритметично стойност, както средната коригирана стойност (вземайки предвид коефициента на апаратурата и таблицата с корекциите),
- концентрация на разтвора,
- температура на изпитването,
- колко стар е разтвора, по-специално времето, изтекло от приготвянето на разтвора до неговото измерване,
- изменение на повърхностното напрежение на разтвора с времето, от момента на изсипването му в съд за измерване,
- всички информации и наблюдения, представляващи интерес за интерпретацията на резултатите трябва да бъдат представени, особено що се отнася до примесите и физичното състояние на веществото.

### 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 115*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- 2) *Pure and applied chemistry*, vol. 48, 1976, p. 511.
- 3) Harkins, W.D., Jordan, H.F., *J. Amer. Chem. Soc.*, vol. 52, 1930, p. 1751.

## **A.6. РАЗТВОРИМОСТ ВЪВ ВОДА**

### **1. МЕТОД**

Описаните методи се базират на ръководните указания на ОИСП (1).

#### **1.1. Увод**

За извършване на това изпитване е полезно да се знае структурната формула, парното налягане, дисоциационната константа и вероятността за хидролиза (в зависимост от рН) на даденото вещество.

Няма метод, с който да може да бъде определен целия обхват от водоразтворимости.

Методът не е приложим за летливи вещества.

С описаните по-долу два метода може да бъде определен почти целия обхват от разтворимости:

- първият, наречен „метод с елуиране в колона“ се прилага за предимно чисти вещества със слаба разтворимост ( $< 10^{-2}$  g/l) и стабилни във вода,
- вторият, наречен „метод с колба“ се прилага за предимно чисти вещества с висока разтворимост ( $> 10^{-2}$  g/l) и стабилни във вода.

Водоразтворимостта на изследваното вещество може да бъде повлияна значително от наличието на примеси.

#### **1.2. Определения и единици**

Водоразтворимост на дадено вещество е масовата му концентрация на насищане на във вода при дадена температура. Тя се изразява в единици за маса към обем разтвор.

В система SI единицата е  $\text{kg/m}^3$  (може да се използва също и g/l).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Използването на сравнителни вещества не е необходимо във всички случаи при изследване на ново вещество. Те трябва основно да служат за контрол на качеството на метода през определен период и за сравнение на резултатите, когато се използва друг метод.

#### **1.4. Принцип на метода на изпитване**

Приблизителното количество вещество и времето, необходимо за получаване на масова концентрация на насищане) трябва да бъдат определени предварително с просто изпитване.

##### *1.4.1. Метод с елуиране в колона*

Този метод се основава на елуиране на изследваното вещество с вода в микроколона, запълнена с инертен носител като стъклени топчета, силикагел или пясък и излишък от изследваното вещество. Водоразтворимостта се определя, когато бъде достигната постоянна масовата концентрация на елуата. В този случай се наблюдава плато в зависимостта на концентрацията от времето.

#### 1.4.2. Метод с колба

При този метод веществото (твърдите тела трябва да бъдат стрити fino) се разтваря във вода при температура малко по-висока от температурата на изпитване. Когато се достигне насищане, сместа се охлажда, държи се при температурата на изпитване и се разбърква до достигане на равновесие (2). След което, чрез подходящ аналитичен метод се определя масовата концентрация на веществото във водния разтвор, който не трябва да съдържа нито една неразтворена частица.

### 1.5. Критерии за качество

#### 1.5.1. Повтаряемост

Повтаряемостта, която може да бъде получена при метода с елуиране в колона, е по-ниска от 30%; при метода с колба се наблюдава повтаряемост по-ниска от 15%.

#### 1.5.2. Чувствителност

Тя зависи от използвания метод, като най-ниската масова концентрация, която може да бъде определена е  $10^{-6}$  g/l.

### 1.6. Описание на метода

#### 1.6.1. Условия на изпитване

Препоръчително е изпитването да бъде извършвано при температура  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ако се предполага съществуването на температурна зависимост на разтворимостта ( $> 3\%$  за  $^{\circ}\text{C}$ ), трябва да бъдат използвани две други температури, най-малко с  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  по-висока и по-ниска от началната избрана температура. В този случай температурата трябва да бъде регулирана с точност до  $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Избраната температура трябва да бъде поддържана постоянна във всички части на апаратурата, където би могло да има температурно влияние.

#### 1.6.2. Предварително изпитване

В градуиран 10-милилитров цилиндър с тапа, към приблизително 0,1 грама от даденото вещество (твърдите вещества трябва да бъдат стрити на прах) се прибавят определени нарастващи обеми от дестилирана вода при стайна температура, следвайки прогресията показана в по-долната таблица:

0,1 g, разтворимо в „x“ ml вода	0,1	0,5	1	2	10	100	$> 100$
Приблизителна разтворимост (g/l)	$> 1000$	100 - 200	200 - 100	100 - 50	50 - 10	10 - 1	$< 1$

След всяко прибавяне на посоченото количество вода, сместа се разбърква десет минути интензивно, след което визуално се проверява дали съдържа неразтворени частици. Ако след прибавяне на 10 милилитра вода, веществото или части от него не е разтворено, съдържанието от цилиндъра се прехвърля в 100 милилитров градуиран цилиндър; допълва се до 100 милилитра с вода и се разбърква. При ниска разтворимост, времето, необходимо за разтваряне на дадено вещество може да бъде значително по-дълго (да се предвидят 24 часа). Приблизителната разтворимост е показана в таблицата, изразена като прибавен обем вода, при който се извършва пълно разтваряне на пробата. Ако веществото

остава видимо неразтворимо, се извършва ново разреждане за да се определи дали да се използва метода с елуиране в колона или метода с колба.

### 1.6.3. Метод с елуиране в колона

#### 1.6.3.1. Носител, разтворител и елуент

При метода с елуиране в колона носителят трябва да бъде инертен. За тази цел могат да бъдат използвани топчета от стъкло или силициев двуокис. За нанасяне на изследваното вещество върху носителя като разтворител се използва бидестилирана вода, получена в кварцова или стъклена апаратура.

#### *Забележка.*

Да не се използва вода, идваща директно от органичен йонообменник.

#### 1.6.3.2. Нанасяне на веществото върху носителя

Приблизително 600 милиграма (mg) от носителя се претеглят и пренасят в колба от 50 милилитра (ml) с кръгло дъно.

Претегленото подходящо количество от изпитваното вещество се разтваря в избрания разтворител. Към носителя се прибавя съответното количество от разтвора на изследваното вещество. Разтворителят трябва да бъде напълно изпарен, например в ротационен изпарител, в противен случай не се осъществява насищане на подложката с вода поради ефекти на разпределение върху повърхността на носителя.

Нанасянето върху носителя може да създаде проблеми (грешни резултати), ако изследваното вещество е нанесено като масло или в различна кристална фаза. Този проблем трябва да бъде разгледан експериментално.

Към така приготвения носител се прибавят 5 милилитра (ml) вода и след 2 часа суспензията се прехвърля в микроколоната. Би могло също сухия нанесен носител да бъде поставен в микроколоната, предварително напълнена с вода, където да престои около два часа до създаване на равновесие.

#### Режим на работа:

Извличането на веществото от подложката може да бъде извършено по два начина:

- с циркуляционна помпа (виж фигура 1),
- с воден резервоар (виж фигура 4).

#### 1.6.3.3. Метод с елуиране в колона с циркуляционна помпа

##### Апаратура:

На фигура 1 е представена схема на стандартна апаратура. Подходяща микроколоната е показана на фигура 2, приемат се и други размери при условие, че удовлетворяват критериите за възпроизводимост и чувствителност. Колоната трябва да има буферен обем равен на пет обема носител плюс минимум пет проби. Този обем може да бъде намален, ако се използва добавка от разтвор за да се заместят посочените по-горе пет обема, отстранени с примесите.

Колоната трябва да бъде свързана с циркуляционна помпа, имаща възможност да осигури приблизителен дебит от 25 милилитра за час (ml/h). Помпата е

свързана посредством тefлонови (политетрафлуороетиленови) и/или стъклени връзки. Колоната и помпата, когато вече са свързани, трябва да позволят вземане на проби от оттока и изравняване на налягането на резервоара с атмосферното. Материалът в колоната се задържа върху малък тампон (5 mm) от стъклена вата, който също така служи за филтриране на частиците. За циркулационната помпа може да бъде използвана, например, перисталтична помпа (да се внимава да няма никакво замърсяване нито адсорбция на материала в тръбата) или мембранна помпа.

Процес на измерване:

Пуска се потокът през колоната, препоръчаният дебит е приблизително 25 милилитра в час (около 10 обема в час за описаната по-горе колона). Първите пет обема служат за извличане на примесите, разтворими във вода и се изхвърлят. След това се свързва циркулационната помпа, включва се апарата до установяване на равновесно състояние, определено от пет последователни проби, чиито концентрации не се различават с повече от  $\pm 30\%$ . Тези проби трябва да бъдат през интервали, съответстващи на преминаването на разтвор с обем най-малко 10 пъти обема на носителя.

#### 1.6.3.4. Метод с елуиране в колона с буферен резервоар.

Апаратура (виж фигури 3 и 4)

Резервоар: свързването с резервоара става чрез шиф, който от своя страна е свързан с тefлонова тръба. Препоръчван дебит: 25 милилитра на час (ml/h). Елуатите се събират и анализират съобразно избрания метод.

Процес на измерване:

Пробите от този интервал на елуиране, за който минимум пет последователни проби са с еднаква концентрация ( $\pm 30\%$ ), се използват за определяне на водоразтворимостта.

Опитът трябва да бъде повторен при два пъти по-малък дебит. Ако резултатите от двата опита съвпадат, изпитването е задоволително; ако разтворимостта видимо се увеличи при по-нисък дебит, той трябва отново да бъде намален на половина и така, докато два последователни опита дадат една и съща разтворимост.

В двата случая (циркулационна помпа или воден резервоар) фракциите трябва да бъдат проверени за евентуалното наличие на колоидно вещество като се изследват за Тиндалов ефект (разсейване на светлина). Наличието на такива частици води до грешни резултати и измерването трябва да бъде повторено като се подобри филтриращото действие на колоната. Измерва се и се отбелязва стойността на рН за всяка проба. Трябва да бъде извършен втори опит при същата температура.

#### 1.6.4. Метод с колба

##### 1.6.4.1. Апаратура

За този метод е необходим следния материал:

- стандартни лабораторна стъклария и инструменти,

- подходящо устройство за разбъркване на течностите при постоянни контролирани температури,
- ако е необходимо, центрофуга, термостатирана в присъствие на емулсия,
- апаратура за аналитично определяне.

#### 1.6.4.2. Процес на измерване

Количеството продукт, необходимо за насищане на избрания воден обем се определя чрез предварително изпитване. Необходимият обем вода зависи от аналитичния метод и от обхвата на разтворимост. Около пет пъти повече от предварително определеното количество вещество се претегля и се поставя във всеки от трите стъклени съда със стъклени тапи (например епруветки за центрофугиране, колби). Във всеки съд се прибавя избраното количество вода и се затваря херметично. Затворените съдове се разбъркват при температура 30 °С (да се използва устройство за разбъркване или смесване, можещо да работи при постоянна температура, например магнитна бъркалка в контролирана с термостат водна баня). След един ден, един от съдовете се изважда и се термостатира отново за 24 часа при температурата на изпитването; от време на време да се разбърква. След това съдържанието на съда се центрофугира при температурата на изпитване и концентрацията на съединението в прозрачната водна фаза се определя по съответен аналитичен начин. Другите две колби се обработват като първата, след първоначално термостатиране при 30 °С за два и три дена съответно. Ако концентрациите поне на двата последни съда съвпадат с изискваната възпроизводимост, изпитването е задоволително. Ако резултатите от съдове 1, 2 и 3 показват тенденция на покачващи се стойности, изпитването трябва да бъде повторено като се използват по-дълги времена на термостатиране.

Стойността на рН на всяка проба трябва да бъде отбелязвана.

#### 1.6.5. Анализ

При тези определяния се препоръчва използването на метод за анализ, специфичен за всяко вещество, тъй като малки количества разтворими примеси могат да доведат до съществени грешки в измерената разтворимост. Примери за такива методи: газова или течна хроматография, методи за титруване, фотометрични методи, волтаметрични методи.

## 2. ДАННИ

### 2.1. Метод с елуиране в колона

За всеки един опит трябва да бъде изчислена средната стойност, определена на базата на най-малко пет последователни проби, взети от платото на насищане, както и стандартното отклонение.

### 2.2. Метод с колба

Трябва да бъдат посочени индивидуалните резултати за всеки един от трите съда; изчислява се средната им стойност и резултатите, приети за постоянни (повторяемост по-ниска от 15 %), се изразяват в единици за маса към обем разтвор. Това може да изисква прехвърлянето на единиците за маса в единици за обем, използвайки плътността, когато разтворимостта е много висока (> 100 g/l).

### **3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

#### **3.1. Метод с елуиране в колона**

Протоколът трябва да съдържа, по възможност, резултатите от предварителния тест, както и следните данни:

- подробно описание на веществото (идентификация и примеси),
- индивидуални концентрации, дебити и рН за всяка проба,
- средно и стандартно отклонения на най-малко пет проби от платото на насищане, за всеки опит,
- средна стойност от две последователни приемливи измервания,
- температура на водата по време на процеса на насищане,
- използван метод за анализ,
- природа на носителя,
- количество вещество, нанесено върху носителя,
- използван разтворител,
- данни за химична нестабилност на веществото по време на изпитването и използван метод,
- всички данни, полезни при интерпретацията на резултатите.

#### **3.2. Метод с колба**

Протоколът трябва да съдържа, по възможност, следните данни:

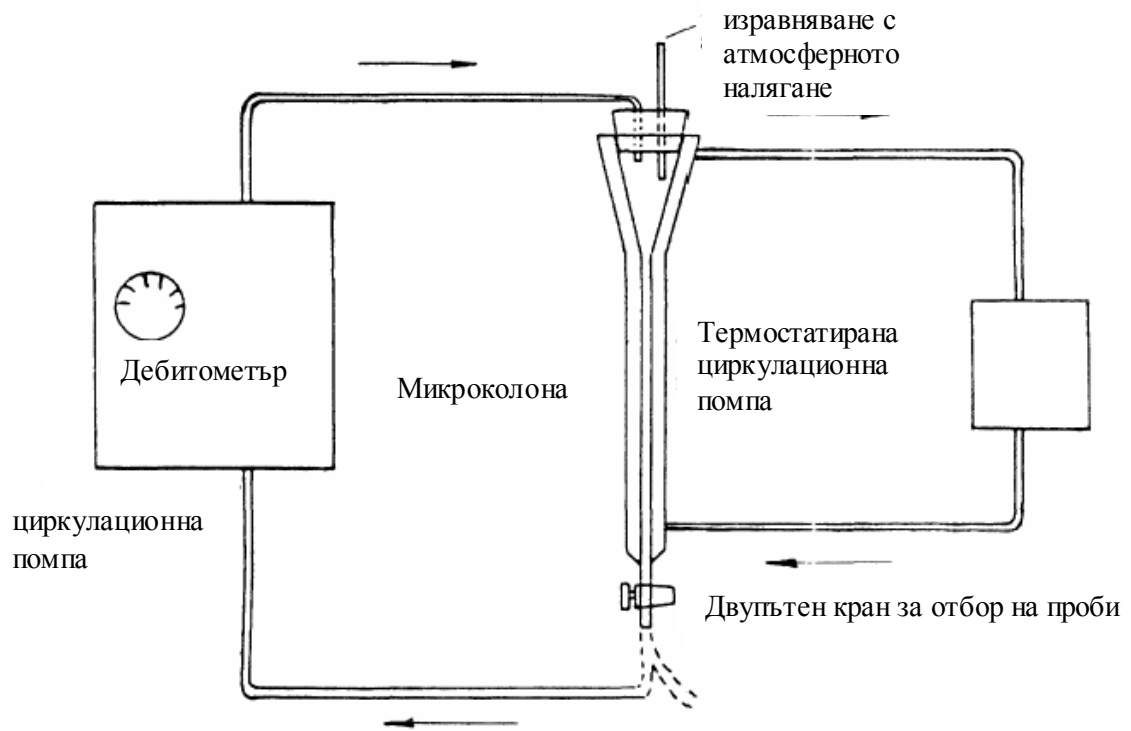
- подробно описание на веществото (идентификация и примеси),
- индивидуални резултати от анализа и тяхната средна стойност, в случая когато е определена повече от една стойност за даден съд,
- рН на всяка проба,
- средна стойност от резултатите за различните колби, при които се наблюдава съвпадение,
- температура на изпитването,
- използван метод за анализ,
- данни за химическа нестабилност на веществото по време на изпитването и използван метод,
- всички данни, полезни за тълкуването на резултатите.

### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

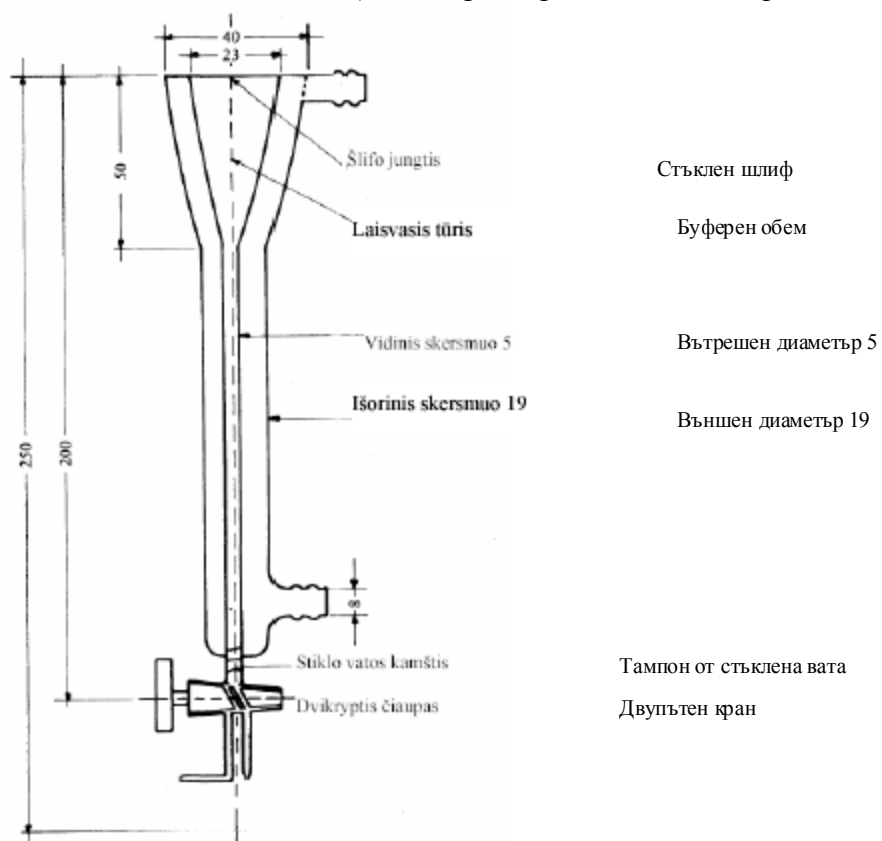
- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 105*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- 2) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 116*, Decision of the Council C(81) 30 Final.



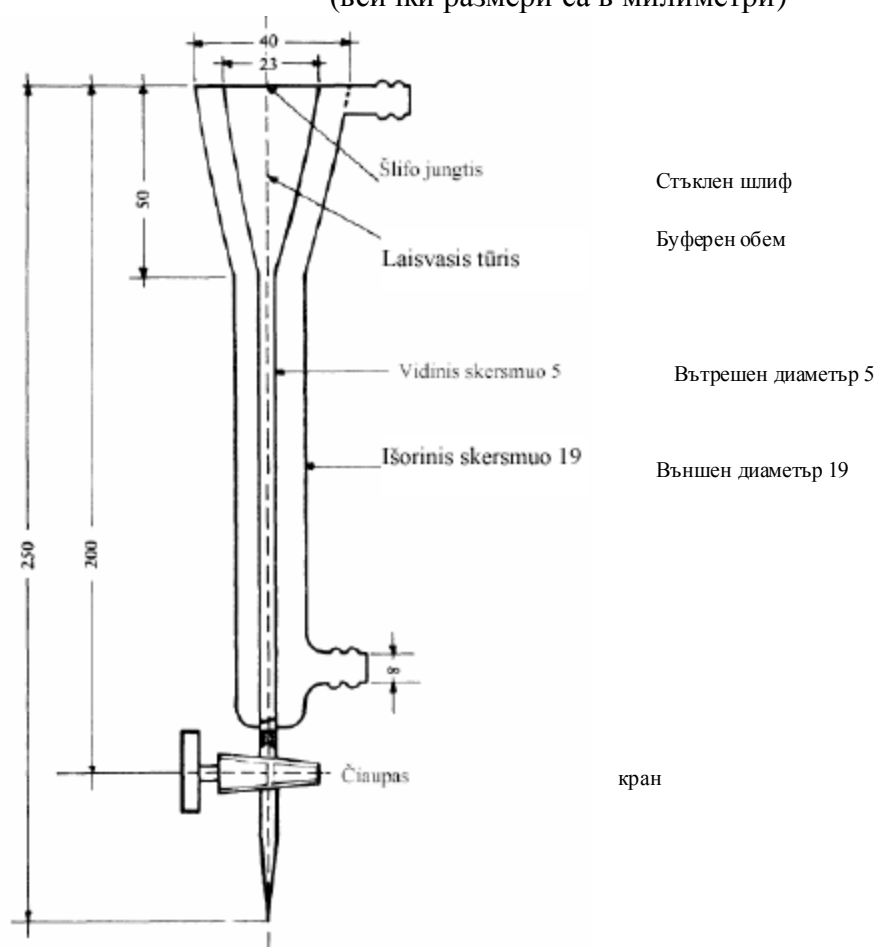
Допълнение  
Фигура 1  
Схема на устройството за изпитване



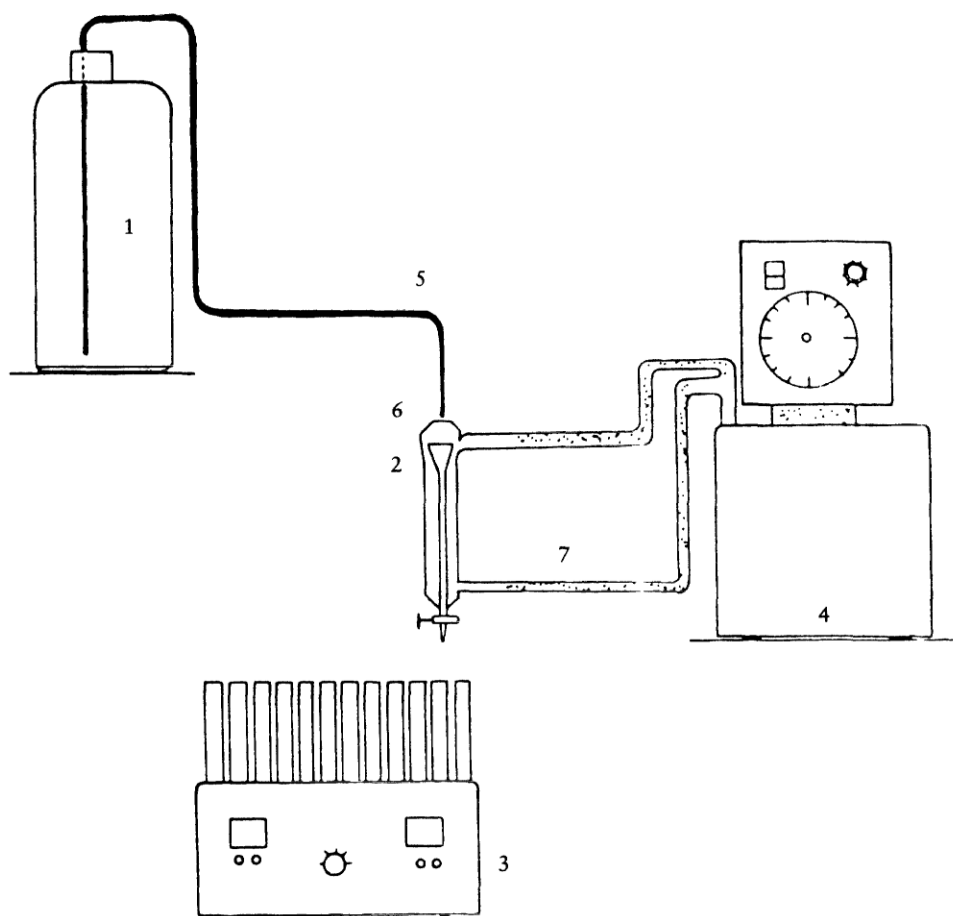
Фигура 2  
**Стандартна микроколна**  
 (всички размери са в милиметри)



Фигура 3  
**Стандартна микроколна**  
 (всички размери са в милиметри)



*Фигура 4*  
**Устройство за изпитване за определяне на водоразтворимостта на слабо  
разтворими и слабо летливи вещества**



- 1 Воден резервоар, например колба (емност от 2,5 литра),
- 2 Колоната (виж фигура 3),
- 3 Сборник (колектор) за фракциите,
- 4 Термостат,
- 5 Тефлонова тръба,
- 6 Стъклен штифт,
- 7 Тръби за подаване на вода (между термостата и колоната, вътрешен диаметър приблизително 8 милиметра).

## А.7. РАЗТВОРИМОСТ В МАЗНИНИ

### 1. МЕТОД

Описаният метод се базира на ръководните указания на ОИСП (1).

#### 1.1. Увод

За да бъде извършено това изпитване е полезно предварително да се знае коефициента на разпределение, водоразтворимостта, структурната формула и стабилността при температура 50 °С на даденото вещество. Този метод се прилага само при предимно чисти вещества, стабилни и не много летливи при температура 50 °С.

Той не е подходящ за вещества, които реагират с триглицеридите при условията на изпитване.

#### 1.2. Определения и единици

Масовата част от дадено вещество, която образува хомогенна фаза с течна мазнина, без да води до химични реакции се дефинира като разтворимост в мазнини. Максималната стойност на тази част се нарича количество за насищане, тя зависи от температурата.

Количеството за насищане на дадено вещество трябва да бъде изразено в милиграми за 100 грама стандартна мазнина при температура 37 °С ± 0,5 °С.

Съществува следното отношение между разтворимостта в грамове за 100 грама разтвор (S') и разтворимостта в грамове за 100 грама разтворител (S):

$$S = \frac{100 \times S'}{100 - S'} \text{ g/100 g стандартна мазнина.}$$

Умножавайки S с 1 000 се получава разтворимостта в милиграми за 100 грама стандартна мазнина.

#### 1.3. Сравнителни вещества

Използването на сравнителни вещества не е необходимо във всички случаи при изследване на ново вещество. Те трябва основно да служат за проверка на качеството на метода през определен период от време и за сравнение на резултатите, когато се използва друг метод.

#### 1.4. Принцип на метода

Даденото вещество се прибавя към “стандартна мазнина” и се разбърква. Количеството вещество трябва да бъде достатъчно за да има излишък. Разтворената част се определя с подходящ аналитичен метод.

#### 1.5. Критерии за качество

##### 1.5.1. Специфичност

До момента не е известна повтаряемостта на измерването.

Резултатите се прилагат за стандартни мазнини и за сравнително чисти вещества. Дори при температура 37 °С мазнините могат да образуват емулсии или фини суспензии от твърди тела. Тъй като те ще повлияят на последващото

определяне на количеството за насищане, образуването на тези емулсии или суспензии трябва да бъде избягвано.

## **1.6. Описание на метода**

### **1.6.1. Подготовка**

#### **1.6.1.1. Апаратура**

Необходимо оборудване:

- стандартна лабораторна стъклария,
- везна,
- центрофуга с термостат,
- бъркалка, оборудвана със система за контрол на температурата,
- термостат.

#### **1.6.1.2. Стандартни мазнини**

Необходимо е използването на стандартни мазнини. Тези стандартни мазнини трябва да бъдат лесно определими. Пример за такава стандартна мазнина е даден в допълнението.

#### **1.6.1.3. Предварително изпитване**

Просто предварително изпитване трябва да бъде извършено за определяне на приблизителното количество вещество, необходимо за получаване на насищане, при температурата на изпитване (37 °C).

#### *Бележка*

Скоростта на установяване на равновесие на насищане може да голяма степен да зависи от размера на частиците (при твърди тела). Затова тези вещества трябва да бъдат стрити на прах.

#### **1.6.1.4. Подготовка на веществото**

Претеглят се осем проби и се поставят в колби от 50 милилитра. Обикновено количеството на всяка проба трябва да е два пъти по-голямо от необходимото за насищане, както е определено в предварителното изпитване.

След прибавяне на претеглено количество от около 25 грама втечнена и добре хомогенизирана стандартна мазнина, колбите се затварят херметично със стълена шлифована запушалка и се разбъркват. Половината (група 1) се разбърква при температура 30 °C, а другата половина (група 2) – при температура около 50 °C, всяка в продължение най-малко на един час.

### **1.6.2. Условия на изпитване**

Определянето на разтворимостта в мазнини се извършва при 37 °C ± 0,5 °C.

### **1.6.3. Методология**

Съдържанието на колбите от двете групи се разбърква при температура 37 °C ± 0,5 °C до пълно смесване.

Времето на разбъркване, необходимо за установяване на равновесие не може, по принцип, да бъде указано предварително. В случая на течни вещества насищане може да бъде достигнато за няколко минути; в случая на твърди вещества това може да отнеме часове. По принцип времето за разбъркване няма да бъде

повече от три часа. След това разбъркването в две от колбите от всяка група се спира и те се оставят в покой най-малко един час при температура 37 °С, така че да се отдели количеството неразтворени вещества и да се образува хомогенната фаза. В случай на образуване на емулсия или суспензия (например, ефект на Тиндал), тя се отстранява с подходящ метод като термостатирано центрофугиране.

Третата и четвъртата колби от двете групи се разбъркват най-малко 24 часа, след което се оставят в покой в продължение на един час при температура 37 °С ± 0,5 °С.

#### *Бележка*

Ако след този период от време няма образувана утайка (за твърди вещества) или няма разделяне на фази (за течни вещества) изпитването трябва да бъде повторено с по-голямо количество вещество.

#### 1.6.4. Анализ

От всяка хомогенна фаза наситена мазнина се взема по една проба за анализ. Тази проба се претегля и се определя разтворената част.

Може да бъде използван всеки подходящ аналитичен метод или директно или след екстракция с вода или с органичен разтворител, или чрез която и да е друга техника на разделяне.

Примери:

- спектрофотометрия,
- течна или газова хроматография,
- волтметрия.

## 2. ДАННИ

Ако резултатите, получени при ненасищане или пренасищане, или при къси и дълги периоди, значително се различават, изпитването трябва да бъде повторено при по-дълги времена на разбъркване.

## 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва да съдържа, по възможност, следните данни:

- точно описание на веществото (идентификация и примеси),
- мазнина (например: подробно описание, характеристики, произход, състав),
- метод за анализ, отклонения и специфични свойства.

Резултатите трябва да бъдат оценени както е описано по-горе и да бъдат отбелязани в протокола. Ако няма значителни разлики между наблюдаваните стойности в милиграми за 100 грама, индивидуалните стойности, средната стойност и стандартното отклонение трябва да бъдат отбелязани. Ако, даже и след ново изпитване, се наблюдават значителни различия, трябва да бъдат записани само индивидуалните резултати.

Трябва да бъдат записани всички наблюдения и забележки, помагачи за тълкуване на резултатите.

#### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

1) OECD, Paris 1981, *Test Guideline 116*, Decision of the Council C(81) 30 Final.



Допълнение

**ПРИМЕР ЗА СТАНДАРТНА МАЗНИНА**

В следната таблица е показан съставът на стандартна мазнина.

Разпределение на мастната киселина

Брой С атоми във фракцията б “на мастната киселина”	8	10	12	14	16	18	други
% (чрез измерване на 0,5 повърхнина GLC)	7,5	10,3	50,4	13,9	7,6	8,6	1

Разпределение на глицериди

Брой С атоми във фракцията “на мастната киселина”	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
% (чрез измерване на 0,1 повърхнина GLC)	0,1	0,3	1,0	2,3	4,9	10,9	13,9	21,1	16,1	11,7	9,8	4,4	2,2	1,1	0,2

Чистота

Съдържание на моноглицериди (ензимно)	≤ 0,1 %
Съдържание на диглицериди (ензимно)	≤ 0,4 %
Съдържание на неосапунващи	≤ 0,1 %
Индекс на W <sub>ijs</sub>	≤ 0,5
Киселинно число	0,02
Водно съдържание (К. Fischer)	≤ 0,1 %
Температура на топене (ясна)	28,5 °C

Стандартен абсорбционен спектър (дебелина на слоя d = 1 cm, сравнение: вода, 35 °C)

Дължина на вълната (nm)	290	310	330	350	370	390	430	470	510
Трансмисия (%)	2	15	37	64	80	88	95	97	98

Минимум 10 % от трансмисията на светлината при 303 nm.

Тази мазнина е синтетична смес от наситени триглицериди, с разпределение на мастна киселина и триглицериди, подобни на кокосовото масло.

## **A.8. КОЕФИЦИЕНТ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ**

### **1. МЕТОД**

Описаният метод се базира на ръководните указания на ОИСП (1).

#### **1.1. Увод**

За да се извърши този експеримент е полезно предварително да се знае дисоциационната константа, водоразтворимостта, и повърхностното напрежение на даденото вещество.

Този метод се прилага само за предимно чисти вещества, разтворими във вода и н-октанол. Той не е приложим за повърхностно-активни вещества.

#### **1.2. Определения и единици**

Коефициентът на разпределение (P) се дефинира като отношението на равновесните концентрации ( $c_i$ ) на вещество, разтворено в двуфазна система, състояща се от два разтворителя, които не могат да се смесват. В случая на н-октанол и вода:

$$P_{ow} = \frac{c_{\text{октанол}}}{c_{\text{вода}}}$$

Следователно коефициентът на разпределение (P) е частно от две концентрации; обикновено той се представя под формата на десетичния си логаритъм ( $\log P$ ).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Използването на сравнителни вещества не е необходимо във всички случаи при изследване на ново вещество. Те трябва основно да служат за контрол на качеството на метода през определен период от време и за сравнение на резултатите, когато се използват различни методи.

#### **1.4. Принцип на метода**

За да бъде определен коефициентът на разпределение трябва да бъде достигнато равновесие между всички взаимодействащи си компоненти на системата, и да бъдат определени концентрациите на веществата, разтворени в двете фази. Литературен преглед на тази тема показва, че съществуват много методи, които могат да бъдат използвани за решаването на този проблем, т.е. пълно смесване на двете фази, последвано от тяхното разделяне, за да бъде определена равновесната концентрация на изследваното вещество.

#### **1.5. Критерии за качество**

##### **1.5.1 Повтаряемост**

За да бъде получен точен коефициент на разпределение, трябва да бъдат извършени дублиращи се измервания в три серии при различни условия на изпитване, при които количеството разтваряно вещество и отношението на обемите на разтворителите могат да се променят. Определените стойности за коефициента на разпределение, изразени като общите им логаритми трябва да се намират в интервала  $\pm 0,3$  логаритмични единици.

### 1.5.2. Чувствителност

Областта на приложение на метода се определя от чувствителността на аналитичния метод. Трябва да могат да бъдат определяни стойности на  $P_{ow}$  до  $10^5$ , когато концентрацията на разтворено вещество във всяка фаза не е повече от 0,01 mol/l.

### 1.5.3. Специфичност

Закона за разпределение на Нернст е приложим само за разреждени разтвори, при постоянни температура, налягане и рН. По-точно той се прилага за чисто вещество, диспергирано между два чисти разтворителя. Едновременното появяване, в едната или в двете фази, на много различни разтворени вещества, може да повлияе върху получените резултати.

Разделянето или свързването на разтворените молекули води до отклонения от цитирания закон на Нернст. Тези отклонения се обясняват с факта, че коефициента на разделяне става зависим от концентрацията на разтвора.

Поради множеството съществуващи равновесия, този метод на изпитване не трябва да бъде прилаган при йонизиращи се съединения без корекция (при такива вещества могат да бъдат използвани буферни разтвори вместо вода).

## 1.6. Описание на метода

### 1.6.4. Предварителна оценка на коефициента на разпределение

Стойността на коефициента на разпределение може да бъде оценена или чрез просто изчисление (2) или използвайки разтворимостите на изследваното вещество в чисти разтворители (1):

За тази цел:

$$P_{\text{оценка}} = \frac{\text{насищане: } c_{\text{н-октанол}}}{\text{насищане: } c_{\text{вода}}}$$

Също така може да бъде извършено грубо определяне чрез просто предварително изпитване.

### 1.6.2. Подготовка (реактиви)

н-октанол: определянето на коефициента на разпределение трябва да става като се използва реактив с чистота за анализ.

Вода: използва се дестилирана или бидестилирана вода от стъклен или кварцов апарат.

*Бележка:*

Да се избягва използването на вода директно от йонообменник.

#### 1.6.2.1. Пренасищане на разтворители

Преди определяне на коефициента на разделение, разтворителите се насищат взаимно чрез разбъркване при температурата на изпитване. На практика това става като две големи бутилки, съдържащи чист за анализ н-октанол и вода, всяка с достатъчно количество от другия разтворител, се разбъркват с

механична бъркалка в продължение на 24 часа, и след това се оставят в покой докато фазите се разделят и се достигне равновесно състояние.

#### 1.6.2.2. Подготовка за изпитване

Обемът течности трябва да запълва почти изцяло експерименталния съд. Това ще помогне да бъде предотвратена загуба на вещество поради изпарение. Обемното отношение и количеството вещество, което ще бъде използвано се определят от следните фактори:

- предварително определяне на коефициента на разпределение (виж по-горе),
- минимално количество изследвано вещество, необходимо при използвания аналитичен метод,
- граница на максималната концентрация във всяка фаза от 0,01 mol/l.

Извършват се три изпитвания. В първото се прибавя изчислената обемна част, във второто се прибавя два пъти обема на н-октанол, и в третото се прибавя половината от обема на н-октанол.

#### 1.6.2.3. Изпитвано вещество

За осигуряване на равновесие по време на изпитването, се приготвя резервен разтвор в н-октанол с масова концентрация между 1 и 100 милиграма на милилитър (mg/ml). Действителната масова концентрация на този резервен разтвор трябва да бъде определена точно преди той да бъде използван за определяне на коефициента на разпределение. Този разтвор трябва да бъде съхраняван при стабилни условия.

#### 1.6.3. Условия на изпитване

Температурата на изпитване трябва да бъде поддържана постоянна ( $\pm 1$  °C), и да се намира в интервала 20 °C - 25 °C.

#### 1.6.4. Процес на измерване

##### 1.6.4.1. Установяване на равновесие на разпределение

За всяка серия от условия на изпитване се приготвят двойно количество съдове, съдържащи необходимите, старателно измерени количества от двата разтворителя, както и необходимото количество резервен разтвор.

Измерват се обеми октанол. Съдовете за изпитване се поставят в подходяща бъркалка или се разбъркват ръчно. Един препоръчан метод се състои в бързо завъртане на епруветката за центрофугиране на 180° около напречната ѝ ос, така че евентуалният задържан въздух да премине през двете фази.

##### 1.6.4.2. Разделяне на фазите

За разделяне на фазите сместа трябва да бъде центрофугирана. Това се извършва с лабораторна центрофуга, поддържана при стайна температура или, ако се използва центрофуга без контрол на температурата, епруветките за центрофугиране трябва да бъдат темперирани при температурата на изпитването най-малко един час преди анализа.

#### 1.6.5. Анализ

За определяне на коефициента на разпределение е необходимо да бъдат определени концентрациите на изследваното вещество в двете фази. Това става като се вземе проба от всяка от двете фази от всеки съд и за всяка серия от

експериментални условия и се анализира според избрания метод. Общото количество вещество, намиращо се в двете фази трябва да бъде изчислено и сравнено с първоначално внесено количество вещество.

Водната проба трябва да бъде взета по начин, намаляващ до минимум риска за внасяне на следи от октанол: за тази цел може да бъде използвана стъклена спринцовка със сменяща се игла. Първоначално спринцовката се напълва частично с въздух, след това въздухът внимателно се изкарва, едновременно с вкарването на иглата в слоя от n-октанол. Засмуква се необходимият обем от водната фаза в спринцовката, която след това бързо се изважда от разтвора и се маха иглата. Тогава съдържанието на спринцовката може да бъде използвано като водна проба. Концентрацията в двете отделни фази трябва да бъде определена чрез метод, специфичен за веществото. Подходящи физико-химични методи са:

- фотометрични методи,
- газова хроматография,
- течна хроматография при високо налягане.

## 2. ДАННИ

Ако измереното  $P_{ow}$  надвишава  $10^4$ , се препоръчва сравнението на резултатите с изчислена стойност на  $P_{ow}$ , получена по начина, посочен в литература (3).

Надеждността на определените стойности за  $P$  може да бъде проверена чрез сравнение на средната стойност от вторите определяния с общата средна стойност.

## 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът трябва да съдържа, по възможност, следните данни:

- точно описание на веществото (идентификация и примеси),
- температура, при която е извършено определянето,
- аналитичен метод, използван за определяне на концентрациите,
- измерени концентрации в двете фази за всяко определяне (това означава, че общо 12 концентрации трябва да бъдат посочени),
- тегло на изпитваното вещество, обем на всяка фаза, използвана във всеки съд, общо изчислено количество на изпитваното вещество във всяка фаза след достигане на равновесие,
- изчислените стойности на коефициента на разпределение и средната им стойност трябва да бъдат дадени за всяка серия от условия на изпитване, както и средната стойност за всички определяния. Отбелязва се всяко предположение за зависимост на коефициента на разпределение от концентрацията,
- стандартно отклонение на индивидуалните стойности на  $P$  по отношение на тяхната средна стойност,
- средна стойност на  $P$  за всички измервания, изразена чрез десетичния й логаритъм,
- теоретично изчислено  $P_{ow}$ , когато тази стойност е била определена или когато измерената стойност е  $> 10^4$ ,
- рН на използваната вода и на водната фаза по време на изпитването,
- всички наблюдения и забележки, подходящи за интерпретация на резултатите.

#### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 107*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- 2) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 107*, reference 2, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- 3) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 107*, reference 10, Decision of the Council C(81) 30 Final.

## **А.9. ТЕМПЕРАТУРА НА ВЪЗПЛАМЕНЯВАНЕ**

### **1 МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

За да бъде извършен този експеримент е полезно предварително да се разполага с информацията относно възпламенимостта на даденото вещество. Този метод се прилага при течни вещества, в тяхната търговска форма, чиито пари могат да бъдат запалени от източници на възпламеняване. Методите на изпитване, описани в настоящия документ са валидни само за обхватите от температури на възпламеняване, посочени в отделните методи.

#### **1.2. Определения и единици**

Температура на възпламеняване е температурата, коригирана за налягане 101,325 kPa, при която изпитваната течност отделя пари в затворен експериментален съд, при условията дефинирани в метода на изпитване, и то в такива количества, че в експерименталния съд се образува запалима смес/въздух.

Единица: °C;

$t = T - 273,15$ ;

( $t$  е температурата в °C, а  $T$  - в K).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Използването на сравнителни вещества не е необходимо във всички случаи при изследване на ново вещество. Те трябва основно да служат за калибриране на метода през определен период от време и за сравнение на резултатите, когато се използва друг метод.

#### **1.4. Принцип на метода**

Веществото се поставя в експериментален съд и се загрева постепенно докато парите достигнат такава концентрация във въздуха, че да се получи запалима смес.

#### **1.5. Критерии за качество**

##### *1.5.1. Повторяемост*

Повторяемостта зависи от обхвата на температурата на възпламеняване и от използвания метод за изпитване; максимум  $\pm 2$  °C.

##### *1.5.2 Чувствителност*

Чувствителността зависи от използвания метод за изпитване.

##### *1.5.3. Специфичност*

Специфичността на някои методи на изпитване се ограничава до някои обхвати на температурата на възпламеняване и зависи от някои специфични свойства на веществото (например висок вискозитет).

#### **1.6. Описание на метода**

##### *1.6.1. Подготовка*

Проба от изследваното вещество се поставя в апарат за изпитване, съответстващ на точка 1.6.3.1 и/или точка 1.6.3.2.

#### 1.6.2. *Експериментални условия*

За предпочитане е апаратът да бъде инсталиран на място, защитено от въздушни течения.

#### 1.6.3. *Протичане на изпитването*

##### 1.6.3.1. Равновесен метод

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

##### 1.6.3.2. Неравновесен метод

Апарат на Абел (Abel):

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

Апарат на Абел-Пенски (Abel-Pensky):

Виж стандарти: (EN 57), DIN 51755, първа част (за температури от 5 °C до 65 °C), DIN 51755, втора част (за температури под 5 °C) и NF M07-036.

Апарат на Таг (Tag):

Виж стандарти ASTM D 56 и ISO 2719.

Апарат на Пенски-Мартенс (Pensky-Martens):

Виж стандарти ISO 2719, (EN 11), DIN 51758, ASTM 8013, ASTM D 93, BS 200-34 и NF M07-019.

#### *Забележки:*

Когато температурата на възпламеняване, определена чрез неравновесен метод (виж точка 1.6.3.2) има следните стойности:  $0 \pm 2$  °C,  $21 \pm 2$  °C,  $55 \pm 2$  °C, тя трябва да бъде потвърдена чрез равновесен метод, като се използва същия апарат.

Само методите, които могат да дадат температурата на възпламеняване могат да бъдат използвани за нотификация.

За определяне на температурата на възпламеняване на вискозни течности (бои, гуми и т.н.), съдържащи разтворители, трябва да бъдат използвани само апарати и методи на изпитване, позволяващи определянето на температурата на възпламеняване на вискозни течности. Виж стандарти ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 и DIN 53213 част 1.

## 2. ДАННИ

### 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът трябва да съдържа, по възможност, следната информация:

- точно описание на веществото (идентификация и примеси),
- описание на използвания метод, както и всяка евентуална промяна,
- резултатите и всяка информация или забележка, които могат да бъдат полезни при интерпретацията на резултатите.



#### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Няма.

## **A.10. ВЪЗПЛАМЕНИМОСТ (ТВЪРДИ ТЕЛА)**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Преди да бъде извършен този експеримент е полезно да се разполага с предварителна информация относно потенциалните експлозивни свойства на даденото вещество.

Този метод се прилага само при прахообразни, зърнести или пастообразни вещества.

За да не бъдат включвани всички вещества, склонни към запалване, а само тези които горят бързо или тези, чието горене, по един или друг начин, е особено опасно, за силно възпламеними се считат само веществата, чиято скорост на горене преминава определена граница. От друга страна, металните прахове, склонни да изгарят също се считат за силно възпламеними, ако нажежаването се разпространява по цялата проба. Това нажежаване и трудностите, свързани с гасенето на огъня са основната причина, поради която металните прахове са особено опасни. Обичайните средства за гасене, като въглероден двуоксид и/или вода могат значително да увеличат опасностите.

#### **1.2. Определения и единици**

Време на горене, изразено в секунди.

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма специфицирани.

#### **1.4. Принцип на метода**

Веществото, в неговата търговска форма, се поставя във форма на купчина с дължина 250 милиметра. След това се прави опит за възпламеняване на веществото при условията, определени в точка 1.6.3 и се измерва времето на горене.

#### **1.5. Критерии за качество**

#### **1.6. Описание на метода**

##### *1.6.1. Подготовка*

В случая на прахообразни или зърнести вещества, продуктът, в неговата търговска форма, се изсипва в метална форма с дължина от 250 милиметра и триъгълно напречно сечение с вътрешна височина и ширина съответно от 10 милиметра и 20 милиметра. От двете страни на формата, се поставят надлъжно метални плочки, чиято цел е да служат за странични подпори. Тези плочки превишават с 2 милиметра горния ръб на триъгълното напречно сечение (виж фигурата). След това формата се оставя да падне три пъти от височина 2 сантиметра върху твърда повърхност. При необходимост веществото се напълва отново. После страничните подпори се махат и излишъка се изравнява. Негорима и не порьозна плочка се поставя върху металната форма, всичко се обръща и формата се отделя.

Пастообразните вещества се разстилат върху негорима повърхност под формата на връв с дължина 250 милиметра и сечение приблизително 1 квадратен сантиметър.

За запалване на единия край на купчината от веществото се използва подходящ източник на възпламеняване, като малък пламък или нагрят минимум до 1 000 °С тел.

#### *1.6.2. Условия на изпитване*

В случая на чувствителни към влага вещества, изпитването се извършва възможно най-бързо след изваждане на веществото от съда.

#### *1.6.3. Протичане на изпитването*

Запалва се единият край на купчината с вещество. Когато 80 милиметра от купчината са горели, се измерва скоростта на горене за следващите 100 милиметра. Изпитването се извършва шест пъти, последователно, като всеки път се използва студена и чиста плоча.

## **2. ДАННИ**

За извършване на оценка, са необходими данните за времената на горене, определени при шест изпитвания.

## **3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

### **3.1. Протокол от изпитването**

Протоколът трябва да съдържа, по възможност, следната информация:

- точно описание на веществото (идентификация и примеси),
- описание на изпитваното вещество, физичното му състояние, включително и съдържанието на влага,
- резултати от измерванията,
- всяка допълнителна забележка, която може да бъде полезна за интерпретация на резултатите.

### **3.2. Интерпретация на резултатите**

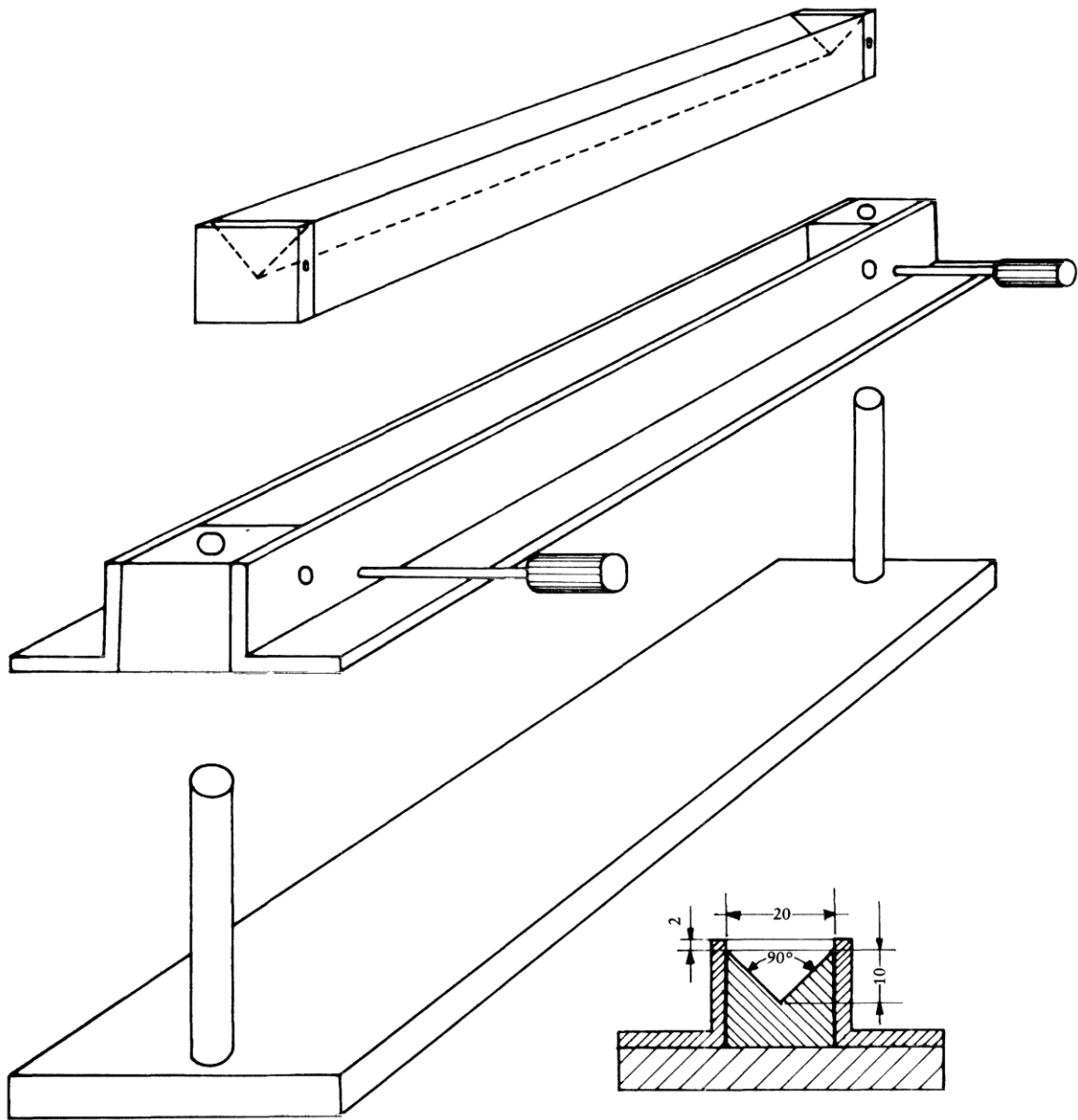
Прахообразните, зърнести или пастообразни вещества трябва да бъдат считани за лесно възпламеними, когато времето на горене по време на шест изпитвания, извършени съответно метода, описан в точка 1.6, е по-малко от 45 секунди. Металните прахове или металните сплави трябва да бъдат считани за лесно възпламеними, когато могат да бъдат запалени и пламъкът или реакционната зона се простира върху цялата проба.

## **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Няма.

Допълнение  
Фигура

Форма и аксесоари, необходими за изработване на купчина  
(Всички размери са в милиметри)



Дължина на формата: 250 мм  
Материал: алуминий

## **A.11. ВЪЗПЛАМЕНИМОСТ (ГАЗОВЕ)**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Настоящият метод позволява да бъде определено дали газове, смесени с въздух при стайна температура и атмосферно налягане, притежават интервал на възпламенимост. Смесии, съдържащи нарастващи концентрации от изпитвания газ, се излагат на действието на електрична искра и се наблюдава дали има възпламеняване.

#### **1.2. Определения и единици**

Интервал на възпламенимост е интервалът от концентрации между горна и долна граници на експлозия. Горна и долна граници на експлозия представляват тези концентрации на газа във въздух, при които огънят не се разпространява.

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма специфицирани.

#### **1.4. Принцип на метода**

Концентрацията на газа във въздух се повишава постепенно и при всеки етап сместа се излага на действието на електрична искра.

#### **1.5. Критерии за качество**

Няма определени.

#### **1.6. Описание на метода**

##### *1.6.1. Апарат*

Съдът за изпитване представлява поставен вертикално стъклен цилиндър с вътрешен диаметър най-малко 50 милиметра и височина най-малко 300 милиметра. Възпламеняващите електроди се намират на разстояние от 3 до 5 милиметра един от друг, и са поставени на 60 милиметра от дъното на цилиндъра. Цилиндърът е оборудван с клапан. Апаратът трябва да бъде обезопасен с преграда за ограничаване на щетите при евентуална експлозия. Източникът на възпламеняване е индуктивна искра, поддържана за 0,5 секунди, генерирана от трансформатор за високо напрежение с напрежение на изхода от 10 до 15 kV (максималната мощност е 300 W).

##### *1.6.2. Условия на изпитване*

Изпитването трябва да бъде извършено при стайна температура.

##### *1.6.3. Протичане на изпитването*

Чрез дозиращи помпи, стъкленият цилиндър се напълва със смес въздух-газ с известна концентрация. През сместа се пропуска искра и се наблюдава дали от източника на възпламеняване се отделя пламък и се разпространява независимо. Концентрацията на газа се увеличава на стъпки от по 1 обемен процент, докато се осъществи описаното по-горе възпламеняване.

## **2. ДАННИ**

За определяне на това свойство единственият валиден информативен резултат е разпространението на пламъка.

## **3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът трябва да съдържа, по възможност, следната информация:

- точно описание на веществото (идентификация и примеси),
- описание на използвания апарат, посочвайки размерите му,
- стайна температура по време на изпитването,
- концентрации на изпитване, както и получени резултати,
- резултати от изпитването: невъзпламеняващ се или лесно възпламеняващ се газ,
- когато се заключи „невъзпламенимост“, трябва да бъде декларирано, че всички концентрации са изпробвани, с увеличаване на концентрациите на стъпки от по 1 %, от 0 до 100 %,
- всяка информация или забележка, която може да бъде полезна за интерпретация на резултатите.

## **4 ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Няма.

## **A.12. ВЪЗПЛАМЕНИМОСТ (ВЕЩЕСТВА И ПРЕПАРАТИ, КОИТО ПРИ КОНТАКТ С ВОДА ИЛИ ВЛАЖЕН ВЪЗДУХ, ОБРАЗУВАТ ЛЕСНО ВЪЗПЛАМЕНИМИ ГАЗОВЕ В ОПАСНИ КОЛИЧЕСТВА)**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Настоящият метод може да бъде използван за определяне дали реакцията на дадено вещество с вода води до образуване на опасно количество от газ или газове, склонни към лесно възпламеняване или токсични.

Той може да бъде прилаган и при течни и при твърди вещества, но не и при вещества, които спонтанно се запалват при контакт с въздух.

#### **1.2. Определения и единици**

Лесно възпламеними:

Вещества и препарати, които при контакт с вода или влажен въздух, отделят опасно количество от лесно възпламеними газове с минимален дебит от 1 l/kg за час. Това ограничение не държи сметка за токсичността на газа.

#### **1.3. Принцип на метода**

Изпитването на веществото включва описаните по-долу етапи; ако по време на някой от етапите се получи възпламеняване, не е необходимо продължаване на изпитването.

##### *1.3.1. Етап 1*

Изпитваното вещество се поставя в бидон, съдържащ дестилирана вода при 20 °C и се отбелязва дали газът се запалва или не.

##### *1.3.2. Етап 2*

Изпитваното вещество се поставя върху филтърна хартия, плаваща на повърхността на дестилирана вода в капсула при 20 °C и се отбелязва дали отделеният газ се запалва или не. Филтърната хартия служи само за поддържане на веществото на място, което води до увеличение на вероятността за възпламеняване.

##### *1.3.3. Етап 3*

Изпитваното вещество се поставя на купчина с височина от 2 сантиметра и диаметър от 3 сантиметра приблизително. Към купчината се прибавят няколко капки вода и се отбелязва дали отделеният газ се запалва или не.

##### *1.3.4. Етап 4*

Изпитваното вещество се смесва с дестилирана вода при 20 °C и се измерва дебита на газа за период от седем часа на интервали от по един час. Ако, след 7 часа, дебитът е променлив или нараства, времето за измерване трябва да бъде увеличено най-много до 5 дни. Изпитването може да бъде прекратено, ако в даден момент дебитът превишава 1 l/kg за час.

#### **1.4. Сравнително вещество**

Няма специфицирано.

## 1.5. Критерии за качество

Няма посочени.

## 1.6. Описание на методите

### 1.6.1. *Eman 1*

#### 1.6.1.1. Условия на изпитване

Изпитваното вещество се използва в неговата търговска форма и изпитването се извършва при стайна температура (приблизително 20 °C).

#### 1.6.1.2. Протичане на изпитването

Малко количество (приблизително 2 милиметра в диаметър) от изпитваното вещество се поставя в бидон, съдържащ дестилирана вода. Отбелязва се дали: i) има отделяне на газ, ii) газът се запалва. Ако газът се запалва, не е необходимо да бъде продължено изпитването на веществото, защото от този момент то се счита за опасно вещество.

### 1.6.2. *Eman 2*

#### 1.6.2.1. Апарат

Филтърна хартия, плаваща на повърхността на подходящ съд, например капсула с диаметър от 100 милиметра.

#### 1.6.2.2. Условия на изпитване

Изпитваното вещество се използва в неговата търговска форма и изпитването се извършва при стайна температура (приблизително 20 °C).

#### 1.6.2.3. Протичане на изпитването

Малко количество от изпитваното вещество (приблизително 2 милиметра в диаметър) се поставя в центъра на филтърна хартия. Отбелязва се дали: i) има отделяне на газ, ii) газът се запалва. Ако газът се запалва, не е необходимо да се продължи изпитването на веществото, защото от този момент то се счита за опасно вещество.

### 1.6.3. *Eman 3*

#### 1.6.3.1. Условия на изпитване

Изпитваното вещество се използва в неговата търговска форма и изпитването се извършва при стайна температура (приблизително 20 °C).

#### 1.6.3.2. Протичане на изпитването

Изпитваното вещество се поставя на купчина с височина от 2 сантиметра и диаметър от 3 сантиметра приблизително, с малък кратер на върха. Няколко капки вода се прибавят в дупката и се отбелязва дали: i) има отделяне на газ, ii) газът се запалва. Ако газът се запалва, не е необходимо да се продължи изпитването на веществото, защото от този момент то се счита за опасно вещество.

### 1.6.4. *Eman 4*

#### 1.6.4.1. Апарат



Апаратът е показан на фигурата от допълнението.

#### 1.6.4.2. Условия на изпитване

Проверява се дали съдът с изпитваното вещество не съдържа прахообразни частици ( $<500\mu\text{m}$ ). Ако те са повече от 1 % от общото тегло, или ако пробата е ронлива, преди извършване на изпитване веществото се смила на прах за да се намали размера на частиците по време на съхраняване и транспорт; в противен случай веществото се използва в търговската му форма. Изпитването се извършва при стайна температура ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и атмосферно налягане.

#### 1.6.4.3. Протичане на изпитването

Във фунията с кранче от апаратурата се налива вода, после се взема, претегля и поставя в конична колба достатъчно количество вещество, до максимално тегло от 25 грама, за да се получи отделяне на газ между 100 и 250 кубични сантиметри. Обемът на отделения газ се измерва с всеки подходящ метод. Кранчето на фунията се отваря за да пропусне водата в коничната колба; включва се хронометър. Отбелязва се времето, необходимо за пълното отделяне на газ и, при възможност, се извършват междинни отчитания. Изпитването трябва да бъде извършено три пъти.

Ако химичната идентичност на газа не е известна, той трябва да бъде изследван. Ако газът съдържа лесно възпламеними съставки и е неизвестно дали цялата смес е лесно възпламенима, приготвя се и се изпитва смес със същия състав, съгласно метода на изпитване (A.11).

## 2. ДАННИ

За да се счита дадено изпитвано вещество за опасно вещество, е достатъчно да се възпламенява или да отделя лесно възпламеним газ при дебит по-висок от 1 l/kg за час по време на три изпитвания (1.6.1., 1.6.2. и 1.6.3.).

## 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

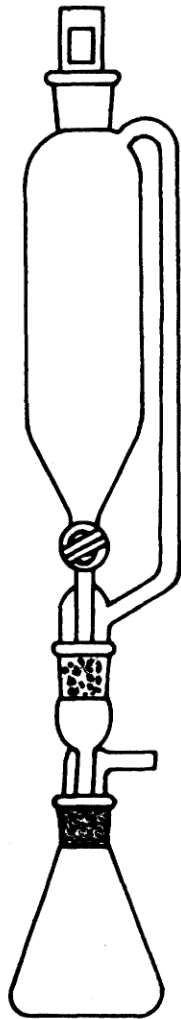
Протоколът трябва да съдържа, по възможност, следната информация:

- точно описание и спецификация на веществото във вида му на получаване (например цвят, размер на частиците и физично състояние),
- всяка първоначална подготовка на изпитваното вещество,
- резултати от изпитването,
- химична идентичност на отделения газ,
- дебит на отделения газ (1.6.4.),
- всички допълнителни наблюдения, полезни за интерпретация на резултатите.

## 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- 1) ISO 1773.
- 2) OECD, Paris, *Preliminary Test Guideline for the Determination of Substances which give off Highly Inflammable Gases in Dangerous Amounts on Contact with Water*, A 80/28 - Final report of the OECD chemical testing programme.
- 3) UN Doc. No ST/SG/AC10/1 rev. 1.

Допълнение  
Фигура  
Апаратура



## **A.13. ВЪЗПЛАМЕНИМОСТ (ТВЪРДИ ТЕЛА И ТЕЧНОСТИ)**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

За да бъде извършен този експеримент е полезно предварително да се знае самовъзпламенимостта на даденото вещество. Този метод се прилага при течни и твърди вещества, под тяхната търговска форма, които се възпламеняват в малки количества и за кратко време след като са били в контакт с въздух при стайна температура.

Този метод не се отнася за веществата, за чието спонтанно възпламеняване при стайна температура са необходими часове или дни, или за тези, които се възпламеняват спонтанно при значително по-висока температура.

#### **1.2. Определения и единици**

Течностите и твърдите тела се считат за лесно възпламеними, ако се възпламенят най-малко при едно от шест изпитвания, проведени при условията, описани в точка 1.6.

Самовъзпламенимостта при течности може да изисква също така изпитване по метода, описан в част А.15 (Самовъзпламенимост: определяне на температурата на самовъзпламенимост на летливи течности и газове).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма специфицирани.

#### **1.4. Принцип на метода**

Веществото се поставя в контакт с въздух при температура  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  в продължение на 5 минути. Ако се получи възпламеняване, веществото се счита за лесно възпламенимо.

#### **1.5. Критерии за качество**

Повторяемост: поради важността във връзка с безопасността, за да бъде считано дадено вещество за силно възпламенимо е достатъчен един позитивен резултат от шест изпитвания.

#### **1.6. Описание на метода**

##### **1.6.1. Апарат**

Порцеланова капсула с приблизителен диаметър от 10 сантиметра се запълва с диатомитова пръст (кизелгур) до височина от приблизително 5 милиметра, при стайна температура.

##### *Забележка:*

Диатомитовата пръст (кизелгур) или всяко друго подобно инертно вещество, което е на разположение, се взема като представително за почвата върху която, веществото може да бъде разпространено в случай на злополука.

##### **1.6.2. Провеждане на изпитването**

а) Прахообразни твърди вещества

Един или два кубични сантиметра от изпитваното прахообразно вещество се изсипват от височина приблизително 1 метър върху негорима повърхност и се наблюдава дали веществото се възпламенява по време на падането или в първите пет минути след натрупването.

б) Течности

Около пет кубични сантиметра от изследваната течност се изливат в подготвена порцеланова капсула и се наблюдава дали веществото се възпламенява след пет минути.

## 2. ДАННИ

За оценка са необходими резултатите от пет изпитвания.

## 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът трябва да съдържа, по възможност, следните данни:

- описание на изпитваното вещество,
- резултати от изпитването.

## 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- 1) OECD, Paris, *Preliminary Test Guideline for the Determination of Pyrophoric Behaviour of Solids and Liquids*, A 80/23 - Final report of the OECD chemical testing programme.

## **A.14. ОПАСНОСТ ОТ ЕКСПЛОЗИЯ**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

С този метод се определя дали дадено твърдо, течно или пастообразно вещество или препарат представлява опасност от експлозия, когато е подложено на действието на пламък (термична чувствителност), удар или триене (чувствителност към механично възбуждане).

Методът се състои от три части:

- а) изпитване за термична чувствителност
- б) изпитване за механична чувствителност (удар)
- в) изпитване за механична чувствителност (триене)

Методът дава данни, позволяващи да бъде оценена възможността за осъществяване на експлозия чрез някои обикновени стимулации. Той няма за цел да определя дали дадено вещество или препарат е или не е склонно към експлозия при някакви условия, нито да определя до каква степен първоначалното разлагане може да бъде разпространено и да причини експлозията на цялата проба.

Методът е подходящ за определяне дали дадено вещество или препарат представляват опасност от експлозия (термична и механична чувствителност) при условията, определени в директивата. Изпитванията са излишни, ако достъпните термодинамични данни (топлина на образуване, топлина на разлагане, липса на някои функционални групи (1) в структурната формула) позволяват да бъде установено по сигурен начин, че веществото или препаратът не могат да бъдат разложени, да образуват газове и много бързо да отделят топлина (т.е. материалът не представлява никакъв риск от експлозия). Прието е, че методът не е окончателен. Той използва избрани типове специфицирани апаратури, широко използвани в международен мащаб и които обикновено дават убедителни резултати.

Експериментаторът може да предпочете друг тип апаратура за прилагане на трите, цитирани по-горе методи, при условие че този избор е научно обоснован и че тази апаратура е приета на международно ниво. В този случай той трябва да съпостави резултатите си с резултати, получени чрез специфицирана апаратура.

#### **1.2. Определения и единици**

Експлозивни вещества и препарати:

Веществата и препаратите, които могат да се взривят под действие на пламък, или които са по-чувствителни на удар или на триене от динитробензол.

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Мета-динитробензол, технически кристален продукт, за метод на изпитване чрез триене или чрез удар.

#### **1.4. Принцип на метода**

За определяне на условията за безопасност при извършване на трите изпитвания за чувствителност е необходим предварителен селекционен тест.

#### 1.4.1. *Предварително селекционно изпитване*

Много малки проби (приблизително 10 мг) от веществото или препарат се подлагат: на нагриване, без ограничение, в пламък от бунзенова горелка, на удар във всяка подходяща форма на апаратура и на триене, използвайки дървен чук и наковалня или всеки друг тип устройство за триене. Целта е да бъде определено дали веществото е чувствително и избухливо в такава степен, че посочените изпитвания за чувствителност да трябва да бъдат проведени при особени предпазни мерки за да се избегне физическото нараняване на експериментатора.

#### 1.4.2. *Термична чувствителност*

При този метод даденото вещество или препарат се нагрива в стоманена тръба с различни степени на ограничение, осигурени от плочки с дюзи с различен диаметър, за да се определи дали даденото вещество или препарат може да избухне при термично въздействие.

#### 1.4.3. *Механична чувствителност (удар)*

При този метод даденото вещество или препарат се подлагат на удар с чук, падащ върху стоманена наковалня.

#### 1.4.4. *Механична чувствителност (триене)*

При този метод даденото вещество или препарат се подлагат на триене между еталонни повърхности, при определени условия на натоварване и относително движение.

### 1.5. **Критерии за качество**

Няма посочени.

### 1.6. **Описание на метода**

#### 1.6.1. *Апаратура*

##### 1.6.1.1. Термична чувствителност (въздействие на пламък)

Стоманената тръба е направена от стоманен лист за изтегляне (виж допълнението) чрез процес на изтегляне. Вътрешният ѝ диаметър е 24 милиметра, дължината ѝ – 75 милиметра и дебелината на стената ѝ – 0,5 милиметра. В отвореният си край, тръбата има затварящ фланец (виж фигура 1). Тръбата е оборудвана с кръгла плочка с дюза, устойчива на налягане и имаща отдушник. Тази плочка е здраво закрепена за тръбата чрез връзка от две части с резба (гайка и тапа). Плочката (виж фигура 1) е с дебелина 6 милиметра и е направена от високо устойчива хромна стомана (виж допълнението).

За определяне на степента на риск от експлозия на веществото или препарат, експериментаторът разполага със серия от плочки с дюза с различни диаметри на отворите (1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20...мм). Гайката и тапата (виж фигура 1) са направени от хром-манганова стомана (виж допълнението), не даваща искри до 800 °С. Стоманените тръби се използват само в един експеримент.

### 1.6.1.2. Механична чувствителност (удар)

Класическият апарат с чука се състои от: чугунен блок (сив чугун), фундамент и наковалня, колона, направляващи елементи, падаща тежест и освобождаващ механизъм. Стоманеният блок (дължина 230 мм x ширина 250 мм x височина 200 мм), отлят с фундамент (дължина 450 мм x ширина 450 мм x височина 60 мм) поддържа стоманената наковалня с диаметър 100 милиметра и височина 70 милиметра, която е завинтена върху него. От задната страна на блока е завинтен държател и върху него е фиксирана колоната, представляваща стоманена тръба, изтеглена без запояване, с външен диаметър от 90 милиметра и вътрешен диаметър от 70 милиметра. Четири винта, захванати в бетонов блок от 60 x 60 x 60 сантиметра, поддържат чука по такъв начин, че релсите да бъдат напълно вертикални и да осигуряват лесно водене на падащата тежест. Чукът, тежащ 10 килограма, е от масивна стомана; неговата ударна повърхност е от закалена стомана HRC 60-63, с минимален диаметър от 25 милиметра. По време на изпитванията, височината на падане е 0,4 метра.

Изследваната проба се поставя в матрица, състояща се от два коаксиални цилиндъра от закалена стомана, поставени един върху друг и един стоманен кух цилиндър, изпълняващ функцията на направляващ пръстен. Коаксиалните цилиндри трябва да бъдат с диаметър от 10 (-0,003 – 0,005) милиметра, с височина също от 10 милиметра, с полирани повърхности и заоблени ръбове (радиус на кривина 0,5 мм), твърдост HRC 58 до 65. Кухият цилиндър да бъде с външен диаметър от 16 милиметра, вътрешен диаметър от 10 (+0,005 + 0,010) милиметра, с полирана вътрешна повърхност и с височина от 13 милиметра. При експлозия, стоманените цилиндри и кухия цилиндър не трябва да бъдат използвани отново за други изпитвания. Матрицата се поставя върху междинна стоманена наковалня с височина 26 милиметра и се центрира чрез центриращ пръстен с предпазна халка, за извеждане на газовете, отделени при експлозията.

### 1.6.1.3. Механична чувствителност (триене)

Апаратът за изпитване чрез триене се състои от основна чугунена плоча (сив чугун), върху която е монтирано устройството за триене, съдържащо фиксиран порцеланов клин и множество подвижни порцеланови плочки. Плочката се фиксира в плъзгач, преместващ се между две релси. Плъзгачът се задейства посредством лост, ексцентрикова шайба и зъбна предавка, с електромотор така, че плочката се движи възвратно-постъпателно с ход от 10 милиметра под задвижващия лост. Порцелановият клин е зареден с 360 нютона.

Порцелановите плочки са от технически бял порцелан и имат следните размери: 25 милиметра дължина x 25 милиметра ширина x 5 милиметра дебелина. Преди нагриване, двете триещи страни на плочките се обработват чрез търкане с гъба за получаване на грапавини с дълбочина от 9 до 32  $\mu\text{m}$ .

Цилиндричният клин също е от технически бял порцелан: дължина 15 милиметра, диаметър 10 милиметра, страни със сферични повърхности, грапави (радиус на кривината 10 мм).

## 1.6.2. Условия на изпитването

### 1.6.2.1. Термична чувствителност (въздействие на пламък)

Веществото, във физичната форма в която е доставено, се поставя в тръбата до височина 60 милиметра, на три пъти по равно количество. Всеки път се притиска леко, прилагайки сила 80 Нютона върху повърхността с помощта на подходящо дървено бутало с диаметър малко по-малък от този на тръбата. Ако веществото е желеобразно да се избягва образуването на въздушни мехурчета по време на пълненето.

#### 1.6.2.2. Механична чувствителност (удар)

Веществото се изпитва в сухо състояние. Пробата трябва да бъде с обем 40 кубични милиметра, или да бъде с обем, подходящ за използваната апаратура. При твърди вещества, с изключение на пастообразните вещества, се процедира по следния начин:

- а) прахообразните вещества се пресяват (сито с размер на отворите 0,5 мм); частта, отделена чрез пресяване се използва за изпитване;
- б) пресованите, отляти или по друг начин кондензирани вещества се раздробяват и пресяват; частта, отделена чрез пресяване (диаметър от 0,5 до 1 мм) се използва за изпитване.

При течните вещества, горният метален цилиндър се спуска надолу, докато стигне на разстояние 1 милиметър от долния цилиндър и се поддържа в това положение.

#### 1.6.2.3. Механична чувствителност (триене)

Веществото се изпитва в сухо състояние. Пробата трябва да бъде с обем 10 кубични милиметра. При твърди вещества, с изключение на пастообразните вещества, се процедира по следния начин:

- а) прахообразните вещества се пресяват (сито с размер на отворите 0,5 мм); частта отделена чрез пресяване се използва за изпитване;
- б) пресованите, отляти или по друг начин кондензирани вещества се раздробяват и пресяват; частта, отделена чрез пресяване (диаметър по-малък от 0,5 mm) се използва за изпитване.

### 1.6.3. Протичане на изпитването

#### 1.6.3.1. Термична чувствителност (въздействие на пламък)

Нагриването се извършва с пропан, идващ от фабрична бутилка за стъстен газ, оборудвана с регулатор на налягането (500 mbar) и дебитометър, и разпределен на четири горелки посредством колектор. Четирите горелки консумират 3,2 литра пропан в минута. При използване на други газове за нагриване, горелките, консумацията на газ, въздухоподаването се избират така, че сравнителни измервания, извършени с инертни вещества (пясък, дибутилфталат) да показват, в запълнените тръби, повишения на температурата, подобни на тези, получени с пропан.

Горелките са разположени около камерата за изпитване както е показано на фигура 2.

Горелките се регулират така, че върха на вътрешния син конус на пламъка почти да допира тръбата. Изпитването се извършва в метална камера, чийто размери са посочени на фигура 2.

Размерите на пропановите горелки са посочени на фигури 3а и 3б.



Задължително се правят две серии от по три изпитвания, в първата серия се използва плочка с дюза, чийто отвор е с диаметър 2 милиметра, във втората – отвор, с диаметър по-голям от 2 милиметра (например, 6 мм).

Ако по време на първата серия се произведе експлозия (отвор 2 мм), не е необходимо да бъдат извършвани следващите серии от изпитвания. Ако след 5 минути не се наблюдава експлозия, изпитването е приключило.

#### 1.6.3.2. Механична чувствителност (удар)

С посочения апарат за изпитване чрез удар се извършват шест изпитвания, като тежест от 10 килограма пада от 0,4 метра. При други апарати, пробата се сравнява с м-динитробензол по установена процедура (техника « up-and-down » и др.).

#### 1.6.3.3. Механична чувствителност (триене)

Порцелановият клин се поставя върху изпитваната проба и се закача тежестта. При извършване на изпитването, следите оставени от гъбата върху порцелановата поставка трябва да бъдат перпендикулярни на посоката на движение. Да се внимава клинът да бъде върху пробата, количеството изследвано вещество да бъде достатъчно и поставката да се придвижва правилно под клина, т.е. да извършва възвратно-постъпателно движение с ход от 10 милиметра във всяка посока и това за 0,44 секунди. Всяка част от повърхността може да бъде използвана само за едно изпитване.

## 2. ДАННИ

### 2.1. Интерпретация на резултатите

Изпитванията могат да бъдат прекратени след получаване на положителен резултат по време на някой от тестовете.

### 2.2. Оценка

По принцип, дадено вещество или препарат се счита за представляващо риск от експлозия, по смисъла на директивата, ако:

а) в определения брой изпитвания за термична чувствителност се наблюдава експлозия (т.е. тръбата се пръсне на три или повече части),

или ако

б) по време на шестте изпитвания, извършени с посочения изпитващ апарат за удар, има експлозия (възпламеняването се равнява на експлозия) най-малко един път или ако пробата е по-чувствителна от м-динитробензол при друг тест с удар,

или ако

в) по време на шестте изпитвания, извършени с посочения изпитващ апарат за триене, има експлозия (дефлаграцията или възпламеняването се равнява на експлозия) най-малко един път или ако пробата е по-чувствителна от 1,3-динитробензол при друг тест с триене.

## 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

### 3.1. Изпитвателен протокол

Протоколът трябва да съдържа, по възможност, следната информация:

- идентичност, състав, чистота, съдържание на влага и др., на изследваното веществото или препарат,
  - физична форма на пробата; да се уточни дали е била пресяна или не,
  - наблюдения по време на изпитванията (вид реакция, искри, пламък, експлозия, брой парчета и др.),
  - резултати от всяко изпитване,
  - при използване на друг апарат, да се представи научна обосновка за това използване, както и доказателства за корелация между резултатите, получени със специфициран апарат и тези, получени с еквивалентния апарат,
- всички полезни наблюдения, като посочване на изпитвания, извършени върху подобни вещества, които могат да бъдат от помощ за коректната интерпретация на резултатите.

### 3.2. Интерпретация и оценка на резултатите

В протокола трябва да бъдат посочени резултатите, считани за грешни, аномални или непредставителни. При отхвърляне на даден резултат се дава обяснение и се посочват резултатите от заместващо или допълнително изпитване.

В някои случаи резултатът може да бъде грешен по причина на физичната форма или летливата природа на веществото или препарата по време на изпитването; в такъв случай е полезно да се знае какъв резултат би се получил ако веществото или препарата са използвани в търговската им форма. Други изпитвания могат да позволят получаването на тази информация. В случай, че даден аномален резултат може да бъде обяснен по този начин, последният трябва да бъде приет такъв какъвто е и да бъде използван за съобразно класифициране на веществото или препарата.

## 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- 1) Bretherick, L., *Handbook of Reactive Chemical Hazards*, London, Butterworths, 1979, p. 60 - 63.
- 2) Koenen, H., Ide, K.H., Über die Prüfung explosiver Stoffe, I. Ermittlung der Reibempfindlichkeit, *Explosive Stoffe*, vol. 3, 1955, p. 57 - 65 und p.89 - 93.
- 3) Koenen, H., Ide, K.H., Über die Prüfung explosiver Stoffe, III. Ermittlung der Empfindlichkeit explosiver Stoffe gegen thermische Beanspruchung in einer Erhitzungskammer mit verschiedenen definierten Öffnungen (Stahlhusenverfahren), *Explosive Stoffe*, vol. 4, 1956, p. 119 - 125, und p.143 - 148.
- 4) Koenen, H., Ide, K.H., Haupt, W., Über die Prüfung explosiver Stoffe, IV. Ermittlung der Schlagempfindlichkeit explosiver Stoffe von fester, flüssiger und gelatinöser Beschaffenheit, *Explosive Stoffe*, vol. 6, 1958, p. 178 - 189, 202 - 214 und 223 - 235.
- 5) ONU, 1980, December, United Nations Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods (document ST/SG/AC/10/5/Add. 3, Table 4.3).

*Допълнение*

**Пример за спецификация на материала**

- (1) Спецификация n° 1.0336.505 g, в съответствие с DIN 1623, лист 1.
- (2) Спецификация n° 1.4873, в съответствие с лист „Stahl-Eisen-Werkstoff“ 490-52.
- (3) Спецификация n° 1.3817, в съответствие с лист „Stahl-Eisen-Werkstoff“ 490-52.

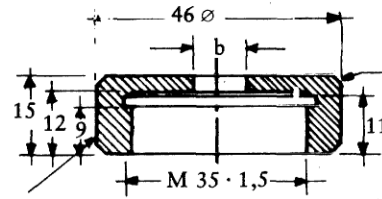
Фигура 1  
(Размерите са в милиметри)

$b = 10\varnothing$  или  $20\varnothing$

две плоски стени за ключ  
41

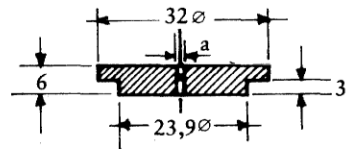
$a = 2,0\varnothing$

две плоски стени за ключ  
36

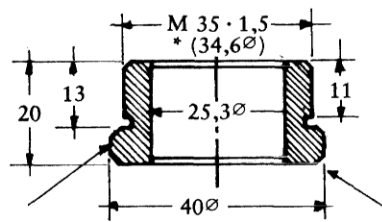


Скосен ръб

Гайка

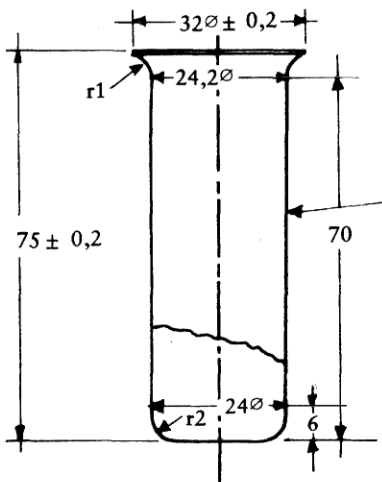


Плочка с отвор



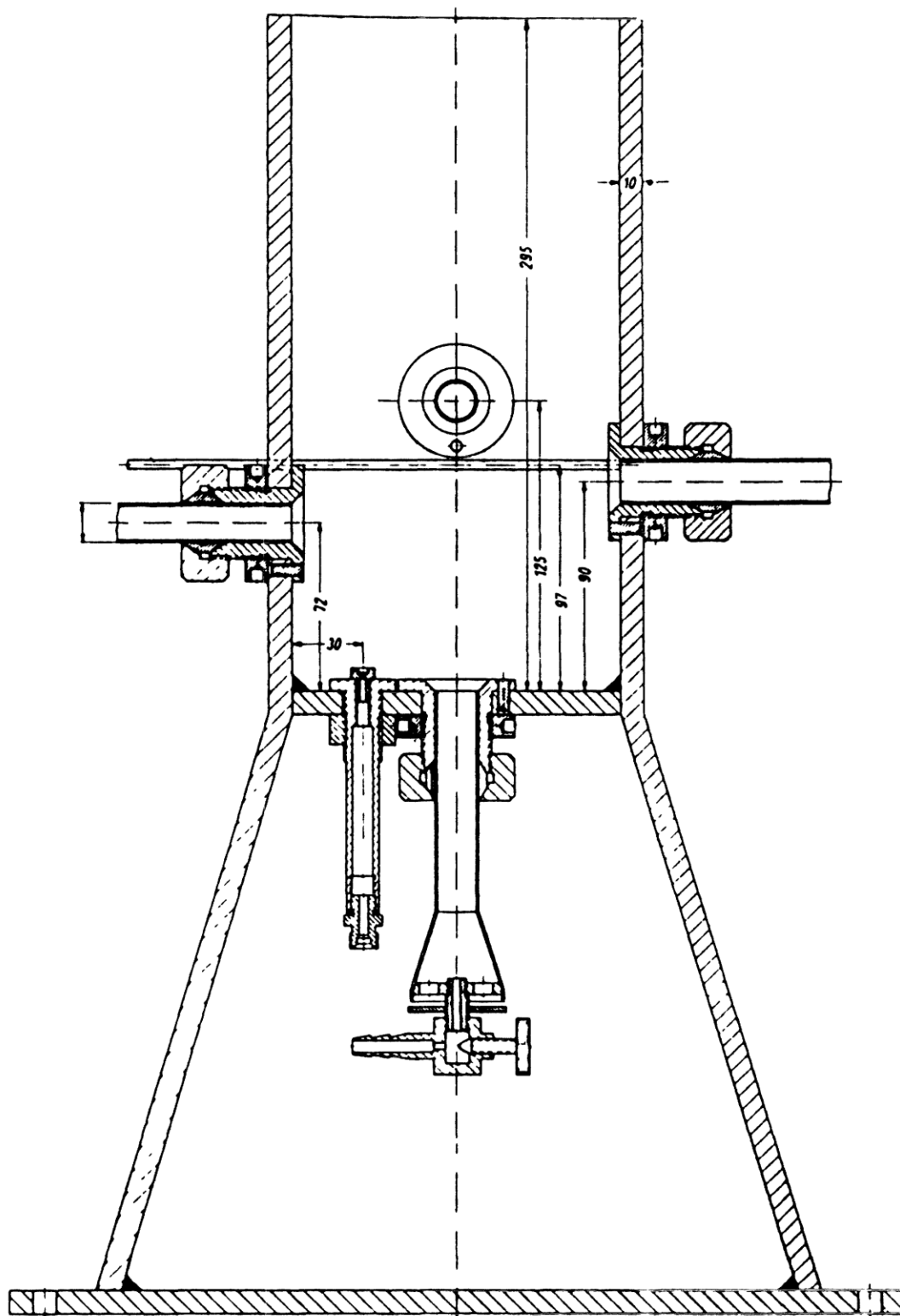
Пръстен с резба;  
нарязване на резба със  
слабо триене

Скосен ръб

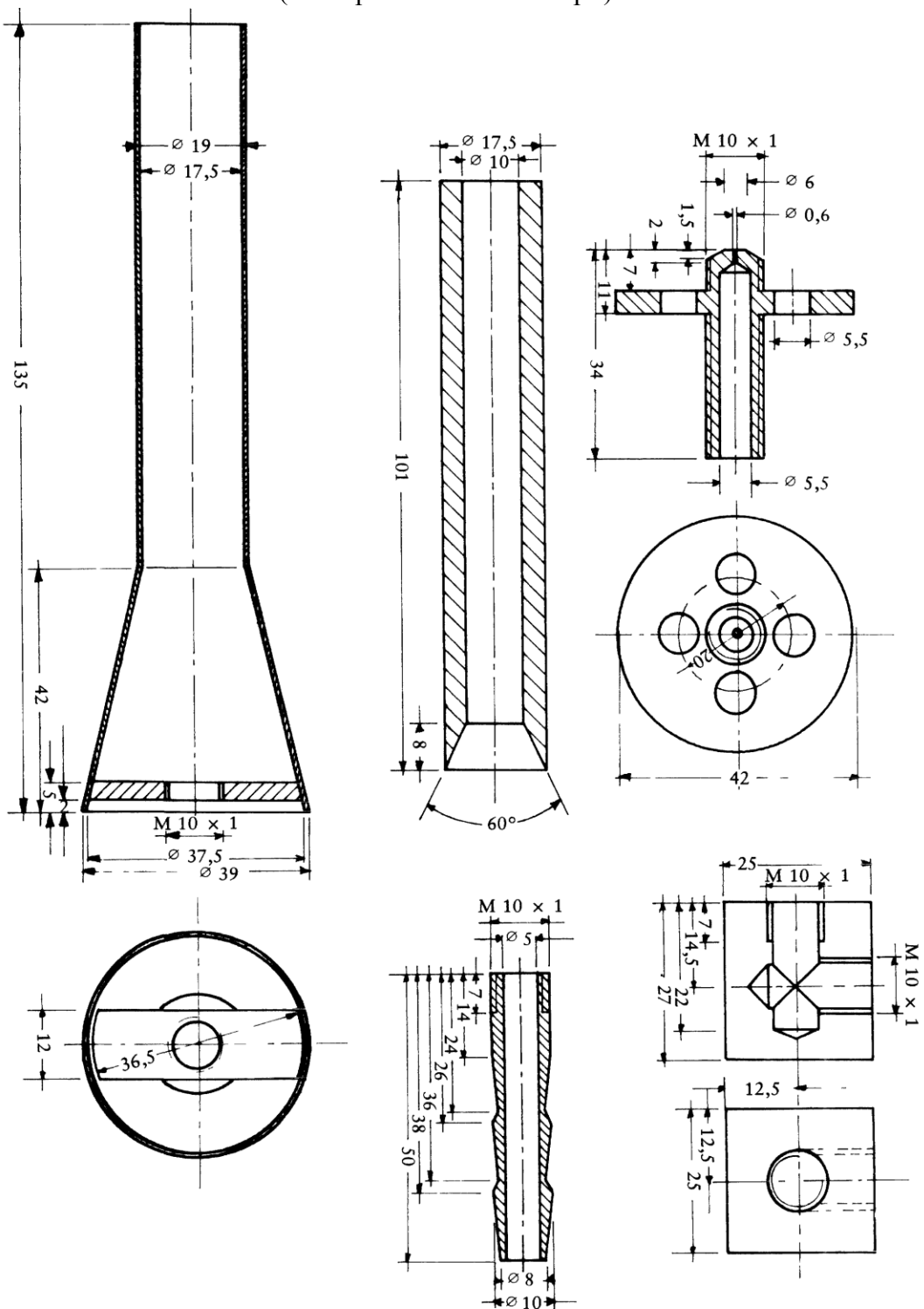


Тръба

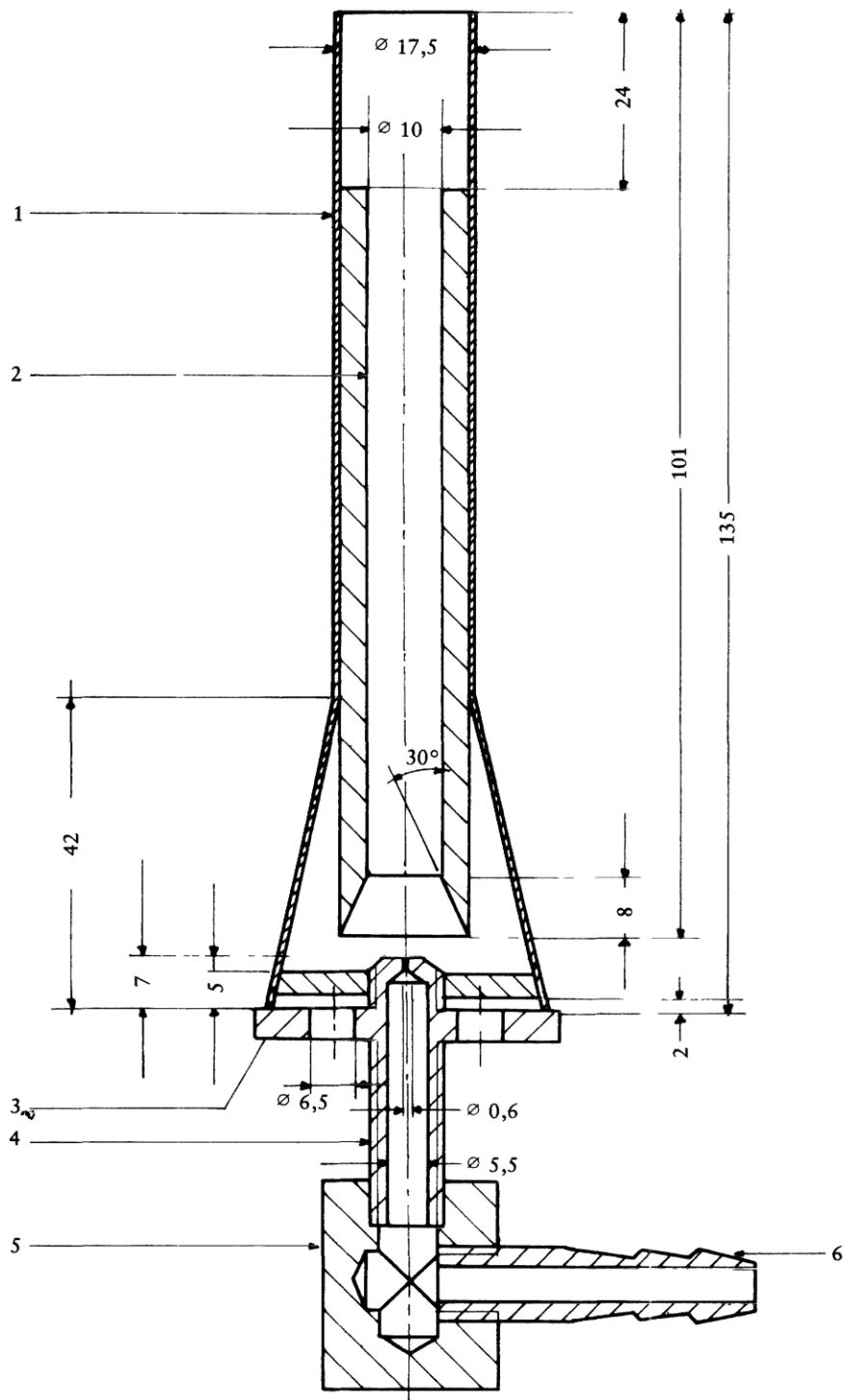
Фигура 2  
(Размерите са в милиметри)



Фигура 3а  
 Материал: месинг  
 (Размерите са в милиметри)



Фигура 3b  
 Материал: месинг  
 (Размерите са в милиметри)



## **А. 15. САМОВЪЗПЛАМЕНИМОСТ (ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТЕМПЕРАТУРАТА НА САМОВЪЗПЛАМЕНИМОСТ НА ЛЕТЛИВИ ТЕЧНОСТИ И ГАЗОВЕ)**

### **1. Метод**

#### **1.1 Увод**

За да бъде извършен този експеримент е полезно да се разполага с предварителна информация относно самовъзпламенимостта на даденото вещество. Описаният тук метод се прилага при газообразни или летливи течни вещества, под тяхната търговска форма, които, или чиито пари, могат да бъдат възпламенени от гореща повърхност в присъствие на въздух. Температурата на самовъзпламеняване може значително да бъде понижена от присъствието на каталитични примеси.

#### **1.2. Определения и единици**

Степента на самовъзпламенимост се изразява чрез температурата на самозапалване. Температура на самозапалване е най-ниската температура, при която изпитваното вещество в смес с въздух се запалва при условията, определени в метода на изпитване.

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма специфицирани.

#### **1.4. Принцип на метода**

Самовъзпламенимостта на газове и пари се определя с помощта на апарата, описан в стандарт CEI 79-4.

#### **1.5. Критерии за качество**

Възпроизводимостта зависи от температурния интервал на самозапалване и от използвания метод за изпитване: максимум  $\pm 5$  °C.

Чувствителността зависи от използвания метод за изпитване.

Специфичността също зависи от използвания метод за изпитване.

#### **1.6. Описание на метода**

##### *1.6.1. Апарат*

Апаратът е описан в метода, посочен в точка 1.6.3.

##### *1.6.2. Условия на изпитване*

Проба от изследваното вещество се изпитва според метода, посочен в точка 1.6.3.

##### *1.6.3. Протичане на изпитването*

Виж стандарти CEI 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78 и BS 4056.



## **2. ДАННИ**

Отбелязват се температурата на изпитване, атмосферното налягане, количеството използвана проба, интервалът време, който протича до осъществяване на възпламеняване.

## **3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът трябва да съдържа, по възможност, следната информация:

- точна спецификация на веществото (идентификация и примеси),
- количество използвано вещество, атмосферно налягане,
- резултати от измерванията (температура на изпитване, резултати по отношение на възпламеняването, съответните времеви интервали),
- всяка допълнителна бележка, полезна за интерпретация на резултатите.

## **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Няма.

## **А. 16. САМОВЪЗПЛАМЕНИМОСТ (ТВЪРДИ ТЕЛА - ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОТНОСИТЕЛНАТА ТЕМПЕРАТУРА НА СПОНТАННО ВЪЗПЛАМЕНЯВАНЕ )**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Експлозивните вещества и тези, които се запалват при контакт с въздух при стайна температура не трябва да бъдат подлагани на това изпитване.

Целта му е да даде предварителна информация относно спонтанната възпламенимост на твърди вещества при високи температури.

Ако отделената топлина, при реакция на даденото вещество с кислород, или при екзотермично разлагане, не се разпространява достатъчно бързо в околната среда, самозагриването води до спонтанно възпламеняване. Следователно спонтанно възпламеняване се получава, когато скоростта на създаване превишава скоростта на разпространение на топлината.

Процесът на изпитване е полезен като предварителен тест за избор на твърди вещества. Имайки предвид сложната природа на възпламеняването и горенето на твърдите тела, температурата на спонтанно възпламеняване, определена по този метод на изпитване, трябва да служи само за сравнителни цели.

#### **1.2. Определения и единици**

Температурата на спонтанно възпламеняване, определяна по този метод, е минималната стайна температура, изразена в градуси Целзий (°C), при която даден обем от дадено вещество се запалва спонтанно при определени условия.

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

#### **1.4. Принцип на метода**

Определен обем от изпитваното вещество се поставя в пещ при стайна температура; регистрира се кривата температура/време в центъра на пробата, докато температурата на пещта се повишава до 400 °C със скорост 0,5 °C в минута. За целите на настоящото изпитване, температурата на пещта, при която температурата на пробата достига 400 °C чрез самозагриване, се нарича температура на спонтанно възпламеняване.

#### **1.5. Критерии за качество**

Няма.

#### **1.6. Описание на метода**

##### *1.6.1. Апаратура*

##### **1.6.1.1. Пещ**

Термопрограмируема лабораторна пещ (обем: приблизително 2 литра), оборудвана със система за естествено циркулиране на въздух и предпазен

клапан. За да бъде избегнат всякакъв риск от експлозия е необходимо да се внимава газовете от разлагането да не влязат в контакт с електричните съпротивления (нагреватели).

#### 1.6.1.2. Куб от метална телена мрежа

Парче телена мрежа от неръждаема стомана с ширина на дупката от 0,045 милиметра, се изрязва по начина, посочен на фигура 1 (виж допълнението). Мрежата се сгъва и се закрепва с метална жица във форма на отворен куб, т.е. без горна страна.

#### 1.6.1.3. Термодвойки

Подходящи термодвойки.

#### 1.6.1.4. Регистриращо устройство

Всяко записващо двуканално устройство, калибрирано за интервал от 0 °C до 600 °C или за съответстващо напрежение.

#### 1.6.2. Условия на изпитване

Веществата се изследват в търговския им вид.

#### 1.6.3. Протичане на изпитването

Кубът се напълва с изпитваното вещество. Притиска се леко и се добавя вещество до пълното запълване на куба. Пробата се окачва в центъра на пещта при стайна температура. Една термодвойка се поставя в центъра на куба и друга – между куба и стената на пещта, за да регистрира температурата ѝ.

Температурите на пещта и пробата се отчитат непрекъснато, докато температурата на пещта се покачва до 400 °C или до температурата на топене на твърдото тяло, ако е по-ниска, със скорост от 0,5 °C в минута.

Когато веществото се запали, термодвойката от пробата показва много силно повишение на температурата в сравнение с температурата на пещта.

## 2. ДАННИ

Температурата на пещта, при която температурата на пробата достига 400 °C чрез samozagryvane, e подходяща за оценката (виж фигура 2 на допълнението).

## 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

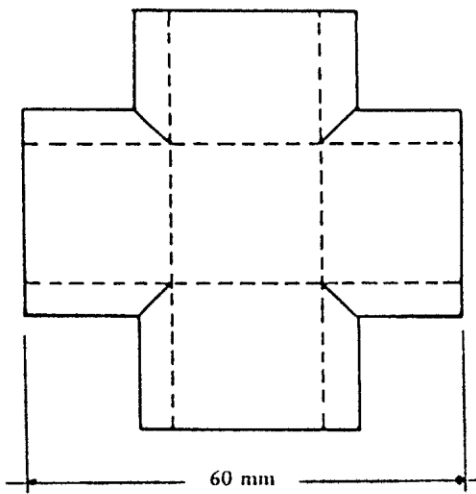
- описание на изпитваното вещество,
- резултати от измерванията, включително крива температура/време,
- всички допълнителни бележки, полезни за интерпретация на резултатите.

## 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

Няма.

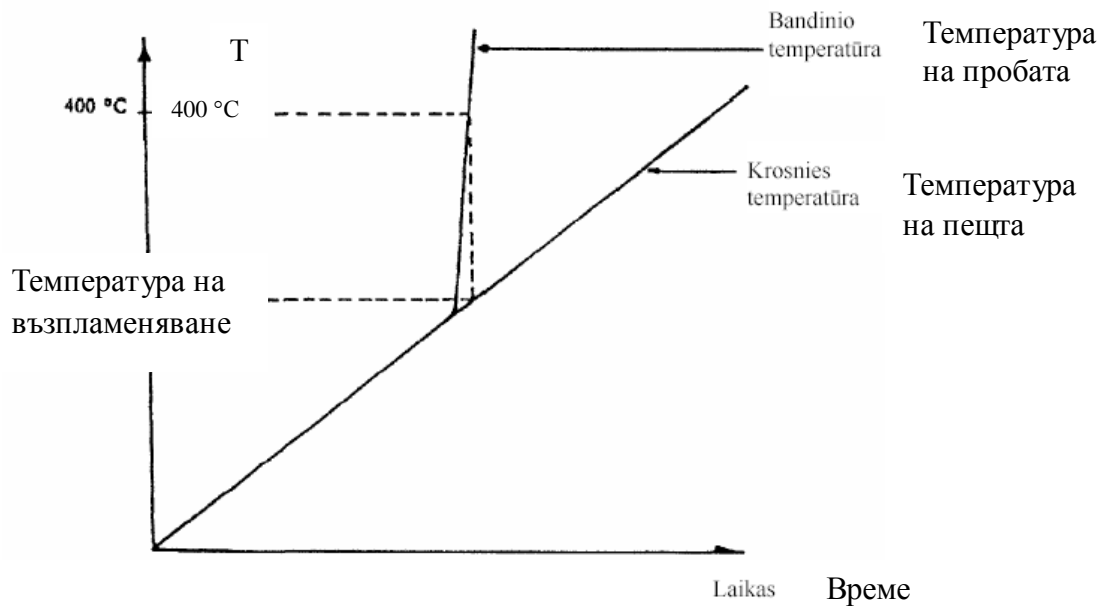
Допълнение  
Фигура 1

Модел на куб за изпитване от 20 мм



Фигура 2

Типична крива температура/време



## **А. 17. ОКСИДИРАЩИ СВОЙСТВА**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Преди извършване на този експеримент е полезно да се разполага с предварителна информация относно оксидиращите свойства и евентуалната токсичност на даденото вещество.

Описаният тук метод е неприложим при течности, газове, експлозивни или лесно възпламеними вещества, органични пероксиди и при твърди вещества, които могат да се стопят при условията на изпитването.

Това изпитване не е подходящо, когато изследването на химичната структура показва без никакво съмнение, че веществото или препаратът не може да осъществи екзотермична реакция с гориво.

За да се изясни, дали това изпитване няма нужда от специални предпазни мерки, трябва да бъде извършено предварително изпитване.

#### **1.2. Определения и единици**

Време на горене: време на реакцията, изразено в секунди, взето за реакционната зона, придвижваща се през купчината, според процедурата описана в точка 1.6.

Скорост на горене: изразена в милиметри за секунда.

Максимална скорост на горене: най-високата стойност измежду скоростите на горене, получени със смеси, съдържащи от 10 до 90 тегловни процента гориво.

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Като сравнително вещество за изпитването и за предварителното изпитване се използва бариев нитрат (чист за анализ).

Калиев бихромат може също да бъде използван при предварителното изпитване.

При транспорт на калиевия бихромат трябва да бъдат вземани специални предпазни мерки.

Сравнителната смес се състои от бариев нитрат и целулоза на прах, приготвя се в съответствие с точка 1.6 и притежава максимална скорост на горене (обикновено се използва смес, съдържаща 60 тегловни процента бариев нитрат).

#### **1.4. Принцип на метода**

По съображения за безопасност, се извършва предварително изпитване. Не е нужно да бъде продължено изпитването, ако предварителното изпитване показва, че веществото има оксидиращи свойства. В противен случай, веществото или препаратът се подлагат на пълно изпитване.

При това изпитване, изследваното вещество и определено гориво се смесват в различни пропорции. Всяка от тези смеси се слага на купчина, която се запалва

от единия край. Максималната скорост на горене се сравнява с максималната скорост на горене на сравнителната смес.

### 1.5. Критерии за качество

Валиден е всеки метод на смилане и смесване, стига разликата между максималната скорост на горене при всяко от шестте изпитвания и средната аритметична стойност от шестте изпитвания да не превишава 10 %.

### 1.6. Описание на метода

#### 1.6.1. Предварително изпитване

Даденото вещество, в търговския му вид, се изсушава. Сухото вещество се смесва грубо с целулоза или със стърготини, в тегловно отношение 2-1 и така образуваната смес се слага на купчина с форма на конус с диаметър на основата 3,5 сантиметра и височина 2,5 сантиметра, което се получава като се запълва без притискане подходяща конична форма (например стъклена лабораторна фуния, чиято тръбичка е запушена).

Купчината се слага върху студена, неабсорбираща и непроводяща повърхност. Възпламеняващият източник представлява инертна метална жичка, като платина или никел (който може да бъде нагръван приблизително до 1000 °C), поставена на около 1 милиметър над изпитваната повърхност и преминаваща през основата на коничната купчина. Изпитването трябва да бъде извършвано в камина (виж точка 1.6.3).

Възпламеняващия източник остава запален по време на теста. Интензитетът и продължителността на реакцията се наблюдават и отчитат.

Веществото или препаратата се считат за оксидиращи, ако реакцията е интензивна.

При съществуване на съмнение относно резултата е необходимо да бъде извършено, описаното по-долу, пълно изпитване.

#### 1.6.2. Подготовки

##### 1.6.2.1. Изпитвано вещество

За получаване на частици по-малки от 0,125 милиметра, пробата се третира по следния начин: веществото, взето в търговския му вид, се пресява. Останалата част се стрива, като това се повтаря докато цялата проба премине през ситото.

Могат да бъдат използвани всички методи на смилане и пресяване, удовлетворяващи изискваните качествени критерии.

Преди да се направи сместа, веществото се суши при 105 °C до постоянно тегло. Ако температурата на разлагане на веществото е по-ниска от 105 °C, веществото се суши при по-ниска температура.

##### 1.6.2.2. Гориво

За гориво се използва целулоза на прах. Тя трябва да бъде от типа, използван при тънкослойна или колонова хроматография. Подходяща е целулозата, чиято

дължина на повече от 85 % от нишките е между 0,020 и 0,075 милиметра. Целулозният прах се пресява през сито с размер на дупките от 0,125 милиметра.

Преди приготвяне на сместа, целулозата се суши при 105 °С до постоянно тегло.

Ако по време на предварителното изпитване са използвани дървени стърготини, сега се използват меки дървени стърготини, които се приготвят като се събира частта, преминала през сито с размер 1 600 микрометра (µm), добре се размесва и после се суши 4 часа при температура 105 °С на слоеве, не по-дебели от 25 милиметра. Стърготините се охлаждат и се съхраняват в плътна опаковка, напълнена възможно най-пълно. За предпочитане е използването да стане в рамките на 24 часа след сушенето.

#### 1.6.2.3. С м е с и

Приготвят се смеси от окислител и целулоза, съдържащи от 10 до 90 % окислител с увеличения от по 10 %. В граничните случаи се използват междинни смеси за по-точно определяне на максималната скорост на горене.

#### *Бележка.*

Смесите от окислител и целулоза, представляващи опасност от експлозия трябва да бъдат манипулирани много предпазливо.

Купчината се приготвя с помощта на метална форма с триъгълно сечение с дължина 250 милиметра, вътрешна височина от 10 милиметра и вътрешна ширина от 20 милиметра. Около тази форма се поставя метална рамка, надвишаваща с 2 милиметра горният ръб на триъгълното сечение (виж фигурата от допълнението). Формата се запълва без притискане с излишък от сместа. След като формата се остави веднъж да падне от височина 2 сантиметра върху твърда повърхност, веществото което е в повече се премахва чрез шпатула, държана косо. След това се маха металната рамка и повърхността на праха се изравнява с ваяк. Негорима плочка се поставя върху формата, която се обръща и формата се отделя.

#### 1.6.2.4. В ъ з п л а м е н я в а щ и з т о ч н и к

Използва се пламък от газова горелка или платинена жичка, загряна електрично до 1000 °С.

#### 1.6.3. У с л о в и я н а и з п и т в а н е

Купчината се поставя в камина, перпендикулярно на посоката на въздушното течение.

Скоростта на аспирация не трябва да бъде променяна по време на изпитванията, тя трябва да бъде достатъчна за да не се задими лабораторията. Пред апарата се разполага устройство, предпазващо го от течение.

Имайки предвид хигроскопичните свойства на целулозата и на изпитваните вещества, изпитването трябва да бъде извършено възможно най-бързо.

Единият край на купчината се запалва чрез допиране на пламъка или нажежената платинена жичка. След като реакционната зона премине разстояние от 30 милиметра, се измерва времето на реакция за 200 милиметра.

Изпитването се извършва със сравнителното вещество. След това изпитването се провежда най-малко един път с всяка от смесите на изследваното вещество с целулозата. Ако се регистрира максимална скорост на реакция, значително по-висока от тази на сравнителното вещество, изпитването може да бъде прекратено; иначе, с трите смеси, при които са регистрирани най-високи скорости на реакция, изпитванията се повтарят пет пъти.

## **2. ДАННИ**

Поради съображения за сигурност, за характеризирание на оксидиращите свойства на изследваното вещество се взема максималната скорост на реакция, а не средната стойност на скоростите.

За оценка на дадената смес, се взема най-високата измерена скорост на горене по време на шестте изпитвания.

Зависимостта на най-високата скорост на горене за всяка смес от съдържанието на гориво се представя в графичен вид.

От графиката се определя максималната скорост на горене.

Шестте скорости на горене, измерени за сместа, която показва максимална скорост на горене, не трябва да се отклоняват повече от 10 % от средната аритметична стойност. В противен случай трябва да бъдат подобрени методите на стриване и смесване.

Получената максимална скорост на горене се сравнява с максималната скорост на горене на сравнителната смес (виж точка 1.3).

## **3. ПРОТОКОЛ**

### **3.1. Протокол от изпитването**

Протоколът трябва да съдържа, по възможност, следната информация:

- описание на изследваното вещество;
- всяка обработка на пробата (например: мелене, сушене);
- резултати от измерванията;
- тип реакция (например: бързо повърхностно изгаряне, изгаряне през цялата маса, всяко наблюдение, отнасящо се до продуктите на горене, и т.н.);
- всички други забележки, полезни за интерпретацията на резултатите, включително описание на интензивността (пламък, искра, дим, бавно нажежаване и т.н.) и приблизителната продължителност на реакцията, наблюдавана за даденото вещество и за сравнителното вещество по време на предварителното изпитване.

### **3.2. Интерпретация на резултатите**

Едно вещество се счита за оксидиращо, ако:

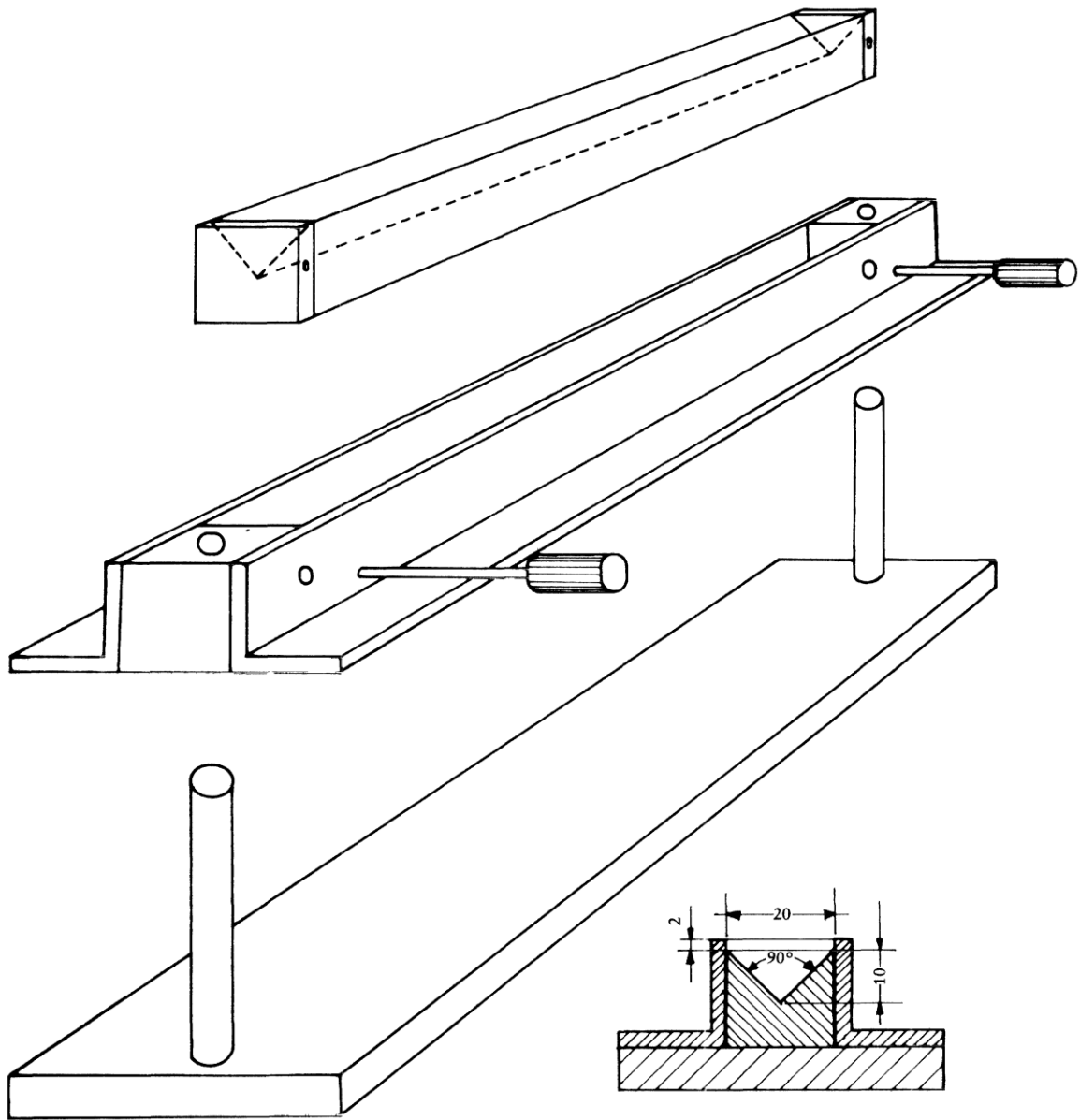


- а) по време на предварителния тест има интензивна реакция;
- б) по време на изпитването, максималната скорост на горене е по-висока или равна на тази на сравнителната смес от целулоза и бариев нитрат.

#### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Няма.

*Допълнение*  
*Фигура*  
**Форма и аксесоари, необходими за оформянето на купчината**  
(Всички размери са в милиметри)



Дължина на формата: 250 мм  
Материал: алуминий

## ЧАСТ Б. МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТОКСИЧНОСТТА

### ОБЩ УВОД, ЧАСТ Б

#### А. УВОД

Виж общия увод.

#### Б. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

- i) *Остра токсичност* - включва неблагоприятните ефекти, които възникват за определен период (обикновено 14 дни) след прилагане на единична доза от дадено вещество.
- ii) *ЛД<sub>50</sub>* (средна летална доза) е статистически определената единична доза от дадено вещество, която причинява смърт на 50 % от приелите я опитни животни. Стойността на ЛД<sub>50</sub> се изразява с теглото на изследваното вещество за единица тегло на опитните животни (милиграм за килограм).
- iii) *ЛК<sub>50</sub>* (средна летална концентрация) е статистически определената концентрация на дадено вещество, която причинява, по време на експозицията или в определен период след нея, смърт на 50 % от опитните животни, експонирани за определен период от време. Стойността на ЛК<sub>50</sub> се изразява с теглото на изследваното вещество за стандартен обем въздух (милиграм за литър).
- iv) *Ниво, при което не се наблюдават токсични ефекти* е максималната доза или ниво на експозиция, не водещи до неблагоприятен ефект, свързан с третирането.
- v) *Субостра/субхронична токсичност* - включва неблагоприятните ефекти, които се появяват при опитните животни, в резултат на ежедневно прилагане или експозиция на дадено вещество, за кратък период от време в сравнение с предвидената продължителност на живота им.
- vi) *Максимална поносима доза (МПД)* е най-високото ниво на интоксикация, използвано в експеримента, при което се проявяват белези на токсичност, без да има по-големи ефекти върху преживяемостта на опитните животни, например, по време на канцерогенно изследване- ефекти, различни от появата на тумори.
- vii) *Кожно дразнене* е появата на обратими възпалителни промени на кожата, в следствие прилагане на дадено вещество.
- viii) *Очно дразнене* е появата на обратими очни промени, вследствие прилагане на дадено вещество върху предната повърхност на окото.
- ix) *Кожна сенсibiliзация* (алергични контактни дерматити) е имунологично предизвикана кожна реакция към дадено вещество.

## *В. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ*

Съществуват ограничения в степента, до която резултатите от опитите с животни и тези, получени ин-витро, могат да бъдат екстраполирани директно за човека и това трябва да се има предвид при оценка и интерпретация на изпитванията за токсичност.

Човешките данни, когато се разполага с такива, се считат за най-достоверни при определяне на потенциалните ефекти от химични вещества върху населението.

### МУТАГЕННОСТ (включително опити за откриване на канцерогенност)

За предварителна оценка на мутагенния потенциал на дадено вещество е необходимо да се получи информация относно два механизма - генетична мутация и хромозомни аберации.

Тези два механизма се изследват с помощта на следните тестове:

- i) тестове, базиращи се на появата на генни мутации (точкови) при прокариотни клетки като *Salmonella typhimurium*; може също да бъде използвана *Escherichia coli*. Изборът измежду тези два организма се прави като се има предвид природата на изпитваното вещество;
- ii) тестове, базиращи се на появата на хромозомни аберации в клетки на бозайници, култивирани "ин-витро"; може също да се процедира "ин-виво" (микронуклеус тест или метафазен анализ на клетки от костен мозък).

## *Г. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ*

Токсикологията е развиваща се експериментална наука и съществува много богата литература по всяка тема. Полезна практическа информация може да бъде намерена в съответните ръководни указания на Организацията за икономическо сътрудничество и развитие (ОИСР).

### Допълнителни забележки

#### *Грижи за животните*

При токсикологичните опити е много важно да бъде провеждан строг контрол на околните условия и да бъдат използвани подходящи техники за грижа за животните.

#### i) Условия на отглеждане

Околните условия в експерименталните помещения или оградени места трябва да бъдат подходящи за използвания вид. За гризачите, температурата в помещението трябва да бъде 22 °C ( $\pm 3$  °C) и относителната влажност - от 30 до 70 %; за зайците и морските свинчета, температурата трябва да бъде 20 °C ( $\pm 3$ °C) и относителната влажност от 30 до 70 %.

Някои експериментални техники са особено чувствителни към температурните влияния и в тези случаи детайлите за подходящите условия трябва да бъдат включени в описанието на метода на изпитване. При всички изследвания на токсичните ефекти, трябва да бъдат следени и отчитани температурата и влажността и измерванията да бъдат отразявани в окончателния протокол от изследването.

При използване на изкуствено осветление, обикновено трябва да бъдат редувани 12 часа светлина и 12 часа тъмнина. Данните за режима на осветление трябва да бъдат записвани и отразявани в окончателния протокол от изследването.

В протоколите за експерименти върху животни, е важно да бъде посочен вида на използваната клетка, както и броят на животните, намиращи се във всяка клетка, както по време на експозиция на химични вещества, така и във всеки следващ период на наблюдение.

#### ii) Хранене

Храната трябва да отговаря на всички хранителни изисквания на изследвания вид. Когато изследваното вещество се въвежда с храната, хранителната стойност на тази храна може да бъде намалена вследствие на взаимодействие между даденото вещество и някои от хранителните съставки.

Възможността за такова взаимодействие трябва да бъде взета предвид, когато се интерпретират експерименталните резултати.

Примесите, съдържащи се в хранителния режим, за които е известно, че могат да повлияят на токсичността, не трябва да присъстват в оказващи ефект концентрации.

## **Б.1. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ - ОРАЛНО ПРИЛАГАНЕ**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Виж общ увод към част Б (точка А).

#### **1.2. Определение**

Виж общ увод към част Б (точка Б).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

#### **1.4. Принцип на метода на изпитване**

Нарастващи дози от изпитваното вещество се прилагат орално, със сонда, на няколко групи опитни животни, по една доза за група. След това се наблюдават ефектите и смъртността, дължащи се на веществото. На животните, умрели по време на експеримента, също както и на тези, преживели при завършването му, се прави аутопсия. Този метод е насочен предимно за изследване на различни видове гризачи.

#### **1.5. Критерии за качество**

Няма.

#### **1.6. Описание на метода на изпитване**

##### *1.6.1. Подготовки*

Животните се държат при характерните за експеримента условия на отглеждане и хранене най-малко пет дни преди започване на опита. Преди началото на изпитването млади, полово зрели и здрави животни се разпределят по произволен начин в различни експериментални групи.

Когато е необходимо изследваното вещество се разтваря или се суспендира в подходящ разтворител. Препоръчва се, при възможност, използването на воден разтвор, в противен случай може да бъде използван разтвор в растителна мазнина, и евентуално разтвор в други разтворители или суспензии. Токсичните свойства на неводните разтворители трябва да бъдат известни или да бъдат определени преди или по време на изпитването. Обикновено, при гризачите, обемът не трябва да превишава 10 милилитра на килограм телесно тегло, освен при водните разтвори, където може да се достигне до 20 милилитра на килограм. Промените на изпитвания обем трябва да бъдат намалени до минимум чрез регулиране на концентрацията, така че да се осигури постоянен обем за всички изследвани дози.

##### *1.6.2. Експериментални условия*

###### **1.6.2.1. Опитни животни**

Плъхът е предпочитаният вид, освен ако няма противопоказания.

Трябва да бъдат използвани обичайни лабораторни породи. За всеки пол разликата в теглото между използваните за едно изпитване животни не трябва да превишава  $\pm 20\%$  от подходящата средна стойност.

#### 1.6.2.2. Брой и пол

За всяка доза се използват най-малко десет гризача (5 женски и 5 мъжки). Женските животни не трябва да са раждали и да са бременни.

#### 1.6.2.3. Дози

Дозите трябва да бъдат достатъчен брой, най-малко три, и да са подходящо разпределени във времето, така че да се получат групи, показващи набор от токсични ефекти и проценти на смъртност. Данните трябва да бъдат достатъчни за начертаването на крива “доза/отговори” и, ако е възможно, да позволят достоверно определяне на LD<sub>50</sub>.

#### 1.6.2.4. Лимитиращо изпитване

Адекватна оценка за потенциала на острата орална токсичност за повечето цели се получава, ако в една третирана серия (по пет животни от пол) не се наблюдава смъртност, дължаща се на даденото вещество през 14 дни след приемане на доза от 5000 милиграма за килограм.

#### 1.6.2.5. Период на наблюдение

Периодът на наблюдение трябва да бъде най-малко 14 дни. Все пак, неговата продължителност не трябва да бъде твърдо фиксирана. Той трябва да бъде определян в зависимост от токсичните реакции, скоростта им на поява и продължителността на възстановителния период; следователно периодът на наблюдение може да бъде продължен, когато се прецени че е необходимо. Времето, за което се появяват и изчезват признаците на токсичност, както и времето на настъпване на смъртта са важни, особено когато има тенденция смъртта да настъпи по-късно.

#### 1.6.3. Работен режим

Животните трябва да бъдат държани гладни преди приема на даденото вещество. В случая на плъхове, те трябва да бъдат лишени от храна цялата нощ преди приема на веществото; за животни с по-висока скорост на метаболизъм е подходящ по-кратък период на гладуване; *водата не се ограничава*. На следващия ден животните трябва да бъдат претегляни преди въвеждане със сонда на изследваното вещество, което се дава в еднократна доза за всяка група. Ако прилагането на една еднократна доза не е възможно, веществото може да бъде давано на по-малки части за период от време не по-дълъг от 24 часа. След въвеждане на веществото животните могат да се оставят гладни още 3 до 4 часа. Ако дозата се приема на части за определен период, може да се наложи да се дава храна и вода на животните в зависимост от продължителността на третирането. След прилагане на веществото, систематично се провеждат и регистрират наблюдения, като по възможност се прави индивидуален лист за всяко животно. През първия ден наблюденията трябва да бъдат извършвани по-често. Внимателен клиничен преглед трябва да бъде провеждан най-малко един път в работен ден. Ежедневно трябва да бъдат извършвани други наблюдения и да се вземат съответните мерки за намаляване загубите на опитните животни, например, аутопсия или замразяване на намерените мъртви животни, както

изолиране или умъртвяване на слабите или умиращи животни. Ежедневните наблюдения трябва да включват промените на кожата и козината, очите, лигавиците, дихателния апарат, кръвоносната система, вегетативната и централна нервни системи, както и двигателната активност и начина на поведение. Треморът, конвулсиите, слюноотделянето, диарииите, летаргията, сънят и комата трябва да бъдат наблюдавани с особено внимание. Времето на смъртта трябва да бъде отбелязано с възможно най-голяма точност.

На животните, умрели по време на опита и на тези, преживели в края на теста се прави аутопсия. Всички макроскопични патологични изменения трябва да бъдат отбелязани. При необходимост трябва да бъдат вземани тъкани за хистопатологично изследване.

## **2. ДАННИ**

Данните трябва да бъдат обобщени в таблична форма, като за всяка опитна група се отразяват броят на животните в началото на изпитването, времето на смъртта на отделните животни, броят на животните, при които се наблюдават други токсични признаци, описание на токсичните ефекти и резултатите от аутопсията. Индивидуалното тегло на животните трябва да бъде определено и регистрирано малко преди въвеждане на даденото вещество, след това един път седмично и в момента на смъртта. Когато преживяемостта надхвърли един ден, промените в теглото трябва да бъдат изчислени и регистрирани. ЛД<sub>50</sub> може да бъде определена чрез прилагане на признат метод. Оценката на данните трябва да включва зависимостта, ако съществува такава, между експозицията на животните на изследваното вещество и появата, както и тежестта на всяко отклонение, включително отклонения в поведението и клинични отклонения, макроскопични увреждания, промени в телесното тегло, смъртност и всички други токсични ефекти.

## **3. РЕЗУЛТАТИ**

### **3.1. Протокол от изпитването**

Протоколът трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- вид, порода (линия), произход, условия на околната среда, хранителен режим, и др.,
- експериментални условия,
- дози (с посочване на концентрациите и на разтворителя, ако е използван такъв),
- таблица с данните, отговори според пол и доза (брой умиращи животни, брой животни, проявяващи признаци на токсичност, брой експонирани животни),
- време на смъртта след въвеждане на дозата,
- резултати от ежедневните наблюдения,
- стойност на ЛД<sub>50</sub> за всеки пол, определена на четиринадесетия ден (с точно посочване на метода на изчисление),
- 95% доверителен интервал за ЛД<sub>50</sub>,
- крива «доза/смъртност» и наклон на кривата (когато изчислителният метод позволява),



- резултати от аутопсията,
- хистопатологични констатации,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### **3.2. Оценка и интерпретация**

Виж общ увод към част Б (точка В).

### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Виж общ увод към част Б (точка Г).

## **Б.2. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ – ИНХАЛАЦИОННО ПРИЛАГАНЕ**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Виж общ увод към част Б (точка А).

#### **1.2. Определение**

Виж общ увод към част Б (точка Б).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

#### **1.4. Принцип на метода на изпитване**

Няколко групи опитни животни се експонират на изпитваното вещество, при нарастващи концентрации и за определен период от време, като за всяка група се използва само една концентрация. След това се наблюдават ефектите и смъртността, дължащи се на веществото. На животните, умрели по време на експеримента, както и на преживелите при завършването му, се прави аутопсия.

#### **1.5. Критерии за качество**

Няма.

#### **1.6. Описание на метода**

##### *1.6.1. Подготовка*

Животните се държат при характерните за експеримента условия на отглеждане и хранене най-малко пет дни преди началото му. Преди започване на изпитването млади и здрави животни се разпределят по произволен начин в различни експериментални групи. Не е необходимо да бъдат подлагани на симулирана експозиция, освен ако използваното устройство за експозиция не го налага. При необходимост към изпитваното вещество може да бъде добавен подходящ разтворител с цел получаване на подходяща концентрация на веществото в атмосферата и в този случай се предвижда контролна група за разтворителя. Ако за улесняване на дозирането се използва разтворител или други добавки, те трябва да бъдат признати за нетоксични. Ако е подходящо могат да бъдат използвани вече съществуващи данни.

##### *1.6.2. Експериментални условия*

###### **1.6.2.1. Опитни животни**

Плъхът е предпочитаният вид, освен ако няма противопоказания.

Трябва да бъдат използвани обичайни лабораторни породи (линии). За всеки пол разликата в теллото между използваните за едно изпитване животни не трябва да превишава  $\pm 20\%$  от подходящата средна стойност.

###### **1.6.2.2. Брой и пол**

Всяко концентрационно ниво се изпитва най-малко на десет гризача (5 женски и 5 мъжки). Женските животни не трябва да са раждали и да са бременни.

#### 1.6.2.3. Експозиционни концентрации

Концентрациите трябва да са достатъчно на брой, най-малко три, и да са подходящо разпределени във времето, така че да се получат групи, показващи набор от токсични ефекти и проценти на смъртност. Данните трябва да бъдат достатъчни за да може да се начертае на крива “концентрация/смъртност » и, ако е възможно, да позволят достоверно определяне на ЛК<sub>50</sub>.

#### 1.6.2.4. Лимитиращо изпитване

Ако експозиция на пет мъжки и пет женски животни на действието на газ с концентрация 20 милиграма на литър или на действието на аерозол или частици с концентрация 5 милиграма на литър, в продължение на 4 часа, (или когато това не е възможно поради химичните или физични, включително експлозивни, свойства на изпитваното вещество, експозиция на възможната максимална концентрация) не води до смъртта на нито едно животно в период от 14 дни, по-нататъшно изпитване се приема за ненужно.

#### 1.6.2.5. Продължителност на експозицията

Продължителността на експозицията е най-малко 4 часа.

#### 1.6.2.6. Експериментално устройство

Животните трябва да бъдат експонирани на веществото с помощта на инхалационно устройство, създаващо въздушен поток с минимум 12 смени на въздуха за час, с достатъчно съдържание на кислород и хомогенно разпределение на изпитвания продукт. При използване на камера, тя трябва да бъде конструирана така, че да се избягва доколкото е възможно, струпването на животните и да се осигури максималната им експозиция, чрез инхалация, на изпитваното вещество. Като общо правило, за да се осигури стабилността на атмосферата в дадена камера за изпитване, общия ”обем” на опитни животни не трябва да превишава 5 % от обема ѝ. Може също да се използва орално-назална система на експозиция, само на главата или на цялото тяло, в индивидуална камера; първите два типа експозиция позволяват да се избегне абсорбцията на изпитваното вещество по други пътища.

#### 1.6.2.7. Период на наблюдение

Периодът на наблюдение трябва да бъде най-малко от 14 дни. При все това, неговата продължителност не трябва да бъде фиксирана твърдо. Тя трябва да бъде определяна в зависимост от токсичните реакции, от скоростта им на поява и от продължителността на възстановителния период; следователно при необходимост периодът на наблюдение може да бъде удължен. Времето, за което се появяват и изчезват признаците на токсичност, както и времето на настъпване на смъртта са важни, особено когато се наблюдава тенденция за по-късно настъпване на смъртта.

#### 1.6.3. Работен режим

Малко преди експозицията, животните се претеглят, след което се експонират на изпитваната концентрация в описаната апаратура в продължение най-малко на 4 часа, като концентрацията в камерите е предварително стабилизирана. Стабилизирането на концентрацията трябва да бъде бързо. Температурата, при която се провежда изпитването трябва да бъде поддържана на 22 °C ± 3°C.

В идеалния случай относителната влажност трябва да бъде поддържана между 30 и 70 %, но, в някои случаи (например изпитване на аерозоли), това може да се окаже невъзможно. По време на експозицията на животните не се дава храна и вода.

Трябва да бъде използвана динамична инхалационна система, оборудвана с подходящо устройство за аналитичен контрол на концентрацията.

За определяне на подходящите експозиционни концентрации, се препоръчва извършването на предварително изпитване. Системата трябва да осигурява максимално бързо създаване на стабилни условия на експозиция. Скоростта на въздушния поток трябва така да се регулира, че да осигури хомогенни условия в цялата експозиционна камера.

Трябва да бъдат измервани или наблюдавани следните параметри:

а) дебит на въздуха (постоянно);

б) реална концентрация на изпитваното вещество в зоната на дишане. По време на експозиция, концентрацията не трябва да се променя с повече от  $\pm 15\%$  спрямо средната стойност. Все пак в случаите на прахове или някои аерозоли, това ниво на контрол може да не се постигне и тогава се допуска по-голямо отклонение. Частиците и аерозолите трябва да бъдат анализирани толкова често, колкото е необходимо за определяне (най-малко един път) на разпределението на размера на частиците;

в) температура и влажност;

г) по време и след експозицията се извършват наблюдения, които систематично се регистрират; прави се индивидуален лист за всяко животно. През първия ден наблюденията трябва да бъдат чести. Внимателен клиничен преглед трябва да бъде провеждан най-малко един път в работен ден. Ежедневно трябва да бъдат извършвани други наблюдения и да бъдат вземани съответните мерки за намаляване загубите на опитните животни, например, аутопсия или замразяване на намерените мъртви животни, както изолиране или умъртвяване на слабите или умиращи животни.

Ежедневните наблюдения трябва да включват промените на кожата и козината, очите, лигавиците, дихателния апарат, кръвоносната система, вегетативната и централната нервни системи, както и двигателната активност и начина на поведение. Дишането, треморът, конвулсиите, слюноотделянето, диарии, летаргията, сънят и комата трябва да бъдат наблюдавани с особено внимание. Времето на настъпване на смъртта трябва да бъде отбелязано с възможно най-голяма точност. Теглото на всяко животно трябва да бъде определяно всяка седмица след експозицията, както и в момента на настъпване на смъртта.

На животните, умрели по време на експеримента и на преживелите след приключването му се прави аутопсия, като се обръща особено внимание на промените, настъпили в горните и долните дихателни пътища. Трябва да бъдат отбелязвани всички изменения. При необходимост трябва да бъдат вземани тъкани за хистопатологично изследване.

## 2. ДАННИ

Данните трябва да бъдат обобщени в таблична форма, като за всяка опитна група се отразяват броят животни в началото на изпитването, времето на смъртта за всяко животно, броят животни показващи други признаци на токсичност, описание на токсичните ефекти и резултатите от аутопсията. Когато животните преживяват повече от един ден, промените в теглото трябва да бъдат изчислени и регистрирани.  $LK_{50}$  трябва да бъде определена чрез прилагане на признат метод. Оценката на

данните трябва да включва зависимостта, ако съществува такава, между експозицията на животните на изследваното вещество и появата, както и тежестта, на всяко отклонение, включително промени в поведението, клинични отклонения, макроскопични увреждания, промени в телесното тегло, смъртност и всички други токсични ефекти.

### 3. РЕЗУЛТАТИ

#### 3.1. Протокол от изпитването

Протоколът трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- вид, порода (линия), произход, условия на околната среда, хранителен режим, и др.,
- експериментални условия:  
описание на устройството за експозиция, включително дизайн (концепция), тип, размери, източник на въздухоподаване, система за генериране на частици и аерозоли, метод за климатизиране на въздуха и в случай на нужда, начина на престой на животните в камерата за изпитване.

Трябва да бъдат описани използваните устройства за измерване на температурата, влажността, както и концентрацията и размерите на частиците и на аерозолите.

Данни, отнасящи се до експозицията:

Те трябва да бъдат представени в таблична форма, като се посочат средните стойности, както и измерване на изменението им (например, стандартно отклонение); данните трябва да включват:

- а) скорост на въздушния поток през инхалационното устройство,
- б) температура и влажност на въздуха,
- в) номинални концентрации (общо количество от изпитваното вещество, подадено в инхалационното устройство, разделено на обема на въздуха),
- г) природа на разтворителя, в случай на използването му,
- д) реални концентрации в зоната на дишане,
- е) средни размери на частиците,
- ж) продължителност на стабилизацията,
- з) продължителност на експозицията,

- таблица, посочваща реакциите, в зависимост от пол и ниво на експозиция (брой умиращи животни, брой животни, проявяващи признаци на токсичност, брой експонирани животни),
- време на настъпване на смъртта по време или след експозицията,
- резултати от ежедневните наблюдения,
- стойност на  $LK_{50}$  за всеки пол, определена в края на периода на наблюдение (с точно посочване на метода на изчисление),
- 95% доверителен интервал за  $LK_{50}$ ,
- крива « концентрация/смъртност » и наклон на кривата (когато изчислителният метод позволява),
- резултати от аутопсията,
- всички хистопатологични констатации,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### **3.2. Оценка и интерпретация**

Виж общ увод към част Б (точка В).

### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Виж общ увод към част Б (точка Г).

## ЧАСТ Б.3. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ - КОЖНО ПРИЛАГАНЕ

### 1. МЕТОД

#### 1.1. Увод

Виж общ увод към част Б (точка А).

#### 1.2. Определение

Виж общ увод, към част Б (точка Б).

#### 1.3. Сравнителни вещества

Няма.

#### 1.4. Принцип на метода

Нарастващи дози от изпитваното вещество се прилагат кожно, на няколко групи опитни животни, като за всяка група животни се използва само една доза. След това се наблюдават ефектите и смъртността, дължащи се на веществото. На животните, умрели по време на опита се прави аутопсия, също както и на преживелите до края на изследването.

#### 1.5. Критерии за качество

Няма.

#### 1.6. Описание на метода

##### 1.6.1. Подготовки

Животните се държат при характерните за експеримента условия на отглеждане и хранене най-малко пет дни преди началото му. Преди започване на изпитването млади, полово зрели и здрави животни се разпределят по произволен начин в различни експериментални групи. Приблизително 24 часа преди започване на изпитването космите от гръбната (дорзалната) част на тялото на животните се избръсват или остригват, като се избягва нараняване на кожата, което би променило пропускливостта ѝ. Повърхността, която трябва да бъде подготвена за прилагане на веществото трябва да бъде не по-малка от 10 % от телесната повърхност. Когато се изпитват твърди вещества, които при необходимост, могат да бъдат стрити на прах, изпитваното вещество трябва да бъде намокрено с вода или, при нужда, с подходящ разтворител, така че да бъде осигурен добър контакт с кожата. При използване на разтворител трябва да се вземе под внимание влиянието му върху проникването на веществото в кожата. Обикновено течните вещества се прилагат неразредени.

##### 1.6.2. Експериментални условия

###### 1.6.2.1. Опитни животни

Експериментът се провежда на полово зрели плъхове или зайци. Могат да бъдат използвани и други видове, но в този случай трябва да бъде обосновано използването им. Трябва да бъдат използвани обичайни лабораторни породи (линии). За всеки пол разликата в теллото между използваните за едно изпитване животни не трябва да превишава  $\pm 20\%$  от подходящата средна стойност.

###### 1.6.2.2. Брой и пол

За всяка доза се използват най-малко десет гризача (5 женски и 5 мъжки), имащи здрава и непокътната кожа. Женските животни не трябва да са раждали и да са бременни. Използването на по-малък брой животни може понякога да е основателно, особено когато става дума за зайци.

#### 1.6.2.3. Дози

Дозите трябва да бъдат достатъчно на брой, най-малко три, и да са подходящо разпределени във времето, така че да се получат групи, показващи набор от токсични ефекти и проценти на смъртност. При избора на дозите трябва да бъдат взети под внимание дразнещите или корозивните свойства на изпитваното вещество. Данните трябва да бъдат достатъчни за начертване на крива « дози/отговори » и, ако е възможно, да позволят достоверно определяне на ЛД<sub>50</sub>.

#### 1.6.2.4. Лимитиращо изпитване

Ако, по време на предварително изпитване, прилагането на дадено вещество, с доза равна или по-голяма от 2000 милиграма за килограм върху непокътната кожа на най-малко 5 животни от пол, не води до смъртност, дължаща се на веществото през 14 дни след приемане на дозата, може да се заключи, че е излишно продължаването на изпитването с други дози.

#### 1.6.2.5. Период на наблюдение

Периодът на наблюдение трябва да бъде най-малко 14 дни. Все пак, неговата продължителност не трябва да бъде твърдо фиксирана. Тя трябва да бъде определяна в зависимост от токсичните реакции, от скоростта им на поява и от продължителността на възстановителния период; следователно при необходимост периодът на наблюдение може да бъде удължен. Времето, за което се появяват и изчезват признаците на токсичност, както и времето на настъпване на смъртта са важни, особено когато има тенденция на по-късно настъпване на смъртта.

#### 1.6.3. Работен режим

Животните трябва да бъдат поставени в индивидуални клетки. Изпитваното вещество трябва да бъде прилагано по един и същи начин върху повърхност приблизително равна на 10 % от общата телесна повърхност. В случай на силно токсични вещества, третираната повърхност може да бъде по-малка, но изпитваното вещество трябва така да бъде приложено, че да образува възможно най-тънък и равномерен слой.

Изпитваните вещества трябва да бъдат държани в контакт с кожата в продължение на 24 часа посредством пропусклива марлена превръзка и недразнеща лепенка. Третираната част трябва, освен това, да бъде подходящо покрита, така че да бъдат държани на място марлената превръзка и изпитваното вещество и да се избегне поглъщането му от животните. Могат да бъдат използвани апарати за обездвижване за да се попречи на животните да погълнат изпитваното вещество, но не се препоръчва пълна имобилизация.

След края на прилагане на изпитваното вещество, то трябва да бъде отстранено, по възможност с вода или с друг метод на почистване на кожата.

Наблюденията трябва да бъдат систематично отбелязвани, по време на извършването им, като се съставя индивидуален лист за всяко животно. През първия ден животните трябва да бъдат наблюдавани често. Внимателен клиничен преглед



трябва да бъде провеждан най-малко един път в работен ден. Ежедневно трябва да бъдат извършвани други наблюдения и да бъдат вземани съответните мерки за намаляване на загубите на опитните животни, например, аутопсия или замразяване на намерените мъртви животни, както изолирането или умъртвяването на слабите или умиращи животни. Ежедневните наблюдения трябва да включват промените на козината, на третираната кожа, очите, лигавиците, дихателния апарат, кръвоносната система, вегетативната и централната нервни системи, както и двигателната активност и начина на поведение. Треморът, конвулсиите, слюноотделянето, диарииите, летаргията, сънят и комата трябва да бъдат наблюдавани с особено внимание. Времето на настъпване на смъртта трябва да бъде отбелязано с възможно най-голяма точност. На животните, умрели по време на експеримента и на преживелите след приключването му се прави аутопсия. Трябва да бъдат отбелязвани всички макроскопични патологични изменения. При необходимост трябва да бъдат вземани тъкани за хистопатологично изследване.

## **2. ДАННИ**

Данните трябва да бъдат обобщени в таблична форма, като за всяка опитна група се отразяват броят на животните в началото на изпитването, времето на смъртта за всяко животно, броят на животните, показващи други признаци на токсичност, описание на токсичните ефекти и резултатите от аутопсията.

Теглото на всяко животно трябва да бъде измерено и отбелязано малко преди прилагане на изпитваното вещество, след това един път седмично и при настъпване на смъртта. Когато животните преживяват повече от един ден, промените в теглото трябва да бъдат изчислени и регистрирани. ЛД<sub>50</sub> трябва да бъде определена чрез прилагане на признат метод.

Оценката на данните трябва да включва зависимостите, ако съществуват такива, между експозицията на животните на изследваното вещество и появата, както и тежестта на всички отклонения, включително промени в поведението и клинични отклонения, макроскопични увреждания, промени в телесното тегло, смъртност и всички други токсични ефекти.

## **3. РЕЗУЛТАТИ**

### **3.1. Протокол от изпитването**

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- вид, порода (линия), произход, условия на околната среда, хранителен режим, и др.,
- експериментални условия (включително метода за почистване на кожата),
- дози (с посочване на концентрациите и, на разтворителя, в случай на използването му),
- таблица с данните, отговор в зависимост от пол и доза (брой умиращи животни, брой животни, проявяващи признаци на токсичност, брой експонирани животни),
- време на настъпване на смъртта след прилагане на дозата,
- резултати от ежедневните наблюдения,

- стойност на  $LD_{50}$  за всеки пол, определена на четирнадесетия ден, с точно посочване на метода на изчисление,
- 95% доверителен интервал за  $LD_{50}$  (ако е възможно да бъде определен),
- крива « доза/смъртност » и наклон на кривата, ако изчислителният метод го позволява,
- резултати от аутопсията,
- хистопатологични констатации,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### **3.2. Оценка и интерпретация**

Виж общ увод към част Б (точка В).

### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Виж общ увод към част Б (точка Г).

## ЧАСТ Б.4. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ

### КОЖНО ДРАЗНЕНЕ

#### 1. МЕТОД

##### 1.1. Увод

Виж общ увод към част Б (точка А).

##### 1.2. Определение

Виж общ увод към част Б (точка Б).

##### 1.3. Сравнителни вещества

Няма.

##### 1.4. Принцип на метода

Изпитваното вещество се прилага в единична доза върху кожата на няколко опитни животни, като всяко едно от тях представлява своя собствена контрола. Степента на реакцията на дразнене се наблюдава и класифицира след определен интервал от време; тя трябва подробно да бъде описана за да се направи пълна оценка на ефектите. Периодът на наблюдение трябва да бъде достатъчно дълъг, за да може да се направи пълна оценка на обратимостта на наблюдаваните ефекти.

##### 1.5. Критерии за качество

Няма.

##### 1.6. Описание на метода

###### 1.6.1. Подготовки

Приблизително двадесет и четири часа преди изпитването космите от дорзалната област на тялото на животното се остригват или избръсват.

По време на стригането или бръсненето трябва да се внимава да не се одраска кожата. Използват се единствено животни със здрава и непокътната кожа.

Когато се изпитват твърди вещества (които, при необходимост, могат да бъдат пулверизирани), те трябва да бъдат овлажнени в достатъчна степен с вода или, при нужда, с подходящ разтворител, така че да бъде осигурен добър контакт с кожата. При използване на разтворител трябва да бъде отчетено влиянието му върху реакцията на кожно дразнене, причинена от изпитваното вещество. Обикновено течните вещества се прилагат неразредени.

Не е необходимо да бъдат подлагани на първичен тест за дразнене на кожата силно киселинните или алкални вещества, т.к. са предвидими корозивните им свойства. Не е необходимо да бъдат изпитвани веществата, които са показали силна токсичност по кожен път.

###### 1.6.2. Експериментални условия

###### 1.6.2.1. Опитни животни

Независимо, че могат да бъдат използвани различни видове бозайници, белият заек е предпочитаният вид.

#### 1.6.2.2. Брой животни

Използват се най-малко три полово зрели и здрави животни. Използването на по-голям брой животни може да се окаже необходимо за уточняване на нееднозначните реакции.

#### 1.6.2.3. Дози

Върху избраното място се прилага обем от 0,5 милилитра от дадено течено вещество или от 0,5 грама от дадено твърдо вещество, освен в случаите, когато има противопоказания. Не е необходимо предвиждането на контролна група животни. Съседните, нетретирани, участъци от кожата на всяко животно служат за контрола.

#### 1.6.2.4. Период на наблюдение

Продължителността на периода на наблюдение не трябва да бъде фиксирана твърдо, тя трябва да бъде достатъчно дълга за да се определи напълно обратимия или необратимия характер на наблюдаваните ефекти, но обикновено не трябва да превишава 14 дни.

#### 1.6.3. Работен режим

Животните трябва да бъдат поставени в индивидуални клетки. Изпитваното вещество трябва да бъде приложено върху малка повърхност от кожата (приблизително 6 квадратни сантиметра) и да бъде покрито с малко квадратно парче марля, прикрепено с недразнеща лепенка. При течности или някои пасти, може да се наложи изпитваното вещество първо да бъде намазано върху парчето марля, след което тя да бъде поставена върху кожата. През целия период на експозиция квадратното парче марля трябва да бъде поддържано в контакт с кожата с помощта на подходяща полуоклузивна превръзка. В някои случаи може да се наложи използването на оклузивна превръзка. Трябва да бъде предотвратен достъпът на животното до марлята и последващото поглъщане или вдишване на изпитваните вещества.

Продължителността на експозиция е 4 часа. Ако се предполага, че веществото ще доведе до тежка кожна реакция (например да е корозивно), продължителността на експозицията трябва да бъде намалена (например на 1 час или 3 минути).

Когато при период на експозиция по-малък от четири часа се наблюдава силна кожна реакция, не е необходимо повтаряне на експеримента за период на излагане от 4 часа. По-продължителни експозиции могат да бъдат определени при някои условия, например начини на използване и експозиция при човека. В края на експозиционния период, изпитваното вещество трябва да бъде отстранено, по възможност с вода или с подходящ разтворител като се внимава да не се променя съществуващият отговор и да не се нарушава цялостта на епидермиса.

##### 1.6.3.1. Наблюдение и класификация

Наблюдение за прояви на еритема или едем, както и тяхната класификация, трябва да бъдат извършени от 30 до 60 минути, след това 24, 48 и 72 часа след свалянето на превръзката. Реакциите на дразнене се класифицират и регистрират според скалата, посочена в таблицата от допълнението. За определяне на обратимостта на реакциите може да се наложат други наблюдения. Освен наблюденията за дразнене, е

необходимо да бъдат описани напълно всяко тежко увреждане, каквото е корозията (необратимо разрушаване на кожната тъкан) и всеки друг токсичен ефект.

## 2. ДАННИ

Данните трябва да бъдат обобщени под формата на таблици, показващи за всяко животно, класификациите за еритема и едем през целия период на наблюдение. Необходимо е да бъде отбелязано всяко тежко увреждане, интензивността и характерът на дразненето и корозията, обратимостта им, както и всеки друг наблюдаван токсичен ефект.

## 3. РЕЗУЛТАТИ

### 3.1. Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- вид, порода (линия), произход, околна среда, хранителен режим, и др.,
- експериментални условия (включително характерните физико-химични свойства на веществото, метод за подготовка и почистване на кожата),
- таблица с данните, отнасящи се до реакцията на дразнене при всяко животно през всички периоди на наблюдение (например 1, 24, 48 и 72 часа след махане на превръзката),
- описание на всяко наблюдавано тежко увреждане, включително корозия,
- описание на интензивността и характера на наблюдаваното дразнене и всяка хистопатологична констатация,
- описание на всеки токсичен ефект, различен от кожно дразнене,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### 3.2. Оценка и интерпретация

Виж общ увод към част Б (точка В).

## 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

Виж общ увод към част Б (точка Г).

*Допълнение*

### ТАБЛИЦА. КЛАСИФИКАЦИЯ НА КОЖНАТА РЕАКЦИЯ Образуване на еритема и ескара

	Стойност
Липса на еритема	0
Много лека еритема (едва забележима)	1
Добре изразена еритема	2
Умерена до тежка еритема	3

Тежка еритема (възмораво червен цвят) до слабо образуване на ескари 4  
(дълбоко увреждане)

**Образуване на едем**

Липса на едем 0

Много лек едем (едва забележим) 1

Лек едем (ограждане на зоната на оток, добре определено чрез ясно 2  
подуване)

Умерен едем (подуване около 1 mm) 3

Тежък едем (подуване над 1 mm, простиращо се извън мястото на 4  
експозиция)

## ЧАСТ Б.5. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ

### ОЧНО ДРАЗНЕНЕ

#### 1. МЕТОД

##### 1.1. Увод

Виж общ увод към част Б (точка А).

##### 1.2. Определение

Виж общ увод към част Б (точка Б).

##### 1.3. Сравнителни вещества

Няма.

##### 1.4. Принцип на метода

Изпитваното вещество се прилага в единична доза в едното око на всяко от опитните животни; нетретираното око се използва като контрола. Степента на дразнене се оценява и класифицира през определени интервали, след което се описва за да се получи пълна оценка на ефектите. Периодът на наблюдение трябва да бъде достатъчно дълъг за да може да се оцени напълно обратимостта на наблюдаваните ефекти.

##### 1.5. Критерии за качество

Няма.

##### 1.6. Описание на метода

###### 1.6.1. Подготовки

Двете очи на всяко, предварително избрано за изпитването, опитно животно, трябва да бъдат прегледани в срок от 24 часа преди началото на експеримента. Не трябва да бъдат използвани животни с очно дразнене, очни дефекти или вече съществуващо увреждане на роговицата.

Не е необходимо да бъдат подлагани на изпитване за очно дразнене силно киселинните или алкални вещества, които са показали ясна корозивна активност при изследване на кожно дразнене или при други изпитвания.

###### 1.6.2. Експериментални условия

###### 1.6.2.1. Опитни животни

Независимо, че се използват различни видове опитни животни, препоръчва се това изпитване да бъде извършвано върху здрави полово зрели бели зайци.

###### 1.6.2.2. Брой животни

Използват се минимум три животни. Използването на по-голям брой животни може да се окаже необходимо за уточняване на нееднозначните реакции.

###### 1.6.2.3. Дози

Ако изпитваното вещество е течност, използва се обем от 0,1 милилитра. При твърди вещества, пасти и частици, използваното количество трябва да бъде с обем

0,1 милилитра или да бъде с тегло приблизително 0,1 грама (теглото трябва винаги да бъде отбелязвано). Ако изпитваното вещество е твърдо или на гранули, то трябва да бъде стрито на фин прах. Обемът на частиците трябва да бъде измерен след леко уплътняване, например, чрез потупване на измерителния съд.

#### 1.6.2.4. Период на наблюдение

Продължителността на периода на наблюдение не трябва да бъде твърдо фиксирана. Тя трябва да бъде достатъчно дълга за да се оцени обратимия или необратимия характер на наблюдаваните ефекти и обикновено не трябва да превишава 21 дни, броени след вливането.

#### 1.6.3. Работен режим

Животните трябва да бъдат поставени в индивидуални клетки. Изпитваното вещество трябва да бъде поставено в конюнктивалния сак на едното от очите на всяко животно, след като внимателно се отдели долния клепач от очната ябълка. След това клепачите се съединяват, за около секунда, за да не изтече изпитваното вещество. Другото око не се третира и служи за контрола.

Очите на опитните животни не трябва да бъдат промивани в продължение на 24 часа след вливане на изпитваното вещество. Ако е необходимо промивка може да бъде направена на двадесет и четвъртия час. За веществата, чийто дразнещ характер е показан чрез това изпитване, може да се изследва значението на промиването на окото като средство за намаляване на дразнещия ефект или на други вредни ефекти. В този случай се препоръчва използването на шест заека. При три от тях промиването се извършва четири секунди след вливане на изпитваното вещество и при другите три заека, 30 секунди по-късно. При двете групи изплакването продължава 5 минути и се извършва при използване на обем и скорост на струята, които няма да причинят увреждания на окото.

##### 1.6.3.1. Наблюдения и класификация

Очите трябва да бъдат прегледани след 1, 24, 48 и 72 часа. Ако след 72 часа не се наблюдава дразнене, изпитването може да бъде прекратено.

По-продължително наблюдение може да се наложи, ако има персистиращо увреждане на роговицата или друго очно дразнене с цел да се определи прогресирането на уврежданията и тяхната обратимост или необратимост. Освен наблюденията на роговицата, ириса и конюнктивата, трябва да бъдат регистрирани и описани всички други наблюдавани увреждания. Класификацията на очната реакция (виж таблицата) трябва да бъде записвана при всеки преглед. Класификацията на очните реакции може да бъде интерпретирано по различни начини. В помощ на изследователските лаборатории и персонала, натоварен с извършването и интерпретацията на наблюденията, може да се използва илюстрирано ръководство за очно дразнене.

Изследването на реакциите може да бъде улеснено чрез използване на бинокулярна лупа, лампа, биомикроскоп или всеки друг подходящ апарат. След записване на наблюденията, извършени през двадесет и четвъртия час, очите на някои или на всички зайци могат да бъдат прегледани допълнително с флуоресцин.

## 2. ДАННИ



Данните трябва да бъдат обобщени под формата на таблици, показващи за всяко животно, симптомите на дразнене за посоченото време на наблюдение, описание на степента и характера на дразненето, наличието на тежки увреждания и всеки наблюдаван ефект, различен от очния.

### 3. РЕЗУЛТАТИ

#### 3.1. Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- данни за животните (вид, порода (линия), произход, околна среда, хранителен режим, и др.),
- експериментални условия (включително характерните физико-химични свойства на изпитваното вещество),
- таблица с данните за дразнещи/корозивни ефекти, отнасящи се до всяко животно за всеки период на наблюдение (например 1, 24, 48 и 72 часа),
- описание на всяко наблюдавано тежко увреждане,
- описание на степента и характера на наблюдаваното дразнене или корозия, включително обратимостта им,
- описание на използвания метод за оценяване на дразненето след 1, 24, 48 и 72 часа (например, ръчна лампа с визьор, биомикроскоп, флуоресцин),
- описание на всеки наблюдаван неочен локален ефект,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

#### 3.2. Оценка и интерпретация

Виж общ увод към част Б (точка В).

### 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

Виж общ увод към част Б (точка Г).

#### *Допълнение*

#### **ТАБЛИЦА. КЛАСИФИКАЦИЯ НА ОЧНИ УВРЕЖДЕНИЯ**

##### **Роговица**

*Потъмняване: степен на плътност* (наблюденията се отнасят до най-плътните зони)

Липса на улцерация или потъмняване 0

Разпръснати или дифузни зони на потъмняване (различни от лекото притъпяване на нормалния блясък), при ясно видими подробности на ириса 1

Лесно различима полупрозрачна зона, при леко замъглени подробности на 2 ириса

Зона със седефен цвят, не се различават подробностите на ириса, големината 3 на зеницата е трудно различима

Помътнена роговица, ирисът не се различава през помътняването 4

### **Ирис**

Нормален 0

Чувствително увеличени гънки, конгестия, умерена околокорнеална хиперемия или конюнктивна инекция, всеки от тези признаци или комбинация от тях, ирис все още реагиращ на светлина (вялата реакция е положителна) 1

Липса на реакция на светлина, кръвоизлив, явно разрушение (всеки един от тези признаци или всичките) 2

### **Конюнктива**

*Зачервяване (прилага се при палпебралната и окулярна конюнктива, при роговицата и при ириса)*

Нормални кръвоносни съдове 0

Определена хиперемия на някои кръвоносни съдове (инекция на очите) 1

Дифузно пурпурно оцветяване, отделните кръвоносни съдове са трудно разграничими 2

Дифузно тъмно червено оцветяване 3

*Хемозис: клепачи и/или мигателни мембрани*

Липса на едем 0

Лек едем (включително и мигателните мембрани) 1

Явен едем с частично обръщане на клепачите 2

Едем с полузатворени клепачи 3

Едем с повече от наполовина затворени клепачи 4

## **Б.6. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ**

### **КОЖНА СЕНЗИБИЛИЗАЦИЯ**

#### **1. МЕТОД**

##### **1.1. Увод**

Виж Общ увод към част Б (точка А).

##### **1.2. Определение**

Виж Общ увод към част Б (точка Б).

##### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

##### **1.4. Принцип на метода/максимизиращ метод при морски свинчета**

След първоначална експозиция на изпитваното вещество (период на индукция), животните се подлагат, 2 седмици след последната индукционна експозиция, на “разрешаваща експозиция”, извършена със същото вещество, с цел да се установи дали е било предизвикано състояние на свръхчувствителност. Сензибилизацията се определя чрез изследване на кожната реакция, получена след разрешаващата експозиция.

##### **1.5. Критерии за качество**

Няма.

##### **1.6. Описание на метода**

###### *1.6.1. Подготовки*

Здрави млади животни (на възраст под 1 година) се разпределят по произволен начин в третирани и контролни групи. Преди третиране с даденото вещество козината на животните се избръсва или остригва в раменната област, като се избягва одраскване на кожата.

###### *1.6.2. Експериментални условия*

###### *1.6.2.1. Опитни животни*

Използват се бели морски свинчета.

###### *1.6.2.2. Брой и пол*

Могат да бъдат използвани мъжки или женски животни. При използване на женски животни те не трябва да са раждали и да са бременни. За третираната група се използват 20 животни, а за контролната група – не по-малко от 10. Използването на по-малък брой животни трябва да бъде обосновано.

###### *1.6.2.3. Доза*

Концентрацията на изпитваното вещество се определя в зависимост от максималната концентрация, която може да бъде понасяна отлично от животните във всяка фаза на индукция.

Разрешаващата доза не трябва да предизвиква никакво кожно дразнене при несензибилизираните животни. Тези дози могат да бъдат определени с помощта на предварително изследване с по-малък брой (2 или 3) животни.

#### 1.6.2.4. Период на наблюдение

През периода на индукция кожата се наблюдава с цел проверка за евентуални токсични ефекти. След разрешаващата експозиция, кожните реакции се отчитат след 48 и 72 часа.

#### 1.6.3. Работен режим

Животните се претеглят в началото (преди фазата на индукция) и в края на изпитването. Космите в раменната област се избръсват. Процедурата се състои от два етапа.

##### 1.6.3.1. Индукция

Ден 0 – третирана група

Правят се следните интрадермални инжекции, по двойки, в раменната област, така че по една инжекция от всяка двойка се поставя от едната и от другата страна на медианната линия:

1. 0,1 милилитър (ml) Пълен Адювант на Фройнд (ПАФ);
2. 0,1 милилитър (ml) от изпитваното вещество, при необходимост в разтворител;
3. 0,1 милилитър (ml) от изпитваното вещество в Пълен Адювант на Фройнд (ПАФ).

Инжекции 1 и 2 се правят близко една до друга и възможно най-близко до главата, докато инжекция 3 се поставя в каудалната част на изпитваната повърхност.

Ден 0 – контролна група

Правят се следните интрадермални инжекции, по двойки, на същите места като описаните по-горе:

1. 0,1 милилитър Пълен Адювант на Фройнд (ПАФ) ;
2. 0,1 милилитър чист разтворител;
3. 0,1 милилитър разтворител в Пълен Адювант на Фройнд (ПАФ).

Седми ден – третирана група

Космите от изпитваната зона отново се избръсват. Изпитваното вещество с помощта на подходящ разтворител (течните вещества, ако са подходящи, могат да се прилагат директно) се нанася върху филтърна хартия, поставя се върху изпитваната повърхност и в продължение на 48 часа се поддържа в контакт с кожата чрез подходяща превръзка.

Седми ден – контролна група

Космите от изпитваната зона отново се избръсват. По гореописания начин върху повърхността се прилага само разтворителят и в продължение на 48 часа се поддържа в контакт с кожата чрез подходяща превръзка.

##### 1.6.3.2. Разрешаваща експозиция

Двадесет и първи ден

Избръсват се космите от слабините на третираните и контролните животни. Превръзка, съдържаща изпитваното вещество се прилага върху левия хълбок на третираните животни, докато превръзка, съдържаща само разтворителя се прилага на десния хълбок. Превръзките се държат в контакт с кожата в продължение на 24 часа.

Контролната група се третира по идентичен начин.

Двадесет и трети и двадесет и четвърти ден

21 часа след сваляне на превръзката, изпитваната повърхност се изчиства и, ако е необходимо, се избръсва.

3 часа по-късно (или 48 часа след началото на разрешаващата експозиция), се наблюдава и регистрира кожната реакция.

24 часа след това наблюдение, се извършва второ наблюдение (72 часа), което се регистрира.

За изясняване на резултатите, получени при първата разрешаваща експозиция, втора разрешаваща експозиция, ако е необходимо с нова контролна група за разтворителя, трябва да бъде предвидена около седмица след първото изпитване.

#### 1.6.3.3. Наблюдение и отчитане

Всички кожни реакции и необичайни прояви, по време на фазите на индукция и разрешаваща експозиция трябва да бъдат регистрирани и записани в протокола.

## 2. ДАННИ

Данните трябва да бъдат обобщени в таблица, показваща за всяко животно, отчетените кожни реакции при всяко наблюдение.

## 3. РЕЗУЛТАТИ

### 3.1. Протокол

Протоколът трябва да съдържа следната информация:

- порода (линия) на използваните морски свинчета,
- експериментални условия,
- брой, възраст и пол на животните,
- тегло на всяко животно в началото и в края на изпитването,
- всяко отделно наблюдение, включително квалификационната система, ако е използвана такава,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### 3.2. Оценка и интерпретация

Виж Общ увод към част Б (точка В).

## 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

Виж Общ увод към част Б (точка Г).

### *Забележки*

Максимизиращият тест на морски свинчета (МТМС (GPMT)) е широко използван метод от Адювантен тип. Въпреки, че и други методи, посочени в допълнението,

могат да бъдат използвани за определяне на кожносензибилизационния потенциал на дадено вещество, МТМС се приема за предпочитан метод. Чувствителността на този метод и възможността му за разкриване на потенциалните кожни сензибилизатори за хора, се считат за много важни за определяне на класификационна система за токсичност, приложима за общественото здраве. Изборът на всеки друг метод трябва да бъде определян от критерии, гарантиращи валидността му. Такива критерии са предвидима реакция към типични алергени като 2,4-динитрохлорбензол или р-фенилендиамин, или който и да е друг потенциален сензибилизатор, избран в зависимост от вида на изпитваното вещество.

Не съществува един-единствен метод на изпитване, който адекватно да идентифицира всички вещества, притежаващи потенциал на сензибилизация на човешката кожа и който да е приложим за всички вещества.

При избор на метод на изпитване трябва да бъдат вземани предвид фактори като физичните характеристики на даденото вещество, включително способността му да прониква през кожата, и начинът му за контакт с хората, които могат да бъдат експонирани. Изпитванията, с използване на морски свинчета могат да бъдат подразделени на изпитвания от Адювантен тип (при които за засилване на алергенната активност веществото се разтваря или суспендира в Адювант на Фройнд) и изпитвания без използване на Адювант на Фройнд. В някои случаи може да има достатъчни основания за избор на изпитване, включващо локална кожна апликация, вместо интрадермалното инжектиране, прилагано в максимизиращия тест на морски свинчета. В тези случаи трябва отново да се вземат предвид физичните характеристики на изпитваното вещество и условията на възможна човешка експозиция.

Независимо от прилагания метод, чувствителността на породата морски свинчета, използвана при изпитване за кожна сензибилизация, трябва да бъде проверявана през равни интервали (6 месеца) с помощта на известни силни и умерени сензибилизатори, водещи до задоволителен брой положителни реакции.

*Допълнение*

Опит	Дрез (Draize)	Пълен Адювент на Фройнд (ПАФ)	Оптимизация на Мауер (Mauer)	Бюлер (Buehler)	Епикутанен опит на въздух	Адювент на части
<i>Вид</i>	Морско свинче	Морско свинче	Морско свинче	Морско свинче	Морско свинче	Морско свинче
<i>Начин на прилагане</i>	интрадермален (ид)	интрадермален (ид)	интрадермален (ид)	епикутанен (ек)	епикутанен (ек)	ид и ек
<i>Брой животни в опитна група</i>	20	8 - 10	10 - 10	10 - 20	6 - 8	10 - 20
<i>Брой опитни групи</i>	1	1	1	1	1 до 6	1
<i>Брой животни в контролна група</i>	20	8 - 10	10 - 10	10 - 20	6 - 8	10 - 20
<i>Индукционна експозиция- начин на прилагане</i>	ид	ид	ид	дермален	дермален	ид и дермален
<i>Брой експозиции</i>	10	5	9	3	20 или 21	4
<i>Период на експозиция</i>	-	-	24 часа	6 часа всеки път	непрекъснато	48 часа всеки път
<i>Вид превръзка</i>	-	-	-	затворена	на въздух	затворена
<i>Експериментална група</i>	ИВ <sup>(1)</sup>	ИВ в ПАФ	ИВ в ПАФ	ИВ	ИВ	ИВ
<i>Контролна група</i>	няма	само ПАФ	няма	няма	само разтворител (р)	няма
<i>Изпитвана зона</i>	лява слабина	дясна слабина	гръб	лява слабина	дясна слабина	рамо
<i>Честота</i>	На всеки 2 дни	На всеки 2 дни	На всеки 2 дни	На всеки 7 дни	ежедневно	0, 2, 4, 7 ден
<i>Продължителност</i>	0 - 18 дни	0 - 8 дни	0 - 21 дни	0 - 14 дни	0 - 20 дни	0 - 7 дни
<i>Концентрация</i>	2 - 10 два пъти по-голяма от първата	една и съща навсякъде	0,1 ml от 0,1 %	една и съща навсякъде	една и съща вътре във всяка група, различна за отделните групи	една и съща навсякъде
<i>Разрешаваща експозиция- начин на прилагане</i>	ид	дермален	ид	дермален	дермален	дермален
<i>Брой експозиции</i>	1	2	2	1	2	1

Дни	35	22 и 35	14 и 28	28	21 и 35	20
Период експозиция	на -	-	24 часа	6 часа	-	24 часа
Вид превръзка	-	на въздух	-	затворена	на въздух	затворена
Експеримантална група	ИВ	ИВ	ИВ	ИВ	ИВ	ИВ
Контролна група	ИВ	ИВ	ИВ	ИВ	ИВ	ИВ
Изпитвана повърхност	дясна слабина	лява слабина	гръб, нова зона	дясна слабина	лява слабина	рамо
Концентрация	като първата	4 различни	0,1 мл от 0,1 %	същата като при индукцията	4 различни	половината на тази, използвана при индукцията
Оценка (брой часова след разрешаваща експозиция)	24, 48	24, 48, 72	24	24,48	24, 48 и/или 72	24, 48

(<sup>1</sup>) ИВ – изпитвано вещество.



## **Б.7. СУБОСТРА ТОКСИЧНОСТ - ОРАЛНО ПРИЛАГАНЕ**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Виж общ увод към част Б (точка А).

#### **1.2. Определение**

Виж общ увод към част Б (точка Б).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

#### **1.4. Принцип на метода на изпитване**

Нарастващи дози от изпитваното вещество се прилагат ежедневно, по орален път, на няколко групи опитни животни, като за всяка група се прилага по една доза в продължение на 28 дни. По време на третирането животните се наблюдават ежедневно за разкриване на токсичните ефекти. На животните, умрели по време на изпитването, както и на преживелите в края на експеримента се прави аутопсия.

#### **1.5. Критерии за качество**

Няма.

#### **1.6. Описание на метода на изпитване**

##### *1.6.1. Подготовки*

Животните се държат при характерните за експеримента условия на отглеждане и хранене най-малко пет дни преди началото му. Преди започване на изпитването младите здрави животни се разпределят по произволен начин в различни експериментални групи. Изпитваните вещества могат да бъдат приложени с храната, чрез сонда, под формата на капсули или с водата за пиене. Дозите трябва да бъдат прилагани на животните по един и същи начин през цялото време на експеримента. Ако, за улесняване на приемането, се използва разтворител или други добавки, те трябва да са признати за нетоксични. Публикуваните данни могат при необходимост да бъдат използвани.

##### *1.6.2. Експериментални условия*

###### **1.6.2.1. Опитни животни**

Плъхът е предпочитаният вид, освен ако няма противопоказания.

Трябва да бъдат използвани млади, здрави животни от обичайна лабораторна порода (линия); в идеалния случай даденото вещество трябва да бъде приложено преди плъховете да навършат 6 седмична възраст; те не трябва в никакъв случай да бъдат по-възрастни от 8 седмици. В началото на експеримента, разликата в теглото между използваните животни не трябва да превишава  $\pm 20\%$  от средната стойност за групата.

###### **1.6.2.2. Брой и пол**

За всяка доза се използват най-малко десет животни (5 женски и 5 мъжки). Женските животни не трябва да са раждали и да са бременни. Ако е предвидено убиването на животни по време на експеримента, то броят на животните в началото

на опита трябва да бъде увеличен със съответния брой планирани за убиване животни. Освен това, сателитна група от 10 животни (по пет от пол) може да бъде третирана с най-високата доза в продължение на 28 дни и да се наблюдава за обратимост, персистиране или късна поява на токсични ефекти в продължение на 14 дена след третирането.

#### 1.6.2.3. Дози

Използват се най-малко 3 дози и една контрола. Животните от контролната група трябва да бъдат третирани по идентичен начин на тези от експерименталните групи, но без изпитвано вещество. Ако за улеснение на приемането се използва разтворител, той се прилага на контролните животни по същия начин както на третираните и получения обем трябва да съответства на този, приложен на третираната с най-силна доза група. Най-високата доза трябва да предизвиква токсични ефекти, които не водят (или рядко водят) до смърт. Най-ниската доза не трябва да предизвиква никакъв токсичен ефект. Когато се разполага с данни, отнасящи се до експозицията на човека, най-ниската доза трябва да бъде по-висока от тази стойност. В идеалния случай, средната доза трябва да предизвиква минимални забележими токсични ефекти. При използване на повече междинни дози, те трябва да бъдат достатъчно раздалечени за да се получи градация на токсичните ефекти. В групите с прилагане на слаби и междинни дози, както и в контролната група, смъртните случаи трябва да бъдат малко за да позволят добра оценка на резултатите.

Когато изпитваното вещество се въвежда с храната, се използва или постоянна хранителна концентрация (ppm или мг/кг храна) или постоянна доза в зависимост от телесното тегло на животните; трябва да бъде уточнен използваният метод. В случая на вещество, въвеждано със сонда, дозите трябва да бъдат прилагани ежедневно по едно и също време. Дозите трябва да бъдат регулирани (ежеседмично или на всеки две седмици) с цел запазване на постоянно ниво на дозата спрямо телесното тегло на съответното животно.

#### 1.6.2.4. Лимитиращо изпитване

Ако даден 28 дневен експеримент, извършен по описания по-горе метод, при доза 1000 милиграма на килограм (мг/кг) телесно тегло дневно или при по-висока доза, в зависимост от възможната човешка експозиция (когато е известна) не показва никакъв токсичен ефект, по-нататъшните тестове се считат за излишни. При веществата с ниска токсичност, приложени с хранителния режим, е важно да се гарантира, че тяхното количество или свойства не пречат на нормалните хранителни изисквания.

#### 1.6.2.5. Период на наблюдение

Всички животни трябва да бъдат наблюдавани ежедневно; токсичните признаци, както и момента на тяхната поява, тяхната интензивност и продължителност трябва да бъдат записвани. Времето на настъпване на смъртта и времето, когато токсичните признаци се появяват или изчезват трябва да бъдат отбелязвани.

#### 1.6.3. Работен режим

В идеалния случай дозите от изпитваните вещества се прилагат на животните седем дни седмично, в продължение на 28 дни. Животните от сателитните групи, предвидени за допълнителни наблюдения, трябва да бъдат държани без третиране

още 14 дни за да се види проследи оздравяването или персистирането на токсичните ефекти.

Ежедневното наблюдение трябва да включва промените на кожата и козината, очите, лигавиците, дихателния апарат, кръвоносната система, периферната и централната нервна системи, както и двигателната активност и начина на поведение. Хранителната консумация (както и консумацията на вода, когато изпитваното вещество се прилага с водата за пиене), както и теглото на животните трябва да бъдат определяни всяка седмица.

Животните трябва редовно да се наблюдават и да се внимава, в рамките на възможното, да не се губят за експеримента поради канибализъм, аутолиза на тъканите или грешка при поставянето. На всички преживели животни от третираните, не сателитни, групи се прави аутопсия. Умиращите животни веднага се изваждат и им се прави аутопсия.

Следните анализи трябва да бъдат извършвани в края на периода на изпитване върху всички животни (включително и контролните):

1. хематологичен преглед, включващ минимум хематокрит, концентрация на хемоглобин, преброяване на еритроцитите, пълно и диференциално преброяване на левкоцитите, както и изследване на кръвосъсирването;
2. клинична биохимия на кръвта, включваща минимум един параметър, характеризиращ бъбречната и чернодробната функции: серумна аланинаминотрансфераза (преди известна под името глутаматпируваттрансаминаза) и серумна аспартатаминотрансфераза (преди известна под името глутаматоксалацетаттрансаминаза), азот на уреята, албумин, кръвен креатинин, общ билирубин и общ серумен белтък.

При необходимост за адекватна токсикологична оценка могат да бъдат проведени и други определяния, включващи калций, фосфор, хлориди, натрий, калий, глюкоза, липиди, хормони, киселинно-алкален баланс, метхемоглобин и холинестеразна активност.

Други биохимични клинични анализи могат да бъдат извършени, ако е необходимо, за задълбочаване на изследването на наблюдаваните ефекти.

#### 1.6.3.1. Аутопсия

На всички животни, подложени на изпитването трябва да бъде направена пълна аутопсия. Черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези и тестисите трябва да бъдат претеглени във влажно състояние, възможно най-бързо след дисекцията, за да се избегне изсъхването. Черният дроб, бъбреците, далака, надбъбречните жлези и сърцето, както и всеки друг орган с макроскопични увреждания или промени в обема, трябва да бъде запазен в подходяща среда за евентуални по-нататъшни хистопатологични изследвания.

#### 1.6.3.2. Хистопатологично изследване

Хистологично изследване се провежда върху запазени органи и тъкани на животните от контролната група и опитната група, третирана с най-високата доза.

Органите и тъканите, притежаващи увреждания, провокирани от действието на най-високата доза от изпитваното вещество, трябва да бъдат изследвани във всички групи, изложени на по-ниски дози. Животните от всяка сателитна група трябва да бъдат подложени на хистологично изследване, насочено най-вече към органите и тъканите, за които са констатирани увреждания при другите третирани групи.

## **2. ДАННИ**

Данните трябва да бъдат обобщени в таблична форма, отразяваща за всяка опитна серия, брой животни в началото на изпитването и брой животни показващи всеки определен вид увреждане.

Всички наблюдавани резултати трябва да бъдат обработени с подходящ статистически метод. Може да бъде използван всеки признат статистически метод.

## **3. РЕЗУЛТАТИ**

### **3.1. Протокол от изпитването**

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- вид, порода (линия), произход, околна среда, хранителен режим, и др.,
- експериментални условия,
- дози (включително разтворител, ако е използван) и концентрации,
- токсична реакция според пол и доза,
- ако е възможно, ниво при което няма никакъв ефект,
- време на настъпване на смъртта по време на изпитването или посочване че животните са преживели след експеримента,
- токсични или други ефекти,
- време на наблюдаване на всеки необичаен признак и последващото му развитие,
- количества храна и телесно тегло,
- извършени хематологични изследвания и пълните резултати,
- извършени биохимични клинични изследвания и пълните резултати,
- резултати от аутопсията,
- подробно описание на всички хистопатологични изследвания,
- статистическа обработка на резултатите, когато е възможно,
- хистопатологични констатации,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### **3.2. Оценка и интерпретация**

Виж общ увод към част Б (точка В).

## **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Виж общ увод към част Б (точка Г).

## **Б.8. СУБОСТРА ТОКСИЧНОСТ - ИНХАЛАЦИОННО ПРИЛАГАНЕ**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Виж общ увод към част Б (точка А).

#### **1.2. Определение**

Виж общ увод към част Б (точка Б).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

#### **1.4. Принцип на метода на изпитване**

Дози от изпитваното вещество, с нарастващи концентрации, се прилагат ежедневно, за определен период от време, на няколко групи опитни животни, като за всяка група животни се прилага само една концентрация в продължение на 28 дни. При използване на разтворител с цел получаване на подходяща концентрация на изпитваното вещество в атмосферата, трябва да бъде предвидена контролна група за този разтворител. По време на периода на прилагане животните се наблюдават ежедневно за откриване на признаци на токсичност. На животните, умрели по време на експеримента, както и на преживелите след приключването му, се прави аутопсия.

#### **1.5. Критерии за качество**

Няма.

#### **1.6. Описание на метода на изпитване**

##### *1.6.1. Подготовки*

Животните се държат при характерните за експеримента условия на отглеждане и хранене най-малко пет дни преди началото му. Преди започване на изпитването младите здрави животни се разпределят по произволен начин в необходимия брой групи. При нужда, към изпитваното вещество може да бъде добавен подходящ разтворител с цел получаване на подходяща концентрация в атмосферата. Ако за улесняване на дозирането се използва разтворител или други добавки, те трябва да са признати за нетоксични. При нужда могат да бъдат използвани публикувани данни.

##### *1.6.2. Експериментални условия*

###### **1.6.2.1. Опитни животни**

Плъхът е предпочитаният вид, освен ако няма противопоказания.

Трябва да бъдат използвани млади, здрави животни от обичайните лабораторни породи (линии). В началото на експеримента, разликата в теглото между използваните животни не трябва да превишава  $\pm 20\%$  от подходящата средна стойност.

###### **1.6.2.2. Брой и пол**

За всяка експериментална група се използват най-малко десет животни (5 женски и 5 мъжки). Женските животни не трябва да са раждали и да са бременни. Ако е

предвидено да се убиват животни по време на експеримента, броят на животните в началото на изпитването трябва да бъде увеличен с броя на животните, планирани за убиване. Допълнително, сателитна група от 10 животни (по 5 животни от пол) може да бъде третирана с най-високата доза в продължение на 28 дни и да бъде наблюдавана за обратимост, персистиране или късна поява на токсични ефекти в продължение на 14 дена след третирането.

#### 1.6.2.3. Експозиционни концентрации

Необходими са най-малко три концентрации и една контролна група или, в случай на нужда, контролна група за разтворителя (отговаряща на концентрацията на разтворителя при най-високо ниво на експозиция). Животните от контролната група трябва да бъдат третирани по идентичен начин на тези от експерименталната група, но без вдишване на изпитваното вещество. Най-високата доза трябва да предизвиква токсични ефекти, не водещи (или рядко) до смърт. Най-ниската доза не трябва да предизвиква никакъв токсичен ефект. Когато се разполага с данни, отнасящи се до експозицията на човека, най-ниската доза трябва да е по-висока от тази стойност. В идеалния случай междинната концентрация трябва да предизвиква минимални забележими токсични ефекти. При използване на повече междинни концентрации, те трябва да бъдат достатъчно раздалечени за да се получи градация на токсичните ефекти. В групите с прилагане на ниски и междинни концентрации, както и в контролните групи, смъртните случаи трябва да бъдат малко, което да позволи добра оценка на резултатите.

#### 1.6.2.4. Период на експозиция

Ежедневната експозиция трябва да бъде 6 часа, но за отговаряне на някои специфични изисквания може да се наложи използване и на други продължителности.

#### 1.6.2.5. Оборудване

Животните трябва да бъдат експонирани на действието на веществото с помощта на инхалационно устройство, предназначено да осигурява непрекъснат въздушен поток и най-малко 12 смени на въздуха за час, с подходящо съдържание на кислород и хомогенно разпределение на изпитвания продукт във въздуха. При използване на камера, тя трябва да бъде така конструирана, че да се избягва доколкото е възможно, струпването на опитните животни и да се осигури максималната им експозиция, чрез инхалация, на изпитваното вещество. Като общо правило, за да се осигури стабилност на атмосферата в дадена камера, общият "обем" на опитните животни не трябва да превишава 5 % от обема на камерата за изпитване. Може също да бъде използвана орално-назална система на експозиция, само на главата или на цялото тяло, в индивидуална камера; първите два типа на експозиция позволяват да бъде намален приема на изпитваното вещество по други пътища.

#### 1.6.2.6. Период на наблюдение

Опитните животни трябва да бъдат наблюдавани ежедневно, за откриване на признаци на токсичност, по време на целия период на третиране и на възстановителния период. Времето на настъпване на смъртта, както и времето на поява или изчезване на признаците на токсичност трябва да бъдат отбелязвани.

#### 1.6.3. Работен режим

Животните се експонират на изпитваното вещество ежедневно от пет до седем дни в седмицата, за период от 28 дни. Животните от всяка сателитна група, предвидена за

допълнителни наблюдения, трябва да бъдат държани без третиране още 14 дни, за да се проследи оздравяването или персистирането на токсичните ефекти. Температурата, при която се провежда изпитването, трябва да бъде поддържана на  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . При оптимални условия относителната влажност трябва да бъде между 30 и 70 %, но, в някои случаи, това може да се окаже невъзможно (например, изпитване на аерозоли). По време на експозицията на животните не се дават храна и вода.

Трябва да бъде използвана динамична инхалационна система, оборудвана с подходящо устройство за аналитичен контрол на концентрацията.

За определяне на подходящите експозиционни концентрации, се препоръчва извършването на предварително изпитване. Скоростта на въздушния поток трябва да бъде регулирана така, че да осигурява хомогенни условия в цялата експозиционна камера. Системата трябва да осигурява възможно най-бързото постигане на стабилни условия на експозиция.

Трябва да бъдат извършвани измервания или контрол на следните параметри:

- а) скорост на въздушния поток (непрекъснато);
- б) реална концентрация на изпитваното вещество в зоната на дишане. През периода на ежедневна експозиция, концентрацията не трябва да се променя с повече от 15 % спрямо средната стойност. Все пак в случаите на прахове или аерозоли, това ниво на контрол може да не се достигне и тогава е допустимо по-голямо отклонение. По време на целия експеримент, ежедневните концентрации трябва да се запазват колкото е възможно по-постоянни. Определя се разпределението на размера на частиците и/или аерозола толкова често, колкото е необходимо за оценяване на стабилността на му.
- в) температура и влажност;
- г) по време и след експозицията се извършват наблюдения, които систематично се регистрират; запазват се индивидуални данни за всяко животно. Всички животни трябва ежедневно да бъдат преглеждани и да се регистрират признаците на токсичност, времето на тяхната поява, интензивност и продължителност. Ежедневните наблюдения трябва да включват промените на кожата и козината, очите и лигавиците, дихателния апарат, кръвоносната система, периферната и централната нервна системи, както и двигателната активност и начина на поведение. Теглото на животните трябва да бъде измервано всяка седмица. Препоръчва се ежеседмично определяне на хранителната консумация. Животните трябва редовно да бъдат наблюдавани и да се внимава, в рамките на възможното, да не се губят за експеримента поради канибализъм, автолиза на тъканите или грешка при поставянето. На всички преживели животни от третираните, не сателитни, групи се прави аутопсия. Умиращите животни трябва веднага да бъдат изваждани и да им се направи аутопсия.

В края на изпитването на всички животни (включително и контролните) се провеждат следните изследвания:

- i) хематологичен анализ, включващ минимум хематокрит, концентрация на хемоглобин, преброяване на еритроцити, пълно и диференциално преброяване на левкоцити, както и изследване на кръвосъсирването;
- ii) клинична биохимия на кръвта, включваща минимум един параметър, характеризиращ бъбречната и чернодробната функции: серумна аланинаминотрансфераза (преди известна под името глутаматпируваттрансаминаза), серумна аспартатаминотрансфераза

(преди известна под името глутаматоксалацетаттрансминаза), азот на уреята, албумин, кръвен креатинин, общ билирубин и общ белтък. При необходимост за адекватна токсикологична оценка могат да бъдат проведени и други определяния, включващи калций, фосфор, хлориди, натрий, калий, глюкоза, липиди, хормони, киселинно-алкален баланс, метхемоглобин, холинестеразна активност и др. Други биохимични клинични анализи могат, ако е необходимо, да бъдат извършени за задълбочаване на изследването на наблюдаваните ефекти.

#### 1.6.3.1. Аутопсия

На всички опитни животни трябва да бъде направена пълна аутопсия. Черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези и тестисите трябва да бъдат претеглени във влажно състояние, възможно най-бързо след дисекцията за да се избегне изсъхването им. Органите и тъканите трябва да бъдат съхранени в подходяща среда, позволяваща евентуални бъдещи хистопатологични изследвания: дихателните пътища, черният дроб, бъбреците, далака, надбъбречните жлези и сърцето, както и всички други органи с макроскопични увреждания или промени в обема. Ринофаринкса и белите дробове трябва да бъдат извадени цели, претеглени и обработени с подходящ фиксатор, позволяващ запазването на белодробната структура. Допълнително бавно инжектиране на фиксатор се счита за ефикасен метод.

#### 1.6.3.2. Хистопатологично изследване

Хистологично изследване трябва да бъде извършено върху запазените органи и тъкани на животни от опитната група, експонирана на най-високата доза и на животни от контролната(ите) група(и). Органите и тъканите, при които се установяват увреждания, дължащи се на изпитваното вещество в случай на най-висока концентрация, трябва да бъдат изследвани във всички групи, експонирани на по-ниски концентрации. Животните от всички сателитни групи трябва да бъдат изследвани хистологично, като се обръща внимание най-вече на органите и тъканите, за които са констатирани увреждания при другите третиранни групи.

## 2. ДАННИ

Данните трябва да бъдат обобщени в таблица, показваща за всяка опитна група, броят на животните в началото на изпитването и броят на животните с всеки отделен вид увреждане.

Всички наблюдавани резултати трябва да бъдат обработени с подходящ статистически метод. Могат да бъдат използвани всички признати статистически методи.

## 3. РЕЗУЛТАТИ

### 3.1. Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- вид, порода (линия), произход, околна среда, хранителен режим, и др.,
- експериментални условия:



описание на устройството за експозиция, включително вид, тип, размери, източник на въздухоподаване, система за генериране на частици и аерозоли, метод за климатизиране на въздуха, третиране на издишания въздух и при нужда, начин на престой на животните в камерата за изпитване. Трябва да бъде описана използваната апаратура за измерване на температурата и, ако е необходимо, стабилността на аерозолните концентрации и размерите на частиците.

Данни, отнасящи се до експозицията:

Те трябва да бъдат представени под формата на таблица, като се посочат средните стойности, както и определяне на изменението им (например, стандартно отклонение); данните трябва да включват:

- а) скорост на въздушния поток през инхалационното устройство,
  - б) температура и влажност на въздуха,
  - в) номинални концентрации (общо количество на изпитваното вещество, подадено в инхалационното устройство, разделено на обема на въздуха),
  - г) природа на разтворителя, в случай на използването му,
  - д) реални концентрации в зоната на дишане,
  - е) средни размери на частиците,
- токсична реакция в зависимост от пол и доза,
  - време на настъпване на смъртта по време на изпитването или посочване, че животните са преживели след експеримента,
  - токсични или други ефекти, ниво, при което няма никакъв ефект,
  - време на наблюдаване на всеки анормален признак и развитието му,
  - количества храна и телесно тегло,
  - извършени хематологични изследвания и пълните резултати,
  - извършени биохимични клинични изследвания и пълните резултати,
  - резултати от аутопсията,
  - подробно описание на всички хистопатологични наблюдения,
  - статистическа обработка на резултатите, когато е възможно,
  - хистопатологични констатации,
  - обсъждане на резултатите,
  - интерпретация на резултатите.

### **3.2. Оценка и интерпретация**

Виж общ увод към част Б (точка В).

## **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Виж общ увод към част Б (точка Г).

## **Б.9. СУБОСТРА ТОКСИЧНОСТ - КОЖНО ПРИЛАГАНЕ**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Виж общ увод към част Б (точка А).

#### **1.2. Определение**

Виж общ увод към част Б (точка Б).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

#### **1.4. Принцип на метода на изпитване**

Нарастващи дози от изпитваното вещество се нанасят ежедневно върху кожата на групи от опитни животни, като на всяка група се прилага по една доза в продължение на 28 дни. През периода на прилагане животните се наблюдават ежедневно за разкриване на признаци на токсичност. На животните, умрели по време на опита се прави аутопсия, също както и преживелите до края на изследването.

#### **1.5. Критерии за качество**

Няма.

#### **1.6. Описание на метода на изпитване**

##### *1.6.1. Подготовки*

Животните се държат при характерните за експеримента условия на отглеждане и хранене най-малко пет дни преди началото му. Преди започване на изпитването младите здрави животни се разпределят по произволен начин в третирани и контролни групи. Малко преди началото на опита се остригва козината от гръбната (дорзалната) област на животните. Може да се използва и бръснене, но тогава то трябва да бъде извършено около 24 часа преди опита. По време на бръсненето или стригането трябва да се внимава да не се нарани кожата. Повърхността, която трябва да бъде подготвена за прилагане на веществото, трябва да бъде не по-малка от 10 % от телесната повърхност. При определяне на кожния участък за почистване и третиране трябва да се вземе под внимание теглото на животното. Когато се изпитват твърди вещества, които в случай на нужда могат да бъдат стрити на прах, веществото трябва да бъде омокрено с вода или, при нужда, с подходящ разтворител, така че да бъде осигурен добър контакт с кожата. Течните вещества обикновено се прилагат неразредени. Апликациите се правят ежедневно, пет или седем дни седмично.

##### *1.6.2. Експериментални условия*

###### **1.6.2.1. Опитни животни**

Експериментът се провежда на полово зрели плъхове, зайци или морски свинчета. Могат да бъдат използвани и други видове, но тогава използването им трябва да бъде обосновано. При започване на експеримента, разликата в теглото на използваните животни не трябва да превишава  $\pm 20\%$  от средната стойност.

###### **1.6.2.2. Брой и пол**

Всяка доза се изпитва най-малко на десет животни (5 женски и 5 мъжки), със здрава кожа. Женските не трябва да са раждали и да са бременни. Ако е предвидено по време на експеримента да бъдат убити животни, броят на животните в началото на изпитването трябва да бъде увеличен с броя на животните, които са планирани за убиване преди края на опита. Допълнително, сателитна група от 10 животни (по 5 животни от пол) може да бъде третирана с най-високата доза в продължение на 28 дни и да се наблюдава за обратимост, персистиране или късна поява на токсични ефекти в продължение на 14 дена след третирането.

#### 1.6.2.3. Дози

Необходими са най-малко три дози и една контролна група и, в случай на нужда, контролна група за разтворителя. Периодът на експозиция трябва да бъде най-малко 6 часа дневно. Изпитваното вещество трябва да бъде прилагано всеки ден по едно и също време и дозите трябва да се регулират ежеседмично или на две седмици, за да се поддържа постоянно ниво на дозата по отношение на телесното тегло на животните. Животните от контролната група трябва да бъдат третирани по идентичен начин на тези от експерименталната група, но без прилагане на изпитваното вещество. Когато, за улеснение на дозирането, се използва разтворител, той се прилага към контролната група при същите условия и в количество като при третираната с най-висока доза група. Най-високата доза трябва да предизвиква токсични ефекти, които не водят (или рядко водят) до смърт. Най-ниската доза не трябва да предизвиква никакъв токсичен ефект. Когато се разполага с данни, отнасящи се до експозицията при човека, най-ниската доза трябва да бъде по-висока от тази стойност. В идеалния случай междинната доза трябва да предизвиква минимални забележими токсични ефекти. При използване на повече междинни дози, те трябва да са достатъчно раздалечени, за да се получи градация на токсичните ефекти. В групите с прилагане на слаби и междинни дози, както и в контролните групи, смъртните случаи трябва да са малко, за да позволят добра оценка на резултатите.

Ако прилагането на изпитваното вещество води до силно кожно дразнене, концентрациите трябва да бъдат намалени; това може да доведе до намаление и даже до изчезване на други токсични ефекти, проявени при най-високата доза. Освен това, ако кожните увреждания са много сериозни, може да се наложи спирането на опита и започването му наново, но с по-ниски концентрации.

#### 1.6.2.4. Лимитиращо изпитване

Ако даден предварителен експеримент, извършен при доза от 1000 милиграма на килограм, или при по-висока доза, в зависимост от възможната експозиция при човека, когато последната е известна, не показва никакъв токсичен ефект, по-нататъшните тестове могат да бъдат считани за излишни.

#### 1.6.2.5. Период на наблюдение

Опитните животни трябва да бъдат наблюдавани ежедневно за разкриване на признаци на токсичност. Времето на настъпване на смъртта и времето на поява или изчезване на токсичните ефекти трябва да бъде отбелязвано.

#### 1.6.3. Работен режим

Животните трябва да бъдат поставени в индивидуални клетки. В идеалния случай дозите от изпитваните вещества се прилагат на животните седем дни седмично за период от 28 дни. Животните от всяка сателитна група, предвидена за допълнителни

наблюдения, трябва да бъдат наблюдавани в продължение на 14 дни след приключване на третирането за да се проследи оздравяването или устойчивостта на токсичните ефекти. Продължителността на експозицията трябва да е най-малко 6 часа дневно. Изпитваното вещество трябва да бъде приложено по един и същи начин върху кожна повърхност приблизително равна на 10 % от общата телесна повърхност. В случай на силно токсични вещества, третираната повърхност може да бъде по-малка, но изпитваното вещество трябва така да бъде приложено, че да образува възможно най-тънък и равномерен слой.

По време на експозиция, изпитваното вещество се държи в контакт с кожата посредством марлена превръзка и недразнеща лепенка. Третираната част трябва, освен това, да бъде подходящо покрита, така че да се държат на място марлената превръзка и изпитваното вещество и да се избегне поглъщането му от животните. Могат да бъдат използвани апарати за обездвижване, за да се попречи на животните да погълнат изпитваното вещество, но не се препоръчва пълна имобилизация.

В края на периода на експозиция, всички остатъци от изпитваното вещество трябва да бъдат отстранени, по възможност с вода или с друг подходящ метод за почистване на кожата.

Всички животни трябва ежедневно да бъдат преглеждани, като се отчитат признаците на токсичност, времето на тяхната поява, интензивността и продължителността им. Ежедневните наблюдения трябва да включват промените на кожата и козината, очите и лигавиците, дихателния апарат, кръвоносната система, периферната и централната нервна системи, както и двигателната активност и начин на поведение. Теглото на животните трябва да бъде определяно ежеседмично. Препръчва се измерване на хранителната консумация всяка седмица. Животните трябва редовно да бъдат наблюдавани и да се внимава, в рамките на възможното, да не се губят за експеримента поради канибализъм, автолиза на тъканите или грешка при поставянето. На всички преживели животни от третираните, не сателитни, групи се прави аутопсия. Умиращите животни веднага се изваждат и им се прави аутопсия.

Следните изследвания трябва да бъдат проведени в края на изпитването на всички животни (включително и тези от контролната група):

1. хематологичен анализ, включващ минимум хематокрит, концентрация на хемоглобин, преброяване на еритроцити, пълно и диференциално преброяване на левкоцити, както и изследване на кръвосъсирването;
2. клинична биохимия на кръвта, включваща най-малко един параметър, характеризиращ бъбречната и чернодробната функции: серумна аланинаминотрансфераза (преди известна под името глутаматпируваттрансаминаза), серумна аспартатаминотрансфераза (преди известна под името глутаматоксалацетаттрансаминаза), азот на уреята, албумин, кръвен креатинин, общ билирубин и общ белтък.

При необходимост за адекватна токсикологична оценка могат да бъдат проведени и други определяния, включващи калций, фосфор, хлориди, натрий, калий, глюкоза, липиди, хормони, киселинно-алкален баланс, метхемоглобин, холинестеразна активност.

При нужда могат да бъдат извършени и други биохимични клинични анализи за задълбочаване на изследването на наблюдаваните ефекти.

#### 1.6.4. Аутопсия

На всички опитни животни трябва да бъде направена пълна аутопсия. Черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези и тестисите трябва да бъдат претеглени във

влажно състояние, възможно най-бързо след дисекцията за да се избегне изсъхването им. В подходяща среда, позволяваща евентуални бъдещи хистопатологични изследвания трябва да бъдат запазвани следните органи и тъкани: нормална и третирана кожа, черен дроб, бъбреци и всички интересни органи (т.е. тези, които имат макроскопски увреждания или промени в обема).

#### 1.6.5. *Хистопатологично изследване*

Хистологично изследване трябва да бъде извършено върху запазените органи и тъкани на животните от групата, третирана с най-висока доза и на животните от контролната група. Органите и тъканите, притежаващи увреждания, дължащи се на изпитваното вещество в случая на най-висока концентрация, трябва да бъдат изследвани във всички групи, експонирани на по-ниски концентрации. Животните от всички сателитни групи трябва да бъдат изследвани хистологично, като се обръща внимание най-вече на органите и тъканите, за които са констатирани увреждания при другите третирани групи.

## 2. ДАННИ

Данните трябва да бъдат обобщени в таблица, показваща за всяка опитна група, броят на животните в началото на изпитването и броят на животните с всеки отделен вид увреждане.

Всички наблюдавани резултати трябва да бъдат обработени с подходящ статистически метод. Могат да бъдат използвани всички признати статистически методи.

## 3. РЕЗУЛТАТИ

### 3.1. **Протокол от изпитването**

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- данни за животните (вид, порода (линия), произход, околна среда, хранителен режим, и др.),
- експериментални условия,
- дози (включително разтворител, ако е използван) и концентрации,
- ако е възможно, ниво при което няма никакъв ефект,
- токсична реакция в зависимост от пол и доза,
- време на настъпване на смъртта по време на изпитването или посочване, че животните са преживели след експеримента,
- токсични или други ефекти,
- време на наблюдаване на всеки аномален признак и развитието му,
- количества храна и телесно тегло,
- извършени хематологични изследвания и пълните резултати,
- извършени биохимични клинични изследвания и пълните резултати,
- резултати от аутопсията,
- подробно описание на всички хистопатологични наблюдения,
- статистическа обработка на резултатите, когато е възможно,
- хистопатологични констатации,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### **3.2. Оценка и интерпретация**

Виж общ увод към част Б (точка В).

### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Виж общ увод към част Б (точка Г).

## **Б.10. ДРУГИ ЕФЕКТИ : МУТАГЕННОСТ ЦИТОГЕНЕТИЧЕН *ИН ВИТРО* АНАЛИЗ ВЪРХУ БОЗАЙНИЦИ**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Виж общ увод към част Б (точка А).

#### **1.2. Определение**

Виж общ увод към част Б (точка Б).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

#### **1.4. Принцип на метода**

Цитогенетичният ин-витро анализ е ускорено изпитване за мутагенност, предназначено за разкриване на структурни хромозомни аберации в клетъчни култури от бозайници. Могат да бъдат използвани култури от установени (постоянни) клетъчни линии, както и култури от първични клетки. След експозиция на действието на изпитваните вещества, в присъствие или в отсъствие на активираща смес от чернодробни ензими (постмитохондриална фракция, обогатена с кофактори), клетъчните култури се третират с митотичен вретенов инхибитор, като колхицин, за да натрупат клетки в метафазен тип стадий на митоза (с-метафаза). Клетките се събират в подходящи моменти и се изготвят хромозомни препарати. Препаратите се оцветяват и метафазните клетки се анализират за откриване на хромозомни аберации.

#### **1.5. Критерии за качество**

Няма.

#### **1.6. Описание на метода**

##### *1.6.1. Подготовка*

Преди да се използват за третиране на клетките, изпитваните вещества се приготвят в среда на култура или се разтварят в подходящи разтворители. Използват се установени (постоянни) клетъчни линии или култури от първични клетки, например клетки от китайски хамстер и човешки лимфоцити.

##### *1.6.2. Експериментални условия*

###### **Брой култури**

За всяка експериментална точка се използват най-малко две култури.

###### **Използване на позитивни и негативни контроли**

За негативни контроли се използват разтворителят (когато разтворителят не е средата на културата или вода), активиращата смес от чернодробни ензими с разтворителя, както и нетретирани контроли.

Във всеки експеримент е включена положителна контрола; когато за активиране на изпитваното вещество се използва активираща смес от чернодробни ензими, като

положителна контрола трябва да бъде използвано вещество, нуждаещо се от метаболитна активация.

#### Дози

Използват се най-малко три дози от изпитваното вещество при интервал най-малко един логаритъм, като най-високата доза намалява митотичната активност с около 50%.

#### Условия на култивиране

Използват се подходящи среда на отглеждане на културите и инкубационни условия (например, температура, съдове за култивиране, концентрация на CO<sub>2</sub> и влажност).

### 1.6.3. Работен режим

#### 1.6.3.1. Приготвяне на културите

Установени (постоянни) клетъчни линии: клетките се получават от матерни култури (например чрез трипсинизация или чрез селективно отделяне с помощта на силно разбъркване), посяват се в съдове за култивиране при подходяща плътност и се инкубират при 37 °C.

Човешки лимфоцити: Хепаринизирана кръв се прибавя към средата за отглеждане на култури, съдържаща фитохемаглутинин, фетален телешки серум и антибиотици и се инкубира при 37 °C.

#### 1.6.3.2. Третиране на културите с изпитваното вещество

##### i) Третиране без активираща смес от чернодробни ензими

Всички обработки трябва да покриват времето за един пълен клетъчен цикъл и схемите на фиксиране трябва да осигуряват анализа на първите митози, получени след третиране на клетките, обработвани на различни стадии от цикъла им. Когато третирането не покрива пълната продължителност на клетъчния цикъл, се избират много времена на фиксиране за да се вземат проби от клетки, намиращи се на различни стадии на клетъчния цикъл по време на третирането, т.е. G<sub>1</sub>, S и G<sub>2</sub>.

Изпитваното вещество се прибавя към културите от установени (постоянни) клетъчни линии, когато последните се намират в стадий на експоненциален растеж. Културите от човешки лимфоцити се третират, когато са все още в полу-синхронно състояние. Ако изпитваното вещество променя продължителността на клетъчния цикъл, трябва да бъде променен интервала на фиксиране.

ii) При третиране, изпитваното вещество в комбинация с активиращата смес от чернодробни ензими, трябва да действат възможно най-дълго време, без да причиняват токсичен ефект върху клетките. Ако поради токсичност третирането не покрива пълната продължителност на клетъчния цикъл, се избират много времена на фиксиране за да се вземат проби от клетки, намиращи се на различни стадии на клетъчния цикъл по време на третирането, т.е. G<sub>1</sub>, S и G<sub>2</sub>.



Събиране на клетките

Клетъчните култури се обработват с митотичен вретенов инхибитор от 1 до 2 часа преди събирането им. Всяка култура се събира и третира отделно за изготвяне на хромозомните препарати.

### 1.6.3.3. Изготвяне на хромозомни препарати

Изготвянето на хромозомните препарати включва хипотонично третиране на клетките, фиксиране, натриване върху предметни стъкла и оцветяване.

Анализи

За разкриване на хромозомни аберации за всяка култура се анализират минимум 100, добре натрити метафази. Преди анализ предметните стъкла се кодират.

При човешките лимфоцити се анализират само метафазите, съдържащи 46 центромера. В установените (постоянни) клетъчни линии се анализират само метафазите, съдържащи  $\pm 2$  центромера от модалния брой.

## 2. ДАННИ

Данните се представят под формата на таблица. Хроматидният тип аберации (празнини, разкъсвания, взаимни обмени), хромозомният тип аберации (празнини, разкъсвания, минутни, кръгови, дицентрични и полицентрични хромозоми) и броят анормални метафази (включени и изключени празнини) се описват отделно за всички третирани култури, както и за всички контролни култури.

Данните се обработват с подходящи статистически методи.

## 3. РЕЗУЛТАТИ

### 3.1. Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- използвани култури,
- експериментални условия: състав на средата, концентрация на CO<sub>2</sub>, инкубационна температура, продължителност на инкубацията, дози, момент на третиране, продължителност на третиране с митотичен вретенов инхибитор и концентрацията му, тип активираща смес от чернодробни ензими, позитивни и негативни контроли,
- брой клетъчни култури,
- брой анализирани метафази (данните се посочват отделно за всяка култура),
- митотичен индекс,
- тип и брой на аберациите, посочени отделно за всяка третирана култура и контрола, модален брой хромозоми в използваните установени клетъчни линии,
- статистическа обработка,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### 3.2. Оценка и интерпретация

Виж общ увод към част Б (точка В).

**4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**  
Виж общ увод към част Б (точка Г).

**Б.11. ДРУГИ ЕФЕКТИ : МУТАГЕННОСТ  
ЦИТОГЕНЕТИЧЕН *ИН ВИВО* АНАЛИЗ ВЪРХУ КОСТЕН МОЗЪК ОТ  
БОЗАЙНИЦИ, ХРОМОЗОМЕН АНАЛИЗ**

**1. МЕТОД**

**1.1. Увод**

Виж общ увод към част Б (точка А).

**1.2. Определение**

Виж общ увод към част Б (точка Б).

**1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

**1.4. Принцип на метода**

Цитогенетичният *ин-виво* анализ е ускорено изпитване за мутагенност, предназначено за разкриване на структурни хромозомни аберации. Последните се оценяват основно през първата митоза, последваща третирането. С химичните мутагени, по-голямата част от предизвиканите аберации са от хроматиден тип.

При този метод се използва костен мозък от бозайници, експонирани по подходящ начин на действието на изпитваните вещества и убивани през определени последователни интервали. Преди да бъдат убити, животните се третират с вещества като колхицин, които пречат на образуването на вретено, за да се натрупат клетки в метафазен тип стадий на митоза (с-метафаза). Хромозомните препарати се приготвят от изсушени на въздух клетки, после оцветени; след това се провежда микроскопски анализ на метафазите за разкриване на хромозомни аберации.

**1.5. Критерии за качество**

Няма.

**1.6. Описание на метода**

**1.6.1. Подготовки**

Изпитваните вещества се разтварят във физиологичен разтвор. Ако са неразтворими, те се разтварят или суспендират в подходящ разтворител.

**1.6.2. Експериментални условия**

**1.6.2.1. Опитни животни**

Използват се гризачи като плъх, мишка или китайски хамстер. Млади, половозрели и здрави животни се разпределят по произволен начин в третирани и контролни групи.

**1.6.2.2. Брой и пол**

За всяка експериментална и контролна група се използват най-малко пет женски и пет мъжки животни. Следователно, ако експерименталната програма включва няколко периода на наблюдение след третирането, за всеки период на наблюдение се изследват по десет животни.

**1.6.2.3. Начин на прилагане**

По принцип изпитваните вещества трябва да бъдат прилагани еднократно. Въз основа на токсикологичните данни, с които се разполага, може да бъде използван режим с повторно прилагане, но само в случай, че изпитваното вещество не проявява цитотоксичен ефект върху костния мозък. Прилагането се извършва основно перорално или чрез интраперитонеална инжекция. Подходящи могат да бъдат и други пътища на прилагане.

#### 1.6.2.4. Използване на позитивни и негативни контроли

Вещество, за което се знае, че предизвиква хромозомни аберации *in vivo* се използва като положителна контрола и отрицателна (за разтворител) контролна група се включва също в плана на всеки експеримент.

#### 1.6.2.5. Дози

За основното досие се използва една доза от изпитваното вещество, дозата, която е максимално поносима или тази, водеща до появата на някои белези на цитотоксичност, например, частично инхибиране на митозата.

Допълнителни дози могат да бъдат използвани, когато това е научно аргументирано.

Ако изпитването служи като метод за верификация, трябва да бъдат изследвани още най-малко две допълнителни дози.

#### 1.6.3. Работен режим

Изпитването може да бъде извършено по два начина:

- i) Животните се третират с изследваното вещество еднократно, при максимално поносима доза. След третиране, се вземат три проби. Междинното време за вземане на проба е 24 часа. Тъй като изпитваното вещество може да повлияе на кинетиката на клетъчния цикъл, се извършва едно по-ранно и едно по-късно вземане на проба, подходящо разделени в интервала от 6 до 48 часа след прилагане на веществото. Когато се използват допълнителни дози, пробите трябва да бъдат вземани през периода на максимална чувствителност или, ако това време не е известно, 24 часа след третиране;
- ii) Ако фармако-кинетичните и метаболитни данни налагат режим с повторно третиране, може да се използва повторно дозиране и пробите трябва да бъдат вземани 6 и 24 часа след последното третиране.

#### Изготвяне на костно-мозъчни препарати

Преди убиване на животните се инжектира, интраперитонеално, подходяща доза митотичен вретенов инхибитор за да се получат подходящ брой клетки в *s*-метафаза. Костен мозък се взема от двете фемурални кости, непосредствено след убиването на животните чрез промиване с фетален телешки серум. След подходящо хипотонично третиране, клетките се фиксират и после натриват върху предметни стъкла. След изсушаване на въздух, стъклата се оцветяват.

#### Анализ

Преди извършване на микроскопски анализ стъклата се кодират. За да се открият хромозомните аберации, за всяко животно се анализират най-малко 50, добре натрити метафази, съдържащи пълен брой центромери. Допълнително могат да бъдат установени митотичните индекси за всяко животно.

## **2. ДАННИ**

Данните се представят под формата на таблица. Хроматидният и изохроматидният тип аберации (празнини, разкъсвания, преподреждания), броят аномални метафази (включени и изключени празнини) и митотичните индекси (когато са установени) се описват отделно за всички третирани животни, както и за всички контролни животни. Средните стойности и стандартните отклонения за всяка третирана и контролна група също се описват. Данните се обработват с подходящи статистически методи.

## **3. РЕЗУЛТАТИ**

### **3.1. Протокол**

Протоколът от опита трябва да съдържа следната информация:

- вид и порода (линия) на използваните животни,
- брой животни от всеки пол в опитните и контролните групи,
- експериментални условия: подробно описание на режима на третиране и вземане на проби, дози, продължителност на третиране с митотичен вретенов инхибитор, и концентрацията му,
- брой анализирани метафази за всяко животно,
- митотични индекси (когато са установени),
- тип и брой на аберациите, посочени отделно за всяко третирано и контролно животно,
- статистическа обработка,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### **3.2. Оценка и интерпретация**

Виж общ увод към част Б (точка В).

## **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Виж общ увод към част Б (точка Г).

## **Б.12. ДРУГИ ЕФЕКТИ : МУТАГЕННОСТ МИКРОНУКЛЕУС ТЕСТ**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Виж общ увод към част Б (точка А).

#### **1.2. Определение**

Виж общ увод към част Б (точка Б).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

#### **1.4. Принцип на метода**

Микронуклеус тестът е ускорено *ин-виво* изпитване върху бозайници, предназначено за разкриване на хромозомни нарушения или увреждания на митотичния апарат, предизвикани от химични вещества. Това изпитване се базира на повишаване на броя на микронуклеусите (микроядрата) в полихроматофилните еритроцити при третираните животни в сравнение с контролните.

Микронуклеусите се образуват от хромозомни фрагменти или от цели хромозоми, изоставащи в хода на митозата. При трансформирането на еритобластите в еритроцити, главното ядро се изхвърля, докато микронуклеусът може да остане в цитоплазмата. При това изпитване се използват незрели, полихроматофилни еритроцити от костен мозък на лабораторни бозайници, експонирани, по подходящ начин, на действието на изпитваните вещества. След екстракция на костния мозък се изготвят и оцветяват костно-мозъчни натривки. Провежда се микроскопски анализ за броя на микронуклеуси, намиращи се в полихроматофилните еритроцити и се определя съотношението между полихроматофилните и нормохромните еритроцити.

#### **1.5. Критерии за качество**

Няма.

#### **1.6. Описание на метода**

##### *1.6.1. Подготовки*

Изпитваните вещества се разтварят в изотоничен разтвор. Ако веществата са неразтворими, те се разтварят или суспендират в подходящ разтворител. При използване на разтворител той не трябва да взаимодейства с изпитваното вещество, нито да предизвиква токсични ефекти. Обикновено се използват пряко приготвени разтвори на изпитваното вещество.

##### *1.6.2. Експериментални условия*

###### **1.6.2.1. Опитни животни**

Препоръчва се използването на мишки, но други бозайници също могат да бъдат използвани. Млади, здрави и полово зрели животни се разпределят по произволен начин в третирани и контролни групи.

###### **1.6.2.2. Брой и пол**

Всяка опитна и контролна група се състои най-малко от пет женски и пет мъжки животни. Следователно, ако експерименталната програма включва няколко периода на наблюдение след третирането, за всеки период на наблюдение се убиват по десет животни.

#### 1.6.2.3. Начин на прилагане

По принцип изпитваните вещества трябва да бъдат въведени еднократно. Въз основа на токсикологичните данни, с които се разполага, може да бъде използван режим с повторно прилагане, но само в случай, че изпитваното вещество не проявява цитотоксичен ефект върху костния мозък.

Прилагането се извършва основно перорално или чрез интраперитонеална инжекция. Подходящи могат да бъдат и други пътища на прилагане.

#### 1.6.2.4. Използване на позитивни и негативни контроли

Всеки експеримент трябва да включва позитивни и негативни (за разтворител) контроли.

#### 1.6.2.5. Дози

За основното досие се използва една доза от изпитваното вещество, дозата, която е максимално поносима или тази, водеща до появата на някои белези на цитотоксичност, например, промяна в съотношението полихроматофилни еритроцити/нормохромни еритроцити.

Допълнителни дози могат да бъдат използвани, когато това е научно аргументирано.

Ако изпитването служи като метод за верификация, трябва да бъдат изследвани още най-малко две допълнителни дози.

#### 1.6.3. Работен режим

Изпитването трябва да бъде проведено по два начина:

- i) Животните се третират с изследваното вещество еднократно, при максимално поносима доза. Пробите трябва да бъдат вземани през периода на максимална чувствителност на изпитването, който варира в зависимост от изпитваното вещество. Затова, при използване на максимална доза, пробите от костен мозък се вземат най-малко на три пъти, в началото на третирането и после на подходящи интервали, но без да се преминават 72 часа от началото.

Когато се използват допълнителни дози, пробите трябва да бъдат вземани през периода на максимална чувствителност или, ако това време не е известно, 24 часа след третирането;

- ii) Ако фармако-кинетичните и метаболитни данни налагат режим с повторно третиране, може да се използва повторно дозиране и пробите трябва да бъдат вземани най-малко на 3 пъти, най-рано 12 часа след последното третиране, и после на подходящи интервали без да се преминават 72 часа.

Изготвяне на костно-мозъчни препарати

Костен мозък се взема от двете фемурални кости, непосредствено след убиването на животните, чрез промиване с фетален телешки серум. Клетките се утаяват чрез

центруфугиране и супернатанта се изхвърля. Капки от хомогенната клетъчна суспензия се нанасят върху предметни стъкла и се изтеглят като натривки. След изсушаване на въздух, стъклата се оцветяват.

#### Анализ

Преди микроскопският анализ стъклата се кодират. Наличието на микронуклеуси се търси най-малко измежду 1 000 полихроматофилни еритроцита за всяко животно. Съотношението между нормохроматните и полихроматофилните еритроцити се определя за всяко животно, на базата на 1 000 еритроцита.

## 2. ДАННИ

Данните се представят под формата на таблица. За всички опитни и контролни животни се представят индивидуални данни за брой полихроматофилни еритроцити, брой микронуклеарни полихроматофилни еритроцити, процент микронуклеирани клетки и съотношението между нормохромни и полихроматофилни еритроцити. За всяка третирана и контролна група се представят също средните стойности и стандартните отклонения. Данните се обработват с подходящи статистически методи.

## 3. РЕЗУЛТАТИ

### 3.1. Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- вид и порода (линия) на използваните животни, възраст на животните,
- брой на животните от всеки пол в опитните и контролните групи,
- експериментални условия: подробно описание на режима на третиране и вземане на проби, данни за токсичността, позитивни и негативни контроли,
- критерии за преброяване на микронуклеуси,
- зависимост «доза-ефект», при възможност,
- статистическа обработка,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### 3.2. Оценка и интерпретация

Виж общ увод към част Б (точка В).

## 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

Виж общ увод към част Б (точка Г).



## **Б.13. ДРУГИ ЕФЕКТИ : МУТАГЕННОСТ**

### **ИЗПИТВАНЕ ЗА РЕВЕРСИВНА МУТАЦИЯ ВЪРХУ ESCHERICHIA COLI**

#### **1. МЕТОД**

##### **1.1. Увод**

Виж общ увод към част Б (точка А).

##### **1.2. Определение**

Виж общ увод към част Б (точка Б).

##### **1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

##### **1.4. Принцип на метода**

Ревертантната система *Escherichia coli* триптофан (*trp*) е микробиално изпитване, позволяващо измерването на реверсията  $trp^- \rightarrow trp^+$ , дължаща се на въздействието на химични вещества, които предизвикват базисни замествания на ниво геном на този организъм.

Бактериите се експонират на изпитваните вещества с и без метаболитна активация. След подходящ период на инкубация върху минимална среда, ревертантните колонии се изброяват и полученият брой се сравнява с този на спонтанните ревертанти, наблюдавани при контролна нетретирана култура и/или в присъствие на разтворител.

##### **1.5. Критерии за качество**

Няма.

##### **1.6. Описание на метода**

Изпитването може да бъде извършено по следните методи:

- i) метод на предварителна инкубация;
- ii) метод на директна инкорпорация, където бактериите и изпитваното вещество се смесват с топ агар и се изливат на повърхността на селективен агар в петриево блюдо.

###### *1.6.1. Подготовки*

###### **1.6.1.1. Бактерии**

Бактериите се отглеждат при 37 °C до края на експоненциалната фаза или до началото на стационарната фаза на растеж. Клетъчната плътност трябва да бъде приблизително  $10^8 - 10^9$  клетки на милилитър.

###### **1.6.1.2. Метаболитна активация**

Бактериите трябва да бъдат експонирани на изпитваното вещество в присъствие и в отсъствие на подходяща активираща смес от чернодробни ензими от бозайник (постмитохондриална фракция, обогатена с кофактори), приготвена от мишки или плъхове, предварително третирани с ензимни индуктори.

###### *1.6.2. Експериментални условия*

###### **1.6.2.1. Опитни шамоте**

Трябва да бъдат използвани три щама – WP2, WP2 *uvr* A и WP2 *uvr* A pKM 101. За приготвяне и съхранение на културите трябва да бъдат прилагани признати методи. Задължително се проверяват растежните изисквания и генетичната идентичност на щамовете, тяхната чувствителност към УВ облъчване или към митомицин С, както и резистентността към ампицилин на щам WP2 *uvr* A pKM 101. Честотата на спонтанните реверсии на щамовете трябва да бъде в очакваните интервали.

#### 1.6.2.2. Среда

Използва се подходяща за експресията и селекцията на мутантите среда със съответен топ агар.

#### 1.6.2.3. Използване на позитивни и негативни контроли

Изпитванията трябва да включват успоредни нетретиранни контроли и контроли за разтворител. Трябва да бъдат извършени също и позитивни контроли за следните две цели:

- i) Потвърждаване на чувствителността на бактериалните щамове. Като позитивни контроли за изпитванията без метаболитна активация могат да бъдат използвани етан сулфонат, 4-нитрохинолин оксид или етил нитрозоурея (етил нитрозокарбамид).
- ii) Осигуряване на активността на съответната метаболитна система. Позитивна контрола за активността на дадена метаболитна система за всички щамове е 2-аминоантрацен. Подходящо е, при възможност, да се използва позитивна контрола от същия химичен клас, от който е изпитваното вещество.

#### 1.6.2.4. Количество изпитвано вещество за петриево блюдо

Най-малко пет различни количества от даденото вещество трябва да бъдат изпитани с полу-логаритмични (0,5 log) интервали между отделните петриеви блюда. Веществата се изпитват до достигане на границите на разтворимост или токсичност. Показатели за токсичност са намаляването на броя спонтанни ревертанти, нарушаването на фона от ауксотрофни бактерии или количеството преживяли третирани култури. Нетоксичните химични вещества трябва да бъдат изследвани до 5 милиграма за петриево блюдо преди да може да се даде оценка за негативен резултат от изпитването.

#### 1.6.2.5. Инкубационни условия

Петриевите блюда се инкубират при 37 °C за период от 48 до 72 часа.

#### 1.6.3. Работен режим

При метода на директна инкорпорация върху петриево блюдо, без ензимна активация, изпитваното вещество и 0,1 милилитър от свежата бактериална култура се добавят към 2,0 милилитра топ агар. При изпитванията с метаболитна активация, след прибавяне на изпитваното вещество и бактериите към агара, към него се добавя 0,5 милилитра активираща смес от чернодробни ензими, съдържащи адекватно количество постмитохондриална фракция. Съдържанието на всяка епруветка се смесва и се излива на повърхността на селективен агар в петриево блюдо. След втвърдяване на топ агара, петриевите блюда се инкубират при 37 °C за период от 48 до 72 часа. В края на инкубационния период се преброяват ревертантните колонии за всяко петриево блюдо.

При метода с предварителна инкубация, смес от изпитваното вещество, 0,1 милилитра свежа бактериална култура и адекватно количество активираща смес от

чернодробни ензими или същото количество буферен разтвор се инкубират преди добавяне на 2,0 милилитра топ агар. Останалите етапи от работния режим на този метод са аналогични на метода на директна инкорпорация върху петриево блюдо.

Всички петриеви блюда, приготвени по тези два метода се приготвят най-малко в три екземпляра.

## **2. ДАННИ**

Броят ревертантни колонии за всяко петриево блюдо се посочва за всички третиранни и контролни групи. Преброяването за всяко петриево блюдо, средния брой ревертантни колонии за петриево блюдо и стандартните отклонения трябва да бъдат представени за изпитваното вещество и за контролите.

Всички резултати се потвърждават с независим експеримент.

Данните трябва да бъдат обработени с подходящи статистически методи.

## **3. РЕЗУЛТАТИ**

### **3.1. Протокол от изпитването**

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- бактерии, използван щам,
- експериментални условия: дози, токсичност, състав на средата, методи на третиране (предварителна инкубация, инкубация), активираща смес от чернодробни ензими, сравнителни вещества, негативни контроли,
- преброяване за всяко петриево блюдо, среден брой ревертантни колонии за петриево блюдо, стандартни отклонения, по възможност - зависимост «доза/ефект»,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### **3.2. Оценка и интерпретация**

Виж общ увод към част Б (точка В).

## **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Виж общ увод към част Б (точка Г).

**Б.14. ДРУГИ ЕФЕКТИ : МУТАГЕННОСТ**  
**ИЗПИТВАНЕ ЗА РЕВЕРСИВНА МУТАЦИЯ ВЪРХУ SALMONELLA**  
**TYPHIMURIUM**

**1. МЕТОД**

**1.1. Увод**

Виж общ увод към част Б (точка А).

**1.2. Определение**

Виж общ увод към част Б (точка Б).

**1.3. Сравнителни вещества**

Няма.

**1.4. Принцип на метода**

Ревертантната система *Salmonella typhimurium* хистидин (*his*) е микробиално изпитване, позволяващо измерване на реверсията  $his^- \rightarrow his^+$ , дължаща се на въздействието химични вещества, които предизвикват базисни замествания или фреймшифтни мутации в генома на този организъм.

Бактериите се експонират на изпитваните вещества с и без метаболитна активация и се посяват на повърхността на минимална среда. След подходящ период на инкубация, ревертантните колонии се изброяват и полученият брой се сравнява с този на спонтанните ревертанти, наблюдавани при контролна нетретирана култура и/или в присъствие на разтворител.

**1.5. Критерии за качество**

Няма.

**1.6. Описание на метода**

*1.6.1. Подготовки*

**1.6.1.1. Бактерии**

Свежи бактериални култури се отглеждат при 37 °С до края на експоненциалната фаза или до началото на стационарната фаза на растеж. Клетъчната плътност трябва да бъде приблизително  $10^8 - 10^9$  клетки на милилитър.

**1.6.1.2. Метаболитна активация**

Бактериите трябва да бъдат експонирани на изпитваното вещество в присъствие и в отсъствие на подходяща активираща смес от чернодробни ензими от бозайник (постмитохондриална фракция, обогатена с кофактори), приготвена от мишки или плъхове, предварително третирани с ензимни индуктори.

*1.6.2. Експериментални условия*

**1.6.2.1. Опитни щамове**

Трябва да бъдат използвани най-малко четири щамове – ТА 1535, ТА 1537, ТА 98 и ТА 100; допълнително могат да бъдат използвани други щамове, като ТА 1538. За приготвяне и съхранение на културите трябва да бъдат прилагани признати методи. Задължително се проверяват растежните изисквания и генетичната идентичност на щамовете, тяхната чувствителност към УВ облъчване и кристал-виолет (violet

crystal), както и резистентността им към ампицилин. Честотата на спонтанните реверсии на щамовете трябва да бъде в очакваните интервали.

#### 1.6.2.2. Среда

Използва се подходяща селективна среда със съответен топ агар.

#### 1.6.2.3. Използване на позитивни и негативни контроли

Изпитванията трябва да включват успоредни нетретирани контроли и контроли за разтворител. Трябва да бъдат извършени също и позитивни контроли за следните две цели:

- i) Потвърждаване на чувствителността на бактериалните щамове. За изпитванията без метаболитна активация могат да бъдат използвани следните съединения:

##### *Щамове*

ТА 1535, ТА 100

ТА 1538, ТА 98

ТА 1537

##### *Ревертиращи*

Натриев азид

2-нитрофлуорен

9-аминоакридин

- ii) Осигуряване на активността на съответната метаболитна система. Позитивна контрола за активността на дадена метаболитна система за всички щамове е 2-аминоантрацен. Подходящо е, при възможност, да се използва позитивна контрола от същия химичен клас, от който е изпитваното вещество.

#### 1.6.2.4. Количество изпитвано вещество за петриево блюдо

Най-малко пет различни количества от даденото вещество трябва да бъдат изпитани с полу-логаритмични (0,5 log) интервали между отделните петриеви блюда. Веществата се изпитват до достигане на границите на разтворимост или токсичност. Показатели за токсичност са намаляването на броя спонтанни ревертанти, нарушаването на фона от ауксотрофни бактерии или количеството преживяли третирани култури. Нетоксичните химични вещества трябва да бъдат изследвани до 5 милиграма за петриево блюдо преди да може да се даде оценка за негативен резултат от изпитването.

#### 1.6.2.5. Инкубационни условия

Петриевите блюда се инкубират при 37 °C за период от 48 до 72 часа.

#### 1.6.3. Работен режим

При метода на директна инкорпорация върху петриево блюдо, без ензимна активация, изпитваното вещество и 0,1 милилитър от свежата бактериална култура се добавят към 2,0 милилитра топ агар. При изпитванията с метаболитна активация, след прибавяне на изпитваното вещество и бактериите към агара, към него се добавя 0,5 милилитра активираща смес от чернодробни ензими, съдържащи адекватно количество постмитохондриална фракция. Съдържанието на всяка епруветка се смесва и се излива на повърхността на селективен агар в петриево блюдо. След втвърдяване на агара, петриевите блюда се инкубират при 37 °C за период от 48 до 72 часа. В края на инкубационния период се преброяват ревертантните колонии за всяко петриево блюдо.

При метода с предварителна инкубация, смес от изпитваното вещество, 0,1 милилитра свежа бактериално култура и адекватно количество активираща смес от

чернодробни ензими или същото количество буферен разтвор се инкубират преди добавяне на 2,0 милилитра топ агар. Останалите етапи от работния режим на този метод са аналогични на метода на директна инкорпорация върху петриево блюдо.

Всички петриеви блюда, приготвени по тези два метода се приготвят най-малко в три екземпляра.

## **2. ДАННИ**

Броят ревертантни колонии за всяко петриево блюдо се посочва за всички третирани и контролни групи. Преброяването за всяко петриево блюдо, средния брой ревертантни колонии за петриево блюдо и стандартните отклонения трябва да бъдат представени за изпитваното вещество и за контролите. Всички резултати се потвърждават с независим експеримент. Данните трябва да бъдат обработени с подходящи статистически методи.

## **3. РЕЗУЛТАТИ**

### **3.1. Протокол от изпитването**

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- бактерии, използван щам,
- експериментални условия: дози, токсичност, състав на средата, методи на третиране (предварителна инкубация, инкубация), активизираща смес от чернодробни ензими, сравнителни вещества, негативни контроли,
- преброяване за всяко петриево блюдо, среден брой ревертантни колонии за петриево блюдо, стандартни отклонения, по възможност - зависимост „доза/ефект »,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретация на резултатите.

### **3.2. Оценка и интерпретация**

Виж общ увод към част Б (точка В).

## **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Виж общ увод към част Б (точка Г).

## **ЧАСТ В : МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЕКОТОКСИЧНОСТТА**

### **В.1. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ ПРИ РИБИТЕ**

#### **1. МЕТОД**

##### **1.1. Увод**

За да бъде избран най-подходящият метод на изпитване (статичен, полу-статичен или динамичен), позволяващ осигуряването на задоволителни постоянни концентрации на изследваното вещество по време на изпитването е желателно да се разполага, доколкото е възможно, с данни за водоразтворимостта, парното налягане, химичната стабилност, константите на дисоциация и биодеградацията на изпитваното вещество.

Другите необходими данни, например структурна формула, степен на чистота, природа и процент значими примеси, наличие и количество добавки, както и коефициента на разпределение н-октанол/вода, трябва да бъдат взети предвид при планиране на изпитването и интерпретацията на резултатите.

##### **1.2. Определение и единици**

Остра токсичност е видимият неблагоприятен ефект, причинен в даден организъм при експозиция на дадено вещество за кратък период (дни).

В настоящото изпитване, острата токсичност се изразява като средна летална концентрация ( $ЛК_{50}$ ), т.е. концентрацията във вода, която причинява смъртта на 50% от изпитваната група риби, експонирана през непрекъснат период от време, който трябва да се посочи. Концентрациите на изпитваното вещество се изразяват като тегло към обем (мг/л) и също като тегло към тегло (част от милион, ppm).

##### **1.3. Сравнителни вещества**

За да се покаже, че при лабораторните условия на изпитване, отговорът (реакцията) на изпитвания вид не се е променил значително, може да бъде извършено изпитване със сравнително вещество.

За това изпитване няма посочено сравнително вещество.

##### **1.4. Принцип на метода на изпитване**

Рибите се експонират на изпитваното(ите) вещество(а), прибавени във водата, при даден концентрационен интервал, в продължение най-малко на 48 часа, но за предпочитане 96 часа. Смъртността се отчита най-малко на всеки 24 часа и концентрациите, причиняващи смъртта на 50% от рибите ( $ЛК_{50}$ ) се изчисляват, по възможност, при всяко наблюдение.

##### **1.5. Критерии за качество**

Смъртността при контролите не трябва да превишава 10 % в края на изпитването.

През цялото време на провеждане на изпитването концентрацията на кислород трябва да бъде по-висока от 60% от стойността на насищане.

Чрез анализ, или чрез химичните свойства или чрез използваната система на изпитване трябва да бъде показано, че концентрацията на изпитваното вещество е

била поддържана по задоволителен начин (например в границите на 80% от началната концентрация, по време на изпитването).

#### 1.6. Описание на метода на изпитване

Могат да бъдат използвани три типа системи.

Статично изпитване:

Изпитване за токсичност, извършвано върху водни организми, по време на което изпитваният разтвор не се подновява (разтворите не се променят по време на провеждане на изпитването).

Полу-статично изпитване:

Изпитване без непрекъснато подновяване на разтвора, но с периодично подновяване при по-продължителни периоди на изпитване (например, на всеки 24 часа).

Динамично изпитване:

Изпитване за токсичност, по време на което водата в експерименталните съдове се подновява непрекъснато, изпитваното химично вещество се пренася от водата използвана за подновяване на изпитваната среда.

##### 1.6.1. Реактиви

###### 1.6.1.1. Разтвори на изпитваните вещества

Матерните разтвори с необходимите концентрации се подготвят чрез разтваряне на веществото в дейонизирана вода, или във вода, в съответствие с описанието в точка 1.6.1.2.

Матерните разтвори на веществата със слаба водоразтворимост могат да бъдат приготвени чрез ултразвуково диспергиране или, при необходимост, използвайки органични разтворители, емулгатори или диспергатори. При използване на такъв тип спомагателно вещество, контролните риби трябва да бъдат експонирани на концентрация на спомагателното вещество, съответстваща на максимална концентрация на изпитваното вещество. Концентрацията на тези спомагателни вещества не трябва да превишава 0,1 грам на литър.

Концентрациите, избрани за изпитването се приготвят чрез разреждане на матерния разтвор. При провеждане на изпитване при високи концентрации, веществото може да бъде разтворено директно във вода за разреждане.

Изпитването трябва да бъде извършвано без регулиране на рН. Ако се окаже, че има голяма промяна на стойността на рН, се препоръчва изпитването да бъде повторено с регулиране на рН и резултатите да бъдат описани. В такъв случай стойността на рН на матерния разтвор трябва да бъде изравнена със стойността на рН на водата за разреждане, освен ако няма особени, противоположни причини. HCl и NaOH са предпочитани за тази цел. Това регулиране на рН трябва да бъде извършено така, че концентрацията на изпитваното вещество в матерния разтвор да не се промени значително. Ако регулирането води до химична реакция или утаяване на изпитваното вещество, това наблюдение трябва да бъде описано.

###### 1.6.1.2. Води за отглеждане и за разреждане

Може да бъде използвана питейна вода (незамърсена с опасни концентрации хлор, тежки метали или други вещества), натурална вода с добро качество или



“регенерирана ” вода (виж допълнение 1). Предпочитат се води с обща твърдост между 30 и 250 милиграма на литър (за CaCO<sub>3</sub>), и с рН от 6,0 - 8,5.

### 1.6.2. Апаратура

Апаратурата трябва да бъде от химически инертен материал:

- система за автоматично разреждане (за динамичното изпитване),
- устройство за измерване на кислорода,
- уред за определяне на твърдостта на водата,
- подходяща апаратура за контрол на температурата,
- рН-метър.

### 1.6.3. Изпитвани риби

Използват се един или няколко вида, като изборът се предоставя на лабораторията, която провежда изпитването.

Препоръчва се изборът на използвания вид да става на базата на важни практически критерии, като: видът да е веднага на разположение през цялата година, да се поддържа лесно, да е годен за изпитване, относителната му чувствителност, и всички значими икономически, биологични и екологични фактори. Рибата трябва да бъде здрава и да няма видими малформации.

Видовете риба, препоръчвани за изпитването са посочени в допълнение 2.

#### 1.6.3.1. Отглеждане

За предпочитане е изпитваните риби да произхождат от една и съща група, в която отделните риби имат еднаква дължина и възраст. Те трябва да бъдат държани най-малко 12 дни при следните условия:

- съдове:  
желателно е да бъдат използвани съдове с обем най-малко 300 литра за студеноводните риби и най-малко 100 литра за топловодните,
- зареждане:  
променливо, според използваната система (рециркулационна или динамична) и вида риба,
- вода:  
виж точка 1.6.1.2.
- светлина:  
фотопериод от 12 до 16 часа дневно,
- концентрация на разтворен кислород:  
минимум 80% от стойността на насищане,
- хранене:  
ежедневно или три пъти седмично, със спиране от 24 часа преди началото на изпитването.

#### 1.6.3.1. Смъртност

След период на адаптация от 48 часа се регистрира смъртността. За качеството на групата се съди по следните критерии:

- смъртност за 7 дни по-висока от 10 % от популацията: отхвърляне на цялата група,
- смъртност за 7 дни между 5 и 10 % от популацията: периодът на наблюдение се продължава с 7 дни. Ако не се констатира друг смъртен случай, групата се приема, в противен случай се отхвърля,
- смъртност за 7 дни по-ниска от 5 % от популацията: приемане на групата.

#### 1.6.4. Адаптация

Преди да бъдат използвани, рибите трябва да бъдат държани минимум 7 дни в условията на изпитването (вода и температура).

#### 1.6.5. Режим на работа

Преди окончателното изпитване, може да бъде извършено изпитване, целящо определянето на интервала от ефикасни концентрации. Това изпитване дава информация за интервала от концентрации, който да бъде използван по време на окончателното изпитване.

В добавка към серията от изпитвания се провежда контролно изпитване (т.е. без изпитвано вещество), като при необходимост се използва спомагателното вещество.

По време на изпитването концентрациите не трябва да намаляват с повече от 20 %. В зависимост от физичните и химичните свойства на веществото се избира статичен, полу-статичен или динамичен метод.

Рибата се експонира на изпитваното вещество при следните условия:

- продължителност:  
най-малко 48 часа, за предпочитане – 96 часа,
- брой организми:  
най-малко 10 на концентрация,
- съдове:  
с подходящ обем, в зависимост от препоръчаното зареждане,
- биологично зареждане:  
максимално препоръчано зареждане за статичното и полу-статичното изпитване: 1,0 грам на литър; за динамичните изпитвания се приема по-голямо зареждане,
- концентрация на изпитване:  
една контрола, най-малко пет концентрации на изпитване, различаващи се с постоянен коефициент не превишаващ 1,8 и намиращи се в интервал на смъртност от 0% до 100%,
- вода:  
виж точка 1.6.1.2.
- светлина:  
фотопериод от 12 до 16 часа дневно,
- температура:

съответстваща на избрания вид (допълнение 2), но с точност  $\pm 1$  °C, независимо от системата на изпитване,

- концентрация на разтворен кислород:  
минимум 60% от стойността на насищане,
- хранене:  
няма.

Рибите се изследват през първите 2 до 4 часа и най-малко на интервали от 24 часа. Смятат се за мъртви, ако докосване на опашната перка не предизвиква никаква реакция и ако не се вижда никакво дихателно движение. При всяко наблюдение мъртвите риби се отстраняват и се отчита смъртността.

Видимите отклонения (например: губене на равновесие, промени в поведението при плуване, дишане, пигментация, и др.) се описват.

Ежедневно се извършват измервания на рН, на разтворения кислород и на температурата.

## **2. ОЦЕНКА НА ДАНИТЕ**

На логаритмично-вероятностна хартия се нанасят процентите смъртност за всеки препоръчан период на експозиция, в зависимост от концентрациите. Получените точки се свързват и се отбелязва концентрацията, отговаряща на 50% отговор (смъртност) (виж фигура от допълнение 3).

По този начин се получава ЛК<sub>50</sub> за съответния период на експозиция.

Ако данните са достатъчни средната летална концентрация (ЛК<sub>50</sub>) и доверителните ѝ граници ( $p=0,05$ ) могат да бъдат изчислени като се използва класически метод.

Стойността на ЛК<sub>50</sub> трябва да бъде закръглена до една или максимум две значещи цифри.

Когато наклонът на кривата е много голям и не позволява изчисление на ЛК<sub>50</sub>, е достатъчно да се извърши графично определяне на тази стойност.

Когато две последователни концентрации в съотношение 1,8 дават само 0 или само 100% смъртност, тези две стойности са достатъчни за посочване на интервала, в който се намира ЛК<sub>50</sub>.

Ако се установи, че стабилността или хомогенността на изпитваното вещество не могат да бъдат поддържани, това наблюдение трябва да бъде отбелязано и резултатите да бъдат интерпретирани внимателно.

## **3. ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа:

- информация за изпитвания организъм (научно име, вид, доставчик, евентуално предварителна обработка, размер и брой, използвани за всяка концентрация на изпитване),

- списък на използваните концентрации и всички достъпни данни за стабилността на изпитваното вещество в разтвор при тези концентрации,
- описание на апаратурата за изпитване,
- при извършване на химични анализи – използвани методи и получени резултати,
- произход на водата за разреждане и основните ѝ характеристики (рН, твърдост, температура),
- евентуално концентрации на спомагателните вещества,
- в случай на вещества слабо разтворими във вода, метод на получаване на матерния разтвор и разтвора за изпитване,
- мотиви за избора и детайли на използвания метод на изпитване (например: продължителност на изпитване, статична, полу-статична и динамична система, количество на подновяване, аерация или не, зареждане с риба и т.н.),
- данни за осветлението,
- максимална изпитвана концентрация, непредизвикваща смъртност по време на изпитването,
- минимална изпитвана концентрация, предизвикваща 100% смъртност по време на изпитването,
- обща смъртност за всяка концентрация и за контролно изпитване (доверителни граници от 95% по възможност),
- статистически методи, използвани за определяне на стойностите на ЛК<sub>50</sub>,
- графично представяне на процентите смъртност в зависимост от концентрациите в края на изпитването,
- наклон на кривата и доверителните ѝ граници от 95%,
- концентрация на разтворен кислород, рН и температура на изпитваните разтвори на всеки 24 часа,
- ако е използвано сравнително вещество, неговото име и получените резултати,
- качествените критерии трябва да се спазват.

#### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 203*, Decision of the Council C(81) 30, Final.

*Допълнение 1*  
**Регенерирана вода**

*Пример за подходяща вода за разреждане*

Химичните продукти трябва да бъдат с качество за анализ.

Водата трябва да бъде дестилирана вода с добро качество или дейонизирана вода с проводимост по-ниска от  $5 \mu\text{Scm}^{-1}$ .

*Матерни разтвори*

CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O (калциев хлорид, дихидрат):	11,76 g
Да се разтвори във вода, да се допълни до един литър.	
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O (магнезиев сулфат, хептахидрат):	4,93 g
Да се разтвори във вода, да се допълни до един литър.	
NaHCO <sub>3</sub> (натриев хидрокарбонат):	2,59 g
Да се разтвори във вода, да се допълни до един литър.	
KCl (калиев хлорид):	0,23 g
Да се разтвори във вода, да се допълни до един литър.	

*Регенерирана вода за разтваряне*

Смесват се 25 ml от всеки от четирите матерни разтвора и се допълват с вода до 1 литър.

Аерира се до насищане с разтворен кислород.

Стойността на рН трябва да бъде  $7,9 \pm 0,3$ .

При нужда рН се регулира с NaOH (натриев хидроксид) или HCl (солна киселина).

Така приготвената вода за разреждане се оставя в покой около 12 часа и не трябва повече да бъде аерирана.

Сумата от Ca и Mg йони в този разтвор е равна на 2,5 mmol/l. Отношението между Ca и Mg йони (Ca:Mg) е 4:1, а между Na и K йони (Na:K) - 10:1. Общата алкалност на този разтвор е равна на 0,8 mmol/l.

Евентуалните различия в приготвянето на водата за разреждане не трябва да променят съдържанието и свойствата ѝ.

Допълнение 2

Видове риби, препоръчвани за изпитването

Препоръчан вид	Препоръчан температурен интервал на изпитване (°C)	Препоръчвана пълна дължина на изпитваното животно(см)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Риба-зебра	от 20 до 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) Fathhead minnow	от 20 до 24	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Обикновен шаран	от 20 до 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) Killifish	от 20 до 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulate</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Гупи	от 20 до 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Linneaus 1758) Bluegill	от 20 до 24	5,0 ± 2,0
<i>Salmo gairdneri</i> (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Дъгова пъстърва	от 13 до 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Golden orfe Мъздруга	от 20 до 24	6,0 ± 2,0

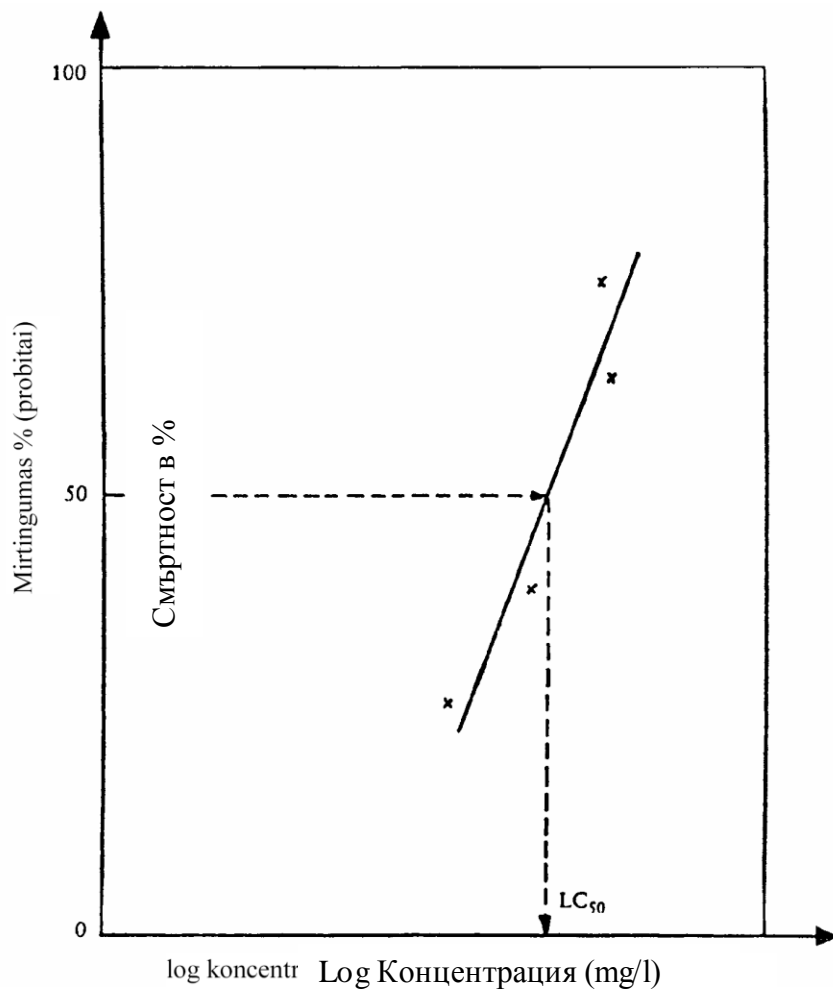
Доставка

Посочените по-горе риби са лесни за отглеждане и/или на разположение през цялата година. Те могат да се размножават и развиват или в басейни или при лаборатория, при контролирани санитарни условия. Изпитваното животно трябва да бъде здраво и с известен произход. Тези риби са на разположение почти навсякъде по света.

Допълнение 3

Пример за крива: процент смъртност/концентрация

Пример за определяне на ЛК<sub>50</sub> върху логаритмично-вероятностна хартия



## Допълнение 4

### Примери за стандартизирани методи

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 203*, Decision of the Council, C(81) 30, Final.
- 2) ISO/TC/147/SC 5/WG/3. - *Draft proposal for screening chemicals and products for acute toxicity to fish using a static, semi-static or flow-through method*, Document 7346/I, II, III, 1980/06/15 ISO/DP.
- 3) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz : *Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden - Part II* 1974.
- 4) DIN *Testverfahren mit Wasserorganismen*, 38 412 (L1) und L (15).
- 5) AFNOR, *Determination de la toxicité aigue d'une substance vis-à-vis de Brachydanio rerio*, T90-303.
- 6) JIS K 0102, *Acute toxicity test for fish*.
- 7) *Degradability, ecotoxicity and bioaccumulation. The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment*, volumes I and II, Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands 1980.
- 8) Environmental Protection Agency, 1975, *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.
- 9) Environmental Protection Agency, January 1978, *Environmental monitoring and support laboratory*, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012.
- 10) Environmental Protection Agency, *Toxic Substance Control*, 16 March 1979, part IV.
- 11) *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 14th edition, 1975, APHA-AWWA-WPCF.
- 12) Commission of the European Communities, *Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish*, CEE Study D. 8368, 22 March 1979.
- 13) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., *A simplified method for evaluating dose effects experiments*, *J. Pharm, Exp. Therap.*, vol. 96, 1949, p. 99.



## **В.2. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ ПРИ ДАФНИИТЕ**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Преди започване на изпитването е желателно е да се разполага, до колкото е възможно, с данни за водоразтворимостта, парното налягане, химичната стабилност, константите на дисоциация и биодеградацията на изпитваното вещество.

При планиране на изпитването и интерпретацията на резултатите трябва да бъде взета предвид и допълнителна информация (например структурна формула, чистота в проценти, природа и процент значими примеси, наличие и количество добавки и коефициент на разпределение н-октанол/вода).

#### **1.2. Определение и единици**

Изискването в Директивата относно ЛК<sub>50</sub> за дафния се счита за изпълнено с определянето на ЕК<sub>50</sub>, така както е описано в настоящия метод на изпитване.

В настоящото изпитване, острата токсичност се изразява чрез средната ефективна концентрация (ЕК<sub>50</sub>) на имобилизация. Това е концентрацията (в начална стойност), която имобилизира 50% от изпитваната група дафнии за период на експозиция от 24 часа. При възможност може също да бъде определена ЕК<sub>50</sub> за 48 часа. Всички концентрации на изпитваното вещество се изразяват като тегло към обем (mg/l) и също като тегло към тегло (част от милион, ppm).

#### **Имобилизация**

Организмите, които не са в състояние да се придвижат в рамките на 15 секунди след леко разбъркване на съда, се смятат за имобилизирани.

Всички концентрации на изпитваното вещество се изразяват като тегло към тегло (част от милион, ppm).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

За да се покаже, че при лабораторните условия на изпитване, чувствителността на изпитваният вид не се е променила значително, може да бъде извършено изпитване със сравнително вещество.

За това изпитване няма посочено сравнително вещество.

#### **1.4. Принцип на метода на изпитване**

Дафниите се експонират в продължение на 24 часа на изпитваното вещество, разрежено във вода до различни концентрации; при необходимост продължителността на експозиция може да бъде увеличена до 48 часа.

При еднакви условия на изпитване, за даден интервал от ефективни концентрации, различните концентрации на изпитваното вещество предизвикват различни ефекти в подвижността на дафниите. Следователно, в края на изпитването, на всяка концентрация отговаря различен процент на имобилизиране на дафниите.

Концентрациите, предизвикващи от 0 до 100% имобилизации, се определят директно чрез наблюдение, докато ЕК<sub>50</sub> – 24 часа (както и ЕК<sub>50</sub> – 48 часа) се определя, ако е възможно, чрез изчисление.

При този метод се използва статична система, без подновяване на изпитваните разтвори по време на периода на експозиция.

### **1.5. Критерии за качество**

Имобилизацията на контролите не трябва да превишава 10 % в края на изпитването.

Концентрацията на кислород не трябва да бъде по-ниска от 2 милиграма на литър в края на изпитването.

Изпитваните дафнии не трябва да бъдат увеличени на повърхността на водата, поне при контролата.

### **1.6. Описание на метода на изпитване**

#### *1.6.1. Реактиви*

##### **1.6.1.1. Разтвори на изпитваните вещества**

Матерните разтвори с необходимите концентрации се подготвят чрез разтваряне на веществото в дейонизирана вода, или във вода, в съответствие с описанието в точка 1.6.1.2.

Матерните разтвори на веществата със слаба водоразтворимост могат да бъдат приготвени чрез ултразвуково диспергиране или, при необходимост, използвайки органични разтворители, емулгатори или диспергатори. При използване на такъв тип спомагателно вещество, контролните дафнии трябва да бъдат експонирани на концентрация на спомагателното вещество, съответстваща на максимална концентрация на изпитваното вещество. Концентрацията на тези спомагателни вещества не трябва да превишава 0,1 грам на литър.

Концентрациите, избрани за изпитването се приготвят чрез разреждане на матерния разтвор. При провеждане на изпитване с високи концентрации, веществото може да бъде разтворено директно във водата за разреждане.

Изпитването трябва да бъде извършвано без регулиране на рН. В случай на значителни промени на рН, се препоръчва изпитването да бъде повторено с регулиране на стойността на рН и резултатите да бъдат описани. В такъв случай, стойността на рН на матерния разтвор трябва да бъде изравнена със стойността на рН на водата за разреждане, освен ако няма особени, противоположни причини. За тази цел се предпочита използването на HCl и NaOH. Това регулиране на рН трябва да бъде извършено така, че концентрацията на изпитваното вещество в матерния разтвор да не се промени значително. Ако регулирането води до химична реакция или до утаяване на изпитваното вещество, изпитването не трябва да продължи без това наблюдение да бъде отбелязано в протокола.

##### **1.6.1.2. Води за отглеждане и за разреждане**

При това изпитване може да бъде използвана всяка природна или регенерирана вода, подходяща за отглеждането на дафнии (виж допълнението).

С цел да се избегне извършването на адаптации преди изпитването, се препоръчва водата за отглеждане да бъде идентична на водата за отглеждане, използвана при изпитването.

### 1.6.2. Апаратура

Използва се обикновено лабораторно оборудване. Препоръчва се материалът, който ще влиза в контакт с разтворите за изпитване да бъде от стъкло:

- устройство за измерване на кислород (с микро-електрод или всяко друго устройство, подходящо за измерване на кислород в проби с малък обем),
- подходяща апаратура за контрол на температурата,
- рН-метър,
- уред за определяне на твърдостта на водата.

### 1.6.3. Изпитвани организми

*Daphnia magna* или *daphnia pulex*, на възраст над 6 часа и под 24 часа в началото на изпитването, отгледани в лаборатория, без болести и с известен произход (отглеждане – евентуални предварителни третираня и др.).

### 1.6.4. Режим на работа

Окончателното изпитване може да бъде предшествано от предварително изпитване, даващо информация за интервала от концентрации, който да бъде използван по време на окончателното изпитване. В допълнение към сериите от изпитвания трябва да бъде проведено контролно изпитване, извършено със спомагателните вещества, без изпитвано вещество.

Дафниите се експонират на изпитваното вещество при следните условия:

- продължителност:  
най-малко 24 часа,
- брой организми:  
най-малко 20 организма за концентрация на изпитване, за предпочитане разпределени в 4 групи по 5 или в 2 групи по 10,
- биологично зареждане:  
на всеки организъм трябва да бъдат приложени най-малко 2 милилитра от разтвора за изпитване,
- концентрация на изпитване:  
разтворът за изпитване трябва да бъде приготвен непосредствено преди вкарването на дафниите, за предпочитане без използване на други, различни от вода, разтворители. Концентрациите, образуващи геометрична серия със съотношение 1,8 и позволяващи получаването на 0 и 100% имобилизация след 24 часа и серия от междинни степени на имобилизация, позволяваща изчислението на  $EK_{50-24}$  часа, трябва да бъдат изпитани заедно с контролата,
- вода:  
виж точка 1.6.1.2,
- светлина:  
фотопериод е факултативен, пълна тъмнина е приемлива,
- температура:  
температурата на изпитване трябва да бъде между 18 и 22 °С, като за всяко изпитване тя трябва да бъде постоянна до  $\pm 1^\circ\text{C}$ ,

- аерация:  
да не се аерира с барботиране,

- храна:  
няма.

Стойността на рН и концентрацията на кислород за контролите и за всички концентрации на изпитване трябва да бъдат измервани в края на изпитването; стойността на рН на разтворите за изпитване не трябва да бъде променяна.

Летливите вещества трябва да бъдат изпитвани в напълнени и херметично затворени съдове, достатъчно големи за да бъде избегната липсата на кислород.

Дафниите се изследват най-малко след 24 часа на експозиция и отново след 48 часа, ако има продължение на изпитването.

## **2. ОЦЕНКА НА ДАННИТЕ**

На логаритмично-вероятностна хартия се нанасят процентите обща имобилизация в зависимост от концентрациите, след експозиция най-малко от 24 часа. Получените точки се свързват и се отбелязва концентрацията отговаряща на 50% имобилизация.

Ако данните са достатъчни, средната концентрация  $EK_{50}$  и доверителните ѝ граници ( $p=0,05$ ) могат да бъдат изчислени като се използва класически метод.

Стойността на  $EK_{50}$  трябва да бъде закръглена до една или максимум две значещи цифри.

Когато наклонът на кривата е много голям и не позволява изчисление на  $EK_{50}$ , е достатъчно да бъде извършено графично пресмятане на тази стойност.

Когато две последователни концентрации в отношение 1,8 дават само 0 или само 100% имобилизация, тези две стойности са достатъчни за посочване на границите, в които се намира  $EK_{50}$ .

Ако се установи, че стабилността или хомогенността на изпитваното вещество не могат да бъдат поддържани, резултатите трябва да бъдат интерпретирани внимателно и това да бъде посочено в протокола.

## **3. ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа:

- информация за изпитвания организъм (научно име, вид, доставчик или произход, евентуално предварителна обработка, метод на отглеждане, включително източник, природа, количество и честота на хранене),
- брой дафнии, използвани при всяка концентрация на изпитване,
- използвани концентрации и всички достъпни данни за стабилността на изпитваното вещество в изпитвания разтвор при тези концентрации,

- описание на съдовете, използвани за изпитване: обем на разтвора, съдържащ се във всеки от тях, брой организми,
- използвани методи и резултати, ако са извършени химични анализи,
- произход на водата за разреждане и основните ѝ характеристики,
- концентрациите на всяко използвано спомагателно вещество (органични разтвори, диспергенти, и др.),
- данни за осветлението,
- максимална концентрация на изпитване, не предизвикваща никаква имобилизация по време на изпитването,
- минимална концентрация на изпитване, предизвикваща 100% имобилизация по време на изпитването,
- процент обща имобилизация в контролното изпитване, в контролното изпитване с допълнително вещество и за всяка концентрация на изпитване, за препоръчителните периоди на наблюдение (24 часа или 24 и 48 часа),
- стойности на  $EK_{50}$  за всеки препоръчителен период на наблюдение (с доверителни граници от 95%, ако е възможно),
- графично представяне на процентите имобилизация в зависимост от концентрациите в края на изпитването,
- статистически методи, използвани за определяне на стойностите на  $EK_{50}$ ,
- наклон на кривата след 24 часа и доверителните ѝ граници от 95%,
- концентрация на разтворен кислород, стойности на рН и температура на изпитваните разтвори,
- ако е използвано сравнително вещество, неговото име и получените резултати,
- качествените критерии трябва да се спазват.

#### 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guidelines 202*, Decision of the Council C(81) 30, Final.
- 2) ISO *Inhibition of mobility of Daphnia magna* Straus (*Cladocera - crustacea*) ISO/6341.
- 3) AFNOR *Inhibition of mobility of Daphnia magna* Straus (*Cladocera - crustacea*) NFT 90 301.
- 4) DIN *Testverfahren mit Wasserorganismen* 38412 (L1) und (L11).

*Допълнение*  
**Регенерирана вода**

*Пример за подходяща вода за разреждане*

Химичните продукти трябва да бъдат чисти за анализ.

Водата трябва да бъде дестилирана вода с добро качество или дейонизирана вода с проводимост по-ниска от  $5 \mu\text{Scm}^{-1}$ .

*Матерни разтвори*

CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O (калциев хлорид, дихидрат):	11,76 g
разтворен във вода до получаване на един литър.	
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O (магнезиев сулфат, хептахидрат):	4,93 g
разтворен във вода до получаване на един литър.	
NaHCO <sub>3</sub> (натриев хидрокарбонат):	2,59 g
разтворен във вода до получаване на един литър.	
KCl (калиев хлорид):	0,23 g
разтворен във вода до получаване на един литър.	

*Регенерирана вода за разтваряне*

Смесват се 25 мл от всеки от четирите матерни разтвора и се допълват с вода до 1 литър.

Аерира се до насищане с разтворен кислород.

Стойността на рН трябва да бъде  $7,9 \pm 0,3$ . При нужда стойността на рН се регулира с NaOH (натриев хидроксид) или HCl (солна киселина).

Така приготвената вода за разреждане се оставя в покой около 12 часа и не е необходимо повече да бъде аерирана.

Сумата от Ca и Mg йони в този разтвор е равна на 2,5 mmol/l. Отношението между Ca и Mg йони (Ca:Mg) е 4:1, а между Na и K йони (Na:K) - 10:1.

Общата алкалност на този разтвор е равна на 0,8 mmol/l.

Всяко различие в приготвянето на водата за разреждане не трябва да променя съдържанието или свойствата ѝ.

### В.3. БИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ: МОДИФИЦИРАН ОИСП СКРИНИНГ ТЕСТ

#### 1. МЕТОД

##### 1.1. Увод

Цел на метода е измерване на биоразграждането на водоразтворими и нелетливи органични съединения, в аеробна водна среда, при начална концентрация, съответстваща на 5 до 10 милиграма разтворен органичен въглерод (РОВ) на литър. Ако границите на чувствителност на анализаторите на органичен въглерод се подобрят, използването на ниски концентрации на изпитване би било полезно, особено за токсични съединения. Трябва да бъде определено съдържанието на органичен въглерод в изпитваното вещество.

Методът е приложим само за органични вещества, които при концентрацията на изпитване (5 до 40 mg РОВ/l):

- са разтворими във вода,
- имат пренебрежимо парно налягане,
- не проявяват инхибиращ ефект върху бактериите,
- не се адсорбират значително върху стъклени повърхности.

За интерпретация на получените резултати, особено в случаите когато резултатите са ниски, е полезно да се знаят относителните пропорции на основните елементи, съставляващи изпитваното вещество.

Познаването на прага на токсичност на даденото вещество по отношение на микроорганизми може да бъде полезно за интерпретиране на ниски резултати и за избиране на подходящи концентрации на изпитване.

##### 1.2. Определения и единици

Разграждането се изразява в проценти отстранен РОВ, по отношение на началната му стойност:

$$D_t = \left[ 1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100,$$

където:

$D_t$  = разграждане в проценти отстранен РОВ, в момент  $t$ ,

$C_0$  = начална концентрация на РОВ на средата на отглеждане на култури (mg РОВ на литър),

$C_t$  = концентрация на РОВ на средата за отглеждане на култури, в момент  $t$  (mg РОВ на литър),

$C_{bl(0)}$  = начална концентрация на РОВ на контролата (mg РОВ на литър),

$C_{bl(t)}$  = концентрация на РОВ на контролата, в момент  $t$  (mg РОВ на литър).

##### 1.3. Сравнителни вещества

За проверка на активността на субстанцията (оникулума) е желателно да бъдат използвани подходящи сравнителни вещества. За тази цел могат да бъдат използвани, например, анилин, натриев ацетат или натриев бензоат. Разграждането на тези вещества трябва да бъде по-голямо или равно на 70% за 10 дни, чието броене започва от деня, когато процентът наблюдавано биоразграждане е за пръв път по-висок от 10%. За да бъде валидно изпитването, тези резултати трябва да

бъдат получени за срок от 28 дни. В противен случай то трябва да бъде повторено като се използва субстанция (оникулум) с различен произход.

#### **1.4. Принцип на метода на изпитване**

Определено количество от веществото се разтваря в неорганична среда (разтвор от минерални хранителни елементи, обогатен с разтвор на микроелементи и разтвор от необходимите витамини) така, че да се получи концентрация, отговаряща на 5 до 40 милиграма РОВ на литър. След това този разтвор се посява с малко количество различни видове микроорганизми, аерира се при температура 20 до 25 °С и се държи на тъмно или при дифузна светлина.

Разграждането се проследява чрез определяне на РОВ за период от 28 дни.

Методът се проверява с помощта на сравнително вещество.

За определяне на концентрациите на РОВ на средите, паралелно се извършва «празен опит», не съдържащ нито изпитвано, нито сравнително вещество.

#### **1.5. Критерии за качество**

Възпроизводимостта на метода е установена чрез сравнително изпитване между ЕИО и ОИСР.

Най-ниската концентрация на изпитваното вещество, за която методът може да бъде приложен се определя до голяма степен от границата на детекция при анализ на органичния въглерод (в момента - 0,5 mg C/l) и от концентрацията на разтворения органичен въглерод в хранителния разтвор.

#### **1.6. Описание на метода**

##### *1.6.1. Реактиви*

##### *1.6.1.1. В о д а*

За разтворител основно се използват деминерализирана или дестилирана вода, без следи от токсични вещества (особено мед). Може да бъде използвана само вода, която е деминерализирана чрез дестилация или йонен обмен.

Дестилираната вода не трябва да съдържа повече от 10 % от органичния въглерод, внесен чрез изпитваното вещество.

За анализ на РОВ с концентрации между 0 и 40 милиграма на литър е необходима вода с висока чистота. Замърсявания се получават не само от примесите във водата, но и от йонообменните смоли и микробните пролиферации (бактерии или водорасли, развиващи се под действие на светлината, и др.). За една серия от изпитвания трябва да бъде използвана вода само от една партида, като предварително трябва да бъде проверена чрез анализ на РОВ. При необходимост водата може да бъде пречистена чрез облъчване с УВ или чрез други методи.

##### *1.6.1.2. Х р а н и т е л е н   р а з т в о р*

В 1 литър хранителен разтвор се съдържа по 1 милилитър от всеки от следните а) до е) водни разтвори (1.6.1.1.) (РА означава реактив чист за анализ):

а)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (калиев дихидрофосфат): РА 8,50 g



- $K_2HPO_4$  (калиев хидрофосфат): PA 21,75g
- $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$  (натриев хидрофосфат дихидрат): PA 33,40 g
- $NH_4Cl$  (амониев хлорид): PA 20,00 g
- Разтваря се и се допълва до 1 000 ml с вода (1.6.1.1).  
Стойността на рН трябва да бъде 7,2.
- б)  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (магнезиев сулфат хептахидрат): PA 22,50 g
- Разтваря се и се допълва до 1 000 ml с вода (1.6.1.1).
- в)  $CaCl_2$  (калциев хлорид): PA 27,50 g
- Разтваря се и се допълва до 1 000 ml с вода (1.6.1.1).  
Този разтвор трябва да бъде приготвен непосредствено преди изпитването.
- г)  $FeCl_3 \times 6H_2O$  (железен (III) хлорид хексахидрат): PA 0,25 g
- Разтваря се и се допълва до 1 000 ml с вода (1.6.1.1).
- д) Разтвор от микроелементи:
- $MnSO_4 \times 4 H_2O$  (манганов (II) сулфат тетрагидрат) PA 39,9 mg  
(= 30,23 mg  $MnSO_4 \times H_2O$ ) :
- $H_3BO_3$  (борна киселина): PA 57,2 mg
- $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  (цинков сулфат хептахидрат): PA 42,8 mg
- $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$  (амониев(IV) хептамолибдат)  
(= 36,85 mg  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$ ): PA 34,7 mg
- Fe-хелатно ( $FeCl_3 \times EDTA$ ) PA 100,0 mg
- Разтваря се и се допълва до 1 000 ml с вода (1.6.1.1).  
Матерният разтвор от микроелементи се стерилизира при температура 120 °C, налягане 2 атмосфери, за 20 минути
- е) Витаминен разтвор
- Биотин : PA 0,2 mg
- Никотинова киселина: PA 2,0 mg
- Тиамин (витамин B1): PA 1,0 mg
- p*-аминобензоена киселина: PA 1,0 mg
- Пантотенова киселина (витамин B5): PA 1,0 mg
- Пиридоксамин (витамин B6): PA 5,0 mg
- Цианкобаламин (витамин B12): PA 2,0 mg
- Фолиева киселина: PA 5,0 mg
- Разтваря се и се допълва до 100 ml с вода (1.6.1.1).  
Разтворът се филтрува през 0,2  $\mu m$  стерилна мембрана.  
Вместо разтвор 1.6.2.1. (е) може да бъде използван 15 mg екстракт от мая (фермент), разтворен в 100 милилитра вода (1.6.1.1).

### 1.6.1.3. Сравнителни вещества

Анилин (прясно дестилиран), натриев ацетат, натриев бензоат.

### 1.6.1.4. Разтвор на живачен хлорид

1 %  $\text{HgCl}_2$  във вода (1.6.1.1).

## 1.6.2. Апаратура

1.6.2.1. Бъркалка, върху която могат да бъдат поставени Ерленмайерови колби от 2 литра, с автоматично регулиране на температурата или поставена в термостатична обвивка при температура 20 - 25 °C.

1.6.2.2. Ерленмайерови колби от 2 литра с тясно гърло. Преди употреба колбите трябва много внимателно да бъдат почистени с алкохолен разтвор на солна киселина, изплакнати и изсушени за да бъде избегнато замърсяване с остатъци от предишни изпитвания. Даже, ако колбите са нови, за да се премахне всякакъв риск от замърсяване, преди първата им употреба трябва да бъдат изчистени по посочения начин.

1.6.2.3. Устройство за филтриране през мембрана.

1.6.2.4. Мембранни филтри от 0,2  $\mu\text{m}$ .

1.6.2.5. Въглероден анализатор.

## 1.6.3. Приготвяне на субстанцията (оникулума)

Посявката може да бъде извършена с всяка една от субстанциите, получени по описаните по-долу начини, при условие, че валидността ѝ е проверена със сравнително вещество (1.6.1.3).

### 1.6.3.1. Субстанция (оникулум) от отпадни води

За предпочитане е субстанцията (оникулума) да бъде получавана от отпадни води с добро качество, взети от станция, обработваща най-вече битови води. Пробата от отпадни води трябва да бъде аерирана от момента на вземане до използването ѝ. За приготвяне на субстанцията пробата се филтрува през едър филтър, като първите 200 милилитра се отделят. Филтратът, подходящо аериран, трябва да бъде използван същия ден.

### 1.6.3.2. Субстанция (оникулум) от почва

100 грама почва (плодородна, нестерилна) се поставят в суспензия от 1 000 милилитра питейна вода без хлор (не могат да бъдат използвани почви с високо съдържание на глина, пясък или органичен въглерод). След разбъркване суспензията трябва да бъде оставена в покой за 30 минути.

Супернатантът се филтрува с едър филтър, като първите 200 милилитра се отделят. Филтратът веднага се аерира и аерацията продължава до използването му; той трябва да бъде използван същия ден.

### 1.6.3.3. Субстанция (оникулум) от повърхностна вода

Проба от повърхностна вода се филтрува през едра филтърна хартия, отделяйки първите 200 милилитра. Филтратът, подходящо аериран до употребата му, трябва да бъде използван същия ден.

#### 1.6.3.4. Смесена субстанция (оникулум)

Проби с еднакви обеми от трите типа субстанции, описани по-горе, се смесват добре и така се получава крайната субстанция (оникулум).

Валидността на субстанцията (оникулума) се проверява с помощта на сравнително вещество (1.6.1.3).

#### 1.6.4. Режим на работа

Изпитваните и сравнителните вещества (1.6.1.3) се изпитват по два пъти. Допълнително се извършва празно изпитване (за определяне на РОВ) със субстанция (оникулум), но без прибавяне на изпитвано или сравнително вещество.

Приготвя се матерен разтвор на изпитваното вещество във вода (1.6.1.1). Към хранителния разтвор (1.6.1.2) се прибавя такова количество от този матерен разтвор, че да бъде получена концентрация на РОВ от 5 до 40 милиграма на литър. Сравнителното вещество (1.6.1.3) трябва да бъде изпитвано при начална концентрация от 20 милиграма РОВ на литър.

Във всеки един от двата съда (1.6.2.2) се изсипва 900 милилитра от така приготвената хранителна среда и се посяват с 0,5 милилитра субстанция (оникулум) (1.6.3). Съдовете се покриват например с алуминиево фолио така, че да не бъде нарушен въздушният обмен между съда и околната атмосфера (не може да се използва памук поради анализа на РОВ). След това съдовете се поставят върху бъркалка, като по време на изпитването се поддържа постоянна температура от 20 - 25 °C и са защитени от светлина. Околният въздух не трябва да съдържа замърсители и токсични вещества (хлорирани разтвори и др.).

По време на изпитването за биоразграждане, концентрациите на РОВ трябва да бъдат определяни по два пъти през първия и през двадесет и седмия и двадесет и осмия дни. За проследяване развитието на разграждането трябва да бъдат извършени най-малко три допълнителни анализа (около седми, четринадесети и двадесет и първи ден).

За всяко определяне трябва да бъде вземан само точно определения обем. Центруфугирането или филтруването през мембрана, предшестващи определянето на въглерода, изискват различни обеми в зависимост от използваните апарати. Загубите, дължащи се на изпарение на средата за отглеждане трябва да бъдат коригирани чрез добавяне на необходимото количество вода (1.6.1.1).

Преди всяко вземане на проба, средата трябва добре да бъде разбъркана и веществата, прилепващи към стените на съда трябва да бъдат разтворени или поставени в суспензия. Филтрираните или центрофугирани проби трябва да бъдат анализирани през същия ден; в противен случай на 10 милилитра среда трябва да бъде добавен 0,05 милилитра разтвор на HgCl<sub>2</sub> (1.6.1.4) или пробите да бъдат съхранени при температура между 2 и 4 °C за 24 часа, или при - 18 °C за по-дълги периоди.

Ако преди 28-ия ден се наблюдава плато, изпитването може да се счита за завършено. Ако разграждането явно е започнало преди 28-ия ден, но не е достигнало плато, желателно е изпитването да бъде продължено за 1 или 2 седмици.

Всички тези операции изискват много внимание и осигуряване на много чисти (но не стерилни) съдове, пипети и др.

#### 1.6.5. Определяне на *POB*

Мембранните филтри са подходящи, ако е доказано че не отделят въглерод и не адсорбират изпитваното вещество по време на филтруване.

Ако пробите се центрофугират, това трябва да става при  $40\,000\text{ ms}^{-2}$  (около 4 000 g) за предпочитане в изстудена центрофуга, при всички случаи под 40 °C.

#### *Забележка*

При много ниски концентрации изглежда, че различаването *ООВ* : *POB* чрез центрофугиране не е задоволително, или защото всички бактерии не са елиминирани, или защото въглерод, който е съставна част на бактериалната плазма, е отново разтворен. При по-големи концентрации ( $\geq 10\text{ mg/l}$ ), грешката при центрофугирането изглежда относително малка за идентична инокулация.

Взетата проба (около 30 ml) веднага се центрофугира или филтрира през мембрана чрез филтриращо устройство (1.6.2.3), използвайки мембранни филтри, третиранни както е посочено в точка 1.6.2.4. Първите 20 милилитра от филтратата се отстраняват.

Концентрацията на *POB* на останалия филтрат (около 10 ml) се определя на два пъти чрез въглероден анализатор (1.6.2.5). Ако филтратата не може да бъде анализиран същия ден, той трябва да бъде съхранен както е описано в точка 1.6.4.

## 2. ОЦЕНКА НА ДАННИТЕ

Резултатите от определянията се записват според приложения по-долу модел (допълнение 1), и стойностите на биоразграждането се изчисляват съобразно 1.2.

Концентрациите на *POB* се закръгляват до най-близката една десета от милиграм на литър. Средните стойности на  $D_t$  се закръгляват до най-близкия цял процент.

Протичането на изпитването за разграждане се представя графично на диаграма, чиито модел е приложен (допълнение 2).

Резултатите от изпитването за разграждане са валидни, ако в една и съща серия на изпитване, сравнителното вещество показва процент на отстраняване на *POB*  $\geq 70\%$  за 10 дни, чието броене започва от деня когато процентът наблюдавано биоразлагане е за пръв път по-висок от 10%. Този резултат трябва да бъде получен за срок от 28 дни, като се има предвид продължителността на изпитването, в противен случай цялата серия трябва да бъде отхвърлена.

## 3. ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

### 3.1. Протокол от изпитването

Изпитвателния протокол трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- налични данни (допълнение 1),
- протичането на изпитването за разграждане се представя с диаграма, показваща латентната фаза, фазата на разграждане, наклона на кривата, времеви интервал („времеви интервал“ тук означава период от 10 дни, започващ от деня когато процентът наблюдавано биоразлагане е за пръв път по-висок от 10%),
- доказателства за валидността на изпитването (намаление на РОВ на сравнителното вещество  $\geq 70$  % за 10 дни, считани от деня в който разграждането преминава 10 %, като този резултат трябва да бъде получен в срок от 28 дни, като се има предвид продължителността на изпитването).

### **3.2. Интерпретация на резултатите**

Имайки предвид строгите условия на това изпитване, нисък резултат не означава със сигурност, че изпитваното вещество не е биоразграждащо се в условия на околната среда, а само показва че са необходими допълнителни изследвания, за да се установи този факт.

Изпитваните вещества, за които по време на това изпитване е установена висока степен на биоразграждане се считат за лесно биоразграждащи се, при условие че тази степен се получава за 10 дни, които се броят от денят когато тя превишава за пръв път 10 %.

## **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301E*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- 2) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 3, No 2, 1979, p. 159 - 173.
- 3) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 1, 1981, p. 45 - 55.

Допълнение 1

**Биотично разграждане: Модифициран ОИСП скрининг тест**

Организация, отговорна за изпитването: .....

Изпитвано вещество: .....

Експеримент №:.....

Данни, отнасящи се до изпитването

Теоретична концентрация.....mg/l POB

*Определяне на въглерода*

	Колба №		Концентрация на POB след x дни (mg/l)						
			0(C <sub>0</sub> )						
<i>Изпитване:</i> Хранителен минерален разтвор с изпитвано вещество и с оникулация	1	a <sub>1</sub>							
		a <sub>2</sub>							
		$C_{a(t)} = \frac{a_1 + a_2}{2}$							
	2	b <sub>1</sub>							
		b <sub>2</sub>							
		$C_{b(t)} = \frac{b_1 + b_2}{2}$							
<i>Контрол:</i> Хранителен минерален разтвор без изпитвано вещество, но с оникулация	3	bl <sub>1</sub>							
		bl <sub>2</sub>							
		$C_{bl(t)} = \frac{bl_1 + bl_2}{2}$							

*Оценка на необработените данни*

Колба №	Изчисление на резултатите	% загуба на POB след x дни						
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0						
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0						
Средна стойност (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0						

(\*) не се определя средна стойност между D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub> в случай на голяма разлика.

**Биотично разграждане: Модифициран ОИСП скрининг тест (Бюлетин)**

Организация, отговорна за изпитването:.....  
Ръководител на изпитването: .....  
Начална дата на изпитването: ..... Експеримент № .....  
Изпитвано вещество:.....  
Химична структура: .....  
Матерен разтвор:

	mg/l	mg/l ООВ (*)	mg/l РОВ (**)
Концентрация на изпитваното вещество			

(\*) разлика между стойностите на РОВ и ООВ показва недостатъчна разтворимост на изпитваното вещество.

(\*\*) Всички стойности на РОВ са определени след филтруване през мембрана или центрофугиране.

Въглероден анализатор: .....  
Субстанция (оникулум): .....

*Резултат от изпитването*

$D_t$  = .....% загуба на РОВ след .....дни,

*Валидиране на резултата*

Сравнително вещество: .....

Резултат: .....% загуба на РОВ след .....дни.

Контролен експеримент №.....

*Забележки:*

.....

*(Дата)*

*(Подпис)*

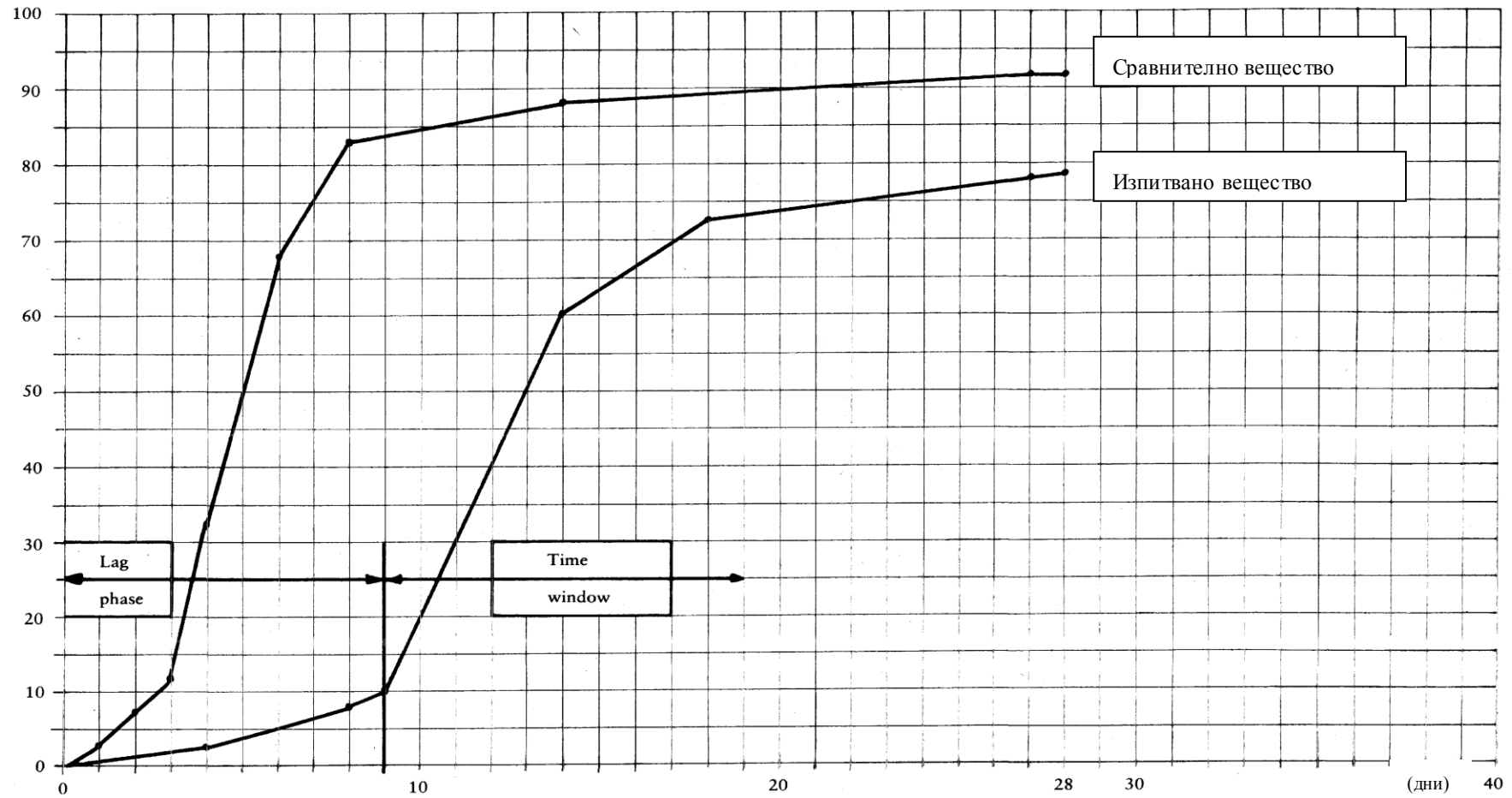


Допълнение 2

Модифициран ОИСР скрининг тест

Организация, отговорна за изпитването:..... Изпитвано вещество:..... Експеримент №. ....

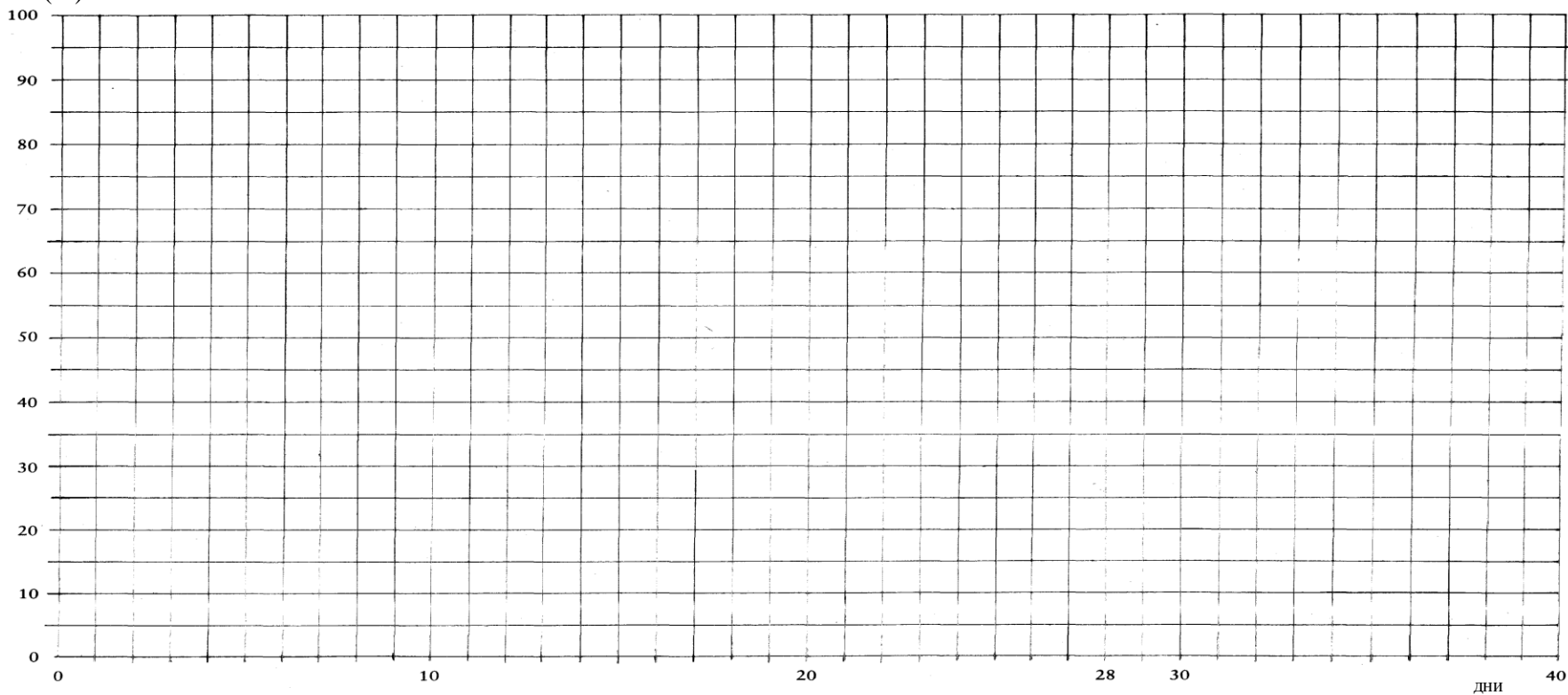
Загуба на  
РОВ, (%)



### Модифициран ОИСР скрининг тест

Организация, отговорна за изпитването:..... Изпитвано вещество:..... Експеримент №. ....

Загуба на  
РОВ (%)





## **В.4. БИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ: МОДИФИЦИРАНО ИЗПИТВАНЕ AFNOR NF T 90/302**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Цел на настоящия метод е измерване на биоразграждането на водоразтворими и нелетливи органични съединения, в аеробна водна среда, при начална концентрация съответстваща на 40 милиграма разтворен органичен въглерод (РОВ) на литър. Ако границите на чувствителност на анализаторите на органичен въглерод се подобрят, използването на ниски концентрации на изпитване би било полезно особено при токсични съединения.

Съдържанието на органичен въглерод в изпитваното вещество трябва да бъде известно.

Методът е приложим само за органични вещества, които при концентрацията на изпитване (40 mg РОВ/l):

- са разтворими във вода,
- имат пренебрежимо парно налягане,
- не проявяват инхибиращ ефект върху бактериите,
- не се адсорбират значително върху стъклени повърхности.

За интерпретация на получените резултати, особено в случаите, когато резултатите са ниски, е полезно да се знаят относителните пропорции на основните елементи, съставляващи изпитваното вещество.

Информация за токсичността на химичното вещество по отношение на микроорганизми може да бъде полезна за интерпретация на ниските резултати.

#### **1.2. Определение и единици**

Разграждането се изразява в проценти отстранен РОВ по отношение на началната му стойност:

$$D_t = \left[ 1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100,$$

където:

$D_t$  = разграждане, в проценти отстранен РОВ, в момент  $t$ ,

$C_0$  = начална концентрация на РОВ на средата на отглеждане на култури (mg РОВ/l),

$C_t$  = концентрация на РОВ на средата на отглеждане на култури, в момент  $t$  (mg РОВ/l),

$C_{bl(0)}$  = начална концентрация на РОВ на контролата (mg РОВ/l),

$C_{bl(t)}$  = концентрация на РОВ на контролата, в момент  $t$  (mg РОВ/l).

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Желателно е активността на субстанцията (оникулама) да бъде проверена с помощта на подходящи сравнителни химични вещества.

За тази цел могат да бъдат използвани примерно анилин, натриев ацетат или натриев бензоат, които трябва да покажат намаляване на съдържанието на РОВ по-голямо или равно на 70% за 10 дни, в противен случай изпитването се анулира и трябва да бъде проведено отново като се използва субстанция (оникулум) с друг

произход.

При този определен метод на изпитване, може да бъде използвана глюкоза най-вече за изпитване на инхибиращия ефект и за тестване на активността на субстанцията (оникулум), което би могло също да бъде извършено с анилин, натриев ацетат и натриев бензоат.

#### 1.4. Принцип на метода на изпитване

Разтворените във вода органични вещества, се разграждат биологично от хио-органотрофни микроорганизми, използващи ги като единствен източник на въглерод и енергия. Тези вещества се изследват при концентрация, при която началното съдържание на органичен въглерод да е 40 милиграма на литър. Останалият в разтвора органичен въглерод се измерва най-малко след 3, 7, 14 и 28 дни. Едновременно с това се изследват евентуалните инхибиторни ефекти на изпитваното вещество по отношение на субстанцията. Процесът се проверява чрез сравнително вещество.

#### 1.5. Критерии за качество

Възпроизводимостта на метода е установена чрез сравнително изпитване между Европейската икономическа общност и Организацията на икономическо сътрудничество и развитие.

Най-ниската концентрация на изпитваното вещество, за която методът може да бъде приложен се определя до голяма степен от границата на чувствителност на анализ на органичния въглерод, която в момента е 0,5 mg C/l и от концентрацията на разтворения органичен въглерод в хранителния разтвор.

#### 1.6. . Описание на метода на изпитване

##### 1.6.1. Реактиви

Химичните вещества трябва да бъдат с призната чистота за анализ.

##### 1.6.1.1. Дестилирана вода

Дестилираната вода не трябва да съдържа повече от 10 % от органичния въглерод, внесен чрез изпитваното вещество.

##### 1.6.1.2. Хранителен разтвор

Изпитваната среда се приготвя както е описано по-долу, като се използват стерилни материали. За 1 литър разтвор, в дестилирана вода се разтварят (РА означава реактив с чистота за анализ):

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (амониев сулфат):	РА 0,300 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (амониев нитрат):	РА 0,150 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (калиев дихидрофосфат):	РА 0,300 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12H <sub>2</sub> O (натриев хидрофосфат додекахидрат):	РА 2,000 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O (магнезиев сулфат хептахидрат):	РА 0,050 g
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O (калциев хлорид дихидрат):	РА 0,050 g
Екстракт от мая (фермент)	РА 0,005 g

Стойността на рН е 7,5 ± 0,1.

Прибавя се 1 милилитър от разтвор на микроелементи със следното съдържание:

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (железен (II) сулфат хептахидрат):	РА 0,100 g
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (манганов (II) сулфат монохидрат):	РА 0,100 g
$\text{K}_2\text{MoO}_4$ (калиев молибдат):	РА 0,025 g
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ (натриев тетраборат декахидрат):	РА 0,025 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (кобалтов (II) нитрат хексахидрат):	РА 0,025 g
$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (меден (II) хлорид дихидрат):	РА 0,025 g
$\text{ZnCl}_2$ (цинков хлорид):	РА 0,025 g
$\text{NH}_4\text{VO}_3$ (амониев ванадат):	РА 0,010 g

Дестилирана вода : 100 ml.

Разтворът от микроелементи може да бъде съхраняван в продължение на 1 месец при температура между + 1°C и + 4 °С.

Допълва се до обема (1 литър) и се хомогенизира. Средата трябва да бъде използвана в рамките на 12 часа.

#### 1.6.1.3. Сравнителни вещества

Анилин (прясно дестилиран), натриев ацетат, натриев бензоат, глюкоза.

#### 1.6.2. Апаратура

Обикновено лабораторно оборудване и:

- апарат за измерване на органичен въглерод,
- спектрофотометър,
- центрофуга (4 000 g),
- бъркалка, позволяваща достатъчна аерация и разбъркване,
- апаратура за измерване на разтворения кислород, рН-метър, конични колби от 500 милилитра с широк отвор, стерилни,
- апаратура за стерилно филтруване (мембрана с размер на пори от 0,22 микрометра ( $\mu\text{m}$ )).

Стъкларията трябва да бъде много старателно изчистена и да няма никакви следи от органични или токсични вещества.

#### 1.6.3. Приготвяне на субстанцията (оникулум)

Взема се достатъчен обем от смес на три проби от замърсени повърхностни води и отточни води от градски пречиствателни станции, без значителни специфични замърсявания. Бактералното съдържание на всяка проба трябва да бъде най-малко  $10^5$  бактерии за милилитър.

Пробите трябва да бъдат използвани за посевка в срок от 12 часа, включително транспорта, и не трябва да остават повече от 6 часа без аерация.

Филтрува се през хартия за елиминиране на най-големите неразтворими частици, филтратът се събира и се прекарва през мембрана с размер на порите 0,22 микрометра ( $\mu\text{m}$ ).

Мие се с подходящ изотоничен разтвор. Отложените върху мембраната бактерии се прехвърлят в малък обем от някакъв изотоничен разтвор. Разбърква се добре. Измерва се абсорбцията при 620 nm и от нея се определя концентрацията на бактериите, като се използва еталонна крива, построена предварително чрез преброяване в твърда среда, използвайки вида *Pseudomonas fluorescens* ATCC 15453. Прибавя се необходимият обем разтвор за довеждане на бактериалната концентрация до  $(5 \pm 3) \times 10^7/\text{ml}$ . Субстанцията се използва през следващия час.

#### 1.6.4. Изпитване

Инкубацията трябва да бъде извършвана в отсъствие на силна светлина, в инкубатор поставен при температура от 20 до 25 °C, без токсични изпарения.

Приготвят се следните разтвори:

1. Разтвор на изпитваното вещество в изпитваната среда, така че да се получи концентрация на органичен въглерод от 40 милиграма на литър.
2. Разтвор на глюкоза в изпитваната среда, така че да се получи концентрация на органичен въглерод от 40 милиграма на литър.
3. Разтвор, съдържащ в изпитваната среда използваните концентрации от изпитваното вещество и от глюкоза.
4. да се разполага също така с достатъчен обем от изпитвана среда.

Разбъркват се поотделно четирите разтвора и се стерилизират чрез филтруване през мембрана.

Мембранните филтри са подходящи, ако е доказано че не отделят въглерод и не адсорбират изпитваното вещество по време на филтруване.

Всички необходими манипулации трябва да бъдат извършвани стерилно. Разтворите се разпределят в колбите за изпитване (предварително стерилизирани) според следната схема:

Колба № 1 (изпитване):	150 ml от разтвор 1
Колба № 2 (изпитване):	150 ml от разтвор 1
Колба № 3 (изпитване):	150 ml от разтвор 1
Колба № 4 (стерилна контрола):	150 ml от разтвор 1
Колба № 5 (глюкозна контрола):	150 ml от разтвор 2
Колба № 6(контрола инхибиращо действие):	150 ml от разтвор 3
Колба № 7 (празно изпитване):	150 ml от разтвор 4

В колби 1, 2, 3, 5, 6 и 7 се посява 1,5 милилитра субстанция (оникулум) и добре се смесва чрез ръчно разбъркване.

От всяка колба се вземат проби от 3 до 5 милилитра.

Пробите се центрофугират при 4 000 g за 15 минути, като температурата се поддържа под 26 °С.

Супернатантите се събират за количествен анализ на органичен въглерод, съответстващ на нулево време.

Колбите се поставят върху бъркалката и се оставят там през цялото време на изпитване: на третия ден концентрацията на разтворен кислород в колба № 5 трябва да бъде равна най-малко на 5 милиграма за литър.

По същия начин както при количествения анализ на органичен въглерод, съответстващ на нулево време, се извършват същите количествени анализи на колби 1, 2, 3, 5, 6 и 7 след инкубационен период най-малко 3, 7, 14 и 28 дни. Въпреки това, ако намаляването на съдържанието на въглерод достигне 95 % от началното съдържание в колби 1, 2 и 3, изпитването се счита за завършено.

Изпитването може да приключи преди двадесет и осмия ден, ако преди тази дата се достигне плато.

Ако на двадесет и осмия ден се наблюдава разграждане, но без да се достигне плато, желателно е изпитването да бъде продължено още 1 или 2 седмици.

В края на изпитването се прави количествен анализ на органичния въглерод в колба n°4 по същия начин както за нулево време и се тества стерилността, като се посее в колба с течна среда за отглеждане на култури и се инкубира при температура 25 °С за 5 дни.

Среда за отглеждане на култури:

Дехидратиран екстракт от мая 3 g  
(фермент)

Панкреатичен казеинов пептон 6 g

Вода 1 000 ml

Компонентите на цялата дехидратирана среда се разтварят в кипяща вода. При необходимост да се регулира рН по такъв начин, че след стерилизация да достигне  $7,2 \pm 0,2$  при 20 °С.

Ако количествените анализи на органичния въглерод трябва да бъдат отложени, супернатантите се съхраняват при 4 °С, на тъмно, в стъклени шишета, запушени херметично; приемливата максимална продължителност на съхранение е 24 часа. Ако анализът не може да бъде извършен в срок от 24 часа, пробите се замразяват при температура по-ниска от -18 С.

За компенсирание на водните загуби, дължащи се на изпарение, преди всяко вземане на проба се проверява обема на средата в колбата и се прибавя, ако е необходимо, дестилирана вода, стерилизирана чрез филтруване през мембрана с размер на порите от 0,22 микрометра ( $\mu\text{m}$ ), така че обемът да бъде доведен до стойността му, измерена след предишното вземане на проба.

## 2. ОЦЕНКА НА ДАНИТЕ



Резултатите от анализите се записват според приложения модел (допълнение 1) и стойностите на биоразграждане се изчисляват съобразно с точка 1.2.

Резултатите от изпитването за биоразграждане са валидни, ако са изпълнени следните условия:

- на седмия ден, процентът на разграждане на глюкозата в колба № 5 трябва да бъде най-малко 80 %,
- в края на изпитването, колба № 4 трябва да бъде все още стерилна,
- на третия ден, концентрацията на разтворения кислород в колба № 5 трябва да бъде най-малко 5 милиграма на литър.

На седмия ден процентът на биоразграждане на глюкозата в колба № 6 трябва да бъде равен най-малко на 75 % от тази, наблюдавана в колба № 5. Ако тази граница не е достигната, може да бъде предположено, че изпитваното вещество показва инхибиторен ефект по отношение на намиращите се там бактерии и че следователно методът не е приложим за него при определената концентрация.

#### *Забележки*

Сравнението на процентите отстранен въглерод в колби 1, 2 и 3 от една страна, и в колба № 4, от друга страна, позволява да бъдат разграничени причините за наблюдаваното разграждане:

- физико-химични процеси в колба № 4,
- физико-химични и биологични процеси в колби 1, 2 и 3.

### **3. ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

#### **3.1. Протокол от изпитването**

Изпитвателният протокол трябва да съдържа, по възможност, описание на всички резултати от проведените опити с изпитваното и сравнителното вещества и празните изпитания.

Да се отбележат по-специално следните точки:

- процент на изчезване на веществото в колба № 4 в края на изпитването,
- евентуално наблюдавани процеси на инхибиране,
- доказателства за валидността на изпитването,
- протичането на изпитването за разграждане се представя с диаграма, показваща латентната фаза, фазата на разграждане, наклона на кривата, времеви интервал („времеви интервал“ тук означава период от 10 дни, започващ от деня когато процентът наблюдавано биоразграждане е за пръв път по-висок от 10%),

#### **3.2. Интерпретация на резултатите**

Имайки предвид строгите условия на това изпитване, нисък резултат не означава със сигурност, че изпитваното вещество не е биоразграждащо се при условия на околната среда, а само показва че са необходими допълнителни изследвания за да бъде установен този факт.

Изпитваните химични вещества, за които по време на това изпитване се получава значителна загуба на РОВ, се считат за лесно биоразграждащи се, при условие че тази загуба се получава за 10 дни, които се броят от деня, когато тя превишава за пръв път 10 %.

#### 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301A*, Decision of the Council C(81) 30, Final.
- 2) Gerike, P., Fischer. W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 3, No 2, 1979, p. 159 - 173.
- 3) Gerike, P., Fischer W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 1, 1981, p. 45 - 55.
- 4) AFNOR: *Method for the evaluation in aqueous medium of the biodegradability of so-called "total" of organic products*, T 90-302.

Допълнение 1

Модифицирано изпитване AFNOR NF T 90/302 (Бюлетин)

Експеримент № : .....  
 Начална дата на изпитването : .....  
 Сравнително изпитвано вещество: .....  
 Теоретичен извод от изпитването: .....  
 Въглероден анализ:.....

Количествен въглероден анализ

Среда на отглеждане на култури	Колба №	Концентрация на РОВ след x дни, mg/l				
		t = 0	3	7	14	28 дни
Изпитване	1	1C <sub>0</sub>	1C <sub>3</sub>	1C <sub>7</sub>	1C <sub>14</sub>	1C <sub>28</sub>
Изпитване	2	2C <sub>0</sub>	2C <sub>3</sub>	2C <sub>7</sub>	2C <sub>14</sub>	2C <sub>28</sub>
Изпитване	3	3C <sub>0</sub>	3C <sub>3</sub>	3C <sub>7</sub>	3C <sub>14</sub>	3C <sub>28</sub>
Средна стойност	1 - 3	$\bar{C}_0$	$\bar{C}_3$	$\bar{C}_7$	$\bar{C}_{14}$	$\bar{C}_{28}$
Стерилна контрола	4	4C <sub>0</sub>				4C <sub>28</sub>
Глюкозна контрола	5	5C <sub>0</sub>	5C <sub>3</sub>	5C <sub>7</sub>	5C <sub>14</sub>	5C <sub>28</sub>
Инхибиторна контрола	6	6C <sub>0</sub>	6C <sub>3</sub>	6C <sub>7</sub>	6C <sub>14</sub>	6C <sub>28</sub>
Контрола субстанция	7	C <sub>bl(0)</sub>	C <sub>bl(3)</sub>	C <sub>bl(7)</sub>	C <sub>bl(14)</sub>	C <sub>bl(28)</sub>

Изчисление

	t = 0	3	7	14	28 (дни)
Изпитване	0				
$\left[ 1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$					
Глюкозна контрола	0				
$\left[ 1 - \frac{5C_t - C_{bl(t)}}{5C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$					
Инхибиторна контрола	0				
$\left[ 1 - \frac{6C_t - C_{bl(t)}}{6C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$					

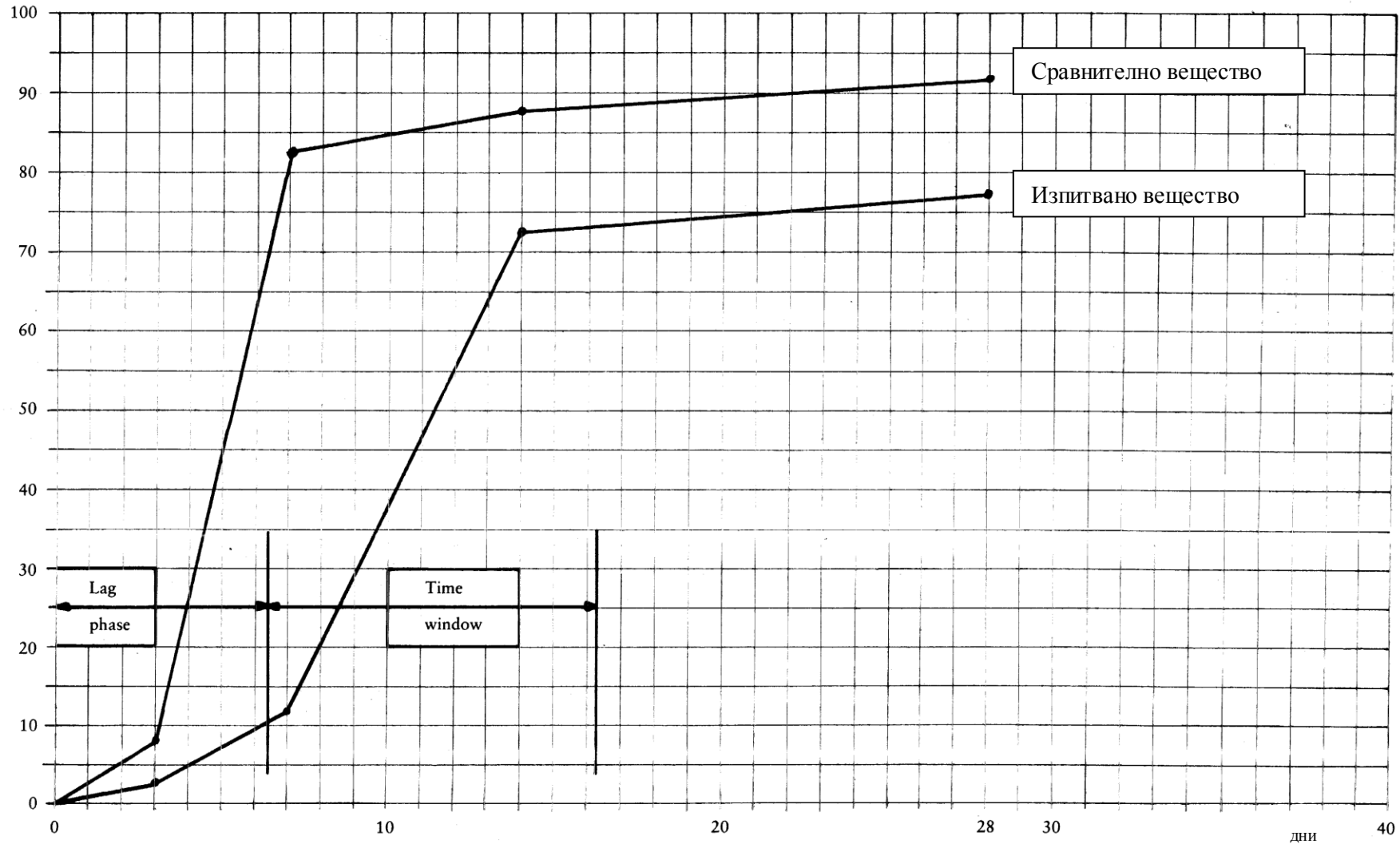
Валидност:

- разтворен кислород, колба № 5, трети ден:.....mg/l,
- процент на биоразграждане, колба № 5, седми ден:.....%,
- процент на биоразграждане, колба № 6, седми ден:.....%,
- стерилност, колба № 4:.....

Модифицирано изпитване AFNOR NF T 90/302

Организация, отговорна за изпитването: ..... Изпитвано вещество: ..... Експеримент № : .....

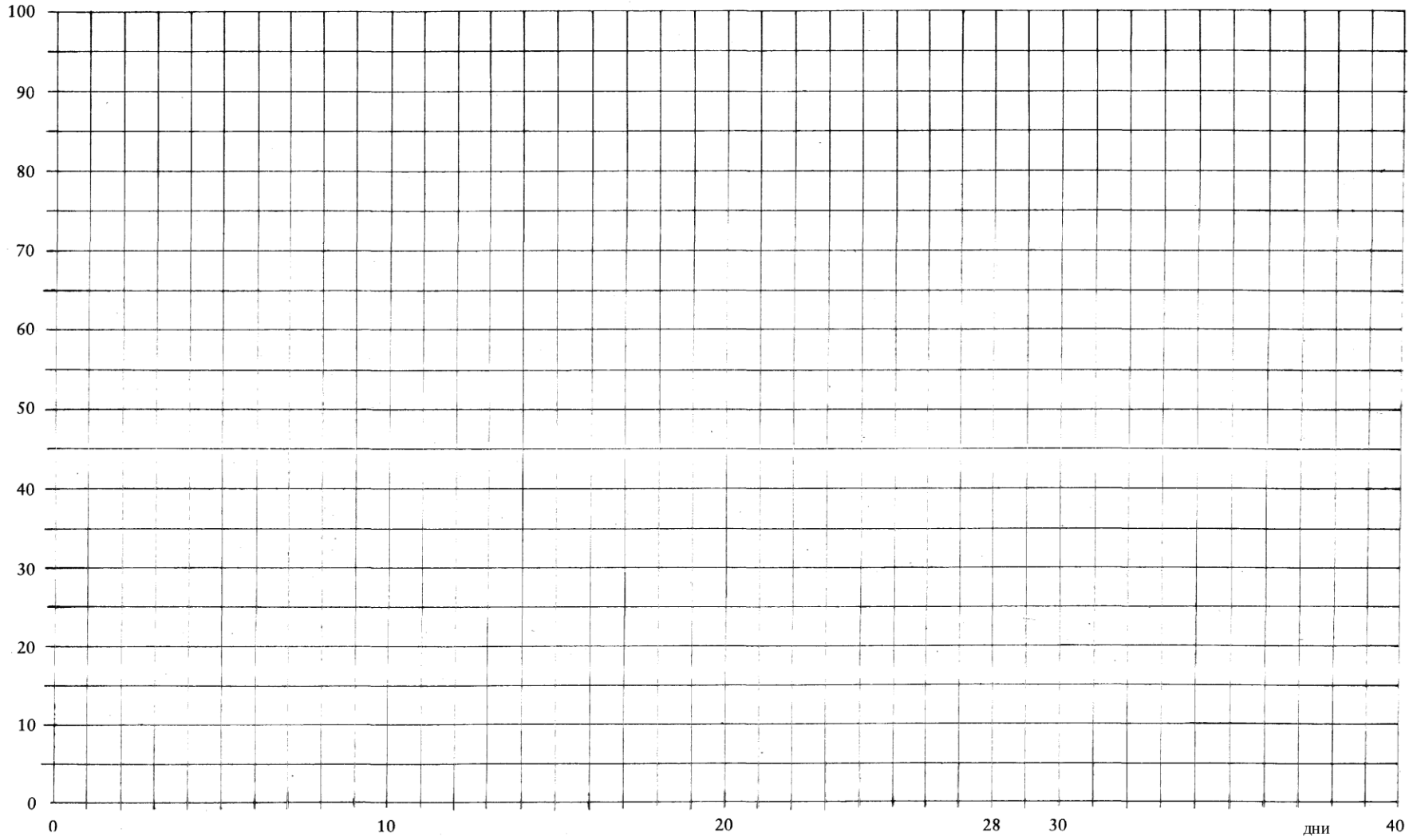
Загуба на POB,  
(%)



Модифицирано изпитване AFNOR NF T 90/302

Организация, отговорна за изпитването: ..... Изпитвано вещество: ..... Експеримент № : .....

Загуба на РОВ,  
(%)



## **В.5. БИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ: МОДИФИЦИРАНО ИЗПИТВАНЕ *STURM***

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Цел на метода е измерване на биоразграждането на нелетливи органични съединения, в аеробна водна среда, при две начални концентрации от 10 и от 20 милиграма на литър (основни концентрации).

Съдържанието на органичен въглерод на изпитвания продукт трябва да бъде известно (анализ на съдържанието на общ органичен въглерод (ООВ) или оценка с помощта на емпиричната формула, позволяваща изчисляването на теоретичната необходимост от  $\text{CO}_2$ ).

Методът е приложим само за изпитване на органични вещества, които при използваната по време на изпитване концентрацията :

- имат пренебрежимо парно налягане,
- не проявяват инхибиращ ефект върху бактериите.

Методът може, по принцип, да бъде прилаган за вещества, слабо разтворими при използваните концентрации.

Данните за относителните пропорции на основните елементи, съставлящи изпитваното вещество са полезни за интерпретация на получените резултати, особено в случаите, когато резултатите са ниски.

Данните за токсичността на химичното вещество по отношение на микроорганизми могат да бъдат полезни за интерпретацията на ниски резултати и за избиране на подходящи концентрации на изпитване.

#### **1.2. Определения и единици**

Разграждането се дефинира чрез количеството  $\text{CO}_2$ , произведено от веществото, изразено в проценти от теоретичната стойност на  $\text{CO}_2$ , който то би трябвало да произведе ( $\text{ThCO}_2$ ), стойност изчислена на базата на съдържанието на органичен въглерод в изпитваното вещество.

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Препоръчва се използването на подходящи сравнителни вещества за проверка на активността на субстанцията (ониколум)а.

За тази цел могат да бъдат използвани, например, анилин, натриев ацетат или натриев бензоат, които трябва да покажат производство на  $\text{CO}_2 \geq 60\%$  за 28 дни, в противен случай резултатът не трябва да бъде зачитан и изпитването трябва да бъде повторено като се използва субстанция с различен произход.

#### **1.4. Принцип на метода на изпитване**

Изпитваното вещество се прибавя към определена течна среда, посята с микроорганизми, съдържащи се в отпадни води и се аерира при температура от 20 до 25 °C. По време на периода на изпитване се регистрира температурата.

Отделеният  $\text{CO}_2$  се улавя под формата на  $\text{BaCO}_3$  и разграждането се проследява чрез анализ на  $\text{CO}_2$  в продължение на 28 дни. Имайки предвид резултатите от контролни измервания, пълното количество  $\text{CO}_2$ , произведено от изпитваното вещество се определя като проценти по отношение на пълното  $\text{CO}_2$ , което разглежданото вещество би произвело теоретично, в зависимост от неговото съдържание на въглерод.

Процесът се проверява чрез контролна субстанция (виж точка 1.6.1.3).

### 1.5. Критерии за качество

Възпроизводимостта на метода е установена чрез сравнително изпитване между Европейската икономическа общност и Организацията на икономическо сътрудничество и развитие.

Ендогенното производство на  $\text{CO}_2$  от субстанцията, измерено в контролната колба, е основната причина, поради която използваното изпитвано вещество не трябва да бъде с концентрация, по-ниска от 5 милиграма на литър. (Когато изпитването се адаптира за използване на сравнителни вещества, маркирани с  $^{14}\text{C}$ , концентрацията може да бъде значително по-ниска.)

### 1.6. Описание на метода

#### 1.6.1. Реактиви

##### 1.6.1.1. Вода с ”високо качество”

Бидестилирана вода, без токсични вещества (особено мед), с ниско съдържание на въглерод ( $< 2,0 \text{ mg/l OOB}$ ) и със съпротивление  $\geq 18$  мегаома ( $\text{megaohms}$ ) на сантиметър. Дестилираната вода не трябва да съдържа повече от 10 % от органичния въглерод, произлизащ от изпитваното вещество.

##### 1.6.1.2. Хранителен разтвор

###### а) Матерен разтвор

$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (железен (III) хлорид хексахидрат):	0,25 g
Разтворя се в 1 000 ml вода (1.6.1.1).	
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (магнезиев сулфат хептахидрат):	22,50 g
Разтворя се в 1 000 ml вода (1.6.1.1).	
$\text{CaCl}_2$ (калциев хлорид):	27,50 g
Разтворя се в 1 000 ml вода (1.6.1.1).	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (калиев дихидрофосфат)	8,50 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (калиев хидрофосфат)	21,75 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (натриев хидрофосфат дихидрат)	33,40 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (амониев хлорид):	1,70 g
Разтворя се в 1 000 ml вода (1.6.1.1).	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (амониев сулфат):	40,00 g
Разтворя се в 1 000 ml вода (1.6.1.1).	

###### б) Среда на изпитване

Средата на изпитване съдържа, за литър, следните количества разтвор:

- 4 ml разтвор на железен (III) хлорид,
- 1 ml разтвор на магнезиев сулфат,
- 1 ml разтвор на калциев хлорид,
- 2 ml разтвор на фосфат,
- 1 ml разтвор на амониев сулфат.

Стойността на рН трябва да бъде  $7,2 \pm 0,2$ .

#### 1.6.1.3. Сравнителни вещества

Анилин (прясно дестилиран), натриев ацетат, натриев бензоат.

#### 1.6.1.4. Бариев хидроксид 0,025 N (0,0125 M)

В 1 литър вода от високо качество се разтварят 4,0 грама  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$ . Филтрува се с хартиен филтър и прозрачният разтвор се затваря херметически, за да се избегне абсорбцията на  $\text{CO}_2$ , съдържащ се във въздуха. За серията на изпитване се препоръчва приготвяне на количества разтвор, по-големи от 5 литра.

### 1.6.2. Апаратура

#### 1.6.2.1. Апаратура за очистка на $\text{CO}_2$

За серия от 12 шишета за изпитване (3 изпитвани вещества) трябва:

(Шишето за изпитване е съд от оцветено стъкло с вместимост от 4 до 5 литра. При използване на съдове от неочветено стъкло, изпитването трябва да бъде извършено на тъмно).

- 4 пластмасови съда с вместимост от 1 литър, запълнени с 700 милилитра 10 N (10 M) NaOH.
- 1 Ерленмайерова колба с вместимост от 1 литър, запълнена с 700 милилитра 0,025 N (0,0125 M) разтвор на  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ .
- 1 Ерленмайерова колба с вместимост от 1 литър, чието предназначение е да приеме евентуалният излишък от течност.

Тези съдове са свързани последователно, с помощта на инертна тръба, към източник на състен въздух и въздухът се подава в разтворите с постоянен дебит.

За всяка серия от 4 допълнителни шишета за изпитване, се прибавя 1 пластмасово шише с вместимост от 1 литър, запълнено с 700 милилитра 10 N (10 M) NaOH.

#### 1.6.2.2. Апаратура за производство на $\text{CO}_2$

- 4 шишета за изпитване от оцветено стъкло, с вместимост от 4 до 5 литра, за всяко изпитвано вещество.
- Пластмасови тапи и еластични тръби.

#### 1.6.2.3. Шишета, абсорбиращи $\text{CO}_2$

Абсорбиращи шишета от 100 милилитра, съдържащи бариев хидроксид.

### 1.6.3. Приготвяне на субстанцията (оникулума)

Използваните за изпитванията организми идват от активна утайка, прясно взета от градка пречиствателна станция, работеща нормално. Тази станция не трябва да обработва или трябва да обработва съвсем малко количество индустриални отпадни води.



След пристигане в лабораторията, активната утайка се аерира в рамките на 4 часа. Вземат се 500 милилитра от сместа и се хомогеницират механично за 2 минути. След това сместа се оставя да се декантира за 30 минути.

Ако след 30 минути супернатантът съдържа все още значително количество твърди частици, декантирането може да бъде продължено още от 30 до 60 минути или да бъде адаптирана утайката към лабораторните условия за да се получи по-добро декантиране.

Супернатантът се оставя да се отдекантира така, че да се получи достатъчен обем за осигуряване на посявка от 1 % субстанция за всяка колба за изпитване. Да се избягва пренасянето на по-голямо количество твърди частици от калта, което би довело до грешка при измерване на произведения  $\text{CO}_2$ .

Препоръчва се преброяване на микроорганизмите в супернатанта. Обикновено субстанцията трябва да съдържа от  $10^6$  до  $20 \times 10^6$  клетки на милилитър. Трябва да бъде използвана в деня на приготвянето ѝ.

#### 1.6.4. Работен режим

##### 1.6.4.1. Матерен разтвор

Матерният разтвор на изпитваното вещество се получава чрез разтваряне във вода с високо качество, така че да се получи концентрация 1 000 милиграма на литър.

Матерните разтвори се приготвят като се има предвид съдържанието на органичен въглерод в изпитваното вещество. Ако това съдържание е неизвестно, матерните разтвори се правят с необходимата концентрация, като се има предвид теглото на веществата. За получаване на хомогенна проба е необходимо добро разбъркване, като се избягва образуването на пяна. В случая на твърди тела, може да се наложи те да бъдат стопени и да се смеси съдържанието в съдовете преди да се вземе проба от тях. Тази част от работния режим е изключително важна, защото изчислението на процента на биоразграждане е точно само, ако внесеният в изпитваната система органичен въглерод е в определено количество.

Ако стойността на рН на матерният разтвор се намира между 3 и 10, тя не трябва да бъде коригирана, тъй като се определя от фосфатния буфер, влизащ в състава на изпитваната среда. Ако стойността на рН е извън посочените граници, аликвотна част от матерният разтвор се регулира на  $\text{pH } 7,0 \pm 1,0$  с помощта на 1N (1M) HCl или NaOH, като се внимава разтвора да бъде добре хомогенизиран по време на прибавяне на киселината или основата.

За потвърждаване на номиналната концентрация на органичния въглерод на изпитваното вещество, матерният разтвор (или неутрализираната аликвотна част) се анализира за общ органичен въглерод.

Ако изследваното вещество не е разтворимо във вода, необходимото количество от веществото, в тегло или в обем, се прибавя директно в шишето за изпитване.

Ако изследваното вещество не е разтворимо при концентрациите, необходими за изпитване, трябва да бъдат взети специални мерки, например да се използва метод за диспергиране чрез ултразвук, за да се получи добра дисперсност на изпитваното вещество.

#### 1.6.4.2. Условия на изпитване

Тъй като се използва 1 % от субстанцията, необходимо е да бъдат извършвани разреждания в изследваната среда.

Най-лесно това става по следния начин:

- а) във всеки от съдовете за изпитване с вместимост от 4 до 5 литра се прибавят 2 470 милилитра вода с високо качество (виж точка 1.6.1.1);
- б) във всеки от съдовете за изпитване с вместимост от 4 до 5 литра се добавят съответно 3 милилитра от матерния разтвор, съдържащ амониев сулфат, магнезиев сулфат и калциев хлорид, както и 6 милилитра от фосфатния буферен разтвор и 12 милилитра от ферихлоридния разтвор;
- в) във всеки от съдовете за изпитване с вместимост от 4 до 5 литра се добавя 30 милилитра субстанция, произтичаща от активна утайка.

Въглеродният двуоксид се изгонва от сместа чрез 24 часово барботиране с въздух, не съдържащ  $\text{CO}_2$ .

След периода на аерация, 3 абсорбиращи шишета се пълнят с 100 милилитра 0,025 N (0,0125 M)  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  и се свързват последователно с изхода на всеки от съдовете за изпитване.

#### 1.6.4.3. Извършване на изпитването

Първоначално изпитваното вещество се добавя в 2 от 4 съда за изпитване. Всяко вещество се изпитва при две концентрации : 10 и 20 милиграма на литър.

Необходимото количество от матерния разтвор се изчислява по следната формула :

$$\text{Количество матерен разтвор за съд за изпитване, в ml:} = \frac{B \times C}{A}$$

където:

B = концентрация на изпитваното вещество в шишето за изпитване (mg/l),

A = концентрация на изпитваното вещество в матерния разтвор (mg/l),

C = краен обем на изследваната среда в шише за изпитване (ml).

Към подходящите шишета за изпитване се добавя достатъчно количество от матерния разтвор за получаване на концентрацията на изпитване, като се използва по-горната формула, и се допълва с дестилирана вода до получаване на 473 милилитра (матерен разтвор + вода с “високо качество”). В третото шише за изпитване, използвано за контрол и не съдържащо изпитвано вещество, се добавя 473 милилитра вода с “високо качество”.

Крайният обем на всяко шише за изпитване е 3 000 милилитра.

Към последното от 4 шишета за изпитване се добавя сравнително вещество с концентрация 20 милиграма на литър.

Изпитването започва с продухване на разтвора с въздух, несъдържащ  $\text{CO}_2$ , с дебит от 50 до 100 милилитра в минута за изпитвано шише (приблизително 1 до 2 балочета в секунда).

В случая на изпитване на вещества, неразтворими във вода, и внесени в сухо състояние в шишетата за изпитване, хомогенизацията се подобрява с помощта на магнитна бъркалка. При пенещите се химикали, барботирането с въздух,

несъдържащ  $\text{CO}_2$ , може да бъде заменено с продухване над разтвора и разбъркване с магнитна бъркалка.

Произведеният  $\text{CO}_2$  във всяко шише реагира с бариевият хидроксид и се утаява под формата на бариев карбонат; количеството произведен  $\text{CO}_2$  се оценява чрез титруване на остатъчният  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  с 0,05 N (0,05 M)  $\text{HCl}$ . Периодично (на всеки 2 или 3 дни), се откача абсорбиращото  $\text{CO}_2$  шише, намиращо се най-близо до шишето за изпитване и се извършва титруване. Приближават се двете шишета и в края на серията се поставя ново абсорбиращо шише, напълнено с 100 милилитра пресен 0,025 N (0,0125 M)  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ .

Необходимите титрувания (преди появата на бяла утайка от  $\text{BaCO}_3$  във втората уловка), се извършват приблизително на всеки два дни през първите десет дена и след това на всеки пет дни до двадесет и осмия ден.

На двадесет и седмия ден се измерва отново рН на разтворите, съдържащи се във шишетата за изпитване и после за разлагане на карбонатите се прибавя 1 милилитър концентрирана солна киселина на шише. Шишетата се аерират през нощта и се взема проба от всяко от тях за определяне на разтворения органичен въглерод. Финално титруване се извършва през двадесет и осмия ден.

След отделяне на най-близките до шишетата за изпитване абсорбиращи шишета, се титруват 100 милилитра от разтвора на  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ .  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  се титрува с 0,05 N (0,05 M)  $\text{HCl}$ , като използваният индикатор е фенолфталеин.

Изпитването се извършва при стайна температура (20 до 25 °C), като температурата се отчита през цялото време на изпитване.

Ако преди двадесет и осмия ден се наблюдава плато, изпитването може да се приеме за завършено.

Ако на двадесет и осмия ден разграждането очевидно е започнало, но без да е достигнато плато, счита се за добре изпитването да бъде продължено още 1 или 2 седмици.

#### 1.6.5. *Определяне на $\text{CO}_2$*

Могат да бъдат разгледани и други начини за измерване на отделения  $\text{CO}_2$ , различни от обратно титруване на  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , намиращ се в уловките. Това по никакъв начин не променя принципа на изпитването и може даже да позволи непрекъснато отчитане на процента биоразграждане в процеса му на еволюция.

Първият етап на изчисление на полученото количество  $\text{CO}_2$  трябва да включва коефициент на корекция, отчитащ ендогенното получаване на  $\text{CO}_2$  в шишетата с изпитвано вещество. Контролното шише служи за “контролна посявка”, позволяваща корекция, отчитаща  $\text{CO}_2$ , което трябва да произведе ендогенното дишане на бактериите. Количеството  $\text{CO}_2$ , произведено от изпитваното вещество се определя чрез разликата (в ml на реактив за титруване) между абсорбиращото шише, съответстващо на изпитването и абсорбиращото шише, съответстващо на контролата.

В случай на използване на 0,05 N (0,05 M)  $\text{HCl}$ , за титруване на абсорбиращото шише, всеки милилитър титрувана  $\text{HCl}$  отговаря на 1,1 милиграма произведен  $\text{CO}_2$ .

## **2. ОЦЕНКА НА ДАННИТЕ**

Резултатите от анализите се записват в приложения бюлетин (допълнение 1) и стойностите на биоразграждане се изчисляват в съответствие с указанията от точка 1.2.

Концентрациите на CO<sub>2</sub> се изчисляват с точност от 0,1 милиграм на литър. Стойностите за биоразграждането се закръгляват към най-близката стойност на единиците.

Протичането на изпитването за разграждане се представя графично чрез диаграма, като показаната за пример (виж допълнение 2).

Резултатите от изпитването за биоразграждане са валидни, ако са изпълнени следните условия:

- трябва, в една и съща серия на изпитване, биоразграждането на контролното вещество да бъде  $\geq 60\%$  за 28 дни (в противен случай цялата серия трябва да бъде анулирана и изпитването да бъде започнато отново със субстанция (оникулум) с различен произход).
- трябва, по време на изпитването, да не се произвежда никакво значително количество CO<sub>2</sub> в шишетата за контролно изпитване (замърсяване на средата, на стъклото и на въздуха). В края на изпитването пълното производство на CO<sub>2</sub> не трябва да превишава 50 милиграма CO<sub>2</sub> на 3 литра среда.

## **3. РЕЗУЛТАТИ**

### **3.1. Протокол от изпитването**

Изпитвателният протокол трябва, по възможност, да съдържа следната информация:

- данните, представени съобразно бюлетина (виж допълнение 1),
- протичане на изпитването за разграждане, представено с диаграма, показваща латентната фаза, фазата на разграждане, наклона на кривата, времеви интервал („времеви интервал“ тук означава период от 10 дни, започващ от деня, когато процентът наблюдавано биоразграждане е за пръв път по-висок от 10%),
- начин на диспергиране за веществата, неразтворими в условията на изпитване,
- дата и място на вземане на използваните за изпитването организми и обработката на която са подложени преди инокулация,
- обхват от температурите, измерени по време на изпитването,
- в случай на преброяване, в съответствие с указанията в точка 1.6.2 (инокулация), брой микроорганизми, образуващи колонии на милилитър,
- доказателства за валидността на изпитването ( $\geq 60\%$  разграждане за 28 дни при сравнителните вещества).

### **3.2. Интерпретация на резултатите**

Имайки предвид строгите условия на това изпитване, нисък резултат не означава със сигурност, че изпитваното вещество не е биоразграждащо се при условия на околната среда, а само показва, че са необходими допълнителни изследвания, за да бъде установен този факт.

Изпитваните химични вещества, показващи висок процент на биоразграждане, се считат за лесно биоразграждащи се, при условие че този процент се получава за 10 дни, които се броят от денят, когато то превишава за пръв път 10 %.

#### **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301B*, Decision of the Council C(81) 30, Final.
- 2) Gerike, P., Fisher, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 3, No 2, 1979, p. 159 - 173.
- 3) Gerike, P., Fisher, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 1, 1981, p. 45 - 55.
- 4) Larson, R.J., Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 38, 1979, p. 1153 - 1161.

Допълнение I

Бюлетин за модифицирано изпитване *Sturm*

Експеримент № : .....  
Начална дата на изпитването : .....  
Изпитвано, сравнително вещество : .....  
Теоретична концентрация: .....  
Въглероден анализ: .....  
Теоретичен TCO<sub>2</sub> .....  
Температурен обхват, отчетен по време на изпитването: .....

Производство на CO<sub>2</sub>: .....

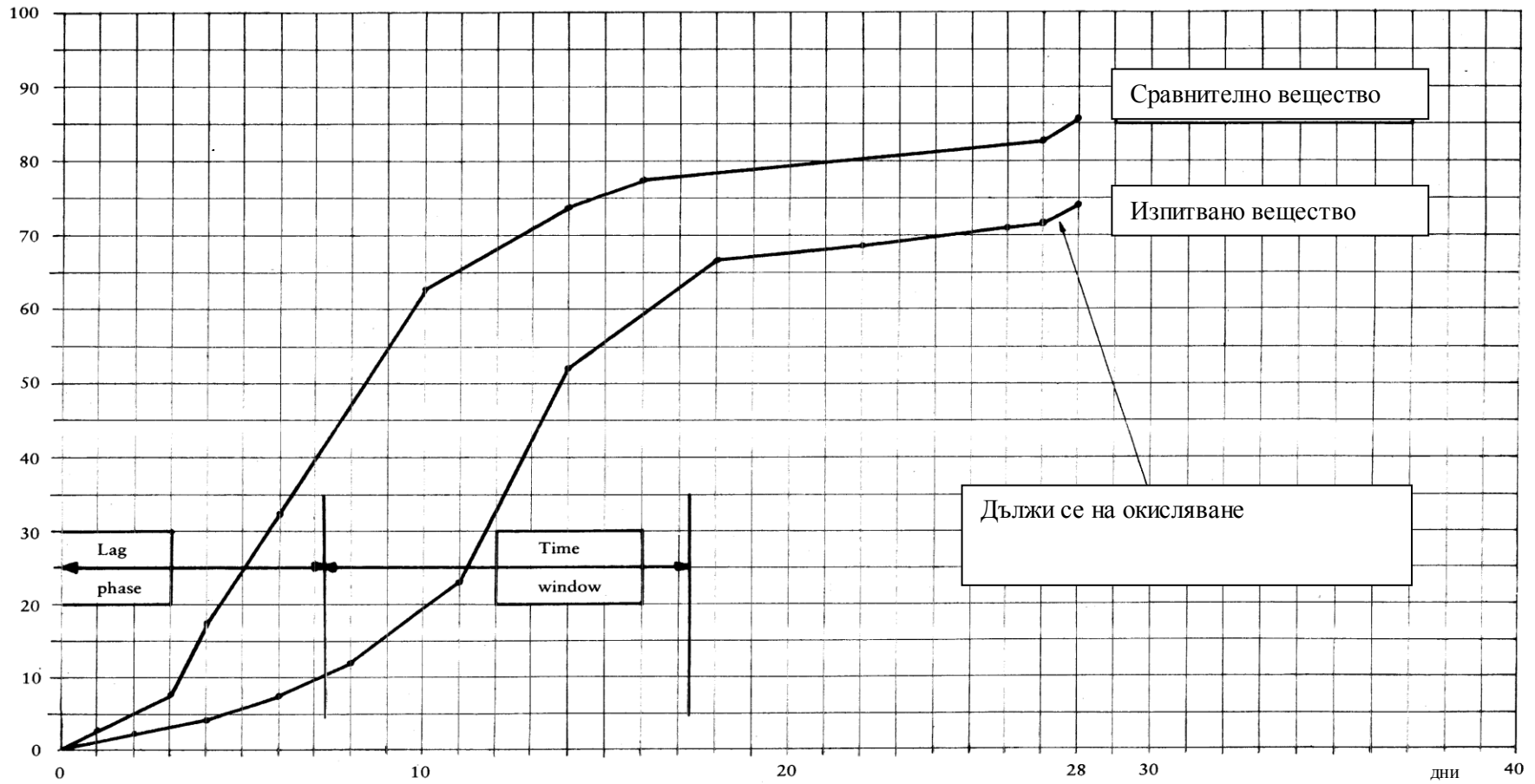
Дни	Уловен CO <sub>2</sub> (mg)	Общо количество CO <sub>2</sub> (mg)	% TCO <sub>2</sub>
28			

Валидност: .....  
- сравнително вещество и % биоразграждане: .....  
- пълна еволюция на CO<sub>2</sub> в колбите за контролно изпитване.....

Модифицирано изпитване *Sturm*

Организация, отговорна за изпитването: ..... Изпитвано вещество: ..... Експеримент № : .....

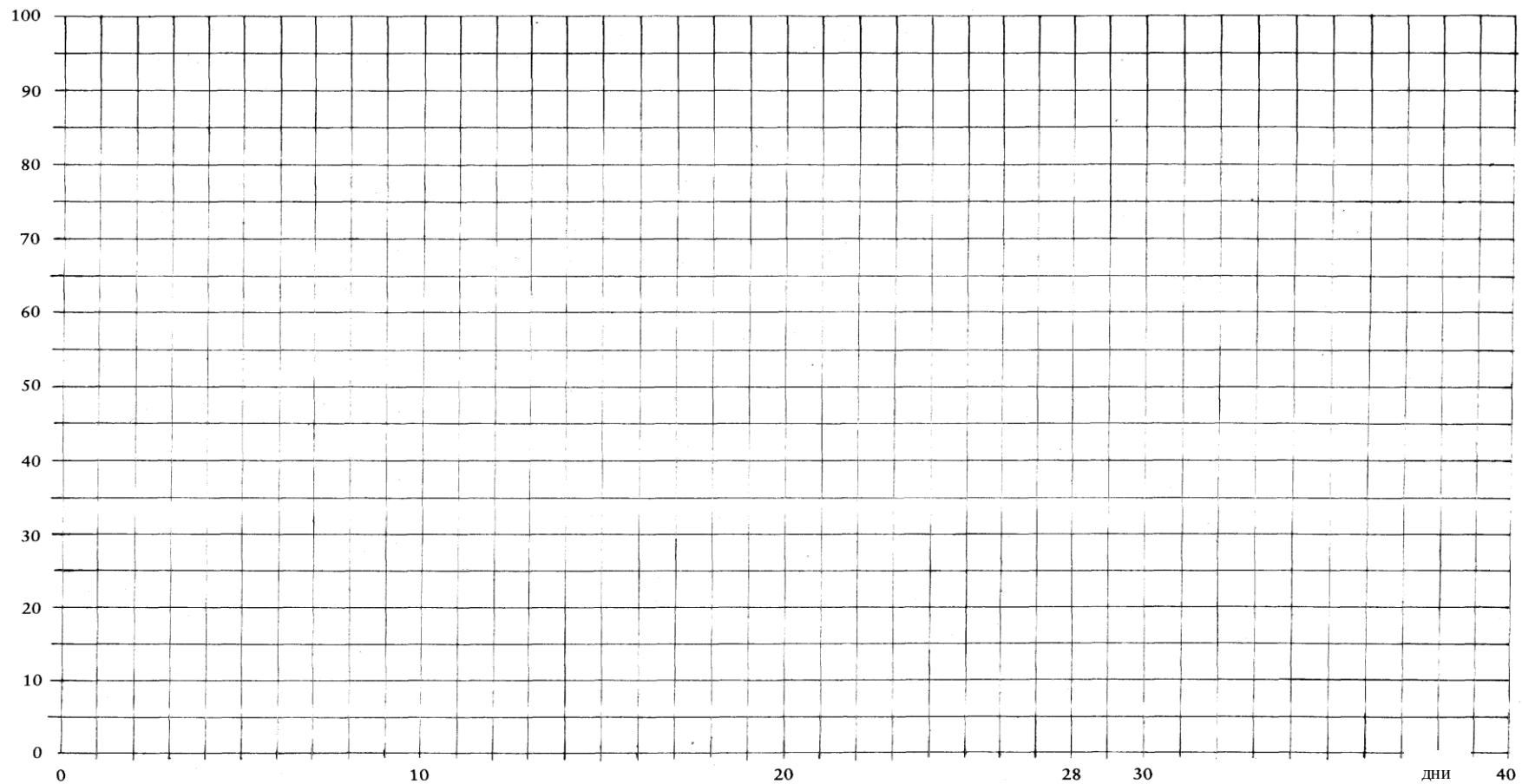
Биоразграждане  
(%)



Модифицирано изпитване *Sturm*

Организация, отговорна за изпитването: ..... Изпитвано вещество: ..... Експеримент № : .....

Биоразграждане  
(%)





## **В.6. БИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ: ИЗПИТВАНЕ В ЗАТВОРЕНА КОЛБА**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Цел на метода е определяне на биоразграждането на органични вещества, в аеробна водна среда, при концентрации от 2 милиграма на литър (стандартна концентрация) до 10 милиграма на литър.

При сегашното състояние на развитие, изпитването е особено подходящо за оценка на биоразграждането на разтворими във вода съединения. При все това, по принцип, нищо не пречи да бъдат изследвани летливи или слабо разтворими във вода съединения.

Емпиричната формула на изпитваното вещество трябва да позволява да бъде изчислена теоретичната потребност от кислород (ТПК); ако тази стойност не е известна, за еталонна стойност може да бъде използвана химичната потребност от кислород (ХПК) на изпитваното вещество (виж допълнение 1).

Методът е приложим само за органични вещества, които при концентрацията, използвана по време на изпитване нямат инхибиращо действие върху бактериите. Ако изпитваното вещество не е разтворимо при предвидената за изпитването концентрация, трябва евентуално да бъдат взети специални мерки, като диспергиране с ултразвук, за получаване на достатъчна дисперсност.

Данни за относителните пропорции на различните елементи, съставлящи изпитваното вещество биха улеснили интерпретацията на получените резултати, особено в случаите, когато резултатите са ниски.

Данни за токсичността на химичните вещества по отношение на микроорганизми могат да улеснят интерпретацията на ниските резултати, както и избора на подходящи концентрации на изпитване.

Този метод може да бъде използван за определяне на биохимичната потребност от кислород (БПК).

#### **1.2. Определение и резултати**

Биохимичната потребност от кислород (БПК) представлява разликата в консумацията на кислород между контрола и разтвор на изпитваното вещество при условията на изпитване. След разделяне с концентрацията (P/V) на изпитваното вещество, кислородната консумация се изразява в mg БПК/mg вещество.

Разграждането се определя като отношението между биохимичната потребност от кислород и теоретичната потребност от кислород (ТПК) или химичната потребност от кислород (ХПК), изразени в проценти.

#### *Забележка*

Понякога двата начина на изчисление (проценти ТПК или проценти ХПК) водят до различни резултати.

$$\% \text{ на биоразграждане (ТПК)} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg изпитвано вещество}}{\text{ТПК}} \times 100$$

или

$$\% \text{ на биоразграждане (ХПК)} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg изпитвано вещество}}{\text{mg ХПК}/\text{mg изпитвано вещество}} \times 100$$

където:

ТПК – теоретична потребност от кислород (изчисление, виж допълнението),

ХПК – химична потребност от кислород, определена експериментално.

### 1.3. Сравнителни вещества

Желателно е активността субстанцията да бъде проверена с помощта на подходящи сравнителни химични вещества.

За тази цел могат да бъдат използвани, например, анилин, натриев ацетат или натриев бензоат, които трябва да покажат разграждане  $\geq 60\%$  за 28 дни, в противен случай изпитването се счита за невалидно и трябва да бъде проведено отново със субстанция (оникулум) с различен произход.

### 1.4. Принцип на метода на изпитване

Определено количество от изпитваното вещество се разтваря в неорганична среда (разтвор от минерални хранителни елементи) така, че да се получи концентрация от 2 милиграма на литър. След това този разтвор се посява с малък брой микроорганизми от различни видове и се държи в затворени колби при постоянна температура (20 до 21 °C), на тъмно.

Процесът на разграждането се проследява чрез кислородни анализи в продължение на 28 дни. Процедурата се проверява с помощта на сравнително вещество. За определяне на контролната консумация на кислород паралелно се провежда изпитване без изпитвано или сравнително вещество.

Едновременно изпитваното вещество се проверява за евентуални инхибиращи ефекти по отношение на субстанцията (оникулум).

### 1.5. Критерии за качество

Възпроизводимостта на метода е установена чрез сравнително изпитване между Европейската икономическа общност и Организацията на икономическо сътрудничество и развитие.

### 1.6. Описание на метода на изпитване

#### 1.6.1. Реактиви

##### 1.6.1.1. Дестилирана или деминерализирана вода

Дестилирана или деминерализирана вода не съдържаща повече от 0,1 mg Cu/l, наситена с въздух. Необходимият за ежедневните операции обем (например 50 литра) се държи при стайна температура, около 20 °C, и се аерира интензивно в продължение на 20 минути със сгъстен въздух. Обикновено водата е готова за употреба след като е стояла 20 часа при 20°C. Съдържанието на кислород се определя с цел контрол. То трябва да достигне 9,09 mg O<sub>2</sub>/l при 20 °C. Всички

операции на пренасяне или на пълнене на наситената с въздух вода трябва да бъдат извършвани чрез сифон, без отделяне на балончета.

#### 1.6.1.2. Хранителен разтвор

а) Матерни разтвори:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (калиев дихидрофосфат):	8,50 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (калиев хидрофосфат):	21,75 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (натриев хидрофосфат дихидрат):	33,30 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (амониев хлорид):	1,70 g

Разтваря се в 1 000 ml дестилирана вода.

Стойността на рН трябва да бъде 7,2.

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (магнезиев сулфат хептахидрат):	22,50 g
--	---------

Разтваря се в 1 000 ml дестилирана вода.

$\text{CaCl}_2$ (калциев хлорид):	27,50 g
-----------------------------------	---------

Разтваря се в 1 000 ml дестилирана вода.

$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (железен (III) хлорид хексахидрат):	0,25 g
--	--------

Разтваря се в 1 000 ml дестилирана вода.

б) Среда на изпитване:

Средата на изпитване съдържа, на литър вода (1.6.1.1), 1 милилитър от всеки от посочените по-горе матерни разтвори.

Стойността на рН е  $7,2 \pm 0,2$ .

#### 1.6.1.3. Сравнителни вещества

Анилин (прясно дестилиран), натриев ацетат, натриев бензоат.

#### 1.6.2. Апаратура

1.6.2.1. Могат да бъдат използвани градуирани колби с вместимост от 250 до 300 милилитра, със стъклена тапа или неградуирани колби с тясно гърло, от 250 милилитра, със стъклена тапа, чийто обем трябва да бъде определен.

1.6.2.2. Различни градуирани шишета от 2, 3 и 5 литра за подготовка на експеримента и за напълване на БПК шишетата.

1.6.2.3. Пипети с вместимост от 1 до 10 милилитра. Ампули за декантиране и едра филтърна хартия. Шишета за приготвяне на субстанцията (оникулума).

1.6.2.4. Водна баня за държане на флаконите при постоянна температура, на тъмно.

#### 1.6.3. Приготвяне на субстанцията (оникулума)

Посявката може да бъде извършена с помощта на една от четирите, описани по-долу процедури и валидността ѝ да бъде проверена със сравнително вещество (1.6.1.3).

##### 1.6.3.1. Субстанция (оникулум) от почва

100 грама градинска почва, която не е торена скоро (особено се препоръчва използването на почва от парник, държана при постоянна температура през цялата година) се поставят в суспензия от 1 литър нехлорирана питейна вода. След 30 минути суспензията се филтрува с едър хартиен филтър, като първите два милилитра от филтратата се отделят. Останалата част от филтратата служи за субстанцията (1 капка на литър краен обем). Субстанцията трябва да бъде приготвена точно преди изпитването. В случай на съхранение през повече часове, трябва да бъде аерирана. Броят кълнове може да бъде определен чрез броене върху хранителен агар или хранителни пръчици. Не трябва да има повече от  $10^3$  до  $10^5$  кълнове за милилитър краен обем.

#### 1.6.3.2. Субстанция (оникулум) от отпадни води

За предпочитане е субстанцията да бъде приготвяна, използвайки отпадни води (активна утайка или бактериални легла от станция, обработваща предимно битови води). Пробата трябва да бъде аерирана от момента на вземане до използването ѝ. За приготвяне на субстанцията, пробата се филтрува през едър филтър. Първите 200 милилитра се отделят. Останалата част от филтратата се аерира подходящо до момента на използването му. Субстанцията трябва да бъде използвана в деня на вземане на проба.

#### 1.6.3.3. Субстанция (оникулум) от лабораторна “активна утайка”

Използват се отточните води от експериментална станция с активна утайка, оборудвана с мощно устройство за аерация. Инокулационният разтвор се приготвя както е посочено в точка 1.6.3.2.

#### 1.6.3.4. Смесена субстанция (оникулум)

Проби с еднакви обеми от трите вида субстанции (1.6.3.1 до 1.6.3.3) се смесват добре и така се получава крайната субстанция (оникулум).

#### 1.6.4. Режим на работа

Всички необходими манипулации преди инкубацията се извършват при температура близка до 20 °C.

Приготвят се различни групи колби (1.6.2.1) за серии от едновременни експерименти за определяне на БПК на изпитваните и сравнителните вещества (виж допълнение 2). Ако химичните анализи се извършват едновременно, трябва да бъдат предвидени достатъчен брой колби, включително необходимите колби за проверка на субстанцията и контролата. Например, подготвят се 7 или 15 колби за вещество, изпитвано за 0, 5, 15 и 28 дни, след като е приготвен достатъчен обем вода в големи шишета (1.6.2.2).

Тези големи шишета се напълват първо с дестилирана вода до една трета от обема им чрез еластичен маркуч (1.6.1.1). След това, всеки от хранителните матерни разтвори (1.6.1.2) се наливат в шишетата до получаване на крайния обем и се прибавя изпитваното или сравнителното вещество, докато се достигнат крайни концентрации от 2 милиграма на литър и понякога 5 или 10 милиграма на литър (mg/l).

Приблизителната концентрация на 9 милиграма кислород, разтворен в литър вода за разреждане при 20 °С ограничава възможната начална концентрация на изпитваното вещество на приблизително 2 милиграма на литър, така че да се гарантира поддържане на значителна концентрация на кислород след окисление на веществото.

Веществата със слабо разграждане или веществата, чиято ТПК е ниска могат успоредно да бъдат изпитвани при по-високи концентрации.

Посявката се извършва с пипета – една капка за литър краен обем; по същият начин се процедира и при контролата.

Накрая разтворът се довежда до необходимия обем с помощта на еластичен маркуч, допиращ се до дъното на шишето. Това осигурява достатъчно смесване на разтвора. След това, всеки от така приготвените разтвори се прехвърля веднага във всяка съответна група от колби чрез еластичен маркуч, потопен до три четвърти от шишето (не до дъното).

Колбите, предназначени за измерване в нулев момент се анализират или се подлагат на обработка, осигуряваща запазването им за следващи анализи (за определяне на O<sub>2</sub>, утаяване с MnCl<sub>2</sub> и NaOH).

Останалите приготвени колби се поставят във водна баня при температура 20 °С, на тъмно; изваждат се от водната баня след 5, 15 и 28 дни и се анализират.

Всяка една от сериите е придружена от пълна серия успоредни изпитвания за определяне на контролата, консумацията на кислород без субстанция и сравнително вещество.

Проверка на инхибирането:

Инхибиращото действие на веществата може лесно да бъде проверено чрез тест в затворена колба:

- 1 серия: 2 mg/l от лесно биоразграждащо се съединение, например маслен алкохол, кондензиран с етиленов оксид в молекулно отношение 1:10 или кое да е от контролните химически вещества,
- 2 серия: x mg/l от изпитваното вещество (x обикновено е равно на 2),
- 3 серия: 2 mg/l от лесно биоразграждащи се съединения плюс x mg/l от изпитваното вещество.

Ако стойностите на БПК на серия 3 са по-ниски от сумата от стойностите на серии 1 и 2, може да се приеме, че изпитваното вещество няма инхибиращо действие спрямо бактерии, при тази концентрация. Този контрол е винаги необходим, когато отрицателно или слабо разграждане изглежда нелогично предвид структурата на изследваното вещество, т.е. ако някои белези позволяват да се предположи, че това слабо биоразграждане се дължи на инхибиращи процеси.

#### 1.6.5. *Определяне на разтворения кислород*

Количественото определяне на разтворения кислород се извършва с помощта на стандартизирани, признати в международен или национален план, химични или електрохимични методи.

## 2. ОЦЕНКА НА ДАННИТЕ

Резултатите от анализа се описват в приложения по-долу бюлетин (виж допълнение 3).

Еволюцията на разграждането се представя графично чрез диаграма.

Резултатите от изпитването за биоразграждане са валидни, ако са изпълнени едновременно следните условия:

- в една и съща серия на изпитване, биоразграждането на сравнителното вещество е  $\geq 60\%$  за 28 дни. В противен случай цялата серия трябва да бъде анулирана.
- консумацията на кислород, без субстанция, не превишава 0,3 милиграма кислород на литър ( $\text{mg O}_2/\text{l}$ ) след 5 дни и 0,4 милиграма кислород на литър след 28 дни; контролата със субстанция не трябва да има консумация  $> 0,5$  милиграма кислород на литър след 5 дни и 0,6 милиграма кислород на литър след 15 до 28 дни.

## 3. РЕЗУЛТАТИ

### 3.1. Протокол от изпитването

Изпитвателният протокол трябва, по възможност, да съдържа:

- данните, записани в предвидената от бюлетина форма (виж допълнение 3),
- протичане на изпитването за разграждане, представено с диаграма, показваща латентната фаза, фазата на разграждане, наклона на кривата, времеви интервал („времеви интервал“ тук означава период от 10 дни, започващ от деня, когато процентът наблюдавано биоразграждане е за пръв път по-висок от 10%),
- методът, използван за определяне на ХПК,
- методът, използван за измерване на кислород,
- научна обосновка и коментар относно всяка промяна на процедурата или на отмяна на теста,
- начин на диспергиране на слаборастварими при условията на изпитване вещества,
- доказателства за валидността на изпитването.

### 3.2. Интерпретация на резултатите

Трябва да бъде отчетена възможността за евентуално повлияване на резултатите от азотни съединения.

Имайки предвид, че изпитването се провежда при много строги условия, нисък резултат не означава със сигурност, че изпитваното вещество не е биоразграждащо се при условия на околната среда, а че са необходими допълнителни изследвания за да бъде установен този факт.

Изпитваните химични вещества, характеризиращи се с висока консумация на кислород в настоящото изпитване се считат за лесно биоразграждащи се, при условие, че това ниво се достига за 10 дни, които се броят от деня, когато нивото на биоразграждане превишава за пръв път 10 %.

## 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301D*, Decision of the Council C(81) 30, Final.

- 2) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 3, No 2, 1979, p. 159 - 173.
- 3) Gerike, P., Fischer, W.K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 1, 1981, p. 45 - 55.

### Допълнение 1

#### Изчисление на теоретичната биохимична потребност от кислород (ТПК)

Теоретичната биохимична потребност от кислород (ТПК) на съединението  $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ , с молекулно тегло МТ, се изчислява чрез прилагане на следната формула:

$$ТПК_{NH_3} = \frac{16[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + 2\frac{1}{2}p + \frac{1}{2}na - o]}{MT}$$

Прилагането на тази формула изисква С да се е превърнал в  $CO_2$ , Н в  $H_2O$ , Р в  $P_2O_5$  и Na в  $Na_2O$ . Халогенният елемент се отстранява под формата на хидрохалогенид и азота под формата на амоняк.

*Пример:*

Глюкоза  $C_6H_{12}O_6$ , МТ = 180.

$$ТПК = \frac{16(2 \times 6 + 1/2 \times 12 - 6)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg глюкоза}$$

При изчислението на молекулните тегла на соли, различни от солите на алкалните метали, се приема че тези соли са хидролизирани.

Предполага се че сярата е окислена до състояние + 6.

*Пример:*

Натриев n-алкилбензолсулфонат  $C_{18}H_{29}SO_3Na$ , МТ = 348

$$ТПК = \frac{16(36 + 29/2 + 3 + 1/2 - 3)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg вещество}$$

В случая на някои съединения съдържащи азот, последният може също да се премахне под формата на амоняк, нитрит или нитрат, в зависимост от различните теоретични биохимични потребности от кислород.

$$ТПК_{NO_2^-} = \frac{16[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + 1\frac{1}{2}n + 2\frac{1}{2}p + \frac{1}{2}na - o]}{MT}$$

$$ТПК_{NO_3^-} = \frac{16[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + 2\frac{1}{2}n + 2\frac{1}{2}p + \frac{1}{2}na - o]}{MT}$$

Предполагайки че при анализ се наблюдава пълно образуване на нитрат, например в случая на един вторичен амин:  $(C_{12}H_{25})_2NH$ , МТ: 353

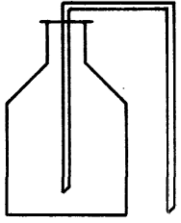
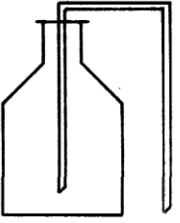
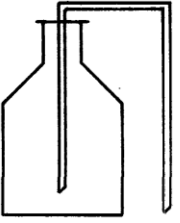
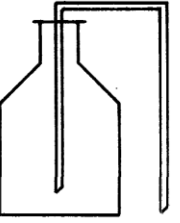
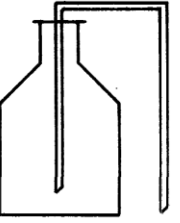
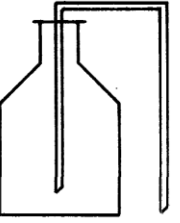
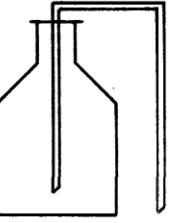
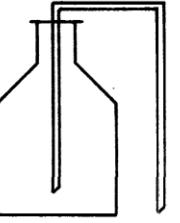
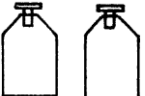




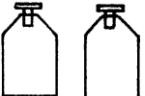
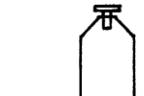
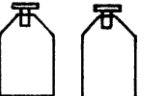
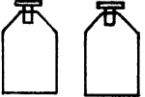
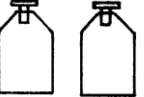
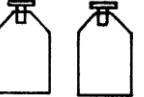
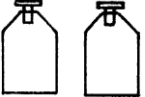
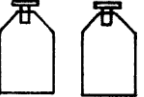
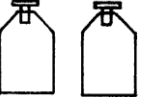
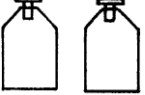


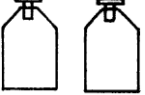

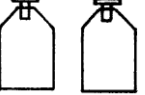
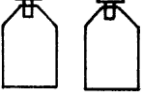
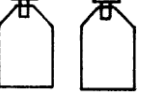

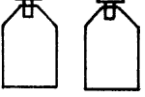


$$ТПК_{NO_3^-} = \frac{16(48 + 51/2 + 5/2)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg вещество}$$



Допълнение 2

Схема за разпределение на колбите за изпитване със затворена колба

(\* –за евентуален специфичен анализ)

	Контрола				Определяне			
	Дестилирана Хранителни ↓ вода разтвори	Дестилирана Хранителни Инокулация ↓	Дестилирана Хранителни Инокулация ↓	Дестилирана Хранителни Инокулация ↓	Дестилирана Хранителни Инокулация ↓	Дестилирана Хранителни Инокулация ↓	Дестилирана Хранителни Инокулация ↓	Дестилирана Хранителни Инокулация ↓
	Разтвор от хранителни елементи (проверка на контрола на кислорода)	Контрол на инокулацията	Контрол на инокулацията	Контрол на инокулацията	Еталонно съединение ↓ Сравнителни вещества	Еталонно съединение ↓ Сравнителни вещества	Испитвано вещество ↓ Испитвано вещество	Испитвано вещество ↓ Испитвано вещество
								
Анализи	O <sub>2</sub> – опред.	*- опред.	O <sub>2</sub> – опред.	*- опред.	O <sub>2</sub> – опред.	*- опред.	O <sub>2</sub> – опред.	*- опред.
веднага								
5 дни								
15 дни								
28 дни								

Допълнение 3

**Биотично разграждане: тест в затворена колба (бюлетин)**

Лаборатория:.....

Ръководител на изследването: .....

Начална дата на изпитването:..... Експеримент №:.....

Изпитвано вещество:.....

Химичен състав:.....

Анализ (метод на Winkler или кислороден електрод) .....

ТПК или ХПК на изпитваното вещество:..... mg O<sub>2</sub>/ mg

Температура на водата за разреждане след аерация: .....

Концентрация на кислород във водата след аерация, и в началото на експеримента:..... mg O<sub>2</sub>/l

Субстанция (оникулум):

.....

*Резултат от изпитването:*

D<sub>t</sub> = ..... БПК, изразен в % ТПК след 28 дни  
или

D<sub>t</sub> - ..... БПК, изразен в % ХПК след 28 дни

*Валидиране на резултата*

Сравнително вещество:.....

Резултат:..... БПК, изразен в % ТПК след 28 дни

Контролен експеримент n°: .....

*Забележки:*

Лаборатория:.....  
 Изпитвано вещество:.....  
 Експеримент №:.....

**A: Определяния на кислорода:**

	Колба №		mg O <sub>2</sub> след x дни			
			0	5	15	28
Хранителен минерален разтвор без изпитвано вещество и без инокулация	Контрол на O <sub>2</sub>	c <sub>1</sub>			-	
		c <sub>2</sub>		-	-	-
	Средна стойност	$m_0 = \frac{c_1 + c_2}{2}$				
Хранителен минерален разтвор без изпитвано вещество, но с инокулация	1	c <sub>3</sub>				
	2	c <sub>4</sub>				
	Средна стойност на празния опит	$m_b = \frac{c_3 + c_4}{2}$				
Хранителен минерален разтвор с изпитвано вещество и с инокулация	1	a <sub>1</sub>				
	2	a <sub>2</sub>				
	Средна стойност на изпитвано вещество	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

**B: Консумация на O<sub>2</sub> (mg БПК/l) след x дни**

$$БПК_x = (m_0 - (m_{bx}) - (m_0 - m_x) \cdot (*))$$

mg БПК/l след x дни		
5	15	28

\* Тази разлика е важна за контрол на валидността на изпитването.

**B: Оценка**

$$D_t = \frac{\text{mg БПК}_x / l}{\text{mg Ив} (**) / l} \times 100$$

$$\% \text{ БПК}_x / \text{ХПК} = \frac{\text{mg БПК}_x / l}{\text{mg Ив} / l \times \text{ХПК}}$$

	след x дни		
	5	15	28
% БПК/ТПК			
% БПК <sub>x</sub> /ХПК			

(\*\*) Изпитвано вещество

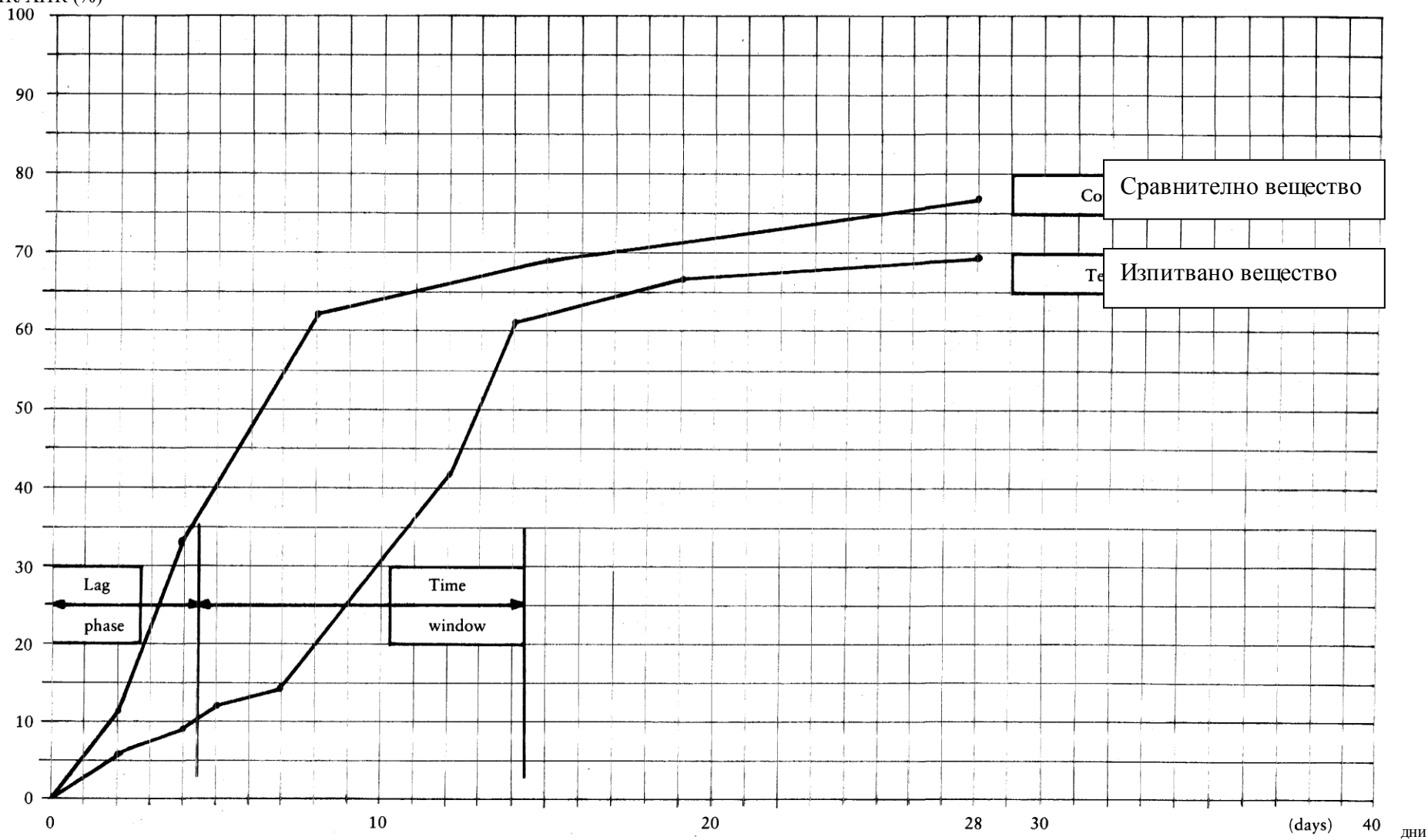
Допълнение 4

Изпитване в затворена колба

Организация, отговорна за изпитването:..... Изпитвано вещество:..... Експеримент № : .....

% ТБПК или %

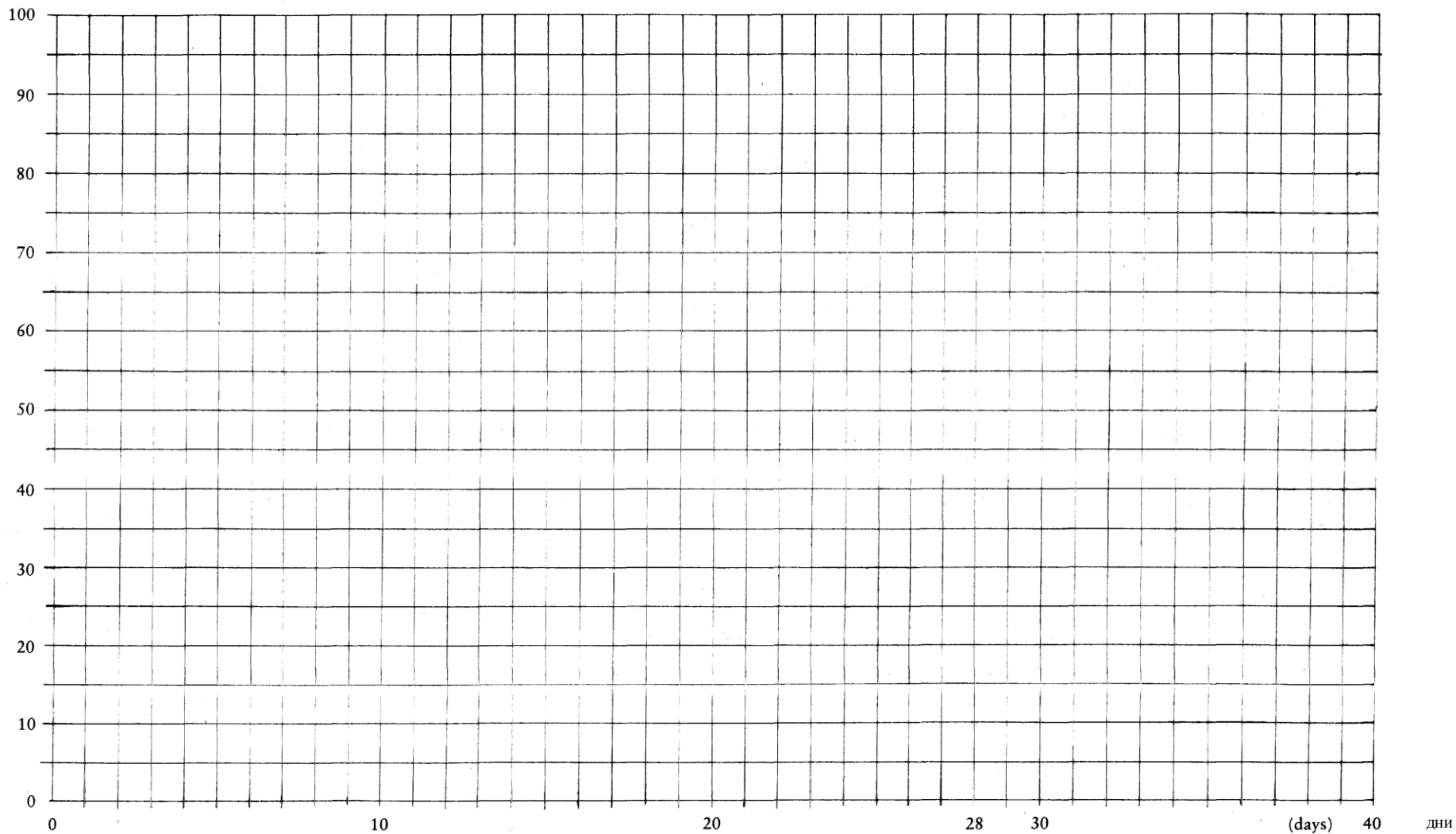
БПК/ХПК (%)



Изпитване в затворена колба

Организация, отговорна за изпитването: ..... Изпитвано вещество: ..... Експеримент № : .....

% ТБПК или %  
БПК/ХПК (%)



## В.7. БИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ: МОДИФИЦИРАНО ИЗПИТВАНЕ МІТІ

### 1. МЕТОД

#### 1.1. Увод

Настоящият метод на изпитване има за цел измерване на биоразграждането на органични вещества, във водна среда, чрез респирометър, показващ биохимичната потребност от кислород.

За да може да бъде изчислена теоретичната потребност от кислород (ТПК) е необходимо да се знае емпиричната формула на изпитваното вещество; в противен случай може да бъде използвана химичната потребност от кислород (ХПК).

Настоящият метод е приложим само за органични вещества, които при концентрацията, използвана по време на изпитване:

- имат пренебрежимо малко парно налягане,
- нямат инхибиращо действие върху бактериите,
- не са в контакт с абсорбента на  $\text{CO}_2$  и не взаимодействат с него.

Ако изпитваното вещество не е разтворимо при концентрацията на изпитване, може да се прибегне до специални методи, като диспергиране с ултразвук, за получаване на достатъчна дисперсност.

Данни за токсичността на химичното вещество по отношение на микроорганизми могат да бъдат полезни за интерпретация на резултати, показващи ограничено биоразграждане, както и при избора на подходящи концентрации.

Данни за относителните пропорции на основните елементи, съставлящи изследваното вещество биха улеснили интерпретацията на получените резултати.

#### 1.2. Определение и единици

$$\text{Процент на разграждане} = \frac{(\text{БПК} - \text{В})}{\text{ТПК (или ХПК)}} \times 100 \%$$

или

$$\text{Процент на разграждане} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

където:

БПК – биохимична потребност от кислород (експериментална) (mg) на изпитваното вещество, така както е определена от кривата на БПК,

В – консумация на кислород (експериментална) (mg) на основната среда за отглеждане на култури към която се прибавя субстанцията, така както е определена от кривата на БПК,

ТПК – теоретична потребност от кислород за пълно (теоретично) окисление на изпитваното вещество (mg),

S<sub>a</sub> – остатъчно количество (експериментално) (mg) от изпитваното вещество в края на изпитването за биоразграждане,

S<sub>b</sub> – остатъчно количество (експериментално) (mg) от веществото, подложено на контролно изпитване с вода към която се добавя единствено изпитваното вещество.

### 1.3. Сравнителни вещества

За проверка на активността на субстанцията е желателно да се използват сравнителни вещества, като анилин, натриев ацетат или натриев бензоат. Ако процентът на разграждане на анилин, изчислен по кислородната консумация, не превишава 40% след 7 и 65 % след 14 дни, изпитването се счита за невалидно.

Ако разграждането в контролното изпитване (Sb bas) е значително, изпитването също се счита за невалидно.

### 1.4. Принцип на метода

Изследваните вещества представляват единствения източник на органичен въглерод в средата и няма предварителна адаптация на микроорганизмите към изследваните вещества.

Използва се автоматичен апарат за измерване на консумацията на кислород в затворен кръг (апарат за измерване на БПК). Изпитваните химични вещества се поставят в експериментални съдове и се посяват с микро-организми. По време на изпитването биохимичната потребност от кислород се измерва непрекъснато чрез апарат за измерване на БПК. Биоразграждането се изчислява на базата на БПК и на допълнителен химичен анализ, като измерване на концентрацията на разтворения органичен въглерод, концентрацията на остатъчните продукти и т.н.

### 1.5. Критерии за качество

#### 1.5.1. Повтаряемост

Обикновено добра, особено за химични вещества, чиято разтворимост във вода е по-голяма от 0,1 грам на литър (g/l).

#### 1.5.2. Чувствителност

А) Консумация на кислород: граница на детекция = 1 милиграм (кислород, консумиран от микроорганизмите).

Б) Химичен анализ: зависи от чувствителността на използваните аналитични методи.

#### 1.5.3. Специфичност

Този метод се прилага за всички нелетливи химични вещества, за които  $(C)_{\text{вода}} / (C)_{\text{въздух}} \geq 1$ . За летливите вещества е подходящо да бъде използван „модифициран апарат за измерване на БПК“, който представлява обикновен апарат, оборудван с капилярни тръби (виж допълнение 1).

### 1.6. Описание на метода на изпитване

#### 1.6.1. Реактиви

1.6.1.1. Дестилираната вода не трябва да съдържа повече 10 % от органичния въглерод, внесен от изследваното вещество.

#### 1.6.1.2. Основна среда за отглеждане на култури

Вземат се по 3 милилитра (ml) съответно от разтвор А, разтвор Б, разтвор В и разтвор Г и се добавя вода за да бъде допълнен обема до 1 000 милилитра (във всички случаи да бъде използвана дейонизирана вода).

А) $K_2HPO_4$ (калиев хидрофосфат):	21,75 g
$KH_2PO_4$ (калиев дихидрофосфат):	8,50 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (натриев хидрофосфат додекахидрат):	44,60 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (амониев хлорид):	1,70 g
Разтваря се и обемът се допълва до 1 000 ml с вода (1.6.1.1). Стойността на рН на разтвора трябва да бъде 7,2.	
Б) $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (магнезиев сулфат хептахидрат)	22,50 g
Разтваря се и обемът се допълва до 1 000 ml с вода (1.6.1.1).	
В) $\text{CaCl}_2$ (калциев хлорид):	27,50 g
Разтваря се и обемът се допълва до 1 000 ml с вода (1.6.1.1).	
Г) $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (железен (III) хлорид хексахидрат):	0,25 g
Разтваря се и обемът се допълва до 1 000 ml с вода (1.6.1.1).	

### 1.6.2. Апаратура

Апаратура за измерване на БПК, оборудвана с 6 колби с вместимост 300 милилитра всяка.

Колби № 1 и № 2:

300 милилитра дейонизирана вода + 30 милиграма изследвано вещество.

Колби № 3 и № 4:

300 милилитра от основна среда за отглеждане на култури + 9 милиграма активна утайка (сухо тегло) + 30 милиграма изследвано вещество.

Колба № 5:

300 милилитра от основна среда за отглеждане на култури + 9 милиграма активна утайка (сухо тегло) + 30 милиграма анилин или друго сравнително вещество.

Колба № 6:

300 милилитра от основна среда за отглеждане на култури + 9 милиграма активна утайка (сухо тегло).

### 1.6.3. Приготвяне на субстанцията

#### 1.6.3.1. Активна утайка

Места за вземане на проби от утайка : по принцип, угаечни проби се вземат от най-малко 10 различни места, разпределени по цялата страна, главно в зоните, където се използват и изхвърлят в околната среда различни химични вещества.

В Япония например, стандартната активна утайка на Японския център за биохимично тестване (Japanese Chemical Biotesting Centre) се състои от смес от проби взети от следните места:

- градска пречиствателна станция: три станции, намиращи се в северната, централната и южната част на Япония,
- промишлена пречиствателна станция: една станция с предназначение да преработва използваните от химическите индустрии води,
- реки: три реки, намиращи се в северната, централната и южната част на Япония,
- езеро: едно езеро, намиращо се в централната част на Япония,
- морета: две вътрешни японски морета.



Периодичност на вземане на проби от утайка: по принцип утаечните проби трябва да се вземат четири пъти в годината, през март, през юни, през септември и през декември.

Метод за вземане на проби от утайка:

- канални води: взема се 1 литър утайка, рециклирана в пречиствателната станция,
- реки, езера и блата или морета: взема се 1 литър почва, намираща се на повърхността на брега и в контакт с атмосферата.

Приготвяне:

Утаечните проби, произлизащи от различни места се поставят в съд, хомогенизират се и се оставят да се декантират. Плаващите чужди вещества се отстраняват и супернатантът се прекарва през хартиен филтър № 2. Стойността на рН на филтратата се регулира на  $7,0 \pm 1,0$ , чрез натриев хидроксид или фосфорна киселина, след което филтратата се прелива в инкубационен съд и се аерира.

Култура:

След около 30 минути аерация, се взема около една трета от пълния обем на супернатанта. Прибавя се същият обем от 0,1 % синтетична отпадъчна вода (синтетична отпадъчна вода: 1 г глюкоза, 1 г пептон и 1 г калиев фосфат се разтварят в 1 литър вода и стойността на рН на разтвора се регулира на  $7,0 \pm 1,0$  посредством натриев хидроксид) към останалата част от супернатанта и сместа отново се аерира. Операцията се повтаря всеки ден. Инкубацията се извършва при  $25 \pm 2$  °C.

Контрол:

При контрола на културата се проверяват следните параметри и се извършват необходимите настройки:

- вид на супернатанта : супернатанта на активната утайка трябва да бъде прозрачен;
- свойства на декантиране на активната утайка: активната утайка на големи флокули трябва да има добри декантиращи свойства;
- състояние на формиране на активната утайка: в случай че не се наблюдава образуване на флокули, трябва да бъде увеличен или обемът на добавяната 0,1 % синтетична отпадъчна вода или честотата и на прибавяне на синтетичната отпадъчна вода;
- стойността на рН на супернатанта трябва да бъде равна на  $7,0 \pm 1,0$ ;
- температура: инкубационната температура на активната утайка е  $25 \pm 2$  °C;
- степен на аерация: при смяна на супернатанта със синтетична отпадъчна вода, суспензията намираща се в съда за отглеждане на култури трябва да бъде достатъчно аерирана, така че концентрацията на разтвореният в разтвора кислород да бъде поддържана със стойност по-голяма от 5 милиграма на литър;
- микрофлора на активната утайка: при наблюдаване на активната утайка с микроскоп ( $\times 100$  до  $\times 400$ ), освен едрите флокули трябва да се видят и известен брой протозои (най-прости едноклетъчни организми) от различен вид;
- смес от прясна и стара активна утайка: за да се запази същата активност на активната стара и прясна утайка, филтратът от супернатанта от използвана за изпитване активна утайка трябва да се смеси с равен обем от филтратата на супернатант на прясно събрана активна утайка, след което сместа се инкубира.
- проверка на ефикасността на активната утайка: ефикасността на активната утайка се проверява периодично (т.е. най-малко един път на всеки три месеца) с помощта на сравнителни вещества и използвайки препоръчания по-долу метод. Обръща се

особено внимание на контрола на активността на старата утайка по време на смесването на проби от прясна и стара утайка.

Пример за приготвяне на проби от активна утайка и период на използване:

Декември	Януари	Февруари
Култура	Период на използване	
Март	Април	Май
Смес, култура	Период на използване	
Юни	Юли	Август
Смес, култура	Период на използване	
Септември	Октомври	Ноември
Смес, култура (и така нататък).	Период на използване	

#### 1.6.4. Приготвяне на веществото за изследване

Ако изследваното вещество не може да бъде разтворено във вода за получаване на необходимата за изпитването концентрация, трябва да бъде пулверизирано възможно най-фино.

#### 1.6.5. Прибавяне на изследваното вещество и приготвяне с цел изпитване

Приготвят се описаните по-долу съдове за изпитване и се температурат при необходимата за изпитването температура (виж точка 1.6.2).

- 1) Два съда за изпитване, съдържащи вода, към която ще бъдат прибавени 100 милиграма на литър изследвано вещество (съдове 1 и 2).
- 2) Два съда за изпитване, съдържащи основната среда за отглеждане на култури към която ще бъдат прибавени 100 милиграма на литър изследвано вещество; при нужда преди посевка на активната утайка, стойността на рН на разтвора се регулира на 7 (съдове 3 и 4).
- 3) Един съд за изпитване, съдържащ основната среда за отглеждане на култури към която ще се прибави 100 милиграма на литър анилин или което и да е друго сравнително вещество.
- 4) Един контролен съд за изпитване, съдържащ само основната среда за отглеждане на култури (съд 6).

##### 1.6.5.1. Посевка на активната утайка

Субстанцията се прибавя към описаните по-горе съдове 3, 4, 5 и 6 по такъв начин, че концентрацията на веществата в суспензия, определени, например, от японските индустриални стандарти (3), да бъде равна на 30 милиграма на литър.

##### 1.6.5.2. Условия на изпитване

Концентрация на изследвани вещества: 100 милиграма на литър.

Концентрация на активна утайка: 30 милиграма на литър.

Температура на изпитване: 20 до 25 °С,

Продължителност на изпитването: 28 дни.

Изпитването се извършва на тъмно. Ежедневно се проверява температурата, както и промените в цвета на съдържанието на инкубационния съд.

Изпитваните разтвори се хомогенизират чрез механична бъркалка.

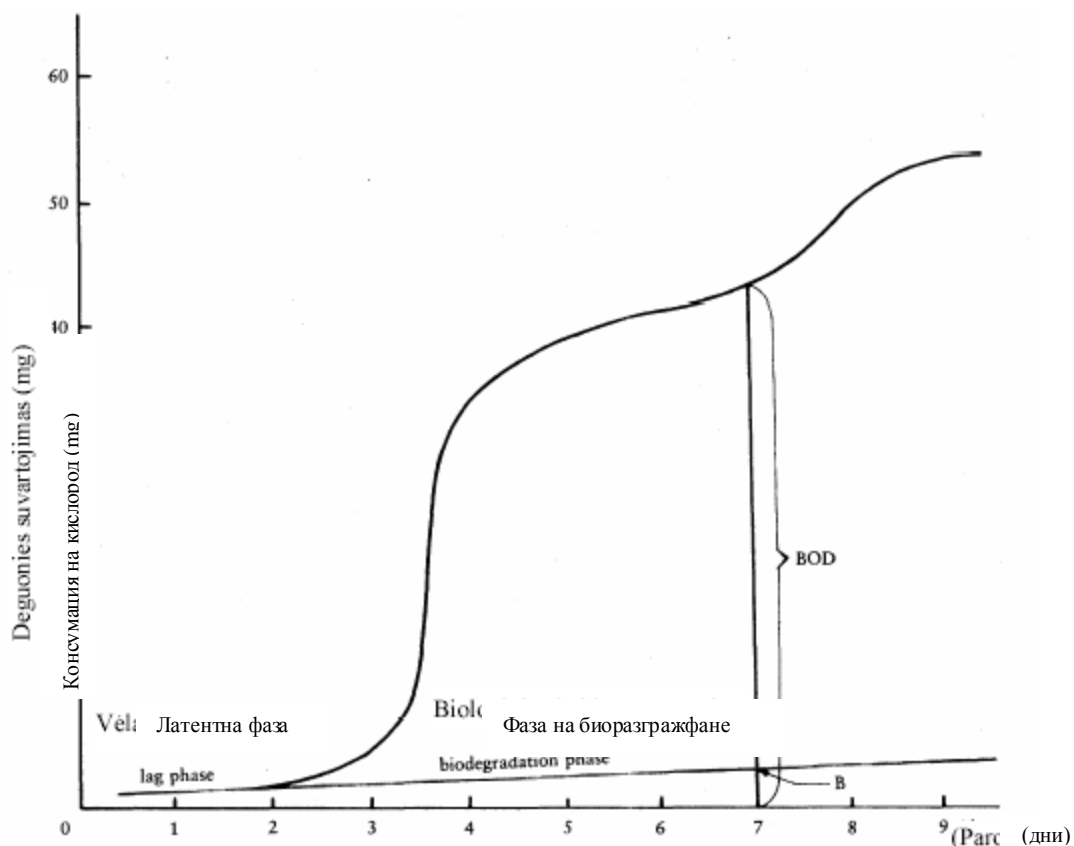
#### 1.6.6. Режим на работа

Кривата на еволюцията на БПК се регистрира непрекъснато в продължение на 28 дни (виж фигурата).

След 28 дни на изпитване се мери стойността на рН и концентрацията на остатъчните и междинни химични продукти в съдовете за изпитване.

Фигура

Крива на БПК на анилин



Изследваните вещества в съда за изпитване без активна утайка също се анализират с цел да бъде установено дали има някаква промяна в изследваното вещество по време на изпитването или загуба на първоначалното вещество вследствие изпарение или адсорбция от стените на съда и др.

#### 1.6.7. Аналитична апаратура

Ако изследваното вещество е разтворимо във вода, добре е в края на изпитването да бъде определено също остатъчното количество общ органичен въглерод.

а) При използване на апаратура за определяне на общ органичен въглерод:

вземат се 10 милилитра от изследвания разтвор в съда за изпитване и се центрофугират при 3 000 грама за 5 минути. След това остатъчната част от общия органичен въглерод в супернатанта се измерва чрез апарат за определяне на общ органичен въглерод.

б) При използване на друга апаратура:

изследваното вещество се извлича с подходящ разтворител, като се действа върху цялото съдържание на съда за изпитване и след подходяща предварителна обработка, като концентрация, се определя остатъчното количество от изследваното вещество чрез аналитичен метод (газова хроматография, масспектрометрия, спектрофотометрия и др.).

При летливите вещества, темостатираната баня на апарата за измерване на БПК трябва да бъде охладена до 10 °С и да бъде поддържана при тази температура най-малко 30 минути, за да се попречи на изпарението. След това се извършват анализи а) и б).

## 2. ОЦЕНКА НА ДАННИТЕ

### 2.1. Изразяване на резултатите

Методите за изчисление на процента на разграждане от консумацията на кислород и от на резултатите от директния анализ са представени в точка 1.2.

### 2.2. Оценка на резултатите

Теоретичната потребност от кислород може да бъде изчислена както е посочено в допълнение 2 или следвайки оригиналния метод МПТ:

Елемент	Оксидирана форма
C	CO <sub>2</sub>
H	H <sub>2</sub> O
N	NO <sub>2</sub>
S	SO <sub>2</sub>
X (халоген)	X

## 3. ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

### 3.1. Протокол от изпитването

Изпитвателният протокол трябва да съдържа, по възможност, следните данни:

- данни за изследваните химични вещества: име, структура, молекулно тегло, чистота, природа на примесите, физико-химични свойства, идентификация на веществото,
- условия на изпитване,
- субстанции: място на вземане и концентрация на активна утайка,
- изследвано вещество: концентрация,
- продължителност на изпитването,
- температура на изпитване,
- аналитични методи:
  - предобработка,
  - аналитични характеристики на апаратите,
  - ефективност на анализа,
  - идентификация на междинните продукти,
- резултати:

криви на биоразграждане (проверка на активността на субстанцията + крива на веществото)

БПК (мг)

B (мг)

Sa (мг)

Sb (мг)

ТПК (мг)

Процент на разграждане, получен чрез определяне на БПК,

Процент на разграждане, получен чрез химичен анализ,

Хроматограми и спектри на изпитваните вещества, получени и използвани за анализа,

- доказателство за валидност (виж точка 1.3).

### 3.2. Интерпретация на резултатите

Трябва да бъде проверено дали веществата не съдържат азот, който може да повлияе на резултатите.

Ако процентът на възстановяване на Sb е от порядъка на 10 % или по-нисък, това показва наличие на аналитични проблеми или хидролиза, например; в такъв случай трябва много да се внимава при интерпретацията на резултатите.

Поради строгите условия на провеждане на изпитването, нисък резултат не означава със сигурност, че изпитваното вещество не е биоразграждащо се в природни условия, а че са необходими допълнителни изпитвания за да се докаже този факт.

Изследваните вещества, за които резултатите от настоящото изпитване показват висока консумация на кислород трябва да бъдат считани за лесно биоразграждащи се, при условие че това ниво се достига за 10 дни, които се броят от деня, когато нивото на биоразграждане превишава за пръв път 10 %.

## 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 301 C*, Decision of the Council C(81) 30, Final.

2) *Biodegradability and bioaccumulation test of chemical substances* (C-5/98/JAP), 1978.

3) *The chemical substances control law in Japan* (Chemical Products Safety Division, Basic Industries Bureau, MITI) (C-2/78/JAP), 1978.

4) *The biodegradability and bioaccumulation of new and existing chemical substances*, 5,8 (C-3/78/JAP), 1978.

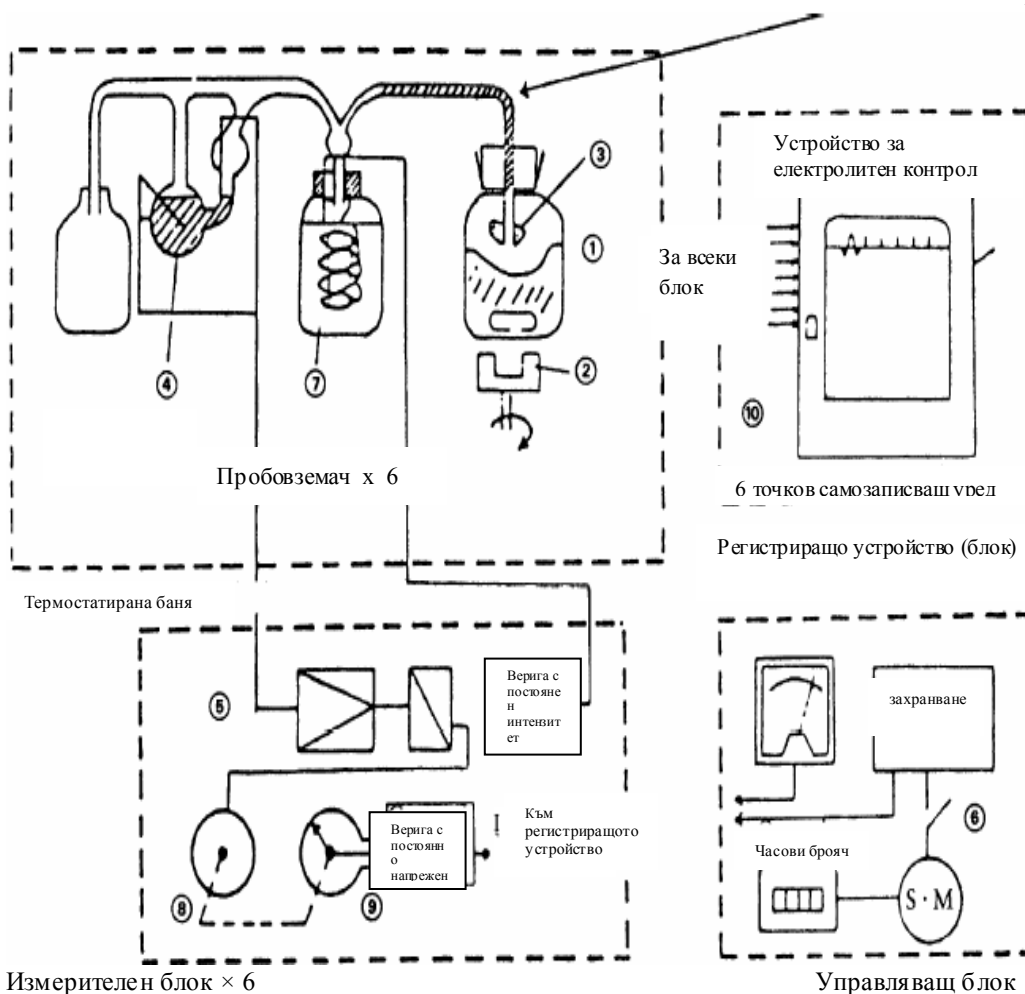
## Допълнение 1

### Принцип на действие на апаратура за измерване на консумацията на кислород в затворен кръг

Измерването на кислорода, консумиран от микро-организмите може да се направи чрез метод за електрохимичен анализ (кулонометрия).

Принципна схема на апарата:

(В апарата, модифициран за измерване на БПК, щрихованата част на тръбата се заменя с капиларна тръба.)



Средата, съдържаща се в инкубационно шише (1) се хомогенизира с магнитна бъркалка (2). В процеса на реакцията, разтвореният в течността кислород се консумира. Кислородът ( $O_2$ ) поддържан в инкубационното шише се разтваря в течността и се превръща в  $CO_2$ .

Когато  $CO_2$  се абсорбира от натронова вар (3), парциалното налягане на кислорода в шишето и пълното налягане намаляват.

Намаляването на налягането се отчита и превръща в електричен сигнал от манометъра с електрод (4), този сигнал се усилва с усилвател (5), за да задвижи реле (6), което пък пуска в действие синхронния електродвигател (8). Едновременно с това, под действието на ток с постоянна интензивност, се получава кислород чрез

електролиза от разтвор на мед в сярна киселина, намиращ се в шишета за електролиза (7).

Този кислород се изпраща в инкубационното шише и така полученото възстановяване на налягането се отчита с манометър, което води до изключване на веригата и до спиране на електролитния и синхронния мотори.

Пространството над течността в инкубационното шише се държи при постоянно кислородно налягане и количеството кислород, получено при електролизата. Тъй като последното количество от своя страна е пропорционално на продължителността на електролизата, електролитният ток е постоянен.

Чрез включен във веригата блокиращ потенциометър, ъгълът на завъртане на синхронния електродвигател (9) се превръща в сигнал mV, който се отчита като количество консумиран кислород и записва на самозаписващ уред (10).



## Допълнение 2

### Изчисление на теоретичната биохимична потребност от кислород

Теоретичната биохимична потребност от кислород (ТПК) на веществото  $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ , с молекулно тегло МТ, се изчислява по следната формула:

$$ТПК_{NH_3} = \frac{16[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + 2\frac{1}{2}p + \frac{1}{2}na - o]}{MT}$$

Прилагането на тази формула изисква С да се е превърнал в  $CO_2$ , Н в  $H_2O$ , Р в  $P_2O_5$  и Na в  $Na_2O$ . Халогенният елемент се отстранява под формата на хидрохалогенид и азота под формата на амоняк.

*Пример:*

Глюкоза  $C_6H_{12}O_6$ , МТ = 180.

$$ТПК = \frac{16(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg глюкоза}$$

При изчислението на молекулните тегла на соли, различни от солите на алкалните метали, се приема че тези соли са хидролизирани. Предполага се, че сярата е окислена до състояние + 6.

*Пример:*

Натриев n-алкилбензолсулфонат  $C_{18}H_{29}SO_3Na$ , МТ = 348

$$ТПК = \frac{16(36 + 29/2 + 3 + 1/2 - 3)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg вещество}$$

В случая на някои съединения съдържащи азот, последният може също да бъде премахнат под формата на амоняк, нитрит или нитрат, в зависимост от различните теоретични биохимични потребности от кислород.

$$ТПК_{NO_2^-} = \frac{16[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + 1\frac{1}{2}n + 2\frac{1}{2}p + \frac{1}{2}na - o]}{MT}$$

$$ТПК_{NO_3^-} = \frac{16[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + 2\frac{1}{2}n + 2\frac{1}{2}p + \frac{1}{2}na - o]}{MT}$$

Ако пълно образуване на нитрат се наблюдава при анализ в случая на един вторичен амин:  $(C_{12}H_{25})_2NH$ , МТ: 353

$$ТПК_{NO_3^-} = \frac{16(48 + 51/2 + 5/2)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg вещество}$$

Допълнение 3

**Биотично разграждане: модифицирано изпитване МПТ (бюлетин)**

Лаборатория:.....

Ръководител на изследването: .....

Начална дата на изпитването:..... Експеримент №:.....

Изпитвано вещество:.....

Химичен състав:.....

Анализ:.....

ТПК или ХПК на изпитваното вещество:.....

Субстанция (оникулум): .....

Място на вземане на проба:.....

Концентрация: .....

---

*Резултат от изпитването:*

$$\dots\dots\dots\% \text{ разграждане} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{ThOD}} \times 100 \% \text{ след 28 дни}$$

или

$$\dots\dots\dots\% \text{ разграждане} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{COD}} \times 100 \% \text{ след 28 дни}$$

$$\dots\dots\dots\% \text{ разграждане} = \frac{\text{Sb} - \text{Sa}}{\text{Sb}} \times 100 \% \text{ след 28 дни}$$

*Валидиране на резултата*

Химичен контрол:.....

Резултат:..... % деградация след 28 дни.....

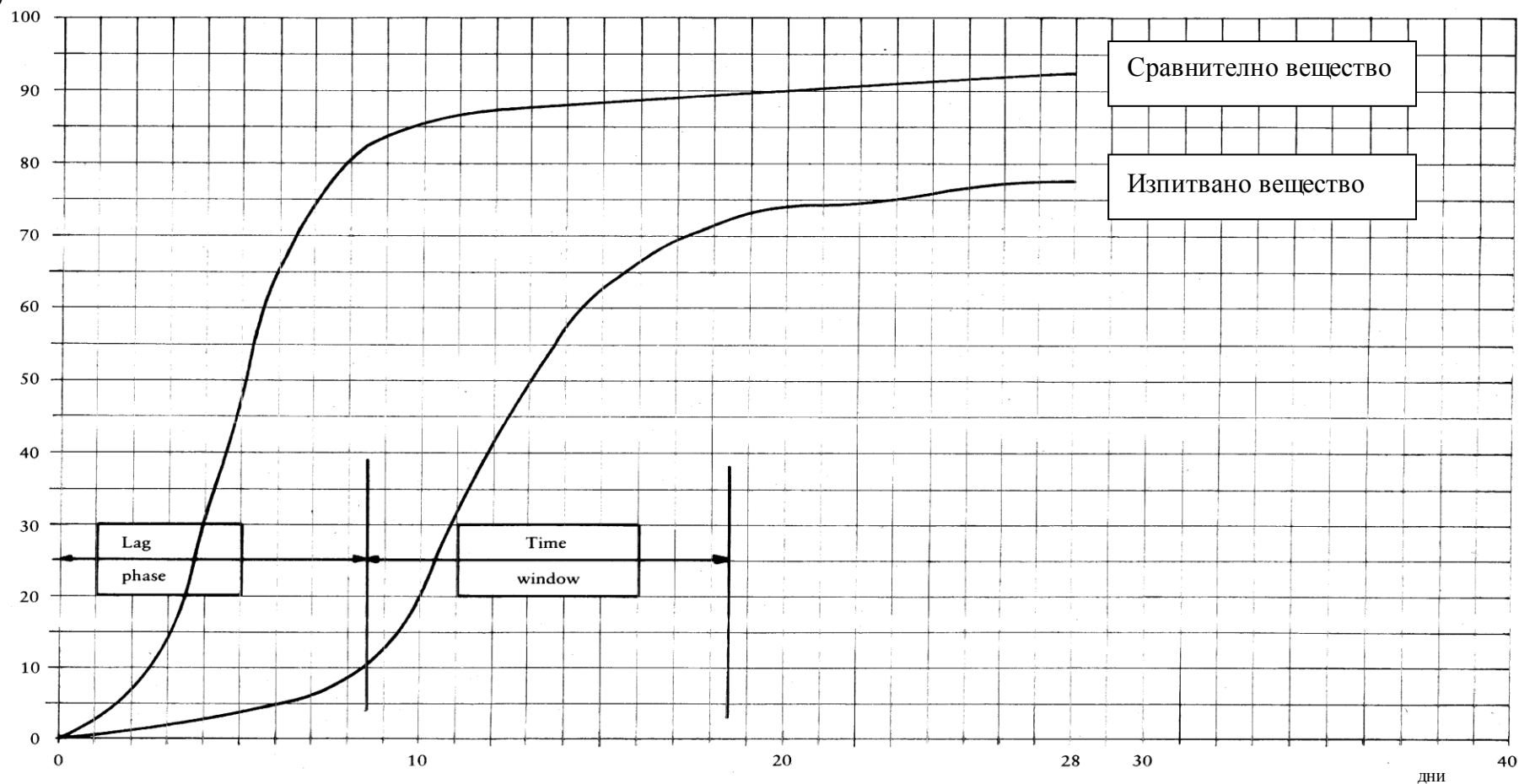
Контролен експеримент №: .....

*Забележки:*



Допълнение 4  
Модифицирано изпитване МГТ

Организация, отговорна за изпитването: ..... Изпитвано вещество: ..... Експеримент №. ....  
Биоразграждане  
(%)

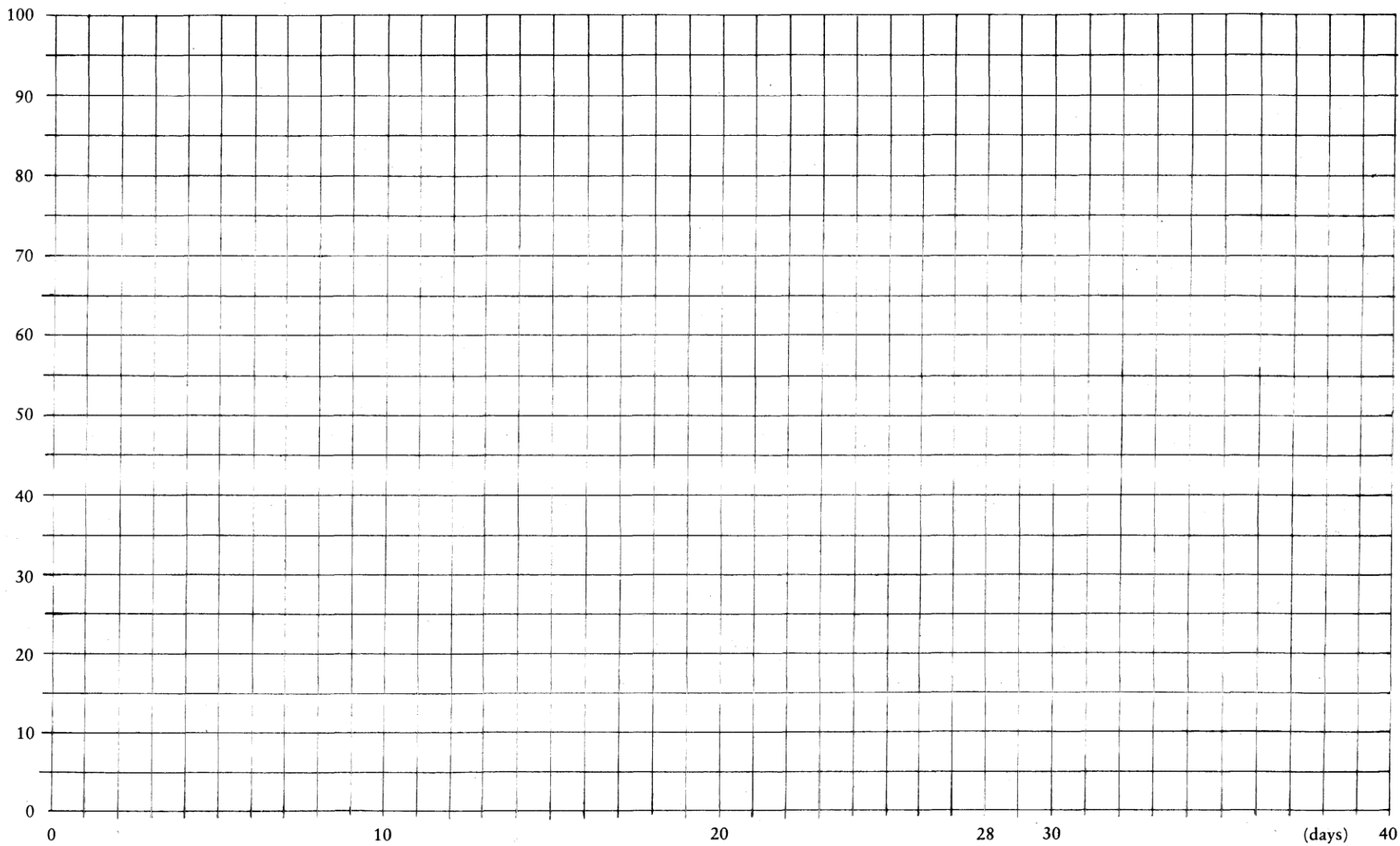


# Модифицирано изпитване МПТ

Организация, отговорна за изпитването: ..... Изпитвано вещество: .....

Експеримент №.

Биоразграждане  
(%)



дни

## **В.8. РАЗГРАЖДАНЕ: БИОХИМИЧНА ПОТРЕБНОСТ ОТ КИСЛОРОД**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Настоящият метод има за цел измерване на биохимичната потребност от кислород (БПК) на органични, твърди или течни вещества.

Данните, получени при това изпитване се отнасят до водоразтворими съединения; при все това, по принцип, летливите съединения и съединенията със слаба водоразтворимост също могат да бъдат изпитвани.

Методът е приложим само за органични вещества, които нямат инхибиращо действие върху бактериите при концентрацията, използвана по време на изпитване. Ако изпитваното вещество не е разтворимо при концентрацията на изпитване, може да се наложи прибягване до специални методи, като диспергиране с ултразвук, за получаване на добра дисперсност на веществото.

Данни за токсичността на химичното вещество могат да бъдат да улеснят интерпретацията на не много убедителните резултати, както и избора на подходящи концентрации на изпитване.

#### *1.2. Определение и единици*

Биохимичната потребност от кислород (БПК) се дефинира като количеството разтворен кислород, необходимо за осигуряване, при определени условия, на биохимичното окисление на определен обем разтвор на изпитваното вещество.

Резултатите се изразяват като грамове БПК за грам изпитвано вещество.

#### *1.3. Сравнителни вещества*

Сравнителни вещества не могат да бъдат препоръчани.

Желателно е използването на подходящо контролно химично вещество за да се провери активността на субстанцията.

#### *1.4. Принцип на метода за изпитване*

Предварително определено количество от даденото вещество, разтворено или диспергирано в подходяща аерирана среда се посява с микро-организми и се инкубира при определена стайна температура, на тъмно.

Биохимичната потребност от кислород (БПК) се определя от разликата между количеството разтворен кислород в началото и в края на изпитването. Продължителността на изпитването е най-малко пет дни и не трябва да превишава 28 дни.

Контролата трябва да се извърши с успоредно изпитване, несъдържащо изпитвано вещество.

#### *1.5. Критерии за качество*

Определянето на биохимичната потребност от кислород (БПК) не може да се счита за валидно определяне на биоразграждане на дадено вещество. То представлява само селекционно изпитване.

### **1.6. Описание на метода на изпитване**

Предварително се приготвя разтвор или дисперсия на веществото с цел получаване на концентрация на биохимичната потребност от кислород (БПК) съвместима с използвания метод. Тогава биохимичната потребност от кислород (БПК) се определя чрез прилагане на подходящ стандартизиран национален метод. За предпочитане е да бъде използван международен метод, ако е съгласуван.

## **2. ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Биохимичната потребност от кислород на предварителния разтвор се изчислява по избран нормализиран метод и се превръща в грамове БПК към грам изпитвано вещество.

## **3. ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Трябва да бъде посочен използваният метод.

Биохимичната потребност от кислород трябва да бъде средната стойност от най-малко три валидни измервания.

Всички данни и подходящи наблюдения, помагачи за интерпретацията на резултатите трябва да бъдат отбелязани, особено що се отнася до примесите, физичното състояние, токсичните ефекти и съдържанието на веществото, които могат да повлияят на резултатите.

Използването на всяка добавка за инхибиране на биологичната нитрификация трябва да бъде упоменато.

## **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Списък на стандартизирани методи, например:

NF T 90 - 103: Determination of Biochemical Oxygen Demand.

NBN 407: Biochemical Oxygen Demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of Water and Associated Materials, HMSO, London.

## **В.9. РАЗГРАЖДАНЕ: ХИМИЧНА ПОТРЕБНОСТ ОТ КИСЛОРОД**

### **1. МЕТОД**

#### **1.1. Увод**

Настоящият метод има за цел измерване на химичната потребност от кислород (ХПК) на органични, твърди или течни вещества, чрез прилагане на всеки стандартен режим на работа, при определени лабораторни условия.

Ако се разполага с данни за формулата на даденото вещество, това би улеснило провеждането на това изпитване, както и интерпретацията на получените резултати (например соли на халогенни елементи, феросоли на органични съединения, хлорорганични съединения).

#### **1.2. Определение и единици**

Химичната потребност от кислород е мярка за окисляемостта на дадено вещество, определена като количеството кислород от окисляващ реактив, консумирано от даденото вещество при определени лабораторни условия.

Резултатите се изразяват като грамове DCO за грам изпитвано вещество.

#### **1.3. Сравнителни вещества**

Използването на сравнителни вещества не се изисква във всички случаи при изследване на ново вещество. Те трябва основно да служат за периодично калибриране на метода и за сравнение на резултатите, когато се използва друг метод.

#### **1.4. Принцип на метода на изпитване**

Определено количество от даденото вещество, разтворено или диспергирано във вода, се окислява с калиев бихромат в присъствие на концентрирана сярна киселина (катализаторът е сребърен сулфат) на топло и в противопоток в продължение на два часа. Остатъкният бихромат се определя чрез титруване с помощта на фероамониев сулфат.

В случая, когато веществата съдържат хлор, се прибавя живачен сулфат за намаляване влиянието на хлоридите.

#### **1.5. Критерии за качество**

Поради случайния характер на условията за определяне на химичната потребност от кислород (ХПК), последната трябва да бъде приемана по-скоро като "показател за окисляемост", отколкото като оценка за органичното вещество.

Хлоридите могат да влияят по време на извършване на това изпитване; други неорганични редуциращи или оксидиращи вещества също могат да повлияят на определянето на химичната потребност от кислород (ХПК).

Някои циклични съединения не се окисляват напълно по време на изпитването.

#### **1.6. Описание на метода за изпитване**

Предварително се приготвя разтвор или дисперсия на веществото за достигане на химична потребност от кислород (ХПК) от 250 до 600 милиграма на литър.

*Забележка:*



Когато се работи със слабо разтворими и недиспергиращи се вещества, се претегля количество от даденото вещество, фино пулверизирано или в течно състояние, съответстващо на приблизително 5 милиграма ХПК и се внася в експерименталния апарат с добавяне на вода.

След това се определя химичната потребност от кислород (ХПК), като се прилага всеки подходящ стандартизиран национален метод, в изчакване на публикуването на стандартизиран международен метод, след което е желателно той да бъде използван.

## **2. ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Химичната потребност от кислород (ХПК) в експерименталния съд се изчислява по избран нормализиран метод и се превръща в грамове ХПК към грам изпитвано вещество.

## **3. ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Трябва да бъде посочен използваният сравнителен метод.

Химичната потребност от кислород е средната стойност от най-малко три измервания. Всички данни и наблюдения, представляващи интерес за интерпретацията на резултатите трябва да бъдат отбелязани, особено що се отнася до примесите, физичното състояние и специфичните свойства на веществото (ако са известни), можещи да повлияят на резултатите.

Използването на живачен сулфат за намаляване влиянието на хлоридите се отбелязва.

## **4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ**

Примери за стандартизирани методи.:

NBN T 91 - 201	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
ISBN 0 11 7512494	Chemical Oxygen Demand (dichromate value) of polluted and waste waters.
NF T 90 - 101	Determination de la demande chimique en oxygene.
DS 217 = Water analysis	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
DIN 38409 - H - 41	Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD) within the range above 15 mg/l .
NEN 3235 5.3	Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.
ISO DP 6060	Water Quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate Methods.

## В.10. АБИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ: ХИДРОЛИЗА В ЗАВИСИМОСТ ОТ рН

### 1. МЕТОД

Този метод се основава на метода, описан в “ръководните указания” на ОИСР (1).

#### 1.1. Увод

Хидролизата е важна реакция, контролираща абиотичното разграждане. Тази реакция е изключително подходяща за слабо биоразграждащи се вещества и може да влияе на устойчивостта на дадено вещество в околната среда.

По-голямата част от хидролизните реакции са от псевдо-първи порядък и за това “времената на полуживот” зависят от концентрацията. Обикновено това позволява резултатите, получени при лабораторни концентрации да бъдат екстраполирани за условия на околната среда.

Освен това, цитирани са много примери (2), показващи задоволително съответствие между резултатите, получени в чиста вода и в природна вода, за различни видове химични вещества.

За осъществяване на това изпитване е полезно да се разполага с предварителни данни за парното налягане на веществото.

Този метод е приложим само за твърди вещества. По принцип примесите влияят на резултатите.

Хидролизното поведение на химичните вещества трябва да бъде изследвано при стойности на рН, срещани обикновено в околната среда (рН 4 до 9).

#### 1.2. Определения и единици

Хидролизата се отнася до реакцията на даден химичен продукт RX с водата. Тази реакция може да бъде представена чрез характерна смяна на радикала X с OH:



Скоростта, с която концентрацията на RX намалява се дава със зависимостта:

$$\text{скорост} = k \times [\text{H}_2\text{O}] \times [\text{RX}] \quad [2]$$

Тъй като водата е в голям излишък по отношение на химичното вещество, този тип реакция обикновено се описва като реакция от псевдо-първи порядък, по време на която наблюдаваната скоростна константа са дава със зависимостта:

$$k_{\text{obs}} = k \times [\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

Тази константа може да бъде определена за дадена стойност на рН и дадена температура T, като се използва уравнението:

$$k_{\text{obs}} = \frac{2,303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

където:

$t$  – време,  
 $C_0$  – концентрация на веществото в момент 0,  
 $C_t$  – концентрация на веществото в момент  $t$ ,  
2,303 – коефициент на превръщане между естествени (неперови) и десетични логаритми.

Концентрациите се изразяват с g/l или mol/l.  
Единицата за константата  $k_{obs}$  е (време)<sup>-1</sup>

Времето на полуживот,  $t_{1/2}$ , е времето, необходимо за намаляване на концентрацията на изпитваното химично вещество с 50%, т.е.:

$$C_t = \frac{1}{2} C_0 \quad [5]$$

От изрази (4) и (5), може да бъде показано, че:

$$t_{1/2} = 0,693/k_{obs} \quad [6]$$

### *1.3. Сравнителни вещества*

Използването на сравнителни вещества не е необходимо във всички случаи при изследване на ново вещество. Те трябва основно да служат за проверка на ефикасността на метода през определен период от време и за сравнение на резултатите, когато се използва друг метод.

Ацетилсалициловата киселина (аспирин) и 0,0-диетил 0-2 изопропил-4-метил-6 пиримидил тиофосфат (димпилат, диазинон) са използвани като сравнителни вещества (1).

### *1.4. Принцип на метода*

Даденото вещество се разтваря във вода при ниска концентрация, стойността на рН и на температурата се контролират.

Намаляването на концентрацията на веществото с времето се проследява с всеки подходящ аналитичен метод.

На графика се представя зависимостта на логаритмите на концентрациите на веществото от времето и, ако се получава права линия, скоростната константа от първи порядък може да бъде получена от наклона на правата (виж точка 2).

Когато не е възможно скоростната константа да бъде определена директно за определена температура, обикновено е възможно да бъде оценена стойността на тази константа, като се използва уравнението на Арениус, даващо температурната зависимост на скоростната константа.

От линейната графика на логаритъма на скоростната константа, както е определена за дадена температура, в зависимост от реципрочната стойност на абсолютната температура (K), е възможно да бъде екстраполирана стойността на скоростната константа, която не е определена в първия случай.

### *1.5. Критерии за качество*

Представените резултати в цитат (2) показват, че измервания на скоростната константа на хидролиза за 13 класа органични структури могат да бъдат извършени с голяма точност.

Повтаряемостта зависи най-вече от контролирането на стойността на рН, на концентрацията на разтворения кислород и може да бъде повлияна от наличието на микроорганизми.

### *1.6. Описание на метода*

#### *1.6.1. Реактиви*

##### *1.6.1.1. Буферни разтвори*

Изпитването се извършва при три стойности на рН: 4,0, 7,0 и 9,0.

За тази цел трябва да бъдат приготвени буферни разтвори, като се използват химични реактиви с чистота за анализ и дестилирана или дейонизирана стерилна вода.

Няколко примера за буферни разтвори са представени в допълнението.

Ако даден буферен разтвор влияе върху скоростта на хидролиза; в такъв случай трябва да бъде използван друг буферен разтвор. В цитат (2) се препоръчва използване като буфери на борат или ацетат, вместо фосфати.

Ако стойността на рН на буферните разтвори при температурата на изпитване не е известна, тя трябва да бъде определена с помощта на рН-метър, калибриран при избраната температура с точност  $\pm 0,1$  на единица стойност на рН.

##### *1.6.1.2. Разтвори за изпитване*

Изпитваното вещество се разтваря в избрания буфер и концентрацията му не трябва да превишава 0,01 М или половината от концентрацията на насищане.

Използването на смесващи се с вода органични разтворители се препоръчва само за вещества с ниска разтворимост във вода. Количеството разтворител трябва да бъде под 1% и не трябва да влияе на хидролизния процес.

#### *1.6.2. Апаратура*

Трябва да бъдат използвани затворени стъклени колби, но трябва да бъде избягвано използването на смазка върху шифа.

Ако използваното вещество или буфер са летливи, или ако изпитването се извършва при високи температури, за предпочитане е да бъдат използвани запоеени или затворени тръби, запълнени възможно най-пълно.

### 1.6.3. Аналитичен метод

Аналитичният метод зависи от природата на изпитваното вещество и трябва да бъде достатъчно чувствителен и специфичен за определяне на намаление на началната концентрация с 10%.

Методът трябва да бъде специфичен, за да позволи определяне на изпитваното вещество при използваните по време на изпитването концентрации и може да бъде комбинация на няколко подходящи аналитични метода.

### 1.6.4. Условия на изпитване

Изпитванията се извършват с използване на контролируема термостатирана преграда или баня с постоянна температура, настроена на избраната температура, с допустимо отклонение от  $\pm 0,5$  °C. Температурата се поддържа и измерва с точност до  $\pm 0,1$  °C. Фотолизните влияния трябва да бъдат избягвани с подходящи средства.

Трябва да бъдат вземани всички подходящи предпазни мерки за отстраняване на разтвореният кислород (например, барботиране с азот или аргон в продължение на 5 минути преди приготвяне на разтворите).

### 1.6.5. Процедура на изпитване

#### 1.6.5.1. Предварителен тест

За всички вещества трябва да бъде извършен предварителен тест при температура  $50 \pm 0,5$  °C и стойности на рН: 4,0, 7,0 и 9,0.

Извършват се достатъчен брой измервания, така че да бъде възможно да се оцени дали, за всяка стойност на рН и при  $50$  °C, времето на полу-живот ( $t_{1/2}$ ) е по-малко от 2,4 часа или дали по-малко от 10% хидролиза се наблюдава след 5 дни. (Може да бъде направена оценката, че тези стойности отговарят съответно на времена на живот по-малки от 1 ден или по-големи от 1 година при условия, по-близки до тези на околната среда ( $25$  °C)).

Ако предварителният тест показва че 50% или повече от изпитваното вещество са хидролизирани за 2,4 часа при температура  $50$  °C или че по-малко от 10% са хидролизирани след 5 дни за всяка стойност на рН (4, 7 и 9), не е необходимо изпитванията да бъдат продължавани.

В други случаи и за стойности на рН, за които тези условия не са изпълнени, се извършва изпитване № 1.

#### 1.6.5.2. Изпитване № 1

Изпитване № 1 се извършва при една температура, за предпочитане  $50 \pm 0,5$  °C, ако е възможно при стерилни условия, за стойностите на рН, за които предварителните изпитвания са показали нужда от допълнителни изпитвания.

Трябва да бъдат избрани достатъчен брой проби (не по-малко от 4) за да бъде покрит интервалът от 20 до 70 % на хидролиза за определяне на поведение от псевдо-първи порядък за определените стойности на рН.

За всяка стойност на рН, за която е извършено изпитване № 1, се определя порядъка на реакцията.

Изчислява се скоростната константа при 25 °С.

Решението за избор на експериментален метод зависи от това, дали е възможно да се заключи от изпитване № 1, че реакцията е или не е от псевдо-първи порядък.

Ако по време на изпитване № 1 не е възможно да бъде определено със сигурност дали реакцията е от псевдо-първи порядък, експериментите трябва да продължат така, както е описано в изпитване № 2.

Ако определянето на псевдо-първи порядък на реакцията по време на изпитване № 1 е надеждно, експериментите трябва да продължат според описанието на изпитване № 3 (или, при някои условия е възможно да се изчисли скоростната константа при 25 °С на базата на константи, определени при 50 °С, изчислени използвайки резултатите от изпитване № 1 (виж точка 3.2).

#### *1.6.5.3. Изпитване № 2*

Това изпитване се извършва за всяка стойност на рН, за която е установено в изпитване № 1, че е необходимо да бъдат продължени експериментите:

- или при избрана, по-ниска от 40 °С температура,
- или при две температури, под 50 °С, разделени една от друга най-малко с 10 °С.

За всяка стойност на рН и за температурата, при които е извършено изпитване № 2, се измерват най-малко шест, разделени по подходящ начин точки, така че процентите на хидролиза да бъдат в интервала от 20 % до 70 %.

За една стойност на рН и една температура се извършва двойно определяне. Когато изпитване № 2 е извършено при две температури, по-ниски от 50 °С, за предпочитане е двойното определяне да бъде извършвано при по-ниската от двете температури.

За всяка стойност на рН и температурата, при които е извършено изпитване № 2 се дава графична оценка на времето на полу-живот ( $t_{1/2}$ ), когато това е възможно.

#### *1.6.5.4. Изпитване № 3*

Това изпитване се извършва за всяка стойност на рН, за която резултатите от изпитване № 1, са показали необходимостта:

- или при избрана, по-ниска от 40 °С температура,
- или при две температури, под 50 °С, разделени една от друга най-малко с 10 °С.

За всяка стойност на рН и за температурата, при които е извършено изпитване № 3, се избират три точки на определяне, първата в нулев момент ( $t = 0$ ) и втората и третата, когато процентите на хидролиза са над 30 %; трябва да бъдат изчислени константата  $k_{obs}$  и  $t_{1/2}$ .

## 2. ДАННИ

В случай на поведение от псевдо-първи порядък, стойностите на  $k_{obs}$  за всяка стойност на рН и всяка температура на изпитване могат да бъдат получени от графиката на логаритмите на концентрациите в зависимост от времето, като се използва израза:

$$k_{obs} = -\text{наклон} \times 2,303 \quad [7]$$

Освен това,  $t_{1/2}$  може да бъде изчислено като се използва уравнение [6]. Когато е подходящо се изчислява  $k_{25\text{ }^\circ\text{C}}$  прилагайки уравнението на Арениус.

В случая, когато поведението не е от псевдо-първи порядък, виж точка 3.1.

## 3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

### 3.1. *Протоколът от изпитването трябва, по възможност, да съдържа следната информация:*

- спецификации на изследваното вещество;
- всеки резултат, получен със сравнителни вещества;
- принцип и пълно описание на използвания аналитичен метод;
- за всяко изпитване: температури, стойност на рН, състав на буфера и таблица с експерименталните точки “концентрация – време”;
- в случай на реакции от псевдо-първи порядък, стойностите на  $k_{obs}$  и  $t_{1/2}$  и методите за тяхното изчисляване;
- в случай на реакция, която не е от псевдо-първи порядък, се построява графиката на зависимостта на логаритмите на концентрациите от времето;
- всяка информация и наблюдение, необходими за интерпретацията на резултатите.

### 3.2. *Интерпретация на резултатите*

Понякога е възможно да бъдат изчислени приемливи стойности на скоростната константа (при температура 25°C) на изпитваното вещество, при условие че стойностите на енергията на активация за хомолози на химичното вещество са вече известни и че може да бъде оценено, че енергията на активация на изпитваното вещество е от същия порядък.

## 4. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- 1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 111*, Decision du Conseil C(81) 30 F.
- 2) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 111*, Decision du Conseil C(81) 30 F, reference (2).

*Допълнение*  
**Буферна смес**

**A. CLARK И LUBS**

Посочените по-долу стойности на рН са изчислени от потенциални измервания с използване на стандартните уравнения на Sørensen (1909).

Реалните стойности на рН са с 0,04 по-високи от тези стойности

Съдържание	рН
0,1 М калиев хидрофталат + 0,1 N HCl при 20 °C	3,8
2,63 мл 0,1 N HCl + 50 мл фталат, допълва се до 100 мл	
0,1 М калиев хидрофталат + 0,1 N NaOH при 20 °C	
0,40 мл 0,1 N NaOH + 50 мл фталат, допълва се до 100 мл	4,0
3,70 мл 0,1 N NaOH + 50 мл фталат, допълва се до 100 мл	4,2
0,1 М калиев дихидрофосфат + 0,1 N NaOH при 20 °C	
23,45 мл 0,1 N NaOH + 50 мл фосфат, допълва се до 100 мл	6,8
29,63 мл 0,1 N NaOH + 50 мл фосфат, допълва се до 100 мл	7,0
35,00 мл 0,1 N NaOH + 50 мл фосфат, допълва се до 100 мл	7,2
0,1 М H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> в 0,1 М KCl + 0,1 N NaOH при 20 °C	
16,30 мл 0,1 N NaOH + 50 мл борна киселина, допълва се до 100 мл	8,8
21,30 мл 0,1 N NaOH + 50 мл борна киселина, допълва се до 100 мл	9,0
26,70 мл 0,1 N NaOH + 50 мл борна киселина, допълва се до 100 мл	9,2

**B. KOLTHOFF И VLEESHOUWER**

Съдържание	рН
0,1 М калиев дихидроцитрат и 0,1 N NaOH при 18 °C (прибавя се се много тънък кристал от тимол или няколко милиграма живачен йодид, за да се избегне нарастването) на мухлясането).	3,8
2,0 мл 0,1 N NaOH + 50 мл цитрат, допълва се до 100 мл	4,0
9,0 мл 0,1 N NaOH + 50 мл цитрат, допълва се до 100 мл	4,2
16,3 мл 0,1 N NaOH + 50 мл цитрат, допълва се до 100 мл	



**B. SÖRENSEN**

0,05 М боракс + 0,1 N HCl

Състав		pH			
мл боракс	мл HCl	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 М боракс + 0,1 N NaOH

Състав		pH			
мл боракс	мл NaOH	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12