

II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

KOMMISSION

RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 25. April 1984

zur sechsten Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt

(84/449/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN
GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 67/548/EWG des Rates vom 27. Juni 1967 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe ⁽¹⁾, zum sechstenmal geändert durch die Richtlinie 79/831/EWG des Rates ⁽²⁾, insbesondere durch die Artikel 19, 20 und 21,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Nach Artikel 3 Absatz 1 der Richtlinie 79/831/EWG erfolgt die Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Stoffe und Zubereitungen sowie ihrer Toxizität und Ökotoxizität nach den in Anhang V vorgesehenen Methoden.

Gemäß Artikel 19 der Richtlinie 79/831/EWG vom 18. September 1979 findet auf Anhang V das genannte Verfahren des Ausschusses für die Anpassung an den technischen Fortschritt Anwendung. Insbesondere sind die von den zuständigen internationalen Einrichtungen anerkannten und empfohlenen Methoden zu berücksichtigen, sofern solche Empfehlungen abgegeben wurden.

Die vorliegende Richtlinie stimmt mit der Stellungnahme des Ausschusses für die Anpassung der Richtlinien über die Beseitigung der technischen Handels-

hemmnisse bei gefährlichen Stoffen und Zubereitungen an den technischen Fortschritt überein —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Der Text des Anhangs V der Richtlinie 67/548/EWG wird durch den Text des Anhangs dieser Richtlinie ersetzt.

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten erlassen und veröffentlichen bis zum 1. Juli 1985 die erforderlichen Bestimmungen, um dieser Richtlinie nachzukommen, und setzen die Kommission hiervon unverzüglich in Kenntnis. Sie wenden diese Bestimmungen spätestens ab 1. Juli 1986 an.

Artikel 3

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 25. April 1984

Für die Kommission

Karl-Heinz NARJES

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. Nr. 196 vom 16. 8. 1967, S. 1.

⁽²⁾ ABl. Nr. L 259 vom 15. 10. 1979, S. 10.

ANHANG

In diesem Anhang werden die Methoden zur Bestimmung der physikalisch-chemischen, toxikologischen und ökotoxikologischen Eigenschaften gemäß den Anhängen VII und VIII der Richtlinie 79/831/EWG beschrieben. Diese beruhen auf Methoden, die von den zuständigen internationalen Stellen (insbesondere OECD) anerkannt und empfohlen worden sind.

Wo keine solchen Methoden verfügbar waren, sind einzelstaatliche Normen oder von den Wissenschaftlern vereinbarte Methoden gewählt worden. Generell sollten die Versuche mit den auf dem Markt erhältlichen Stoffen durchgeführt werden. Beachtung ist dem möglichen Einfluß von Verunreinigungen auf die Ergebnisse beizumessen.

Wenn die Methoden dieses Anhanges nicht geeignet für die Untersuchung einer bestimmten Eigenschaft sind, muß der Anmelder die alternativ benutzte Methode begründen.

Die Tierversuche sind in Übereinstimmung mit den einzelstaatlichen Bestimmungen durchzuführen und sollten humanen Kriterien und den neuesten internationalen Erkenntnissen im Bereich der Tiergesundheit Rechnung tragen.

Bei gleichwertigen Prüfmethode ist nur diejenige anzuwenden, die die geringeren Tieropfer erfordert.

INHALTSVERZEICHNIS

TEIL A: Methoden zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften	4
A. 1. Schmelzpunkt/Schmelzbereich	4
A. 2. Siedepunkt/Siedebereich	13
A. 3. Relative Dichte	20
A. 4. Dampfdruck	25
A. 5. Oberflächenspannung	37
A. 6. Wasserlöslichkeit	44
A. 7. Fettlöslichkeit	53
A. 8. Verteilungskoeffizient	57
A. 9. Flammpunkt	61
A. 10. Entzündlichkeit (Feste Stoffe)	63
A. 11. Entzündlichkeit (Gase)	66
A. 12. Entzündlichkeit (Stoffe und Zubereitungen, die bei Berührung mit Wasser oder mit feuchter Luft leichtentzündliche Gase in gefährlicher Menge entwickeln)	68
A. 13. Entzündlichkeit (Feste und flüssige Stoffe)	72
A. 14. Explosionsgefahr	74
A. 15. Selbstentzündlichkeit (Bestimmung der Zündtemperatur von Flüssigkeiten und Gasen)	84
A. 16. Selbstentzündlichkeit (Feste Stoffe — Bestimmung der relativen Selbstentzündungstemperatur)	86
A. 17. Brandfördernde Eigenschaften	89
TEIL B: Methoden zur Bestimmung der Toxizität	94
Allgemeine Einleitung	94
B. 1. Akute Toxizität oral	96
B. 2. Akute Toxizität Inhalation	99
B. 3. Akute Toxizität dermal	103
B. 4. Akute Toxizität Hautreizung	106
B. 5. Akute Toxizität Augenreizung	109
B. 6. Akute Toxizität Sensibilisierung der Haut	113
B. 7. Subakute Toxizität oral	118
B. 8. Subakute Toxizität Inhalation	122
B. 9. Subakute Toxizität dermal	127
B. 10. Sonstige Wirkung — Mutagenität — in vitro Säuger zytogenetischer Test	131
B. 11. Sonstige Wirkung — Mutagenität — in vivo Säugerknochenmark zytogenetischer Test Chromosomenanalyse	134
B. 12. Sonstige Wirkung — Mutagenität — Mikrokerntest	137
B. 13. Sonstige Wirkung — Mutagenität — <i>Escherichia Coli</i> — Rückmutationsversuch ..	140
B. 14. Sonstige Wirkung — Mutagenität — <i>Salmonella Typhimurium</i> — Rückmutationsversuch	143
TEIL C: Methoden zur Bestimmung der Ökotoxizität	146
C. 1. Akute Toxizität für Fische	146
C. 2. Akute Toxizität für Daphnien	155
C. 3. Abbaubarkeit — Biologische Abbaubarkeit — Modifizierter OECD-Screening-Test	160
C. 4. Abbaubarkeit — Biologische Abbaubarkeit — Modifizierter AFNOR-Test NFT 90/302	170
C. 5. Abbaubarkeit — Biologische Abbaubarkeit — Modifizierter Sturm-Test	179
C. 6. Abbaubarkeit — Biologische Abbaubarkeit — Geschlossener Flaschentest	188
C. 7. Abbaubarkeit — Biologische Abbaubarkeit — Modifizierter MITI-Test	199
C. 8. Abbaubarkeit — Biochemischer Sauerstoffbedarf	212
C. 9. Abbaubarkeit — Chemischer Sauerstoffbedarf	214
C. 10. Abbaubarkeit — Abiotischer Abbau — Hydrolyse in Abhängigkeit vom pH	216

A: METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER PHYSIKALISCH-CHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN

A. 1. SCHMELZPUNKT/SCHMELZBEREICH

1. METHODEN

Den beschriebenen Methoden liegt die OECD-Prüfrichtlinie (1) zugrunde.

1.1. Einleitung

Die hier beschriebenen Methoden und Geräte sind in bezug auf die Reinheitsgrade zur Bestimmung des Schmelzpunkts der meisten chemischen Substanzen anzuwenden.

Die Wahl der bestgeeigneten Methode hängt von der Natur der zu untersuchenden Substanz ab.

Die Anwendbarkeit ist davon abhängig, ob sich der betreffende Stoff leicht, schwierig oder überhaupt nicht pulverisieren läßt.

Für bestimmte Stoffe bietet sich eher eine Bestimmung des Gefrier- oder Erstarrungspunktes an: folglich wurden Vorschriften für diese Bestimmungen in die Prüfrichtlinie aufgenommen.

1.2. Definitionen und Einheiten

Als Schmelzpunkt (Smp.) bezeichnet man diejenige Temperatur, bei der unter normalem atmosphärischem Druck der Übergang zwischen fester und flüssiger Phase stattfindet.

Unter idealen Bedingungen entspricht diese Temperatur ebenfalls dem Erstarrungspunkt oder dem Gefrierpunkt. Da bei vielen Substanzen der Phasenübergang in einem weiten Temperaturbereich stattfindet, wird dieser Übergang auch oft als Schmelzbereich bezeichnet.

Umrechnung der Einheiten (K in °C)

$$t = T - 273,15$$

wobei t in °C und T in K ausgedrückt sind.

1.3. Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Meßanordnung von Zeit zu Zeit zu kalibrieren und bei Anwendung einer anderen Methode einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

Einige der Eichsubstanzen sind in den unter Punkt (2) aufgeführten Methoden zu finden.

1.4. Prinzip der Prüfmethode

Man bestimmt die Temperatur oder den Temperaturbereich der Phasenumwandlung vom festen in den flüssigen Zustand. In der Praxis wird eine Probe der zu untersuchenden Substanz bei Atmosphärendruck erhitzt. Die Temperaturen des Schmelzbeginns, sowie des vollständigen Schmelzens werden bestimmt. Drei Typen von Methoden werden beschrieben: Kapillarmethoden, Heitzischmethoden und Gefrierpunktbestimmungen.

1.4.1. Die Kapillarmethode

1.4.1.1. Schmelzpunktgeräte mit Flüssigkeitsbad

Eine geringe Menge der fein zerriebenen Substanz wird in ein Kapillarröhrchen gefüllt und durch Klopfen verdichtet. Das Röhrchen wird zusammen mit einem Thermometer erhitzt und dabei der Temperaturanstieg so eingestellt, daß er während des eigentlichen Schmelzvorgangs weniger als 1 K pro min beträgt.

Man notiert die Temperaturen des Schmelzbegins und des Schmelzendes.

1.4.1.2. Metallblock

Wie in 1.4.1.1, jedoch mit dem Unterschied, daß das Kapillarröhrchen und das Thermometer in einem Metallblock befestigt sind und sich durch Öffnungen in dem Block beobachten lassen.

1.4.1.3. Bestimmung mit Photozelle

Die in dem Kapillarröhrchen befindliche Substanzprobe wird in einem Metallzylinder automatisch erwärmt. In dem Zylinder befindet sich eine Öffnung, und ein gebündelter Lichtstrahl wird auf diesem Wege durch die Probe auf eine genauestens geeichte Photozelle gerichtet. Nun ändern sich die optischen Eigenschaften der meisten Substanzen beim Schmelzen von opak nach durchsichtig. In diesem Augenblick steigt also die Lichtintensität in der Photozelle, und ein Stoppsignal wird zum Meßgerät übertragen, das die Temperatur des in der Heizkammer befindlichen Platin-Widerstandsthermometers übernimmt. Allerdings eignet sich diese Methode nicht für einige stark gefärbte Substanzen.

1.4.2. Heitzische

1.4.2.1. Kofler-Heizbank

Die Wirkungsweise der Kofler-Heizbank beruht auf zwei elektrisch beheizten Metallblöcken unterschiedlicher Wärmeleitfähigkeiten, wobei die Bank selbst so ausgelegt ist, daß auf ihrer ganzen Länge ein fast linearer Temperaturgradient herrscht. Der Temperaturbereich der Heizbank liegt im allgemeinen zwischen 283 K bis 543 K. Die Bank verfügt über eine spezielle Temperaturableseeinrichtung bestehend aus Läufer mit Zeiger und einer für die jeweilige Heizbank ausgelegten Skala. Zur Schmelzpunktbestimmung wird die betreffende Substanz in einer dünnen Schicht direkt auf die Oberfläche der Heizbank aufgebracht. In wenigen Sekunden zeichnet sich eine scharfe Trennlinie zwischen der flüssigen und der festen Phase ab. Zur Ablesung der Temperatur wird der Zeiger auf die Trennlinie eingestellt.

1.4.2.2. Das Schmelzmikroskop

Zur Schmelzpunktbestimmung mit sehr kleinen Stoffmengen sind verschiedene Heitzische mit Mikroskop im Gebrauch. Die meisten Heitzische mit Mikroskop bedienen sich zur Temperaturablesung empfindlicher Thermoelemente, doch werden ebenfalls Quecksilberthermometer verwendet. Das typische Schmelzpunktbestimmungsgerät mit Heitzisch und Mikroskop besitzt eine Heizkammer mit einer Metallplatte, auf welcher die auf einem Objektträger befindliche Probe angebracht wird. Durch eine Öffnung im Mittelpunkt der Metallplatte wird über den Beleuchtungsspiegel des Mikroskops ein Lichtbündel gerichtet. Bei Messungen wird die Heizkammer durch eine Glasplatte abgedeckt, damit die Probe vor Lufteinflüssen geschützt wird.

Das Aufheizen der Probe wird durch einen Regelwiderstand kontrolliert. Für sehr genaue Messungen an optisch anisotropen Substanzen kann polarisiertes Licht verwendet werden.

1.4.2.3. Die Meniskusmethode

Diese Methode wird vor allem für Polyamide angewandt.

Bestimmung der Temperatur, bei der sich ein Silikonölmeniskus, der zwischen dem Heitzisch und einer durch die Polyamidprobe getragenen Glasabdeckplatte eingeschlossen ist, sichtbar verlagert.

1.4.3. *Methoden zur Gefrierpunktbestimmung*

Die Probe wird in ein dazu bestimmtes Reagenzglas gefüllt und in ein Gerät zur Bestimmung des Kristallisationspunkts gestellt.

Während des Abkühlens wird die Probe langsam und kontinuierlich gerührt und die Temperatur alle 30 Sekunden abgelesen und notiert.

Diejenige Temperatur, bei der der Temperaturverlauf während einiger Ablesungen konstant bleibt, ist (nach entsprechender Thermometerkorrektur) die Kristallisationstemperatur.

1.5. **Qualitätskriterien**

Der Anwendungsbereich und die Genauigkeit der Methoden zur Bestimmung von Schmelzpunkt und Schmelzbereich sind der Tabelle zu entnehmen.

TABELLE: ANWENDBARKEIT DER BESCHRIEBENEN METHODEN

A. Kapillarmethoden

Meßmethode	pulverisierbare Substanzen	nichtpulverisierbare Substanzen	Temperaturbereich	ungefähre maximale Genauigkeit ⁽¹⁾	Bemerkungen
Schmelzpunktgeräte mit Flüssigkeitsbad	Ja	nur wenige	273 K bis 573 K	± 0,3 K	exist.-Standard JIS K 0064
Schmelzpunktgeräte mit Metallblock	Ja	nur wenige	293 K bis 573 K	± 0,5 K	exist.-Standard ISO 1218-(E)
Photozellengeräte	Ja	verschiedene, unter Verwendung bestimmter Zusatzgeräte	253 K bis 573 K	± 0,1 K	

⁽¹⁾ Je nach dem verwendeten Gerätetyp und Reinheitsgrad der verwendeten Stoffe.

B. Heitzische und Gefrierpunktbestimmungen

Meßmethode	pulverisierbare Substanzen	nichtpulverisierbare Substanzen	Temperaturbereich	ungefähre maximale Genauigkeit ⁽¹⁾	Bemerkungen
Kofler-Heiztisch	Ja	nein	283 K bis 543 K	± 1,0 K	Standard ANSI/ASTM D 3451-76
Schmelzmikroskop	Ja	nur wenige	273 K bis 573 K (mögl. bis 1773 K)	± 0,2 K	Standard DIN 53736
Meniskusmethode	Nein	speziell für Polyamide	293 K bis 573 K	± 0,5 K	Standard ISO 1218-(E)
Gefrierpunktmethoden	für Flüssigkeiten	für Flüssigkeiten	223 K bis 573 K	± 0,5 K	Standards z.B. BS 4699

⁽¹⁾ Je nach dem verwendeten Gerätetyp und Reinheitsgrad der verwendeten Stoffe.

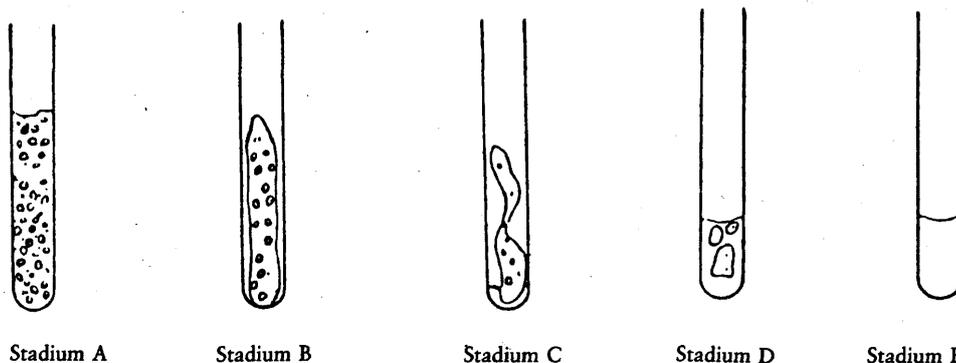
1.6. Beschreibung der Methoden

Die Durchführung fast aller hier aufgeführten Prüfmethode ist in nationalen und internationalen Normen beschrieben (siehe Anlage).

1.6.1. Methoden mit Kapillarrohr

Im allgemeinen lassen sich bei fein pulverisierten Substanzen im Verlaufe eines langsamen Temperaturanstiegs die in Abbildung 1 dargestellten Schmelzstadien erkennen.

Abbildung 1



Stadium A: (Schmelzbeginn, Feuchtpunkt): Feine Tröpfchen haften gleichmäßig an der Innenwand des Kapillarrohrs.

Stadium B: (Schrumpfpunkt): Aufgrund des Schrumpfens der Probe bildet sich zwischen Innenwand und Probe ein klarer Flüssigkeitsfilm.

Stadium C: (Beginn des Zusammenfallens): Die geschrumpfte Probe beginnt nun nach unten zusammenzufallen und wird flüssig.

Stadium D: (Verflüssigungspunkt): An der Oberfläche bildet sich ein vollständiger Meniskus, aber ein erheblicher Teil der Probe ist noch fest.

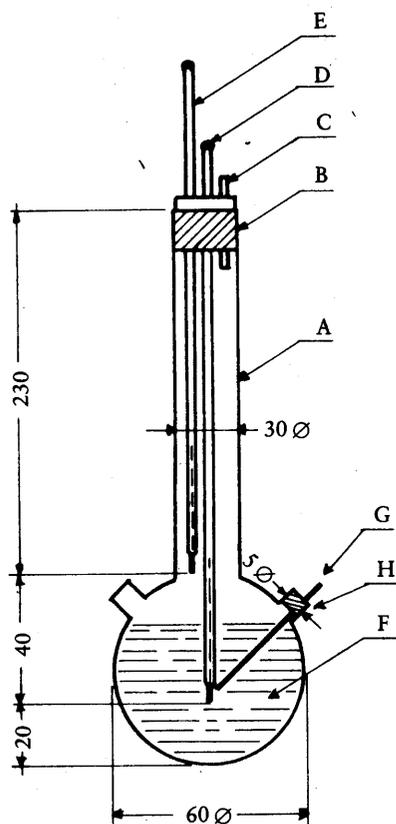
Stadium E: (Endstadium des Schmelzens): Die Probe enthält keine festen Teilchen mehr.

Während der Schmelzpunktbestimmung werden die Temperaturen beim Beginn und Ende des Schmelzvorgangs registriert.

1.6.1.1. Schmelzpunktbestimmungsgeräte mit Flüssigkeitsbad

Abbildung 2 enthält die Darstellung einer genormten Glasapparatur zur Schmelzpunktbestimmung (JIS K 0064). Alle Dimensionsangaben in mm.

Abbildung 2



- A: Meßkolben
 B: Korkstopfen
 C: Druckausgleich
 D: Thermometer
 E: Hilfsthermometer
 F: Badflüssigkeit
 G: Kapillarröhrchen aus Glas,
 80 bis 100 mm lang mit einem inneren Durchmesser
 von 1,0 mm \pm 0,2 mm und einer Wandstärke von
 0,2 bis 0,3 mm.
 H: seitlicher Stutzen

Die Badflüssigkeit:

Je nach dem Schmelzpunkt sollte eine der nachstehenden Flüssigkeiten gewählt werden. Flüssiges Paraffin für Schmelzpunkte nicht über 473 K konz. Schwefelsäure oder Silikonöl für Schmelzpunkte nicht über 573 K.

Für Schmelzpunkte über 523 K wird eine Mischung aus drei Gewichtsteilen Schwefelsäure und zwei Gewichtsteilen Kaliumsulfat benutzt.

Thermometer:

Es sollten nur solche Thermometer verwendet werden, die den Anforderungen der nachstehenden oder anderer gleichwertiger Normen entsprechen:
 ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Durchführung:

Die getrocknete Substanz wird in einem Mörser fein zerrieben und anschließend in ein an einem Ende zugeschmolzenes Kapillarröhrchen gefüllt. Nach Verdichten durch Klopfen sollte die Füllhöhe etwa 3 mm betragen. Zu diesem Zweck läßt man das Kapillarröhrchen aus ca. 700 mm Höhe durch ein Glasrohr auf ein Uhrglas fallen.

Das gefüllte Kapillarröhrchen wird derart in das Bad eingebracht, daß der mittlere Teil der Quecksilberkugel des Thermometers das Kapillarröhrchen an der Stelle berührt, an der sich die Probe befindet. Gewöhnlich führt man das Kapillarröhrchen etwa 10 K vor Erreichen des Schmelzpunkts in das Gerät ein.

Das Flüssigkeitsbad wird so beheizt, daß der Temperaturanstieg etwa 3 K pro min beträgt. Dabei muß die Flüssigkeit gerührt werden. Etwa 10 K vor dem Erreichen der erwarteten Schmelztemperatur wird der Temperaturanstieg auf maximal 1 K pro min reduziert.

Berechnung:

Die Berechnung des Schmelzpunkts wird folgendermaßen durchgeführt:

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

Darin bedeuten:

T = korrigierte Schmelztemperatur in K,

T_D = Temperaturablesung am Thermometer D in K,

T_E = Temperaturablesung am Thermometer E in K,

n = Anzahl der Grade, die der Quecksilberfaden des Thermometers D aus der Flüssigkeit herausragt.

1.6.1.2. Bestimmungen im Metallblock

Das Gerät besteht aus:

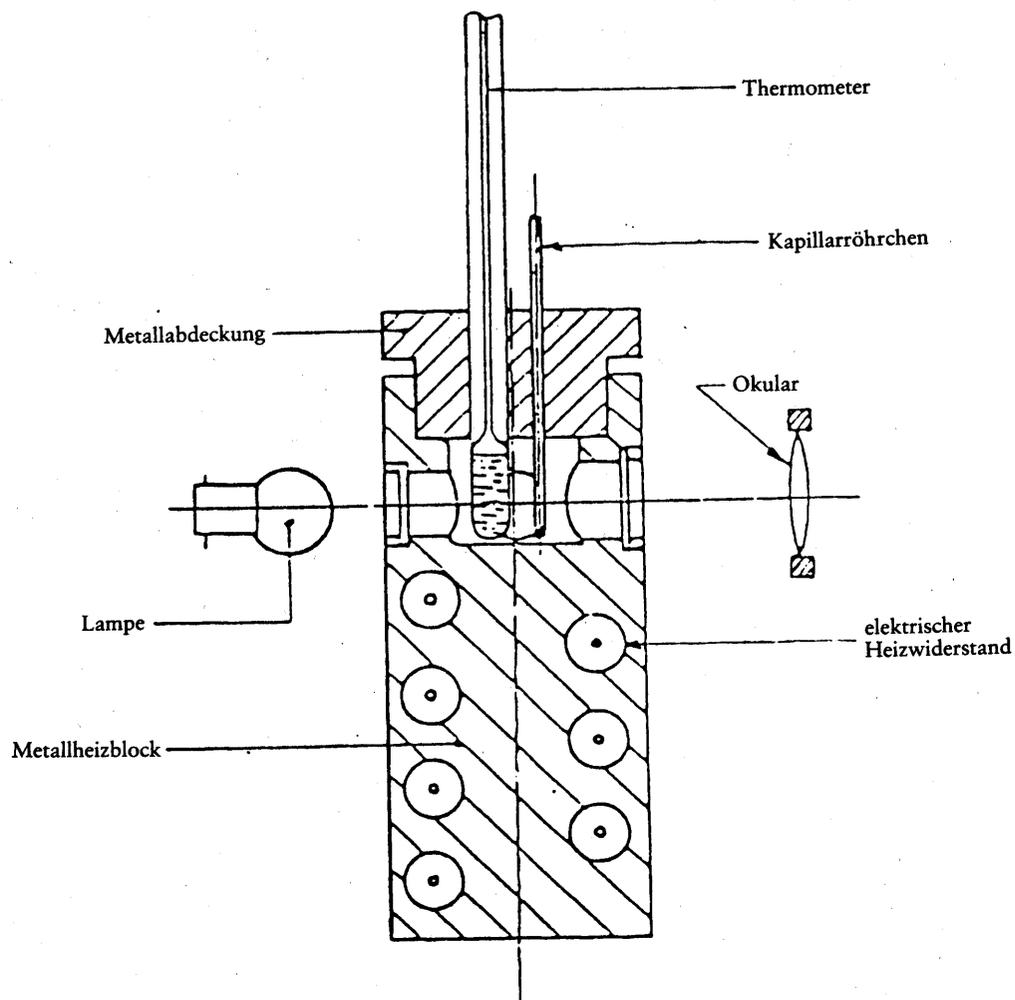
- einem zylindrischen Metallblock, dessen oberer Teil hohl ist und eine Heizkammer bildet (vergleiche Abbildung 3),
- einer Abdeckplatte aus Metall mit zwei oder mehreren Öffnungen, durch welche Röhren in den Metallblock eingebracht werden können,
- einem Heizsystem für den Metallblock, beispielsweise mit einem in den Metallblock eingeschlossenen elektrischen Heizwiderstand,
- einem Regelwiderstand zur Regulierung der Leistungsaufnahme bei elektrischer Heizung,
- vier Fenstern aus hitzebeständigem Glas, die sich an den Seitenwänden der Heizkammer rechtwinklig gegenüberliegen (vor einem dieser Fenster befindet sich ein Okular zur Beobachtung des Kapillarröhrchens. Die drei anderen Fenster dienen zur Beleuchtung des Innenraums mittels Lampen).
- und einem an einem Ende zugeschmolzenen Kapillarröhrchen aus hitzebeständigem Glas (vergleiche 1.6.1.1).

Thermometer:

Vergleiche die Normen in 1.6.1.1.

Es können ebenfalls elektrische Meßgeräte mit vergleichbarer Genauigkeit verwendet werden.

Abbildung 3



Durchführung:

Vergleiche 1.6.1.1. In diesem Fall ist keine Temperaturkorrektur vorgesehen. Die beobachtete Temperatur ist die des Schmelzpunkts.

1.6.1.3. Bestimmung mit Photozelle (automatisch)**Gerät und Verfahren:**

Das Gerät besteht aus einer Metallkammer mit automatischer Heizvorrichtung. Drei Kapillarröhrchen werden nach 1.6.1.1 gefüllt und in die Heizkammer gestellt.

Zur Kalibrierung des Gerätes stehen fünf lineare Temperaturanstiegsraten zur Verfügung; der geeignete Temperaturanstieg wird elektrisch auf eine im voraus festgelegte lineare Anstiegsrate gebracht. Die jeweiligen Temperaturen der Heizkammern und der Schmelzpunkt des in den Kapillarröhrchen enthaltenen Stoffes werden mit Registriergeräten aufgezeichnet.

1.6.2. Heiztische**1.6.2.1. Die Kofler-Heizbank**

(siehe Anlage)

1.6.2.2. Schmelzmikroskop

(siehe Anlage)

1.6.2.3. Meniskusmethode (Polyamide)

(siehe Anlage)

Im Bereich des Schmelzpunkts sollte die Heizgeschwindigkeit weniger als 1 K/min betragen.

1.6.3. Methoden zur Gefrierpunktbestimmung

(siehe Anlage)

2. DATEN

In bestimmten Fällen ist eine Thermometeranpassung erforderlich.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Die angewandte Methode ist anzugeben.

Als Schmelzpunkt ist der Mittelwert mindestens zweier Messungen anzugeben, deren Werte im Bereich der ungefähren Genauigkeit (vergleiche Tabelle) liegen. Eine Schätzung der Genauigkeit ist erforderlich. Liegt der Temperaturunterschied zwischen der Anfangs- und der Endphase des Schmelzens innerhalb der Genauigkeitsgrenzen der Methode, so ist die Endtemperatur als Schmelzpunkt anzugeben, andernfalls sind beide Temperaturen anzugeben.

Bestimmte Stoffe zersetzen sich oder sublimieren, bevor der Schmelzpunkt erreicht ist. Dies ist im Bericht anzugeben.

Alle zur Bewertung der Ergebnisse notwendigen Informationen und Bemerkungen sind zu notieren, insbesondere diejenigen über Verunreinigungen und den Aggregatzustand des Stoffes.

4. LITERATUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102 — Decision of the Council C(81)30 Final
- (2) I.U.P.A.C., Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, Pure and Applied Chemistry, Vol. 48, 1976, S. 505—515

Anlage

Weitere technische Einzelheiten können folgenden Normen entnommen werden:

1. Kapillarmethoden**1.1. Schmelzpunktapparate mit Flüssigkeitsbad**

ASTM E 324-69	Standard Test Method for Relative Initial and Final Melting Points and the Melting Range of Organic Chemicals
BS 4634	Method for the Determination of Melting Point and/or Melting Range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalls von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing Methods for Melting Point of Chemical Products.

1.2. Schmelzpunktgeräte mit Metallblock

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

2. Heitzische**2.1. Kofler-Heizbank**

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

2.2. Schmelzmikroskop

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

2.3. Meniskushmethode (Polyamide)

ISO 1218 (E)	Plastics-Polyamides-Determination of 'Melting-Point'
ANSI/ASTM D 2133-66	Standard Specification for Acetal Resin Injection Molding and Extrusion Materials
NF T 51-050	Résines de Polyamide — Détermination du 'Point de fusion' Méthode du ménisque

3. Gefrierpunktbestimmungsmethoden

BS 4633	Method for the Determination of Crystallizing Point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point Point of Petroleum Wax (Cooling Curve)
DIN 10319	Bestimmung des Gefrierpunkts von Milch

DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunkts von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
DIN 51556	Bestimmung des Erstarrungspunkts am rotierenden Thermometer
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunkts von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de Fusion des Paraffines

A. 2. SIEDEPUNKT/SIEDEBEREICH

1. METHODEN

Den beschriebenen Methoden liegt die OECD-Prüfrichtlinie (1) zugrunde.

1.1. Einleitung

Die hier beschriebenen Methoden und Geräte können für Flüssigkeiten verwendet werden, wenn diese nicht unterhalb des Siedepunktes chemisch reagieren (z. B. Autoxidation, Umlagerung, Abbau, usw.). Die Methoden können auf reine und unreine Flüssigkeiten angewendet werden.

Bevorzugt wird die Methode mit Photozellen-Detektion, da sie sowohl die Bestimmung der Schmelz- als auch der Siedepunkte ermöglicht. Darüber hinaus können die Messungen automatisch durchgeführt werden.

Die dynamische Methode bietet den Vorteil, daß sie auch zur Bestimmung des Dampfdrucks verwendet werden kann; dabei ist es nicht erforderlich, die Siedetemperatur auf den Normaldruck (101,325 kPa) zu berichtigen, da der Normdruck während der Messung eingestellt werden kann. Diese Methode ist zur Zeit jedoch nicht automatisiert.

Bemerkungen

Der Einfluß von Verunreinigungen auf die Bestimmung des Siedepunktes hängt weitgehend von der Art der Verunreinigung ab. Dieser Einfluß kann beträchtlich sein, wenn ein hochflüchtiges Lösungsmittel in der Probe vertreten ist. Die Zusammensetzung der untersuchten Probe ändert sich infolge der Verflüchtigung von niedrigsiedenden Komponenten von Messung zu Messung. Auf diese Weise erhält man kontinuierlich höhere Werte.

1.2. Definitionen und Einheiten

Als Standardsiedepunkt wird diejenige Temperatur bezeichnet, bei der der Dampfdruck einer Flüssigkeit bei Sättigung dem Standarddruck entspricht.

Der gemessene Siedepunkt hängt vom Luftdruck ab. Die Abhängigkeit kann durch die Clausius-Clapeyron-Gleichung wie folgt beschrieben werden:

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

(wobei p der Dampfdruck des Stoffes in Pascal, ΔH_v seine Verdampfungswärme in J mol^{-1} und R die universelle molare Gaskonstante ist.

$$R = 8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}.$$

Die Temperatur des Siedepunktes (Siedetemperatur) wird entsprechend dem Umgebungsdruck bei der Messung in K eingesetzt.

Umrechnungen.

Druck (Einheiten: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa („bar“ — Einheiten sind weiterhin zulässig, werden aber nicht empfohlen);

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr (Die Einheiten mm, Hg und Torr sind nicht zugelassen).

Temperatur (Einheiten: K)

$$t = T - 273,15$$

t in °C und T in K.

1.3. Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen eingesetzt werden, in denen ein neuer Stoff untersucht wird. Sie sollten primär dazu verwendet werden, die Methode von Zeit zu Zeit zu kalibrieren und einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

Einige Kalibriersubstanzen sind in den in der Anlage aufgeführten Methoden zu finden.

1.4. Prinzip der Prüfmethode

Alle Methoden zur Bestimmung des Siedepunktes (Siedebereiches) basieren auf der Messung der Siedetemperatur. Fünf Methoden werden beschrieben.

1.4.1. Bestimmung mit dem Ebulliometer

Ebulliometer wurden ursprünglich zur Bestimmung des Molekulargewichts durch Erhöhung des Siedepunktes entwickelt, eignen sich aber auch für genaue Messungen des Siedepunktes. Im ASTM D 1120-72 wird ein sehr einfaches Gerät beschrieben (siehe Anlage). Die Flüssigkeit wird in diesem Gerät unter Gleichgewichtsbedingungen bei atmosphärischem Druck erhitzt, bis sie siedet.

1.4.2. Dynamische Methode

Messung der Rekondensationstemperatur des Dampfes mit Hilfe eines Thermoelementes oder Hg-Thermometers im Rückfluß während des Siedeprozesses. Bei dieser Methode kann der Druck geändert werden.

1.4.3. Destillationsmethode für den Siedepunkt und Siedebereich

Destillation der Flüssigkeit und Messung der Rekondensationstemperatur des Dampfes, sowie Bestimmung der Destillatmenge.

1.4.4. Verfahren nach Siwoloboff

Erhitzung einer Probe in einem Probenröhrchen, das in ein Wärmebad eingetaucht wird. Ein zugeschmolzenes Kapillarröhrchen in dessen unterem Teil ein Luftbläschen enthalten ist, wird in das Probenröhrchen getaucht.

Bestimmt wird die Temperatur, bei der eine regelmäßige Kette von Bläschen aus dem Kapillarröhrchen entweicht bzw. die Temperatur, bei der die Bläschenkette bei Kühlung abbricht und die Flüssigkeit im Kapillarröhrchen plötzlich ansteigt (Siwoloboff).

1.4.5. Photozellen-Detektion

Entsprechend dem Prinzip nach Siwoloboff wird unter Verwendung der aufsteigenden Bläschen eine automatische photoelektrische Messung durchgeführt.

1.5. Qualitätskriterien

Die Anwendbarkeit und Genauigkeit der verschiedenen Verfahren zur Bestimmung des Siedepunktes/Siedebereiches gehen aus Tabelle 1 hervor.

1.6. Beschreibung der Methoden

Einige Methoden sind in internationalen und nationalen Normen beschrieben worden (siehe Anlage).

1.6.1. Ebulliometer

Siehe Anlage.

1.6.2. *Dynamische Methode*

Siehe Prüfmethode A.4 für die Bestimmung des Dampfdruckes. Die bei einem Druck von 101,325 kPa beobachtete Siedetemperatur wird notiert.

1.6.3. *Destillationsverfahren (Siedebereich)*

Siehe Anlage.

TABELLE 1: VERGLEICH DER METHODEN

Meßmethode	geschätzte Genauigkeit	Bemerkungen
Ebulliometer	± 1,4 K (bis zu 373 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ± 2,5 K (über 373 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾	Norm: ASTM D 1120-72 ⁽¹⁾
Dynamische Methode	± 0,5 K ⁽²⁾	
Destillationsmethode (Siedebereich)	± 0,5 K	Normen: ISO/R 918 DIN 53171 BS 4591/71
nach Siwoloboff	± 1 K bis ± 2 K ⁽²⁾	
Photozellen-Detektion	± 0,3 K (bei 373 K) ⁽²⁾	

⁽¹⁾ Diese Genauigkeit gilt nur für das einfache Gerät, wie es zum Beispiel in ASTM D 1120-72 beschrieben wird; sie kann durch verfeinerte Ebulliometergeräte verbessert werden.

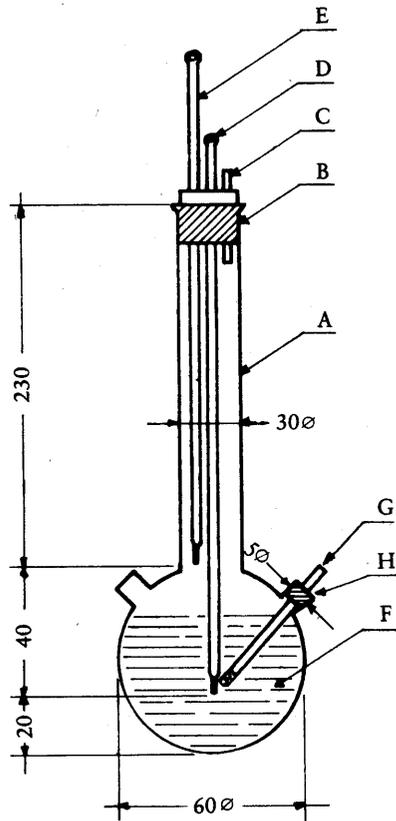
⁽²⁾ Gilt nur für reine Substanzen.

1.6.4. *Verfahren nach Siwoloboff*

Die Probe wird in einem Probenröhrchen — Durchmesser etwa 5 mm — in einem Schmelzpunktapparat erhitzt (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1 zeigt einen Typ einer genormten Apparatur zur Bestimmung des Schmelz- und Siedepunktes (JIS K 0064); (Glas, alle Spezifikationen in mm).

Abbildung 1



- A: Meßröhre
- B: Korkstopfen
- C: Druckausgleich
- D: Thermometer
- E: Hilfsthermometer
- F: Badflüssigkeit
- G: Probenröhrchen; Außendurchmesser max. 5 mm; ca. 100 mm lange Kapillarröhrchen mit einem Innendurchmesser von 1 mm und einer Wandstärke von 0,2—0,3 mm
- H: Seitlicher Stutzen

Ein etwa 1 cm über dem unteren Ende zugeschmolzenes Kapillarröhrchen (Siedekapillare) wird in das Probenröhrchen gegeben. Der Pegel, bis zu dem die Prüfsubstanz aufgefüllt wird, ist so zu wählen, daß der zugeschmolzene Abschnitt der Kapillare unter der Oberfläche liegt. Das die Siedekapillare enthaltene Probenröhrchen wird entweder mit einem Gummiband am Thermometer oder an einer seitlichen Halterung befestigt (siehe Abbildung 2).

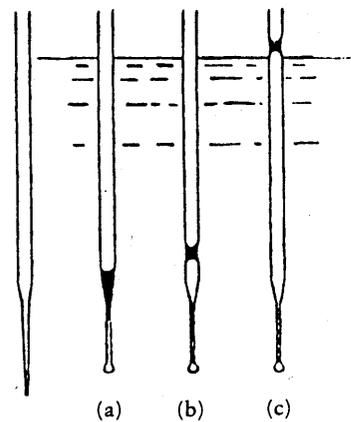
Abbildung 2

Prinzip nach Siwoloboff



Abbildung 3

modifiziertes Prinzip



Die Badflüssigkeit wird entsprechend der Siedetemperatur ausgewählt. Bei Temperaturen bis zu 573 K kann Schwefelsäure oder Silikonöl verwendet werden. Paraffinöl darf nur bis zu 473 K verwendet werden. Die Erhitzung der Badflüssigkeit sollte zunächst mit einer Temperaturrate von 3 K/min erfolgen. Die Badflüssigkeit muß gerührt werden. Ca. 10 K unterhalb des erwarteten Siedepunktes wird die Erhitzung verlangsamt, so daß die Temperaturerhöhung bei weniger als 1 K/min liegt. Kurz vor dem Erreichen der Siedetemperatur beginnen Bläschen aus der Siedekapillare aufzusteigen.

Der Siedepunkt ist erreicht, wenn die Bläschenkette bei Kühlung abbricht und die Flüssigkeit plötzlich in der Kapillare hochzusteigen beginnt. Der entsprechende Thermometerstand ist gleich der Siedetemperatur der Substanz.

Beim modifizierten Prinzip gemäß Abbildung 3 wird der Siedepunkt im Schmelzpunktröhrchen bestimmt. Es ist bis auf eine etwa 2 cm lange feine Spitze ausgezogen (a): eine geringe Menge der Probe wird angesaugt. Das offene Ende des feinen Röhrchens wird zugeschmolzen, so daß sich am Ende ein feines Luftbläschen befindet. Bei der Erhitzung im Schmelzpunktbestimmungsapparat (b) dehnt sich das Luftbläschen aus. Der Siedepunkt entspricht der Temperatur, bei der der Pfropfen der Substanz den Oberflächenpegel der Badflüssigkeit erreicht (c).

1.6.5. *Photozellen-Detektion*

Die Probe wird in einem Kapillarröhrchen in einem Metallblock erhitzt. Durch entsprechende Öffnungen im Block wird ein Lichtstrahl durch die Substanz auf eine genau kalibrierte Photozelle ausgerichtet. Bei der Erhöhung der Temperatur der Probe steigen einzelne Luftbläschen aus der Siedekapillare auf.

Wenn die Siedetemperatur erreicht ist, nimmt die Zahl der Bläschen enorm zu. Dies führt zu einer von einer Photozelle aufgezeichneten Änderung in der Lichtintensität und löst ein Signal im Meßgerät aus, das die Temperatur eines im Block gelegenen Platin-Widerstandsthermometers anzeigt.

Dieses Verfahren ist besonders nützlich, da es Bestimmungen unterhalb der Raumtemperatur bis zu 253,15 K (-20 °C) ohne jede apparative Änderung ermöglicht.

Das Instrument muß lediglich in einem Kühlraum oder in ein Kühlbad gestellt werden. Die genaue Durchführung der Siedepunktsbestimmung ist den Bedienungsvorschriften der Geräte zu entnehmen.

2. DATEN

Bei geringfügigen Abweichungen vom Normaldruck (maximal ± 5 kPa) werden die Siedepunkttemperaturen mit Hilfe der nachstehenden Sidney-Young-Zahlen-Wert-Gleichung auf T_n umgerechnet:

$$T_n = T + f_T \cdot \Delta P$$

Darin bedeuten:

ΔP = (101,325 - p) Vorzeichen beachten,

p = Barometermessung in kPa,

f_T = Korrekturfaktor für den Siedepunkt in Abhängigkeit vom Druck in K/kPa,

T = gemessene Siedetemperatur in K,

T_n = Siedetemperatur, berichtigt auf Normaldruck in K.

Die Temperatur-Korrekturfaktoren f_T und die Gleichungen für ihre Näherung sind für zahlreiche Stoffe in den erwähnten internationalen und nationalen Normen (Anlage) aufgeführt.

So gibt beispielsweise die Vorschrift nach DIN 53171 die Korrektur für die in Anstrichstoffen enthaltenen Lösungsmittel an.

Tabelle 2 enthält eine Tabelle der Temperatur-Korrekturfaktoren organischer Lösungsmittel (siehe ISO/DIS 4626).

TABELLE 2: TEMPERATUR-KORREKTURFAKTOREN f_T

Temperatur T in K	Korrekturfaktor f_T in K/kPa
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

3. ABSCHLUSSBERICHT

Die verwendete Methode ist anzugeben. Der aufgeführte Siedepunkt ist gleich dem Mittelwert von mindestens 2 Messungen, die innerhalb des Genauigkeitsbereichs gemäß Tabelle 1 liegen. Wenn die Bestimmungen nicht wiederholbar sind, müssen andere Verfahren gewählt werden.

Die gemessenen Siedepunkte und ihr Mittelwert, sowie der Druck (die Drücke) in kPa, bei denen die Messungen durchgeführt wurden, sind anzugeben.

Der Druck sollte möglichst nahe beim Normaldruck liegen. Wenn eine Prüfsubstanz oberhalb eines Temperaturbereichs siedet, sollte dieser Bereich angegeben werden. Für alle Ergebnisse sollten Schätzungen für die Genauigkeit aufgeführt werden.

Alle für die Auswertung von Ergebnissen sachdienlichen Informationen und Bemerkungen, insbesondere in bezug auf Verunreinigungen und Aggregatzustand des Stoffes, sind anzugeben.

4. LITERATUR

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

Anlage

Zu weiteren technischen Einzelheiten können beispielsweise folgende Normen herangezogen werden:

1. **Ebulliometer**

ASTM D 1120-72 (Standard Test Method for Boiling Point of Engine Antifreezes).

2. **Destillationsverfahren (Siedebereich)**

ISO/R 918 Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range).

BS 4349/68 Method for the Determination of Distillation of Petroleum Products.

BS 4591/71 Method for the Determination of Distillation Characteristics.

DIN 53171 Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes.

A. 3. RELATIVE DICHTE

1. METHODE

Den beschriebenen Methoden liegt die OECD-Prüfrichtlinie (1) zugrunde.

1.1. Einleitung

Die hier beschriebenen Methoden zur Bestimmung der relativen Dichte gelten für Feststoffe und Flüssigkeiten ohne jede Einschränkung in bezug auf ihren Reinheitsgrad. Die verschiedenen zu verwendenden Methoden sind in der Tabelle aufgeführt.

1.2. Definitionen und Einheiten

Die relative Dichte (D_4^{20}) von Feststoffen oder Flüssigkeiten ist das Verhältnis zwischen der Masse eines bestimmten Volumens des zu prüfenden Stoffes, gemessen bei 20 °C, und der Masse des gleichen Volumens Wasser, bestimmt bei 4 °C. Die relative Dichte hat keine Dimension.

Die Dichte (ρ) eines Stoffes ist gleich dem Quotienten aus seiner Masse m und seinem Volumen v .

Die Dichte wird in SI-Einheiten (kg/m^3) angegeben.

1.3. Referenzsubstanzen (1), (2)

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Meßanordnung von Zeit zu Zeit zu kalibrieren und bei Anwendung einer anderen Methode einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

1.4. Prinzip der Methoden

Es werden vier Methoden verwendet.

1.4.1. *Auftriebsmethoden*

1.4.1.1. Aräometer (für Flüssigkeiten)

Hinreichend genaue und schnelle Bestimmungen der Dichte können mit Aräometern erreicht werden, bei denen die Dichte einer Flüssigkeit durch Ablesen der Eintauchtiefe des Schwimmkörpers an einer graduierten Skala ermittelt werden kann.

1.4.1.2. Hydrostatische Waage (für Flüssigkeiten und Feststoffe)

Der Unterschied zwischen dem Gewicht einer an der Luft und im Wasser gemessenen Probe kann zur Bestimmung ihrer Dichte verwendet werden. Bei Feststoffen ist die gemessene Dichte nur für die verwendete (spezifische) Probe repräsentativ. Zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten wird ein Körper eines bekannten Volumens v zunächst an der Luft und dann in der Flüssigkeit gewogen.

1.4.1.3. Tauchkugelmethode (für Flüssigkeiten) (3)

Bei dieser Methode wird die Dichte einer Flüssigkeit aus der Differenz zwischen den Ergebnissen der Wägung der Flüssigkeit vor und nach dem Eintauchen einer Kugel bekannten Volumens in die Prüf-Flüssigkeit ermittelt.

1.4.2. Pyknometer-Methoden

Für Feststoffe oder Flüssigkeiten können Pyknometer verschiedener Formen mit bekannten Volumina verwendet werden. Die Dichte wird aus der Differenz zwischen den Ergebnissen der Wägung des vollen und des leeren Pyknometers und seinem bekannten Volumen errechnet.

1.4.3. Luftvergleichspyknometer (für Feststoffe)

Die Dichte eines Feststoffs beliebiger Form kann bei Raumtemperatur mit dem Gasvergleichspyknometer gemessen werden. Das Volumen einer Substanz wird in der Luft oder in einem Inertgas in einem Zylinder mit veränderbarem kalibriertem Volumen gemessen. Zur Berechnung der Dichte wird nach Abschluß der Volumenmessung eine Wägung durchgeführt.

1.4.4. Schwingungsdichtemesser (4), (5), (6)

Die Dichte einer Flüssigkeit kann mit einem Schwingungsdichtemesser gemessen werden. Ein in Form eines U-Rohres gebauter mechanischer Oszillator wird in Schwingungen versetzt; die sich einstellende Frequenz hängt von der Masse des Oszillators ab.

Bei Einführung einer Probe ändert sich die Resonanzfrequenz des Oszillators. Das Gerät muß durch zwei Flüssigkeiten mit bekannten Dichten kalibriert werden.

Diese Flüssigkeiten sollten möglichst so gewählt werden, daß ihre Dichten den zu messenden Bereich einschließen.

1.5. Qualitätskriterien

Die Anwendbarkeit der für die Bestimmung der relativen Dichte verwendeten Methoden ist aus der Tabelle zu ersehen.

Die in der ISO-Norm genannte Genauigkeit bezieht sich ausschließlich auf reine Stoffe.

1.6. Beschreibung der Methoden

Die als Beispiel aufgeführten Normen, die im Hinblick auf weitere technische Einzelheiten herangezogen werden müssen, sind als Anlage beigefügt.

Die Prüfungen sind bei 20 °C durchzuführen, wobei mindestens zwei Messungen vorzunehmen sind.

2. DATEN

Siehe Normen.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Die verwendete Methode ist anzugeben.

Die relative Dichte (D_4^{20}) soll(te) gemäß 1.2 zusammen mit dem Aggregatzustand des gemessenen Stoffes angegeben werden.

Alle für die Auswertung von Ergebnissen sachdienlichen Informationen und Bemerkungen, insbesondere in bezug auf Verunreinigungen und Aggregatzustand des Stoffes sind zu melden.

TABELLE: ANWENDBARKEIT VON METHODEN

Meßmethoden	Dichte		möglicher Höchstwert der dynamischen Viskosität	Bemerkungen
	Feststoff	Flüssigkeit		
1.4.1.1. Aräometer		×	5 Pa s	ISO 387 ISO/R 649
1.4.1.2. Hydrostatische Waage a) Feststoffe b) Flüssigkeiten	×	×	5 Pa s	ISO/R 1185 (A) ISO/R 91 und R 758
1.4.1.3. Tauchkugelmethode		×	20 Pa s	DIN 53217 voraussichtl.
1.4.2. Pyknometer a) Feststoffe b) Flüssigkeiten	×	×	500 Pa s	ISO/R 3507 ISO/R 1183 (B) ISO/R 758
1.4.3. Luftvergleichspyknometer	×			DIN 55990 — Teil 3 DIN 53243
1.4.4. Schwingungsdichtemesser		×	5 Pa s	

4.

LITERATUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109 — Decision of the Council C(81)30 Final.
- (2) I.U.P.A.C., Recommended reference materials for realisation of Physico-chemical Properties. — Pure and Applied Chemistry, Vol. 48, 1976, S. 508.
- (3) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, Vol. 11, 1979, S. 427—430.
- (4) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, Vol. 19, 1970, S. 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, S. 717—726.
- (6) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, Vol. 9, 1976, S. 253—255.

Anlage

Für weitere technische Einzelheiten können beispielsweise folgende Normen konsultiert werden:

1. **Auftriebsverfahren**1.1. *Aräometer*

- DIN 12790 Aräometer; allgemeine Bestimmungen
- ISO 387
- DIN 12791 Teil 1: Dichte-Aräometer; Grundserien, Ausführung, Justierung und Anwendung
Teil 2: Dichte-Aräometer; Normgrößen, Bezeichnungen
- ISO/R 649
- DIN 12793 Laborgeräte aus Glas: Sucharäometer für Vormessung und rohe Betriebsmessung

1.2. *Hydrostatische Waage*

Für Feststoffe:

- ISO/R 1183 Method A, Methods for determining the density and relative density of plastics including cellular plastics
- ASTM-D-792 Specific gravity and density of plastics by displacement
- DIN 53479 Prüfung von Kunststoffen und Elastomeren; Bestimmung der Dichte

Für Flüssigkeiten

- ISO/R 91, ISO/R 758
- DIN 51757 Prüfung von Mineralölen und verwandten Stoffen; Bestimmung der Dichte
- ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 und 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 Titel entspricht ASTM D 1298

1.3. *Tauchkugelmethode*

- DIN 53217 Prüfung von Anstrichstoffen; Bestimmung der Dichte mit dem Pyknometer (Der Zustand für die Tauchkugelmethode soll 1981 veröffentlicht werden.)

2. **Pyknometer-Methoden**2.1. *Für Flüssigkeiten*

- ISO 3507 Pyknometer
- ISO/R 758 Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
- DIN 12797 Pyknometer nach Gay-Lussac (für nicht besonders viskose nicht flüchtige Flüssigkeiten)
- DIN 12798 Pyknometer nach Lipkin (für Flüssigkeiten mit einer kinematischen Viskosität von weniger als $100 \cdot 10^{-6} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ bei 15 °C)

- | | |
|-------------|--|
| DIN 12800 | Pyknometer nach Sprengel (für Flüssigkeiten wie in DIN 12798) |
| DIN 12801 | Pyknometer nach Reischauer (für Flüssigkeiten mit einer kinematischen Viskosität von weniger als $100 \cdot 10^{-6} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ bei 20 °C; kann insbesondere auf Kohlenwasserstoffe sowie auf Flüssigkeiten mit hohem Dampfdruck — etwa 1 bar bei 90 °C angewendet werden) |
| DIN 12806 | Pyknometer nach Hubbard (für viskose Flüssigkeiten aller Arten, die keinen zu hohen Dampfdruck aufweisen, insbesondere auch für Anstrichstoffe und Bitumen) |
| DIN 12807 | Pyknometer nach Bingham (für Flüssigkeiten wie in DIN 12801) |
| DIN 12808 | Pyknometer nach Jaulmes (insbesondere für Ethanol-Wassergemisch) |
| DIN 12809 | Pyknometer mit eingeschliffenem Thermometer und Seitenkapillaren (für nicht besonders viskose Flüssigkeiten) |
| DIN 53217 | Prüfung von Anstrichstoffen; Bestimmung der Dichte mit dem Pyknometer |
| DIN 51757 | Punkt 7: Prüfung von Mineralölen und verwandten Stoffen; Bestimmung der Dichte |
| 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 Bicappillary Pycnometer Method) |
| BS 5903 | Method for Determination of Relative Density and Density of Petroleum Products by the Capillary-Stoppered Pycnometer Method |
|
 | |
| 2.2. | <i>Für Feststoffe</i> |
| ISO/R 1183 | Method B: Methods for Determining the Density and Relative Density of Plastics excluding Cellular Plastics |
| DIN 19683 | Bestimmung der Dichte von Böden |
|
 | |
| 3. | Luftvergleichspyknometer |
| DIN 55990 | Teil 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte |
| DIN 53243 | Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung |

A. 4. DAMPFDRUCK

1. METHODE

Die beschriebenen Methoden basieren auf der OECD-Prüfrichtlinie (1).

1.1. Einleitung

Zur Durchführung des Tests ist es nützlich, Vorinformationen über die Struktur, den Schmelz- und den Siedepunkt der Prüfsubstanz zu haben.

Es gibt keine Prüfmethode, die für den gesamten Dampfdruck-Meßbereich geeignet ist. Daher werden zur Messung der Dampfdrücke von $<10^{-3}$ Pa bis 10^5 Pa mehrere Methoden empfohlen.

Verunreinigungen beeinflussen die Dampfdruckbestimmung eines Stoffes. Der Einfluß von Verunreinigungen auf den Dampfdruck hängt in hohem Maße von der Art der Verunreinigung ab. Befindet sich ein leichtflüchtiges Lösungsmittel in der Probe, kann sich dies erheblich auf das Ergebnis auswirken.

1.2. Definitionen und Einheiten

Der Dampfdruck einer Substanz ist definiert als der Sättigungsdruck über einer festen oder flüssigen Substanz. Im thermodynamischen Gleichgewicht ist der Dampfdruck einer reinen Substanz ausschließlich eine Funktion der Temperatur.

Die zu verwendende SI-Einheit für den Druck ist Pascal (Newton/m²).

Nachstehend einige der früher gebräuchlichen Einheiten mit den entsprechenden Umrechnungsfaktoren:

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

$$1 \text{ physikal. Atmosphäre (atm)} = 1,013 \times 10^5 \text{ Pa}$$

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

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

Die SI-Einheit für die Temperatur ist Kelvin (K).

1.3. Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Meßanordnung von Zeit zu Zeit zu kalibrieren und bei Anwendung einer anderen Methode einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

1.4. Prinzip der Methode

Zur Bestimmung des Dampfdrucks werden fünf Methoden vorgeschlagen, die in verschiedenen Dampfdruckbereichen eingesetzt werden können. Mit jeder Methode wird der Dampfdruck bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. In einem begrenzten Temperaturbereich ist der Logarithmus des Dampfdrucks einer reinen Substanz der Temperatur umgekehrt proportional.

1.4.1. *Dynamische Methode*

Bei der dynamischen Methode wird die Siedetemperatur bei einem bestimmten vorgegebenen Druck gemessen.

Empfohlener Bereich:

10^3 Pa bis 10^5 Pa zwischen 20 °C und 100 °C.

Diese Methode wird ebenfalls für Siedepunktbestimmungen empfohlen, wozu sie sich bis zu Temperaturen von 350 °C eignet.

1.4.2. Statische Methode

Bei diesem Verfahren wird derjenige Dampfdruck gemessen, der sich im thermodynamischen Gleichgewicht im geschlossenen System bei einer gegebenen Temperatur über einer Substanz einstellt.

Diese Methode eignet sich für Ein- und Mehrkomponentensysteme.

Empfohlener Bereich:

10 Pa bis 10^5 Pa zwischen 0 °C und 100 °C.

1.4.3. Isoteniskop

Diese genormte Methode beruht ebenfalls auf einem statischen Verfahren, eignet sich jedoch im allgemeinen nicht für Mehrkomponentensysteme. Weitere Informationen können der ASTM-Methode D-2879-75 entnommen werden.

Empfohlener Bereich:

von 10^2 Pa bis 10^5 Pa zwischen 0 °C und 100 °C.

1.4.4. Dampfdruckwaage

Unter Vakuumbedingungen bestimmt man die Substanzmenge, die eine Meßzelle pro Zeiteinheit durch eine Öffnung bekannter Größe so verläßt, daß eine Rückkehr der Substanz in die Meßzelle vernachlässigt werden kann (z. B. durch Messung des Impulses eines Dampfstrahls auf eine empfindliche Waage oder durch Bestimmung des Gewichtsverlusts).

Empfohlener Bereich:

10^{-3} Pa bis 1 Pa zwischen 0 °C und 100 °C.

1.4.5. Gassättigungsmethode

Ein Strom eines inerten Trägergases wird so über die zu untersuchende Substanz geleitet, daß er sich mit dessen Dampf sättigt. Dieser Dampf wird in einer geeigneten Falle gesammelt. Man mißt die Substanzmenge, die eine bekannte Menge an Trägergas transportiert und berechnet damit den Dampfdruck bei einer vorgegebenen Temperatur.

Empfohlener Bereich:

bis 1 Pa.

1.5. Qualitätskriterien

In der Tabelle findet sich ein Vergleich der verschiedenen Dampfdruck-Bestimmungsmethoden hinsichtlich ihrer Anwendung, Vergleichbarkeit, Wiederholbarkeit (repeatability), Meßbereich sowie vorhandener Normen.

TABELLE: QUALITÄTSKRITERIEN

Meßmethode	Substanz		geschätzte Wiederholbarkeit ⁽¹⁾	geschätzte Vergleichbarkeit ⁽¹⁾	empfohlener Bereich	vorhandene Normen
	fest	flüssig				
1.4.1. Dynamische Methode		×	bis zu 25 % 1— 5 %	bis zu 25 % 1— 5 %	10 ³ Pa bis 2 · 10 ³ Pa 2 · 10 ³ Pa bis 10 ⁵ Pa	— —
1.4.2. Statische Methode	×	×	5—10 %	5—10 %	10 Pa bis 10 ⁵ Pa	—
1.4.3. Isoteniskop	×	×	5—10 %	5—10 %	10 ² Pa bis 10 ⁵ Pa	ASTM-D 2879-75
1.4.4. Dampfdruckwaage	×	×	5—20 %	bis 50 %	10 ⁻³ Pa bis 1 Pa	—
1.4.5. Gassättigungsmethode	×	×	10—30 %	bis 50 %	< 10 ⁻³ Pa bis 1 Pa	—

⁽¹⁾ Abhängig vom Reinheitsgrad der Prüfsubstanz.

1.6. Beschreibung der Methoden

1.6.1. Dynamische Methode

1.6.1.1. Apparatur

Die Apparatur besteht im allgemeinen aus einem Siedegefaß mit Aufsatzkühler aus Glas oder Metall (Abbildung 1) sowie einer entsprechenden Einrichtung zum Regeln und Messen von Temperatur und Druck. Der in der Abbildung dargestellte Apparatur-Typ besteht aus hitzebeständigem Glas und setzt sich aus 5 Komponenten zusammen.

Ein großes, teilweise doppelwandiges Rohr weist eine Schliffverbindung, einen Kühler, einen Kühlkolben und einen Einlaß auf.

Ein Glaszylinder mit einer Cottrellpumpe wird im Siedebereich des Rohres angebracht. Er besitzt innen eine aufgeraute Oberfläche aus gesintertem Glas, um Siedeverzüge zu vermeiden.

Die Temperatur wird mit einem Thermoelement oder einem Widerstandsthermometer, das in eine kleine Menge Öl eingetaucht wird, gemessen. Es wird in das Einsatzrohr eingeführt, das über eine Kernschliffverbindung verfügt und am unteren Ende zugeschmolzen ist.

Über ein Kreuzstück werden die notwendigen Verbindungen zur Druckregulierung und -messung hergestellt.

Ein Rundkolben, der als Puffervolumen fungiert, wird mittels einer Kapillare mit der Meßapparatur verbunden.

Zur Erhitzung des Siedegefaßes wird eine Heizpatrone von unten außen in die Glasapparatur eingeführt. Mit einem Regeltransformator wird der gewünschte Heizstrom eingestellt und mit einem Amperemeter überwacht.

Das erforderliche Vakuum zwischen 10² Pa und ca. 10⁵ Pa wird mit einer Ölpumpe erzeugt.

Zur Einstellung des gewünschten Drucks schließt man eine Stickstoffbombe über ein entsprechendes Ventil an, das außerdem auch zur Belüftung der Apparatur dient.

Mittels eines an das Kreuzstück angeschlossenen Präzisionsmanometers werden die erforderlichen Druckmessungen vorgenommen.

1.6.1.2. Meßvorgang

Zur Bestimmung des Dampfdrucks der Probe mißt man ihren Siedepunkt bei verschiedenen festgelegten Drücken zwischen ungefähr 10^3 Pa und 10^5 Pa. Der Siedepunkt (oder das Siedegleichgewicht im Falle von Gemischen) ist erreicht, wenn die Temperatur (bei konstantem Druck) als konstant angezeigt wird. Diese Methode eignet sich nicht zur Messung schäumender Substanzen.

Vor jeder Messung werden zuerst alle Glasteile gründlich gereinigt und getrocknet und dann unter Gasballast evakuiert. Anschließend füllt man die Substanz in das Gerät ein. Während des Einfüllens kann es bei nichtpulverförmigen Feststoffen Probleme geben, doch lassen sich diese durch Erwärmen des Kühlmantels umgehen. Nach dem Einfüllen wird die Apparatur zugeflanscht und die Substanz entgast. Danach stellt man den niedrigsten gewünschten Druck ein und schaltet die Heizung an. Gleichzeitig schließt man das Thermoelement bzw. das Widerstandsthermometer an einen Schreiber an. Das Gleichgewicht ist dann erreicht, wenn bei konstantem Druck eine konstante Siedetemperatur abgelesen werden kann. Nach Registrierung dieses Meßpunkts wird ein höherer Druck eingestellt. Man fährt auf diese Weise fort, bis ein Druck von 10^5 Pa erreicht ist (ungefähr 5 bis 10 Messungen insgesamt). Zur Überprüfung müssen Bestimmungen bei abnehmenden Drücken wiederholt werden.

1.6.2. Statische Methode

1.6.2.1. Apparatur

Die zur Messung benutzte Apparatur (Abbildung 2) umfaßt ein Heiz- und Kühlsystem aus Glas oder Metall zur Temperierung der Probe und zur Messung der Temperatur. Außerdem enthält die Apparatur Instrumente zur Einstellung und Messung des Druckes.

Der Probenraum wird auf der einen Seite durch ein Hochvakuumventil aus Edelstahl begrenzt. Auf der anderen Seite ist ein U-Rohr angebracht, das eine geeignete Manometerflüssigkeit enthält. Das andere Ende des U-Rohres mündet in ein Kreuzstück. Ein Abzweig führt zur Vakuumpumpe, ein weiterer zur Stickstoffbombe und der dritte zu einem Manometer.

Zur Temperierung der Probe bringt man den gesamten Probenbehälter bis einschließlich zum Ventilteller, sowie einen hinreichend großen Abschnitt des U-Rohrs (zweckmäßig bis zur Höhe des Ventiltellers) in ein geeignetes konstant zu temperierendes Bad. Die Temperaturmessung wird mittels eines Thermoelements oder eines Widerstandsthermometers in nächster Nähe der Außenwand des Probengefäßes vorgenommen und kann aufgezeichnet werden.

Zum Unterkühlen der Probe eignet sich flüssiger Stickstoff oder ein Gemisch aus Äthanol und Trockeneis. Für Messungen bei tiefen Temperaturen verwendet man einen Ultrakryostaten.

Mit einer geeigneten Pumpe evakuiert man die Apparatur bis zu dem erforderlichen Druck.

Gewöhnlich mißt man den Dampfdruck der Substanz indirekt mittels einer Nullanzeige. Ein solches Nullinstrument kann aus einem mit einer Flüssigkeit gefüllten U-Rohr, wie weiter unten beschrieben, oder unter anderem aus einem Membrankapazitätsmanometer bestehen. Bei Erwärmung der Probe bewirkt der Dampfdruck der Substanz eine Verschiebung des Flüssigkeitsgleichgewichts in dem U-Rohr. Zur Kompensierung des Dampfdrucks läßt man nun Stickstoff über ein Ventil in die Apparatur strömen, bis sich die Druckanzeigeflüssigkeit wieder auf Null befindet. Der dazu erforderliche Stickstoffdruck wird mittels eines Präzisionsmanometers bei Raumtemperatur abgelesen. Dieser Druck entspricht dem Dampfdruck der Substanz bei der jeweiligen Meßtemperatur. Je nach Druckbereich und chemischem Verhalten der Prüfsubstanz können als U-Rohr-Flüssigkeiten zur Nulleinstellung verwendet werden: Quecksilber, Silikonöle, Phthalate.

Quecksilber läßt sich im Bereich von normalem Luftdruck bis 10^2 Pa verwenden, Silikonöle und Phthalate auch unter 10^2 Pa bis hinab zu 10 Pa. Membrankapazitätsmanometer lassen sich sogar unter 10^{-1} Pa einsetzen.

1.6.2.2. Meßvorgang

Vor der Messung werden alle Bestandteile der Apparatur in Abbildung 2 gründlich mit Lösungsmitteln gereinigt und dann unter Vakuum getrocknet.

Anschließend füllt man das U-Rohr mit der gewünschten Flüssigkeit, die zuvor bei erhöhter Temperatur entgast wurde.

Nach dem Einfüllen der Prüfsubstanz wird die Apparatur zugeflanscht und der Probenbehälter auf eine hinreichend tiefe Temperatur gebracht. Bei geöffnetem Ventil über dem Probenbehälter wird mehrere Minuten lang die Luft aus dem Gerät abgesaugt. Anschließend schließt man das Ventil über dem Behälter und bringt die Probe auf die gewünschte Temperatur. Man beobachtet währenddessen die erfolgende Verschiebung der Flüssigkeitssäulen und stellt dabei, falls notwendig, bis zum Erreichen einer konstanten Temperatur mit Stickstoff den Gleichstand der Flüssigkeitssäulen her. Die Probe wird sodann erneut unterkühlt. Falls sich dann noch ein Restdruck beobachten läßt, ist dies entweder auf die in der Probe enthaltene Luft zurückzuführen, die im Verlauf des Aufheizens freigesetzt wurde und abgesaugt werden kann, oder aber die Kühltemperatur ist nicht tief genug. In diesem Fall ist flüssiger Stickstoff als Kühlmittel einzusetzen.

Nach ausreichendem Entgasen der Substanz bestimmt man die Temperaturabhängigkeit des Dampfdrucks in genügend kleinen Temperaturintervallen.

1.6.3. *Isoteniskop*

Für eine vollständige Beschreibung dieser Methode verweisen wir auf die Literatur (2). Das Prinzip des Meßgeräts zeigt Abbildung 3. Ebenso wie die in 1.6.2 beschriebene statische Methode eignet sich das Isoteniskop zur Untersuchung von Feststoffen und Flüssigkeiten.

Bei der Untersuchung von Flüssigkeiten verwendet man diese gleichzeitig als Anzeigesäule im Hilfsmanometer. Bei Feststoffen benutzt man je nach Druck- und Temperaturbereich die in 1.6.2 erwähnten Manometerflüssigkeiten. Im ersten Fall wird die Kugel eines Flüssigkeitsisoteniskops mit der Prüfsubstanz gefüllt, die bei erhöhter Temperatur unter Sieden entgast wird.

Gleichzeitig destilliert ein Teil der Flüssigkeit aus der Kugel. Sie schlägt sich in der oberen gekühlten Kugel nieder und fließt in das U-Rohr zurück. Sobald sich genügend entgaste Flüssigkeit in dem U-Rohr befindet, werden die untere Kugel und das U-Rohr auf die gewählte Temperatur gebracht. Der sich ergebende Dampfdruck wird, wie in 1.6.2 beschrieben, indirekt gemessen.

Bei der Untersuchung von Feststoffen wird die entgaste Manometerflüssigkeit in eine Ausbuchtung am langen Schenkel des Isoteniskops gefüllt. Dann wird der zu untersuchende Feststoff in die untere Kugel eingebracht und bei erhöhter Temperatur entgast. Danach neigt man das Isoteniskop, damit die Manometerflüssigkeit in das U-Rohr fließen kann. Zur Messung des Dampfdrucks als Funktion der Temperatur verfährt man wie in 1.6.2.

1.6.4. *Dampfdruckwaage*

1.6.4.1. *Apparatur*

In der Literatur werden verschiedene Ausführungen der Apparatur beschrieben (1). Die hier beschriebene Apparatur dient zur Darstellung des allgemeinen Funktionsprinzips. In Abbildung 4 sind zahlreiche Bestandteile des Geräts wiedergegeben, insbesondere die Grundplatte mit Glocke, eine Pumpe mit Vakuummeßeinrichtung, sowie eine Vorrichtung zur Messung des Dampfdrucks mittels optischer Anzeige des Zeigerausschlags. Auf der Grundplatte befinden sich die folgenden Einbauten:

- Ein Verdampferofen mit Flansch und Drehdurchführung. Bei dem Verdampferofen handelt es sich um eine flache zylindrische Kupferdose (er kann auch aus Glas mit einer Kupferummantelung bestehen). Er sitzt in einer Kupferhalterung, die mit ihrem überstehenden unteren Rand auf eine Edelstahlplatte geschraubt ist. Diese wiederum ist mit der Grundplatte über einen Flansch so verbunden, daß eine Drehung um die Ofenachse möglich ist. Die Heizung erfolgt durch eine Heizspirale, die im Innern der Edelstahlplatte sitzt und somit gegen den Vakuumraum abgeschlossen ist.
- Der Ofendeckel aus Kupfer ist mit drei Öffnungen unterschiedlichen Durchmessers versehen, die um 90° gegeneinander versetzt sind. Durch Drehen des Ofens läßt sich die gewünschte Öffnung oder eine Zwischenstellung unter der Blende im exzentrisch zum Ofen sitzenden Kühlkasten einstellen und dadurch der Molekularstrahl auf die Waagschale freigeben oder abblenden. Zur Temperaturmessung befindet sich ein Thermolement oder ein Widerstandsthermometer in der Ofenwand.
- Bei der Waage handelt es sich um ein Drehspulinstrument, dessen Zeiger durch ein kleines Rohr ersetzt wurde, auf dem Waagebalken und Gegengewicht befestigt sind. Der Waagebalken besitzt eine auswechselbare Waagschale aus vergoldetem Aluminium. Etwa im Zentrum des Waagebalkens ist ein 0,1 mm dicker Konstantandraht befestigt, auf dem Eichgewichte aufgesetzt werden können. Der Dampfdruck kann mittels eines photoelektrischen Nullpunktinstruments auf einem Schreiber aufgezeichnet werden.

- Die Waagschale ist von einem Messingbehälter ummantelt, der nur 2 Schlitz für die Bewegung des Waagebalkens sowie eine schmale Öffnung für den Eintritt des Molekularstrahls enthält. Zur Wärmeableitung nach außen ist oben auf dem Messingbehälter ein Kupferstab befestigt, der mittels eines Edelstahlrohrs wärmeisoliert durch die Grundplatte geführt ist. Der Kupferstab taucht in ein mit flüssigem Stickstoff gefülltes Dewargefäß unter der Grundplatte ein.

1.6.4.2. Meßvorgang

Man füllt den Kupferofen mit der Prüfsubstanz und schließt ihn mit dem Deckel. Die Blende mit Kühlkasten wird über den Ofen geschoben. Die Glocke wird aufgesetzt, und die Vakuumpumpen werden eingeschaltet. Vor Beginn der Messungen sollte der Enddruck ungefähr 10^{-4} Pa betragen. Ab 10^{-2} Pa beginnt man mit dem Kühlen des Kühlkastens.

Nach einiger Zeit wird die Waagschale genügend abgekühlt sein, um eine Kondensation des aus dem Ofen austretenden Dampfstrahls zu bewirken. Der Impuls und die gleichzeitige Kondensation lösen ein Signal auf dem angeschlossenen Schreiber aus. Die Auswertung dieses Ausschlags liefert zwei Informationen: Bei der hier beschriebenen Apparatur wird der Dampfdruck direkt aus dem Impuls auf die Waagschale bestimmt (dazu braucht man das Molekulargewicht nicht zu kennen). Gleichzeitig wird die Masse des Kondensats gemessen, und aus der für das Kondensieren erforderlichen Zeit läßt sich so die Verdampfungsgeschwindigkeit berechnen. Der Dampfdruck läßt sich auch aus der Verdampfungsgeschwindigkeit und dem Molekulargewicht nach der Hertzschen Gleichung berechnen:

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

Dabei ist

- G = Verdampfungsgeschwindigkeit ($\text{kg/s} \cdot \text{m}^2$),
 M = Molekulargewicht (g/mol),
 T = Temperatur (K),
 R = universelle molare Gaskonstante ($\text{J/mol} \cdot \text{K}$),
 P = Dampfdruck (Pa).

Nach Erreichen des erforderlichen Vakuums beginnt man mit der Meßreihe bei der niedrigsten gewünschten Temperatur. Man öffnet das entsprechende Loch im Deckel, der Dampfstrahl passiert die darüber befindliche Blende und trifft auf die gekühlte Waagschale. Diese Waagschale ist so dimensioniert, daß der gesamte Strahl in seiner Kosinusverteilung erfaßt wird. Der Impuls des Dampfstrahls übt eine Kraft auf die Waagschale aus, und die Moleküle kondensieren auf ihrer gekühlten Oberfläche. Durch diesen Impuls wird der Waagebalken aus seiner Gleichgewichtslage abgelenkt. An seinem Ende befindet sich ein kleines Fähnchen, das optisch über ein Prismensystem und zwei Photodioden registriert wird. Mittels eines angeschlossenen Regelschaltkreises wird das Ungleichgewicht momentan kompensiert und dadurch der Waagebalken in seiner Gleichgewichtslage gehalten. Das erforderliche Drehmoment wird aufgezeichnet. Nach vorheriger Eichung mit Gewichten entspricht es dem Dampfdruck der untersuchten Substanz.

Im weiteren Verlauf der Messung steigert man die Temperatur in kleinen Intervallen, bis der höchste gewünschte Temperaturwert erreicht ist. Anschließend wird die Probe wieder abgekühlt und man kann gegebenenfalls eine zweite Dampfdruckkurve aufzeichnen. Eine Reproduzierbarkeit der beiden Meßreihen ist nur dann gewährleistet, wenn die gemessene Substanz einen hinreichenden Reinheitsgrad aufweist. Falls ein dritter Durchgang die Resultate des zweiten nicht bestätigt, ist dies unter Umständen darauf zurückzuführen, daß sich die Substanz im untersuchten Temperaturbereich zersetzt.

1.6.5. Gassättigungsmethode

1.6.5.1. Apparatur

Die verwendete Apparatur besteht aus einer Reihe von in Abbildung 5 dargestellten, weiter unten beschriebenen Bestandteilen (1).

Trägergas:

Das Trägergas darf mit der Prüfsubstanz nicht chemisch reagieren. Gewöhnlich ist Stickstoff geeignet, doch zuweilen müssen andere Gase verwendet werden. Die verwendeten Gase müssen trocken sein. (siehe Abbildung 5, Ziffer 4: Messung der relativen Feuchtigkeit des Gases).

Durchflußkontrolle:

Ein geeignetes Regelsystem zur Kontrolle des Gasstroms ist notwendig, um einen konstanten und wahlweise einstellbaren Gasfluß durch die Sättigungssäule(n) zu gewährleisten.

Kühlfallen zum Niederschlagen des Dampfes:

Ihre Wahl hängt von den jeweiligen Eigenschaften der Prüfsubstanz und der verwendeten Analyse-methode ab. Die Dämpfe sollten quantitativ so abgeschieden werden, daß eine anschließende Analyse möglich ist. Für manche Prüfsubstanzen werden sich mit Flüssigkeiten wie Hexan oder Äthylenglykol gefüllte Kühlfallen anbieten. Für andere wiederum mögen feste Adsorber zur Anwendung kommen.

Wärmeaustauscher:

Zur Messung bei verschiedenen Temperaturen kann es notwendig sein, einen Wärmeaustauscher in die Anordnung mit einzubauen.

Sättigungssäule:

Die zu untersuchende Substanz wird in gelöster Form auf die Oberfläche eines geeigneten inerten Trägermaterials aufgebracht. Dies wird in die Sättigungssäule(n) eingebracht. Sie sollte so dimensioniert und die Gasdurchflußgeschwindigkeit so eingestellt werden, daß eine vollständige Sättigung des Trägergases sichergestellt ist. Die Säule(n) muß (müssen) thermostatiert werden. Soll bei Temperaturen über 20 °C gemessen werden, müssen die Apparaturteile zwischen der(n) Sättigungssäule(n) und den Kühlfallen ebenfalls beheizt werden, um eine Kondensation der Prüfsubstanz zu vermeiden.

1.6.5.2. Meßvorgang**Vorbereitung der Sättigungssäule(n):**

Man löst die zu untersuchende Substanz in einem sehr flüchtigen Lösungsmittel und gibt sie einer ausreichenden Menge an Trägermaterial zu. Man muß eine genügende Menge an Prüfsubstanz hinzufügen, um die Sättigung für die gesamte Dauer des Tests zu gewährleisten. Das Lösungsmittel wird an der Luft oder im Rotationsdampfer vollständig verdampft und das sorgfältig durchgemischte Material in die Sättigungssäule(n) gefüllt. Nach dem Aufheizen der Probe im temperaturkontrollierten Bad wird trockener Stickstoff durch die Apparatur geleitet.

Messung:

Man verbindet die Adsorptionsfallen mit dem Ausgang der Säule(n) und notiert die Zeit. Zu Beginn und in regelmäßigen Abständen während der Messungen kontrolliert man die Durchflußmenge mittels eines Blasenzählers (oder kontinuierlich mit einem Durchflußmesser).

Der Druck am Ausgang der Sättigungssäule(n) muß gemessen werden.

Dies geschieht entweder

- a) durch Zwischenschalten eines Manometers zwischen die Säule(n) und die Adsorptionsfallen (wegen des steigenden Totvolumens und der vergrößerten Adsorptionsfläche)
- oder
- b) durch Bestimmung des Druckabfalls längs der speziellen Adsorptionsfallen-anordnung als Funktion der Durchflußrate (bei Flüssigkeitsfallen möglicherweise nicht sehr zufriedenstellend).

In Vorversuchen oder durch Schätzungen bestimmt man die erforderliche Zeit zur Abscheidung der für die verschiedenen Bestimmungsmethoden benötigten Substanzmenge. Desgleichen werden Vorversuche zur Bestimmung der maximalen Durchflußgeschwindigkeit durchgeführt, bei der das Trägergas vollständig von dem Dampf der Substanz gesättigt wird, bevor der Dampfdruck bei einer gegebenen Temperatur berechnet wird. Zu diesem Zweck leitet man das Trägergas so langsam in die Sättigungssäule(n) ein, daß sich für eine noch geringere Durchflußgeschwindigkeit kein größerer berechneter Dampfdruckwert ergibt.

Die spezifische Analyse-methode hängt von der Art der zu untersuchenden Substanz ab (z. B. Gaschromatographie oder Gravimetrie).

Man bestimmt die Substanzmenge, die von einem bekannten Volumen an Trägergas mitgeführt wird.

1.6.5.3. Berechnung des Dampfdruckes

Der Dampfdruck berechnet sich aus der Dampfdichte W/V mit Hilfe folgender Gleichung:

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

Dabei ist:

P = Dampfdruck in (Pa)

W = absorbierte Substanz in (g)

V = Volumen des gesättigten Gases in (m^3)

R = universelle molare Gaskonstante ($J/mol \cdot K$)

T = Temperatur in (K)

M = Molekulargewicht (g/mol)

Die gemessenen Volumina müssen wegen der herrschenden Druck- und Temperaturdifferenzen zwischen dem Durchflußmesser und den mit Thermostaten beheizten Sättigungssäulen entsprechend korrigiert werden. Ist der Durchflußmesser den Adsorptionsfallen nachgeschaltet, so muß mit entsprechenden Korrekturen dem möglicherweise verdampften Inhalt der Fallen Rechnung getragen werden (1).

2. DATEN

Dampfdruckbestimmungen mit einer jeden der oben beschriebenen Methoden sollten bei mindestens 2 Temperaturen vorgenommen werden. 3 oder mehr sind bevorzugt im Bereich von 0 °C bis 50 °C, um den Verlauf der Dampfdruckkurve zu erhalten.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Bericht enthält folgende Informationen:

- Genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen);
- Mindestens 2 Dampfdruck- und Temperaturwerte, vorzugsweise im Bereich 0 °C bis 50 °C. Außerdem sollten alle Rohdaten sowie eine $\log p$ gegen $1/T$ -Kurve enthalten sein. Weiterhin sollte der geschätzte Dampfdruckwert bei 20 °C oder 25 °C angegeben werden.

Wird eine Zustandsänderung (Phasenübergang, Zersetzung) festgestellt, sollte auf folgendes geachtet werden:

- Art der Veränderung;
- Temperatur bei Atmosphärendruck, bei der die jeweilige Veränderung auftritt;
- Dampfdruckwerte bei 10 °C und 20 °C unter- oder oberhalb des Punktes, bei der die Zustandsänderung eintritt (es sei denn, es liegt ein Übergang vom festen in den gasförmigen Zustand vor).

Alle Informationen und Bemerkungen, die zur Bewertung der Ergebnisse von Bedeutung sind, müssen im Bericht erwähnt werden.

Die verwendete Methode sollte ebenso wie Abweichungen von dieser vermerkt werden.

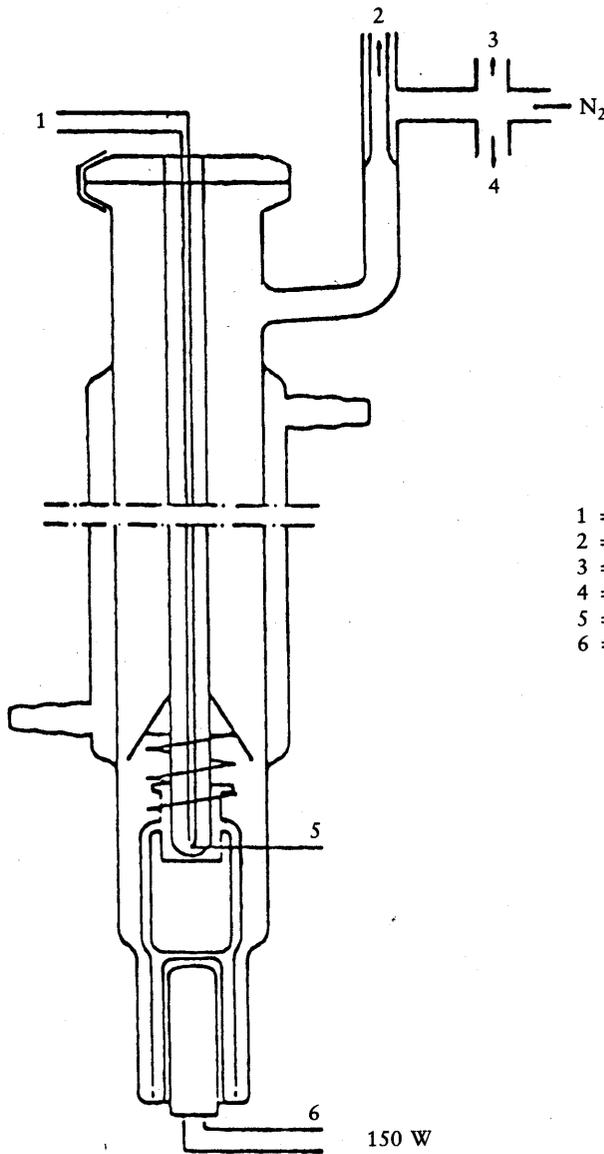
4. LITERATUR

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

Anlage

Abbildung 1

Apparatur zur Bestimmung der Dampfdruckkurve nach der dynamischen Methode



- 1 = Thermoelement
- 2 = Vakuumpuffervolumen
- 3 = Manometer
- 4 = Vakuum
- 5 = Meßpunkt
- 6 = Heizelement etwa 150 W

Abbildung 2

Apparatur zur Bestimmung der Dampfdruckkurve nach der statischen Methode

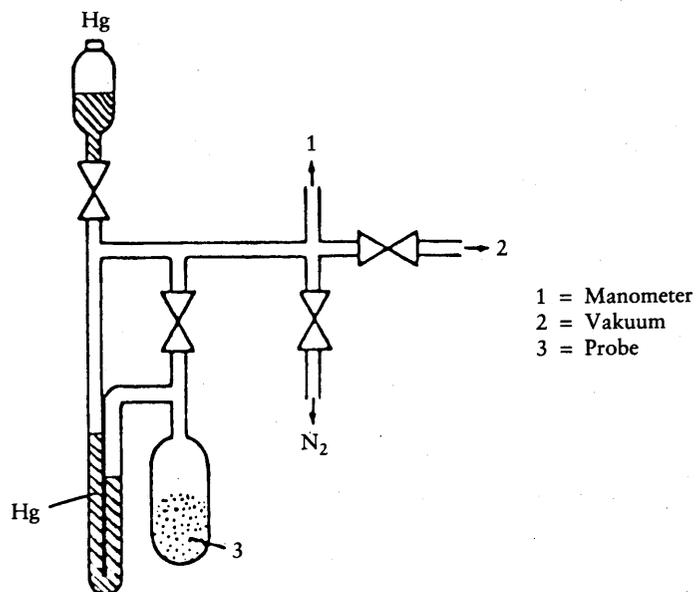


Abbildung 3

Isoteniskop

(Literaturverzeichnis (2))

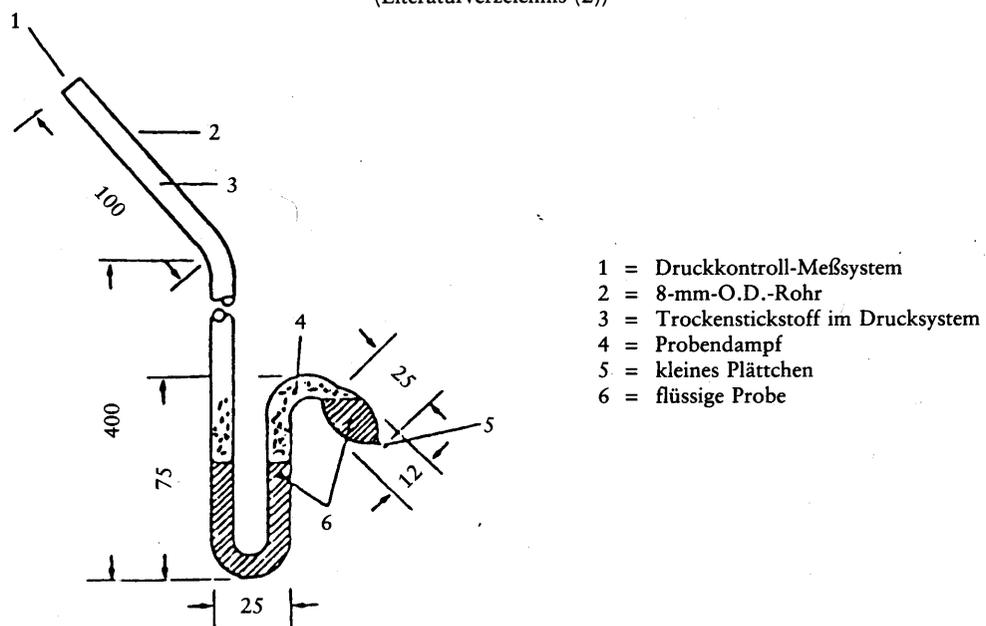
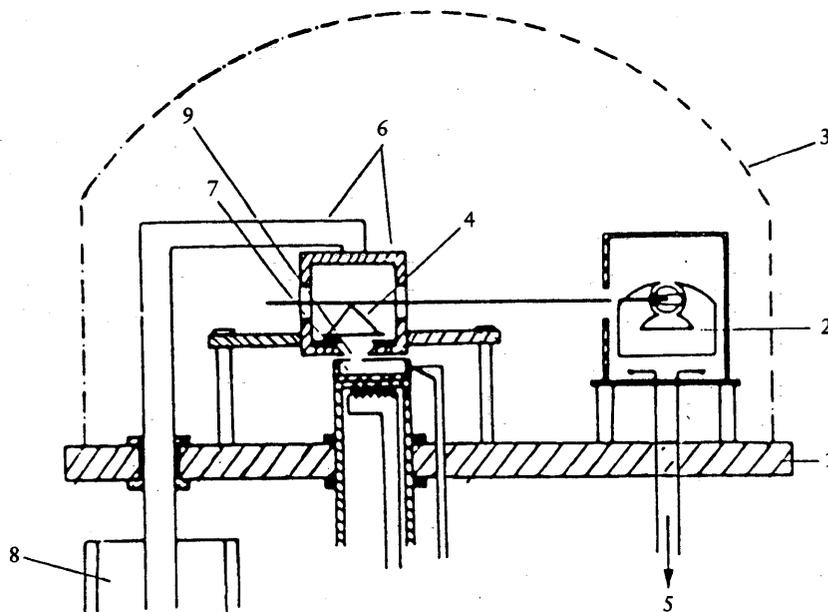


Abbildung 4

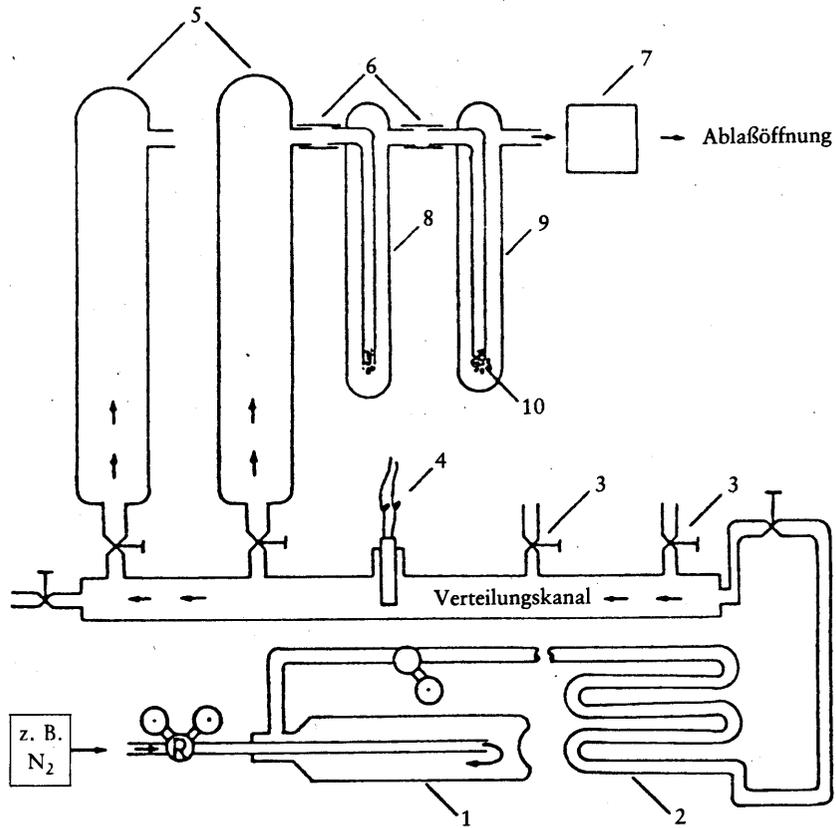
Apparatur zur Bestimmung der Dampfdruckkurve mit der Dampfdruckwaage



- 1 = Grundplatte
- 2 = Drehspuleninstrument
- 3 = Glocke
- 4 = Waage und Waagschale
- 5 = Vakuum-Meßeinrichtung
- 6 = Kühlkasten und Kühlstab
- 7 = Verdampferofen
- 8 = Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff
- 9 = Schutzmantel

Abbildung 5

Beispiel für ein Durchflußsystem zur Bestimmung des Dampfdrucks mit der Gassättigungsmethode



- 1 = Durchflußregler
- 2 = Wärmeaustauscher
- 3 = Nadelventile
- 4 = Gerät zur Messung der relativen Feuchtigkeit
- 5 = Saturationskolonnen
- 6 = PTFE-Dichtungen
- 7 = Durchflußmesser
- 8 = Absorberfalle
- 9 = Ölfalle
- 10 = gesinterter Blasenähler

A. 5. OBERFLÄCHENSPIANNUNG

1. METHODE

Den beschriebenen Methoden liegt die OECD-Prüfrichtlinie (1) zugrunde.

1.1. Einleitung

Die hier beschriebenen Methoden sind zur Messung der Oberflächenspannung wäßriger Lösungen anzuwenden.

Zweckdienlich ist, daß vor der Durchführung dieser Prüfungen Vorabinformationen über die Wasserlöslichkeit, die Struktur, die Hydrolyseigenschaften und die kritische Konzentration für Mizellbildung des Stoffes vorliegen.

Die nachstehenden Methoden können für die meisten chemischen Substanzen ohne Einschränkung in bezug auf ihren Reinheitsgrad angewendet werden.

Die Messung der Oberflächenspannung nach der Ringmethode beschränkt sich auf wäßrige Lösungen mit einer dynamischen Viskosität unter ca. 200 mPa s.

1.2. Definition und Einheiten

Die freie Oberflächenthalpie pro Flächeneinheit bezeichnet man als Oberflächenspannung. Sie wird in folgenden Einheiten ausgedrückt:

N/m (Einheit in SI) oder

mN/m (Untereinheit in SI),

1 N/m = 10^3 dyn/cm,

1 mN/m = 1 dyn/cm im veralteten CGS-System.

1.3. Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Meßanordnung von Zeit zu Zeit zu kalibrieren und bei Anwendung einer anderen Methode einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

Referenzsubstanzen, die einen weiten Bereich von Oberflächenspannungen abdecken, sind in den Literaturangaben (1) und (2) aufgeführt.

1.4. Prinzip der Methoden

Die Methoden basieren auf der Messung der maximalen Kraft, die vertikal auf einen Bügel oder einen Ring ausgeübt werden muß, der Kontakt zur Oberfläche der in ein Meßgefäß gefüllten und zu prüfenden Flüssigkeit hat, um ihn aus dieser Oberfläche herauszuziehen. Oder die maximale Kraft wird auf eine Platte ausgeübt, die mit einem Rand in Kontakt mit der Oberfläche steht, um den gebildeten Film hochzuziehen.

1.5. Qualitätskriterien

Die Genauigkeit dieser Methoden überschreitet wahrscheinlich alle Kontrollerfordernisse des Umweltschutzes.

1.6. Methodenbeschreibung

1.6.1. Plattenmethode

Siehe ISO 304—("Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing Up Liquid Films").

1.6.2. *Bügelmethode*

Siehe ISO 304—("Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing Up Liquid Films").

1.6.3. *Ringmethode*

Siehe ISO 304—("Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing Up Liquid Films").

1.6.4. *OECD-Ringmethode*1.6.4.1. *Gerät*

Zur Ausführung der in Betracht kommenden Messungen eignen sich handelsübliche Tensiometer. Sie bestehen aus folgenden Teilen:

- ein beweglicher Probenstisch,
- ein Kraftmeßsystem,
- ein Meßkörper (Ring),
- ein Meßgefäß.

1.6.4.1.1. *Beweglicher Probenstisch*

Der bewegliche Probenstisch dient als Untersatz für das thermostatisierte Meßgefäß, in welchem sich die zu untersuchende Flüssigkeit befindet. Er ist zusammen mit dem Kraftmeßsystem auf ein Stativ montiert.

1.6.4.1.2. *Kraftmeßsystem*

Über dem Probenstisch befindet sich das Kraftmeßsystem (siehe Abbildung). Der Fehler der Kraftmessung sollte einen Wert von $\pm 10^{-6}$ N nicht übersteigen, was einer Fehlergrenze von $\pm 0,1$ mg bei der Massenbestimmung entspricht. In den meisten Fällen erfolgt die Einteilung der Meßskala handelsüblicher Tensiometer in mN/m, so daß die Oberflächenspannung direkt in mN/m mit einer Genauigkeit von 0,1 mN/m abgelesen werden kann.

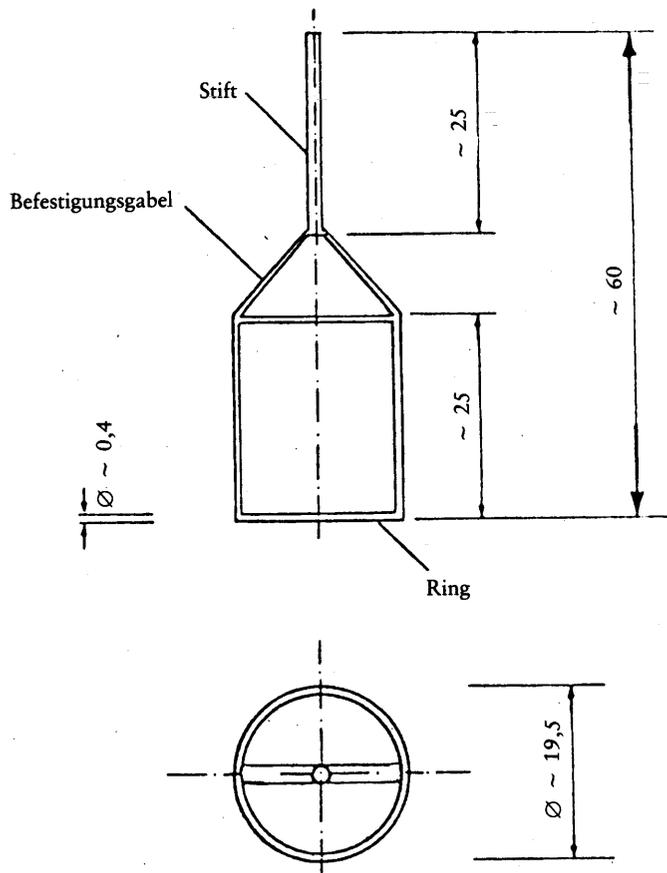
1.6.4.1.3. *Meßkörper (Ring)*

Üblicherweise wird der Ring aus Platin-Iridiumdraht mit einer Stärke von etwa 0,4 mm hergestellt. Der mittlere Umfang beträgt 60 mm. Der Draht ring ist horizontal mittels einer Befestigungsgabel aus Draht und einem Metallstift aufgehängt, welche die Verbindung zum Kraftmeßsystem darstellen (siehe Abbildung).

Abbildung

Meßkörper

(Alle Abmessungen in mm)



1.6.4.1.4. Meßgefäß

Zur Aufnahme der Prüflösung bei den Messungen sollte ein Glasgefäß benutzt werden, das sich in einem Thermostaten befindet. Die Anordnung sollte so ausgelegt werden, daß während der Messungen die Temperatur sowohl der zu untersuchenden Lösung wie auch die der sich über deren Oberfläche befindlichen Gasphase konstant bleiben und die Probe nicht verdampfen kann. Hierzu können zylindrische Glasgefäße mit einem Innendurchmesser von nicht weniger als 45 mm zur Anwendung kommen.

1.6.4.2. Vorbereitung der Apparatur

1.6.4.2.1. Reinigung

Die Glasgefäße müssen sorgfältig gereinigt werden. Falls notwendig sollten sie mit heißer Chromschwefelsäure und anschließend mit sirupartiger Phosphorsäure (83 bis 98 Gew. - % H_3PO_4) gewaschen, sorgfältig mit Leitungswasser gespült und schließlich nochmals mit doppelt destilliertem Wasser ausgewaschen werden, bis man eine neutrale Reaktion erhält. Daraufhin trocknet man das Gefäß oder spült es mit der zu untersuchenden Probenlösung aus.

Der Ring sollte zunächst sorgfältig mit Wasser abgewaschen werden, um alle wasserlöslichen Substanzen zu entfernen. Anschließend wird er kurzzeitig in Chromschwefelsäure getaucht, in doppelt destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion gespült und schließlich kurz über einer Methanolf Flamme erhitzt.

Anmerkung:

Verunreinigungen durch Substanzen, die weder durch Chromschwefelsäure noch Phosphorsäure gelöst oder zersetzt werden, wie beispielsweise Silicone, sind mittels geeigneter organischer Lösungsmittel zu entfernen.

1.6.4.2.2. Eichung der Apparatur

Die Kontrolle der Apparatur besteht in einer Überprüfung des Nullpunktes. Er sollte so eingestellt sein, daß die Instrumentenanzeige eine zuverlässige Bestimmung in mN/m zuläßt.

Aufstellung:

Das Gerät muß waagrecht aufgestellt werden, was sich beispielsweise unter Zuhilfenahme einer Wasserwaage, die man auf die Grundplatte des Tensiometers legt, und entsprechenden Einstellungen mit den dort vorgesehenen Stellschrauben erzielen läßt.

Nullpunkteinstellung:

Nach der Befestigung des Rings an der Apparatur und vor dem Eintauchen in die Flüssigkeit sind der Nullpunkt der Tensiometeranzeige einzustellen und die Parallelität des Rings zur Flüssigkeitsoberfläche zu überprüfen. Dazu kann man die Flüssigkeitsoberfläche als Spiegel benutzen.

Eichen:

Das eigentliche Eichen vor den Untersuchungen läßt sich auf zweierlei Weise durchführen:

- a) Benutzung einer Masse: Bei diesem Verfahren verwendet man Reiter bekannter Masse zwischen 0,1 g und 1,0 g, die auf dem Ring angebracht werden. Der Eichfaktor Φ_a , mit dem alle am Instrument abgelesenen Werte multipliziert werden müssen, läßt sich entsprechend der Gleichung (1) bestimmen:

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

Hierbei ist

$$\sigma_r = \frac{m \cdot g}{2b} \text{ (mN/m) mit}$$

m = Masse der Reiter (g)

g = Erdbeschleunigung ($981 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-2}$ in Meereshöhe),

b = mittlerer Umfang des Rings (cm),

σ_a = abgelesener Wert am Tensiometer nach dem Anbringen der Reiter auf dem Ring (mN/m).

- b) Verwendung von Wasser: Bei diesem Verfahren benutzt man reines Wasser, dessen Oberflächenspannung bei 23 °C einen Wert von 72,3 mN/m besitzt. Dieses Verfahren ist bei weitem schneller durchführbar als die Eichung mit Gewichten, doch läuft man hierbei immer Gefahr, daß die Oberflächenspannung des Wassers durch Spurenverunreinigungen mit oberflächenaktiven Substanzen verfälscht wird.

Der Eichfaktor Φ_b , mit dem alle am Instrument abgelesenen Werte multipliziert werden müssen, läßt sich entsprechend der Gleichung (2) bestimmen:

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

wobei

σ_o = angegebener Literaturwert für die Oberflächenspannung von Wasser (mN/m),

σ_g = gemessener Wert der Oberflächenspannung von Wasser (mN/m),

beide bei der gleichen Temperatur.

1.6.4.3. Vorbereitung der Proben

Von den zu untersuchenden Substanzen sind wäßrige Lösungen in den erforderlichen Konzentrationen herzustellen. Die Lösungen dürfen keine ungelösten Bestandteile enthalten.

Die Lösungen sind bei konstanter Temperatur zu halten ($\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$). Da sich die Oberflächenspannung der im Meßbehälter befindlichen Lösung im Verlaufe der Zeit verändert, sollten Messungen zu

verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen werden und entsprechend eine Kurve erstellt werden, die die Oberflächenspannung als Zeitfunktion darstellt. Ein Gleichgewichtszustand ist erreicht, sobald keine weiteren Änderungen auftreten.

Verschmutzung durch Staub oder gasförmige Substanzen beeinträchtigen die Messung. Aus diesem Grunde sollten die Arbeiten unter einer Schutzhaube vorgenommen werden.

1.6.5. *Prüfbedingungen*

Die Messungen sind bei $\pm 20^\circ\text{C}$ auszuführen, und die Temperaturkonstanz sollte mit $\pm 0,5^\circ\text{C}$ eingehalten werden.

1.6.6. *Durchführung der Prüfung*

Die zu messenden Lösungen werden in das sorgfältig gereinigte Meßgefäß gefüllt, wobei darauf geachtet werden sollte, Schaumbildung zu vermeiden.

Anschließend wird das Gefäß auf den Tisch der Testapparatur gestellt. Das Tischoberteil mit dem Meßgefäß wird nun soweit hochgeschraubt, bis der Ring unter die Oberfläche der zu messenden Lösung taucht.

Das Tischoberteil wird daraufhin langsam und gleichmäßig abgesenkt (mit einer Geschwindigkeit von ca. $0,5\text{ cm/min}$), um den Ring aus der Oberfläche herauszuziehen, bis ein maximaler Wert der Kraft erreicht ist. Der am Ring haftende Flüssigkeitsfilm darf nicht von ihm abreißen. Nach Beendigung der Messung wird der Ring wieder unter die Oberfläche getaucht und der Vorgang wiederholt, bis ein konstanter Wert der Oberflächenspannung erreicht ist. Bei jeder Bestimmung sollte die Zeitmessung mit dem Einfüllen der Lösung in das Meßgefäß beginnen. Die Ablesung erfolgt jeweils zu dem Zeitpunkt, bei dem die Maximalkraft beim Herausziehen des Rings aus der Flüssigkeitsoberfläche erreicht ist.

2. AUSWERTUNG

Zur Berechnung der Oberflächenspannung wird zunächst der in mN/m an der Apparatur abgelesene Wert mit dem Eichfaktor Φ_a oder Φ_b (je nach dem verwendeten Eichverfahren) multipliziert. Man erhält einen Wert, der jedoch nur annähernd gilt und infolgedessen einer Korrektur bedarf.

Harkins und Jordan (3) haben empirische Korrekturfaktoren für Oberflächenspannungswerte bestimmt, die mit der Ringmethode gemessen wurden. Diese Faktoren sind von den Ringdimensionen, der Dichte der Flüssigkeit und ihrer Oberflächenspannung abhängig.

Da es umständlich ist, für jede einzelne Messung den Korrekturfaktor aus den Tabellen von Harkins und Jordan zu bestimmen, um die Oberflächenspannung wäßriger Lösungen zu berechnen, kann eine vereinfachte Methode angewandt werden, die darin besteht, die korrigierten Werte für die Oberflächenspannung direkt aus der nachstehenden Tabelle abzulesen. (Für Ablesewerte, die zwischen den Tabellenwerten liegen, läßt sich der korrigierte Wert interpolieren).

TABELLE: KORREKTUR DER GEMESSENEN OBERFLÄCHENSpannungswerte

Nur für wässrige Lösungen, $\rho \approx 1 \text{ g/cm}^3$

R = 9,55 mm (mittlerer Ringradius)

r = 0,185 mm (Radius des Ringdrahtes)

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

Die Zusammenstellung dieser Tabelle erfolgte auf der Grundlage der Harkins-Jordan-Korrekturen und entsprechend der DIN-Norm (DIN 53914) für Wasser und wässrige Lösungen (Dichte $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$). Sie gilt für einen handelsüblichen Ring, der folgende Dimensionen aufweist: R = 9,55 mm (mittlerer Ringradius) und r = 0,185 mm (Radius des Ringdrahtes). Die Tabelle enthält korrigierte Werte für Oberflächenspannungsmessungen, entweder nach einer Eichung mit Gewichten oder mit Wasser.

Alternativ läßt sich die Oberflächenspannung ohne vorhergehende Eichung nach der folgenden Gleichung berechnen:

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

wobei

F = die vom Kraftmeßsystem angegebene Kraft beim Abreißen des Films,

R = der Ringradius,

f = der Korrekturfaktor (1).

3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht sollte die folgenden Informationen enthalten:

- verwendete Methode: ISO oder OECD-Ringtensiometer-Methode,
- Art des Wassers oder der verwendeten Lösung,
- genaue Spezifizierung der Substanz (Identifizierung und Verunreinigungen),
- Meßergebnisse: abgelesene Oberflächenspannungswerte mit Angabe sowohl der Einzelmesswerte und ihres arithmetischen Mittels wie auch des korrigierten Mittelwertes (wobei der Eichfaktor, sowie die Korrekturtabelle berücksichtigt wird),
- die Konzentration der Lösung,
- die Prüftemperatur,
- das Alter der untersuchten Lösung, insbesondere die Zeitspanne zwischen Zubereitung und Messung der Lösung,
- die Darstellung der Zeitabhängigkeit der Oberflächenspannung nach Eingießen der Lösung in das Meßgefäß,
- jede zusätzliche Information, die zu einer genauen Beschreibung des Meßverfahrens und zur Auswertung der Meßergebnisse notwendig ist,
- über alle für die Auswertung der Ergebnisse sachdienlichen Informationen und Bemerkungen, insbesondere in bezug auf Verunreinigungen und Aggregatzustand des Stoffes, ist zu berichten.

4. LITERATUR

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

A. 6. WASSERLÖSLICHKEIT

1. METHODE

Die hier beschriebenen Methoden basieren auf der Prüfrichtlinie der OECD (1).

1.1. Einleitung

Vor Durchführung dieser Prüfungen sollten Vorinformationen über die Strukturformel, den Dampfdruck, die Dissoziationskonstante und das Hydrolyseverhalten (als Funktion des pH-Wertes) des Stoffes vorliegen.

Für den gesamten Bereich der Wasserlöslichkeit reicht eine einzige Methode nicht aus. Diese Methode eignet sich nicht für flüchtige lösliche Stoffe.

Die beiden unten beschriebenen Prüfmethode decken den gesamten Bereich der Löslichkeiten ab:

- eine Prüfmethode ist für schwerlösliche Substanzen ($< 10^{-2}$ g/l) geeignet. Diese Methode wird als „Säulen-Elutions-Methode“ bezeichnet.
- Die andere Prüfmethode eignet sich für Substanzen höherer Löslichkeit ($> 10^{-2}$ g/l). Dieses Verfahren wird als „Kolben-Methode“ bezeichnet.

Beide Methoden eignen sich im wesentlichen für reine und in Wasser stabile Stoffe und sind nicht anwendbar auf Substanzen mit hoher Flüchtigkeit. Die Wasserlöslichkeit der Prüfsubstanz kann durch Verunreinigungen erheblich beeinträchtigt werden.

1.2. Definitionen und Einheiten

Die Wasserlöslichkeit einer Substanz wird durch ihre Massen-Sättigungskonzentration in Wasser bei einer bestimmten Temperatur angegeben. Die Wasserlöslichkeit wird in Masseneinheiten pro Lösungsvolumen angegeben. Die SI-Einheit ist kg/m^3 (g/l kann auch benutzt werden).

1.3. Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Meßanordnung von Zeit zu Zeit zu kalibrieren und bei Anwendung einer anderen Methode einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

1.4. Prinzip der Prüfmethode

Die ungefähre Probenmenge und die zum Erreichen der Sättigungskonzentration notwendige Zeit sollten in einem einfachen Vorversuch bestimmt werden.

1.4.1. Säulen-Elutions-Methode

Diese Methode basiert auf der Elution einer Prüfsubstanz mit Wasser aus einer Mikro-Säule, die mit einem inerten Trägermaterial wie Glaskugeln, Silika-Gel oder Sand und einem Überschuß an Prüfsubstanz gefüllt ist. Die Wasserlöslichkeit ist bestimmt, wenn die Konzentrationen aufeinanderfolgender Eluatfraktionen konstant sind. Dies zeigt sich in einem Konzentrationsplateau als Funktion der Zeit.

1.4.2. Kolben-Methode

Bei dieser Methode wird die Substanz (Feststoffe müssen pulverisiert werden) bei einer Temperatur in Wasser aufgelöst, die etwas höher als die Prüftemperatur liegt. Wenn die Sättigung erreicht ist, wird die Lösung abgekühlt und bei der Prüftemperatur gehalten. Die Lösung wird gerührt, bis das Gleichgewicht erreicht ist (2). Dann wird die Konzentration der Prüfsubstanz in der wäßrigen Lösung, die keine ungelösten Substanzteilchen enthalten darf, mit einer geeigneten Analysenmethode bestimmt.

1.5. **Qualitätskriterien**1.5.1. *Wiederholbarkeit*

Bei der Säulen-Elutions-Methode ist eine Wiederholbarkeit von < 30 % erreichbar. Bei der Kolben-Methode sollte sie < 15 % sein.

1.5.2. *Empfindlichkeit*

Sie hängt von der Analysenmethode ab. Es können jedoch Massenkonzentrationen bis hinunter zu 10^{-6} g/l bestimmt werden.

1.6. **Beschreibung der Methode**1.6.1. *Prüfbedingungen*

Die Prüfung wird vorzugsweise bei $20\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ durchgeführt. Wenn eine Temperaturabhängigkeit der Wasserlöslichkeit $> 3\text{ %/°C}$ vorzuliegen scheint, wird bei zwei weiteren Temperaturen, die mindestens 10 °C unter und über der ursprünglich gewählten Temperatur liegen, ebenfalls gemessen. In diesem Fall sollte die Temperaturkontrolle bei $\pm 0,1\text{ °C}$ liegen. Die gewählte Temperatur soll in den wichtigen Teilen der Apparatur konstant gehalten werden.

1.6.2. *Vorversuch*

Etwa 0,1 g der Probe (feste Substanzen müssen pulverisiert sein) werden in einen mit Glasstopfen verschließbaren 10-ml-Meßzylinder gegeben. Gemäß der Tabelle wird portionsweise destilliertes Wasser von Raumtemperatur zugesetzt.

0,1 g gelöste Substanz in „x“ ml Wasser	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Annähernde Löslichkeit (g/l)	> 1 000	1 000—200	200—100	100—50	50—10	10—1	< 1

Nach jedem Zusatz der in der Tabelle angegebenen Wassermenge wird die Mischung 10 min kräftig geschüttelt und mit bloßem Auge auf ungelöste Teilchen untersucht. Wenn nach Zusatz von 10 ml Wasser die Probe oder Teile von ihr ungelöst bleiben, wird der Inhalt des Meßzylinders in einen 100-ml-Meßzylinder umgefüllt, mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und geschüttelt. Bei geringer Löslichkeit kann die zur Auflösung einer Substanz erforderliche Zeit erheblich länger sein (bis zu 24 Stunden). Die ungefähre Löslichkeit ist in der Tabelle angegeben, und zwar unter dem Volumen des zur vollständigen Auflösung der Probe notwendigen Wassers. Ist die Substanz noch immer nicht vollständig gelöst, sollte weiter verdünnt werden, um festzustellen, ob entweder die Säulen-Elutions- oder die Kolben-Methode benutzt werden sollte.

1.6.3. *Säulen-Elutions-Methode*1.6.3.1. **Trägermaterial, Lösungsmittel und Eluent**

Das Trägermaterial für das Säulen-Elutionsverfahren muß inert sein. Geeignete Trägermaterialien sind Glaskugeln und Silika-Gel. Zur Aufbringung der Prüfsubstanz auf das Trägermaterial sollte ein geeignetes flüchtiges und analytisch reines Lösungsmittel benutzt werden. Als Eluent oder Lösungsmittel wird in einer Glas- oder Quarz-Apparatur doppelt destilliertes Wasser verwendet.

Anmerkung:

Direkt aus einem organischen Ionenaustauscher entnommenes Wasser sollte nicht benutzt werden.

1.6.3.2. Aufbringung auf das Trägermaterial

Etwa 600 mg Trägermaterial werden abgewogen und in einen 50-ml-Rundkolben eingefüllt. Eine geeignete Menge Prüfsubstanz wird abgewogen und in dem vorgesehenen Lösungsmittel gelöst. Ein ausreichender Teil der Lösung wird zum Trägermaterial hinzugefügt. Das Lösungsmittel wird nun vollständig abgezogen, z. B. in einem Rotationsverdampfer. Wenn das Lösungsmittel nicht ausreichend entfernt wurde, wird keine vollständige Sättigung des Wassers mit der Prüfsubstanz erzielt, da Verteilungseffekte auf der Oberfläche des Trägermaterials auf den Sättigungsvorgang störend wirken würden.

Das Aufbringen der Prüfsubstanz auf das Trägermaterial kann problematisch werden (fehlerhafte Ergebnisse), wenn die Prüfsubstanz sich ölartig oder als anomale Kristallphase auf dem Träger niederschlägt. Das Problem sollte durch Modifizierung des Aufbringungsverfahrens experimentell gelöst werden.

Das beladene Trägermaterial läßt man etwa 2 Stunden lang in etwa 5 ml Wasser quellen. Dann wird die Suspension in die Mikrosäule gefüllt. Es ist auch möglich, das trockene, beladene Trägermaterial in die Mikrosäule zu füllen, die zuvor mit Wasser gefüllt wurde. Auch hier wird der Quellvorgang von etwa 2 Stunden abgewartet.

Weitere Versuchsdurchführung:

Die Elution der Prüfsubstanz vom Trägermaterial kann auf zwei verschiedene Arten vorgenommen werden:

- mit einer Umwälzpumpe (siehe Abbildung 1),
- mit einem Niveaugefäß (siehe Abbildung 4).

1.6.3.3. Säulen-Elution mit der Umwälzpumpe

Apparatur:

Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung eines typischen Systems. Eine geeignete Mikrosäule ist in Abbildung 2 dargestellt. Allerdings ist jede andere Größe ebenfalls akzeptabel, vorausgesetzt, sie erfüllt die Kriterien der Vergleichbarkeit und Empfindlichkeit. Der Kopfraum der Säule sollte so groß sein, daß er mindestens fünf Säulenbett-Volumina Wasser für den Vorlauf und ein ausreichendes Volumen für die Entnahme von mindestens fünf Proben aufnehmen kann. Der Kopfraum kann kleiner gehalten werden, wenn das zur Entfernung von Verunreinigungen entnommene Eluatvolumen vor dem Anschluß der Pumpe nachgefüllt wird.

Die Säule sollte mit einer Umwälzpumpe verbunden werden, die einen konstanten Fluß von etwa 25 ml/h fördert. Die Pumpe wird mit Polytetrafluorethylen-Schläuchen und/oder Glasrohren angeschlossen. Bei der aus Säule und Pumpe zusammengesetzten Apparatur soll eine Möglichkeit zur Entnahme von Eluat-Proben und Druckausgleich des Kopfraumes mit der Atmosphäre vorgesehen sein. Das beladene Trägermaterial wird durch einen kleinen (5 mm) Pfropfen aus Glaswolle in der Säule gehalten, der gleichzeitig zum Herausfiltern von Partikeln dient. Die Umwälzpumpe kann z. B. eine peristaltische Pumpe sein. (Dabei ist darauf zu achten, daß es nicht zu einer Verunreinigung und/oder Absorption durch das Schlauchmaterial kommt.) Man kann auch eine Membranpumpe benutzen.

Meßverfahren:

Der Säulenfluß wird in Gang gesetzt. Eine Durchflußleistung von etwa 25 ml/h wird empfohlen (etwa 10 Säulenbett-Volumina/h bei der beschriebenen Säule). Die ersten fünf Säulenbett-Volumina (mindestens) werden verworfen, um wasserlösliche Verunreinigungen zu entfernen. Danach läßt man die Umwälzpumpe bis zur Einstellung des Gleichgewichts laufen. Das Gleichgewicht ist erreicht, wenn bei fünf aufeinanderfolgenden Proben die Konzentrationen um nicht mehr als $\pm 30\%$ in zufälliger Folge differieren. Diese Proben sollten in solchen zeitlichen Abständen genommen werden, in denen mindestens zehn Säulenbett-Volumina der Lösung die Säule durchlaufen haben.

1.6.3.4. Säulen-Elution mit dem Niveaugefäß (siehe Abbildungen 3 und 4)

Niveaugefäß: Der Anschluß des Niveaugefäßes wird mit einem Glasschliff-Verbindungsstück vorgenommen, das mit einem PTFE-Schlauch verbunden ist. Eine Durchflußrate von ca. 25 ml/h wird empfohlen. Aufeinanderfolgende Eluat-Fractionen werden gesammelt und ihre Konzentrationen mit der gewählten Analysenmethode bestimmt.

Meßverfahren:

Diejenigen Fraktionen des mittleren Eluatbereichs, bei denen die Konzentrationen in mindestens fünf aufeinanderfolgenden Proben konstant bleiben ($\pm 30\%$), werden zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit benutzt.

Ein zweiter Durchlauf wird mit halber Durchflußrate durchgeführt. Stimmen die Ergebnisse der beiden Versuche überein, wird das Prüfergebnis als zufriedenstellend betrachtet. Ist die Löslichkeit bei dem niedrigeren Durchfluß anscheinend höher, muß die Durchflußleistung weiterhin so lange halbiert werden, bis zwei aufeinanderfolgende Versuchsdurchläufe die gleiche Löslichkeit ergeben.

In beiden Fällen (sowohl mit Umwälzpumpe als auch mit dem Niveaugefaß) sollten die Proben durch Prüfung des Tyndall-Effekts (Lichtstreuung) auf kolloidale Substanzpartikel untersucht werden. Wenn solche Substanzpartikel in der Lösung vorkommen, ist das Prüfergebnis unbrauchbar. Die Prüfung sollte dann wiederholt werden, nachdem die Filterfunktion der Säule verbessert wurde. Der pH-Wert jeder Probe sollte bestimmt und aufgenommen werden. Ein zweiter Durchlauf sollte bei der gleichen Temperatur durchgeführt werden.

1.6.4. Kolben-Methode**1.6.4.1. Geräte**

Für diese Methode braucht man folgende Geräte:

- übliche Laborglasgeräte und -instrumente,
- eine Vorrichtung zum Schütteln der Lösungen bei konstanter Temperatur,
- eine Zentrifuge (möglichst thermostatisiert) falls diese bei Emulsionen erforderlich wird,
- Geräte für analytische Bestimmungen.

1.6.4.2. Meßverfahren

Die zur Sättigung des vorgegebenen Wasservolumens erforderliche Prüfsubstanzmenge wird anhand der Ergebnisse des Vorversuches abgeschätzt. Das erforderliche Wasservolumen hängt von der Analyse-methode sowie dem Löslichkeitsbereich ab. Etwa fünfmal soviel Prüfsubstanz wie die geschätzte Menge wird jeweils in drei mit Glasstopfen versehene Glasgefäße eingefüllt (z. B. Zentrifugenröhrchen oder Kolben). Das gewählte Wasservolumen wird allen Gefäßen zugesetzt, die daraufhin fest verschlossen werden. Die geschlossenen Gefäße werden dann bei 30 °C geschüttelt. (Dazu sollte ein Schüttel- oder Rührgerät, das bei konstanter Temperatur arbeitet, verwendet werden, z. B. magnetisches Rühren in einem thermostatisierten Wasserbad.) Nach einem Tag wird eines der Gefäße entnommen und 24 h unter gelegentlichem Schütteln bei Prüftemperatur stehengelassen, bis sich das Gleichgewicht wieder eingestellt hat. Dann wird der Inhalt des Gefäßes bei Prüftemperatur zentrifugiert und die Konzentration der Prüfsubstanz in der klaren wäßrigen Phase mit einem geeigneten Analysenverfahren bestimmt. Mit den beiden anderen Kolben wird nach zwei bzw. drei Tagen genauso verfahren, nachdem zuvor das Sättigungsgleichgewicht bei 30 °C eingestellt wurde. Entsprechen die Prüfergebnisse — mindestens die der beiden letzten Kolben — der geforderten Wiederholbarkeit, ist die Prüfung als zufriedenstellend anzusehen. Die gesamte Prüfung sollte unter Verlängerung der Zeiten für die Gleichgewichtseinstellung wiederholt werden, wenn die Prüfergebnisse der Kolben 1, 2 und 3 eine steigende Tendenz aufweisen.

Der pH-Wert jeder Probe sollte aufgenommen werden.

1.6.5. Analyse

Für diese Bestimmungen ist eine substanzspezifische Analysenmethode vorzuziehen, da bereits kleine Mengen von Verunreinigungen große Fehler bei Bestimmung der Wasserlöslichkeit verursachen können. Beispiele für solche Analysenmethoden sind: Gas- oder Flüssigkeitschromatographie, Titrierverfahren, photometrische Methoden, voltametrische Verfahren.

2. DATEN**2.1. Säulen-Elutions-Methode**

Es wird der Mittelwert von mindestens fünf aufeinanderfolgenden Proben aus dem Bereich des Sättigungsplateaus berechnet, wie auch die Standardabweichung.

2.2. Kolben-Methode

Die einzelnen Ergebnisse sollten für jeden der drei Kolben angegeben werden. Diejenigen Ergebnisse, die als konstant angesehen werden (Wiederholbarkeit weniger als 15 %), sollten gemittelt und in Masseneinheiten pro Lösungsvolumen angegeben werden. Es ist eventuell notwendig, die Masseneinheiten in Volumeneinheiten umzuwandeln. Bei sehr hoher Löslichkeit (>100 g/l) kann man mit der Dichte arbeiten.

3. ABSCHLUSSBERICHT**3.1. Säulen-Elutions-Methode**

Der Bericht soll, wenn möglich, Angaben über die Ergebnisse des Vorversuches sowie die nachstehenden Informationen enthalten:

- genaue Beschreibung der Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen),
- die Konzentrationen, Durchflußraten und pH-Werte jeder Probe,
- die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens fünf Proben aus dem Bereich des Sättigungsplateaus eines jeden Versuches,
- Durchschnittswerte der zwei aufeinanderfolgenden gültigen Durchläufe,
- Temperatur des Wassers während des Sättigungsvorgangs,
- das verwendete Analyseverfahren,
- Art des verwendeten Trägermaterials,
- Aufbringung der Prüfsubstanz auf das Trägermaterial,
- verwendetes Lösungsmittel,
- ggf. Hinweis auf eine chemische Instabilität der Prüfsubstanz während des Prüfungsvorgangs und der angewendeten Analyseverfahren,
- alle Informationen, die zur Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung sind.

3.2. Kolben-Methode

Der Bericht soll, wenn möglich, folgende Angaben enthalten:

- genaue Beschreibung der Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen),
- die einzelnen Analyseergebnisse und die Durchschnittswerte, wenn pro Kolben mehr als ein Wert bestimmt wurde,
- den pH-Wert jeder Probe,
- den Mittelwert aus denjenigen Kolben, deren Ergebnisse übereinstimmten,
- die Prüftemperatur,
- die verwendete Analyseverfahren,
- ggf. Hinweis auf eine chemische Instabilität der Prüfsubstanz während des Prüfungsvorgangs und der angewendeten Analyseverfahren,
- alle Informationen, die zur Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung sind.

4. LITERATUR

- (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.

Anlage

Abbildung 1

Schematische Testanordnung

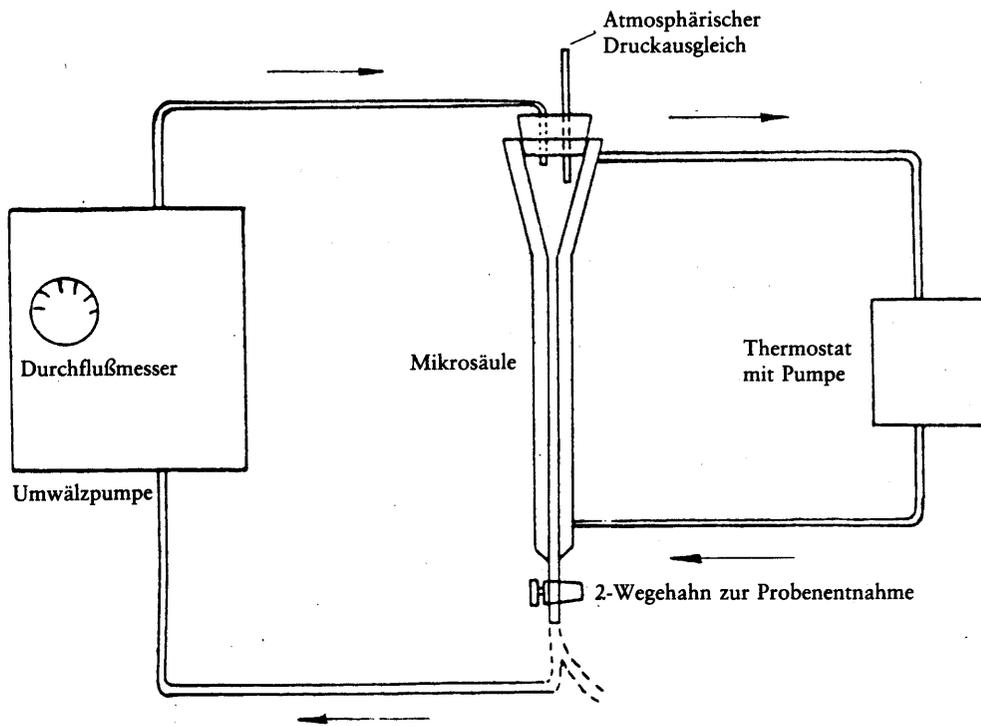


Abbildung 2

Typische Mikrosäule
(alle Abmessungen in mm)

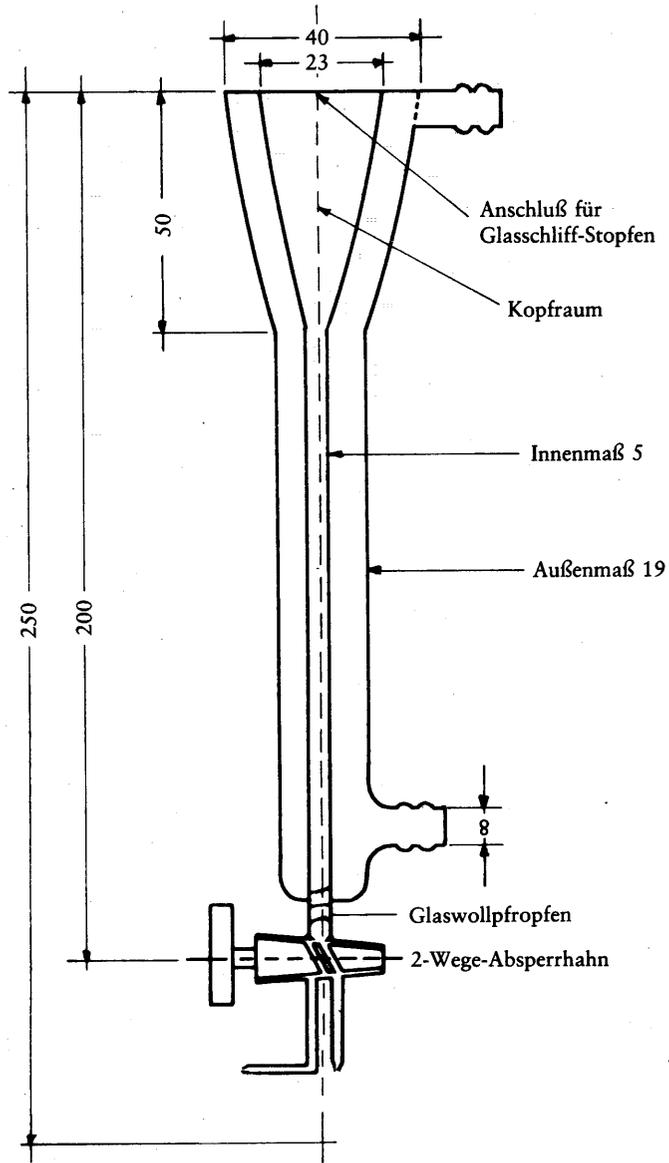


Abbildung 3

Typische Mikrosäule
(alle Abmessungen in mm)

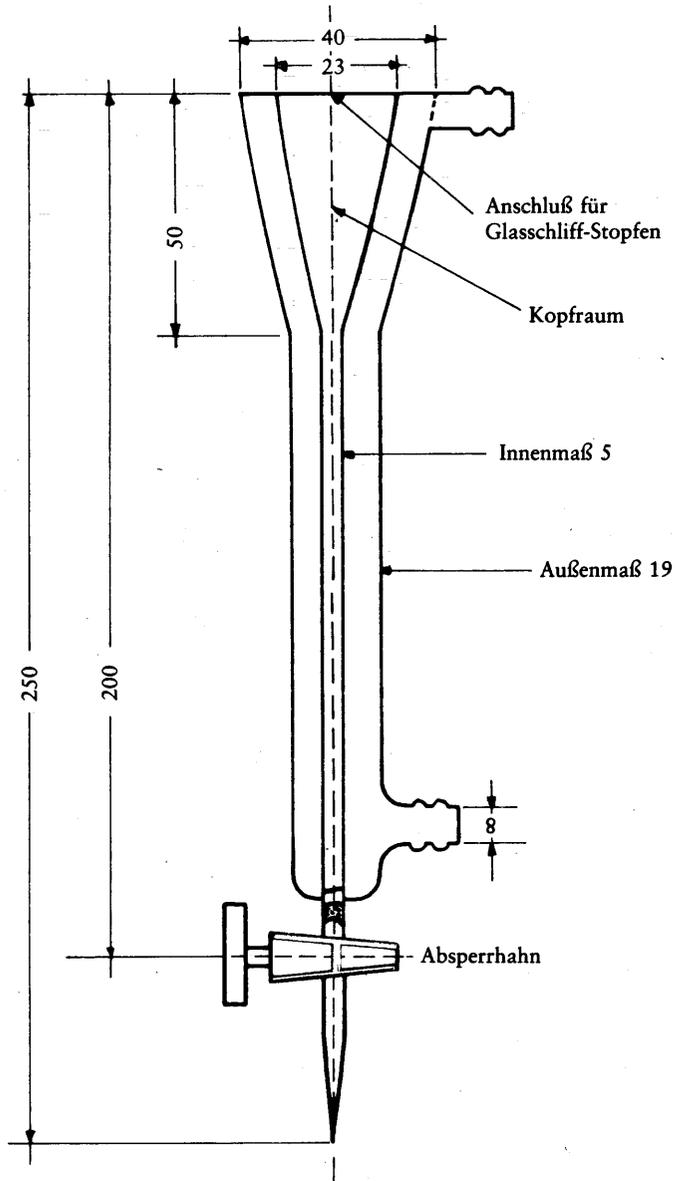
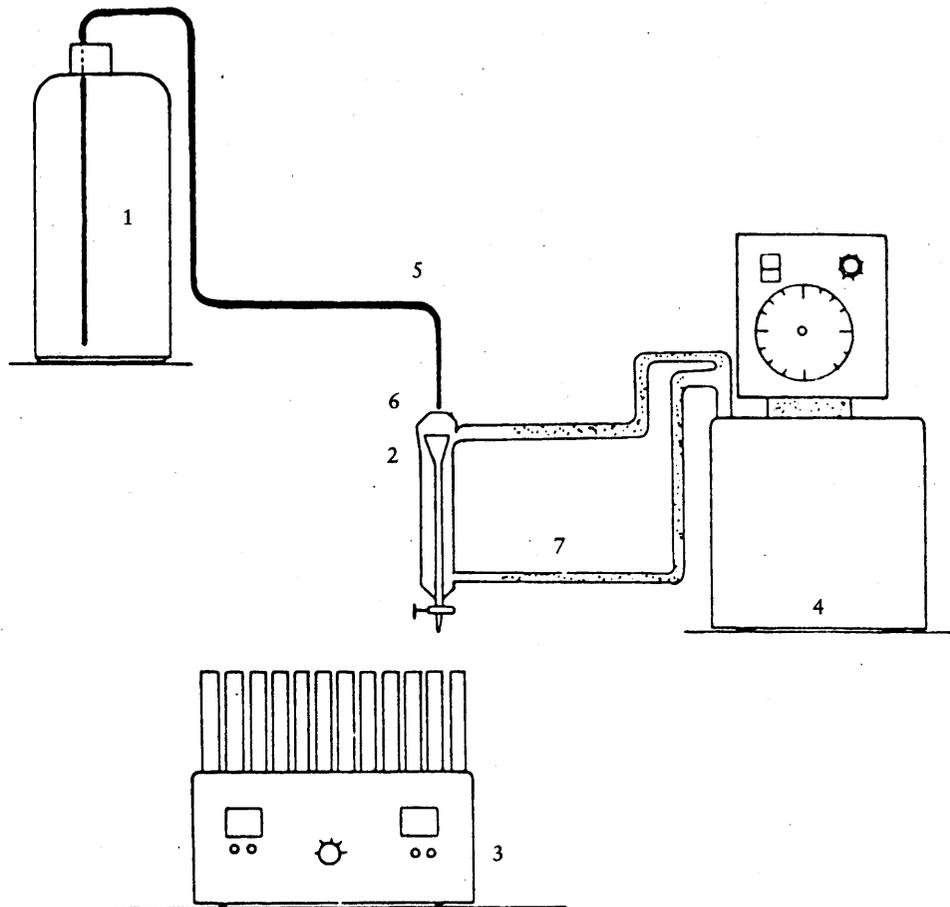


Abbildung 4

Testanordnung zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit schwerlöslicher, wenig flüchtiger Substanzen



- 1 = Niveaugefäß (z. B. 2,5-l-Kolben)
- 2 = Säule (siehe Abbildung 3)
- 3 = Fraktionssammler
- 4 = Thermostat
- 5 = Teflonschlauch
- 6 = Glasschliff-Stopfen
- 7 = Wasserschlauch (zwischen Thermostat und Säule, Innendurchmesser ungefähr 8 mm)

A. 7. FETTLÖSLICHKEIT

1. METHODE

Der beschriebenen Methode liegt die OECD-Prüfrichtlinie (1) zugrunde.

1.1. Einleitung

Zur Durchführung der Prüfung ist es nützlich, Vorinformation über den Verteilungskoeffizienten, die Wasserlöslichkeit, die Strukturformel und die Stabilität der Prüfsubstanz bei 50 °C zu haben.

Diese Methode gilt nur für im wesentlichen reine Substanzen, die bei 50 °C stabil und unter den gleichen Bedingungen nicht merkbar flüchtig sind.

Die Methode ist nicht für Prüfsubstanzen geeignet, die mit Triglyzeriden reagieren.

1.2. Definitionen und Einheiten

Der Massenanteil einer Substanz, der mit einem flüssigen Fett (Öl) ohne chemische Reaktion eine homogene Phase bildet, ist als Fettlöslichkeit definiert. Das Maximum eines solchen Massenanteils ist der Sättigungsmassenanteil. Es besteht Temperaturabhängigkeit.

Der Sättigungsanteil einer Substanz wird in mg/100 g Standardfett bei 37 °C ± 0,5 °C angegeben.

Zwischen der Löslichkeit in g/100 g Lösung (S') und der Löslichkeit in g pro 100 g Lösungsmittel (S) besteht folgende Beziehung:

$$S = \frac{100 \times S'}{100 - S'} \text{ g/100 g Standardfett}$$

Multiplikation des Wertes S mit 1 000 ergibt mg/100 g Standardfett.

1.3. Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen die Meßanordnung von Zeit zu Zeit zu kalibrieren und bei Anwendung einer anderen Methode einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird unter festgelegten Bedingungen durch Rühren in einem flüssigen Standardfett gelöst, wobei ein angemessener Überschuß vorgelegt wird, der sich aus dem Vorversuch ergibt.

Die gelöste Substanzmenge wird durch eine geeignete analytische Methode bestimmt.

1.5. Qualitätskriterien

1.5.1. Anwendbarkeit

Die Wiederholbarkeit (= repeatability) der Messung ist zur Zeit unbekannt.

Die Ergebnisse gelten für Standardfette bei Verwendung relativ reiner Substanzen. Bei 37 °C können Fette Emulsionen oder feine Suspensionen mit Feststoffen bilden. Da hierdurch die Bestimmung des Massenanteils gestört wird, ist eine derartige Bildung zu vermeiden.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung****1.6.1.1. Geräte**

Folgende Ausrüstung wird benötigt:

- normale Laboratoriumsglasgeräte,
- Waage,
- Zentrifuge mit Thermostat,
- Rührvorrichtung, die in Kombination mit einem Temperatur-Kontrollsystem benutzt werden kann,
- Thermostat.

1.6.1.2. Standardfett

Der Einsatz von Standardfett ist notwendig. Die Standardfette sollen definierbar sein. Ein Beispiel für ein solches Fett ist als Anlage beigefügt.

1.6.1.3. Vorversuch

Es ist ein einfacher Vorversuch durchzuführen, um die ungefähre Prüfsubstanzmenge zu bestimmen, die zur Einstellung des Sättigungsmassenanteils bei der Prüftemperatur von 37 °C erforderlich ist.

Anmerkung:

Die Geschwindigkeit der Einstellung des Sättigungsgleichgewichts kann bei Feststoffen sehr stark von der Partikelgröße abhängen. Aus diesem Grunde sollen diese Stoffe pulverisiert werden.

1.6.1.4. Vorbereitung der Prüfsubstanz

8 Proben in 50-ml-Kolben einwiegen. Normalerweise die doppelte Menge an Prüfsubstanz nehmen, wie zur Sättigung im Vorversuch ermittelt.

Nach Hinzufügen einer gewogenen Menge von etwa 25 g verflüssigtem und gemischtem Standardfett, die mit einem Rührer versehenen Kolben fest mit Glasstöpseln verschließen. Eine Hälfte (Gruppe 1) bei 30 °C, die andere Hälfte (Gruppe 2) bei etwa 50 °C je mindestens 1 Stunde lang rühren.

1.6.2. Prüfbedingungen

Die Bestimmung der Fettlöslichkeit wird bei 37 °C ± 0,5 °C vorgenommen.

1.6.3. Meßverfahren

Der Inhalt der Kolben beider Gruppen bei 37 °C ± 0,5 °C rühren, es muß gute Durchmischung bestehen.

Die zur Erreichung des Gleichgewichts nötige Rührdauer kann im allgemeinen nicht vorausgesagt werden. Bei flüssigen Substanzen kann eine Sättigung innerhalb von Minuten erreicht sein. Bei festen Substanzen kann dies Stunden dauern. Im allgemeinen werden nicht mehr als 3 Stunden Rührzeit nötig sein. Nach dieser Rührzeit wird das Rühren für 2 Kolben aus jeder Gruppe abgestellt. Diese beiden Kolben bleiben noch mindestens 1 Stunde bei 37 °C stehen, um die ungelösten Bestandteile zu trennen und die Bildung einer homogenen Phase zu ermöglichen.

Falls sich Emulsionen oder Suspensionen bilden (z. B. Tyndall-Effekt), müssen diese durch ein geeignetes Verfahren beseitigt werden, wie z. B. Zentrifugieren in einer thermostatisierten Zentrifuge.

Die dritten und vierten Kolben beider Gruppen sollen mindestens 24 Stunden gerührt werden, bevor sie noch 1 Stunde bei $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ ohne Rühren stehen.

Anmerkung:

Wenn nach diesem Zeitraum bei festen Substanzen kein Bodensatz bzw. bei flüssigen Substanzen keine Phasentrennung festzustellen ist, muß der Ansatz mit einer größeren Prüfsubstanzmenge wiederholt werden.

1.6.4. *Analyse*

Jeder gesättigten Fettphase eine Probe zur Analyse entnehmen. Diese Probe wird gewogen und der Massenanteil bestimmt.

Jedes geeignete Analysenverfahren kann verwendet werden, entweder direkt oder nach Extraktion mit Wasser oder einem organischem Lösungsmittel bzw. nach Anwendung anderer Trennverfahren.

Beispiele für solche Methoden sind:

- Spektrophotometrie,
- Gas- oder Flüssigkeitschromatographie,
- Voltametrie.

2. **DATEN**

Ergeben sich signifikante Unterschiede in den Ergebnissen von Unter- oder Übersättigung oder Kurzzeit- und Langzeit-Rührperioden, dann muß die Bestimmung mit längeren Rührzeiten wiederholt werden.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

Der Bericht enthält, wenn möglich, folgende Informationen:

- genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen),
- genaue Angaben über das eingesetzte Fett (z. B. Beschreibung, Eigenschaften, Herkunft, Zusammensetzung),
- Analysenmethode, Abweichungen, besondere Aspekte.

Die Ergebnisse müssen wie oben beschrieben ausgewertet werden. Sie sind Bestandteil des Prüfberichts. Falls zwischen den verschiedenen beobachteten Werten in mg/100 g keine signifikanten Unterschiede bestehen, sollen die Einzelwerte, der Mittelwert und die Standardabweichung im Prüfbericht angegeben werden.

Falls selbst nach Wiederholung der Bestimmung die Unterschiede sehr groß bleiben, sollen nur die Einzelergebnisse angeführt werden.

Alle Informationen und Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung sind, müssen in den Bericht aufgenommen werden.

4. **LITERATUR**

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

Anlage

BEISPIEL FÜR STANDARDFETTE

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung eines typischen Standardfettes.

Fettsäureverteilung

Zahl der C-Atome im Fettsäurerest	6	8	10	12	14	16	18	andere
GLC-Fläche (%)	0,5	7,5	10,3	50,4	13,9	7,6	8,6	1

Glycerid-Verteilung

Gesamtzahl der C-Atome in den Fettsäureresten	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
GLC-Flächen (%)	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

Reinheit

Monoglycerid-Gehalt (enzymatisch) \leq 0,1 %

Diglycerid-Gehalt (enzymatisch) \leq 0,4 %

Unverseifbares \leq 0,1 %

Wijs-Zahl \leq 0,5

Säurezahl 0,02

Wassergehalt (K. Fischer) \leq 0,1 %

Klar-Schmelzpunkt 28,5 °C

Typisches Absorptionsspektrum (Schichtdicke $d = 1$ cm, Vergleich: Wasser, 35 °C)

Wellenlänge (nm)	290	310	330	350	370	390	430	470	510
Durchlässigkeit (%)	2	15	37	64	80	88	95	97	98

mindestens 10 % Lichtdurchlässigkeit bei 303 nm

Dieses Fettsimulans ist eine synthetische Mischung gesättigter Triglyceride mit einer Fettsäure- und Triglyceridverteilung, ähnlich wie Kokosfett.

A. 8. VERTEILUNGSKOEFFIZIENT

1. METHODE

Der beschriebenen Methode liegt die OECD-Prüfrichtlinie zugrunde (1).

1.1. Einleitung

Vor Durchführung der Prüfung sollten Vorinformationen über Dissoziationskonstante, Wasserlöslichkeit und Oberflächenspannung des Stoffes vorliegen.

Die Methode ist nur für reine Substanzen anwendbar, die in Wasser und n-Oktanol löslich sind. Sie ist nicht für oberflächenaktive Substanzen geeignet.

1.2. Definition und Einheiten

Als Verteilungskoeffizient (P) bezeichnet man das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen (c_i) einer gelösten Substanz in einem Zweiphasensystem aus zwei weitgehend unmischbaren Lösungsmitteln.

Im Falle von n-Oktanol und Wasser ergibt sich:

$$P_{OW} = \frac{c_{\text{Oktanol}}}{c_{\text{Wasser}}}$$

Der Verteilungskoeffizient (P) ist somit der Quotient zweier Konzentrationen. Er wird gewöhnlich in Form seines Zehnerlogarithmus ($\log P$) angegeben.

1.3. Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Meßanordnung von Zeit zu Zeit zu kalibrieren und bei Anwendung einer anderen Methode einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

1.4. Prinzip der Methode

Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten müssen nach Einstellung des Gleichgewichts zwischen allen wechselwirkenden Komponenten des Verteilungssystems die Konzentrationen der in beiden Phasen gelösten Substanz ermittelt werden.

Die einschlägige Literatur zeigt, daß die Lösung dieses Problems mit verschiedenen Techniken möglich ist, wie z. B. der gründlichen Mischung der beiden Phasen, mit anschließender Phasentrennung zur Bestimmung der Gleichgewichtskonzentration der untersuchten Substanz.

1.5. Qualitätskriterien

1.5.1. Wiederholbarkeit

Um die Genauigkeit der Verteilungskoeffizienten zu gewährleisten, sind Doppelbestimmungen bei drei verschiedenen Prüfbedingungen durchzuführen. Dazu können sowohl die eingesetzte Menge der untersuchten Substanz als auch das Verhältnis der Lösungsmittelvolumina verändert werden. Die so ermittelten Werte des Verteilungskoeffizienten, ausgedrückt als deren Zehnerlogarithmus, sollen in einem Bereich von $\pm 0,3$ log-Einheiten liegen.

1.5.2. Empfindlichkeit

Der Meßbereich der Methode wird durch die Bestimmungsgrenze des Analysenverfahrens festgelegt. Diese sollte ausreichend sein, um die Bestimmung von P_{OW} -Werten bis 10^5 zu ermöglichen, wenn die Konzentration der gelösten Substanz in keiner Phase größer ist als 0,01 Mol/l.

1.5.3. Anwendbarkeit

Das Nernst'sche Verteilungsgesetz gilt nur für verdünnte Lösungen bei konstanter Temperatur, Druck und pH-Wert. Es gilt streng nur für eine reine Substanz, die zwischen zwei reinen Lösungsmitteln verteilt ist. Wenn mehrere gelöste Stoffe in einer oder beiden Phasen gleichzeitig vorkommen, kann dadurch das Ergebnis beeinflusst werden.

Dissoziation oder Assoziation gelöster Moleküle führen zu Abweichungen vom Nernst'schen Verteilungsgesetz. Solche Abweichungen zeigen sich darin, daß der Verteilungskoeffizient von der Konzentration der Lösung abhängig wird.

Wegen der auftretenden multiplen Verteilungsgleichgewichte sollte diese Methode für ionische Verbindungen nicht ohne entsprechende Korrekturen angewendet werden. (Die Benutzung von Pufferlösungen anstelle von Wasser sollte für derartige Verbindungen erwogen werden.)

1.6. Beschreibung der Methode

1.6.1. Schätzung der Verteilungskoeffizienten

Der Wert des Verteilungskoeffizienten kann entweder durch eine einfache Berechnung (2) oder aus den Sättigungslöslichkeiten der Prüfsubstanz in den reinen Lösungsmitteln (1) abgeschätzt werden.

Hierbei ist

$$P_{\text{Schätzung}} = \frac{\text{Sättigung } c_{n\text{-Oktanol}}}{\text{Sättigung } c_{\text{Wasser}}}$$

Alternativ kann der Wert auch in einer vereinfachten Vorprüfung grob bestimmt werden.

1.6.2. Vorbereitung

n-Oktanol: Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten soll mit sehr reinem Reagens durchgeführt werden.

Wasser: Es soll destilliertes bzw. doppelt destilliertes Wasser aus Glas- oder Quarzgefäßen verwendet werden.

Anmerkung:

Direkt aus einem Ionenaustauscher entnommenes Wasser soll nicht benutzt werden.

1.6.2.1. Vorsättigung der Lösungsmittel

Vor der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten werden die Phasen des Lösungsmittelsystems durch Schütteln bei Prüftemperatur gegenseitig gesättigt. Dazu ist es praktisch, zwei große Vorratsflaschen gefüllt mit sehr reinem *n*-Oktanol bzw. Wasser mit jeweils einer ausreichenden Menge des anderen Lösungsmittels zu versetzen, mit einem mechanischen Schüttelapparat 24 Stunden zu schütteln und dann so lange stehen zu lassen, bis sich die Phasen getrennt haben und der Sättigungszustand erreicht ist.

1.6.2.2. Vorbereitung der Prüfung

Das Gesamtvolumen des Zweiphasensystems soll das Prüfgefäß nahezu ausfüllen. Dadurch können Materialverluste aufgrund von Verdampfung verhindert werden. Das Volumenverhältnis und die einzusetzenden Mengen der Substanz werden durch die folgenden Angaben festgelegt:

- den Schätzwert des Verteilungskoeffizienten (siehe oben),
- die für das Analysenverfahren erforderliche Mindestmenge an Prüfsubstanz und
- die Begrenzung der Konzentration in jeder Phase auf maximal 0,01 Mol/l.

Es sind drei Prüfungen durchzuführen. Bei der ersten wird das berechnete Volumenverhältnis eingesetzt, bei der zweiten das doppelte Volumen an *n*-Oktanol und bei der dritten die Hälfte des Volumens an *n*-Oktanol.

1.6.2.3. Prüfsubstanz

Zur Erstellung einer Massenbilanz über die Prüfung wird eine Vorratslösung in n-Oktanol mit einer Massenkonzentration zwischen 1 und 100 mg/ml hergestellt. Die tatsächlich vorliegende Massenkonzentration dieser Vorratslösung soll vor ihrem Gebrauch zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten exakt bestimmt werden. Diese Lösung soll so gelagert werden, daß ihre Stabilität gewährleistet ist.

1.6.3. Prüfbedingungen

Die Prüftemperatur sollte zwischen 20 und 25 °C liegen und konstant (± 1 °C) gehalten werden.

1.6.4. Meßverfahren

1.6.4.1. Einstellung des Verteilungsgleichgewichts

Für jede der Prüfbedingungen sollen zwei Prüfgefäße vorbereitet werden, die jeweils die erforderlichen genau abgemessenen Mengen der beiden Lösungsmittel sowie die erforderliche Menge an Vorratslösung enthalten.

Die Oktanol-Anteile sollten volumetrisch abgemessen werden. Die Prüfgefäße sollten entweder mit einem geeigneten Schüttelapparat oder von Hand geschüttelt werden. Ein empfohlenes Verfahren besteht darin, das Zentrifugenglas rasch um 180° um seine Querachse zu drehen, so daß eventuelle eingeschlossene Luft durch beide Phasen aufsteigt.

1.6.4.2. Phasentrennung

Zur Trennung der Phasen sollte die Mischung in einer Laborzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Wenn eine Zentrifuge ohne Thermostat benutzt wird, sollten die Zentrifugengläser von der Analyse mindestens eine Stunde bei Prüftemperatur aufbewahrt werden, damit sich das Gleichgewicht wieder einstellt.

1.6.5. Analyse

Zur Ermittlung des Verteilungskoeffizienten müssen die Konzentrationen der Testsubstanz in beiden Phasen analysiert werden. Dies kann dadurch geschehen, daß von jeder der beiden Phasen aus jedem Glas und für jede Prüfbedingung ein aliquoter Teil entnommen und mit gewählten Verfahren analysiert wird. Die in den beiden Phasen vorhandene Gesamtmenge der Substanz soll berechnet und mit der eingesetzten Menge verglichen werden. Die Probenahme aus der wäßrigen Phase sollte so erfolgen, daß die Gefahr des Einschlusses von Spuren an n-Oktanol möglichst weitgehend vermindert wird: z. B. kann eine Glasspritze mit auswechselbarer Nadel zur Probenahme verwendet werden. Zuerst sollte die Spritze teilweise mit Luft gefüllt werden.

Diese Luft sollte vorsichtig herausgedrückt werden, während die Nadel durch die Oktanolschicht hindurchgeführt wird. Ein ausreichendes Volumen an wäßriger Phase wird in die Spritze gezogen. Die Spritze wird schnell aus der Lösung entfernt und die Nadel abgenommen. Der Inhalt der Spritze kann dann als wäßrige Probe weiterverwendet werden. Die Konzentration in den beiden voneinander getrennten Phasen sollte am besten mit einem substanzspezifischen Verfahren ermittelt werden. Beispiele für möglicherweise geeignete physikalisch-chemische Bestimmungsverfahren sind:

- photometrische Verfahren,
- Gaschromatographie,
- Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie.

2. DATEN

Ist der gemessene P_{OW} größer als 10^4 , wird empfohlen, die Ergebnisse mit einem berechneten P_{OW} -Wert zu vergleichen, der z. B. nach der in der Literatur (3) angegebenen Methode ermittelt wurde.

Die Zuverlässigkeit der ermittelten P-Werte kann durch Vergleich der Mittelwerte der Doppelbestimmungen mit dem Gesamtmittelwert geprüft werden.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Bericht enthält folgende Informationen:

- genaue Beschreibung der Substanz (Identität und Verunreinigungen),
- Prüftemperatur,
- Angaben über die zur Konzentrationsbestimmung verwendeten Analyseverfahren,
- die in beiden Phasen bei der Bestimmung gemessenen Konzentrationen (d. h., daß insgesamt 12 Konzentrationen angegeben werden sollten),
- die Einwaage an Prüfsubstanz, das Volumen jeder Phase in jedem Prüfgefäß und die berechnete Gesamtmenge an Prüfsubstanz, die in jeder Phase nach Erreichen des Gleichgewichts enthalten ist,
- die berechneten Werte des Verteilungskoeffizienten (P) für jede Prüfung, der Mittelwert für jede Prüfbedingung und der Mittelwert aus allen Prüfungen sind anzugeben. Hinweise für eine Konzentrationsabhängigkeit des Verteilungskoeffizienten sollten im Bericht vermerkt werden,
- die Standardabweichung der einzelnen P-Werte vom Mittelwert sollte angegeben werden,
- der Mittelwert aus allen Prüfungen sollte auch als Zehnerlogarithmus angegeben werden,
- der mit einem Berechnungsverfahren ermittelte theoretische P_{OW} -Wert sollte angegeben werden, wenn er bestimmt wurde oder wenn der Meßwert $> 10^4$ ist,
- der pH-Wert des verwendeten Wassers und der wäßrigen Phase während des Experiments,
- alle für die Auswertung der Ergebnisse wichtigen Informationen und Bemerkungen.

4. LITERATUR

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

A. 9. FLAMMPUNKT**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Es ist zweckdienlich, Vorinformationen über die Entzündlichkeit der Prüfsubstanz zu haben, um diesen Versuch durchzuführen. Das Prüfverfahren ist auf flüssige handelsübliche Substanzen anwendbar, deren Dämpfe durch Zündquellen entflammt werden können. Die in diesem Text beschriebenen Prüfverfahren sind nur für diejenigen Flamm punktbereiche zuverlässig, die bei den jeweiligen Verfahren angegeben werden.

1.2. Definitionen und Einheiten

Der Flammpunkt ist die niedrigste Temperatur, bezogen auf einen Druck von 101,325 kPa, bei der sich in einem geschlossenen Tiegel aus der zu prüfenden Flüssigkeit unter den in der Prüfmethode festgelegten Bedingungen Dämpfe in einer solchen Menge entwickeln, daß sich im Tiegel ein durch Fremdzündung entflammbares Dampf/Luft-Gemisch bildet.

Einheiten: °C

$$t = T - 273,15$$

(t in °C und T in K)

1.3. Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen brauchen nicht in allen Fällen verwendet zu werden, in denen eine neue Substanz untersucht wird. Sie sollten hauptsächlich dazu dienen, das Prüfgerät von Zeit zu Zeit zu kalibrieren und die Möglichkeit bieten, Ergebnisse zu vergleichen, wenn eine andere Methode angewandt worden ist.

1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird in einen Tiegel gefüllt, der allmählich erwärmt wird, bis der Dampf eine ausreichend hohe Konzentration in der Luft erreicht hat und das Gemisch gezündet werden kann.

1.5. Qualitätskriterien**1.5.1. Wiederholbarkeit**

Die Wiederholbarkeit ist je nach Flamm punktbereich und benutzter Prüfmethode unterschiedlich; max. ± 2 °C.

1.5.2. Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit hängt von der benutzten Prüfmethode ab.

1.5.3. Spezifische Anwendbarkeit

Die Spezifität einiger Prüfmethoden ist auf bestimmte Flamm punktbereiche beschränkt und hängt von substanztypischen Eigenschaften ab (z. B. hohe Viskosität).

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitungen**

Eine Probe der zu prüfenden Substanz wird in ein Prüfgerät gemäß 1.6.3.1 und/oder 1.6.3.2 eingefüllt.

1.6.2. Versuchsbedingungen

Das Prüfgerät ist vor Zugluft geschützt aufzustellen.

1.6.3. Versuchsausführung**1.6.3.1. Gleichgewichtsmethode**

Siehe dazu: ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. Nicht-Gleichgewichtsmethode

Zur Bestimmung des Flammpunktes viskoser Flüssigkeiten (Farben, Klebstoffe und ähnliches), die Lösemittel enthalten, dürfen nur solche Prüfgeräte und Prüfmethode verwendet werden, die zur Bestimmung des Flammpunktes viskoser Flüssigkeiten geeignet sind.

Siehe dazu: ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 Teil 1.

Gerät nach Abel:

Siehe dazu: BS 2000 Teil 170, NF M07-011, NF T66-009.

Gerät nach Abel-Pensky:

Siehe dazu: (EN 57), DIN 51755 Teil 1 (für Temperaturen von 5 °C bis 65 °C), DIN 51755 Teil 2 (für Temperaturen unter 5 °C), NF M07-036.

Gerät nach Tag:

Siehe dazu: ASTM D 56, ISO 2719.

Gerät nach Pensky-Martens:

Siehe dazu: ISO 2719, (EN 11), DIN 51758, ASTM 8013, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Bemerkungen:

Wird mit einer Nicht-Gleichgewichtsmethode wie in 1.6.3.2 ein Flammpunkt von $(0 \pm 2) ^\circ\text{C}$, $(21 \pm 2) ^\circ\text{C}$, $(55 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ermittelt, sollte das Prüfergebnis mit dem gleichen Gerät, jedoch unter Benutzung einer Gleichgewichtsmethode, bestätigt werden.

Für eine Anmeldung dürfen nur diejenigen Methoden benutzt werden, bei denen der Zahlenwert des Flammpunktes bestimmt wird.

2. DATEN**3. ABSCHLUSSBERICHT**

Der Prüfbericht enthält:

- genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identifikation und Verunreinigungen),
- die angewandte Prüfmethode sowie mögliche Abweichungen davon sollen angegeben werden,
- die Ergebnisse sowie alle Informationen und Bemerkungen, die für die Interpretation der Versuchsergebnisse von Bedeutung sind, sollen angegeben werden.

4. LITERATUR

Keine.

A. 10. ENTZÜNDLICHKEIT — FESTE STOFFE

1. METHODE

1.1. Einleitung

Es ist zweckdienlich, vor der Ausführung der Prüfung, Informationen über mögliche explosive Eigenschaften der Prüfsubstanz einzuholen.

Diese Methode kann nur bei pulverförmigen, körnigen und pastenförmigen Substanzen angewendet werden.

Um nicht alle Stoffe zu erfassen, die entzündet werden können, sondern nur solche, die schnell brennen oder deren Brennverhalten besonders gefährlich ist, sollen nur diejenigen Stoffe als leicht entzündlich eingestuft werden, deren Abbrandgeschwindigkeit einen bestimmten Grenzwert überschreitet. Darüber hinaus sollen alle Metallpulver als leicht entzündlich beurteilt werden, die entzündet werden können und über die gesamte Länge der Schüttung durchglühen. Glühende Metallpulver sind nämlich besonders gefährlich, weil sie schwer zu löschen sind; übliche Löschmittel wie Kohlendioxid oder Wasser können die Gefahren beträchtlich vergrößern.

1.2. Definitionen und Einheiten

Die Abbrandzeit wird in Sekunden ausgedrückt.

1.3. Referenzsubstanzen

Nicht spezifiziert.

1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird in ihrer handelsüblichen Form zu einer Schüttung von 250 mm Länge geformt. Dann wird versucht, die Schüttung gemäß den Bedingungen unter Nr. 1.6.3 zu entzünden; die Abbrandzeit wird gemessen.

1.5. Qualitätskriterien

1.6. Beschreibung der Methode

1.6.1. Vorbereitung

Pulverförmige und körnige Prüfsubstanzen werden in ihrer handelsüblichen Form locker in die Form gefüllt. Die Form aus Metall hat eine Länge von 250 mm und einen dreieckigen Querschnitt mit einer inneren Höhe von 10 mm und einer inneren Breite von 20 mm. Die Form wird an beiden Längsseiten von zwei Metallblechen begrenzt, die die dreieckige Form um 2 mm überragen (siehe Abbildung). Die gefüllte Form wird dreimal aus einer Höhe von 2 cm auf eine feste Unterlage fallen gelassen. Falls nötig, wird die Form danach aufgefüllt. Dann werden die seitlichen Begrenzungen entfernt und die überschüssige Substanzmenge wird abgetrennt. Schließlich wird eine nicht brennbare und nicht poröse Platte auf die freie Oberfläche der Schüttung gelegt, das Ganze um 180° gedreht und die Form entfernt.

Pastenförmige Substanzen werden in Form eines Stranges von 250 mm Länge und einem Querschnitt von etwa 1 cm² auf eine nicht brennbare Platte aufgebracht.

Um die Schüttung an einem Ende zu entzünden, kann jede geeignete Zündquelle, wie z. B. eine Gassparflamme oder ein heißer Draht mit einer Mindesttemperatur von 1 000 °C, verwendet werden.

1.6.2. *Versuchsbedingungen*

Hygroskopische Prüfsubstanzen sollen so schnell wie möglich nach der Entnahme aus dem Behälter geprüft werden.

1.6.3. *Versuchsausführung*

Ein Ende der Schüttung soll entzündet werden. Nach einem Abbrand über eine Länge von 80 mm soll die Abbrandzeit über die folgenden 100 mm gemessen werden. Der Versuch soll sechsmal ausgeführt werden, wobei jedesmal eine saubere, kalte Platte verwendet werden soll.

2. **DATEN**

Die Abbrandzeiten von sechs Versuchen sind maßgebend für die Beurteilung.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. **Prüfbericht**

Der Prüfbericht enthält:

- genaue Angaben über die Prüfsubstanzen (Identifikation und Verunreinigungen),
- Beschreibung der Prüfsubstanzen, physikalischer Zustand, Feuchtigkeitsgehalt,
- Meßergebnisse,
- alle zusätzlichen Bemerkungen, die für die Auswertung der Ergebnisse von Bedeutung sind.

3.2. **Interpretation**

Pulver, körnige oder pastenförmige Prüfsubstanzen werden als leicht entzündlich beurteilt, wenn die Abbrandzeit bei einem von 6 Versuchen, die nach der unter Nr. 1.6 beschriebenen Methode durchgeführt werden, kleiner ist als 45 s. Pulver von Metallen oder Metallegierungen werden als leicht entzündlich beurteilt, wenn sie entzündet werden können und die Flamme oder die Reaktionszone sich über die gesamte Probe ausbreitet.

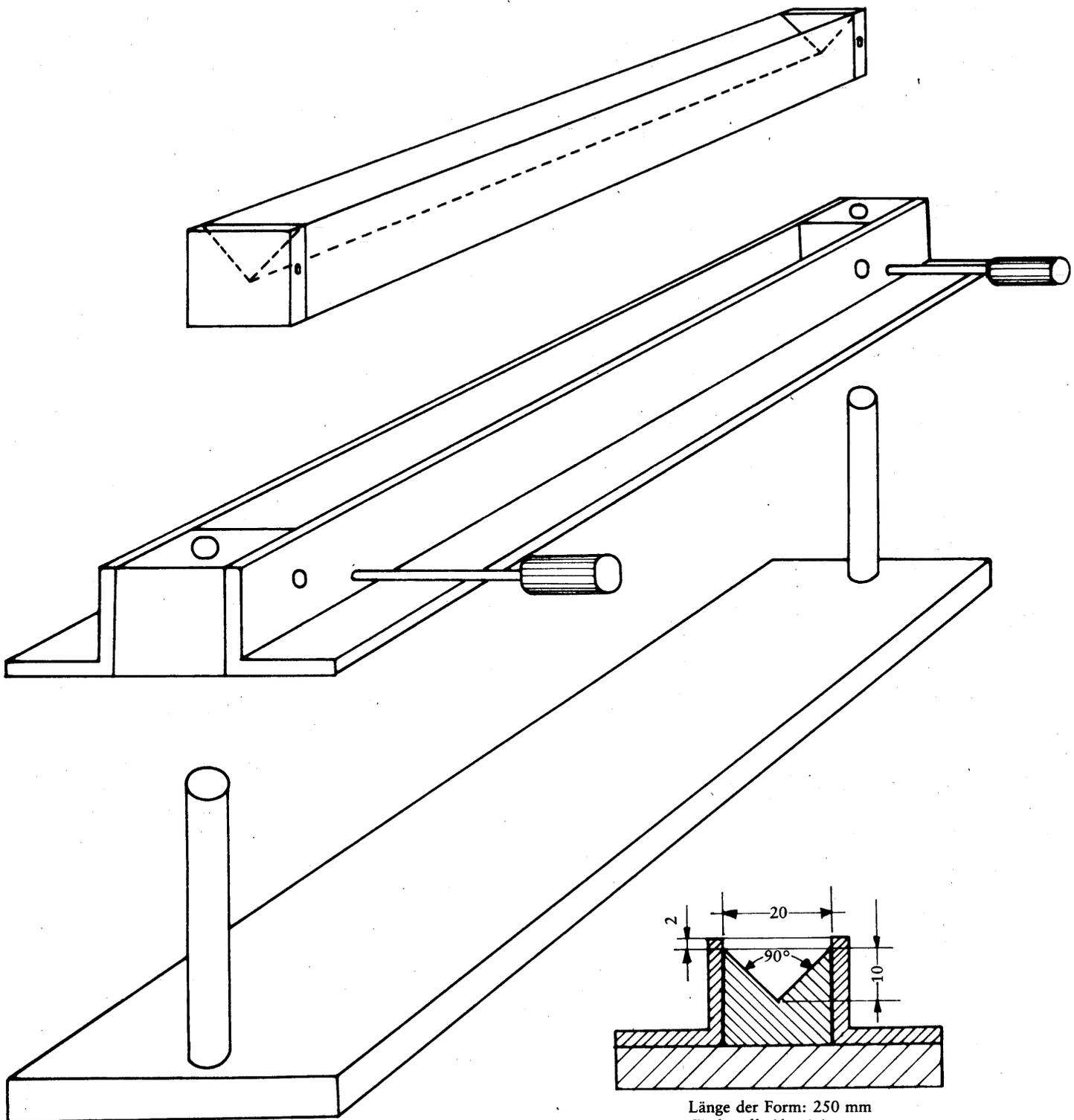
4. **LITERATUR**

Keine.

Anlage

Abbildung

Form und Zubehör zur Herstellung der Schüttung
(alle Maßangaben in mm)



Länge der Form: 250 mm
Werkstoff: Aluminium

A. 11. ENTZÜNDLICHKEIT — GASE

1. METHODE

1.1. Einleitung

Mit dieser Methode läßt sich bestimmen, ob Gase im Gemisch mit Luft bei atmosphärischem Druck und Raumtemperatur einen Explosionsbereich aufweisen. Gemische mit steigender Konzentration des zu prüfenden Gases mit Luft werden einem elektrischen Funken ausgesetzt und man beobachtet, ob eine Entzündung erfolgt.

1.2. Definition

Der Explosionsbereich ist der Konzentrationsbereich zwischen der unteren und oberen Explosionsgrenze. Die untere und obere Explosionsgrenze bezeichnen die beiden Grenzwerte des Brenngasgehaltes im Brenngas/Luft-Gemisch, bei denen eine selbständige Flammenausbreitung von der Zündquelle her gerade nicht mehr auftritt.

1.3. Referenzsubstanzen

Nicht spezifiziert.

1.4. Prinzip der Methode

Der Gasanteil im Gas/Luft-Gemisch wird stufenweise erhöht und das Gemisch jeweils einem elektrischen Funken ausgesetzt.

1.5. Qualitätskriterien

Nicht spezifiziert.

1.6. Beschreibung der Methode

1.6.1. Gerät

Das Versuchsgefäß ist ein aufrecht stehender Glaszylinder mit einem inneren Durchmesser von mindestens 50 mm und einer Mindesthöhe von 300 mm. Die Zündelektroden befinden sich 60 mm über dem Boden des Zylinders und haben einen Abstand von 3 mm bis 5 mm voneinander. Der Zylinder ist mit einer Druckentlastungsöffnung versehen. Das Gerät ist überdies mit einem Schutzschirm versehen, um eventuelle Explosionsschäden zu verhindern.

Ein Induktionsfunken von 0,5 s Dauer, der mittels eines Hochspannungstransformators mit von 10 bis 15 kV Sekundärspannung (maximale Leistungsaufnahme 300 W) erzeugt wird, dient als Zündquelle.

1.6.2. Versuchsbedingungen

Der Versuch muß bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

1.6.3. Versuchsausführung

Mit Hilfe einer volumetrisch arbeitenden Dosierpumpe wird ein Gas/Luft-Gemisch hergestellt und so lange von unten nach oben durch das Versuchsgefäß geleitet, bis das vorher darin befindliche Gas verdrängt worden ist. Danach wird im ruhenden Gemisch mit dem Induktionsfunken gezündet und beobachtet, ob sich eine Flamme von der Zündquelle ablöst und selbständig ausbreitet. Der Gasanteil wird beginnend bei 1 % (Volumenanteil) stufenweise um 1 % erhöht, bis eine wie oben beschriebene Entzündung erfolgt.

2. DATEN

Das Auftreten der Flammenablösung ist die einzig relevante Information zur Bestimmung dieser Eigenschaft.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht enthält:

- genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identifikation und Verunreinigungen),
- eine Beschreibung mit Abmessungen des benutzten Geräts,
- die Raumtemperatur, bei der der Versuch durchgeführt wurde,
- die geprüften Konzentrationen und die erhaltenen Ergebnisse,
- die Versuchsergebnisse — nicht entzündliches oder leicht entzündliches Gas,
- erweist sich ein Gas als „nicht entzündlich“, soll dargelegt werden, daß alle Konzentrationen durch Erhöhung der Konzentration um jeweils 1 % von 0 auf 100 % geprüft wurden,
- alle Informationen und Bemerkungen, die zur Auswertung der Ergebnisse von Bedeutung sind, müssen im Bericht erwähnt werden.

4. LITERATUR

Keine.

A. 12. ENTZÜNDLICHKEIT — STOFFE UND ZUBEREITUNGEN, DIE BEI BERÜHRUNG MIT WASSER ODER MIT FEUCHTER LUFT LEICHTENTZÜNDLICHE GASE IN GEFÄHRLICHER MENGE ENTWICKELN

1. METHODE

1.1. Einleitung

Diese Prüfmethode kann angewandt werden, um festzustellen, ob die Reaktion eines Stoffes mit Wasser zur Entwicklung gefährlicher Mengen von leichtentzündlichen oder giftigen Gasen führt.

Das Verfahren kann sowohl für feste als auch für flüssige Stoffe angewandt werden. Dieses Verfahren gilt jedoch nicht für Stoffe, die sich bei Berührung mit Luft selbst entzünden.

1.2. Definitionen

„Leichtentzündlich“: Stoffe und Zubereitungen, die bei Berührung mit Wasser oder mit feuchter Luft leichtentzündliche Gase in gefährlicher Menge (mindestens 1 l/kg·h) entwickeln. Diese Grenze berücksichtigt nicht die Giftigkeit eines Gases.

1.3. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird in der nachstehend beschriebenen Stufenfolge geprüft; erfolgt auf irgendeiner Stufe eine Entzündung, so ist keine weitere Prüfung mehr notwendig.

1.3.1. Stufe 1

Die Prüfsubstanz wird in eine Schale gegeben, die destilliertes Wasser mit einer Temperatur von 20 °C enthält; es wird festgestellt, ob sich das hierbei entwickelte Gas entzündet.

1.3.2. Stufe 2

Die Prüfsubstanz wird auf ein Filterpapier gegeben, das auf der Oberfläche des Wassers einer mit destilliertem Wasser von 20 °C gefüllten Schale schwimmt; es wird festgestellt, ob sich das entwickelte Gas entzündet. Das Filterpapier dient nur dazu, die Substanz an der betreffenden Stelle zu halten, wodurch die Möglichkeit einer Entzündung erhöht wird.

1.3.3. Stufe 3

Mit der Prüfsubstanz wird eine kleine Schüttung von etwa 2 cm Höhe und 3 cm Durchmesser hergestellt. Es werden einige Tropfen Wasser auf diese Schüttung gegeben und es wird festgestellt, ob sich das entwickelte Gas entzündet.

1.3.4. Stufe 4

Die Prüfsubstanz wird mit destilliertem Wasser (20 °C) versetzt und die entwickelte Gasmenge wird über eine Zeit von 7 Stunden in Abständen von je 1 Stunde gemessen. Ist die Gasentwicklung ungleichmäßig oder nimmt sie nach 7 Stunden noch zu, so ist die Meßdauer zu verlängern bis zu einer Höchstdauer von 5 Tagen. Die Prüfung kann abgebrochen werden, wenn die Menge zu irgendeinem Zeitpunkt 1 l/kg·h übersteigt.

1.4. Referenzsubstanz

Nicht spezifiziert.

1.5. Qualitätskriterien

Keine Angabe.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Stufe 1****1.6.1.1. Versuchsbedingungen**

Die Prüfsubstanz wird in ihrer handelsüblichen Form verwendet; die Prüfung erfolgt bei Raumtemperatur (ca. 20 °C).

1.6.1.2. Versuchsausführung

Eine kleine Menge der Prüfsubstanz (etwa 2 mm Durchmesser) wird in eine Schale mit destilliertem Wasser gegeben. Man schreibt auf, (i) ob sich Gas entwickelt und (ii) ob sich das Gas entzündet. Entzündet es sich, so braucht die Substanz nicht weiter geprüft zu werden, da sie als gefährlich zu betrachten ist.

1.6.2. Stufe 2**1.6.2.1. Gerät**

Ein Filterpapier wird flach auf die Oberfläche des Wassers eines mit destilliertem Wasser gefüllten geeigneten Gefäßes gelegt, z. B. einer Abdampfschale mit ca. 100 mm Durchmesser.

1.6.2.2. Versuchsbedingungen

Die Prüfsubstanz wird in ihrer handelsüblichen Form verwendet; der Versuch wird bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) durchgeführt.

1.6.2.3. Versuchsausführung

Eine kleine Menge des zu prüfenden Stoffes (etwa 2 mm Durchmesser) wird mitten auf das Filterpapier gelegt. Man schreibt auf, (i) ob sich Gas entwickelt und (ii) ob sich das Gas entzündet. Entzündet es sich, so braucht der Stoff nicht weiter geprüft zu werden, da er als gefährlich zu betrachten ist.

1.6.3. Stufe 3**1.6.3.1. Versuchsbedingungen**

Die Prüfsubstanz wird in ihrer im Handel erhältlichen Form verwendet; der Versuch wird bei Raumtemperatur durchgeführt.

1.6.3.2. Versuchsausführung

Mit der Prüfsubstanz wird eine kleine Schüttung von etwa 2 cm Höhe und 3 cm Durchmesser mit einer Vertiefung an der Spitze hergestellt. Man gießt einige Tropfen Wasser in die Vertiefung und schreibt auf, (i) ob sich Gas entwickelt und (ii) ob sich das Gas entzündet. Entzündet es sich, so braucht die Substanz nicht weiter geprüft zu werden, da sie als gefährlich zu betrachten ist.

1.6.4. Stufe 4**1.6.4.1. Apparat**

Die Apparatur wird gemäß der Abbildung (siehe Anlage) aufgebaut.

1.6.4.2. Versuchsbedingungen

Man stellt fest, ob sich in dem Behälter mit der Prüfsubstanz Pulver mit einer Korngröße von $< 500 \mu\text{m}$ befindet. Macht dieses Pulver mehr als insgesamt 1 % (Massenanteil) aus oder ist die Probe zerreibbar, so ist die gesamte Probe vor dem Versuch zu einem Pulver zu mahlen, um eine Verminderung der Größe der Teilchen (durch Abrieb) bei Lagerung und Handhabung zu berücksichtigen; andernfalls ist die Prüfsubstanz in der handelsüblichen Form zu verwenden.

Der Versuch ist bei Raumtemperatur (20°C) und Atmosphärendruck durchzuführen.

1.6.4.3. Versuchsausführung

Es wird Wasser in den Tropftrichter der Apparatur gegeben und genügend Prüfsubstanz (höchstens 25 g) in den Erlenmeyer-Kolben eingewogen, um 100 cm^3 bis 250 cm^3 Gas zu erzeugen. Die entwickelte Gasmenge kann mit einem beliebigen geeigneten Verfahren gemessen werden. Der Hahn des Tropftrichters wird geöffnet, um das Wasser in den Kolben zu geben; gleichzeitig wird eine Stoppuhr in Gang gesetzt. Man notiert die Zeit für die Entwicklung der gesamten Gasmenge; wenn möglich sind auch Zwischenwerte aufzuzeichnen. Der Versuch ist dreimal durchzuführen.

Ist die chemische Zusammensetzung des Gases nicht bekannt, so muß es analysiert werden. Enthält es leichtentzündliche Komponenten und ist nicht bekannt, ob das ganze Gemisch leichtentzündlich ist, so ist ein Gemisch mit gleicher Zusammensetzung herzustellen und nach dem entsprechenden Verfahren (A. 11) zu prüfen.

2. DATEN

Eine Entzündung oder die Entwicklung von leichtentzündlichem Gas in einer Menge von mehr als $1 \text{ l/kg}\cdot\text{h}$ in drei Versuchen genügt, um die geprüfte Substanz als gefährlich einzustufen. (1.6.1), (1.6.2) und (1.6.3).

3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht enthält:

- genaue Angaben und Beschreibung der Prüfsubstanz (z. B. Farbe, Teilchengröße, Aggregatzustand),
- Vorbehandlung der Prüfsubstanz,
- Versuchsergebnisse,
- chemische Identität des entwickelten Gases,
- die Geschwindigkeit der Gasentwicklung (1.6.4),
- irgendetwelche zusätzlichen Bemerkungen, die zur Auswertung der Ergebnisse wichtig sind.

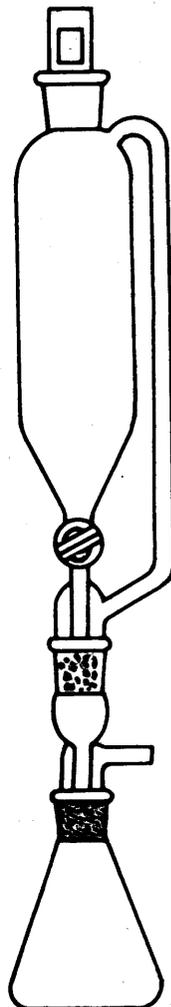
4. LITERATUR

- (1) ISO 1773.
- (2) Vorläufige Prüfrichtlinie der OECD, Paris, zur Bestimmung von Stoffen, die bei Berührung mit Wasser leichtentzündliche Gase in gefährlicher Menge entwickeln. (A 80/28 — Schlußbericht des OECD-Prüfprogramms für Chemikalien).
- (3) U.N. Dok. Nr. ST/SG/AC10/1 Rev. 1.

Anlage

Abbildung

Apparatur



A. 13. ENTZÜNDLICHKEIT — FESTE UND FLÜSSIGE STOFFE**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Es ist zweckdienlich, sich über die Selbstentzündlichkeit eines Stoffes zu informieren. Die Prüfmethode ist anwendbar auf handelsübliche feste und flüssige Stoffe, die sich bei Raumtemperatur in kleinen Mengen nach kurzer Zeit an der Luft selbst entzünden.

Dieses Verfahren gilt nicht für Stoffe, die sich bei Raumtemperatur erst nach Stunden oder Tagen selbst entzünden, oder erheblich höheren Temperaturen ausgesetzt werden müssen, ehe Selbstentzündung eintritt.

1.2. Definitionen

Flüssige und feste Stoffe werden als leichtentzündlich beurteilt, wenn sie sich bei sechs Versuchen unter den in Nr. 1.6. beschriebenen Bedingungen mindestens einmal entzünden.

Die Selbstentzündlichkeit von Flüssigkeiten muß unter Umständen noch nach Verfahren A. 15 geprüft werden. (Selbstentzündlichkeiten: Bestimmung der Zündtemperatur von Flüssigkeiten und Gasen.)

1.3. Referenzsubstanzen

Nicht spezifiziert.

1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird bei einer Temperatur von $(25 \pm 10) ^\circ\text{C}$ 5 Minuten lang mit der Luft in Berührung gebracht. Entzündet sie sich, so wird sie als leichtentzündlich beurteilt.

1.5. Qualitätskriterien

Wiederholbarkeit: Aus sicherheitstechnischen Gründen genügt ein einziges positives Ergebnis bei 6 Versuchen, um die Substanz als leichtentzündlich einzustufen.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Geräte**

Eine Porzellanschale mit einem Durchmesser von ca. 10 cm wird bei Raumtemperatur etwa 5 mm hoch mit Diatomeenerde gefüllt.

Bemerkung:

Diatomeenerde oder irgendein anderer, allgemein verfügbarer ähnlicher inerter Stoff soll repräsentativ für Erde sein, mit der bei einem Unfall ausgelaufene Stoffe in Berührung kommen können.

1.6.2. Versuchsausführung**a) Pulverförmige feste Stoffe**

1 bis 2 cm³ der zu prüfenden pulverförmigen Substanzen werden aus etwa 1 m Höhe auf eine nicht brennbare Unterlage geschüttet, und es wird beobachtet, ob sich die Substanz beim Fallen oder nach Ablagerung innerhalb von 5 Minuten entzündet.

b) Flüssigkeiten

Ca. 5 cm³ der zu prüfenden Flüssigkeit werden in die vorbereitete Porzellanschale gegossen, und es wird beobachtet, ob sich die Prüfsubstanz innerhalb von 5 Minuten entzündet.

2. DATEN

Die Ergebnisse von sechs Versuchen sind maßgebend für die Beurteilung.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht enthält:

- Beschreibung der Prüfsubstanz,
- Versuchsergebnisse.

4. LITERATUR

- (1) Vorläufige Prüfrichtlinie der OECD, Paris, zur Bestimmung des pyrophoren Verhaltens von festen und flüssigen Stoffen, A 80/23 — Schlußbericht des OECD-Prüfprogramms für Chemikalien.

A. 14. EXPLOSIONSGEFAHR

1. METHODE

1.1. Einleitung

Die Methode dient als Prüfschema zur Feststellung, ob feste, flüssige oder pastenförmige Stoffe oder Zubereitungen bei Flammenzündung (thermische Empfindlichkeit) oder bei Einwirkung von Stoß oder Reibung (mechanische Empfindlichkeit) eine Explosionsgefahr darstellen.

Sie besteht aus drei Prüfungen:

- a) Prüfung der thermischen Empfindlichkeit,
- b) Prüfung der mechanischen Empfindlichkeit bei Schlagbeanspruchung,
- c) Prüfung der mechanischen Empfindlichkeit bei Reibbeanspruchung.

Die Methode liefert Ergebnisse mit denen die Wahrscheinlichkeit der Auslösung einer Explosion bei Einwirkung verschiedener üblicher Beanspruchung festgestellt werden kann. Sie dient nicht zur Feststellung, ob ein Stoff oder eine Zubereitung explosionsfähig ist (d. h. ob ein Stoff oder eine Zubereitung überhaupt unter irgendeiner Bedingung in der Lage ist zu explodieren); sie dient auch nicht zur Ermittlung, in welchem Ausmaß eine beginnende Zersetzung auf die gesamte Probe übertragen werden kann, um in dieser eine Explosion auszulösen.

Die Methode dient zur Feststellung, ob ein Stoff oder eine Zubereitung unter den besonderen in der Richtlinie festgelegten Bedingungen eine Explosionsgefahr darstellt (thermische und mechanische Empfindlichkeit).

Die Prüfungen sind überflüssig, sofern thermodynamische Daten für die Stoffe und Zubereitungen (Bildungs-, Zersetzungsenthalpie, reaktive Gruppen (1) in der Strukturformel) bekannt sind, die außer jedem Zweifel erkennen lassen, daß der Stoff oder die Zubereitung sich nicht unter schneller, wärmeliefernder Bildung von Gasen zersetzen kann (d. h. die Substanz keine Explosionsgefahr darstellt). Es ist zu beachten, daß die Methode nicht als endgültig festgelegt betrachtet werden kann. Sie umfaßt eine Reihe ausgewählter spezieller Geräte, die international verbreitet sind und die normalerweise aussagekräftige Ergebnisse liefern.

Die mit der Prüfung befaßte Person kann auch andere Geräte für die drei nachfolgend festgelegten Prüfungen verwenden, vorausgesetzt, daß dies wissenschaftlich begründet werden kann, und daß die eingesetzten Geräte international anerkannt sind. In diesem Fall müssen die mit diesen Geräten erhaltenen Ergebnisse mit den unter Verwendung der in der Richtlinie beschriebenen Geräte erhaltenen Ergebnissen in Beziehung gesetzt werden.

1.2. Definitionen

Als explosionsgefährlich gelten Stoffe und Zubereitungen, die durch Flammenzündung zur Explosion gebracht werden können oder die gegen Stoß oder Reibung empfindlicher sind als Dinitrobenzol $C_6H_4(NO_2)_2$.

1.3. Referenzsubstanz

m-Dinitrobenzol $C_6H_4(NO_2)_2$, kristallin, technisches Produkt für die Prüfung der Schlag- und Reibempfindlichkeit.

1.4. Prinzip der Methode

Um sichere Bedingungen für die Ausführung der drei Empfindlichkeitsprüfungen herauszufinden, ist die Durchführung von Vorversuchen erforderlich.

1.4.1. Vorversuche

Sehr kleine Proben (etwa 10 mg) der Prüfsubstanz werden ohne Einschluß mit einer Bunsenbrennerflamme erhitzt, in einem geeigneten Gerät einem Schlag ausgesetzt und unter Verwendung eines Reibstiftes und eines Widerlagers oder in einer beliebigen Reibmaschine gerieben. Das Ziel der Vorversuche ist festzustellen, ob der Stoff oder die Zubereitung so empfindlich und in ihrer Explosionswirkung so gefährlich ist, daß zur Vermeidung von Verletzungen des Prüfenden, besondere Schutzmaßnahmen bei der Durchführung der Prüfungen vorzusehen sind.

1.4.2. Thermische Empfindlichkeit

Für die Prüfung wird die Prüfsubstanz in Stahlhülsen erhitzt, wobei unterschiedliche Einschlußbedingungen durch Verwendung von Düsenplatten mit Öffnungen verschiedenen Durchmessers erreicht werden. Auf diese Weise wird bestimmt, ob der Stoff oder die Zubereitung bei thermischer Beanspruchung explodieren kann.

1.4.3. Mechanische Empfindlichkeit (Stoß)

Die Prüfung besteht darin, daß die Prüfsubstanz dem Schlag eines Fallgewichtes auf einem Stahlamboß ausgesetzt wird.

1.4.4. Mechanische Empfindlichkeit (Reibung)

Bei dieser Prüfung wird die Prüfsubstanz der Reibung zwischen standardisierten Oberflächen unter festgelegten Bedingungen der Belastung und relativen Bewegung ausgesetzt.

1.5. Qualitätskriterien

Nicht festgelegt.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Apparaturen****1.6.1.1. Thermische Empfindlichkeit**

Die Stahlhülse wird aus Tiefziehblech (siehe Anlage) im Ziehverfahren hergestellt. Sie hat einen inneren Durchmesser von 24 mm, eine Länge von 75 mm und eine Wanddicke von 0,5 mm. Am offenen Ende ist die Hülse mit einem Bund zum Verschließen der Hülse versehen (siehe Abbildung 1). Die Hülse wird durch eine Düsenplatte verschlossen, die mit der aus Gewindering und Mutter bestehenden Verschraubung fest mit der Hülse verbunden wird. Die Düsenplatte (siehe Abbildung 1) ist 6 mm dick und besteht aus warmfestem Chromstahl (siehe Anlage). Zur Ermittlung des Grades der Explosionsgefährlichkeit des Stoffes oder der Zubereitung stehen Düsenplatten mit verschiedenen Öffnungsdurchmessern (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20 ... mm) zur Verfügung. Der Gewindering und die Mutter bestehen aus Chrom-Mangan-Stahl (siehe Anlage), der bei 800 °C zunderfest ist. Für jeden Versuch ist eine neue Stahlhülse zu verwenden.

1.6.1.2. Mechanische Empfindlichkeit (Stoß)

Ein typischer Fallhammer-Apparat besteht im wesentlichen aus einem Block aus Grauguß mit Fuß und Amboß, der Säule, den Führungsschienen und dem Fallgewicht mit Auslösevorrichtung. Der Block 230 mm (Tiefe) × 250 mm (Breite) × 200 mm (Höhe) mit Fuß 450 mm (Tiefe) × 450 mm (Breite) × 60 mm (Höhe) trägt einen aufgeschraubten Stahlamboß von 100 mm Durchmesser und 70 mm Höhe. Auf der Rückseite des Stahlblocks ist die Halterung angeschraubt, in der die Säule aus nahtlos gezogenem Stahlrohr von 90 mm Außendurchmesser und 70 mm Innendurchmesser befestigt ist. Auf einem massiven Betonsockel 60 cm × 60 cm × 60 cm mit vier darin verankerten Steinschrauben ist der Fallhammer satt aufliegend so befestigt, daß die Führungsschienen genau senkrecht stehen und das

Fallgewicht leicht geführt wird. Die Masse des Fallgewichts muß 10 kg betragen. Das Fallgewicht besteht aus kompaktem massivem Stahl. Es muß einen zylindrischen Schlageinsatz aus gehärtetem Stahl HRC 60 bis 63 und einen Mindestdurchmesser von 25 mm haben. Die Versuche müssen bei einer Fallhöhe von 0,4 m ausgeführt werden.

Die zu untersuchende Probe ist in eine Stempelvorrichtung einzuschließen, die aus zwei koaxial übereinanderstehenden Stahlzylindern und einem Hohlzylinder aus Stahl als Führungsring besteht. Die Stahlstempel, Abmessung 10 (-0,003 - 0,005) mm Durchmesser und 10 mm Höhe, müssen polierte Flächen, abgerundete Kanten (Krümmungsradius: 0,5 mm) und eine Härte HRC 58 bis 65 haben. Die Hohlzylinder müssen einen äußeren Durchmesser von 16 mm, eine geschliffene Bohrung von 10 (+0,005 + 0,010) mm und eine Höhe von 13 mm haben.

Tritt beim Versuch eine Explosion ein, so dürfen die Stahlstempel und die Hohlzylinder nicht zu weiteren Versuchen benutzt werden.

Die Stempelvorrichtung ist auf einen Zwischenamboß von 26 mm Durchmesser und 26 mm Höhe aus Stahl zu stellen und durch einen Zentriering mit einem Lochkranz zum Abströmen der Explosionschwaden zu zentrieren.

1.6.1.3. Mechanische Empfindlichkeit (Reibung)

Der Reibapparat besteht aus der Grundplatte (Grauguß), auf der die Reibvorrichtung, bestehend aus feststehendem Porzellanstift und beweglichen Porzellanplättchen, montiert ist. Das Porzellanplättchen ist in einem Schlitten zu befestigen, der in zwei Gleitschienen geführt wird. Der Schlitten ist über eine Schubstange, eine Exzentrzscheibe und ein Getriebe durch einen Elektromotor so anzutreiben, daß das Porzellanplättchen unter dem Porzellanstift eine Hin- und Rückbewegung von 10 mm Länge ausführt.

Der Porzellanstift ist mit etwa 360 N zu belasten.

Die Porzellanplättchen werden aus rein weißem technischem Porzellan gefertigt und haben die Abmessungen 25 mm (Länge) × 25 mm (Breite) × 5 mm (Höhe). Beide Reibflächen der Plättchen müssen vor dem Brennen durch Streichen mit einem Schwamm aufgeraut sein (Rauhtiefe 9 µm bis 32 µm).

Der zylindrische Porzellanstift ist ebenfalls aus rein weißem technischem Porzellan gefertigt. Er ist 15 mm lang, hat einen Durchmesser von 10 mm und eine raue kugelige Endfläche mit einem Krümmungsradius von 10 mm.

1.6.2. Versuchsbedingungen

1.6.2.1. Thermische Empfindlichkeit

Die Substanz wird im Auslieferungszustand bis zu 60 mm hoch in drei etwa gleich großen Portionen in die Hülse eingefüllt. Jede Portion wird unter Anwendung einer Kraft von 80 N mittels eines Holzstabes, dessen Durchmesser etwas kleiner als der Innendurchmesser der Hülse ist, angedrückt. Im Fall der Prüfung gelatinöser Substanzen ist dafür Sorge zu tragen, daß während des Füllens der Hülse keine Luftblasen (Lunker) mit eingebracht werden.

1.6.2.2. Mechanische Empfindlichkeit (Stoß)

Die Substanz ist im trockenen Zustand zu prüfen. Die Probe muß ein Volumen von 40 mm³ oder ein der verwendeten Apparatur angepaßtes Volumen haben. Für die festen — ausgenommen pastenförmige — Substanzen gilt folgendes:

- a) Pulverförmige Substanzen sind zu sieben (Maschenweite 0,5 mm); der gesamte Siebdurchgang ist zur Prüfung zu verwenden;
- b) Gepreßte, gegossene oder anderweitig verdichtete Substanzen sind zu zerkleinern und zu sieben; zur Prüfung ist die Siebfraction 0,5 bis 1,0 mm Durchmesser zu verwenden.

Bei flüssigen Substanzen ist der obere Stahlstempel bis zu einem Abstand von 1 mm vom unteren Stempel hineinzudrücken und in dieser Lage zu halten.

1.6.2.3. Mechanische Empfindlichkeit (Reibung)

Die Substanz ist im trockenen Zustand zu prüfen. Die Probe muß ein Volumen von 10 mm³ haben. Für feste Substanzen, ausgenommen pastenförmige Substanzen, gilt folgendes:

- a) Pulverförmige Substanzen sind zu sieben (Maschenweite 0,5 mm); der gesamte Siebdurchgang ist zur Prüfung zu verwenden;
- b) Gepreßte, gegossene oder anderweitig verdichtete Substanzen sind zu zerkleinern und zu sieben; die Siebfraction < 0,5 mm ist für die Prüfung zu verwenden.

1.6.3. Versuchsausführung

1.6.3.1. Thermische Empfindlichkeit

Zum Erhitzen der Hülsen wird Propan verwendet, das einer handelsüblichen Stahlflasche mit Druckminderer (500 mbar) entnommen wird. Der über einen Strömungsmesser und einen Verteiler den vier Brennern zugeführte Heizgasstrom ist so einzustellen, daß den vier Brennern insgesamt 3,2 Liter Propan je Minute zugeführt werden.

Sollen anstelle von Propan andere Heizgase verwendet werden, sind die Brenner, der Gasverbrauch und die Luftzufuhr so zu wählen, daß bei Vergleichsmessungen unter Verwendung von Inertstoffen als Füllgut der Hülsen (Sand, Dibutylphthalat) gleiche Kurven für den zeitlichen Temperaturverlauf in den Hülsen gemessen werden, wie sie bei der Verwendung von Propan erhalten werden.

Die Brenner sind entsprechend Abbildung 2 um den Schutzkasten herum anzuordnen.

Die Brenner sind so einzustellen, daß die Spitzen der inneren blauen Kegel der Flammen gerade die Hülse berühren. Der Versuch ist in einem Schutzkasten, dessen Abmessungen in Abbildung 2 angegeben sind, durchzuführen.

Die Abmessungen der Propangasbrenner sind in den Abbildungen 3 a) und 3 b) dargestellt.

Es müssen zwei Serien von je drei Einzelversuchen ausgeführt werden, wobei für die erste Serie Düsenplatten verwendet werden, deren Düsen einen Durchmesser von 2 mm aufweisen; für die zweite Serie werden Düsenplatten verwendet, die Düsen mit einem Durchmesser > 2 mm (z. B. 6 mm) aufweisen.

Tritt während der ersten Serie (Düsendurchmesser 2 mm) eine Explosion ein, kann auf die Durchführung der zweiten Versuchsserie verzichtet werden. Tritt während eines Versuchs innerhalb von 5 Minuten keine Explosion ein, wird der Versuch abgebrochen.

1.6.3.2. Mechanische Empfindlichkeit (Stoß)

Mit dem beschriebenen Fallhammer-Apparat werden sechs Einzelversuche unter Verwendung eines Fallgewichts von 10 kg und Anwendung einer Fallhöhe von 0,4 m ausgeführt. Bei Verwendung einer anderen Apparatur wird die Probe mit m-Dinitrobenzol C₆H₄(NO₂)₂ unter Benutzung anerkannter Auswertemethoden (z. B. up and down technique) verglichen.

1.6.3.3. Mechanische Empfindlichkeit (Reibung)

Der Porzellanstift ist auf die zu untersuchende Probe zu setzen und zu belasten. Bei Durchführung des Versuchs müssen der Schwammstrich quer zur Bewegungsrichtung des Porzellanplättchens liegen und der Stift auf der Probe stehen und so viel Prüfsubstanz vor dem Stift liegen, daß bei der Plättchenbewegung genügend Prüfsubstanz unter den Stift gelangt. Das Porzellanplättchen ist unter dem Porzellanstift in einer Zeit von 0,44 s je 10 mm hin- und herzubewegen. Jeder Oberflächenbezirk des Plättchens darf nur einmal für einen Versuch verwendet werden.

2. DATEN

2.1. Behandlung der Ergebnisse

Die Prüfung kann, sobald ein positives Ergebnis in einem Einzelversuch erhalten wird, abgebrochen werden.

2.2. Auswertung

Grundsätzlich gilt ein Stoff oder eine Zubereitung im Sinne dieser Richtlinie als explosionsgefährlich,

- a) wenn sie innerhalb der festgelegten Anzahl von Einzelversuchen zur Prüfung der thermischen Empfindlichkeit zur Explosion kommen (d. h. die Hülse in drei oder mehr Splitter zerlegt wird);
oder
- b) wenn bei sechs Einzelversuchen mit dem beschriebenen Fallhammer-Apparat mindestens einmal eine Explosion auftritt (eine Entzündung steht einer Explosion gleich) oder wenn bei Verwendung einer anderen Apparatur die Probe empfindlicher ist als m-Dinitrobenzol $C_6H_4(NO_2)_2$;
oder
- c) wenn bei sechs Einzelversuchen mit dem beschriebenen Reibapparat mindestens einmal eine Explosion auftritt (eine Entflammung, ein Knistern steht einer Explosion gleich) oder wenn bei Anwendung einer anderen Prüfmethode die Probe empfindlicher ist als m-Dinitrobenzol $C_6H_4(NO_2)_2$.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält:

- die Bezeichnung, die Zusammensetzung, die Reinheit, den Feuchtigkeitsgehalt usw. der Prüfsubstanz,
- die physikalische Form der Probe und die Angabe, ob die Probe gesiebt worden ist,
- die Beobachtungen während der Prüfungen (Art der Reaktion, Funken- oder Flammenbildung, Explosion, Zahl der Splitter usw.),
- die Ergebnisse jedes Einzelversuchs,
- die wissenschaftliche Begründung für die Verwendung anderer Prüfverfahren und -geräte als in der Richtlinie beschrieben, sowie die Beweisführung für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse,
- alle nützlichen Hinweise auf Versuche mit ähnlichen Substanzen, die für die richtige Auslegung der erhaltenen Versuchsergebnisse von Bedeutung sein können.

3.2. Interpretation

Im Prüfbericht sind auch alle Ergebnisse, die als falsch, anormal oder nicht repräsentativ angesehen werden, anzugeben. Wird ein Versuchsergebnis nicht in die Bewertung einbezogen, so ist dies zu begründen, und es sind die Ergebnisse anderer oder zusätzlicher Versuche aufzuführen. Gelegentlich bezieht sich ein Versuchsergebnis nur auf die bei der Prüfung vorliegende physikalische Form und gegebenenfalls die Flüchtigkeit des Stoffes oder der Zubereitung. In diesem Falle sollte angegeben werden, welches Ergebnis man erhalten würde, wenn der Stoff oder die Zubereitung in der handelsüblichen Form geprüft würde. Eine derartige Information kann u. U. bei Anwendung alternativer Prüfmethode erhalten werden. Kann die Abnormität eines Ergebnisses nicht auf diese Weise nachgewiesen werden, muß das erhaltene Ergebnis in die Bewertung einbezogen werden und der Stoff oder die Zubereitung entsprechend eingestuft werden.

4.

LITERATUR

- (1) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, London. Butterworths, 1979, S. 60—63.
- (2) Koenen, H., Ide, K. H., Über die Prüfung explosiver Stoffe, I. Ermittlung der Reibempfindlichkeit, Explosive Stoffe, Vol. 3, 1955, S. 57—65 und S. 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, S. 119—125, 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, S. 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).

Anlage

Beispiel für Werkstoffspezifikationen

1. Werkstoffspezifikation Nr. 1.0336.505 g gemäß DIN 1623, Blatt 1
 2. Werkstoffspezifikation Nr. 1.4873 gemäß „Stahl-Eisen-Werkstoff“ 490-52
 3. Werkstoffspezifikation Nr. 1.3817 gemäß „Stahl-Eisen-Werkstoff“ 490-52
-

Abbildung 1

Abmessungen in mm

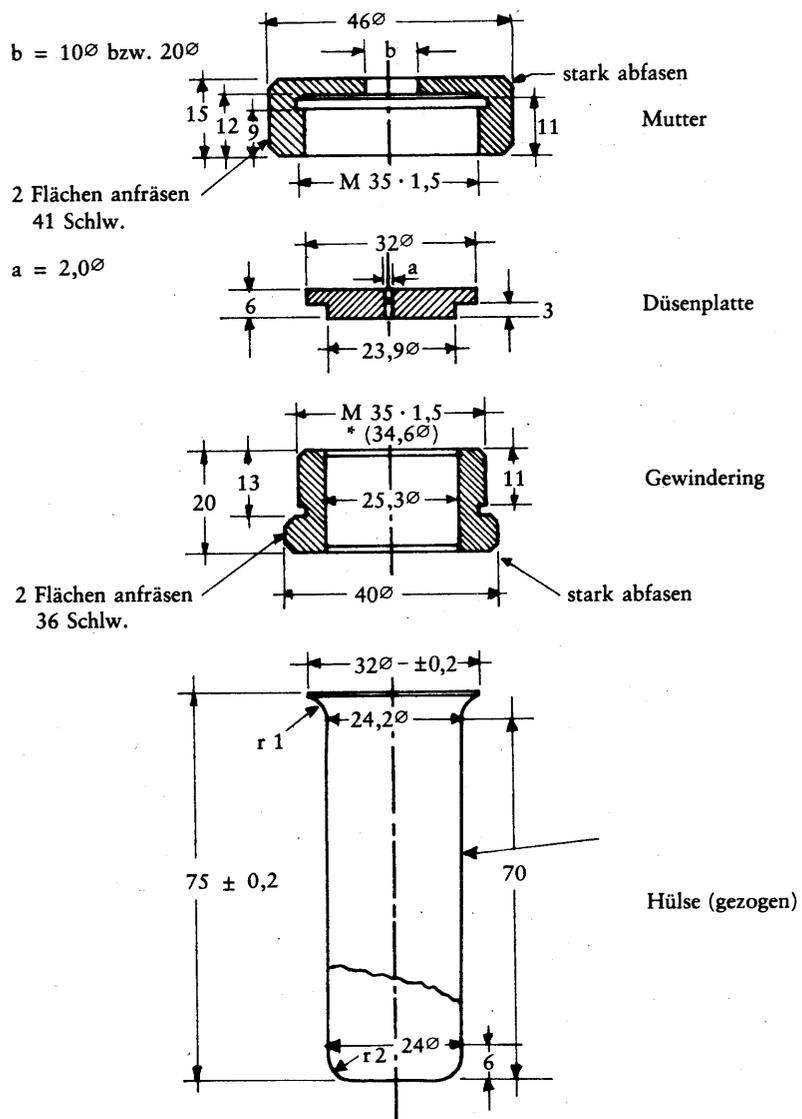


Abbildung 2

(Maße in mm)

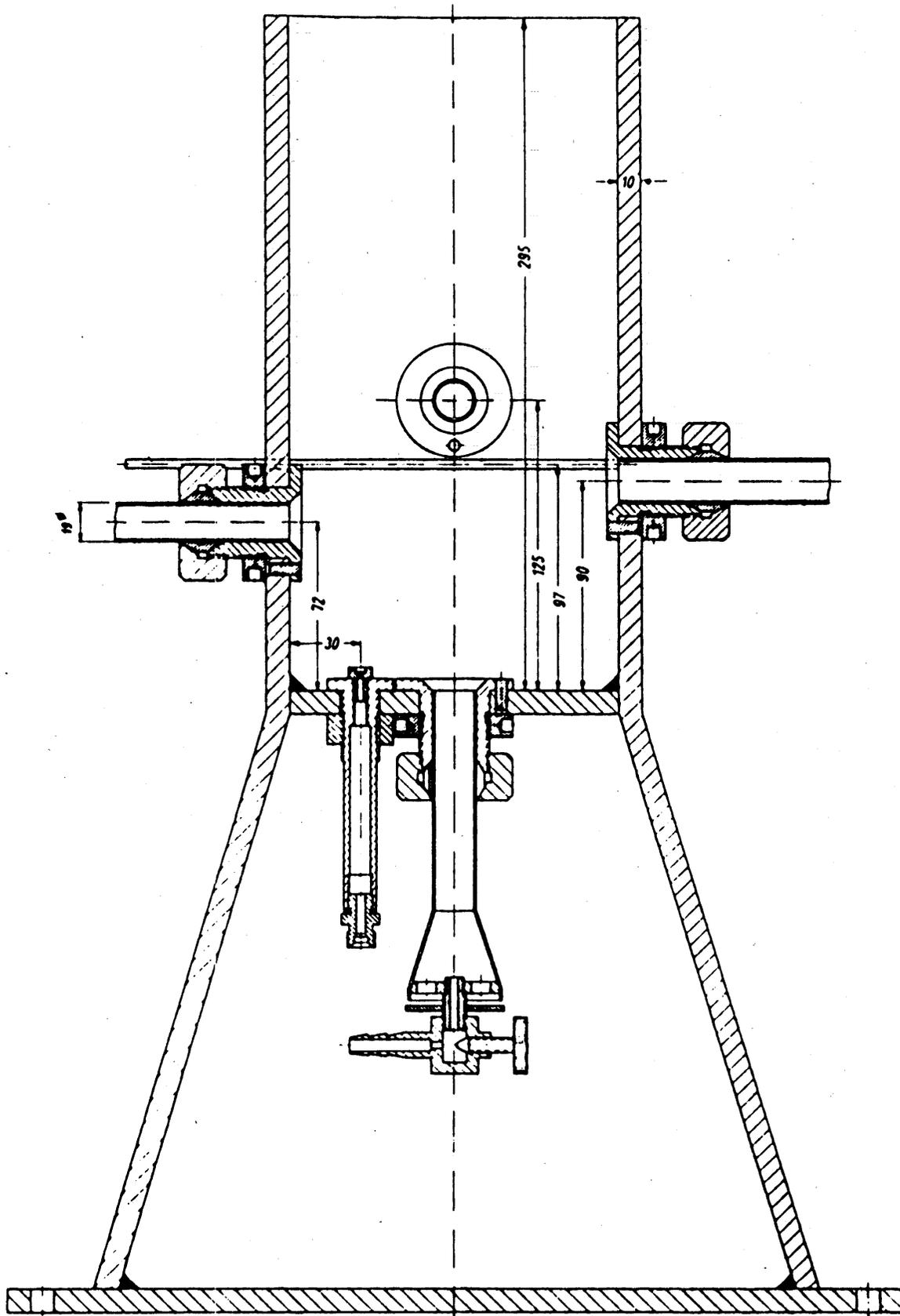


Abbildung 3 a

Material: Messing

(Maße in mm)

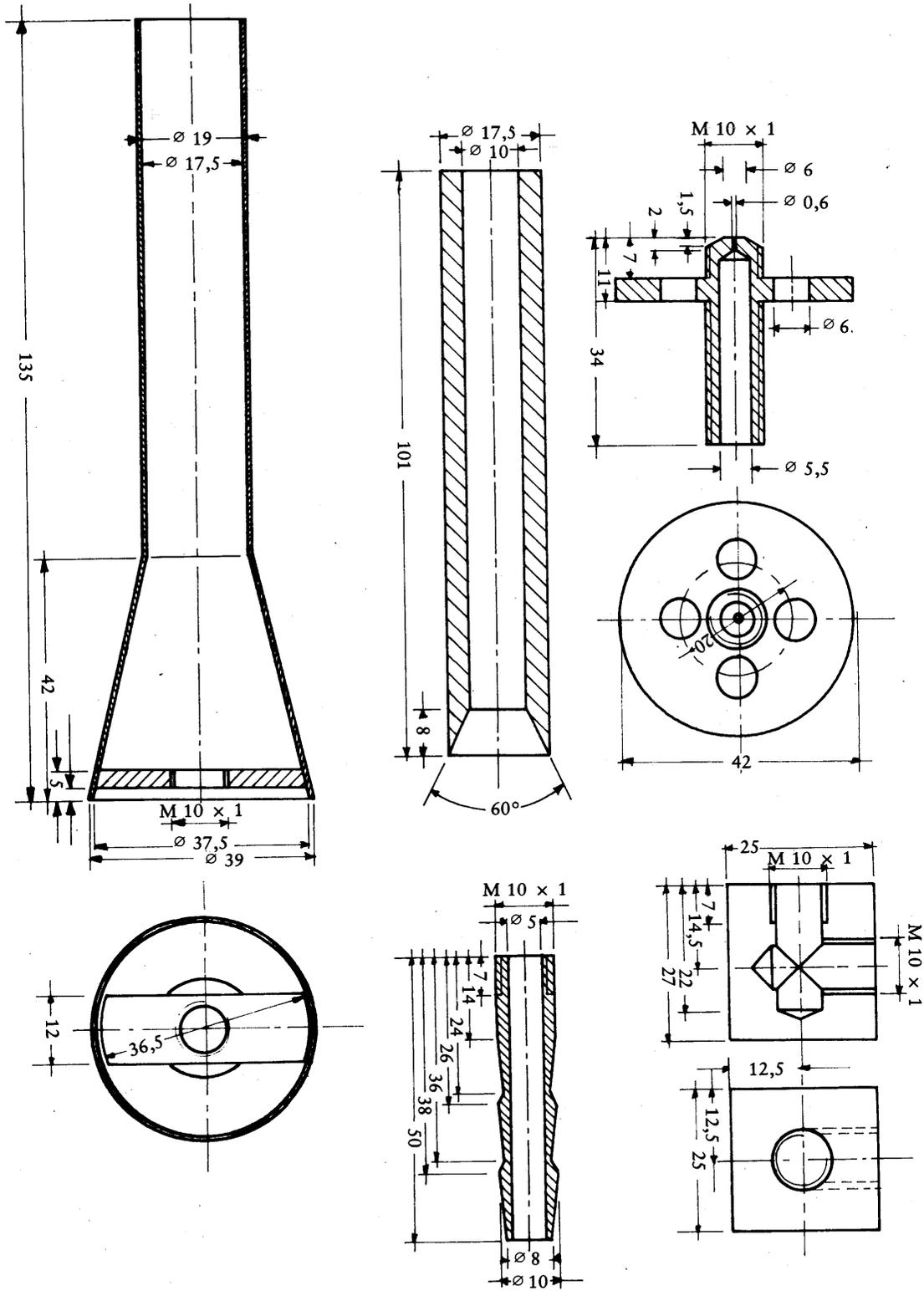
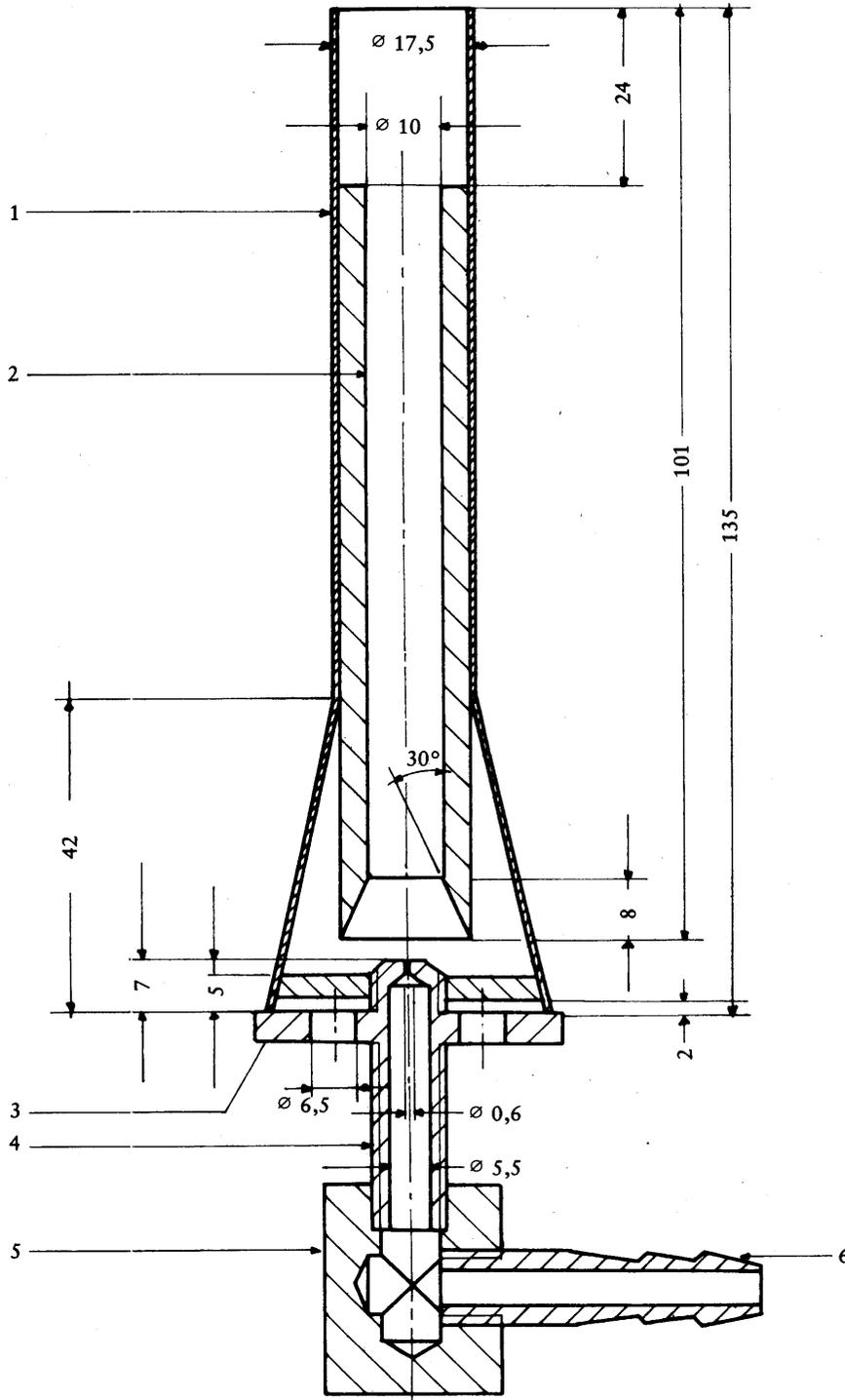


Abbildung 3 b

Material: Messing

(Maße in mm)



A. 15. SELBSTENTZÜNDLICHKEIT — BESTIMMUNG DER ZÜNDTEMPERATUR VON FLÜSSIGKEITEN UND GASEN

1. METHODE

1.1. Einleitung

Es ist zweckdienlich, Vorinformationen über die Selbstentzündlichkeit eines Stoffes zu haben. Das Prüfverfahren ist auf handelsübliche, gasförmige und flüssige Stoffe anwendbar, die oder deren Dämpfe in Gegenwart von Luft an einer heißen Oberfläche gezündet werden können. Die Zündtemperatur kann durch katalytisch wirkende Verunreinigungen erheblich herabgesetzt werden.

1.2. Definitionen

Der Grad der Selbstentzündlichkeit wird durch Angabe der Zündtemperatur ausgedrückt. Die Zündtemperatur ist die niedrigste Temperatur, bei der sich die zu prüfende Substanz im Gemisch mit Luft unter den im Prüfverfahren definierten Bedingungen entzündet.

1.3. Referenzsubstanzen

Nicht spezifiziert.

1.4. Prinzip der Methode

Die Selbstentzündungsfähigkeit von Gasen und Dämpfen wird mit Hilfe der in IEC 79-4 beschriebenen Apparatur bestimmt.

1.5. Qualitätskriterien

Die Wiederholbarkeit schwankt je nach Bereich der Zündtemperaturen und der benutzten Prüfmethode um maximal ± 5 °C.

Die Empfindlichkeit hängt von der benutzten Prüfmethode ab.

Die Spezifität hängt von der benutzten Prüfmethode ab.

1.6. Beschreibung der Methode

1.6.1. Gerät

Die Prüfgeräte sind in den unter 1.6.3 genannten Methoden beschrieben.

1.6.2. Versuchsbedingungen

Eine Probe der Prüfsubstanz wird entsprechend den unter 1.6.3 genannten Methoden geprüft.

1.6.3. Versuchsausführung

Siehe IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056.

2. DATEN

Registrierung von Versuchstemperatur, Luftdruck, Menge der eingesetzten Probe, Zeitverzug bis zur Zündung.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht enthält:

- genaue Angaben über die Substanz (Identifikation und Verunreinigungen),
- Probenmenge, Luftdruck,
- Meßergebnisse (Versuchstemperaturen, Ergebnisse hinsichtlich der Zündung und des Zündvorganges),
- alle zusätzlichen Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse wichtig sind.

4. LITERATUR

Keine

A. 16. SELBSTENTZÜNDLICHKEIT — FESTE STOFFE — BESTIMMUNG DER RELATIVEN SELBSTENTZÜNDUNGSTEMPERATUR

1. METHODE

1.1. Einleitung

Diese Prüfmethode gilt nicht für explosive Stoffe und solche, die sich bei Raumtemperatur an der Luft selbst entzünden.

Zweck dieser Prüfung ist der Erhalt von vorläufigen Informationen über die Selbstentzündlichkeit von festen Stoffen bei erhöhter Temperatur.

Wird die bei der Reaktion des Stoffes mit Sauerstoff oder bei der exothermen Zersetzung des Stoffes entstehende Wärme nicht schnell genug an die Umgebung abgegeben, so führt Selbsterhitzung zur Selbstentzündung. Selbstentzündung tritt somit ein, wenn die Wärmeentwicklung größer ist als die Wärmeableitung.

Die Prüfmethode wird als vorläufiger „Screening“-Test für feste Substanzen angewandt. Wegen der komplexen Natur der Entzündung und Verbrennung von festen Stoffen soll die mit dieser Methode bestimmte Selbstentzündungstemperatur nur für Vergleichszwecke benutzt werden.

1.2. Definitionen und Einheiten

Die mit dieser Methode bestimmte Selbstentzündungstemperatur ist die minimale Umgebungstemperatur in °C, bei der sich unter definierten Bedingungen eine bestimmte Menge einer Substanz entzündet.

1.3. Referenzsubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Eine bestimmte Menge der zu prüfenden Substanz wird bei Raumtemperatur in einen Ofen eingebracht. Während die Temperatur des Ofens mit einer Rate von 0,5 °C/min auf 400 °C erhöht wird, wird die Temperatur im Innern der Probe gemessen und als Temperatur/Zeit-Kurve registriert. Diejenige Ofentemperatur, bei der die Probetemperatur durch Selbsterhitzung 400 °C erreicht, wird bei diesem Verfahren als Selbstentzündungstemperatur bezeichnet.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode

1.6.1. Gerät

1.6.1.1. Ofen

Ein Laboratoriumsofen (Volumen etwa 2 l) mit Temperaturprogrammierung, natürlicher Luftzirkulation und Explosions-Druckentlastung. Schwelgase dürfen auf keinen Fall mit den elektrischen Heizdrähten in Berührung kommen, da sonst Explosionsgefahr besteht.

1.6.1.2. Drahtnetz-Kubus

Ein Stück Drahtnetz aus rostfreiem Stahl mit einer Maschenweite von 0,045 mm wird entsprechend der Darstellung in Abbildung 1 (siehe Anhang) zugeschnitten. Dieses Drahtnetz wird zu einem oben offenen Kubus gefaltet; die Kanten des Kubus werden mit Draht fest verbunden.

1.6.1.3. Thermoelemente

Geeignete Thermoelemente.

1.6.1.4. Registriergerät

Jedes Registriergerät mit zwei Meßkanälen, das für Temperaturen von 0 bis 600 °C oder dem entsprechenden Thermospannungsbereich kalibriert ist.

1.6.2. Versuchsbedingungen

Die Stoffe werden in ihrer handelsüblichen Form geprüft.

1.6.3. Versuchsausführung

Der Kubus wird mit der zu prüfenden Substanz gefüllt und der Inhalt wird durch leichtes Aufstoßen verdichtet; es wird weitere Prüfsubstanz dazugegeben, bis der Kubus vollständig gefüllt ist. Die Probe wird sodann bei Raumtemperatur in die Mitte des Ofens eingesetzt. Ein Thermoelement wird in der Mitte des Kubus und ein anderes zur Registrierung der Ofentemperatur zwischen dem Kubus und der Ofenwand angebracht.

Während die Ofentemperatur mit einer Rate von 0,5 °C/min auf 400 °C oder bis zum Schmelzpunkt der Prüfsubstanz, falls dieser niedriger ist, gesteigert wird, wird die Temperatur des Ofens und der Probe kontinuierlich aufgezeichnet.

Wenn sich die Prüfsubstanz entzündet, zeigt das Thermoelement der Probe einen starken Temperaturanstieg über die Ofentemperatur hinaus an.

2. DATEN

Die Temperatur des Ofens, bei der die Probentemperatur durch Selbsterhitzung 400 °C erreicht, ist für die Beurteilung maßgebend (siehe Abbildung 2 der Anlage).

3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht enthält:

- Beschreibung der Prüfsubstanz,
- Meßergebnisse einschließlich der Temperatur/Zeit-Kurve,
- alle zusätzlichen Bemerkungen, die zur Auswertung der Ergebnisse von Bedeutung sind.

4. LITERATUR

Keine.

Anlage

Abbildung 1

Muster des Testwürfels
(Kantenlänge 20 mm)

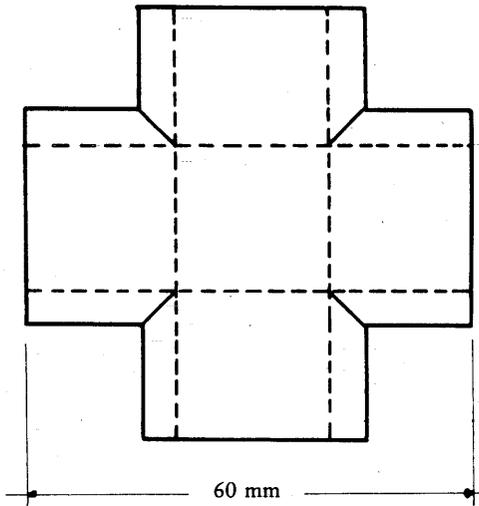
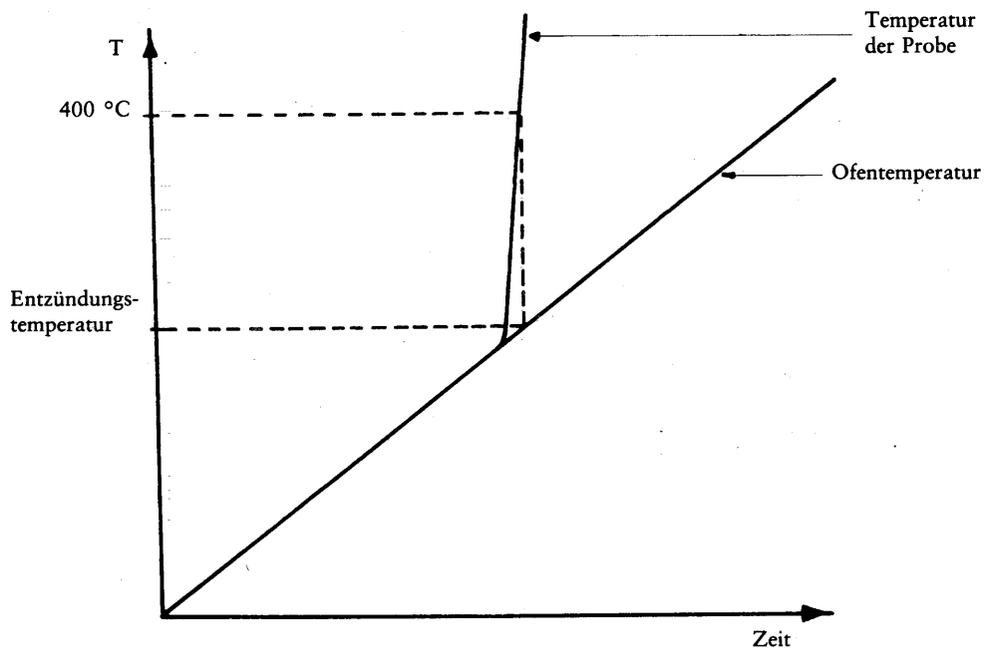


Abbildung 2

Typische Temperatur/Zeit-Kurve



A. 17. BRANDFÖRDERNDE EIGENSCHAFTEN

1. METHODE

1.1. Einleitung

Es ist nützlich, vor Ausführung des Versuches vorläufige Informationen über mögliche explosive und toxische Eigenschaften der Substanz zu besitzen.

Dieses Verfahren kann nicht auf Flüssigkeiten und Gase, explosive oder leicht entzündliche Substanzen, organische Peroxide oder auf brennbare feste Stoffe, die unter den Versuchsbedingungen schmelzen, angewandt werden.

Die Prüfung ist nicht erforderlich, wenn aufgrund der Strukturformel zweifelsfrei ersichtlich ist, daß die Substanz oder die Zubereitung mit brennbarem Material nicht exotherm reagieren kann.

Zur Ermittlung der Sicherheitsvorkehrungen für die Versuchsdurchführung ist es notwendig, einen Vorversuch durchzuführen.

1.2. Definitionen und Einheiten

Abbrandzeit: Diejenige Zeit in Sekunden, in der sich die Reaktionszone über die Schüttung ausbreitet; gemäß dem Verfahren wie unter 1.6 beschrieben.

Abbrandgeschwindigkeit: anzugeben in mm/s.

Höchste Abbrandgeschwindigkeit: Der höchste Wert der Abbrandgeschwindigkeiten von Gemischen mit Massenanteilen an Oxidationsmittel von 10 bis 90 %.

1.3. Referenzsubstanzen

Als Referenzsubstanz für die Prüfung oder den Vorversuch wird Bariumnitrat (analysenrein) verwendet.

Kaliumdichromat kann nur im Vorversuch verwendet werden. Wird Kaliumdichromat verwendet, so sind besondere Vorsichtsmaßnahmen zu ergreifen.

Referenzgemisch ist dasjenige Gemisch aus Bariumnitrat und Cellulosepulver, das gemäß 1.6 hergestellt wurde und die höchste Abbrandgeschwindigkeit hat (üblicherweise ein Gemisch mit einem Massenanteil an Bariumnitrat von 60 %).

1.4. Prinzip der Methode

Der Vorversuch wird aus Gründen der Sicherheit durchgeführt. Wenn durch den Vorversuch eindeutig gezeigt wird, daß die Substanz oder Zubereitung brandfördernd ist, so reicht dieser Versuch aus. Ist dies nicht der Fall, so ist mit dieser Substanz oder Zubereitung das Prüfverfahren wie folgt durchzuführen.

Die zu prüfende Substanz und eine definierte brennbare Substanz werden in verschiedenen Gewichtsverhältnissen gemischt. Jedes Gemisch wird dann zu Schüttungen geformt und diese Schüttungen werden an einem Ende gezündet. Die höchste ermittelte Abbrandgeschwindigkeit wird verglichen mit der höchsten Abbrandgeschwindigkeit eines Bezugsgemisches.

1.5. Qualitätskriterien

Es ist jede Methode der Zerkleinerung und Mischung geeignet, die dazu führt, daß die Differenz der maximalen Abbrandgeschwindigkeiten bei den 6 verschiedenen Versuchen vom arithmetischen Mittelwert nicht mehr als 10 % beträgt.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorversuch**

Die getrocknete Substanz wird in ihrer handelsüblichen Form mit der getrockneten Cellulose oder mit Sägemehl (Gewichtsverhältnis: 2 Teile zu prüfende Substanz, 1 Teil Cellulose) grob gemischt. Das Gemisch wird zu einer kegelartigen Schüttung mit 3,5 cm Durchmesser und 2,5 cm Höhe geformt, indem es ohne besonderes Andrücken in eine kegelartige Form eingefüllt wird (z. B. in einen Glastrichter mit verstopftem Abflußrohr). Die Schüttung wird auf einer kalten, glatten, elektrisch nicht leitenden Oberfläche über der Zündquelle angeordnet; die Zündquelle besteht aus einem inerten Metalldraht, wie z. B. Platin oder Nickel (der elektrisch auf etwa 1 000 °C aufgeheizt werden kann). Die Zündquelle wird ca. 1 mm über der Oberfläche angebracht und verläuft quer durch die gesamte Grundfläche der kegelförmigen Schüttung. Der Versuch muß gemäß 1.6.3 in einem Abzug durchgeführt werden. Die Zündquelle wird eingeschaltet und die ganze Versuchszeit betrieben. Heftigkeit und Dauer der eintretenden Reaktion werden registriert und notiert.

Die Substanz oder Zubereitung wird als brandfördernd beurteilt, wenn die Reaktion heftig ist. In allen Fällen, in denen Zweifel am Ergebnis möglich sind, ist das Prüfverfahren durchzuführen.

1.6.2. Vorbereitung**1.6.2.1. Brandfördernde Substanz**

Die zu prüfende Substanz wird auf eine Korngröße kleiner als 0,125 mm gebracht nach der folgenden Methode:

Die Substanz wird in ihrem handelsüblichen Zustand gesiebt. Die verbleibende Kornfraktion wird zerkleinert; dann wird erneut gesiebt. Das Verfahren wird solange wiederholt, bis die gesamte Probe das Sieb passiert hat.

Es können alle Methoden zum Zerkleinern und Sieben eingesetzt werden, die den Qualitätskriterien genügen.

Vor der Herstellung des Gemisches wird die Substanz bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Wenn die Zersetzungstemperatur der Substanz unterhalb 105 °C liegt, ist die Substanz bei einer entsprechend niedrigeren Temperatur zu trocknen.

1.6.2.2. Brennbare Substanz

Cellulose-Pulver wird als brennbare Substanz verwendet. Es ist dies ein Cellulose-Pulver für die Dünnschicht- und Säulenchromatographie mit einer Faserlänge von mehr als 85 % zwischen 0,020 und 0,075 mm. Das Cellulose-Pulver wird unter Verwendung eines Siebes mit einer Maschenweite von 0,125 mm gesiebt.

Vor der Herstellung der Mischung wird das Cellulose-Pulver bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Wenn Sägemehl im Vorversuch verwendet wird, ist es wie folgt vorzubereiten.

Es wird derjenige Anteil von Weichholzsägemehl verwendet, der ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 600 µm passiert. Dieses Sägemehl wird sorgfältig gemischt und in einer Schichtdicke von weniger als 25 mm bei 105 °C vier Stunden lang getrocknet. Abkühlen lassen und aufbewahren bis zur Verwendung (möglichst innerhalb von 24 Stunden) in einem luftdichten Behälter, der so voll wie möglich gefüllt sein soll.

1.6.2.3. Gemisch

Es werden Oxidationsmittel/Cellulose-Gemische hergestellt mit Massenanteilen an Oxidationsmittel von 10 % bis 90 %, und zwar in 10 %-Intervallen. Für Grenzfälle sollten Gemische mit dazwischen liegender Zusammensetzung hergestellt werden, um die höchste Abbrandgeschwindigkeit genauer zu erhalten.

Bemerkung:

Gemische aus Oxidationsmittel mit Cellulose müssen als potentiell explosionsgefährlich angesehen und mit großer Sorgfalt behandelt werden.

Die Schüttung wird mittels einer Form hergestellt. Die Form ist aus Metall, hat eine Länge von 250 mm und einen dreieckigen Querschnitt mit einer inneren Höhe von 10 mm und einer inneren Breite von 20 mm. An beiden Seiten der Form werden in Längsrichtung seitliche Begrenzungsbleche aufgestellt, die den dreieckigen Querschnitt um 2 mm überragen (siehe Abbildung). Bei dieser Anordnung wird die Form mit Gemisch mit geringem Überschuß gefüllt. Nach dem Fallenlassen der Form aus 20 mm Höhe auf eine feste Unterlage wird die überstehende Substanz mit einem flachen Blech abgestrichen. Danach werden die seitlichen Begrenzungsbleche entfernt und die verbleibende Schicht wird mit einer Rolle geglättet. Nun wird eine nicht brennbare Platte auf die Form gelegt, das Ganze umgedreht und die Form entfernt.

1.6.2.4. Zündquelle

Die Flamme eines Gasbrenners oder eines elektrisch auf etwa 1 000 °C erhitzten Platindrahtes wird als Zündquelle benutzt.

1.6.3. *Versuchsausführung*

Die Schüttung wird quer zur Zugrichtung in einem Abzug angeordnet. Die Absauggeschwindigkeit muß so hoch sein, daß Rauch nicht in das Labor dringen kann; sie soll während des Versuchs nicht verändert werden. Ein Windschutz muß um die Versuchsanordnung herum aufgestellt werden.

Unter Berücksichtigung der Hygroskopizität der Cellulose und der zu prüfenden Substanzen soll die Prüfung so schnell wie möglich ausgeführt werden.

Die Schüttung wird an einem Ende mit der Gasflamme oder dem glühenden Platindraht gezündet.

Es wird die Abbrandzeit gemessen über eine Strecke von 200 mm, nachdem die Reaktionszone einer Strecke von 30 mm vom Start zurückgelegt hat.

Der Test wird mit der Bezugssubstanz ausgeführt. Anschließend wird der Abbrandversuch mindestens einmal mit jeder der von 10 bis 90 % abgestuften Mischungen ausgeführt.

Wenn eine Abbrandgeschwindigkeit gefunden wird, die signifikant größer ist als die des Referenzgemisches, kann der Test beendet werden. Andernfalls muß mit den drei Gemischen, die die höchsten Abbrandgeschwindigkeiten ergeben haben, der Abbrandversuch jeweils fünfmal wiederholt werden.

2. DATEN

Aus sicherheitstechnischen Gründen soll die höchste Abbrandgeschwindigkeit — nicht der Mittelwert — als charakteristische Eigenschaft für das brandfördernde Verhalten der Prüfsubstanz angesehen werden.

Der höchste Wert der Abbrandgeschwindigkeit in einer Serie von sechs Versuchen mit einer bestimmten Mischung ist maßgebend für die Auswertung.

Die höchsten Werte der Abbrandgeschwindigkeit für jede Mischung werden in einer graphischen Darstellung in Abhängigkeit vom Gehalt an Prüfsubstanz aufgetragen.

Aus dieser graphischen Darstellung wird die höchste Abbrandgeschwindigkeit ermittelt.

Die sechs gemessenen Werte für die Abbrandgeschwindigkeit desjenigen Gemisches, das die höchste Abbrandgeschwindigkeit aufweist, dürfen nicht mehr als 10 % vom Mittelwert abweichen. Andernfalls müssen die Methoden der Zerkleinerung und Mischung überprüft werden.

Die höchste gemessene Abbrandgeschwindigkeit wird mit der höchsten Abbrandgeschwindigkeit des Referenzgemisches verglichen (siehe 1.3).

3. ABSCHLUSSBERICHT**3.1. Prüfbericht**

Der Prüfbericht enthält:

- eine Beschreibung der Prüfsubstanz,
- jede Vorbehandlung der Prüfsubstanz (z. B. Mahlung, Trocknung ...),
- die Ergebnisse der Messungen,
- die Art der Reaktion (z. B. schnelle Brandausbreitung an der Oberfläche, Brandfortpflanzung durch das gesamte Volumen, irgendwelche Informationen über Verbrennungsprodukte),
- alle zusätzlichen Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse notwendig sind, einschließlich der Beschreibung der Heftigkeit (Aufflammen, Funkenwurf, Rauchentwicklung, langsames Schwelen usw.) und der ungefähren Dauer der Reaktion beim Vorversuch mit Prüf- und Bezugssubstanz.

3.2. Interpretation

Eine Substanz wird als brandfördernd beurteilt, wenn

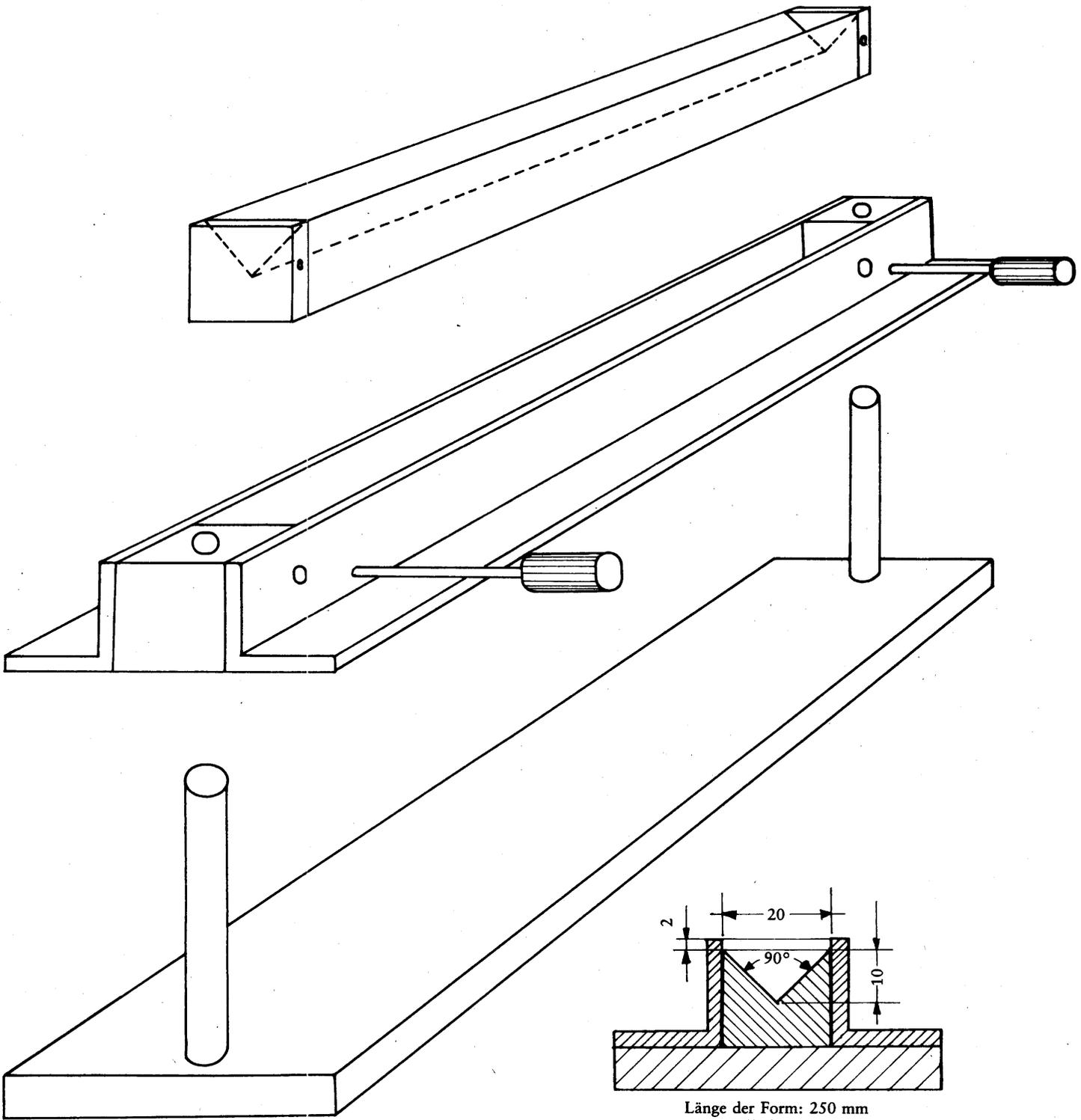
- a) sie im Vorversuch eine heftige Reaktion zeigt
oder
- b) beim Prüfverfahren die höchste Abbrandgeschwindigkeit der geprüften Gemische größer oder gleich der höchsten Abbrandgeschwindigkeit des Referenzgemisches aus Cellulose und Bariumnitrat sind.

4. LITERATUR

Keine.

Anlage
Abbildung

Form und Zubehör zur Herstellung der Schüttung
(alle Maßangaben in mm)



Länge der Form: 250 mm
Werkstoff: Aluminium

B: METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT**ALLGEMEINE EINLEITUNG: TEIL B****A. EINLEITUNG**

Siehe allgemeine Einleitung.

B. DEFINITIONEN

- i) *Akute Toxizität* umfaßt die schädigenden Auswirkungen, die innerhalb eines bestimmten Zeitraumes (meistens 14 Tage) nach Verabreichung einer Einzeldosis einer Substanz auftreten.
- ii) *LD₅₀ (mittlere letale Dosis)* ist die Einzeldosis einer Substanz, die voraussichtlich bei 50 % der exponierten Tiere tödlich wirkt. Die LD₅₀ ist eine statistisch errechnete Größe. Der LD₅₀-Wert wird angegeben als Gewicht der Testsubstanz pro Gewichtseinheit des Versuchstieres (mg/kg Körpergewicht).
- iii) *LC₅₀ (mittlere letale Konzentration)* ist die statistisch errechnete Konzentration einer Substanz, die voraussichtlich bei 50 % der exponierten Tiere während einer definierten Expositionszeit und/oder innerhalb einer bestimmten Zeit danach zum Tode führt. Der LC₅₀-Wert wird als Konzentration der Testsubstanz pro Standardluftvolumen (mg/l) angegeben.
- iv) *Nicht-toxische Dosis* in einem Versuch ist die Höchstdosis oder maximale Expositionskonzentration, bei der keine nachweisbaren Schädigungen entstehen.
- v) *Subakute/subchronische Toxizität* umfaßt die schädigenden Auswirkungen, die bei Versuchstieren als Ergebnis wiederholter täglicher Verabreichung oder Exposition chemischer Substanzen auftreten. Die Behandlungsdauer erstreckt sich über eine kurze Zeit im Verhältnis zur tierartigen Lebenszeit.
- vi) *Maximal verträgliche Dosis (Maximum Tolerated Dose = MTD)* ist die Dosis, die deutliche Zeichen von Toxizität hervorruft, ohne jedoch wesentliche Auswirkungen auf die Überlebenszeit der Tiere während der jeweiligen Testdauer zu zeigen (z. B. bei Versuchen zur Carcinogenese, die nicht tumorbedingt ist).
- vii) Unter *Hautreizung* versteht man das Auslösen von reversiblen Entzündungserscheinungen nach Verabreichung einer Prüfsubstanz.
- viii) Unter *Augenreizung* versteht man das Auslösen von reversiblen Veränderungen am Auge nach Verabreichung einer Prüfsubstanz auf die Oberfläche des Auges.
- ix) *Hautsensibilisierung* (allergische Kontaktdermatitis) ist eine immunologische Hautreaktion, die durch eine Prüfsubstanz bedingt wurde.

C. INTERPRETATION

Es muß beachtet werden, daß Rückschlüsse auf den Menschen bei der Bewertung und Interpretation von Tierversuchen und *in vitro*-Tests nur begrenzt möglich sind.

Soweit verfügbar, sind beim Menschen erhobene Befunde bei der Bestimmung der potentiellen Auswirkung chemischer Substanzen auf die Bevölkerung von höherer Relevanz.

MUTAGENITÄT (einschließlich Karzinogenitäts-Prä-Screening-Test):

Für eine vorläufige Abschätzung des mutagenen Potentials einer Substanz benötigt man Informationen über zwei Arten von Endpunkten, nämlich Genmutationen und Chromosomenaberrationen.

Diese beiden Endpunkte werden durch folgende Prüfungen bewertet:

- i) Prüfungen über die Auslösung von Gen(Punkt)-Mutationen in prokaryotischen Zellen wie *Salmonella typhimurium*; akzeptabel ist auch der Einsatz von *Escherichia coli*. Die Art der zu testenden Chemikalie ist ggf. für die Wahl eines der beiden Testorganismen entscheidend.

- ii) Untersuchungen zur Auslösung von Chromosomenaberrationen an *in vitro* kultivierten Säugerzellen; ein *in vivo*-Verfahren (Mikronukleus-Test oder die Metaphasenanalyse von Knochenmarkzellen) ist ebenfalls brauchbar.

D. LITERATURHINWEISE

Die Toxikologie ist eine ständig fortschreitende experimentelle Wissenschaft und zu einzelnen Themenkreisen ist umfangreiche Literatur vorhanden. Entsprechende Angaben sind in den Prüfrichtlinien der OECD enthalten.

Ergänzende Bemerkungen

Tierpflege

Wesentlich für toxikologische Untersuchungen sind strenge Kontrollen der Umweltbedingungen sowie gute, den jeweiligen Tierarten angemessene Tierpflege.

i) *Haltungsbedingungen*

Die Umweltbedingungen in Versuchsterräumen sind den jeweiligen Tierarten anzupassen. Für Nager ist eine Raumtemperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30–70 % angezeigt; für Kaninchen und Meerschweinchen sollte die Temperatur $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30–70 % betragen.

Einige Untersuchungsmethoden sind besonders temperaturempfindlich. Für diese Fälle sind Einzelheiten über entsprechende Voraussetzungen in der Beschreibung des Prüfverfahrens enthalten. Bei allen Untersuchungen auf toxische Auswirkungen sind Temperatur und Luftfeuchtigkeit zu überwachen, aufzuzeichnen und in den Endbericht der Untersuchung aufzunehmen.

Bei künstlicher Beleuchtung sollen die Licht- und Dunkelfolgen jeweils zwölf Stunden betragen. Einzelheiten des Beleuchtungsmusters sind aufzuzeichnen und in den Untersuchungsbericht aufzunehmen.

Wesentlich für Berichte über Tierversuche ist außerdem der Hinweis auf die Art der Käfighaltung sowie die Anzahl der in einem Käfig untergebrachten Tiere sowohl während der Exposition durch die Prüfsubstanz als auch während der darauf folgenden Beobachtungszeit.

ii) *Fütterungsbedingungen*

Das Futter muß allen ernährungswissenschaftlichen Anforderungen für die jeweils eingesetzte Tierart entsprechen. Werden den Tieren Prüfsubstanzen im Futter verabreicht, so kann sich der Nährwert durch Wechselwirkung zwischen der jeweiligen Substanz und einem Nahrungsmittelbestandteil verringern.

Die Möglichkeit einer solchen Reaktion muß bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Verunreinigungen in der Nahrung, die sich nachweislich auf die Toxizität auswirken, dürfen nicht in beeinträchtigenden Konzentrationen vorhanden sein.

B. 1. AKUTE TOXIZITÄT — ORAL**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird in abgestuften Dosierungen mehreren Versuchstiergruppen oral mit der Schlundsonde verabreicht, und zwar eine Dosierung je Gruppe. Anschließend werden die beobachteten Vergiftungserscheinungen und Todesfälle registriert. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden sezirt. Diese Methode wird in erster Linie bei Untersuchungen mit Nagetieren angewandt.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung**

Vor der Untersuchung werden die Tiere für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden geschlechtsreife Tiere im jugendlichen Stadium randomisiert und den einzelnen Behandlungsgruppen zugeordnet.

Falls erforderlich, wird die Prüfsubstanz suspendiert bzw. in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst. Es wird empfohlen, nach Möglichkeit eine wässrige Lösung zu wählen. Gegebenenfalls ist eine Lösung in Pflanzenöl oder anderen geeigneten Lösungsvermittlern oder eine Suspension zu verwenden. Bei nicht wässrigen Formulierungshilfsmitteln müssen deren relevante toxikologische Eigenschaften bekannt sein, andernfalls sind sie vor oder während des Versuchs zu bestimmen. Bei Nagetieren sollte das Volumen normalerweise 10 ml/kg Körpergewicht nicht überschreiten; ausgenommen sind wässrige Lösungen, von denen bis zu 20 ml/kg verabreicht werden können. Unterschiedliche Volumina sollten durch Anpassung der Konzentration so gering wie möglich gehalten werden, um ein konstantes Volumen in allen Dosierungen zu gewährleisten.

1.6.2. Prüfbedingungen**1.6.2.1. Versuchstiere**

Soweit keine besonderen Gründe vorliegen, ist die Ratte zu bevorzugen. Es sind bekannte Versuchstierstämme zu verwenden. Für jedes Geschlecht sollte die Schwankung des Körpergewichts der Tiere des jeweiligen Versuchs nicht mehr als $\pm 20\%$ vom Mittelwert betragen.

1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens 10 Nagetiere (5 weibliche und 5 männliche) sind für jede Dosierung zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein.

1.6.2.3. Dosierungen

Die Dosisgruppen (mindestens 3) müssen ausreichen, um nach entsprechenden Abstufungen Versuchsgruppen mit toxischen Wirkungen und Mortalitätsraten zu erhalten. Die erhaltenen Daten sollen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufzeigen und — soweit möglich — eine Bestimmung der LD₅₀ erlauben.

1.6.2.4. Limit-Test

Eine ausreichende Abschätzung der akuten oralen Toxizität ist dann gegeben, wenn in einer behandelten Gruppe (5 Tiere pro Geschlecht) innerhalb von 14 Tagen nach Verabreichung von 5 000 mg/kg keine substanzbedingte Mortalität festgestellt wird.

1.6.2.5. Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum sollte mindestens 14 Tage betragen. Die Dauer der Beobachtung soll jedoch nicht starr festgelegt werden. Sie soll von der Art des Vergiftungsbildes, dem zeitlichen Auftreten der Symptome und der Dauer der Erholungsphase abhängig gemacht werden. Die Beobachtungszeit ist zu verlängern, falls es sich als notwendig erweist. Der Zeitpunkt, bei dem Vergiftungserscheinungen auftreten und wieder abklingen sowie der Zeitpunkt des Todes sind von Bedeutung, vor allem dann, wenn Anzeichen für eine verzögerte Mortalität erkennbar sind.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Vor Verabreichung der Prüfsubstanz sollen die Tiere kein Futter erhalten. Bei Ratten sollte eine Nacht lang kein Futter verabreicht werden. Bei Tieren mit einer höheren Stoffwechselrate reicht eine kürzere Nahrungskarenz aus; Trinkwasser kann unbegrenzt verabreicht werden. Am folgenden Tag werden die Tiere gewogen, und die Prüfsubstanz wird in einer einmaligen Dosis oral mit der Schlundsonde verabreicht. Ist eine einmalige Dosierung nicht möglich, kann die zu applizierende Dosis in Teilmengen über einen Zeitraum von höchstens 24 Stunden verabreicht werden. Nach Verabreichung der Prüfsubstanz soll der Futterentzug für weitere 3—4 Stunden beibehalten werden. Wird die Prüfsubstanz in Teilmengen während eines größeren Zeitraums verabreicht, kann es erforderlich sein, den Tieren je nach Länge der Exposition Futter und Wasser zu geben. Nach der Verabreichung werden die Beobachtungen für jedes Tier individuell aufgezeichnet und festgehalten. Die Beobachtungen sind während des ersten Tages häufig durchzuführen. Mindestens einmal jeden Werktag sollte eine sorgfältige klinische Untersuchung erfolgen. Andere tägliche Beobachtungen und entsprechende Vorkehrungen sollen dem Ziel dienen, den Verlust an Tieren für die Studie weitestgehend einzuschränken, z. B. durch Autopsie oder Kühlung tot aufgefundener Tiere oder durch Isolierung oder Tötung schwacher oder sterbender Tiere. Beobachtungen sind auszurichten auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, Atmung und Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie Somatomotorik und Verhaltensmuster. Besonderes Augenmerk sind auf Tremor, Konvulsionen, Salivation, Diarrhoe, Lethargie, Schlaf und Koma zu richten. Der Zeitpunkt des Todes ist so genau wie möglich festzuhalten.

Die während des Versuchs gestorbenen und die bis zum Abschluß des Versuchs überlebenden Tiere werden seziiert. Alle pathologischen Veränderungen sind zu protokollieren. Falls erforderlich, sollten Gewebe für eine histopathologische Untersuchung entnommen werden.

2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, der Zeitpunkt des Todes der einzelnen Tiere, die Zahl der Tiere mit weiteren Anzeichen der Giftwirkung, die Beschreibung der toxischen Auswirkungen und die Sektionsbefunde hervorgehen. Die Bestimmung des Gewichts der einzelnen Tiere erfolgt unmittelbar vor Verabreichung der Prüfsubstanz, danach in wöchentlichen Abständen und zum Zeitpunkt des Todes. Gewichtsveränderungen sind zu bestimmen und aufzuzeichnen, sofern die Tiere länger als einen Tag überleben. Die LD₅₀ ist mit einer anerkannten Methode zu berechnen. Die Auswertung sollte auch —

soweit möglich — die Beziehung zwischen Verabreichungsdosis sowie Auftreten und Grad aller Abnormitäten einschließlich Verhaltensänderungen, klinischer Symptome, schwerer Schädigungen, Körpergewichtsveränderungen, Mortalität und sonstiger toxikologischer Auswirkungen umfassen.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Tierarten, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Versuchsbedingungen;
- Dosierungsgruppen (ggf. Lösungsvermittler und Konzentrationen);
- Auflistung der Daten nach Geschlecht und Dosierung (Zahl der gestorbenen Tiere, Zahl der Tiere mit Vergiftungserscheinungen, Zahl der exponierten Tiere);
- Zeitpunkt des Todes nach Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Verlaufsbeobachtungen;
- LD_{50} — Wert für jedes Geschlecht nach einer Beobachtungszeit von 14 Tagen (unter Angabe der Berechnungsmethode);
- 95 %-Konfidenzbereich für die LD_{50} ;
- Dosis/Mortalitätskurve und Slope-Faktor (falls durch eine Bestimmungsmethode möglich);
- Sektionsbefunde;
- ggf. histopathologische Befunde;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Interpretation der Ergebnisse.

3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

B. 2. AKUTE TOXIZITÄT — INHALATION**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Mehrere Versuchstiergruppen werden mit der Prüfsubstanz in abgestuften Konzentrationen für eine bestimmte Zeit exponiert, und zwar eine Konzentration je Gruppe. Die beobachteten Auswirkungen und Todesfälle werden dabei registriert. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden seziiert.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung**

Vor der Untersuchung werden die Tiere für einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde geschlechtsreife Tiere im jugendlichen Stadium randomisiert und den einzelnen Behandlungs-Gruppen zugeordnet.

Eine simulierte Exposition ist nur dann erforderlich, wenn es die verwendete apparative Expositionsbedingung notwendig macht. Falls erforderlich, kann der Prüfsubstanz ein geeignetes Vehikel zugefügt werden, um die erforderliche Konzentration der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen. In diesem Fall muß jedoch eine Kontrollgruppe, die nur das Vehikel erhält, eingesetzt werden. Wird zur Vereinfachung der Dosierung ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz eingefügt, müssen deren relevante toxikologische Eigenschaften bekannt sein. Es können ggf. historische Daten herangezogen werden.

1.6.2. Prüfbedingungen**1.6.2.1. Versuchstiere**

Soweit keine besonderen Gründe vorliegen, ist die Ratte zu bevorzugen. Es sind bekannte Versuchstierstämme zu verwenden. Für jedes Geschlecht sollte die Schwankung des Körpergewichts der Tiere des jeweiligen Versuchs nicht mehr als $\pm 20\%$ vom Mittelwert betragen.

1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens 10 Nagetiere (5 weibliche und 5 männliche) sind für jede Konzentration zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein.

1.6.2.3. Expositionskonzentrationen

Die Expositionsgruppen (mindestens 3) müssen ausreichen, um nach entsprechenden Abstufungen Versuchsgruppen mit toxischen Wirkungen und Mortalitätsraten zu erhalten. Die erhaltenen Daten sollen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufzeigen und — soweit möglich — eine Bestimmung der LC_{50} erlauben.

1.6.2.4. Limit-Test

Wenn eine Exposition an 5 männlichen und 5 weiblichen Tieren nach 20 mg/l eines Gases oder von 5 mg/l bei Aerosolen oder Stäuben über vier Stunden oder — in den Fällen, in denen es wegen der physikalischen oder chemischen Eigenschaften einschließlich der Explosionsgefahr der Prüfsubstanz nicht möglich ist — die maximale erreichbare Konzentration bei Anwendung innerhalb von 14 Tagen keine substanzbedingte Mortalität herbeiführt, werden weitere Versuche nicht als notwendig erachtet.

1.6.2.5. Expositionszeit

Die Mindestexpositionszeit sollte vier Stunden betragen.

1.6.2.6. Ausrüstung

Für die Tierversuche soll eine Inhalationsanlage benutzt werden, die einen dynamischen Luftstrom mit einem Luftwechsel von mindestens 12 mal pro Stunde sowie einen adäquaten Sauerstoffgehalt und eine gleichmäßig verteilte Expositionsatmosphäre gewährleistet. Wird eine Kammer verwendet, so ist sie so zu gestalten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden und die Exposition durch Inhalation der Prüfsubstanz maximiert wird. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte grundsätzlich das „Gesamtvolumen“ der Versuchstiere 5 % des Kammerolumens nicht überschreiten. Für Expositionen des Mund-Nasen-Bereichs, des Kopfes oder des Ganzkörpers sind Inhalationskammern zu verwenden. Die beiden ersten Expositionsarten sollen dazu beitragen, die Aufnahme der Prüfsubstanz auf anderen Wegen soweit wie möglich einzuschränken.

1.6.2.7. Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum sollte mindestens 14 Tage betragen. Die Dauer der Beobachtung soll nicht starr festgelegt werden. Sie soll jedoch von der Art des Vergiftungsbildes, dem zeitlichen Auftreten der Symptome und der Dauer der Erholungsphase abhängig gemacht werden. Die Beobachtungszeit ist zu verlängern, falls es sich als notwendig erweist. Der Zeitpunkt, bei dem Vergiftungserscheinungen auftreten und wieder abklingen sowie der Zeitpunkt des Todes sind von Bedeutung, vor allem dann, wenn Anzeichen für eine verzögerte Mortalität erkennbar sind.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere werden unmittelbar vor der Exposition gewogen und nach Einstellung des Gleichgewichts der Kammerkonzentration der Prüfsubstanz in den dazu bestimmten Apparaten über einen Zeitraum von mindestens vier Stunden ausgesetzt. Die Einstellung des Gleichgewichts sollte nur wenig Zeit in Anspruch nehmen. Die Temperatur soll während des Versuchs $22^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$ betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit soll zwischen 30 % und 70 % liegen, ausgenommen in den Fällen, wo dies nicht durchführbar ist (z. B. Versuche mit Aerosolen). Während der Exposition werden weder Futter noch Wasser verabreicht.

Es soll ein dynamisches Inhalationssystem mit einem geeigneten analytischen Verfahren zur Bestimmung der Konzentration benutzt werden. Um brauchbare Expositionskonzentrationen zu erhalten, wird ein Vorversuch empfohlen.

Das System soll gewährleisten, daß konstante Expositionsbedingungen so schnell wie möglich erreicht werden. Die Luftdurchflußrate ist so einzustellen, daß die Bedingungen in der gesamten Expositions-kammer einheitlich sind.

Die folgenden Messungen oder Überwachungen sollten durchgeführt werden:

- a) Messungen der Luftdurchflußrate (kontinuierlich).
- b) Die tatsächliche Konzentration der Prüfsubstanz wird im Atembereich gemessen. Während der Expositionsdauer darf die Konzentration um nicht mehr als $\pm 15\%$ vom Mittelwert variieren. Falls dies nicht erreichbar ist, wird bei Stäuben und einigen Aerosolen ein größerer Streubereich akzeptiert. Für Teilchen und Aerosole ist die Analyse so oft wie möglich durchzuführen, mindestens einmal, um die Teilchengrößenverteilung festzulegen.
- c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit.
- d) Während und nach der Exposition werden die Tiere beobachtet und die Befunde aufgezeichnet und im Bericht für jedes Tier festgehalten. Die Beobachtungen sind während des ersten Tages häufig durchzuführen. Mindestens einmal jeden Werktag sollte eine sorgfältige klinische Untersuchung erfolgen. Andere tägliche Beobachtungen und entsprechende Vorkehrungen sollen dem Ziel dienen, den Verlust an Tieren für die Studie weitestgehend einzuschränken, z. B. durch Autopsie oder Kühlung tot aufgefundener Tiere bzw. durch Isolierung oder Tötung schwacher oder sterbender Tiere. Diese Beobachtungen beinhalten Veränderungen von Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, Atmung und Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie Somatomotorik und Verhaltensmuster.

Besonderes Augenmerk sind auf Atemtätigkeit, Tremor, Konvulsionen, Salivation, Diarrhoe, Lethargie, Schlaf und Koma zu richten. Der Zeitpunkt des Todes ist so genau wie möglich festzuhalten. Das Gewicht der Einzeltiere soll nach der Exposition wöchentlich und zum Zeitpunkt des Todes festgestellt werden. Die während des Versuches gestorbenen und die bis zum Abschluß des Versuchs überlebenden Tiere werden seziert unter besonderer Berücksichtigung aller Veränderungen im oberen und unteren Atmungstrakt. Alle pathologischen Veränderungen sind zu protokollieren. Falls erforderlich, sollten Gewebe für eine histopathologische Untersuchung entnommen werden.

2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, der Zeitpunkt des Todes der einzelnen Tiere, die Zahl der Tiere mit weiteren Anzeichen der Giftwirkung, die Beschreibung der toxischen Auswirkungen und die Sektionsbefunde hervorgehen. Gewichtsveränderungen sind zu ermitteln und aufzuzeichnen, sofern die Tiere länger als einen Tag überleben. Die LC_{50} ist mit einer anerkannten Methode zu berechnen. Die Auswertung sollte auch — soweit möglich — die Beziehung zwischen der Verabreichungsdosis sowie Auftreten und Grad aller Abnormitäten einschließlich Verhaltensänderungen, klinischer Symptome, schwerer Schädigungen, Körpergewichtsveränderungen, Mortalität und sonstiger toxikologischer Auswirkungen umfassen.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Tierarten; Stamm; Herkunft; Haltungsbedingungen; Futter usw;
- Versuchsbedingungen:

Beschreibung des Expositionsapparates einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Partikel- und Aerosolherzeugung, Klimatisierungssystem und Art der Unterbringung der Tiere in der Versuchskammer. Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Teilchenkonzentration und -größe des Aerosols sind zu beschreiben.

Expositionsdaten

Diese Daten sind in tabellarischer Form zusammenzustellen und unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankungen (z. B. Standardabweichung) darzustellen. Sie müssen folgende Angaben enthalten:

- a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage;
- b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;

- c) nominale Konzentration (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wurde, dividiert durch das Luftvolumen);
- d) ggf. Art des Vehikels;
- e) tatsächliche Konzentrationen im Atembereich;
- f) mittlere Teilchengrößen;
- g) Zeit für Gleichgewichtseinstellung;
- h) Expositionsdauer;
- Auflistung der Werte nach Geschlecht und Konzentration (Zahl der gestorbenen Tiere, Zahl der Tiere mit Anzeichen von Toxizität, Zahl der exponierten Tiere);
- Zeitpunkt des Todes während oder nach der Exposition;
- Verlaufsbeobachtungen;
- LC_{50} -Wert für jedes Geschlecht, Bestimmung nach Ende der Beobachtungszeit (unter Angabe der Berechnungsmethode);
- 95 %-Konfidenzbereich für die LC_{50} ;
- Konzentration/Mortalitätskurve und Slope-Faktor (falls durch die Bestimmungsmethode möglich);
- Sektionsbefunde;
- ggf. histopathologische Befunde;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Interpretation der Ergebnisse.

3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

B. 3. AKUTE TOXIZITÄT — DERMAL**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definition

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird in abgestuften Dosierungen mehreren Versuchstiergruppen auf die Haut aufgetragen, und zwar eine Dosierung je Gruppe. Anschließend werden die beobachteten Vergiftungserscheinungen und Todesfälle registriert. Tiere, die während des Versuches sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden seziert.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung**

Vor der Untersuchung werden die Tiere für einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen in geeigneten Käfigen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde geschlechtsreife Tiere im jugendlichen Stadium randomisiert und den einzelnen Behandlungsgruppen zugeordnet. Ca. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wird das Fell der Versuchstiere auf dem Rücken durch Scheren oder Rasieren entfernt. Beim Scheren oder Abrasieren des Fells ist darauf zu achten, daß die Haut nicht verletzt wird, da dies zu einer Veränderung der Durchlässigkeit führen könnte. Mindestens 10 % der Körperoberfläche wird für die Applikation der Prüfsubstanz vorbereitet. Werden feste Stoffe verwendet, die gegebenenfalls pulverisiert werden können, sollte die Prüfsubstanz ausreichend mit Wasser oder ggf. in anderer geeigneter Form angefeuchtet werden, um einen guten Kontakt mit der Haut sicherzustellen. Bei Verwendung einer Trägerflüssigkeit ist deren Einfluß auf das Eindringen der Prüfsubstanz in die Haut zu berücksichtigen. Flüssige Prüfsubstanzen werden im allgemeinen unverdünnt angewendet.

1.6.2. Versuchsbedingungen**1.6.2.1. Versuchstiere**

Es können erwachsene Ratten oder Kaninchen verwendet werden. Auch andere Tierarten können benutzt werden, jedoch muß ihre Verwendung begründet werden. Es sollen bekannte Versuchstierstämme verwendet werden. Für jedes Geschlecht sollte die Schwankung des Körpergewichts der Tiere des jeweiligen Versuches nicht mehr als $\pm 20\%$ vom Mittelwert betragen.

1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens 10 Tiere (5 weibliche und 5 männliche) mit gesunder unbeschädigter Haut sollen für jede Dosierung verwendet werden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Die Verwendung einer kleineren Zahl an Tieren kann in einigen Fällen gerechtfertigt sein, vor allem bei Kaninchen.

1.6.2.3. Dosierungen

Die Dosisgruppen (mindestens 3) müssen ausreichen, um nach entsprechenden Abstufungen Versuchsgruppen mit toxischen Wirkungen und Mortalitätsraten zu erhalten. Bei der Festlegung der Dosierungen sollte eine mögliche reizende oder ätzende Wirkung berücksichtigt werden. Die erhaltenen Daten sollen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufzeigen und — soweit möglich — eine Bestimmung der LD₅₀ erlauben.

1.6.2.4. Limit-Test

Wenn in Vorversuchen eine aufgetragene Dosis von mindestens 2 000 mg/kg auf die unbeschädigte Haut bei mindestens 5 Tieren pro Geschlecht innerhalb von 14 Tagen keine substanzbedingte Mortalität herbeiführt, werden weitere Versuche mit anderen Dosierungen nicht als notwendig erachtet.

1.6.2.5. Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum sollte mindestens 14 Tage betragen. Die Dauer der Beobachtung soll jedoch nicht starr festgelegt werden. Sie soll von der Art des Vergiftungsbildes, dem zeitlichen Auftreten der Symptome und der Dauer der Erholungsphase abhängig gemacht werden. Die Beobachtungszeit ist zu verlängern, falls es sich als notwendig erweist. Der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungserscheinungen auftreten und wieder abklingen sowie die entsprechende Zeitdauer und der Zeitpunkt des Todes sind von Bedeutung, vor allem dann, wenn Anzeichen für eine verzögerte Mortalität erkennbar sind.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere sollen einzeln in Käfigen gehalten werden. Die Prüfsubstanz ist einheitlich auf einen Bereich aufzutragen, der etwa 10 % der Körperoberfläche entspricht. Bei hochtoxischen Substanzen kann die behandelte Oberfläche kleiner sein; es sollte jedoch ein möglichst großer Bereich mit einer möglichst dünnen und einheitlichen Schicht behandelt werden.

Die Prüfsubstanz muß während einer Expositionszeit von 24 Stunden mittels eines porösen Mullverbandes und eines nicht reizenden Pflasters Kontakt mit der Haut haben. Die Versuchsfläche ist außerdem auf geeignete Art abzudecken, um den Mullverband und die Prüfsubstanz zu fixieren und sicherzustellen, daß die Tiere die Prüfsubstanz nicht oral aufnehmen können. Es können auch Mittel zur Einschränkung der Bewegungsfreiheit angewendet werden, damit die Tiere die Prüfsubstanz nicht oral aufnehmen können; eine vollständige Immobilisation ist jedoch nicht zu empfehlen.

Nach Ablauf der Expositionszeit werden die Reste der Prüfsubstanz entfernt, soweit möglich unter Verwendung von Wasser oder mit einem anderen geeigneten Hautreinigungsverfahren.

Beobachtungen sind systematisch aufzuzeichnen. Für jedes Tier sind individuelle Aufzeichnungen anzufertigen. Am ersten Tag sind die Tiere häufig zu beobachten. Mindestens einmal jeden Werktag sollte eine sorgfältige klinische Untersuchung erfolgen. Andere tägliche Beobachtungen und entsprechende Vorkehrungen sollen dem Ziel dienen, den Verlust an Tieren für die Studie weitestgehend einzuschränken, z. B. durch Autopsie oder Kühlung tot aufgefundener Tiere oder durch Isolierung oder Tötung schwacher oder sterbender Tiere. Die Beobachtungen beinhalten Veränderungen von Fell, behandelter Haut, Augen, Schleimhäuten, Atmung, Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie Somatomotorik und Verhaltensmuster. Besonderes Augenmerk sind auf Tremor, Konvulsionen, Salivation, Diarrhoe, Lethargie, Schlaf und Koma zu richten. Der Zeitpunkt des Todes ist so genau wie möglich festzuhalten. Die während des Versuchs gestorbenen und die bis zum Abschluß des Versuchs überlebenden Tiere werden seziiert. Alle pathologischen Veränderungen sind zu protokollieren. Falls erforderlich, sollten Gewebe für eine histopathologische Untersuchung entnommen werden.

2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, der Zeitpunkt des Todes der einzelnen Tiere, die Zahl der Tiere mit weiteren Anzeichen der Giftwirkung, die Beschreibung der toxischen Auswirkungen und die Sektionsbefunde hervorgehen. Die Bestimmung des Gewichtes der einzelnen Tiere erfolgt unmittelbar vor Verabreichung der Prüfsubstanz, danach in wöchentlichen Abständen und zum Zeitpunkt des Todes. Gewichtsveränderungen sind zu bestimmen und aufzuzeichnen, sofern die Überlebensfrist länger als einen Tag dauert. Die LD_{50} ist mit einer anerkannten Methode zu berechnen.

Die Auswertung sollte auch — soweit möglich — die Beziehung zwischen der Verabreichungsdosis sowie Auftreten und Grad aller Abnormitäten einschließlich Verhaltensänderungen, Mortalität und sonstiger toxikologischer Auswirkungen umfassen.

3. ABSCHLUSSBERICHT**3.1. Prüfbericht**

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Tierarten, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter, usw.;
- Versuchsbedingungen (einschließlich der Hautreinigungsverfahren);
- Dosierungsgruppen (ggf. Lösungsvermittler und Konzentrationen);
- Auflistung der Daten nach Geschlecht und Dosierung (Zahl der gestorbenen Tiere, Zahl der Tiere mit Vergiftungsanzeichen, Zahl der exponierten Tiere);
- Zeitpunkt des Todes nach Auftragen der Prüfsubstanz;
- Verlaufsbeobachtungen;
- Bestimmung des LD_{50} -Wertes für jedes Geschlecht nach 14 Tagen unter Angabe der Berechnungsmethode;
- 95 %-Konfidenzbereich für die LD_{50} (soweit dies möglich ist);
- Dosis/Mortalitätskurve und Slope-Faktor (falls durch die Bestimmungsmethode möglich);
- Sektionsbefunde;
- ggf. histopathologische Befunde;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Interpretation der Ergebnisse.

3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

B. 4. AKUTE TOXIZITÄT — HAUTREIZUNG**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definition

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird in einer einmaligen Dosierung auf die Haut mehrerer Versuchstiere aufgetragen, wobei jedes Tier als seine eigene Kontrolle dient. Der Grad der Reizung wird nach einer festgesetzten Zeit bestimmt und bewertet und anschließend beschrieben, um eine umfassende Beurteilung der Wirkung vornehmen zu können. Die Beobachtungsdauer sollte so bemessen sein, daß das Abklingen der Reizung miterfaßt wird.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung**

Etwa 24 Stunden vor dem Versuch wird das Fell auf dem Rücken der Versuchstiere geschoren oder rasiert. Dabei ist darauf zu achten, daß die Haut nicht verletzt wird. Es sind nur Tiere mit einer gesunden, unverletzten Haut zu verwenden.

Wird der Versuch mit festen Stoffen durchgeführt (die erforderlichenfalls pulverisiert werden), dann sollte die Prüfsubstanz ausreichend mit Wasser bzw. mit einem geeigneten Vehikel angefeuchtet werden, um einen guten Kontakt mit der Haut sicherzustellen. Bei der Verwendung eines Vehikels ist dessen Einfluß auf der Haut zu berücksichtigen. Flüssige Prüfsubstanzen werden im allgemeinen unverdünnt angewendet.

Stark saure oder alkalische Prüfsubstanzen brauchen aufgrund ihrer vorhersehbaren ätzenden Eigenschaft nicht auf primäre Hautreizungen getestet zu werden. Die Prüfung von Stoffen, die sich bei dermalen Verabreichung als sehr giftig herausgestellt haben, ist nicht erforderlich.

1.6.2. Versuchsbedingungen**1.6.2.1. Versuchstiere**

Es können verschiedene Säugetierarten verwendet werden; jedoch ist das Albino-Kaninchen die bevorzugte Tierart.

1.6.2.2. Anzahl der Tiere

Mindestens drei gesunde erwachsene Tiere sind erforderlich. Weitere Tiere können zur Klärung zweifelhafter Befunde notwendig sein.

1.6.2.3. Dosierungen

Sofern keine besonderen Gründe vorliegen, wird eine Dosis von 0,5 ml Flüssigkeit bzw. 0,5 g eines festen oder halbfesten Stoffes auf die vorbereitete Hautfläche aufgetragen. Unbehandelte Kontrolltiere sind nicht erforderlich, da angrenzende Stellen unbehandelter Haut bei den einzelnen Tieren als Kontrolle für den Versuch dienen.

1.6.2.4. Beobachtungszeitraum

Die Dauer des Beobachtungszeitraums sollte nicht starr festgelegt werden. Sie muß ausreichend lang bemessen sein, um die Reversibilität bzw. Irreversibilität der beobachteten Wirkungen bewerten zu können. Normalerweise brauchen dafür 14 Tage nach der Applikation nicht überschritten zu werden.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere sollen einzeln in Käfigen gehalten werden. Die Prüfsubstanz wird auf eine kleine Hautfläche (etwa 6 cm²) aufgetragen und mit einem Mullläppchen, das durch ein nicht-reizendes Pflaster gehalten wird, abgedeckt. Bei Flüssigkeiten bzw. Pasten kann es erforderlich sein, den Versuchsstoff erst auf das Mullläppchen zu geben und danach auf der Haut zu fixieren. Für die Dauer der Exposition sollte das Läppchen mit einem geeigneten Semi-Okklusivverband auf der Haut gehalten werden. Möglicherweise ist jedoch in einigen Fällen ein Okklusivverband besser geeignet. Es ist zu vermeiden, daß das Tier an den Mullverband gelangt und die Prüfsubstanz oral aufnehmen bzw. inhalieren kann.

Die Expositionsdauer beträgt 4 Stunden. Wenn anzunehmen ist, daß die Prüfsubstanz eine schwerwiegende Hautveränderung verursachen kann d. h. ätzend wirkt, so sollte die Expositionszeit verkürzt werden (z. B. auf 1 Stunde oder 3 Minuten). Wenn eine Expositionsdauer von weniger als 4 Stunden angewendet wird und dabei eine ausgeprägte Hautreaktion beobachtet wird, ist es nicht erforderlich, den Versuch mit einer 4-stündigen Expositionsdauer zu wiederholen. Längere Expositionszeiten sind unter bestimmten Voraussetzungen angezeigt, so z. B. durch die Art des zu erwartenden Kontaktes beim Menschen. Nach Ablauf der Expositionszeit wird die restliche Prüfsubstanz entfernt, falls möglich, mit Wasser oder einem geeigneten Reinigungsmittel, ohne daß dabei jedoch die Epidermis gereizt oder geschädigt wird.

1.6.3.1. Beobachtung und Bewertung

Die Tiere sind auf Anzeichen von Erythem und Hautödem zu beobachten, wobei die Reaktion 30—60 Minuten sowie 24, 48 und 72 Stunden nach Entfernen der Prüfsubstanz festgestellt wird. Die Hautreaktion wird entsprechend der Skala in der Anlage bestimmt und aufgezeichnet. Zur Feststellung der Reversibilität sind möglicherweise weitere Beobachtungen erforderlich. Neben der Beobachtung von Hautreizungen sind alle schwerwiegenden Veränderungen, wie z. B. Verätzungen (irreversible Zerstörung der Haut) und anderen toxischen Wirkungen ausführlich zu beschreiben.

2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jedes einzelne Versuchstier der Grad der Reizung durch Beurteilung des Hauterythems und des Hautödems zu den festgelegten Beobachtungszeitpunkten hervorgehen. Schwere Schädigungen, eine Bewertung des Grades und der Art der Hautreizung, der Ätzung oder Reversibilität bzw. Irreversibilität und jede sonstige toxische Wirkung sind ebenfalls zu vermerken.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**3.1. **Prüfbericht**

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Tierart, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Versuchsbedingungen (einschließlich der relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz und der Hautreinigungsverfahren);
- Auflistung der Art der Reizung für jedes einzelne Tier zu jedem Beobachtungszeitpunkt (1, 24, 48 und 72 Stunden usw. nach Entfernen des Mullverbandes);
- Beschreibung festgestellter ernsthafter Verletzungen, einschließlich Ätzung;
- ausführliche Beschreibung der Stärke und Art der festgestellten Reizung und ggf. der histopathologischen Befunde;
- Beschreibung weiterer toxischer Wirkungen über die festgestellten Hautreizungen hinaus;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

Anlage

HAUTREAKTIONSSKALA

Bildung von Erythem und Schorf

	Wert
Kein Erythem	0
Sehr leichtes Erythem (kaum wahrnehmbar)	1
Klar umschriebenes Erythem	2
Mittleres bis schweres Erythem	3
Schweres Erythem (starke Rötung) bis leichte Schorfbildung (tiefgehende Verletzungen)	4

Ödem-Bildung

Kein Ödem	0
Sehr leichtes Ödem (kaum wahrnehmbar)	1
Leichtes Ödem (Ränder der Stelle sind durch eine deutliche Schwellung klar umschrieben)	2
Mittleres Ödem (Schwellung etwa 1 mm)	3
Starkes Ödem (Schwellung mehr als 1 mm und über den Expositionsbereich hinaus)	4

B. 5. AKUTE TOXIZITÄT — AUGENREIZUNG**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definition

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird in einer einmaligen Dosierung bei jedem Versuchstier in eines der Augen eingebracht; das unbehandelte Auge dient als Kontrolle. Der Grad der Reizung wird nach einer festgesetzten Zeit bestimmt, bewertet und anschließend beschrieben, um eine umfassende Beurteilung der Wirkung vornehmen zu können. Die Beobachtungsdauer sollte so bemessen sein, daß sich die Reversibilität oder die Irreversibilität der eingetretenen Wirkung eindeutig bewerten läßt.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung**

24 Stunden vor dem Versuch werden bei jedem der ausgewählten Versuchstiere beide Augen untersucht. Tiere, bei denen bereits eine Augenreizung, ein Augendefekt oder eine Schädigung der Cornea vorliegt, werden vom Versuch ausgeschlossen.

Stark saure oder alkalische Prüfsubstanzen sowie Substanzen, deren ätzende Wirkung bereits bei Versuchen mit dermalen Applikation oder in sonstigen Prüfungen nachgewiesen wurde, brauchen nicht auf Augenreizung geprüft zu werden.

1.6.2. Versuchsbedingungen**1.6.2.1. Versuchstiere**

Es können verschiedene Versuchstierarten verwendet werden; jedoch ist das gesunde erwachsene Albino-Kaninchen die bevorzugte Tierart.

1.6.2.2. Anzahl der Tiere

Es sind mindestens drei Tiere zu verwenden. Weitere Tiere können zur Klärung zweifelhafter Befunde notwendig sein.

1.6.2.3. Dosierungen

Bei der Prüfung von Flüssigkeiten wird eine Dosis von 0,1 ml verwendet. Bei festen Stoffen, Pasten und partikelförmigen Substanzen sollten ca. 0,1 ml bzw. 0,1 g der zur prüfenden Substanz eingesetzt werden (das tatsächliche Gewicht muß jeweils angegeben werden). Handelt es sich um einen festen oder grobkörnigen Stoff, so ist er zu feinem Staub zu zermahlen. Das Volumen einer homogenen Substanz ist erst nach vorsichtiger Kompaktierung, z. B. durch Klopfen des Meßbehälters zu bestimmen.

1.6.2.4. Beobachtungszeitraum

Die Dauer des Beobachtungszeitraums sollte nicht starr festgelegt werden. Sie muß ausreichend lang bemessen sein, um die Reversibilität oder Irreversibilität der beobachteten Wirkungen bewerten zu können. Normalerweise brauchen dafür 21 Tage nach Applikation der Prüfsubstanz nicht überschritten zu werden.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere sollen einzeln in Käfigen gehalten werden. Die Prüfsubstanz wird bei jedem Tier in den Bindehautsack eines Auges appliziert, indem man das untere Lid leicht vom Augapfel abhebt. Die Lider werden dann etwa eine Sekunde lang leicht zusammengedrückt, damit keine Substanz verloren geht. Das andere, unbehandelte Auge dient als Kontrolle.

Die Augen der Versuchstiere sollen nicht früher als 24 Stunden nach Applikation der Prüfsubstanz ausgewaschen werden. Nach 24 Stunden kann ggf. eine Augenspülung erfolgen.

Substanzen, die bei diesem Testverfahren eine Reizung verursachen, können zusätzlich daraufhin geprüft werden, ob sich durch Auswaschen des Auges die reizende oder schädigende Wirkung vermindern läßt. In diesen Fällen wird empfohlen, 6 Versuchstiere zu verwenden. 4 Sekunden nach Applikation der Prüfsubstanz werden die Augen von drei Tieren ausgewaschen, und 30 Sekunden nach Applikation der Substanz die Augen der übrigen drei. Bei beiden Gruppen werden die Augen 5 Minuten lang mit Wasser ausgewaschen, wobei Menge und Fließgeschwindigkeit so zu wählen sind, daß keine Schäden entstehen.

1.6.3.1. Beobachtung und Bewertung

Die Augen sind nach 1, 24, 48 und 72 Stunden zu untersuchen. Treten nach 72 Stunden keine Anzeichen einer Reizung auf, kann der Versuch abgeschlossen werden.

Ist die Cornea in Mitleidenschaft gezogen bzw. treten weitere Reizungen an den Augen auf, so kann eine längerdauernde Beobachtung erforderlich sein, um die Entwicklung der Veränderungen und ihrer Reversibilität bzw. Irreversibilität zu bestimmen. Neben den Beobachtungen an Cornea, Iris und Bindehaut sind auch andere festgestellte Veränderungen aufzuzeichnen und im Bericht aufzuführen. Die Stärke der Augenreaktion wird bei jeder Untersuchung entsprechend der Skala in der Anlage bestimmt und aufgezeichnet.

Die Einstufung von Augenreaktionen läßt vielfältige Interpretationsmöglichkeiten zu. Um eine Bewertung der in Testlabors oder an sonstigen Stellen durchgeführten Beobachtungen zu erleichtern, können Vergleiche mit einer illustrierten Referenztafel für Augenreizungen vorgenommen werden.

Die Untersuchung der Reaktionen kann durch die Verwendung einer Binokularlupe, einer Spaltlampe, eines Augenmikroskops bzw. anderer geeigneter Einrichtungen erleichtert werden. Nach Aufzeichnung der Beobachtungen nach 24 Stunden können die Augen einiger bzw. aller Tiere außerdem mit Fluoreszein untersucht werden.

2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jedes einzelne Versuchstier eine Bewertung der Stärke und der Art der Reizung sowie schwerwiegende Veränderungen und sonstige festgestellte Wirkungen (nicht nur das Auge betreffend) zu den festgelegten Beobachtungszeitpunkten hervorgehen.

3. ABSCHLUSSBERICHT**3.1. Prüfbericht**

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Tierart, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Versuchsbedingungen (einschließlich der relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz);
- Auflistung der reizenden/ätzenden Wirkungen bei den einzelnen Tieren zu den Beobachtungszeitpunkten nach 1, 24, 48 und 72 Stunden;
- Beschreibung festgestellter ernster Veränderungen;
- ausführliche Beschreibung der Stärke und Art der festgestellten Reizung und Ätzung, einschließlich der Reversibilität;
- Beschreibung des Verfahrens zur Bewertung der Reizung nach 1, 24, 48 und 72 Stunden (z. B. Spaltlampe, Augenmikroskop, Fluoreszein us.);
- Beschreibung weiterer toxischer Wirkungen über die festgestellten Augenveränderungen hinaus;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

Anlage

EINTEILUNG DER AUGENVERÄNDERUNGEN

Cornea

<i>Opazität: Trübungsgrad</i> (für die Auswertung wird die dichteste Stelle genommen)	
Keine Ulzeration oder Opazität	0
Verstreute oder diffuse Opazitätsbereiche (ausgenommen leichte Trübung des normalen Glanzes), Einzelheiten der Iris klar sichtbar	1
Leicht erkennbarer durchscheinender Bereich, Einzelheiten der Iris etwas verschattet	2
Perlmutterartige Bereiche, keine Einzelheiten der Iris sichtbar, Größe der Pupille kaum erkennbar	3
Opake Cornea, Iris aufgrund der Opazität nicht erkennbar	4

Iris

Normal	0
Ausgesprochen vertiefte Falten, Kongestion, Schwellung, leichte circumcorneale Hyperämie oder Injektion; eines dieser Symptome bzw. eine Kombination der verschiedenen Symptome; die Iris reagiert noch auf Licht (träge Reaktion ist positiv)	1
Keine Reaktion auf Licht, Hämorrhagie, starke Zerstörung (ein bzw. alle Symptome)	2

Bindehäute

Rötung: Lider und/oder Nickhaut	
Blutgefäße normal	0
Einige Blutgefäße zeigen eine deutliche Hyperämie (Injektion)	1
Diffuse, karmesinrote Farbe, einzelne Gefäße nur schwer erkennbar	2
Diffuses kräftiges Rot	3
Chemosis: Lider und/oder Nickhaut	
keine Schwellung	0
Jede über dem Normalen liegende Schwellung (einschließlich Nickhaut)	1
Eindeutige Schwellung mit partieller Auswärtskehrung der Lider	2
Schwellung mit etwa halbgeschlossenen Lidern	3
Schwellung mit mehr als halbgeschlossenen Lidern	4

B. 6. AKUTE TOXIZITÄT — SENSIBILISIERUNG DER HAUT**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definition

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode/Meerschweinchen Maximierungstest

Nach einer Anfangsexposition mit einer Prüfsubstanz („Induktionsphase“) werden die Versuchstiere zwei Wochen nach der letzten Behandlung einer Auslösebehandlung („challenge“) ausgesetzt, um festzustellen, ob eine Überempfindlichkeit (Sensibilisierung) induziert wurde. Die Feststellung der Sensibilisierung erfolgt durch Untersuchung der Hautreaktion auf die Auslöseexposition (Challenge).

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung**

Gesunde junge Tiere (jünger als ein Jahr) werden randomisiert und den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt. Vor Verabreichung der Prüfsubstanz wird das Fell der Tiere im Schulterbereich geschoren oder rasiert. Dabei ist darauf zu achten, daß die Haut nicht verletzt wird.

1.6.2. Versuchsbedingungen**1.6.2.1. Versuchstiere**

Es werden Albino-Meerschweinchen benutzt.

1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Es können männliche und/oder weibliche Tiere benutzt werden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein.

Die Behandlungsgruppe besteht aus zwanzig Tieren, die Kontrollgruppe aus mindestens zehn Tieren. Der Einsatz einer geringeren Zahl ist zu begründen.

1.6.2.3. Dosierungen

Die Konzentration der Prüfsubstanz ist an die höchste Dosierung anzupassen, die in jeder Induktionsphase gut verträglich ist.

Die Auslöseexposition darf bei nicht sensibilisierten Tieren keine Hautreizung hervorrufen. Die entsprechende Konzentration läßt sich durch einen Vorversuch mit zwei bis drei Tieren bestimmen.

1.6.2.4. Beobachtungszeitraum

Während der Induktionsphase wird die Haut auf mögliche Reizwirkungen beobachtet. Nach der Auslöseexposition werden die Hautreaktionen nach 48 und 72 Stunden bewertet.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere werden sowohl vor Beginn der Induktionsphase als auch nach Abschluß des Versuchs gewogen. Die Schulterregion wird geschoren. Die Durchführung besteht aus zwei Phasen:

1.6.3.1. Induktion

Tag 0 — behandelte Gruppe

Die Tiere erhalten jeweils intrakutane Injektionen der genannten Substanzen in den Schulterbereich, wobei jede der folgenden Injektionen sowohl in die rechte als auch in die linke Schulter verabreicht wird:

1. 0,1 ml komplettes Freund'sches Adjuvans (Freund Complete Adjuvant = FCA),
2. 0,1 ml Prüfsubstanz, gegebenenfalls im Vehikel,
3. 0,1 ml Prüfsubstanz in FCA.

Die erste und zweite Injektion werden dicht beieinander in die Nähe des Kopfes gesetzt, die dritte in den hinteren Teil des Applikationsbereichs.

Tag 0 — Kontrollgruppe

Die Tiere erhalten an den gleichen Stellen wie oben beschrieben die folgenden intrakutanen Injektionen

1. 0,1 ml FCA,
2. 0,1 ml nur das Vehikel,
3. 0,1 ml Vehikel in FCA.

Tag 7 — behandelte Gruppe

Der Applikationsbereich wird erneut geschoren. Die in einem geeigneten Vehikel gelöste Prüfsubstanz (Flüssigkeiten können ggf. unmittelbar appliziert werden) wird auf ein Filterpapier aufgetragen und mit Hilfe einer geeigneten Abdeckung für 48 Stunden auf den Applikationsbereich fixiert.

Tag 7 — Kontrollgruppe

Der Applikationsbereich wird erneut geschoren. Das Vehikel allein wird in entsprechender Weise aufgebracht und mit einem geeigneten Verband für 48 Stunden fixiert.

1.6.3.2. Auslösung

Tag 21

Die Flanken der behandelten Versuchstiere sowie der Kontrolltiere werden geschoren. Auf die linke Flanke der behandelten Tiere wird ein Lämpchen bzw. feuchte Kammer mit der Prüfsubstanz und auf die rechte Flanke ein mit dem Vehikel getränktes Lämpchen (Kammer) aufgebracht.

Die Lämpchen werden mit einem geeigneten Verband für 24 Stunden in Kontakt mit der Haut gehalten.

Die Kontrollgruppe wird in gleicher Weise behandelt.

Tage 23 und 24

21 Stunden nach Entfernung des Läppchens wird die behandelte Hautfläche gesäubert und ggf. geschoren. 3 Stunden später (48 Stunden nach Beginn der Auslösung) wird die beobachtete Hautreaktion bewertet.

24 Stunden nach dieser Beobachtung (72 Stunden nach Beginn) erfolgt eine zweite Bewertung.

Sollte zur Klärung der Ergebnisse eine zweite Auslösung notwendig sein, so kann diese erforderlichenfalls mit einer neuen Vehikel-Kontrollgruppe eine Woche danach wiederholt werden.

1.6.3.3. Beobachtung und Bewertung

Alle Hautreaktionen und alle ungewöhnlichen Befunde sollten bewertet werden.

2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jedes Versuchstier die Hautreaktion zu den Beobachtungszeitpunkten hervorgehen.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- verwendeter Meerschweinchenstamm;
- Versuchsbedingungen;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Einzelgewicht der Tiere bei Beginn und bei Abschluß des Versuchs;
- alle an den Tieren beobachteten Reaktionen, einschließlich Beschreibung des Einstufungssystems (sofern angewendet);
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

Bemerkungen

Bei dem Maximierungstest am Meerschweinchen (MMT) handelt es sich um ein weitverbreitetes Adjuvans-Verfahren. Es gibt zahlreiche andere Verfahren (die in der Anlage aufgeführt sind), mit deren Hilfe sich feststellen läßt, ob eine Substanz in der Lage ist, eine Sensibilisierungsreaktion der Haut zu bewirken; der MMT gilt jedoch als die bevorzugte (Referenz-)Methode.

Die Empfindlichkeit und Fähigkeit dieses Tests, potentielle Sensibilatoren der menschlichen Haut zu ermitteln, sind von besonderer Bedeutung für ein Klassifizierungssystem der Toxizität im Bereich des öffentlichen Gesundheitswesens. Die Auswahl eines alternativen Testverfahrens muß sich nach den Kriterien der Validität richten. Zu diesen Kriterien zählt eine zu erwartende Reaktion auf Standard-Allergene wie z. B. 2,4-Dinitro-Chlorbenzol oder p-Phenylendiamin oder ein sonstiges wirksames Sensibilisierungsmittel, das zur Kategorie der getesteten Substanzen zählt.

Es gibt kein alleiniges Testverfahren, das geeignet ist, alle Substanzen mit einer potentiellen Sensibilisierungswirkung auf die menschliche Haut hinreichend zu ermitteln und das zudem für alle Substanzen relevant ist.

Bei der Auswahl der Tests sind Faktoren wie die physikalische Beschaffenheit einer Substanz, einschließlich ihrer Fähigkeit, die Haut zu durchdringen und der Art des Kontakts bei ggf. exponierten Menschen zu berücksichtigen.

Tests mit Meerschweinchen können unterteilt werden in Adjuvans-Tests, bei denen ein allergischer Zustand durch Auflösung oder Suspension der Prüfsubstanz im kompletten Adjuvans nach Freund (FCA) potenziert wird, und in die Tests, die ohne Adjuvans arbeiten. Manche Fälle rechtfertigen die Wahl eines Tests mit äußerlicher Applikation anstelle der intrakutanen Injektion wie sie im Maximierungstest am Meerschweinchen Anwendung findet. Zu den Entscheidungskriterien zählen wiederum die physikalischen Merkmale der Prüfsubstanz und die Voraussetzungen einer möglichen menschlichen Exposition.

Unabhängig von der Art des benutzten Tests muß die Empfindlichkeit des Meerschweinstammes, der für den Sensibilisierungstest der Haut eingesetzt wird, in regelmäßigen Zeitabständen (6 Monate) überprüft werden. Dazu sind bekannte hochwirksame und mäßig starke Sensibilisierungsmittel sowie eine ausreichende Zahl positiver Reaktionen hinzuzuziehen.

Anlage

Test	Draize	Kompletter Adjuvans-Test nach Freund FCA	„Maurer Optimisation“	Buehler	Offener Epicutan-Test	„Split-Adjuvans“
<i>Versuchstiere</i>	Meerschweinchen	Meerschweinchen	Meerschweinchen	Meerschweinchen	Meerschweinchen	Meerschweinchen
<i>Verabreichungsweg</i>	intracutan (i.c.)	intracutan (i.c.)	intracutan (i.c.)	epicutan (e.c.)	epicutan (e.c.)	i.c. und e.c.
<i>Zahl der Tiere in der Versuchsgruppe</i>	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
<i>Zahl der Versuchsgruppen</i>	1	1	1	1	1—6	1
<i>Zahl der Tiere in der Kontrollgruppe</i>	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
<i>Induktion</i>						
<i>Verabreichungsweg</i>	i.c.	i.c.	i.c.	e.c.	e.c.	i.c. und e.c.
<i>Zahl der Expositionen</i>	10	5	9	3	20 bzw. 21	4
<i>Expositionsdauer (Std.)</i>	—	—	24	jeweils 6	kontinuierlich	jeweils 48
<i>Pflasterart</i>	—	—	—	occlusiv	offen	geschlossen
<i>Versuchsgruppen</i>	PS (*)	PS (*) in FCA (**)	PS in FCA (**)	PS	PS	PS
<i>Kontrollgruppe</i>	—	—	—	—	nur Vehikel (v)	—
<i>Applikationsbereich</i>	linke Flanke	linke Flanke	Rücken	linke Flanke	rechte Flanke	Schulter
<i>Frequenz (Tage)</i>	jd. 2	jd. 2	jd. 2	alle 7	täglich	0, 2, 4, 7
<i>Dauer (Tage)</i>	0—18	0—8	0—21	0—14	0—20	0—7
<i>Konzentration</i>	2—10faches	immer gleich	0,1 ml (0,1 %ig)	immer gleich	gleichbleibend innerhalb einer Gruppe, ver- schieden für die einzelnen Grup- pen	immer gleich
<i>Auslösung</i>						
<i>Verabreichungsweg</i>	i.c.	e.c.	i.c.	e.c.	e.c.	e.c.
<i>Zahl der Expositionen</i>	1	2	1	1	2	1
<i>Tag(e)</i>	35	22—35	14—28	28	21, 35	20
<i>Expositionsdauer (Std.)</i>	—	—	24	6	—	24
<i>Pflasterart</i>	—	offen	—	occlusiv	offen	geschlossen
<i>Versuchsgruppe(n)</i>	PS	PS	PS	PS	PS	PS
<i>Kontrollgruppe</i>	PS	PS	PS	PS	PS	PS
<i>Applikationsbereich</i>	rechte Flanke	linke Flanke	Rücken, neue Stelle	rechte Flanke	linke Flanke	Schulter
<i>Konzentration</i>	wie erste Expositi- on	4 verschiedene	0,1 ml (1 %ig)	wie Induktion	4 verschiedene	Hälfte der In- duktion
<i>Beurteilung (Std. nach der Auslösung)</i>	24, 48	24, 48, 72	24	24, 48	24, 48 und/oder 72	24, 48

(*) PS = Prüfsubstanz.

(**) FCA = Freund'sches Adjuvans.

B. 7. SUBAKUTE TOXIZITÄT — ORAL**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Prüfmethode

Die Prüfsubstanz wird täglich in abgestuften Dosen mehreren Versuchstiergruppen oral verabreicht, und zwar eine Dosierung je Gruppe über einen Zeitraum von 28 Tagen. Während des Versuchszeitraums werden die Tiere täglich beobachtet, um Symptome toxischer Wirkungen festzustellen. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie bei Versuchsende überlebende Tiere werden sezziert.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung**

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungsgruppen zugeordnet.

Die Prüfsubstanz kann im Futter, mit der Schlundsonde, in Kapseln oder im Trinkwasser verabreicht werden. Bei allen Tieren sollte während des gesamten Versuchszeitraums die Prüfsubstanz nach der gleichen Methode verabreicht werden. Wird der Prüfsubstanz zur Vereinfachung der Verabreichung ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz beigegeben, muß dessen nicht-toxische Wirkung gesichert sein. Dazu können ggf. Daten aus früheren Versuchen herangezogen werden.

1.6.2. Versuchsbedingungen**1.6.2.1. Versuchstiere**

Soweit keine besonderen Gründe vorliegen, sollten die Versuche mit Ratten durchgeführt werden. Es sind junge gesunde Tiere bekannter Versuchstierstämme zu verwenden; bei Versuchsbeginn sollten die Ratten — falls möglich — weniger als 6 Wochen, in keinem Fall jedoch über 8 Wochen alt sein. Die Schwankung im Körpergewicht der Tiere des jeweiligen Versuchs sollte zu Beginn des Versuchs nicht mehr als $\pm 20\%$ vom Mittelwert betragen.

1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens 10 Tiere (5 weibliche und 5 männliche) sind für jede Dosierung zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 10 Tieren (5 Tiere pro Geschlecht) über 28 Tage mit der höchsten Dosierung behandelt werden. Während der darauffolgenden behandlungsfreien 14 Tage wird auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen geachtet.

1.6.2.3. Dosierungen

Es sind mindestens drei Dosierungs- und eine Kontrollgruppe zu wählen. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere. Wird zur Vereinfachung der Applikation ein Vehikel benutzt, so wird der Kontrollgruppe das Vehikel in gleicher Weise verabreicht wie den behandelten Tieren und zwar in der Menge, die die Gruppe mit der höchsten Dosierung erhält. Die höchste Dosierung muß so gewählt werden, daß auf jeden Fall toxische Effekte auftreten, die Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Dosierung darf keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Liegen Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so muß die niedrigste Dosierung diesen Wert überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Dosierung nur geringe toxische Effekte verursachen. Werden mehrere Zwischendosierungen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, daß es zu einer graduellen Abstufung der toxischen Wirkungen kommt.

In den Gruppen mit niedriger und mittlerer Dosierung sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl von Todesfällen gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

Wird die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht, so ist entweder eine konstante Konzentration (ppm oder mg/kg) im Futter oder eine konstante Dosierung in Relation zum Körpergewicht der Tiere zu wählen; jede Abweichung von diesem Schema ist zu begründen. Wird die Substanz mit der Schlundsonde verabreicht, sollte dies täglich zur gleichen Zeit erfolgen. Die Dosierungen sollten in regelmäßigen Zeitabständen (wöchentlich oder 14tägig) so angepaßt werden, daß in Relation zum Körpergewicht der Tiere ein konstantes Dosierungsniveau erhalten bleibt.

1.6.2.4. Limit-Test

Wird ein 28-Tage-Test nach dem nachfolgend beschriebenen Verfahren durchgeführt und verursacht die Verabreichung einer Dosis von 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bzw. einer höheren Dosis, die einer möglichen Exposition beim Menschen entspricht, keine toxischen Effekte, so kann auf eine weitere Prüfung verzichtet werden. Wird eine Prüfsubstanz mit geringer Toxizität mit dem Futter verabreicht, so muß sichergestellt sein, daß weder die zugeführte Menge noch sonstige Eigenschaften der Prüfsubstanz die normalen Ernährungsbedingungen der Tiere beeinträchtigen.

1.6.2.5. Beobachtungszeitraum

Alle Tiere sind täglich auf Vergiftungssymptome zu beobachten und deren zeitliches Auftreten, sowie Grad und Dauer aufzuzeichnen. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungssymptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz normalerweise an 7 Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 28 Tagen. Tiere einer Satellitengruppe, die für eine Nachfolgebeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 14 Tage ohne Behandlung gehalten werden, um die Reversibilität von toxischen Effekten bzw. deren Fortbestehen festzustellen.

Die Beobachtungen der Tiere sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, Atmung, Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Futterraufnahme (und die Wasseraufnahme bei Verabreichung der Prüfsubstanz im Trinkwasser) und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt.

Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um so weit wie möglich sicherzustellen, daß Tiere während des Versuchs nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe oder Fehler beim Umsetzen verlorengehen.

Nach Abschluß des Versuchs werden alle überlebenden Tiere mit Ausnahme der Satellitengruppe sezert. Sterbende Tiere sollten sofort ausgesondert und getötet werden.

Am Ende des Versuchs werden alle Tiere, einschließlich der Kontrolltiere, folgenden Untersuchungen unterzogen:

1. Die Hämatologie sollte mindestens die Bestimmung des Hämatokrit und Hämoglobinkonzentration, der Erythrozytenzahl, der Gesamt- und Differential-Leukozytenzahl sowie die Messung der Gerinnungsfähigkeit umfassen.

2. Klinisch-biochemische Analysen des Blutes:

Zur Beurteilung der Leber- und Nierenfunktion sollte zumindest je einer der folgenden Parameter bestimmt werden: Serum-Alanin-Aminotransferase (früher bekannt als Serum-Pyruvat-Transaminase), Serum-Aspartat-Aminotransferase (früher bekannt als Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), Harnstoff-Stickstoff, Albumin, Kreatinin, Gesamt-Bilirubin und Gesamt-Serum-Protein.

Bestimmungen weiterer blutchemischer Parameter, die ggf. für eine adäquate toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen: Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchtern-glukose, Lipide, Hormone, Säuren-Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität.

Zusätzliche klinisch-biochemische Analysen können ggf. notwendig sein, um die Untersuchung der beobachteten Effekte zu vertiefen.

1.6.3.1. Autopsie

An allen am Versuch beteiligten Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen. Leber, Nieren, Nebennieren und Hoden werden sobald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Organe und Gewebe (Leber, Niere, Milz, Nebennieren und Herz sowie alle Organe mit makroskopischen Veränderungen bzw. Größenveränderungen) sind im Hinblick auf spätere histopathologische Untersuchungen in einem geeigneten Medium aufzubewahren.

1.6.3.2. Histopathologische Untersuchung

Bei allen Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosierung sowie bei den Tieren der Kontrollgruppe ist eine histologische Untersuchung der konservierten Organe und Gewebe durchzuführen. Alle Organe und Gewebe, die in der Gruppe mit der höchsten Dosierung prüfsubstanzbedingte Schädigungen aufweisen, müssen auch bei allen anderen Gruppen mit geringerer Dosierung untersucht werden. Bei den Tieren der Satellitengruppe sind jene Organe und Gewebe mit besonderer Aufmerksamkeit zu untersuchen, bei denen in den behandelten Gruppen toxische Effekte auftraten.

2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Dosisgruppe und Kontrollgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs und die Anzahl der Tiere mit den einzelnen Schädigungsformen zu entnehmen sein.

Alle ermittelten Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Dazu kann jede anerkannte statistische Methode herangezogen werden.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Tierarten, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Versuchsbedingungen;
- Dosierungen (ggf. Vehikel) und Konzentrationen;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;
- nichttoxische Dosis, sofern bestimmbar;
- Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
- toxische bzw. andere Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futtermittelverbrauch und Körpergewichtsverlauf;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- klinisch-biochemische Tests und deren Ergebnisse;
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

B. 8. SUBAKUTE TOXIZITÄT — INHALATION**1. METODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definition

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Mehrere Versuchstiergruppen werden täglich über einen bestimmten Zeitraum der Prüfsubstanz in abgestuften Konzentrationen für 28 Tage ausgesetzt, wobei eine Konzentration für jede Gruppe verwendet wird. Wird ein Vehikel herangezogen, um eine geeignete Konzentration der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen, ist eine Vehikel-Kontrollgruppe einzusetzen. Während des Versuchszeitraums werden die Tiere täglich beobachtet, um Symptome toxischer Wirkungen festzustellen. Tiere, die während des Versuchs sterben sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden sezirt.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung**

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und der erforderlichen Zahl von Gruppen zugeordnet. Falls notwendig, kann der Prüfsubstanz ein geeignetes Vehikel beigegeben werden, um die gewünschte Konzentration der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen. Wird zur Vereinfachung der Dosierung ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz verwendet, muß dessen nichttoxische Wirkung gesichert sein. Dazu können ggf. Daten aus früheren Versuchen herangezogen werden.

1.6.2. Versuchsbedingungen**1.6.2.1. Versuchstiere**

Soweit keine besonderen Gründe vorliegen, sollten die Versuche mit Ratten durchgeführt werden. Es sind junge gesunde Tiere bekannter Versuchstierstämme zu verwenden. Die Schwankung im Körpergewicht der Tiere des jeweiligen Versuchs sollte zu Beginn des Versuchs nicht mehr als $\pm 20\%$ vom Mittelwert betragen.

1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens 10 Tiere (5 männliche und 5 weibliche) sollen für jede Dosierung verwendet werden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollten im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die vor

Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 10 Tieren (5 Tiere pro Geschlecht) über 28 Tage der höchsten Konzentration ausgesetzt werden. Während der darauffolgenden expositionsfreien 14 Tage wird auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen geachtet.

1.6.2.3. Expositionskonzentration

Es sind mindestens drei Konzentrationen sowie eine Kontrollgruppe und — sofern ein Vehikel benutzt wurde — eine Vehikel-Kontrollgruppe (entsprechend der Konzentration des Vehikels bei der höchsten Expositionskonzentration) zu wählen. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere. Die höchste Konzentration ist so zu wählen, daß auf jeden Fall toxische Effekte auftreten, die Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Konzentration darf keine Anzeichen von Toxizität verursachen. Liegen Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so muß die niedrigste Konzentration diesen Wert überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Konzentration nur geringe toxische Effekte verursachen. Werden mehrere Zwischen-Konzentrationen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, daß es zu einer graduellen Abstufung der toxischen Effekte kommt. In den Gruppen der niedrigen und der Zwischen-Konzentrationen sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl von Todesfällen gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

1.6.2.4. Expositionszeit

Die tägliche Expositionszeit sollte 6 Stunden betragen; aufgrund spezifischer Erfordernisse können sich ggf. andere Zeiten als notwendig erweisen.

1.6.2.5. Ausrüstung

Für die Tierversuche sollte eine Inhalationsanlage benutzt werden, die einen dynamischen Luftstrom mit einem Luftwechsel von mindestens 12 mal pro Stunde ermöglicht, um einen adäquaten Sauerstoffgehalt und eine gleichmäßig verteilte Expositionsatmosphäre zu gewährleisten.

Wird eine Kammer verwendet, so ist sie so zu gestalten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden und die Exposition durch Inhalation der Prüfsubstanz maximiert wird. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte grundsätzlich das „Gesamtvolumen“ der Versuchstiere 5 % des Kammervolumens nicht überschreiten. Es sind Expositionen des Mund-Nasen-Bereichs, des Kopfes oder des ganzen Körpers in Inhalationskammern möglich; die beiden ersten Expositionsarten dienen dazu, die Aufnahme der Prüfsubstanz auf anderen Wegen einzuschränken.

1.6.2.6. Beobachtungszeitraum

Die Versuchstiere sind während des gesamten Behandlungszeitraums und der expositionsfreien Phase täglich auf Vergiftungssymptome zu beobachten. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungssymptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere werden der Prüfsubstanz täglich an 5—7 Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 28 Tagen ausgesetzt. Die Tiere einer Satellitengruppe, die für eine Nachbeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 14 Tage ohne Exposition gehalten werden, um die Reversibilität von toxischen Effekten bzw. deren Fortbestehen festzustellen. Die Temperatur soll während des Versuchs $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ betragen. Die relative Feuchtigkeit soll zwischen 30 % und 70 % liegen, ausgenommen in den Fällen, wo dies nicht durchführbar ist (z. B. Versuche mit Aerosolen). Während der Exposition werden weder Futter noch Wasser verabreicht.

Es soll ein dynamisches Inhalationssystem mit einem geeigneten analytischen Verfahren zur Bestimmung der Konzentration benutzt werden. Um brauchbare Expositionskonzentrationen zu erhalten, wird ein

Vorversuch empfohlen. Die Luftdurchflußrate ist so einzustellen, daß die Bedingungen in der gesamten Expositions-kammer einheitlich sind. Das System soll gewährleisten, daß konstante Expositionsbedingungen so schnell wie möglich erreicht werden.

Die folgenden Messungen oder Überwachung sollten durchgeführt werden:

- a) Messung der Luftdurchflußrate (kontinuierlich).
- b) Die tatsächliche Konzentration der Prüfsubstanz wird im Atembereich gemessen. Während der täglichen Expositions-dauer darf die Konzentration nicht mehr als $\pm 15\%$ vom Mittelwert variieren. Bei Stäuben und einigen Aerosolen, wo dies nicht erreichbar ist, wird ein größerer Streubereich akzeptiert. Während der gesamten Versuchsdauer ist die Konzentration von Tag zu Tag so konstant wie möglich zu halten. Was Teilchen und Aerosole betrifft, wird die Teilchengrößenverteilung so oft wie nötig gemessen, um deren Konstanz festzulegen.
- c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit.
- d) Während und nach der Exposition werden die Tiere beobachtet und die Befunde aufgezeichnet und im Bericht für jedes Tier festgehalten. Alle Tiere sollen täglich auf Anzeichen toxischer Effekte beobachtet und deren Auftreten, Grad und Dauer aufgezeichnet werden. Die Beobachtungen der Tiere sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, Atmung, Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Futteraufnahme und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt.

Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um so weit wie möglich sicherzustellen, daß Tiere während des Versuchs nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe oder Fehler beim Umsetzen verloren gehen. Nach Abschluß der Expositionsphase werden alle überlebenden Tiere mit Ausnahme der Satellitengruppe seziert. Sterbende Tiere sollten sofort ausgesondert und getötet werden.

Am Ende des Versuchs werden alle Tiere, einschließlich der Kontrolltiere, folgenden Untersuchungen unterzogen:

- i) Die Hämatologie sollte mindestens die Bestimmung des Hämatokrit und der Hämoglobinkonzentration, der Erythrozytenzahl, der Gesamt- und Differenzial-Leukozytenzahl sowie die Messung der Gerinnungsfähigkeit umfassen.
- ii) Klinisch-biochemische Analysen des Blutes: Zur Beurteilung der Leber- und Nierenfunktion sollte zumindest je einer der folgenden Parameter bestimmt werden:

Serum — Alanin — Aminotransferase (früher bekannt als Serum — Glutamat — Pyruvat — Transaminase), Serum — Aspartate — Aminotransferase (früher bekannt als Serum — Glutamat — Oxalazetat — Transaminase), Harnstoff — Stickstoff, Albumin, Kreatinin, Gesamt-Bilirubin und Gesamt-Serum-Protein.

Bestimmungen weiterer blutchemischer Parameter, die ggf. für eine adäquate toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen:

Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchtern-glukose, Lipide, Hormone, Säuren-Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität usw. Zusätzliche klinisch-biochemische Analysen können ggf. erforderlich sein, um die Untersuchung der beobachteten Effekte zu vertiefen.

1.6.3.1. Autopsie

An allen am Versuch beteiligten Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen. Leber, Nieren, Nebennieren und Hoden werden so bald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Organe und Gewebe (Atmungs-trakt, Leber, Nieren, Milz, Nebennieren, Herz und alle Organe mit makroskopischen Veränderungen bzw. Größenveränderungen) sind im Hinblick auf spätere histopathologische Untersuchungen in einem geeigneten Medium aufzubewahren.

Nase, Pharynx und Lungen sind vollständig zu entnehmen, zu wiegen (Lunge) und mit einem geeigneten Fixativ zu behandeln, um die Lungenstruktur zu erhalten. Am besten eignet sich hierzu die Perfusion der Lunge mit einer Fixierflüssigkeit.

1.6.3.2. Histopathologische Untersuchung

Bei allen Tieren der Gruppe mit der höchsten Konzentration sowie bei den Tieren der Kontrollgruppe(n) ist eine histologische Untersuchung der konservierten Organe und Gewebe durchzuführen. Alle Organe und Gewebe, die in der Gruppe mit der höchsten Konzentration prüfsubstanzbefindliche Schädigungen aufweisen, müssen auch bei allen anderen Gruppen mit geringerer Konzentration untersucht werden. Bei den Tieren der Satellitengruppe sind jene Organe und Gewebe mit besonderer Aufmerksamkeit zu untersuchen, bei denen in den behandelten Gruppen toxische Effekte auftraten.

2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Dosisgruppe und Kontrollgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs und die Anzahl der Tiere mit den einzelnen Schädigungsformen zu entnehmen sein.

Alle ermittelten Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Dazu kann jede anerkannte statistische Methode herangezogen werden.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Tierarten, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Versuchsbedingungen;
- Beschreibung des Expositionsapparats einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Partikel- und Aerosolerzeugung, Klimatisierungssystem, Behandlung der Abluft und Art der Unterbringung der Tiere in einer Versuchskammer. Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und ggf. Konstanz der Aerosolkonzentration oder Teilchengröße sind zu beschreiben.
- Expositionsdaten
Diese Daten sind in tabellarischer Form zusammenzustellen und unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankung (z. B. Standardabweichung) darzustellen. Sie müssen folgende Angaben enthalten:
 - a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage,
 - b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit,
 - c) nominale Konzentration (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wurde, dividiert durch das Luftvolumen),
 - d) ggf. Art des Vehikels
 - e) tatsächliche Konzentration im Atembereich,
 - f) mittlere Teilchengrößen (sofern erforderlich);
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Konzentration;
- Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
- toxische bzw. andere Wirkungen; die Dosierung, bei der keine toxischen Effekte auftraten) no-effect level -NEL);
- Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungsanzeichen und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Fütterung und Körpergewicht;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;

- klinisch-biochemische Tests und deren Ergebnisse;
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, falls möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

B. 9. SUBAKUTE TOXIZITÄT — DERMAL**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methoden

Die Prüfsubstanz wird in abgestuften Dosen täglich mehreren Versuchstiergruppen auf die Haut aufgetragen, und zwar eine Dosierung je Gruppe über einen Zeitraum von 28 Tagen. Während des Versuchszeitraums werden die Tiere täglich beobachtet, um Symptome toxischer Wirkungen festzustellen. Tiere, die während des Versuchs sterben sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden seziiert.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung**

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeordnet. Kurz vor Versuchsbeginn wird das Fell auf dem Rücken der Versuchstiere geschoren. Ein Abrasieren des Fells ist ebenfalls möglich, sollte jedoch 24 Stunden vor dem Versuch erfolgen. Das Scheren oder Rasieren muß normalerweise wöchentlich wiederholt werden. Es ist darauf zu achten, daß dabei die Haut nicht verletzt wird. Mindestens 10 % der Körperoberfläche wird für die Applikation vorbereitet. Bei der Bestimmung des zu scherenen Bereichs und der Applikationsfläche ist das Gewicht der Tiere zu berücksichtigen. Werden Versuche mit festen Stoffen durchgeführt, die gegebenenfalls pulverisiert werden können, sollte die Prüfsubstanz ausreichend mit Wasser, oder ggf. in anderer geeigneter Form angefeuchtet werden, um einen guten Kontakt mit der Haut sicherzustellen. Flüssige Prüfsubstanzen werden gewöhnlich unverdünnt angewendet. Die Applikation erfolgt normalerweise an 5 bis 7 Tagen pro Woche.

1.6.2. Versuchsbedingungen**1.6.2.1. Versuchstiere**

Es können erwachsene Ratten, Kaninchen oder Meerschweinchen verwendet werden. Auch andere Tierarten können benutzt werden, jedoch muß ihre Verwendung begründet werden. Zu Beginn des Versuchs sollte die Schwankung des Körpergewichts der Tiere des jeweiligen Versuchs nicht mehr als $\pm 20\%$ vom Mittelwert betragen.

1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens 10 Tiere (5 weibliche und 5 männliche) mit gesunder unbeschädigter Haut sollen für jede Dosierung verwendet werden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 10 Tieren (5 pro Geschlecht) über 28 Tage mit der höchsten Dosierung behandelt werden. Während der darauffolgenden behandlungsfreien 14 Tage wird auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen geachtet.

1.6.2.3. Dosierungen

Es sind mindestens drei Dosierungen sowie eine Kontrollgruppe und — sofern ein Vehikel benutzt wurde — eine Vehikel-Kontrollgruppe zu wählen. Die Einwirkungszeit sollte mindestens 6 Stunden pro Tag betragen. Die Applikation der Prüfsubstanz sollte täglich zur gleichen Zeit erfolgen. Eine Anpassung der Dosierung an das Körpergewicht ist in festgesetzten Intervallen (wöchentlich oder 14tägig) vorzunehmen, um in Relation zum Körpergewicht des Tieres ein konstantes Dosierungsniveau zu erhalten. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere. Wird zur Erleichterung der Applikation ein Vehikel benutzt, so wird der Kontrollgruppe das Vehikel in gleicher Weise verabreicht wie den behandelten Tieren und zwar in der Menge, die die Gruppe mit der höchsten Dosierung erhält. Die höchste Dosierung muß so gewählt werden, daß auf jeden Fall toxische Effekte auftreten, die Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Dosierung darf keine Anzeichen von Toxizität verursachen. Liegen Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, muß die niedrigste Dosierung diesen Wert überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Dosierung nur geringe toxische Wirkungen verursachen. Werden mehrere Zwischendosierungen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, daß es zu einer graduellen Abstufung der toxischen Wirkungen kommt. In den Gruppen mit niedriger und mittlerer Dosierung sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl von Todesfällen gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen. Führt die Applikation der Prüfsubstanz zu schweren Hautreizungen, sollte die Konzentration herabgesetzt werden, was bei hoher Dosierung zu einer Verminderung oder einem Ausbleiben sonstiger toxischer Wirkungen führen könnte. Wurde überdies die Haut stark beschädigt, ist es u. U. notwendig, den Versuch abzubrechen und mit einer geringeren Konzentration erneut durchzuführen.

1.6.2.4. Limit-Tests

Verursacht bei Durchführung einer Vorstudie die Verabreichung einer Dosis von 1 000 mg/kg bzw. einer höheren Dosis, die einer möglichen Exposition beim Menschen entspricht, keine toxischen Auswirkungen, so ist eine weitere Prüfung nicht erforderlich.

1.6.2.5. Beobachtungszeitraum

Alle Tiere sind täglich auf Vergiftungssymptome zu beobachten. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungssymptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere sollen in Einzelkäfigen gehalten werden. Sie erhalten die Prüfsubstanz vorzugsweise an 7 Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Tiere einer Satellitengruppe, die für eine Nachbeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 14 Tage ohne Behandlung gehalten werden, um die Reversibilität von Vergiftungssymptomen bzw. deren Fortbestehen zu beobachten. Die Expositionszeit beträgt mindestens 6 Stunden pro Tag.

Die Prüfsubstanz ist einheitlich auf einen Bereich, der etwa 10 % der Körperoberfläche entspricht, aufzutragen. Bei hochtoxischen Substanzen kann die behandelte Oberfläche kleiner sein, es sollte jedoch ein möglichst großer Bereich mit einer möglichst dünnen und einheitlichen Schicht exponiert werden.

Die Prüfsubstanz ist während der Expositionszeit mit einem porösen Mullverband und einem hautschonenden Plaster in Kontakt mit der Haut zu halten. Die Versuchsfläche ist außerdem auf eine geeignete Art abzudecken, um den Mullverband und die Prüfsubstanz zu fixieren und sicherzustellen, daß die

Tiere die Prüfsubstanz nicht oral aufnehmen können. Es können auch Mittel zur Einschränkung der Bewegungsfreiheit angewendet werden, damit die Tiere die Prüfsubstanz nicht oral aufnehmen können; eine vollständige Immobilisation ist jedoch nicht zu empfehlen.

Nach Ablauf der Expositionszeit entfernt man — soweit möglich — den Rest der Prüfsubstanz, und zwar unter Verwendung von Wasser oder eines anderen Hautreinigungsverfahrens.

Alle Tiere sollen täglich beobachtet und Vergiftungssymptome sowie deren Beginn, Grad und Dauer aufgezeichnet werden.

Die Beobachtungen sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, Atmung, Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Futterraufnahme und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt.

Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um sicherzustellen, daß Tiere während des Versuchs nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe oder Fehler beim Umsetzen verloren gehen. Nach Abschluß des Versuchs werden alle überlebenden Tiere mit Ausnahme der Satellitengruppe seziiert. Sterbende Tiere sollten sofort ausgesondert und getötet werden.

Am Ende des Versuchs werden alle Tiere, einschließlich der Kontrolltiere, folgenden Untersuchungen unterzogen:

1. Die Hämatologie sollte mindestens die Bestimmung des Hämatokrit und der Hämoglobinkonzentration, der Erythrozytenzahl, der Gesamt- und Differential-Leukozytenzahl sowie die Messung der Gerinnungsfähigkeit umfassen.
2. Klinisch-biochemische Analysen des Blutes: Zur Beurteilung der Leber- und Nierenfunktion sollte zumindest je einer der folgenden Parameter bestimmt werden: Serum — Alanin — Aminotransferase (früher bekannt als Serum — Glutamat — Pyruvat — Transaminase), Serum — Aspartate — Aminotransferase (früher bekannt als Serum — Glutamat — Oxalacetat — Transaminase), Harnstoff — Stickstoff, Albumin, Kreatinin, Gesamt-Bilirubin und Gesamt-Serum-Protein.

Bestimmungen weiterer blutchemischer Parameter, die ggf. für eine adäquate toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen:

Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchtern glukose, Lipide, Hormone, Säuren-Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität.

Zusätzlich klinisch-biochemische Analysen könne ggf. erforderlich sein, um die Untersuchung der beobachteten Effekte zu vertiefen.

1.6.4. *Autopsie*

An allen am Versuch beteiligten Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen. Leber, Nieren, Nebennieren und Hoden werden sobald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Organe und Gewebe, d. h. unbehandelte und behandelte Haut, Leber, Nieren und Zielorgane (Organe mit makroskopischen Veränderungen und Größenveränderungen) sind in einem geeigneten Medium für spätere histopathologische Untersuchungen aufzubewahren.

1.6.5. *Histopathologische Untersuchungen*

Bei allen Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosierung sowie bei den Tieren der Kontrollgruppe ist eine histologische Untersuchung der konservierten Organe und Gewebe durchzuführen. Alle Organe und Gewebe, die in der Gruppe mit der höchsten Dosierung prüfsubstanzbedingte Schädigungen aufweisen, müssen auch bei allen anderen Gruppen mit geringerer Dosierung untersucht werden. Bei den Tieren der Satellitengruppe sind jene Organe und Gewebe mit besonderer Aufmerksamkeit zu untersuchen, bei denen in den behandelten Gruppen toxische Effekte auftraten.

2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Dosisgruppe und Kontrollgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs und die Anzahl der Tiere mit den einzelnen Schädigungsformen zu entnehmen sein.

Alle ermittelten Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Dazu kann jede anerkannte statistische Methode herangezogen werden.

3. ABSCHLUSSBERICHT**3.1. Prüfbericht**

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Tiere (Art, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.);
- Versuchsbedingungen;
- Dosierungen (ggf. Vehikel) und Konzentrationen;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;
- No-effect level (NEL), falls möglich;
- Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
- toxische oder andere Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angabe über Fütterung und Körpergewichte;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- klinisch-biochemische Tests und deren Ergebnisse;
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, falls möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

**B. 10. SONSTIGE WIRKUNG — MUTAGENITÄT
IN VITRO — SÄUGER ZYTOGENETISCHER TEST****1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A),

1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Dieser in vitro-zytogenetische Test ist ein Kurzzeit-Mutagenitätstest zum Nachweis von strukturellen Chromosomenaberrationen an kultivierten Säugetierzellen. Sowohl Kulturen etablierter Zelllinien als auch Primärkulturen können verwendet werden. Nach Exposition gegenüber der Prüfsubstanz mit und ohne einem Leberenzym-Aktivierungsgemisch (post-mitochondriale Fraktion mit Co-Faktorzusatz) werden die Zellkulturen mit einem Spindelgift, z. B. Colchizin behandelt, um eine Anreicherung von Metaphasen (sog. C-Metaphasen) zu erhalten.

Die Zellen werden zu geeigneten Zeitpunkten aufgearbeitet und Chromosomen-Präparate hergestellt. Die Präparate werden gefärbt, und die Metaphasen werden im Hinblick auf Chromosomenveränderungen untersucht.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung**

Vor Exposition der Zellen werden die Prüfchemikalien in Kulturmedien bzw. in geeigneten Trägermedien gelöst. Es werden etablierte Zelllinien bzw. Primärkulturen verwendet, z. B. Zellen von Chinesischen Hamstern oder menschlichen Lymphozyten.

1.6.2. Prüfbedingungen**Zahl der Kulturen**

Für jeden experimentellen Punkt werden mindestens zwei Kulturen verwendet.

Negativ- und Positiv-Kontrollen sind durchzuführen. Das Lösungsmittel (falls weder das Kulturmedium noch Wasser das Lösungsmittel sind), Lösungsmittel mit Leberenzym-Aktivierungsgemisch sowie unbehandelte Kontrollen sind als Negativ-Kontrollen zu verwenden.

Außerdem umfaßt jeder Versuch eine Positiv-Kontrolle. Wird ein Leberenzym-Aktivierungsgemisch zur Aktivierung der Testchemikalie verwendet, so ist eine Verbindung als Positiv-Kontrolle einzusetzen, die erwiesenermaßen eine Stoffwechselaktivierung erfordert.

Konzentrationen

Mindestens 3 Konzentrationen der Prüfsubstanz sind einzusetzen. Der Konzentrationsbereich sollte sich mindestens über eine Zehnerpotenz erstrecken, wobei die höchste Konzentration die Mitoseaktivität um etwa 50 % hemmen sollte.

Kulturbedingungen

Geeignete Kulturmedien und Kulturbedingungen (z. B. Temperatur, verwendete Kulturgefäße, CO₂-Konzentrationen sowie Feuchtigkeit), sind zu verwenden.

1.6.3. Versuchsdurchführung

1.6.3.1. Präparation der Kulturen

Etablierte Zelllinien: Zellen werden aus Stamm-Kulturen gewonnen (z. B. durch Trypsinierung bzw. Abschütteln), in geeigneter Dichte in Kulturgefäße ausgesät und bei 37° C kultiviert.

Menschliche Lymphozyten: heparinisertes Blut wird einem Kulturmedium zugesetzt, daß Phytohämagglutinin, fetales Kälberserum und Antibiotika enthält. Die Kultivierung erfolgt bei 37° C.

1.6.3.2. Behandlung der Kulturen mit der Prüfsubstanz

i) Behandlung ohne Leberenzym-Aktivierungsgemisch

Alle Behandlungen sollten den Zeitraum eines gesamten Zellzyklus abdecken. Der Fixierungszeitpunkt ist so zu wählen, daß nach der Behandlung der Zellen die ersten auftretenden Mitosen analysiert werden. Umfaßt die Behandlung nicht die gesamte Länge eines Zellzyklus, so sind verschiedene Fixationszeiten zu wählen, um Zellen zu sammeln, die sich während der Behandlung in verschiedenen Phasen des Zellzyklus (d. h. G₁, S und G₂) während der Exposition befanden.

Die Prüfchemikalien werden Kulturen mit etablierten Zelllinien in der exponentiellen Wachstumsphase beigegeben. Menschliche Lymphozyten werden im semisynchronen Zustand behandelt.

Verändert die Prüfchemikalie die Dauer des Zellzyklus, ist das Fixierungsintervall entsprechend zu ändern.

ii) Behandlung unter Zusatz eines Leberenzym-Aktivierungsgemisches

Die Prüfsubstanz sollte so lange wie möglich zusammen mit dem Aktivierungssystem zur Behandlung anwesend sein, ohne dabei eine toxische Wirkung auf die Zellen auszuüben. Sollte aus Gründen der Toxizität diese Behandlung nicht die Dauer eines vollen Zellzyklus umfassen, sind verschiedene Fixationszeiten zu wählen, um Zellen zu sammeln, die sich während der Exposition in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befanden (z. B. G₁, S und G₂).

Aufarbeitung der Zellen

Zellkulturen werden 1 bis 2 Stunden vor Entnahme mit dem Spindelgift behandelt. Die einzelnen Kulturen werden jeweils getrennt geerntet und für die Chromosomen-Präparation aufgearbeitet.

1.6.3.3. Präparation der Chromosomen

Die Präparation der Chromosomen umfaßt hypotonische Behandlung der Zellen, Fixierung, Aufbringen auf Objektträger und Färbung.

Analyse

Mindestens 100 gut gespreitete Metaphasen pro Kultur werden auf Chromosomenaberrationen analysiert. Objektträger werden vor der Analyse kodiert.

Bei menschlichen Lymphozyten werden nur Metaphasen mit 46 Zentromeren analysiert. In etablierten Zelllinien werden auch Metaphasen ausgewertet, deren Zahl um ± 2 Zentromeren von der Modalzahl abweicht.

2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Aberrationen vom Chromatid-Typ (Gaps, Brüche, Interchanges), Aberrationen vom Chromosomen-Typ (Gaps, Brüche, Minutes, Ringe, dizentrische und polyzentrische Chromosomen) und die Zahl der aberranten Metaphasen (einschließlich und ausschließlich Gaps) werden getrennt für alle behandelten Kulturen und Kontrollkulturen aufgeführt.

Die Daten werden anhand geeigneter statistischer Methoden ausgewertet.

3. ABSCHLUSSBERICHT**3.1. Prüfbericht**

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Verwendete Zellen;
- Versuchsbedingungen: Zusammensetzung des Mediums, CO₂;
- Konzentration, Kultivierungstemperatur, Kultivierungszeit, Dosierung, Behandlungszeit, Dauer der Behandlung mit dem Spindelgift sowie die jeweilige Konzentration, Art des verwendeten Leberenzym-Aktivierungsgemisches, Positiv- und Negativ-Kontrollen;
- Anzahl der Zellkulturen;
- Anzahl der analysierten Metaphasen (getrennte Daten für die einzelnen Kulturen);
- Mitoseindex;
- Art und Anzahl der Aberrationen pro behandelte Kultur und pro Kontrollkultur;
- Modalzahl der Chromosomen in den verwendeten etablierten Zelllinien;
- Statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

B. 11. SONSTIGE WIRKUNG — MUTAGENITÄT**— IN VIVO — SÄUGER KNOCHENMARK — ZYTOGENETISCHER TEST — CHROMOSOMENANALYSE****1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A)

1.2. Definition

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B)

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Dieser *in vivo*-zytogenetische Test ist ein Kurzzeit-Mutagenitätstest zum Nachweis von strukturellen Chromosomenaberrationen. Im allgemeinen werden Chromosomenaberrationen in den ersten Mitosen nach der Behandlung analysiert. Bei chemischen Mutagenen sind die meisten der induzierten Aberrationen vom Chromatid-Typ.

Bei dieser Prüfmethode werden Säugetiere verwendet, denen die Prüfsubstanzen auf geeignetem Wege verabreicht wird und die zu bestimmten Zeiten getötet werden, um anschließend Zellen aus dem Knochenmark aufzuarbeiten. Die Tiere werden außerdem, bevor man sie tötet, mit einem Spindelgift, z. B. Colchizin behandelt, um Metaphasen (sog. C-Metaphasen) anzureichern. Aus den Zellen werden luftgetrocknete Chromosomen-Präparate hergestellt und gefärbt. Die Metaphasen werden mikroskopisch auf das Auftreten von Chromosomenaberrationen untersucht.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung**

Die Prüfsubstanzen werden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Falls hierin unlöslich, werden sie in geeigneten Trägermedien gelöst oder suspendiert.

Verwendung finden frisch angesetzte Lösungen der Prüfsubstanz.

Wird ein Trägermedium verwendet, um die Dosierung zu erleichtern, so darf es weder mit der Prüfsubstanz reagieren noch toxisch wirken.

1.6.2. Prüfbedingungen**1.6.2.1. Versuchstiere**

Eingesetzt werden Nagetiere, z. B. Ratten, Mäuse oder Chinesische Hamster. Gesunde ausgewachsene Tiere im jugendlichen Stadium werden randomisiert und den Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt.

1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens fünf (5) weibliche und fünf (5) männliche Tiere werden pro Versuchs- und Kontrollgruppe eingesetzt. Sieht der Versuchsplan mehrere Aufarbeitungszeiten nach der Behandlung vor, so sind also 10 Tiere pro Aufarbeitungszeit und Gruppe einzusetzen.

1.6.2.3. Art der Verabreichung

Im allgemeinen sollten die Prüfsubstanzen nur einmal verabreicht werden. Auf der Grundlage toxikologischer Informationen sind wiederholte Behandlungen möglich. Sie sind jedoch nur angebracht, wenn die Prüfsubstanz keine zytotoxischen Auswirkungen auf Zellen des Knochenmarks hat. Übliche Arten der Verabreichung sind die orale Applikation oder die intraperitoneale Injektion. Gegebenenfalls eignen sich auch andere Arten der Verabreichung.

1.6.2.4. Negativ- und Positiv-Kontrollen

Als Positiv-Kontrollsubstanz wird eine Verbindung eingesetzt, von der bekannt ist, daß sie in vivo Chromosomen-Aberrationen verursacht. Eine Negativ-(Lösungsmittel)-Kontrollgruppe ist ebenfalls Bestandteil jedes Versuchs.

1.6.2.5. Dosierungen

In der Grundstufe wird eine (1) Dosis der Prüfsubstanz verwendet. Dabei handelt es sich um die maximal verträgliche Dosis oder eine solche Dosis, die gewisse Anzeichen von Zytotoxizität verursacht, z. B. partielle Mitosehemmung.

Zusätzliche Dosierungen können gewählt werden, falls dies aus wissenschaftlichen Gründen angezeigt erscheint.

Dient der Test als Methode zur Verifizierung, sollten zumindest zwei weitere Dosierungen eingesetzt werden.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Der Test kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen:

- i) Die Tiere werden einmal mit der maximal verträglichen Dosis behandelt. Die Aufarbeitung erfolgt zu drei verschiedenen Zeiten nach der Behandlung. Der mittlere Aufarbeitungszeitpunkt ist 24 Stunden nach der Behandlung.

Da die Zellzykluskinetik durch die Prüfchemikalie beeinflusst werden kann, erfolgt zusätzlich eine Aufarbeitung zu einem früheren und zu einem späteren Zeitpunkt, und zwar innerhalb von 6 bis 48 Stunden nach der Behandlung.

Bei zusätzlichen Dosisgruppen der Prüfsubstanz sollte die Aufarbeitung zu einem Zeitpunkt höchster Aberrationshäufigkeit erfolgen. Falls dieser nicht bekannt ist, werden die Tiere 24 Stunden nach der Behandlung getötet.

- ii) Lassen Informationen über die Pharmakokinetik und den Metabolismus wiederholte Behandlungen angezeigt erscheinen, sind wiederholte Applikationen möglich. Die Tötung der Tiere sollte dann 6 und 24 Stunden nach der letzten Behandlung erfolgen.

Knochenmarkpräparation

Bevor man die Tiere tötet, wird ihnen intraperitoneal eine geeignete Dosis des Spindelgifts injiziert, um eine genügend große Zahl an Zellen zu erhalten, die sich in der C-Metaphase befinden. Durch Herausspülen mit einer isotonischen Lösung wird das Knochenmark aus beiden Oberschenkeln der unmittelbar zuvor getöteten Tiere gewonnen. Nach geeigneter hypotonischer Behandlung werden die Zellen fixiert und nach Lufttrocknung auf Objektträgern gefärbt.

Analyse

Die Objektträger werden vor der mikroskopischen Analyse kodiert. Mindestens 50 gut gespreitete Metaphasen mit vollständiger Zentromerenzahl werden pro Tier auf strukturelle Chromosomenaberrationen untersucht. Zusätzlich können für jedes Tier die Mitoseindizes festgestellt werden.

2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Chromatiden- und Isochromatiden-Aberrationen (Gaps, Brüche, Interchanges), die Zahl der aberranten Metaphasen (einschließlich und ausschließlich Gaps) und die Mitoseindizes, wenn ermittelt, werden getrennt für alle behandelten Tiere und Kontrolltiere aufgeführt. Außerdem sind für jede Versuchs- und Kontrollgruppe die Mittelwerte und die Standardabweichungen anzugeben. Die Daten werden anhand geeigneter statistischer Methoden ausgewertet.

3. ABSCHLUSSBERICHT**3.1. Prüfbericht**

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Art und Stamm der verwendeten Tiere; Alter der Tiere;
- Zahl der Tiere (männlich/weiblich) je Versuchs- und Kontrollgruppe;
- Versuchsbedingungen: detaillierte Beschreibung der Behandlung bzw. Probeentnahme, Dosierungen, Dauer der Behandlung mit dem angewendeten Spindelgift sowie die jeweilige Konzentration;
- Anzahl der pro Tier analysierten Metaphasen;
- Mitoseindex, wenn vorhanden;
- Art und Anzahl der Aberrationen, getrennt nach behandelten Tieren und Kontrolltieren;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

B. 12. SONSTIGE WIRKUNG — MUTAGENITÄT

MIKROKERNTEST

1. METHODE

1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Der Mikrokerntest ist ein Kurzzeit-Test zum Nachweis einer Chromosomenschädigung oder einer Schädigung des Mitoseapparats durch Chemikalien *in vivo*. Grundlage dieser Prüfung ist ein vermehrtes Auftreten an Mikrokernen in polychromatischen Erythrozyten behandelter Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Mikrokern bilden sich aus Chromosomenbruchstücken oder ganzen Chromosomen in proliferierenden Zellen. Wenn sich Erythroblasten zu Erythrozyten entwickeln, wird der Hauptkern ausgestoßen, während der Mikrokern im Zytoplasma verbleiben kann. Ausgewertet werden daher bei diesem Test polychromatische Erythrozyten aus dem Knochenmark von Säugetieren, denen die Prüfsubstanz auf geeignete Weise verabreicht wurde. Das Knochenmark wird extrahiert, Ausstriche werden angefertigt und gefärbt. Mikroskopisch wird das Vorhandensein von Mikrokernen in polychromatischen Erythrozyten untersucht. Zusätzlich wird das Verhältnis der polychromatischen zu den normochromatischen Erythrozyten festgestellt.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode

1.6.1. Vorbereitung

Die Prüfsubstanzen werden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Falls unlöslich, werden sie in geeigneten Trägermedien gelöst oder suspendiert. Wird ein Trägermedium verwendet, darf es weder mit der Prüfsubstanz reagieren noch toxisch wirken. Gewöhnlich finden frisch angesetzte Lösungen der Prüfsubstanz Verwendung.

1.6.2. Prüfbedingungen

1.6.2.1. Versuchstiere

Es empfiehlt sich, Mäuse zu verwenden, jedoch können auch andere Säugetiere eingesetzt werden. Gesunde ausgewachsene Tiere im jugendlichen Stadium werden randomisiert und den Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt.

1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens fünf (5) weibliche und fünf (5) männliche Tiere pro Versuchs- und Kontrollgruppe werden eingesetzt.

Sieht der Versuchsplan mehrere Aufarbeitungszeiten nach der Behandlung vor, so werden bei jedem Aufarbeitungszeitpunkt 10 Tiere pro Gruppe getötet.

1.6.2.3. Art der Verabreichung

Im allgemeinen sollten Prüfsubstanzen nur einmal verabreicht werden. Auf der Grundlage toxikologischer Informationen sind wiederholte Behandlungen möglich. Sie sind jedoch nur angebracht, wenn die Prüfsubstanz keine zytotoxischen Auswirkungen im Knochenmark hat. Übliche Arten der Verabreichung sind die orale oder die intraperitoneale Injektion. Gegebenenfalls eignen sich auch andere Arten der Verabreichung.

1.6.2.4. Negativ- und Positiv-Kontrollen

In jedem Versuch werden sowohl Positiv- als auch Negativ-(Lösungsmittel)-Kontrollen verwendet.

1.6.2.5. Dosierungen

In der Grundstufe wird eine (1) Dosis der Prüfsubstanz verwendet. Dabei handelt es sich um die maximal verträgliche Dosis oder um eine solche Dosis, die gewisse Anzeichen von Zytotoxizität verursacht, z. B. durch eine Veränderung des Verhältnisses von polychromatischen zu normochromatischen Erythrozyten.

Zusätzliche Dosierungen können gewählt werden, falls dies aus wissenschaftlichen Gründen als angezeigt erscheint.

Dient der Test als Methode zur Verifizierung, sollten zumindest zwei weitere Dosierungen eingesetzt werden.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Der Test kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen:

- i) Die Tiere werden einmal mit der maximal verträglichen Dosis behandelt. Die Aufarbeitung sollte zum Zeitpunkt der größten Mikrokernhäufigkeit erfolgen. Da dies je nach Prüfsubstanz variieren kann, erfolgt die Aufarbeitung bei der Verwendung der höchsten Dosis in geeigneten Abständen mindestens zu drei verschiedenen Zeiten. Der früheste Zeitpunkt ist 12 Stunden, der späteste ist 72 Stunden nach der Behandlung.

Werden zusätzliche Dosierungen verwendet, sollte das Knochenmark zum Zeitpunkt der höchstmöglichen Mikrokernhäufigkeit entnommen werden oder, falls dieser nicht bekannt ist, 24 Stunden nach der Behandlung.

- ii) Lassen Informationen über die Pharmakokinetik und den Metabolismus wiederholte Behandlungen angezeigt erscheinen, sind wiederholte Applikationen möglich. Die Aufarbeitung sollte dann mindestens zu drei verschiedenen Zeiten erfolgen, frühestens 12 Stunden nach der letzten Behandlung, dann in geeigneten Zeitabständen, jedoch nicht später als 72 Stunden nach der Behandlung.

Knochenmarkspräparation

Durch Herausspülen mit fetalem Kälberserum wird das Knochenmark aus beiden Oberschenkeln der unmittelbar zuvor getöteten Tiere gewonnen. Die Sedimentierung der Zellen erfolgt durch Zentrifugierung, der Überstand wird verworfen. Tropfen der homogenen Zellsuspension trägt man auf Objektträger auf, fertigt Ausstriche an und färbt sie nach Lufttrocknung.

Analyse

Die Objektträger werden vor der mikroskopischen Analyse kodiert. Mindestens 1 000 polychromatische Erythrozyten pro Tier werden zur Bestimmung der Häufigkeit der Mikrokerne analysiert.

Das Verhältnis von normochromatischen zu polychromatischen Erythrozyten wird für jedes einzelne Tier durch Auszählen von insgesamt 1 000 Erythrozyten bestimmt.

2. DATEN

Die Daten werden in Tabellen zusammengestellt. Die Zahl der ausgewerteten polychromatischen Erythrozyten, die Zahl der polychromatischen Erythrozyten mit Mikrokernen und die Prozentzahl der Zellen mit Mikrokernen und das Verhältnis von normochromatischen zu polychromatischen Erythrozyten werden getrennt für alle behandelten Tiere sowie Kontrolltiere aufgeführt. Außerdem sind für jede Versuchs- und Kontrollgruppe die Mittelwerte und die Standardabweichungen anzugeben. Die Daten werden anhand geeigneter statistischer Methoden ausgewertet.

3. ABSCHLUSSBERICHT**3.1. Prüfbericht**

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Tierart und Stamm der verwendeten Tiere; Alter der Tiere;
- Zahl der Tiere (männlich/weiblich) je Versuchs- und Kontrollgruppe;
- Versuchsbedingungen: detaillierte Beschreibung der Behandlung und Probeentnahme, Dosierungen, Toxizitätsdaten, Negativ- und Positiv-Kontrollen;
- Kriterien zur Klassifizierung der Mikrokerne;
- wenn möglich, Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

B. 13. SONSTIGE WIRKUNGEN — MUTAGENITÄT

ESCHERICHIA COLI — RÜCKMUTATIONSVERSUCH

1. METHODE

1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definition

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Das *E. coli* Tryptophan (*trp*)-Reversionssystem ist ein mikrobielles System, in dem durch Chemikalien induzierte *trp*⁻ — *trp*⁺ — Reversion gemessen wird. Diese Mutation beruht auf Basenveränderungen im Genom des Bakteriums.

Die Bakterien werden der Prüfsubstanz mit und ohne Zusatz eines stoffwechselaktivierenden Systems exponiert. Nach einer geeigneten Inkubationszeit auf einem Minimalmedium werden die Revertanten-Kolonien ausgezählt. Sie werden mit der Zahl der Spontan-Revertanten verglichen, die in einer unbehandelten und einer nur mit einem Lösungsmittel versehenen Kontrollkultur auftreten.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode

Folgende Methoden können zur Durchführung des Versuchs verwendet werden: (1) Die Vorinkubationsmethode und (2) der direkte Plattentest; hierbei werden Bakterien und Prüfsubstanz mit Top-Agar vermischt und auf die Oberfläche einer Selektiv-Agarplatte verteilt.

1.6.1. Vorbereitung

1.6.1.1. Bakterien

Bakterien werden bei 37 °C bis zur späten exponentiellen bzw. zur frühen stationären Phase gezüchtet. Die Zelldichte sollte etwa 10⁸ — 10⁹ pro ml betragen.

1.6.1.2. Metabolische Aktivierung

Die Bakterien sollten gegenüber der Prüfsubstanz exponiert werden, und zwar sowohl mit und ohne Zusatz eines aus Säugetierlebern gewonnenen stoffwechselaktivierenden Systems (post-mitochondriale Fraktion mit Co-Faktorzusatz). Diese wird aus Mäusen bzw. Ratten gewonnen, die mit enzyminduzierenden Stoffen vorbehandelt wurden.

1.6.2. *Versuchsbedingungen*

1.6.2.1. *Versuchsstämme*

Drei Stämme, WP2, WP2 uvr A und WP2 uvr A pKM 101 sollten verwendet werden. Anerkannte Methoden für die Kultivierung und Lagerung von Stammkulturen sind anzuwenden. Die Wachstumsbedingungen und die genetischen Eigenschaften der Stämme, ihre Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlen oder Mitomycin C sowie die Resistanz des Stammes WP2 uvr A pKM 101 gegenüber Ampicillin sind zu überprüfen. Die Zahl der Spontan-Revertanten sollte für alle Stämme im Rahmen der erwarteten normalen Streubreiten liegen.

1.6.2.2. *Medien*

Ein geeignetes Selektiv-Medium für das Wachstum und die Selektion der Mutanten wird zusammen mit einem adäquaten Top-Agar verwendet.

1.6.2.3. *Verwendung von Negativ- und Positiv-Kontrollen*

Sowohl unbehandelte als auch mit Lösungsmitteln versetzte Kontrollkulturen müssen gleichzeitig angelegt werden. Positiv-Kontrollen müssen für die folgenden beiden Zwecke durchgeführt werden:

- i) Bestätigung der Sensibilität der Bakterienstämme: Hierfür können Methylmethansulphonat, 4-Nitroquinolinoxid bzw. Äthylnitrosoharnstoff als Positiv-Kontrollsubstanzen für Versuche ohne metabolische Aktivierung verwendet werden.
- ii) Nachweis der Aktivität des entsprechenden stoffwechselaktivierenden Systems:
2-Aminoanthracen ist als Positiv-Kontrollsubstanz für die Überprüfung der Aktivität eines metabolisierenden Systems für alle Stämme geeignet. Falls verfügbar, sollte eine Positiv-Kontrolle mit einer Substanz durchgeführt werden, die der gleichen chemischen Stoffklasse wie die Prüfsubstanz angehört.

1.6.2.4. *Konzentration der Prüfsubstanz pro Platte*

Es werden mindestens fünf verschiedene Konzentrationen der Prüfsubstanz eingesetzt, die durch halblogarithmische Abstände voneinander verschieden sind. Die Substanzen werden bis zur Grenze ihrer Löslichkeit bzw. Toxizität geprüft.

Die Toxizität wird durch eine Reduzierung der Zahl der spontanen Revertanten, durch vermindertes Hintergrundwachstum bzw. anhand des Überlebens der Bakterien in behandelten Kulturen nachgewiesen. Nichttoxische Substanzen sollten bis zur Konzentration von 5 mg/Platte geprüft werden, bevor sie als negativ zu betrachten sind.

1.6.2.5. *Inkubationsbedingungen*

Die Platten werden bei 37 °C 48 bis 72 Stunden lang inkubiert.

1.6.3. *Versuchsdurchführung*

Beim direkten Plattentest ohne metabolische Aktivierung werden Prüfsubstanz und 0,1 ml einer frischen Bakterienkultur zu 2,0 ml Top-Agar gegeben. Bei Tests mit metabolischer Aktivierung werden 0,5 ml eines Leberenzym-Aktivierungsgemisches mit einer adäquaten Menge einer post-mitochondrialen Fraktion zu dem Top-Agar gegeben, nachdem die Prüfsubstanz und Bakterien hinzugefügt wurden. Der Inhalt eines jeden Röhrchens wird gemischt und auf der Oberfläche einer Selektiv-Agarplatte verteilt. Nach dem Verfestigen des Top-Agars werden die Platten bei 37 °C 48 bis 72 Stunden lang inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Revertanten-Kolonien pro Platte ausgezählt.

Bei der Vorinkubationsmethode wird ein Gemisch aus der Prüfsubstanz, 0,1 ml einer frischen Bakterienkultur, einer adäquaten Menge eines Leberenzym-Aktivierungsgemisches bzw. einer gleichen Menge einer Pufferlösung hergestellt und vorinkubiert, bevor 2,0 ml des Top-Agars beigegeben werden. Der weitere Ablauf unterscheidet sich nicht von der Methode des direkten Plattentests.

Bei beiden Verfahren sind mindestens drei Platten pro Konzentration einzusetzen.

2. DATEN

Die Zahlen der Revertanten-Kolonien pro Platte werden sowohl für Kontrollen als auch für Prüfsubstanz-Serien angegeben. Die Einzel- und Mittelwerte der Revertanten-Kolonien pro Platte sowie die Standardabweichungen sollten sowohl für die geprüfte Substanz als auch für die Kontrollen angegeben werden.

Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen. Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Methoden erfolgen.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Bakterien, verwendeter Stamm;
- Versuchsbedingungen: Konzentrationen, Toxizität, Zusammensetzung der Medien, Methodik (Vorinkubation— Inkubation);
- metabolisierendes System; Referenzsubstanz und Negativ-Kontrollen;
- Zahl der Kolonien pro Platte — Mittelwert der Revertanten-Kolonien pro Platte — Standardabweichung — Dosis-Wirkungs-Beziehung, falls möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. Bewertung und Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

B. 14. SONSTIGE WIRKUNGEN — MUTAGENITÄT**SALMONELLA TYPHIMURIUM — RÜCKMUTATIONSVERSUCH****1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt A).

1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt B).

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Das *Salmonella typhimurium*-Histidin (*his*-Reversionssystem) ist ein mikrobielles System, in dem durch Chemikalien induzierte *his* - → *his* + — Reversion gemessen wird, die auf Basensubstitutionen bzw. Rasterschubmutationen im Genom des Bakteriums beruhen.

Die Bakterien werden der Prüfsubstanz sowohl mit und ohne Zusatz eines stoffwechselaktivierenden Systems exponiert und auf ein Minimalmedium plattiert. Nach einer geeigneten Inkubationszeit werden die Revertanten-Kolonien ausgezählt. Sie werden mit der Zahl der Spontan-Revertanten verglichen, die in einer unbehandelten und einer nur mit einem Lösungsmittel versehenen Kontrollkultur auftreten.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Vorbereitung****1.6.1.1. Bakterien**

Frisch hergestellte Bakterienkulturen werden bei 37 °C bis zur späten exponentiellen bzw. frühen stationären Wachstumsphase gezüchtet. Die Zelldichte sollte etwa 10^8 — 10^9 pro ml betragen.

1.6.1.2. Metabolische Aktivierung

Die Bakterien sollten gegenüber der Prüfsubstanz exponiert werden, und zwar mit und ohne Zusatz eines aus Säugetierleber gewonnenen stoffwechselaktivierenden Systems (post-mitochondriale Fraktion im Co-Faktorzusatz). Diese wird aus Mäusen oder Ratten gewonnen, die mit enzyminduzierenden Stoffen vorbehandelt wurden.

1.6.2. Versuchsbedingungen**1.6.2.1. Versuchsstämme**

Mindestens vier Stämme, TA 1535, TA 1537, TA 98 und TA 100 sind zu verwenden. Andere Stämme wie TA 1538 können zusätzlich benutzt werden. Anerkannte Methoden für die Kultivierung und

Lagerung von Stammkulturen müssen angewendet werden. Die Wachstumsbedingungen und die genetischen Eigenschaften der Stämme, ihre Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlen und Kristallviolett sowie ihre Resistenz gegenüber Ampicillin sind zu überprüfen. Die Zahl der Spontan-Revertanten sollte für alle Stämme im Rahmen der erwarteten normalen Streubreiten liegen.

1.6.2.2. Medien

Ein geeignetes Selektiv-Medium ist in Kombination mit einem adäquaten Top-Agar (Weich-Agar) zu verwenden.

1.6.2.3. Verwendung von Negativ- und Positiv-Kontrollen

Sowohl unbehandelte als auch mit Lösungsmittel exponierte Kontrollkulturen müssen gleichzeitig angelegt werden.

Positiv-Kontrollen müssen für die folgenden beiden Zwecke durchgeführt werden:

- i) Bestätigung der Sensibilität der Bakterienstämme: Hierfür können folgende Stoffe für Versuche ohne metabolische Aktivierung verwendet werden:

<i>Stamm:</i>	<i>revertiert mit:</i>
TA 1535, TA 100	Natriumazid,
TA 1538, TA 98	2-Nitrofluoren,
TA 1537	9-Aminoacridin;

- ii) Nachweis der Aktivität des geeigneten metabolisierenden Systems:

2-Aminoanthracen ist als Positiv-Kontrollsubstanz für die Überprüfung der Aktivität eines metabolisierenden Systems für alle Stämme geeignet. Falls verfügbar, sollte eine Positiv-Kontrolle mit einer Substanz durchgeführt werden, die der gleichen chemischen Stoffklasse wie die Prüfsubstanz angehört.

1.6.2.4. Konzentration der Prüfsubstanz pro Platte

Es werden mindestens fünf verschiedene Konzentrationen der Prüfsubstanz eingesetzt, die durch halblogarithmische Abstände voneinander verschieden sind. Die Substanzen werden bis zur Grenze ihrer Löslichkeit bzw. Toxizität geprüft. Die Toxizität wird durch eine Reduzierung der Zahl spontaner Revertanten durch vermindertes Hintergrundwachstum bzw. anhand des Überlebens der Bakterien in behandelten Kulturen nachgewiesen. Nichttoxische Substanzen sollten bis zu einer Konzentration von 5 mg/Platte geprüft werden, bevor sie als negativ zu betrachten sind.

1.6.2.5. Inkubationsbedingungen

Die Platten werden bei 37 °C 48 bis 72 Stunden lang inkubiert.

1.6.3. Versuchsdurchführung

Beim direkten Plattentest ohne metabolische Aktivierung werden Prüfsubstanz und 0,1 ml einer frischen Bakterienkultur zu 2,0 ml Top-Agar gegeben. Bei Tests mit metabolischer Aktivierung werden 0,5 ml eines Leberenzym-Aktivierungsgemisches mit einer adäquaten Menge einer post-mitochondrialen Fraktion zu dem Top-Agar gegeben, nachdem die Prüfsubstanz und Bakterien hinzugefügt wurden. Der Inhalt eines jeden Röhrchens wird gemischt und auf der Oberfläche einer Selektiv-Agarplatte verteilt. Nach dem Verfestigen des Top-Agars werden die Platten bei 37 °C 48 bis 72 Stunden lang inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Revertanten-Kolonien pro Platte ausgezählt.

Bei der Vorinkubationsmethode wird ein Gemisch aus der Prüfsubstanz, 0,1 ml einer frischen Bakterienkultur, einer adäquaten Menge eines Leberenzym-Aktivierungsgemisches oder einer gleichen Menge einer Pufferlösung hergestellt und vorinkubiert, bevor 2,0 ml des Top-Agars beigegeben werden. Der weitere Ablauf unterscheidet sich nicht von der Methode des direkten Plattentests.

Bei beiden Verfahren sind mindestens drei Platten pro Konzentration einzusetzen.

2. DATEN

Die Zahlen der Revertanten-Kolonien pro Platte werden sowohl für Kontrollen als auch für Prüfsubstanz-Serien angegeben.

Die Einzel- und Mittelwerte der Revertanten-Kolonien pro Platte sowie die Standardabweichungen sollten sowohl für die geprüfte Substanz als auch für die Kontrollen angegeben werden.

Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Methoden erfolgen.

3. ABSCHLUSSBERICHT**3.1. Prüfbericht**

Der Prüfbericht enthält Informationen über:

- Bakterien, verwendeter Stamm;
- Versuchsbedingungen: Konzentrationen, Toxizität, Zusammensetzung der Medien, Methoden (Vorinkubation — Inkubation, metabolisierendes System), Referenzsubstanzen — Negativ-Kontrollen;
- Zahl der Kolonien pro Platte — Mittelwert der Revertanten-Kolonien pro Platte — Standardabweichung — Dosis-Wirkungs-Beziehung, falls möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt C).

4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung — Teil B (Punkt D).

C: METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER ÖKOTOXIZITÄT

C. 1. AKUTE TOXIZITÄT FÜR FISCH

1. METHODE

1.1. Einleitung

Soweit wie möglich sollten Angaben über die Wasserlöslichkeit, den Dampfdruck, die chemische Stabilität, die Dissoziationskonstante und die biologische Abbaubarkeit der Prüfsubstanz vorhanden sein, um die Auswahl der am besten geeigneten Prüfmethode (statisch, semistatisch oder im Durchfluß) zur Sicherstellung ausreichend konstanter Konzentrationen der Prüfsubstanz während des gesamten Prüfzeitraums zu erleichtern.

Weitere erforderliche Angaben, wie z. B. Strukturformel, Reinheitsgrad, Art und Prozentanteil signifikanter Verunreinigungen, Vorhandensein und Menge von Zusätzen, sowie der n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient sind sowohl bei der Planung als auch bei der Interpretation der Prüfergebnisse zu berücksichtigen.

1.2. Definitionen und Einheiten

Unter akuter Toxizität wird die deutlich erkennbare schädigende Wirkung verstanden, die in einem Organismus innerhalb kurzer Zeit (Tage) durch Einwirkung (Exposition) eines Stoffes hervorgerufen wird. In der vorliegenden Prüfung wird die akute Toxizität als die mittlere tödliche (letale) Konzentration (LC_{50}) ausgedrückt, das ist die Konzentration im Wasser, die 50 % einer Prüfgruppe von Fischen innerhalb einer anzugebenden ununterbrochenen Einwirkungsdauer tötet.

Alle Konzentrationen der Prüfsubstanz sind in Gewicht/Volumen (mg/l) und in Gewichtsanteilen (ppm) anzugeben.

1.3. Referenzsubstanzen

Eine Referenzsubstanz kann geprüft werden, um nachzuweisen, daß sich die Reaktion des Prüfsystems unter den Prüfbedingungen der Prüfeinrichtung nicht wesentlich geändert hat.

Referenzsubstanzen sind für diesen Test noch nicht festgelegt.

1.4. Prinzip der Methode

Die Fische werden der (den) dem Wasser zugesetzten Prüfsubstanz(en) für einen Mindestzeitraum von 48 Stunden, vorzugsweise aber von 96 Stunden, ausgesetzt. Die Mortalitäten werden mindestens alle 24 Stunden erfaßt und — soweit möglich — bei jeder Beobachtung auch die Konzentrationen berechnet, die 50 % der Fische töten (LC_{50}).

1.5. Qualitätskriterien

Die Mortalität darf bei den Kontroll-Prüfsystemen am Ende der Prüfung 10 % nicht überschreiten.

Die Sauerstoffkonzentration muß über die gesamte Prüfdauer mehr als 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen haben.

Durch Analysen, chemische Eigenschaften oder durch das verwendete Prüfverfahren ist sicherzustellen, daß die Konzentration der Prüfsubstanz ausreichend aufrechterhalten wurde (z. B. bis zu 80 % der Ausgangskonzentration während des gesamten Prüfzeitraums).

1.6. Beschreibung der Methode

Für die Durchführung der Prüfung aufgrund der vorliegenden Methode sind drei Verfahren möglich:

Statisches Verfahren:

Das Prüfmedium wird während der Prüfdauer nicht erneuert.

Semistatisches Verfahren:

Das Prüfmedium wird regelmäßig nach einem längeren Zeitraum (z. B. 24 Stunden) vollständig ausgewechselt.

Durchfluß-Verfahren:

Das Prüfmedium wird ständig erneuert, wobei die Prüfsubstanz mit dem Wasser für die Erneuerung des Prüfmediums eingebracht wird.

1.6.1. Reagenzien

1.6.1.1. Lösungen der Prüfsubstanzen

Die Stammsätze in den erforderlichen Konzentrationen werden durch Lösung der Prüfsubstanz in deionisiertem Wasser oder Wasser entsprechend 1.6.1.2 hergestellt.

Stammsätze von Prüfsubstanzen mit geringer Wasserlöslichkeit können durch Ultraschalldispersion oder — falls erforderlich — durch Verwendung organischer Lösungsmittel, emulgierender oder dispergierender Mittel hergestellt werden. Werden derartige Trägerstoffe verwendet, müssen die Fische in der Kontrolle derselben Konzentration an Trägerstoffen ausgesetzt werden, wie sie für die höchste Prüfkonzentration verwendet wurde.

Die Konzentration derartiger Trägerstoffe darf 0,1 g/l nicht überschreiten.

Die gewählten Prüfkonzentrationen werden durch Verdünnung des Stammsatzes zubereitet. Werden hohe Konzentrationen geprüft, kann die Prüfsubstanz unmittelbar im Verdünnungswasser gelöst werden.

Die Prüfung ist ohne eine Einstellung des pH-Wertes durchzuführen. Gibt es Anzeichen für eine deutliche Änderung des pH-Wertes, wird empfohlen, die Prüfung mit einer pH-Wert-Einstellung zu wiederholen und die Ergebnisse entsprechend zu protokollieren. In diesem Fall ist der pH-Wert des Stammsatzes auf den pH-Wert des Verdünnungswassers einzustellen, falls nicht bestimmte Gründe dagegen sprechen. Hierzu sind möglichst HCl und NaOH zu verwenden. Die pH-Wert-Einstellung muß so erfolgen, daß sich die Konzentration der Prüfsubstanz im Stammsatz nicht wesentlich ändert. Sollte sich durch die Einstellung eine chemische Reaktion oder eine physikalische Ausfällung der Prüfsubstanz ergeben, so muß diese Beobachtung im Prüfbericht protokolliert werden.

1.6.1.2. Hälterungs- und Verdünnungswasser

Verwendet werden kann Leitungswasser (Trinkwasser) (nicht verunreinigt durch schädliche Konzentrationen an Chlor, Schwermetallen oder anderen Substanzen), einwandfreies natürliches Wasser oder zubereitetes Wasser (siehe Anlage 1).

Am besten geeignet ist Wasser mit einer Gesamthärte zwischen 50 und 250 mg/l (bezogen auf CaCO_3) und einem pH-Wert zwischen 6,0 und 8,5.

1.6.2. Geräte

Alle Geräte müssen aus chemisch inertem Material bestehen:

- Einrichtungen zur automatischen Verdünnung (für das Durchfluß-Verfahren);
- Sauerstoffmeßgerät;
- Gerät zur Bestimmung der Wasserhärte;
- geeignetes Gerät zur Temperaturmessung;
- pH-Meßgerät.

1.6.3. *Prüforganismen*

Die Auswahl von einer oder mehreren Arten liegt im Ermessen der Prüfeinrichtung.

Es wird empfohlen, die verwendeten Arten nach so wichtigen praktischen Kriterien wie ihrer Verfügbarkeit im ganzen Jahr, ihrer problemlosen Haltung, ihrer Eignung für Prüfzwecke, ihrer relativen Empfindlichkeit sowie anderen ökonomisch, biologisch oder ökologisch bedeutsamen Faktoren auszuwählen. Die Fische müssen in guter gesundheitlicher Verfassung sein und dürfen keine offensichtlichen Mißbildungen aufweisen.

Für die Prüfung empfohlene Fischarten sind in Anlage 2 aufgeführt.

1.6.3.1. *Hälterung*

Die Fische sollten möglichst aus einer einzigen Charge bei etwa gleicher Länge und gleichem Alter stammen. Sie müssen mindestens 12 Tage unter folgenden Bedingungen gehalten werden:

Behälter:

Empfohlen werden mindestens 300 l fassende Behälter für Kaltwasserfische, mindestens 100 l fassende Behälter für Warmwasserfische;

Besatz:

Entsprechend dem Verfahren (Umwälzanlage oder Durchfluß) und der Fischart;

Wasser:

Siehe 1.6.1.2;

Beleuchtung:

12 bis 16 Stunden Beleuchtungsdauer täglich;

Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff:

Mindestens 80 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts;

Fütterung:

Dreimal wöchentlich oder täglich, Aussetzung der Fütterung 24 Stunden vor Beginn der Prüfung.

1.6.3.2. *Mortalität*

Nach einer Eingewöhnungszeit von 48 Stunden wird die Mortalität unter Anwendung folgender Kriterien erfaßt:

- bei mehr als 10 % der Population in sieben Tagen:
die Charge ist nicht verwendbar für den Test;
- zwischen 5 und 10 % der Population:
die Hälterungszeit ist weitere sieben Tage fortzusetzen. Treten keine weiteren Sterbefälle auf, ist die Charge für die Prüfung verwendbar, ansonsten nicht;
- bei 5 % und weniger der Population:
die Charge ist für die Prüfung verwendbar.

1.6.4. *Anpassung*

Alle Fische sind für eine Minstdauer von sieben Tagen vor ihrem Einsatz in der Prüfung in Wasser derselben Qualität und bei der gleichen Temperatur einzusetzen, wie es in der Prüfung verwendet wird.

1.6.5. *Durchführung der Prüfung*

Ein Vorversuch kann der eigentlichen Prüfung vorangehen. Dieser Vorversuch liefert Informationen über den in der eigentlichen Prüfung zu verwendenden Konzentrationsbereich.

Zusätzlich zu den Konzentrationen der Prüfsubstanz ist eine Kontrolle mit dem Trägerstoff, falls einer verwendet wird, aber ohne die Prüfsubstanz einzusetzen.

Die Konzentrationen sollen während der Prüfdauer nicht um mehr als 20 % absinken. In Abhängigkeit von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz ist zur Erfüllung dieser Anforderung eine Prüfung in einem statischen semistatischen oder Durchfluß-Verfahren auszuwählen.

Die Fische werden der Prüfsubstanz wie im folgenden beschrieben ausgesetzt:

Dauer:

Mindestens 48 Stunden, aber vorzugsweise 96 Stunden;

Anzahl der Tiere:

Mindestens 10 je Konzentration;

Behälter:

Geeignetes Fassungsvermögen im Verhältnis zum empfohlenen Besatz;

Besatz:

Als Höchstbesatz werden im statischen und semistatischen Verfahren 1,0 g/l empfohlen; im Durchfluß-Verfahren ist ein höherer Besatz möglich;

Prüfkonzentration:

Eine Kontrolle und mindestens fünf Konzentrationen, die sich durch einen konstanten Faktor unterscheiden, der 1,8 nicht überschreiten darf, und die den Bereich von 0 % bis 100 % Mortalität umfassen;

Wasser:

Siehe 1.6.1.2;

Beleuchtung:

12 bis 16 Stunden Beleuchtungsdauer täglich;

Temperatur:

Entsprechend der Fischart (Anlage 2), jedoch innerhalb ± 1 °C bei jeder einzelnen Prüfung;

Konzentration an gelöstem Sauerstoff:

Nicht unter 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts bei der gewählten Temperatur;

Fütterung:

Keine.

Die Fische werden nach den ersten 2–4 Stunden und mindestens alle 24 Stunden beobachtet. Ein Fisch gilt als tot, wenn bei Berührung des Schwanzansatzes keine Reaktion erfolgt und wenn keine Atembewegungen erkennbar sind. Tote Fische sind, sobald sie bemerkt werden, zu entfernen und entsprechend zu protokollieren.

Für den Prüfbericht sind außerdem weitere sichtbare Veränderungen zu erfassen (z. B. Gleichgewichtsverlust, Änderungen des Schwimmverhaltens, der Atmung, der Pigmentierung usw.).

Messungen des pH-Werts, des Gehaltes an gelöstem Sauerstoff und der Temperatur müssen täglich erfolgen.

2. DATEN UND AUSWERTUNG.

Die Mortalität für jede empfohlene Expositionsdauer wird auf Wahrscheinlichkeitspapier (mit logarithmischer Einteilung) gegen die Konzentration aufgetragen. Die Punkte sind nach Augenmaß durch eine Gerade zu verbinden. Die Konzentration, die einer 50%igen Wirkung entspricht, ist abzulesen (siehe Abbildung in Anlage 3).

Dieser Wert entspricht der LC_{50} für die entsprechende Expositionsdauer.

Wenn die Daten es zulassen, läßt sich die LC_{50} und ihr Vertrauensbereich ($P = 0,05$) nach Standardverfahren ermitteln.

Der LC_{50} -Wert ist auf eine (höchstens zwei) signifikante Stelle(n) zu runden.

Sollte der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für eine Berechnung der LC_{50} zu steil sein, so reicht eine graphische Abschätzung dieses Wertes.

Ergeben zwei unmittelbar aufeinanderfolgende Konzentrationen, die sich durch den Faktor 1,8 unterscheiden, 0 % und 100 % Mortalität, so werden diese beiden Werte zur Angabe des Bereiches, in den die LC_{50} fällt, herangezogen.

Wird beobachtet, daß die Stabilität oder Homogenität der Prüfsubstanz nicht aufrechterhalten werden kann, so ist dies im Prüfbericht mitzuteilen und bei der Interpretation der Ergebnisse entsprechend zu berücksichtigen.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht enthält:

- Angaben über die verwendeten Organismen (wissenschaftlicher Name, Stamm, Züchter oder Bezugsquelle, Vorbehandlungen, Größe und Anzahl in den einzelnen Prüfkonzentrationen);
- Liste der verwendeten Konzentrationen, sowie alle vorhandenen Informationen über die Stabilität der Prüfsubstanz in den verwendeten Konzentrationen;
- Beschreibung der Prüfgeräte;
- bei Durchführung chemischer Analysen, Angabe der verwendeten Methoden und die Ergebnisse;
- Herkunft des Verdünnungswassers und wichtigste chemische Eigenschaften (pH-Wert, Härte, Temperatur);
- Konzentration aller Trägerstoffe;
- bei Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit, Angabe der Methode zur Herstellung des Stammsatzes und der Prüflösungen;
- Gründe für die Auswahl und Einzelheiten der Durchführung der Prüfung (z. B. Prüfdauer, statisch, semistatisch, Dosierungsrate, Durchflußrate, ob belüftet, Fischbesatz usw.);
- Beleuchtungsverhältnisse;
- höchste eingesetzte Prüfkonzentration ohne Mortalität im Prüfzeitraum;
- niedrigste eingesetzte Prüfkonzentration mit 100 % Mortalität im Prüfzeitraum;
- kumulative Mortalität bei jeder Konzentration und in der Kontrolle (gegebenenfalls auch in der Kontrolle mit dem Trägerstoff) zu den empfohlenen Beobachtungszeitpunkten;
- LC_{50} -Werte für jeden empfohlenen Beobachtungszeitpunkt (möglichst mit 95 %-Vertrauensbereich);
- verwendete statistische Verfahren zur Bestimmung der LC_{50} -Werte;
- graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve am Ende der Prüfung;
- wenn möglich die Steigung und 95 %-Vertrauensbereich;
- Konzentration des gelösten Sauerstoffs, pH-Werte, Temperatur in den Prüflösungen alle 24 Stunden;
- bei Verwendung einer Referenzsubstanz Angabe der Ergebnisse;
- Nachweis, daß die Qualitätskriterien erfüllt sind.

4. LITERATUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council, C(81) 30 Final.

Anlage 1

Zubereitetes Wasser

Beispiel für ein geeignetes Verdünnungswasser

Alle Chemikalien müssen analysenrein sein.

Das Wasser muß einwandfreies destilliertes oder deionisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von weniger als $5 \mu\text{Scm}^{-1}$ sein.

Stammlösung:

CaCl ₂ · 2H ₂ O Calciumchlorid Dihydrat	11,76 g;
in Wasser lösen und auf 1 Liter Wasser auffüllen	
MgSO ₄ · 7H ₂ O Magnesiumsulfat Heptahydrat	4,93 g;
gleiches Verfahren	
NaHCO ₃ Natriumhydrogencarbonat	2,59 g;
gleiches Verfahren	
KCl Kaliumchlorid	0,23 g;
gleiches Verfahren.	

Zubereitetes Verdünnungswasser

Je 25 ml der vier Stammlösungen mischen und mit Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Solange belüften, bis die Konzentration an gelöstem Sauerstoff dem Luftsauerstoff-Sättigungswert entspricht.

Der pH-Wert muß $7,9 \pm 0,3$ betragen.

Falls erforderlich, ist der pH-Wert mit NaOH (Natriumhydroxid) oder HCl (Salzsäure) einzustellen.

Dieses Verdünnungswasser läßt man 12 Stunden stehen; eine weitere Belüftung ist nicht erforderlich.

Die Summe der Ca- und Mg-Ionen in dieser Lösung beträgt 2,5 mmol/l. Das Verhältnis der Ca- zu den Mg-Ionen beträgt 4 : 1 und das der Na- zu den K-Ionen 10 : 1. Die Gesamtalkalinität dieser Lösung liegt bei 0,8 mmol/l.

Eine abweichende Zubereitung des Verdünnungswassers darf die Zusammensetzung oder die Eigenschaften des Wassers nicht verändern.

Anlage 2

Für die Prüfung empfohlene Fischarten

Empfohlene Art	Empfohlener Bereich der Prüftemperatur (°C)	Empfohlene Gesamtlänge der Fische (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrabärbling	20 bis 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) Amerikanische Elritze	20 bis 24	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linne 1758) Karpfen	20 bis 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) Japanischer Reisfisch	20 bis 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 bis 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Linne 1758) Blauer Sonnenbarsch	20 bis 24	5,0 ± 2,0
<i>Salmo gairdneri</i> (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Regenbogenforelle	13 bis 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linne 1758) Goldorfe	20 bis 24	6,0 ± 2,0

Beschaffung

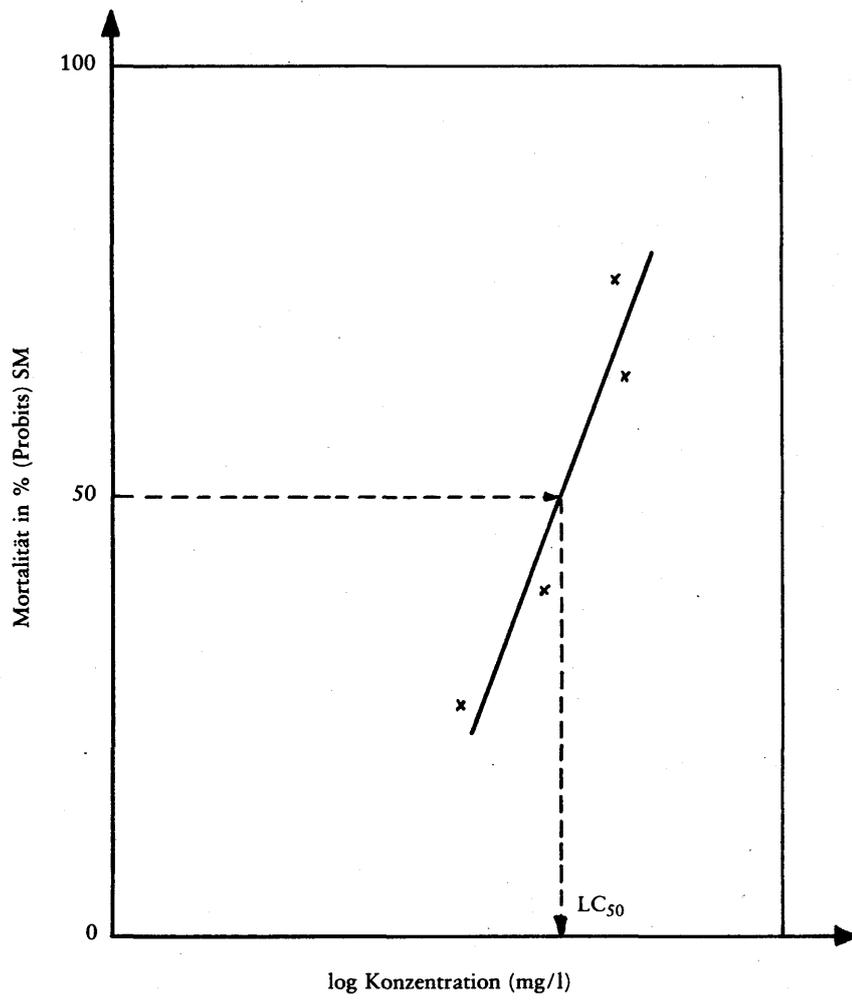
Die oben aufgeführten Fischarten lassen sich leicht züchten und/oder sind das ganze Jahr über weitgehend verfügbar. Sie lassen sich in Fischzuchtbetrieben oder in Prüfeinrichtungen unter Bedingungen züchten und aufziehen, die eine Kontrolle über Krankheiten und Parasiten erlauben, so daß sie für eine Prüfung gesund und von bekannter Herkunft sind.

Diese Fischarten sind in vielen Teilen der Welt erhältlich.

Anlage 3

Beispiel für eine Konzentrations-Mortalitätskurve

Beispiel für die Bestimmung der LC_{50} auf Wahrscheinlichkeitspapier



Anlage 4

Beispiele für Standardverfahren

- (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. Détermination de la toxicité aiguë 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, Volume 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 March 16 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.

C. 2. AKUTE TOXIZITÄT FÜR DAPHNIEN

1. METHODE

1.1. Einleitung

Soweit wie möglich sollten Angaben über die Wasserlöslichkeit, den Dampfdruck, die chemische Stabilität, die Dissoziationskonstante und die biologische Abbaubarkeit der Prüfsubstanz vor dem Beginn der Prüfung vorhanden sein.

Weitere Angaben, wie z. B. Strukturformel, Reinheitsgrad, Art und Prozentanteil signifikanter Verunreinigungen, Vorhandensein und Menge von Zusätzen, sowie der n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient sind sowohl bei der Planung als auch bei der Interpretation der Prüfergebnisse zu berücksichtigen.

1.2. Definitionen und Einheiten

Die Forderung der Richtlinie nach der Ermittlung der LC_{50} bei Daphnien wird erfüllt durch die Bestimmung der EC_{50} , wie sie in dieser Prüfmethode beschrieben wird.

Im Sinne dieser Prüfmethode wird die akute Toxizität als die mittlere effektive (Wirk-)Konzentration (EC_{50}) der Schwimmunfähigkeit verstanden. Das ist die Konzentration (bezogen auf die Ausgangskonzentration), die 50 % der Daphnien einer geprüften Gruppe innerhalb eines Einwirkungszeitraums (Expositionszeitraum) von 24 Stunden schwimmunfähig macht.

Der 48 Stunden- EC_{50} -Wert kann, wenn dies möglich ist, ebenfalls bestimmt werden.

Schwimmunfähigkeit

Es gelten diejenigen Daphnien als schwimmunfähig, die nach leichter Bewegung des Prüfbehälters innerhalb von 15 Sekunden keine Schwimmbewegungen zeigen.

Alle Konzentrationen der Prüfsubstanz sind in Gewicht/Gewicht (ppm) anzugeben.

1.3. Referenzsubstanzen

Eine Referenzsubstanz kann getestet werden, um nachzuweisen, daß sich die Reaktion der geprüften Art unter den Bedingungen der Prüfeinrichtung nicht wesentlich geändert hat.

Referenzsubstanzen sind für diesen Test noch nicht festgelegt.

1.4. Prinzip der Methode

Die Daphnien werden der dem Wasser in verschiedenen Konzentrationen zugesetzten Prüfsubstanz für 24 Stunden ausgesetzt. Falls erforderlich, kann dieser Zeitraum auf 48 Stunden ausgedehnt werden.

Unter sonst gleichen Prüfbedingungen und bei einem angemessenen Bereich von Prüfkonzentrationen wirken sich verschiedene Konzentrationen einer Prüfsubstanz unterschiedlich auf die Schwimmfähigkeit der Daphnien aus. Bei verschiedenen Konzentrationen ergeben sich dann nach Ablauf der Prüfzeit jeweils bestimmte prozentuale Anteile schwimmunfähiger Daphnien. Diejenigen Konzentrationen, die 0 % bzw. 100 % Schwimmunfähigkeit verursachen, werden direkt aus den Prüfbeobachtungen erhalten, während der 24 Stunden- EC_{50} -Wert (wie auch der 48 Stunden- EC_{50} -Wert), soweit möglich, durch Berechnung ermittelt wird.

Bei dieser Methode wird ein statisches Verfahren angewendet. Die Prüflösungen werden daher während des Expositionszeitraums nicht erneuert.

1.5. Qualitätskriterien

In den Kontrollen dürfen bei Versuchsende höchstens 10 % der Daphnien schwimmunfähig sein.

Die Sauerstoffkonzentration darf am Ende der Prüfung nicht weniger als 2 mg/l betragen.

Zumindest die *Daphnien* der Kontrollgruppe dürfen nicht an der Wasseroberfläche hängenbleiben.

1.6. Beschreibung der Methode

1.6.1. Reagenzien

1.6.1.1. Lösungen der Prüfsubstanzen

Die Stammsätze in den erforderlichen Konzentrationen werden durch Lösung der Prüfsubstanz in deionisiertem Wasser oder Wasser entsprechend 1.6.1.2 hergestellt.

Stammsätze von Prüfsubstanzen mit geringer Wasserlöslichkeit können durch Ultraschalldispersion oder — falls erforderlich — durch Verwendung organischer Lösungsmittel, emulgierender oder dispergierender Mittel hergestellt werden. Werden derartige Trägerstoffe verwendet, müssen die *Daphnien* in der Kontrolle derselben Konzentration an Trägerstoffen ausgesetzt werden, wie sie für die höchste Prüfkonzentration verwendet wurde.

Die Konzentration derartiger Trägerstoffe darf 0,1 g/l nicht überschreiten.

Die gewählten Prüfkonzentrationen werden durch Verdünnung des Stammsatzes zubereitet. Werden hohe Konzentrationen geprüft, kann die Prüfsubstanz unmittelbar im Verdünnungswasser gelöst werden.

Die Prüfung ist ohne eine Einstellung des pH-Wertes durchzuführen. Gibt es Anzeichen für eine deutliche Änderung des pH-Wertes, wird empfohlen, die Prüfung mit einer pH-Wert-Einstellung zu wiederholen und die Ergebnisse entsprechend zu protokollieren. In diesem Fall ist der pH-Wert des Stammsatzes auf den pH-Wert des Verdünnungswassers einzustellen, falls nicht bestimmte Gründe dagegen sprechen. Hierzu sind möglichst HCl und NaOH zu verwenden. Die pH-Wert-Einstellung muß so erfolgen, daß sich die Konzentration der Prüfsubstanz im Stammsatz nicht wesentlich ändert. Sollte sich durch die Einstellung eine chemische Reaktion oder eine physikalische Ausfällung der Prüfsubstanz ergeben, so muß diese Beobachtung im Prüfbericht protokolliert werden.

1.6.1.2. Kultur- und Verdünnungswasser

Für diese Prüfung kann jedes zur Kultur von *Daphnien* geeignete Wasser verwendet werden, sei es natürliches oder zubereitetes Wasser (siehe Anlage).

Um die Notwendigkeit einer Anpassung der *Daphnien* an die Prüfbedingungen zu vermeiden, wird empfohlen, für die Kultur das gleiche Wasser wie für die Prüfung zu verwenden.

1.6.2. Geräte

Es sind die üblichen Geräte und Ausstattungen von Prüfeinrichtungen zu verwenden. Teile, die mit den Prüflösungen in Berührung kommen, sollten vorzugsweise ganz aus Glas bestehen:

- Sauerstoffmeßgerät (mit Mikroelektrode, oder ein anderes geeignetes Gerät zur Messung von gelöstem Sauerstoff in kleinen Proben);
- geeignetes Gerät zur Temperaturmessung;
- pH-Meßgerät;
- Gerät zur Bestimmung der Wasserhärte.

1.6.3. Prüforganismen

Daphnia magna oder *Daphnia pulex*, die zu Beginn der Prüfung mehr als 6 und weniger als 24 Stunden alt sind, in der Prüfeinrichtung gezüchtet, frei von offensichtlichen Krankheiten und von bekannter Herkunft (z. B. Aufzucht-Vorbehandlungen usw.).

1.6.4. Durchführung der Prüfung

Ein Vorversuch kann der eigentlichen Prüfung vorangehen. Dieser Vorversuch liefert Informationen über den in der eigentlichen Prüfung zu verwendenden Konzentrationsbereich.

Zusätzlich zu den Konzentrationen der Prüfsubstanz ist eine Kontrolle mit dem Trägerstoff, falls einer verwendet wird, aber ohne die Prüfsubstanz einzusetzen.

Die *Daphnien* werden der Prüfsubstanz wie im folgenden beschrieben ausgesetzt:

Dauer:

Mindestens 24 Stunden;

Anzahl der Tiere:

Mindestens 20 je Konzentration, vorzugsweise aufgeteilt in 4 Gruppen von je 5 *Daphnien* oder 2 Gruppen von je 10 *Daphnien*;

Besatz:

Je *Daphnie* mindestens 2 ml Testlösung;

Prüfkonzentration:

Die Prüflösung ist unmittelbar vor dem Einsetzen der *Daphnien* zuzubereiten, möglichst nur mit Wasser als einzigem Lösungsmittel. Die Konzentrationen werden in geometrischer Reihe mit einem Faktor 1,8 angesetzt. Zusammen mit der Kontrolle sind Konzentrationen einzusetzen, die ausreichen, um 0 % und 100 % Schwimmfähigkeit hervorzurufen, sowie ein Bereich von dazwischenliegenden Konzentrationen, die die Berechnung des 24 Stunden-EC₅₀-Werts erlauben;

Wasser:

Siehe 1.6.1.2;

Beleuchtung:

Ein Hell-Dunkel-Zyklus ist erwünscht, völlige Dunkelheit ist gleichfalls akzeptabel;

Temperatur:

Die Temperatur muß zwischen 18 °C und 22 °C liegen. Für jede einzelne Prüfung hat sie jedoch innerhalb von ± 1 °C konstant zu bleiben;

Belüftung:

Die Prüflösungen sollen nur leicht belüftet werden;

Fütterung:

Keine.

Am Ende der Prüfung ist der pH-Wert und der Gehalt an gelöstem Sauerstoff in den Kontrollen und in jeder Prüfkonzentration zu bestimmen. Der pH-Wert der Prüflösungen darf nicht verändert werden.

Flüchtige Verbindungen sind in randvoll gefüllten, geschlossenen Behältern zu untersuchen, die groß genug sind, um Sauerstoffmangel zu vermeiden.

Die *Daphnien* werden mindestens nach 24 Stunden und bei Verlängerung der Prüfung nach 48 Stunden Expositionszeit untersucht.

2. DATEN UND AUSWERTUNG

Die Schwimmfähigkeit in jeder Konzentration nach mindestens 24 Stunden Expositionsdauer wird auf Wahrscheinlichkeitspapier gegen die Konzentration aufgetragen. Die Punkte sind durch eine Gerade zu verbinden. Die Konzentration, die einer 50 %igen Wirkung entspricht, ist abzulesen.

Wenn die Daten es zulassen, läßt sich die EC₅₀ und ihr Vertrauensbereich ($P = 0,05$) nach Standardverfahren ermitteln.

Der EC_{50} -Wert ist auf eine (höchstens zwei) signifikante Stelle(n) zu runden. Sollte der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für eine Berechnung der EC_{50} zu steil sein, so reicht eine graphische Abschätzung dieses Wertes.

Ergeben zwei unmittelbar aufeinanderfolgende Konzentrationen, die sich durch den Faktor 1,8 unterscheiden, 0 % und 100 % Schwimmunfähigkeit, so werden diese beiden Werte zur Angabe des Bereichs, in den die EC_{50} fällt, herangezogen.

Wird beobachtet, daß die Stabilität oder Homogenität der Prüfsubstanz nicht aufrechterhalten werden kann, so ist dies im Prüfbericht mitzuteilen und bei der Interpretation der Ergebnisse entsprechend zu berücksichtigen.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht enthält:

- Angaben über die verwendeten Organismen (wissenschaftlicher Name; Stamm; Züchter oder Bezugsquelle; Vorbehandlungen; Aufzuchtverfahren einschließlich Herkunft, Art und Menge der Nahrung, Häufigkeit der Fütterung);
- Anzahl der in jeder Prüfkonzentration eingesetzten *Daphnien*;
- Liste der verwendeten Konzentrationen, sowie alle vorhandenen Informationen über die Stabilität der Prüfsubstanz in den verwendeten Prüflösungen;
- Beschreibung der Prüfbehälter, Volumen des jeweiligen Prüfmediums, Anzahl der Tiere je Prüfbehälter;
- bei Durchführung chemischer Analysen, Angabe der verwendeten Methoden und die Ergebnisse;
- Herkunft des Verdünnungswassers und wichtigste chemische Eigenschaften;
- Verfahren der Zubereitung von Stammansätzen und Prüflösungen;
- Konzentration aller Trägerstoffe (organische Lösungsmittel, dispergierende Mittel usw.);
- Beleuchtungsverhältnisse;
- höchste eingesetzte Prüfkonzentration, die im Prüfzeitraum nicht zu einer Schwimmunfähigkeit führte;
- niedrigste eingesetzte Prüfkonzentration, die im Prüfzeitraum zu 100 % Schwimmunfähigkeit führte;
- kumulative Schwimmunfähigkeit in der Kontrolle, in der Kontrolle mit dem Trägerstoff und in jeder Prüfkonzentration zu den empfohlenen Beobachtungszeitpunkten (24 Stunden, oder 24 und 48 Stunden);
- EC_{50} -Wert für jeden empfohlenen Beobachtungszeitpunkt (möglichst mit 95 %-Vertrauensbereich);
- graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve zum Ende der Prüfung;
- wenn möglich die Steigung und 95 %-Vertrauensbereich;
- verwendete statistische Verfahren zur Bestimmung der EC_{50} -Werte.
- Konzentration des gelösten Sauerstoffs, pH-Werte, Temperatur in den Prüflösungen;
- bei Verwendung einer Referenzsubstanz, Angabe der Ergebnisse;
- Nachweis, daß die Qualitätskriterien erfüllt sind.

4. LITERATUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 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).

ANLAGE

Zubereitetes Wasser

Beispiel für ein geeignetes Verdünnungswasser

Alle Chemikalien müssen analysenrein sein.

Das Wasser muß einwandfrei destilliertes oder deionisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von weniger als $5 \mu\text{Scm}^{-1}$ sein.

Stammlösung

CaCl ₂ · 2 H ₂ O Calciumchlorid Dihydrat in Wasser lösen und auf 1 Liter Wasser auffüllen.	11,76 g;
MgSO ₄ · 7H ₂ O Magnesiumsulfat Heptahydrat gleiches Verfahren.	4,93 g;
NaHCO ₃ Natriumhydrogencarbonat gleiches Verfahren.	2,59 g;
KCl Kaliumchlorid gleiches Verfahren.	0,23 g;

Zubereitetes Verdünnungswasser

Je 25 ml der vier Stammlösungen mischen und mit Wasser auf 1 Liter auffüllen.

So lange belüften, bis die Konzentration an gelöstem Sauerstoff dem Luftsauerstoff-Sättigungswert entspricht.

Der pH-Wert muß $7,9 \pm 0,3$ betragen.

Falls erforderlich, ist der pH-Wert mit NaOH (Natriumhydroxid) oder HCl (Salzsäure) einzustellen.

Dieses Verdünnungswasser läßt man 12 Stunden stehen; eine weitere Belüftung ist nicht erforderlich.

Die Summe der Ca- und Mg-Ionen in dieser Lösung beträgt 2,5 mmol/l. Das Verhältnis der Ca- zu den Mg-Ionen beträgt 4 : 1 und das der Na- zu den K-Ionen 10 : 1. Die Gesamtalkalinität dieser Lösung liegt bei 0,8 mmol/l.

Eine abweichende Zubereitung des Verdünnungswassers darf die Zusammensetzung oder die Eigenschaften des Wassers nicht verändern.

C. 3. ABBAUBARKEIT

BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — MODIFIZIERTER OECD SCREENING-TEST

1. METHODE

1.1. Einleitung

Zweck dieses Verfahrens ist die Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit wasserlöslicher, nicht-flüchtiger organischer Verbindungen in einem aeroben wäßrigen Medium bei einer Ausgangs-Konzentration, die 5—40 mg DOC/l (DOC ⁽¹⁾ = gelöster organischer Kohlenstoff) entspricht. Falls die Empfindlichkeit der Analysengeräte für organischen Kohlenstoff verbessert werden kann, ist die Verwendung niedrigerer Prüfkonzentrationen, insbesondere bei toxischen Verbindungen, angebracht. Der Gehalt der Prüfsubstanz an organischem Kohlenstoff muß festgestellt werden.

Die Methode läßt sich nur auf solche organischen Prüfsubstanzen anwenden, die bei den im Test verwendeten Konzentrationen

- wasserlöslich sind (5 bis 40 mg DOC/l),
- einen sehr geringen Dampfdruck haben,
- auf Bakterien nicht hemmend wirken,
- auf Glasoberflächen nicht in nennenswertem Maße adsorbiert werden.

Informationen über die jeweiligen Anteile der wichtigsten Bestandteile der Prüfsubstanz sind für die Interpretation der Testergebnisse nützlich, insbesondere in solchen Fällen, wo die Ergebnisse niedrig oder marginal sind.

Informationen über die Toxizität der chemischen Substanz gegenüber Mikroorganismen kann für die Interpretation niedriger Ergebnisse und die Auswahl geeigneter Prüfkonzentrationen von Nutzen sein.

1.2. Definitionen und Einheiten

Der Abbau wird definiert als die prozentuale Abnahme — DOC bezogen auf die Prüfsubstanz.

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

Dabei ist:

- D_t = der Abbau als prozentuale DOC-Abnahme zum Zeitpunkt t;
- C_0 = DOC-Konzentration des Kulturmediums (mg DOC/l) zu Beginn des Tests;
- C_t = DOC-Konzentration des Kulturmediums zum Zeitpunkt t (mg DOC/l);
- $C_{bl(0)}$ = DOC-Konzentration im Blindversuch (mg DOC/l) zu Beginn des Tests;
- $C_{bl(t)}$ = DOC-Konzentration im Blindversuch (mg DOC/l) zum Zeitpunkt t.

1.3. Kontrollsubstanzen

Die Benutzung geeigneter Kontrollsubstanzen zur Kontrolle der Aktivität des Inokulums ist wünschenswert. Z. B. können Anilin, Natriumacetat oder Natriumbenzoat dafür verwendet werden. Sie müssen innerhalb von 10 Tagen, angefangen von dem Tag, an dem der biologische Abbau zum ersten Mal über 10 % liegt, eine DOC-Abnahme von ≥ 70 % zeigen. Diese Ergebnisse müssen innerhalb der Testdauer von 28 Tagen erzielt werden. Andernfalls wird der Test als ungültig betrachtet und muß mit einem Inokulum aus einer anderen Quelle wiederholt werden.

⁽¹⁾ DOC = dissolved organic carbon.

1.4. Prinzip der Methode

Eine bestimmte Menge der Verbindung wird in einem anorganischen Medium (mineralisches Nährmedium), das Spurenelemente und essentielle Vitamine enthält, in einer Konzentration entsprechend 5—40 mg DOC/l gelöst. Die Lösung wird mit einer geringen Menge polyvalenter Mikroorganismen angeimpft und bei 20—25 °C im Dunkeln oder bei diffuser Beleuchtung auf der Schüttelmaschine bebrütet.

Der Abbau wird mittels DOC-Analyse über einen Zeitraum von 28 Tagen verfolgt.

Das Verfahren wird mit Hilfe einer Kontrollsubstanz überprüft. In einem parallelen Test ohne Prüf- oder Kontrollsubstanz wird der DOC-Blindwert ermittelt.

1.5. Qualitätskriterien

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde in den OECD- und EWG-Ringtests festgestellt.

Die niedrigste Konzentration der Prüfsubstanz, für die dieses Verfahren benutzt werden kann, wird in hohem Maße durch die Empfindlichkeitsgrenze der Analyse auf organisch gebundenen Kohlenstoff bestimmt, die beim augenblicklichen Stand der Technik bei 0,5 mg C/l liegt. Außerdem hängt sie von der gesamten Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs im Testmedium ab.

1.6. Beschreibung der Methode

1.6.1. Reagenzien

1.6.1.1. Wasser

Deionisiertes oder destilliertes Wasser, frei von toxischen Substanzen (insbesondere Kupfer), dient als Lösungsmittel.

Das destillierte Wasser darf nicht mehr als 10 % des durch die Prüfsubstanz eingebrachten organischen Kohlenstoffs enthalten.

Da die DOC-Analysen in einem Konzentrationsbereich von 0—40 mg/l durchgeführt werden, ist ein hoher Reinheitsgrad des Wassers erforderlich. Verunreinigungen können dem Wasser selbst entstammen, aber auch — wenn deionisiertes Wasser verwendet worden ist — durch das Ionenaustauscherharz oder durch Mikroorganismenwachstum verursacht sein (Bakterien, Algenbildung unter Lichteinfluß usw.). Für eine Testserie darf nur eine Wassercharge benutzt werden. Das Wasser ist vor Testbeginn durch eine DOC-Analyse zu kontrollieren. Falls erforderlich, kann geeignetes Wasser durch UV-Bestrahlung oder andere Methoden gewonnen werden.

1.6.1.2. Nährmedium

Jeweils 1 ml der nachfolgenden Lösungen a) bis f) werden zusammengegeben und mit Wasser (1.6.1.1) zu 1 l aufgefüllt (p.a. bedeutet zur Analyse):

- | | |
|---|---------------|
| a) Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 | p.a. 8,50 g, |
| Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 | p.a. 21,75 g, |
| Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | p.a. 33,40 g, |
| Ammoniumchlorid NH_4Cl | p.a. 20,00 g |
| werden in Wasser (1.6.1.1) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert sollte bei 7,2 liegen; | |
| b) Magnesiumsulfatheptahydrat $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | p.a. 22,50 g |
| werden in Wasser gelöst (1.6.1.1) und auf 1 000 ml aufgefüllt; | |
| c) Calciumchlorid CaCl_2 | p.a. 27,50 g |
| werden in Wasser (1.6.1.1) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt; | |

- d) Eisen (III) chloridhexahydrat $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a. 0,25 g
werden in Wasser (1.6.1.1) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt.
Diese Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch frisch anzusetzen;
- e) Lösung der Spurenelemente
Mangan(II)-sulfat $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (= 30,23 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) p.a. 39,9 mg,
Borsäure H_3BO_3 p.a. 57,2 mg,
Zinksulfat heptahydrat $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. 42,8 mg,
Ammoniummolybdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (= 36,85 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) p.a. 34,7 mg,
Fe-Chelat ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{EDTA}$) p.a. 100 mg
werden in Wasser (1.6.1.1) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Vorratslösung
von Spurenelementen ist bei 120° C und 2 atm 20 min. zu sterilisieren;
- f) Vitaminlösung:
Biotin p.a. 0,2 mg,
Nikotinsäure p.a. 2,0 mg,
Thiamin p.a. 1,0 mg,
p-Aminobenzoesäure p.a. 1,0 mg,
Pantothensäure p.a. 1,0 mg,
Pyridoxamin p.a. 5,0 mg,
Cyanocobalamin p.a. 2,0 mg,
Folsäure p.a. 5,0 mg
werden in Wasser (1.6.1.1) gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.
Die Lösung wird durch Membranfilter mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert. Statt
der Lösung 1.6.1.2 (f) können 15 mg Hefeextrakt in 100 ml Wasser (1.6.1.1)
benutzt werden.
- 1.6.1.3. Kontrollsubstanzen
Anilin (frisch destilliert), Natriumacetat, Natriumbenzoat.
- 1.6.1.4. Quecksilberchloridlösung
1 % HgCl_2 in Wasser (1.6.1.1).
- 1.6.2. Geräte
- 1.6.2.1. Schüttelmaschine zur Aufnahme von 2 l-Erlenmeyer-Kolben, die entweder mit einem Thermostaten
ausgestattet ist oder in einem klimatisierten Raum zwischen 20 und 25 °C gehalten wird.
- 1.6.2.2. 2 l-Erlenmeyer-Kolben mit engem Hals (Kolben mit Schikanen werden empfohlen).
Die Kolben müssen vor Gebrauch sorgfältig gereinigt (z. B. mit alkoholischer Salzsäure) gespült und
getrocknet werden, um Verunreinigungen mit Rückständen aus vorangegangenen Tests zu vermeiden.
Die Kolben müssen auch vor dem ersten Gebrauch gereinigt werden, da sie Verunreinigungen enthalten
können.
- 1.6.2.3. Membranfiltrationsgerät.
- 1.6.2.4. Membranfilter 0,2 µm Porengröße.
- 1.6.2.5. Kohlenstoffanalysator.
- 1.6.3. Vorbereitung des Inokulums
Jede der folgenden 4 Quellen kann für das Inokulum verwendet werden. Die Brauchbarkeit des
Inokulums wird mit Hilfe einer Kontrollsubstanz überprüft (1.6.1.3).

1.6.3.1. Inokulum aus Kläranlagenablauf

Das Inokulum entnimmt man vorzugsweise dem Ablauf einer gut arbeitenden Kläranlage, in der hauptsächlich häusliche Abwässer gereinigt werden. Die Ablaufprobe muß zwischen Probenahme und Verwendung aerob gehalten werden. Zur Zubereitung des Inokulums wird die Probe durch ein grobporiges Papierfilter filtriert, wobei die ersten 200 ml verworfen werden. Das Filtrat wird bis zur Verwendung aerob gehalten. Die Impfsuspension muß am gleichen Tag verwendet werden.

1.6.3.2. Inokulum aus Erde

100 g Erde (fruchtbare, nicht sterile Erde) werden in 1 000 ml chlorfreiem Trinkwasser suspendiert (Bodenarten mit sehr hohem Gehalt an Ton, Sand und organischem Kohlenstoff sind ungeeignet). Nach dem Umrühren läßt man die Suspension für 30 Minuten absitzen.

Der Überstand wird durch grobes Filterpapier filtriert, wobei die ersten 200 ml verworfen werden. Das Filtrat wird sofort und bis zur Verwendung fortlaufend belüftet. Die Impfsuspension muß am gleichen Tag verwendet werden.

1.6.3.3. Inokulum aus Oberflächenwasser

Eine Impfsuspension wird aus geeignetem Oberflächenwasser gewonnen. Die Probe wird durch ein grobes Filterpapier filtriert, die ersten 200 ml werden verworfen. Bis zur Verwendung wird das Filtrat aerob gehalten. Die Impfsuspension muß am gleichen Tag verwendet werden.

1.6.3.4. Misch-Inokulum

Die drei verschiedenen Impfsuspensionen werden zu gleichen Teilen gut vermischt und aus der Mischung eine neue Impfsuspension gewonnen. Die Eignung der Impfsuspension wird durch eine Kontrollsubstanz geprüft (1.6.1.3).

1.6.4. Prüfverfahren

Die zu untersuchenden Substanzen werden in doppelten Ansätzen gleichzeitig mit der Kontrollsubstanz (1.6.1.3) geprüft. Außerdem wird ein Blindversuch mit Inokulum, aber ohne Prüf- oder Kontrollsubstanz zur Bestimmung von DOC-Blindwerten durchgeführt.

Eine Stammlösung der Prüfsubstanz in Wasser (1.6.1.1) wird hergestellt. Von dieser Lösung wird soviel zum Nährmedium gegeben (1.6.1.2), daß eine Kohlenstoffkonzentration von 5—40 mg DOC/l erreicht wird. Die Ausgangskonzentration der Kontrollsubstanz (1.6.1.3) entspricht 20 mg DOC/l.

Je 900 ml des Nährmediums werden in 2 Kolben gefüllt (1.6.2.2) und mit je 0,5 ml/l Impfsuspension angeimpft (1.6.3). Die Öffnung des Kolbens wird z. B. mit Alufolie so abgedeckt, daß ein Luftaustausch zwischen Kolben und Umgebungsluft nicht übermäßig behindert wird (Baumwollwatte ist wegen möglicher Streuungen der DOC-Analyse ungeeignet). Dann werden die Kolben auf der Schüttelmaschine befestigt. Die Temperatur von 20—25 °C darf während des Tests nicht verändert werden. Außerdem sollten die Kolben vor Licht geschützt werden. Die Luft sollte frei von Schadstoffen und toxischem Material (chlorierte Lösungsmittel usw.) sein.

Im Laufe des Abbautests werden am 1., 27. und 28. Tag die DOC-Konzentrationen in doppelter Ausführung bestimmt. Mindestens 3 weitere Analysen (etwa 7., 14. und 21. Tag) müssen durchgeführt werden, um den Verlauf des biologischen Abbaus zu verfolgen.

Nur das für die Bestimmung notwendige Volumen an Kulturmedium soll jeweils entnommen werden. Zur Zentrifugierung oder Membranfiltration, die der eigentlichen Kohlenstoffbestimmung vorausgehen, sind je nach Gerät verschiedene Volumina nötig. Verdunstungsverluste des Nährmediums müssen mit Wasser (1.6.1.1) ausgeglichen werden. Das Kulturmedium muß vor jeder Probenahme gut gemischt werden. An der Kolbenwand festhaftende Bestandteile müssen vor der Probenahme gelöst oder suspendiert werden. Die Membran-Filtration oder die Zentrifugierung muß sofort danach durchgeführt

werden. Die filtrierten oder zentrifugierten Proben müssen am gleichen Tag analysiert werden. Andernfalls sind sie mit 0,05 ml der HgCl_2 -Lösung (1.6.1.4) pro 10 ml Nährmedium für einen Tag bei 2—4 °C oder bei längerer Dauer bei -18 °C zu konservieren.

Wird vor dem 28. Tag eine Plateauphase erreicht, kann der Test beendet werden, wenn der Abbau offensichtlich vor dem 28. Tag begann. Wird jedoch kein Plateau erreicht, ist es sinnvoll, das Experiment noch 1—2 Wochen länger fortzuführen.

Alle Verfahrensschritte erfordern große Sorgfalt und Sauberkeit der Gefäße, der Pipetten usw., jedoch keine sterilen Bedingungen.

1.6.5. *DOC-Bestimmungen*

Membranfilter sind geeignet, wenn sichergestellt ist, daß sie weder Kohlenstoff freisetzen noch die Substanz beim Filtrieren adsorbieren.

Wenn die Proben zentrifugiert werden, muß dies bei $40\,000\text{ ms}^{-2}$ ($\sim 4\,000\text{ g}$) 15 Minuten lang geschehen, vorzugsweise in einer gekühlten Zentrifuge, auf jeden Fall jedoch unter 40 °C.

Anmerkung:

Die Zentrifugierung scheint bei sehr geringen Konzentrationen keine sehr gute TOC/DOC-Differenzierung zu ergeben, da entweder nicht alle Bakterien abgetrennt werden oder aber Bakterienplasma teilweise wieder in Lösung geht. Bei höheren Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz ($\geq 10\text{ mg C/l}$) und der gleichen, geringen Impfungsmenge scheint der Fehler beim Zentrifugieren vergleichsweise gering zu sein.

Die dem Kulturmedium entnommene Probe (ca. 30 ml) wird unverzüglich zentrifugiert oder membranfiltriert (1.6.2.3). Dabei benutzt man Membranfilter gemäß 1.6.2.4. Die ersten 20 ml des Filtrats werden verworfen.

Mit dem verbleibenden Filtrat (ca. 10 ml) wird in einem TOC/DOC-Meßgerät (1.6.2.5) eine doppelte Bestimmung der DOC-Konzentration vorgenommen. Sollte eine Analyse des Filtrats nicht am gleichen Tag möglich sein, so ist die Lösung gemäß 1.6.4 aufzubewahren.

2. DATEN UND AUSWERTUNG

Die Analysenergebnisse werden auf dem beigegeführten Formblatt (Anlage 1) festgehalten und die Werte der biologischen Abbaubarkeit gemäß 1.2 berechnet.

Die DOC-Konzentrationen werden auf 0,1 mg/l genau berechnet. Die ermittelten D_t -Werte werden auf das nächste ganze Prozent gerundet.

Der Verlauf der Abbauprüfung wird graphisch in einem Diagramm dargestellt, das in Anlage 2 enthalten ist.

Die Ergebnisse der Abbauprüfung sind gültig, wenn die Bedingung erfüllt ist, daß in der gleichen Testserie die Kontrollsubstanz innerhalb von 10 Tagen nach dem erstmaligen Überschreiten der 10 %-Abbau-Schwelle eine Abnahme der DOC-Konzentration von $\geq 70\%$ erzielt wird. Dieses Ergebnis muß innerhalb der Testdauer von 28 Tagen erzielt werden. Sonst muß die gesamte Testserie verworfen werden.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält:

— Daten wie auf dem Formblatt in Anlage 1 angegeben;

- der Verlauf des Abbaus wird graphisch dargestellt in einem Diagramm, in dem die lag-Phase, die Abbauphase, die Steigung und das Zeitfenster angegeben werden („Zeitfenster“ bezeichnet hier einen Zeitraum von 10 Tagen beginnend mit dem Tag, an dem der beobachtete Abbaugrad zum ersten Mal 10 % übersteigt);
- Kriterium für die Gültigkeit des Tests: Die Kontrollsubstanz erzielt eine Abnahme der DOC-Konzentration von ≥ 70 % innerhalb von 10 Tagen, angefangen von dem Tag, an dem der biologische Abbau zum ersten Mal mehr als 10 % beträgt. Dieses Ergebnis muß innerhalb der Testdauer von 28 Tagen erzielt werden.

3.2. Interpretation der Ergebnisse

Aufgrund der Strenge dieses Tests bedeutet ein niedriges Ergebnis nicht unbedingt, daß die Prüfsubstanz unter Umweltbedingungen biologisch nicht abbaubar ist, sondern zeigt nur, daß weitere Untersuchungen notwendig sind, um dies festzustellen.

Prüfsubstanzen, bei denen in diesem Test eine hohe DOC-Abnahme beobachtet wird, können als biologisch leicht abbaubar angesehen werden, falls diese Abnahme innerhalb von 10 Tagen nach Überschreiten eines Abbaugrads von 10 % erreicht wird.

4. LITERATUR

- (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.

Anlage 1

Biologischer Abbau: Modifizierter OECD Screening-Test

Prüfinstitut:

Prüfsubstanz:

Exp.-Nr.:

Prüfdaten

Theoretische Konzentration: mg/l DOC.

Kohlenstoffbestimmungen

	Kolben Nr.		DOC-Konzentration nach x Tagen (mg/l)						
			0 (C ₀)						
<i>Test</i> Min. Nährlösung mit Testsubstanz und Inokulum	1	a ₁							
		a ₂							
		$C_{a(t)} = \frac{a_1 + a_2}{2}$							
	2	b ₁							
		b ₂							
		$C_{b(t)} = \frac{b_1 + b_2}{2}$							
<i>Blindversuch</i> Min. Nährlösung ohne Prüfsubstanz, aber mit Inokulum	3	bl ₁							
		bl ₂							
		$C_{bl(t)} = \frac{bl_1 + bl_2}{2}$							

Bewertung der Rohdaten

Kolben Nr.	Berechnung der Ergebnisse	% DOC-Abnahme nach x Tagen						
		0						
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						
Mittelwert (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0						

N.B.: D₁ und D₂ sollten nicht gemittelt werden, wenn der Unterschied zu groß ist.

Biologischer Abbau: Modifizierter OECD Screening-Test

Prüfinstitut:

Untersuchungsleiter:

Testbeginn: Exp.-Nr.

Prüfsubstanz:

Chemische Struktur:

Stammlösung:

	mg/l	mg/l TOC ⁽¹⁾	mg/l DOC ⁽²⁾
Prüfsubstanz Konz.			

(1) Nichtübereinstimmung zwischen den DOC- und TOC-Werten deuten auf eine ungenügende Löslichkeit der Substanzen.

(2) Alle DOC-Werte wurden nach Membranfiltration oder Zentrifugierung ermittelt.

Kohlenstoffanalysator:

Inokulum:

Prüfergebnisse

D_t = % DOC-Abnahme nach Tagen

Gültigkeit der Ergebnisse

Kontrollsubstanz:

Ergebnis: % DOC-Abnahme nach Tagen

Bezugsexperiment-Nr.

Bemerkungen:

..... Datum Unterschrift

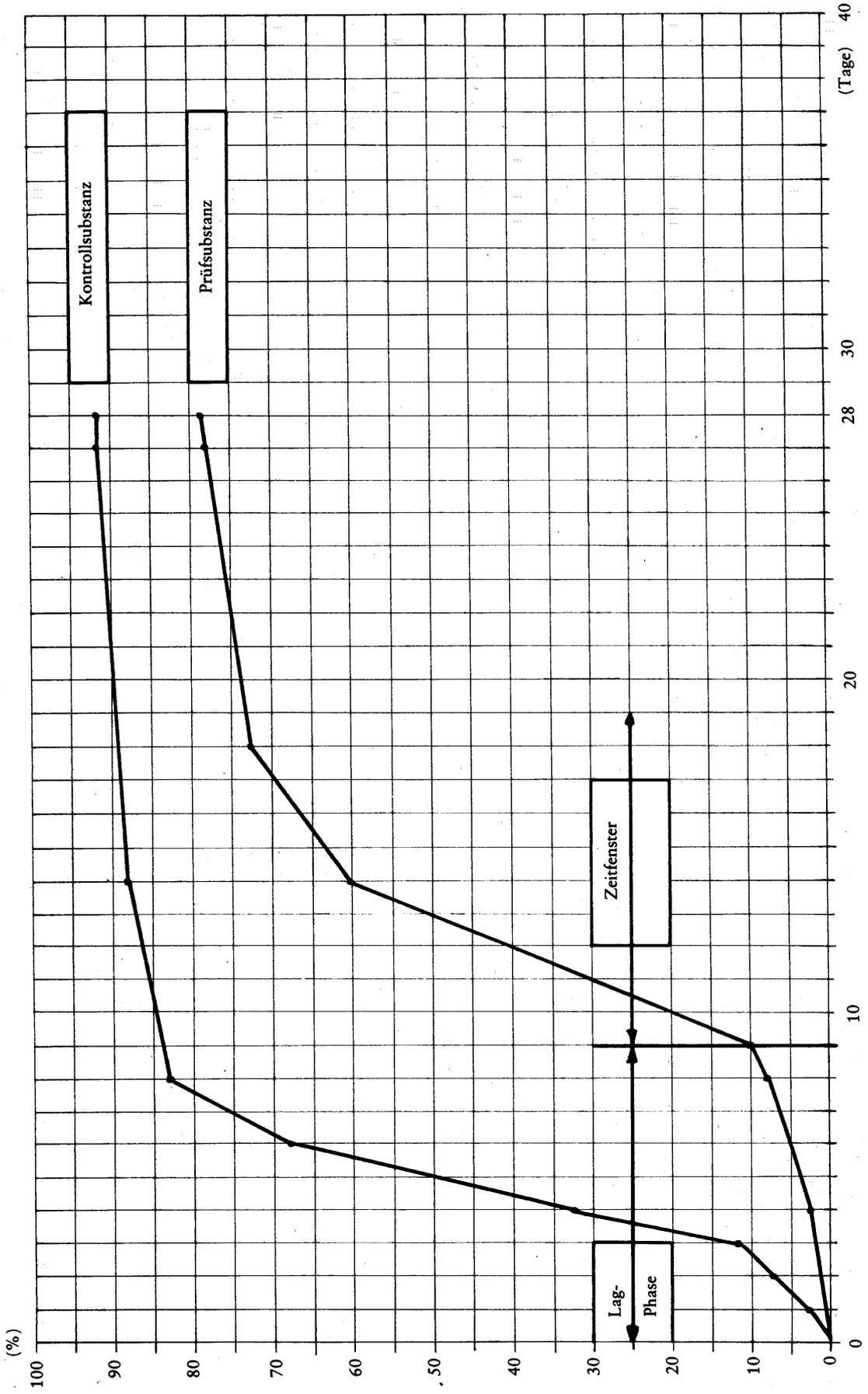
Anlage 2

Modifizierter OECD Screening-Test

Prüfstitut: Exp.-Nr.:

Prüfsubstanz:

DOC-Abnahme (%)



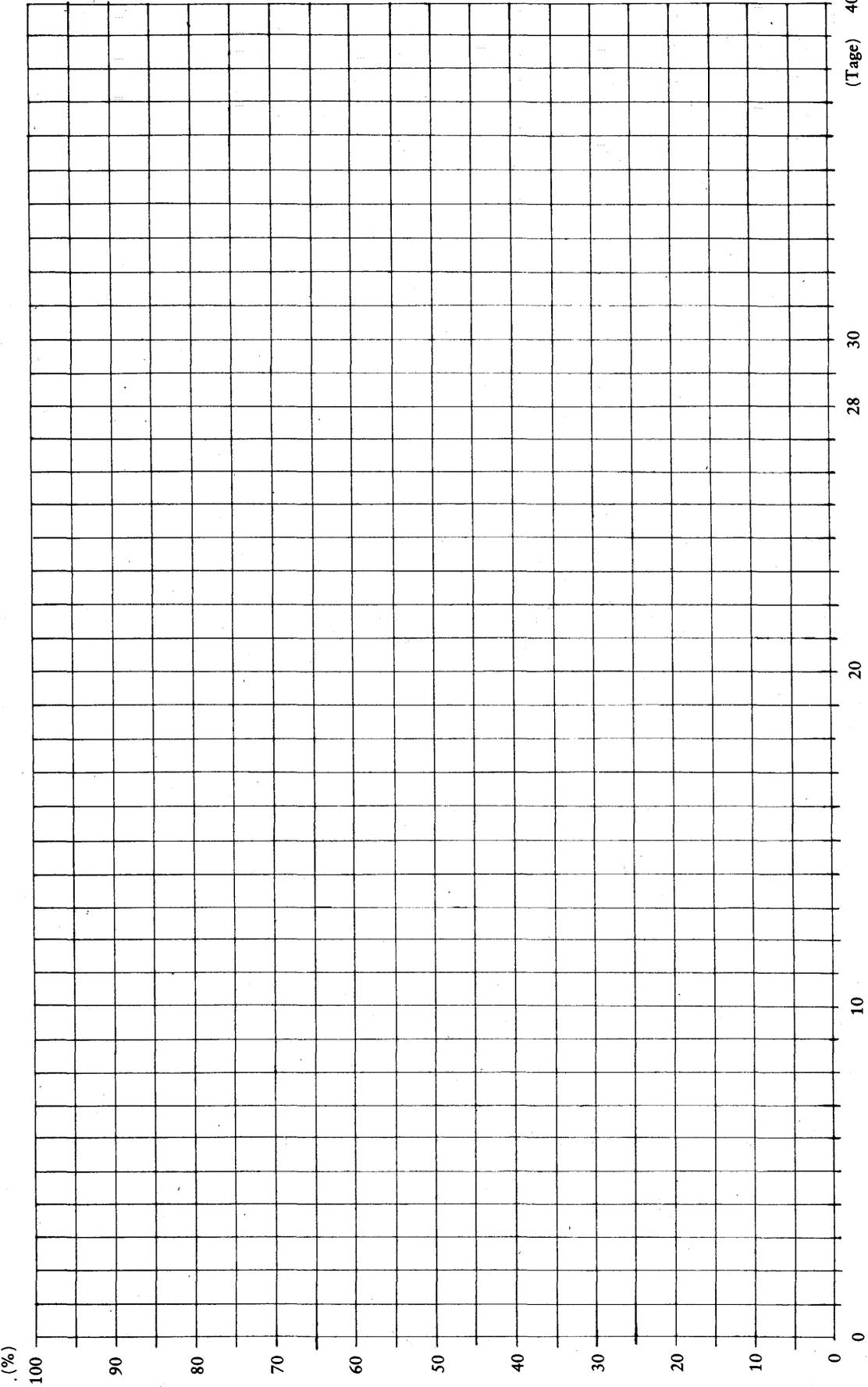
Modifizierter OECD Screening-Test

Exp.-Nr.:

Prüfsubstanz:

Prüfinstitut:

DOC-Abnahme
(%)



C. 4. ABBAUBARKEIT

BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — MODIFIZIERTER AFNOR-TEST — NF T 90/302

1. METHODE

1.1. Einleitung

Zweck dieser Prüfmethode ist die Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit wasserlöslicher, nicht flüchtiger organischer Verbindungen in einem aeroben, wäßrigen Milieu bei einer Anfangskonzentration der Prüfsubstanz, die 40 mg gelöstem organischem Kohlenstoff je Liter entspricht. Wenn die Empfindlichkeit der Analysengeräte für organischen Kohlenstoff verbessert wird, kann die Verwendung niedrigerer Konzentrationen vorteilhaft sein, insbesondere bei toxischen Verbindungen.

Der Gehalt der Prüfsubstanz an organischem Kohlenstoff muß bekannt sein.

Die Methode ist nur auf solche organischen Prüfsubstanzen anwendbar, die bei der in der Prüfung angewendeten Konzentration

- ausreichend wasserlöslich sind, um die Anfangskonzentration zu erreichen (40 mg DOC/l),
- einen vernachlässigbaren Dampfdruck haben,
- nicht bakterienhemmend sind,
- nicht nennenswert an Glasoberflächen adsorbiert werden.

Die Kenntnis der Zusammensetzung der Prüfsubstanz ist nützlich für die Interpretation der Ergebnisse, insbesondere wenn Werte erhalten wurden, die nur einen geringen Abbau anzeigen.

Die Kenntnis der Toxizität der Prüfsubstanz für Mikroorganismen kann für die Interpretation niedriger Abbauwerte von Nutzen sein.

1.2. Definitionen und Einheiten

Der Abbau wird definiert als die prozentuale Abnahme des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC, dissolved organic carbon) bezogen auf die Prüfsubstanz:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

D_t = biologischer Abbau als DOC-Abnahme in Prozent zur Zeit t ;

C_0 = DOC-Konzentration (mg/l) im Prüfansatz zu Beginn;

C_t = DOC-Konzentration (mg/l) im Prüfansatz zur Zeit t ;

$C_{bl(0)}$ = DOC-Konzentration (mg/l) im Blindversuch zu Beginn;

$C_{bl(t)}$ = DOC-Konzentration (mg/l) im Blindversuch zur Zeit t .

1.3. Kontrollsubstanzen

Die Benutzung geeigneter Kontrollsubstanzen zur Überprüfung der Aktivität des Inokulums ist wünschenswert. Zu diesem Zweck können z. B. Anilin, Natriumacetat oder Natriumbenzoat benutzt werden. Sie müssen innerhalb von 28 Tagen zu einer Abnahme von mindestens 70 % des gelösten organischen Kohlenstoffs führen. Andernfalls wird die Prüfung als ungültig betrachtet und sollte mit einem Inokulum anderer Herkunft wiederholt werden.

Bei dieser speziellen Prüfmethode wird Glukose besonders zur Erkennung einer Hemmwirkung eingesetzt. Außerdem dient sie zur Kontrolle der Aktivität des Inokulums, das allerdings auch mit Anilin, Natriumacetat oder Natriumbenzoat überprüft werden kann.

1.4. Prinzip der Methode

Im Wasser gelöste organische Substanzen können biologisch abgebaut werden durch chemo-organotrophe Mikroorganismen, die die Substanz als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Die Prüfsubstanzen werden mit einer Konzentration, die 40 mg/l organischem Kohlenstoff entspricht, eingesetzt. Der in der Lösung verbleibende organische Kohlenstoff wird mindestens nach 3, 7, 14 und 28 Tagen gemessen. Gleichzeitig werden eventuelle Hemmwirkungen der Prüfsubstanz auf das Inokulum untersucht. Das Verfahren wird mit einer Kontrollsubstanz überprüft.

1.5. Qualitätskriterien

Die Reproduzierbarkeit der Methode ist in Ringversuchen von OECD und EWG festgestellt worden.

Die niedrigste Prüfsubstanzkonzentration, für die diese Prüfmethode benutzt werden kann, hängt in hohem Maße von der Empfindlichkeit der organischen Kohlenstoffanalyse ab, die im augenblicklichen Stand der Technik bei 0,5 mg C/l liegt, sowie außerdem von der Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs im Testmedium.

1.6. Beschreibung der Methode

1.6.1. Reagenzien

Es müssen Chemikalien „zur Analyse“ (p.a.) verwendet werden.

1.6.1.1. Destilliertes Wasser

Das destillierte Wasser darf nicht mehr als 10 % der Menge an organischem Kohlenstoff enthalten, die mit der Prüfsubstanz eingebracht wird.

1.6.1.2. Nährmedium

Das Nährmedium ist unter Verwendung sterilen Materials, wie unten angegeben, zuzubereiten. Für 1 l Nährmedium sind folgende Stoffe in destilliertem Wasser aufzulösen:

(p.a. bedeutet „pro analysi“)

Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	p.a. 0,300 g,
Ammoniumnitrat NH_4NO_3	p.a. 0,150 g,
Kalium-dihydrogenphosphat KH_2PO_4	p.a. 0,300 g,
Di-natrium-hydrogenphosphat-dodekahydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	p.a. 2,000 g,
Magnesiumsulfat-heptahydrat $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	p.a. 0,050 g,
Calciumchlorid-dihydrat $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	p.a. 0,050 g,
Hefeextrakt	0,005 g;

der pH-Wert beträgt $7,5 \pm 0,1$.

Hinzuzugeben ist 1 ml einer Spurenelementlösung folgender Zusammensetzung:

Eisen(II)-sulfat-heptahydrat $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	p.a. 0,100 g,
Mangan(II)-sulfat-monohydrat $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	p.a. 0,100 g,
Kaliummolybdat K_2MoO_4	p.a. 0,025 g,
Natrium-tetraborat-dekahydrat $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	p.a. 0,025 g,

Kobalt(II)-nitrat-hexahydrat $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	p.a. 0,025 g,
Kupferchlorid(II)-dihydrat $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	p.a. 0,025 g,
Zinkchlorid ZnCl_2	p.a. 0,025 g,
Ammonium-metavanadat NH_4VO_3	p.a. 0,010 g;

mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen.

(Die Spurenelementlösung kann einen Monat lang bei einer Temperatur zwischen + 1 °C und + 4 °C aufbewahrt werden).

Auf das Volumen (1 l) auffüllen und mischen. Das Medium muß innerhalb von 12 Stunden verwendet werden.

1.6.1.3. Kontrollsubstanzen

Anilin (frisch destilliert), Natriumacetat, Natriumbenzoat, Glukose.

1.6.2. Geräte

Übliche Laborgeräte sowie:

- Apparat zur Bestimmung von organischem Kohlenstoff,
- Spektralphotometer,
- Zentrifuge 4 000 g,
- Schüttelmaschine zur ausreichenden Belüftung und zum Durchschütteln,
- Apparat zur Bestimmung von gelöstem Sauerstoff, pH-Meter, 500 ml Weithals-Erlenmeyerkolben (steril),
- Apparat zur Sterilfiltration (Membranfilter von 0,22 µm Porengröße),

Die Glasgeräte müssen sorgfältig gereinigt und insbesondere frei von jeder Spur organischer oder toxischer Stoffe sein.

1.6.3. Vorbereitung des Inokulums

Zu entnehmen ist eine ausreichende Menge eines Gemisches von drei Proben aus verschmutztem Oberflächenwasser und Ableitungen von städtischen Kläranlagen, die keine wesentlichen speziellen Schadstoffe enthalten. Die Keimzahl jeder Probe muß mindestens 10^5 Bakterien/ml betragen.

Die Proben müssen einschließlich des Transports innerhalb von 12 Stunden zur Impfung verwendet werden und dürfen nicht länger als 6 Stunden ohne Belüftung bleiben.

Durch Papier filtern, um die größeren unlöslichen Partikel zu entfernen, das Filtrat auffangen und durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtrieren.

Mit einer isotonischen Lösung nachwaschen. Die auf der Membran abgelagerten Bakterien in eine kleinere Menge einer beliebigen isotonischen Lösung geben. Gut mischen. Die Extinktion bei 620 nm messen und daraus die Bakterienkonzentration ermitteln aus einer Eichkurve, die zuvor durch eine Zählung von *Pseudomonas fluorescens* Stamm ATCC 15453 ermittelt wurde. Das erforderliche Volumen der isotonischen Lösung hinzufügen, um die Bakterienkonzentration auf $(5 \pm 3) \times 10^7$ /ml einzustellen. Das Inokulum ist innerhalb der nächsten Stunde zu verwenden.

1.6.4. Arbeitsprüfverfahren

Die Inkubation muß unter möglichst weitgehendem Ausschluß von Licht in einem auf 20–25 °C gehaltenen Brutschrank, der frei von giftigen Dämpfen ist, durchgeführt werden.

Zuzubereiten sind folgende Lösungen:

1. Lösung des zu prüfenden Stoffes im Nährmedium mit einer Konzentration von 40 mg/l organischen Kohlenstoffs;
2. Lösung von Glukose im Nährmedium mit einer Konzentration von 40 mg/l organischen Kohlenstoffs;
3. Lösung, die im Nährmedium die verwendeten Prüfsubstanz- und Glukosekonzentrationen enthält;
4. daneben ist ein ausreichendes Volumen des Nährmediums bereitzuhalten.

Die vier Lösungen sind jede für sich zu mischen und durch Membranfiltration zu sterilisieren.

Membranfilter sind geeignet, wenn gewährleistet ist, daß sie weder Kohlenstoff freisetzen noch die zu filtrierende Substanz adsorbieren.

Die erforderlichen Manipulationen sind mit sterilen Arbeitsmethoden durchzuführen. Die Lösungen sind gemäß dem nachfolgenden Schema auf (zuvor sterilisierte) Prüfkolben aufzuteilen:

Kolben Nr. 1 (Prüfansatz)	150 ml Lösung 1;
Kolben Nr. 2 (Prüfansatz)	150 ml Lösung 1;
Kolben Nr. 3 (Prüfansatz)	150 ml Lösung 1;
Kolben Nr. 4 (Sterilitätskontrolle)	150 ml Lösung 1;
Kolben Nr. 5 (Glukosekontrolle)	150 ml Lösung 2;
Kolben Nr. 6 (Feststellung einer Hemmwirkung)	150 ml Lösung 3;
Kolben Nr. 7 (Blindversuch ohne Substrat)	150 ml Lösung 4.

Die Kolben Nrn. 1, 2, 3, 5, 6 und 7 sind mit 1,5 ml Inokulum zu impfen und durch manuelles Schütteln gut durchzumischen.

Aus jedem Kolben ein Aliquot von 3—5 ml entnehmen.

Diese sind bei 4 000 g 15 Minuten lang zu zentrifugieren, wobei die Temperatur unter 26 °C zu halten ist.

Der Überstand ist für die Bestimmung von organischem Kohlenstoff zum Zeitpunkt 0 zu verwenden.

Die Kolben sind auf eine Schüttelmaschine zu stellen, wo sie während des ganzen Versuchs bleiben. Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs im Kolben Nr. 5 muß am 3. Tag mindestens 5 mg/l betragen.

Die gleiche DOC-Bestimmung wie zu Beginn des Versuchs ist in den Kolben Nrn. 1, 2, 3, 5, 6 und 7 mindestens nach 3, 7, 14 und 28 Tagen Inkubationszeit durchzuführen. Sobald jedoch die Abnahme des Kohlenstoffgehalts 95 % des anfänglichen Gehalts in den Kolben Nrn. 1, 2 und 3 erreicht, ist die Prüfung als abgeschlossen zu betrachten.

Die Prüfung kann vor dem 28. Tag abgebrochen werden, wenn vorher ein Plateau beobachtet wurde. Wenn der Abbau am 28. Tag offensichtlich begonnen hat, ohne jedoch bereits ein Plateau zu erreichen, dann ist es sinnvoll, das Experiment noch 1—2 Wochen weiterzuführen.

Am Ende der Prüfung ist im Kolben Nr. 4 ebenso wie zur Zeit 0 eine Bestimmung des organischen Kohlenstoffs durchzuführen. Außerdem ist die Sterilität zu überprüfen, indem ein Röhrchen mit flüssigem Kulturmedium angeimpft und 5 Tage lang bei 25 °C inkubiert wird.

Kulturmedium:

entwässerter Hefeextrakt	3 g,
pankreatisches Caseinpepton	6 g,
Wasser	1 000 ml.

Die trockenen Bestandteile des Kulturmediums sind zusammen in kochendem Wasser aufzulösen. Nötigenfalls ist der pH-Wert einzustellen, so daß er nach dem Sterilisieren bei 20 °C $7,2 \pm 0,2$ beträgt.

Muß die Bestimmung des organischen Kohlenstoffgehalts verschoben werden, ist die überstehende Lösung bei 4 °C in luftdicht verschlossenen Glaskolben im Dunkeln aufzubewahren. Die höchstzuläs-

sige Aufbewahrungszeit beträgt 24 Stunden. Kann die Analyse nicht innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden, dann ist die Lösung bei einer Temperatur unter -18°C einzufrieren.

Als Ausgleich für einen möglichen Wasserverlust durch Verdunstung ist das Volumen des Mediums im Kolben vor jeder Probenahme nachzuprüfen und gegebenenfalls mit destilliertem Wasser, das durch Filtrieren über eine Membran mit einer Porengröße von 0,22 μm umsterilisiert wurde, auf das nach der vorhergehenden Probenahme gemessene Volumen aufzufüllen.

2. DATEN UND AUSWERTUNG

Die Analysenergebnisse werden auf dem beiliegenden Formblatt (Anlage 1) eingetragen. Die Werte der biologischen Abbaubarkeit werden gemäß 1.2 berechnet.

Die Ergebnisse der Prüfung sind gültig, wenn die Bedingungen erfüllt sind,

- daß der biologische Glukoseabbau im Kolben Nr. 5 am 7. Tag mindestens 80 % erreicht hat,
- daß Kolben Nr. 4 am Ende des Versuchs noch steril ist,
- daß die Konzentration des gelösten Sauerstoffs im Kolben Nr. 5 am 3. Tag mindestens 5 mg/l beträgt.

Der Grad des biologischen Abbaus des Glukose im Kolben Nr. 6 muß am 7. Tag mindestens 75 % des im Kolben Nr. 5 gemessenen Wertes betragen. Wird dieser Wert nicht erreicht, darf angenommen werden, daß die Prüfschubstanz auf Bakterien hemmend wirkt und die Prüfmethode daher bei der betreffenden Konzentration nicht anwendbar ist.

Anmerkungen:

Der Vergleich der prozentualen Abnahme von gelöstem organischem Kohlenstoff in den Kolben Nrn. 1, 2 und 3 auf der einen Seite mit den Werten im Kolben Nr. 4 auf der anderen Seite ermöglicht es, bei den Ursachen für den beobachteten Abbau zu differenzieren:

- die physikalisch-chemischen Mechanismen im Kolben Nr. 4 und
- die physikalisch-chemischen zusammen mit den biologischen Mechanismen in den Kolben Nrn. 1, 2 und 3.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Alle Versuchsergebnisse über die Prüfschubstanz, die Kontrollschubstanz und die Blindproben sollen festgehalten werden. Zu erwähnen sind insbesondere folgende Punkte:

- Ausmaß des Bioabbaus in Kolben Nr. 4 am Ende der Prüfung;
- irgendwelche beobachteten Hemmwirkungsphänomene;
- Nachweis der Gültigkeit;
- der Verlauf des Abbaus wird graphisch dargestellt in einem Diagramm, in dem die lag-Phase, die Abbauphase, die Steigung und das Zeitfenster angegeben werden („Zeitfenster“ bezeichnet hier einen Zeitraum von 10 Tagen beginnend mit dem Tag, an dem der beobachtete Abbaugrad zum ersten Mal 10 % übersteigt).

3.2. Interpretation

Wegen der Strenge dieses Prüfverfahrens bedeutet ein niedriges Ergebnis nicht unbedingt, daß die Prüfverbindung unter Umweltbedingungen nicht biologisch abbaubar ist, sondern zeigt nur, daß es weiterer Arbeiten bedarf, um dies festzustellen.

Solche Prüfschubstanzen, bei denen ein großer Anteil des gelösten organischen Kohlenstoffs abgebaut wird, sollten als biologisch leicht abbaubar angesehen werden, falls dieser Abbaugrad innerhalb von 10 Tagen nach Überschreiten eines Abbaugrads von 10 % erreicht wird (Zeitfenster).

4. LITERATUR

- (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.
-

Anlage 1

Formblatt für den modifizierten AFNOR-Test

Experiment-Nr.:
 Datum des Versuchsbeginns:
 Prüf-/Kontrollsubstanz:
 Theoretische Prüfkonzentration:
 Kohlenstoffanalyse:

DOC-Bestimmungen

Kulturmedium	Kolben Nr.	Lösliche organische Kohlenstoffkonzentrationen nach x Tagen in mg/l				
		0	3	7	14	28
Prüfansatz	1	1 _{C₀}	1 _{C₃}	1 _{C₇}	1 _{C₁₄}	1 _{C₂₈}
Prüfansatz	2	2 _{C₀}	2 _{C₃}	2 _{C₇}	2 _{C₁₄}	2 _{C₂₈}
Prüfansatz	3	3 _{C₀}	3 _{C₃}	3 _{C₇}	3 _{C₁₄}	3 _{C₂₈}
Mittelwert	1-3	\bar{C}_0	\bar{C}_3	\bar{C}_7	\bar{C}_{14}	\bar{C}_{28}
Sterilitätskontrolle	4	4 _{C₀}	4_{C₃}	4_{C₇}	4_{C₁₄}	4 _{C₂₈}
Glukosekontrolle	5	5 _{C₀}	5 _{C₃}	5 _{C₇}	5 _{C₁₄}	5 _{C₂₈}
Hemmwirkungskontrolle	6	6 _{C₀}	6 _{C₃}	6 _{C₇}	6 _{C₁₄}	6 _{C₂₈}
Blindversuch	7	C _{bl(0)}	C _{bl(3)}	C _{bl(7)}	C _{bl(14)}	C _{bl(28)}

Auswertung

	t = 0	3	7	24	28
Prüfansatz $\left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
Glukosekontrolle $\left[1 - \frac{5C_t - C_{bl(t)}}{5C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
Hemmwirkungskontrolle $\left[1 - \frac{6C_t - C_{bl(t)}}{6C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				

Gültigkeit

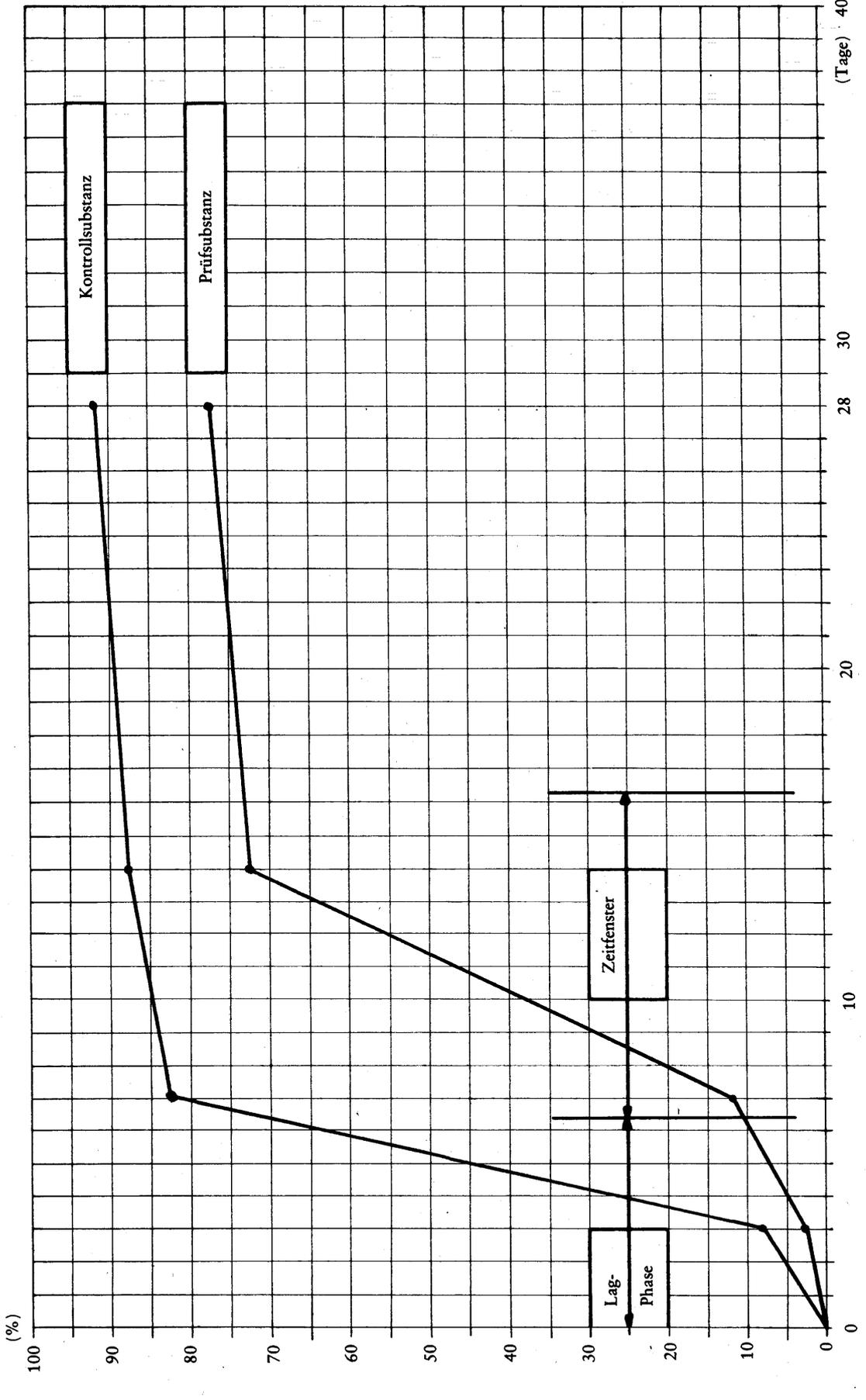
gelöster Sauerstoff Kolben Nr. 5, 3. Tag: mg/l
 % biologischer Abbau Kolben Nr. 5, 7. Tag: %
 % biologischer Abbau Kolben Nr. 6, 7. Tag: %
 Sterilität Kolben Nr. 4:

Anlage 2

Modifizierter AFNOR-Test NF T 90/302

Prüfinstitut: Prüfsubstanz: Exp.-Nr.:

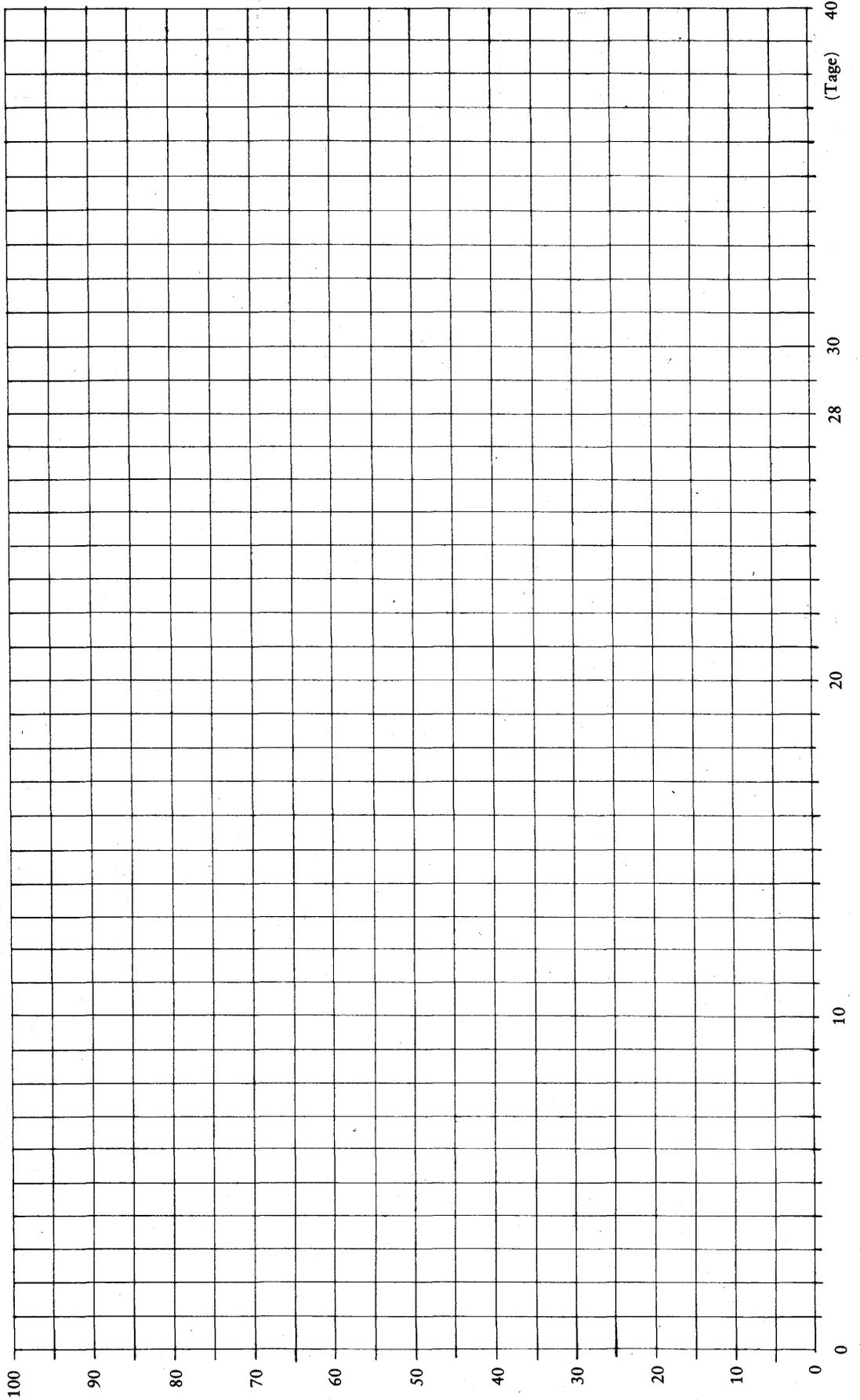
DOC-Abnahme (%)



Modifizierter AFNOR-Test NF T 90/302

Prüfstoff: Prüfsubstanz: Exp.-Nr.:

DOC-Abnahme (%)



C. 5. ABBAUBARKEIT

BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — MODIFIZIERTER STURM-TEST

1. METHODE

1.1. Einleitung

Zweck des Verfahrens ist die Messung der biologischen Abbaubarkeit nichtflüchtiger organischer Substanzen in einem aeroben wäßrigen Medium mit zwei Ausgangskonzentrationen des zu prüfenden Stoffes von 10 bzw. 20 mg/l (Standardkonzentrationen).

Der Gehalt der Testsubstanz an organischem Kohlenstoff muß zu ermitteln sein, entweder über eine TOC-Analyse oder über eine Berechnung z. B. aufgrund der chemischen Formel, die auch zur Berechnung der theoretischen CO₂-Produktion zu verwenden ist.

Das Verfahren läßt sich nur auf solche organischen Stoffe anwenden, die bei den Testkonzentrationen

- einen vernachlässigbaren Dampfdruck aufweisen;
- auf Bakterien nicht hemmend wirken.

Zumindest grundsätzlich ist das Verfahren auch auf Substanzen anwendbar, die bei der Testkonzentration schwer wasserlöslich sind.

Informationen über den relativen Anteil der wichtigsten Verunreinigungen der Prüfsubstanz können sowohl für die Interpretation der Ergebnisse, wie auch für die Wahl der am besten geeigneten Prüfkonzentration von Nutzen sein.

Informationen über die toxische Wirkung der Prüfsubstanz gegenüber Mikroorganismen können für die Interpretation von Prüfergebnissen, die nur einen geringen Abbau anzeigen, von Nutzen sein.

1.2. Definitionen und Einheiten

Der biologische Abbau einer Substanz wird in diesem Test aufgrund der Menge von Kohlendioxid (CO₂) definiert, die durch die Tätigkeit der Mikroorganismen freigesetzt wird.

Dieser Wert wird als Prozentsatz der theoretischen Kohlendioxidmenge (ThCO₂) angegeben, die bei einer vollständigen Oxidation der Substanz entstehen würde.

1.3. Kontrollsubstanzen

Die Verwendung einer geeigneten Kontrollsubstanz zur Überprüfung der Aktivität des Impfguts ist wünschenswert.

Anilin, Natriumacetat oder Natriumbenzoat könnten dazu benutzt werden. Sie müssen innerhalb von 28 Tagen eine CO₂-Freisetzung von ≥ 60 % der theoretischen Menge aufweisen; anderenfalls wird der Test als ungültig betrachtet und muß mit einem Inokulum aus einer anderen Quelle wiederholt werden.

1.4. Prinzip der Methode

Die Testsubstanz wird in ein definiertes Nährmedium gegeben, das mit einem Inokulum aus Belebtschlamm beimpft und bei 20 °C bis 25 °C belüftet wird. Die Temperatur wird über den gesamten Testzeitraum aufgezeichnet.

Das freigesetzte CO₂ wird als BaCO₃ gebunden, der Abbau wird über die Prüfdauer von 28 Tagen über die CO₂-Analyse verfolgt.

Nach Ablauf der Versuchsdauer wird unter Abzug der Ergebnisse des Blindwertansatzes die gesamte CO_2 -Menge bestimmt, die aus der Prüfsubstanz stammt. Diese wird dann als Prozentsatz des theoretischen Wertes ausgedrückt, also der CO_2 -Menge, die von der Prüfsubstanz aufgrund ihres Kohlenstoffgehalts theoretisch hätte freigesetzt werden können.

Das Verfahren wird mit einer Kontrollsubstanz überprüft (siehe 1.6.1.3).

1.5. Qualitätskriterien

Die Wiederholbarkeit dieser Methode wurde in OECD- und EWG-Ringtests festgestellt.

Die Eigenproduktion des Impfguts an CO_2 , die im Blindversuch bestimmt wird, ist der Hauptgrund dafür, daß eine Testkonzentration von weniger als 5 mg/l nicht eingesetzt werden kann. Wird der Test mit einer C^{14} -markierten Testsubstanz durchgeführt, kann die Konzentration erheblich niedriger sein.

1.6. Beschreibung des Testverfahrens

1.6.1. Reagenzien

1.6.1.1. Wasser

Doppelt destilliertes Wasser, das frei von toxischen Substanzen ist, insbesondere Kupfer, einen niedrigen Kohlenstoffgehalt ($< 2,0$ mg/l TOC) und einen spezifischen Widerstand von ≥ 18 megohms \cdot cm aufweist.

Das deionisierte Wasser darf nicht mehr als 10 % des durch die Prüfsubstanz eingebrachten organischen Kohlenstoffes enthalten.

1.6.1.2. Nährmedium

a) Stammlösung

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Eisen (III)chlorid, hexahydrat	0,250 g
gelöst und mit Wasser (1.6.1.1) zu 1 000 ml aufgefüllt;	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Magnesiumsulfat, heptahydrat	22,50 g
gelöst und mit Wasser (1.6.1.1) zu 1 000 ml aufgefüllt;	
CaCl_2 Calciumchlorid	27,50 g
gelöst und mit Wasser (1.6.1.1) zu 1 000 ml aufgefüllt;	
KH_2PO_4 Kaliumdihydrogenphosphat	8,50 g;
K_2HPO_4 Dikaliumhydrogenphosphat	21,75 g;
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Dinatriumhydrogenphosphat, dihydrat	33,40 g;
NH_4Cl Ammoniumchlorid	1,70 g
gelöst und mit Wasser (1.6.1.1) zu 1 000 ml aufgefüllt;	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Ammoniumsulfat	40,00 g
gelöst und mit Wasser (1.6.1.1) zu 1 000 ml aufgefüllt.	

b) Testmedium

Das Testmedium enthält pro Liter Wasser (1.6.1.1) folgende Reagenzien

- 4 ml der obengenannten Eisenchloridlösung,
- 1 ml der obengenannten Magnesiumsulfatlösung,
- 1 ml der obengenannten Calciumchloridlösung,
- 2 ml der obengenannten Phosphatlösung,
- 1 ml der obengenannten Ammoniumsulfatlösung.

Der pH-Wert sollte $7,2 \pm 0,2$ betragen.

1.6.1.3. Kontrollsubstanzen

Anilin (frisch destilliert), Natriumacetat, Natriumbenzoat

1.6.1.4. Bariumhydroxid 0,025 N (0,0125 M)

In 1 l hochreinem Wasser werden 4,0 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ gelöst. Dann wird filtriert und die klare Lösung luftdicht verschlossen, um eine CO_2 -Absorption aus der Umgebungsluft zu verhindern. Es ist angebracht, bei der Durchführung von Testreihen jeweils mehr als 5 Liter Lösung zuzubereiten.

1.6.2. Geräte

1.6.2.1. CO_2 -Eliminationseinrichtung

- Die Einrichtung wird für eine Serie von 12 Testgefäßen, die für die Prüfung von 3 Prüfsubstanzen reichen, beschrieben. Als Testgefäß werden 4—5 l fassende, braune Glasflaschen benutzt. Falls helle Glaskolben benutzt werden, muß der Test unter Lichtabschluß durchgeführt werden;
- Vier 1-Liter-Plastikflaschen mit 700 ml 10 N (10 M) NaOH-Lösung;
- Ein 1-Liter-Erlenmeyerkolben mit 700 ml 0,025 N (0,0125 M) $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung;
- Ein leerer 1-Liter-Erlenmeyerkolben als Auffanggefäß um zu vermeiden, daß Flüssigkeit in die Testgefäße gelangt.

Diese Flaschen werden mit Hilfe von inerten Schläuchen miteinander verbunden und an eine Druckluftquelle angeschlossen. Die Luft wird während des Tests ständig mit gleichbleibender Rate gehalten.

Für jede zusätzliche Gruppe von vier Flaschen muß eine weitere 1-Liter-Plastikflasche mit 700 ml 10 N (10 M) NaOH hinzugefügt werden.

1.6.2.2. Testgefäße

Für jede Testsubstanz braucht man vier 4 bis 5 Liter fassende braune Glaskolben mit Verschlüssen.

1.6.2.3. CO_2 -Absorptionsgefäße

100 ml Waschflaschen, die mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ gefüllt sind.

1.6.3. Vorbereitung des Inokulums

Als Inokulum verwendet man frisch entnommenen Belebtschlamm aus einer gut funktionierenden kommunalen Kläranlage. In diese Kläranlage sollten keine oder nur sehr wenige industrielle Abwässer gelangen.

Sofort nach Ankunft im Labor wird der Belebtschlamm vier Stunden lang belüftet. 500 ml des Belebtschlammes werden entnommen und ca. 2 Minuten lang mit einem Mixer homogenisiert. Dann läßt man den Belebtschlamm eine halbe Stunde absitzen.

Enthält die überstehende Flüssigkeit nach 30 Minuten noch immer sehr viele suspendierte Stoffe, wird die Absetzzeit um 30—60 Minuten verlängert.

Vom Überstand wird soviel dekantiert, daß jedes Testgefäß mit einer Inokulummenge beimpft werden kann, die 1 % des Ansatzvolumens entspricht. Eine Zugabe von suspendierten Stoffen sollte vermieden werden, da diese die CO_2 -Messung beeinflussen könnten.

Es ist nützlich, aber nicht obligatorisch, die Zahl der Mikroorganismen im Inokulum zu bestimmen. Normalerweise sollten $10^6 - 20 \times 10^6$ kolonienbildende Keime pro ml vorhanden sein. Das Inokulum sollte am Tag der Zubereitung verwendet werden.

1.6.4. Prüfverfahren

1.6.4.1. Stammlösung

Eine Stammlösung der Prüfsubstanz wird mit einer Konzentration von 1 000 mg/l angesetzt.

Die Stammlösung kann nach dem Gehalt an organischem Kohlenstoff der Prüfsubstanz angesetzt werden. Ist dieser Anteil unbekannt, kann sie durch Einwaage der Prüfsubstanz hergestellt werden. Zur Erzielung einer homogenen Lösung muß der Ansatz gut gemischt werden. Gleichzeitig sollte jedoch Schaumbildung, die zur Aufkonzentration der Prüfsubstanz führen könnte, vermieden werden. Bei festen Proben kann es notwendig sein, den gesamten Inhalt der Probenflaschen vor Entnahme eines Aliquots gut durchzumischen.

Dieser Teil des Verfahrens ist außerordentlich wichtig, weil die Berechnung des prozentualen biologischen Abbaus direkt davon abhängt, ob die richtige Kohlenstoffmenge in das Testsystem gelangt.

Da der Phosphatpuffer aus dem Testmedium den pH-Wert im Ansatz normalerweise in einem neutralen Bereich hält, braucht der pH-Wert der Vorratslösung nicht korrigiert zu werden, solange er nicht außerhalb des Bereiches von 3—10 liegt.

Liegt der pH-Wert außerhalb dieser Grenzwerte, muß ein Teil der Stammlösung mit 1 N (1 M) HCl oder NaOH auf einen pH-Wert von $7,0 \pm 1,0$ eingestellt werden. Während der Zugabe von Säure oder Base muß die Stammlösung kräftig gerührt werden.

Zur Bestätigung der nominalen Konzentration an organischem Kohlenstoff kann die Stammlösung (bzw. ein neutralisiertes Aliquot) auf ihren Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff (TOC) untersucht werden. Auch die Stammlösung der Kontrollsubstanz muß auf ihren TOC-Wert geprüft werden.

Ist der zu prüfende Stoff nicht wasserlöslich, wird er direkt in die Testgefäße eingewogen oder einpipettiert.

In diesem Fall können auch besondere Maßnahmen, wie der Einsatz von Ultraschall vorgenommen werden, um eine bessere Verteilung der Testsubstanz zu erreichen.

1.6.4.2. Herstellen der Ansätze

Da 1 % Inokulum im CO₂ Testverfahren verwandt wird, ist es erforderlich, Verdünnungen im CO₂-Prüfmedium herzustellen.

Die Testansätze werden wie folgt hergestellt:

- a) In jedes Testgefäß werden zunächst 2 470 ml Wasser (siehe 1.6.1.1) vorgelegt,
- b) dann werden in jedes Testgefäß je 3 ml der Stammlösungen von Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat und Calciumchlorid, sowie 6 ml der Phosphat-Pufferlösung und 12 ml Eisenchloridlösung gegeben,
- c) dann werden jedem Testgefäß 30 ml Inokulum zugesetzt.

Diese Mischung wird 24 Stunden mit CO₂-freier Luft belüftet, um das System von CO₂ zu reinigen.

Nach dem Belüften werden 3 CO₂-Absorptionsflaschen mit 100 ml 0,025 N (0,0125 M) Ba(OH)₂-Lösung gefüllt und in Serien an jedes Testgefäß angeschlossen.

1.6.4.3. Durchführung der Prüfung

Der Test beginnt, wenn in zwei der vier Testgefäße die Prüfsubstanz zugesetzt wird. Jede Prüfsubstanz wird in zwei Konzentrationen mit 10 und 20 mg/l geprüft.

Die Menge der erforderlichen Stammlösung der Prüfsubstanz wird wie folgt berechnet:

$$\text{Stammlösung pro Glaskolben, (ml)} = \frac{B \times C}{A}$$

Es ist:

B = die Konzentration des zu prüfenden Stoffes im Testgefäß (mg/l).

A = die Konzentration des zu prüfenden Stoffes in der Stammlösung (mg/l);

C = das Endvolumen des Testmediums im Testgefäß (ml).

Wenn die notwendige Menge an Stammlösung der Prüfsubstanz zugegeben ist, füllt man die Testgefäße mit Wasser auf, so daß insgesamt 473 ml Flüssigkeit zugegeben werden.

In das dritte Testgefäß, das als Blindwertansatz dient und in das keine Prüfsubstanz gegeben wird, werden 473 ml Wasser gefüllt. Dem letzten der vier Testgefäße wird, entsprechend dem Vorgehen wie bei der Prüfsubstanz, die Kontrollsubstanz in einer Konzentration von 20 mg/l zugesetzt. Das Endvolumen jedes Testgefäßes beträgt damit 3 000 ml.

Bei Versuchsbeginn wird CO₂-freie Luft in die Gefäße geleitet, und zwar in einer Menge von 50—100 ml/Min. pro Testgefäß (= 1—2 Blasen pro Sekunde).

Bei Prüfsubstanzen, die wasserunlöslich sind und die direkt in die Testgefäße gegeben wurden, kann zusätzlich ein magnetischer Rührer verwendet werden. Bei Prüfsubstanzen, die zur Schaumbildung neigen, kann die Luft auch unter Rühren an die Flüssigkeitsoberfläche geleitet werden.

Das in den Testgefäßen freigesetzte Kohlendioxid reagiert mit dem Bariumhydroxid und wird als Bariumkarbonat ausgefällt. Die freigesetzte CO₂-Menge wird durch Rücktitration des verbliebenen Ba(OH)₂ mit standardisierter 0,05 N (0,05 M) HCl bestimmt, wobei Phenolphthalein als Indikator benutzt wird. In regelmäßigen Zeitabständen (alle 2—3 Tage) wird die dem Testgefäß am nächsten stehende Absorptionsflasche zur Titration entnommen. Die verbleibenden beiden Absorptionskolben rücken jeweils um einen Platz auf und ein neuer Absorptionskolben mit 100 ml frischer 0,025 N (0,0125 M) Ba(OH)₂-Lösung wird an das Ende der Serie hinzugefügt.

Die Titrationsen werden nach Bedarf durchgeführt. In den ersten 10 Tagen ca. alle 2—3 Tage (möglichst bevor der erste deutliche BaCO₃-Niederschlag in der zweiten Absorptionsfalle sichtbar wird), dann alle 5 Tage bis zum Testende.

Am 27. Tag wird der pH-Wert in den Testgefäßen gemessen, dann wird jedem Gefäß 1 ml konzentrierte Salzsäure zugesetzt, um das anorganische Carbonat als CO₂ auszutreiben. Anschließend werden die Testgefäße über Nacht belüftet und dann aus jedem eine Probe zur DOC-Analyse entnommen. Am 28. Tag erfolgt die letzte Titration in den Absorptionsgefäßen. Die Titration der 100 ml Ba(OH)₂-Lösung wird nach Entnahme des dem Testgefäß am nächsten stehenden Adsorptionskolbens durchgeführt. Das Ba(OH)₂ wird mit 0,05 N (0,05 M) HCl unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator bestimmt. Der Test wird bei Raumtemperatur (20 °C—25 °C) durchgeführt. Die Temperatur wird während der gesamten Testdauer aufgezeichnet. Wird vor dem 28. Tag eine Plateauphase verzeichnet, kann der Test vorher abgeschlossen werden.

Hat der Abbau offensichtlich vor dem 28. Tag begonnen, aber am 28. Tag noch keine Plateauphase erreicht, kann der Versuch 1—2 Wochen verlängert werden.

1.6.5. Bestimmung der CO₂-Produktion

Zur Messung der CO₂-Entwicklung sind auch andere Methoden als die Rücktitration von Ba(OH)₂ in den Absorptionsgefäßen denkbar. Das ändert jedoch nichts am Testprinzip. Es könnte z. B. eine kontinuierliche Aufzeichnung des produzierten CO₂ und damit des biologischen Abbaus möglich sein.

Der erste Schritt zur Berechnung des produzierten CO₂ ist die Berücksichtigung der endogenen CO₂-Erzeugung des Inokulums. Dazu dient der Blindwertansatz. Von der produzierten CO₂-Menge der Testansätze wird der CO₂-Wert des Blindwerts abgezogen.

Bei der Benutzung von 0,05 N (0,05 M) HCl zur Titration in den Absorptionsgefäßen entspricht 1 ml HCl 1,1 mg CO₂.

2. DATEN UND AUSWERTUNG

Die Analysenergebnisse werden in das Formblatt (siehe Anlage 1) eingetragen. Die Werte für den biologischen Abbau werden gemäß 1.2 berechnet.

Die CO₂-Konzentrationen werden auf 0,1 mg/l genau angegeben. Die Werte für den biologischen Abbau werden auf ganze Prozentwerte abgerundet.

Der Verlauf des Abbaus wird graphisch in einem Diagramm dargestellt, das in Anlage 2 enthalten ist.

Der Abbaustest ist gültig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- Abbau der Kontrollsubstanz innerhalb von 28 Tagen zu $\geq 60\%$. Ist dies nicht der Fall, ist die gesamte Testreihe ungültig und muß mit einem anderen Inokulum wiederholt werden;
- CO₂-Produktion im Blindwertansatz < 50 mg/3 l.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält

- das Formblatt mit den Daten;
- den graphisch dargestellten Verlauf des Abbaus in einem Diagramm, in dem die lag-Phase, die Abbauphase, die Steigung und das Zeitfenster angegeben werden („Zeitfenster“ bezeichnet hier einen Zeitraum von 10 Tagen beginnend mit dem Tag, an dem der beobachtete Abbaugrad zum ersten Mal 10 % übersteigt);
- Angabe des Dispergier- bzw. Suspendierverfahrens, wenn es bei schwer wasserlöslichen Substanzen angewandt wurde;
- Entnahmeort und Zeitpunkt des Inokulums und eventuelle Vorbehandlung des Inokulums; Zeitpunkt der Entnahme;
- Temperaturbereich während des Tests;
- wenn die Keimzahl des Inokulums bestimmt wurde, ist die Zahl der Mikroorganismen pro ml (colony forming units = CFU/ml) anzugeben;
- Nachweis der Gültigkeit des Tests, d. h. Abbau der Kontrollsubstanz zu $\geq 60\%$ innerhalb von 28 Tagen.

3.2. Interpretation der Ergebnisse

Aufgrund der Strenge dieses Tests bedeutet ein niedriges Ergebnis nicht unbedingt, daß die Prüfsubstanz unter Umweltbedingungen biologisch nicht abbaubar ist, sondern zeigt nur, daß weitere Untersuchungen notwendig sind, um dies festzustellen.

Prüfsubstanzen, bei denen in diesem Test eine hohe CO-Bildung beobachtet wird, können als biologisch leicht abbaubar angesehen werden, falls diese Werte innerhalb von 10 Tagen nach dem Zeitpunkt erreicht werden, bei dem der biologische Abbau zum ersten Mal 10 % übersteigt.

4. LITERATUR

- (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 bis 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 bis 55.
- (4) Larson, R. J., Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 38, 1979, p. 1153 bis 1161.

Anlage 1

Formblatt zum modifizierten Sturm-Test

Experiment-Nr.:

Datum des Testbeginns:

Test-/Kontrollsubstanz:

Konzentration der Prüfsbstanz:

Kohlenstoffanalyse:

Theoretischer ThCO₂-Wert:

Temperaturbereich während der Testdauer:

Übersicht der CO₂-Produktion:

Tag Nr.	Gemessenes CO ₂ mg/l	Kumuliertes CO ₂ mg/l	ThCO ₂ %
28			

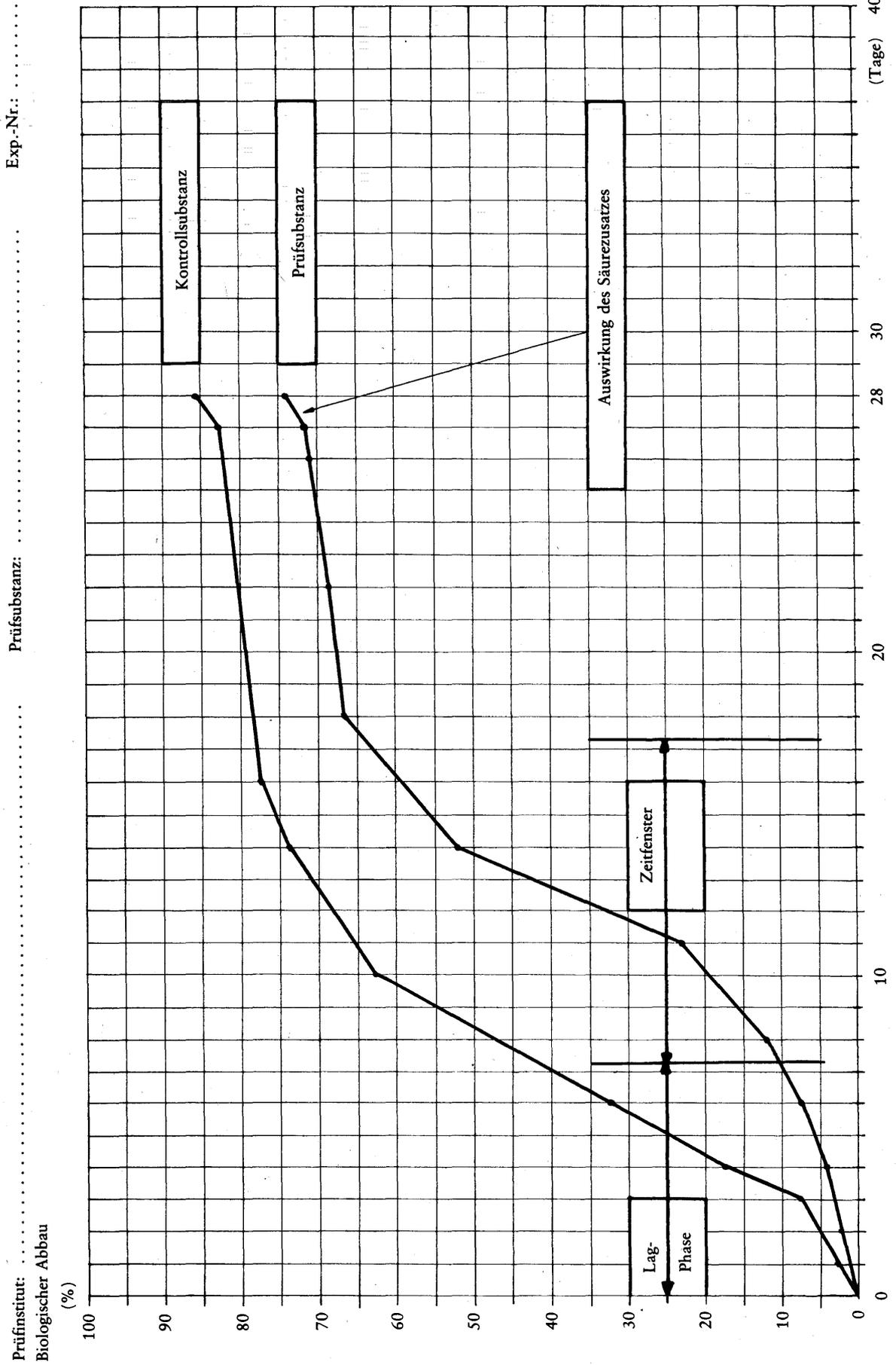
Gültigkeit des Tests:

Biologischer Abbau der Kontrollsubstanz (%):

CO₂-Entwicklung im Blindwertansatz (mg/Ansatz):

Anlage 2

Modifizierter Sturm-Test



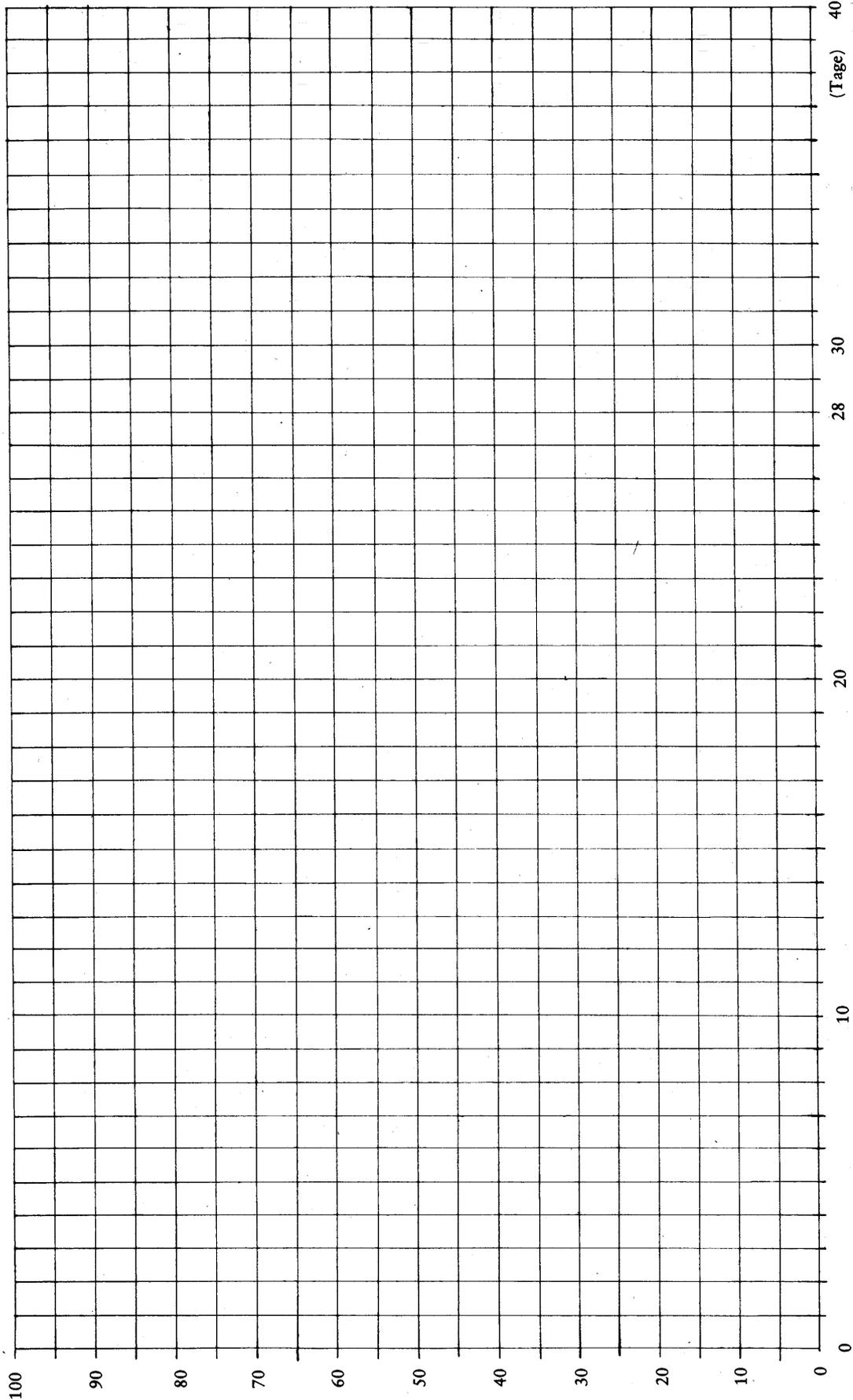
Modifizierter Sturm-Test

Exp.-Nr.:

Prüfsubstanz:

Prüfinstitut:

Biologischer Abbau (%)



C. 6. ABBAUBARKEIT

BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — GESCHLOSSENER FLASCHENTEST

1. METHODE

1.1. Einleitung

Zweck dieses Verfahrens ist die Messung der biologischen Abbaubarkeit organischer Verbindungen in einem aeroben, wäßrigen Medium bei einer Testkonzentration von 2 (Standard-Konzentration) bis 10 mg/l Prüfsubstanz.

Im gegenwärtigen Stand der Entwicklung eignet sich der Test vor allem für die Bewertung der biologischen Abbaubarkeit wasserlöslicher Verbindungen. Zumindest grundsätzlich können jedoch auch flüchtige bzw. schlecht lösliche Verbindungen getestet werden.

Die empirische Formel der Prüfsubstanz braucht man zur Berechnung des theoretischen Sauerstoffbedarfs (ThSB). Falls diese nicht bekannt ist, kann auch der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) der Prüfsubstanz als Bezugswert dienen (siehe Anlage 1).

Die Methode ist nur auf solche organischen Prüfsubstanzen anwendbar, die bei den in den Tests benutzten Konzentrationen keine hemmende Wirkung auf Bakterien haben. Ist die Prüfsubstanz bei der Testkonzentration nicht löslich, können besondere Maßnahmen wie Ultraschalldispersion zur besseren Verteilung der Prüfsubstanz benutzt werden.

Informationen über den relativen Anteil der wichtigsten Bestandteile der Prüfsubstanz sind für die Interpretation der erzielten Ergebnisse, u. a. wenn diese niedrig sind, von Nutzen.

Die Kenntnis der Bakterientoxizität der chemischen Substanz kann für die Interpretation niedrigerer Ergebnisse und für die Auswahl geeigneter Testkonzentrationen von Nutzen sein.

Diese Methode kann zur Bestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB) verwendet werden.

1.2. Definitionen und Einheiten

Der biochemische Sauerstoffbedarf (BSB) errechnet sich aus der Differenz der Sauerstoffabnahme zwischen einer Blindlösung und einer Prüfsubstanzlösung unter Testbedingungen. Man teilt das Ergebnis durch die Konzentration (Masse pro Volumen) der Substanz und erhält die Netto-Sauerstoffabnahme in mg BSB/mg-Substanz.

Der Abbau wird als das Verhältnis zwischen BSB und ThSB bzw. von BSB und CSB definiert und in % ausgedrückt.

Anmerkung:

Manchmal geben diese beiden Methoden (% des ThSB bzw. % des CSB) nicht die gleichen Ergebnisse.

$$\% \text{ biologischer Abbau (von ThSB)} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg Testsubstanz}}{\text{ThSB}} \times 100$$

$$\% \text{ biologischer Abbau (von CSB)} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg Testsubstanz}}{\text{mg CSB/mg Testsubstanz}} \times 100$$

Dabei ist:

ThSB = der theoretische Sauerstoffbedarf (Berechnung siehe Anhang 1);

CSB = der chemische Sauerstoffbedarf, der experimentell ermittelt wird.

1.3. **Kontrollsubstanzen**

Die Verwendung geeigneter Kontrollsubstanzen zur Kontrolle des Inokulums ist wünschenswert.

Anilin, Natriumacetat oder Natriumbenzoat (z. B.) können zu diesem Zweck verwendet werden. Sie müssen innerhalb von 28 Tagen zu einem Abbau von $\geq 60\%$ führen, sonst wird der Test als ungültig betrachtet und muß mit einem Inokulum aus einer anderen Quelle wiederholt werden.

1.4. **Prinzip der Methode**

Eine vorher bestimmte Menge der Verbindung wird in einem anorganischen Medium (mineralische Nährlösung) gelöst und dabei eine Konzentration von etwa 2 mg Prüfsubstanz/l eingestellt. Die Lösung wird mit einer kleinen Anzahl polyvalenter Bakterien beimpft und in verschlossenen Flaschen im Dunklen in einem Wasserbad konstant bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ — $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten. Der Abbau wird 28 Tage lang mittels Sauerstoffanalyse verfolgt. Das Verfahren wird durch eine Kontrollsubstanz überprüft.

Ein Sauerstoffblindwert muß in einem parallelen Test, bei dem weder Prüf- noch Kontrollsubstanz vorhanden sind, bestimmt werden (Impfzehrkontrolle).

Gleichzeitig kann die Prüfsubstanz auf mögliche hemmende Wirkungen auf das Inokulum untersucht werden.

1.5. **Qualitätskriterien**

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde in OECD- und EWG-Ringtests festgestellt.

1.6. **Beschreibung der Methode**1.6.1. **Reagenzien**1.6.1.1. **Destilliertes oder deionisiertes Wasser**

Destilliertes oder deionisiertes Wasser, luftgesättigt, mit nicht mehr als 0,01 mg Cu/l. Das erforderliche Tagesvolumen (z. B. 50 l) wird bei Raumtemperatur (so nahe wie möglich bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) gehalten und 20 Minuten lang mit sauberer Druckluft stark belüftet. Im allgemeinen ist das Wasser nach 20-stündigem Stehen bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebrauchsfertig. Der Sauerstoffgehalt wird zu Kontrollzwecken bestimmt. Die Konzentration sollte bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 9,09 mg O_2 /l betragen.

Das Füllen und Umfüllen des luftgesättigten Wassers sollte blasenfrei durch Hebern erfolgen.

1.6.1.2. **Nährmedium**a) **Stammlösung**

Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 8,50 g,

Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 21,75 g,

Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 33,30 g,

Ammoniumchlorid NH_4Cl 1,70 g,

werden gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt;

Der pH-Wert sollte 7,2 betragen.

Magnesiumsulfatheptahydrat $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,50 g

werden gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt;

Calciumchlorid CaCl_2 27,50 g

werden gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt;

Eisen(III)chloridhexahydrat $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g

werden gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt.

b) Nährmedium

Das Nährmedium enthält pro Liter Wasser (1.6.1.1) 1 ml jeder der oben genannten Stammlösungen. Der pH-Wert sollte $7,2 \pm 0,2$ betragen.

1.6.1.3. Kontrollsubstanzen

Anilin (frisch destilliert), Natriumacetat, Natriumbenzoat.

1.6.2. Geräte

1.6.2.1. Geeichte 250—300 ml-Flaschen mit Glasstopfen zur BSB-Bestimmung. Ersatzweise können auch ungeeichte 250 ml-Enghals-Flaschen mit Schrägschliffstopfen, deren Volumen man selbst bestimmt, benutzt werden.

1.6.2.2. Verschiedene 2-, 3- und 5-Liter-Kolben mit Litermarkierungen zur Vorbereitung des Experiments und zum Füllen der BSB-Flaschen.

1.6.2.3. 1—10 ml-Pipetten, Trichter und grobes Filterpapier.

Flaschen zur Bereitung des Inokulums.

1.6.2.4. Thermostatbad, in dem die Flaschen vor Licht geschützt bei konstanter Temperatur gehalten werden können.

1.6.3. Vorbereitung des Inokulums

Folgende Inokula werden verwendet. Ihre Brauchbarkeit wird mit einer Kontrollsubstanz geprüft (1.6.1.3).

1.6.3.1. Inokulum aus Erde

Eine wäßrige Suspension aus 100 g nicht frisch gedüngter Gartenerde (Erde aus einem Treibhaus, in dem das ganze Jahr konstante Temperatur herrscht, ist besonders gut geeignet), wird in 1 l chlorfreiem Leitungswasser suspendiert. Nach 30 Minuten wird die Suspension durch ein grobes Filterpapier filtriert und die ersten 200 ml des Filtrats verworfen. Der verbleibende Hauptteil des Filtrats dient zur Impfung (1 Tropfen aus einer spitzen Pipette pro Liter Endvolumen). Das Inokulum wird unmittelbar vor dem Experiment angesetzt. Soll es mehrere Stunden aufbewahrt werden, muß es belüftet werden. Die Keimzahl kann nach dem Koch'schen Plattengußverfahren oder dem Nährscheibenkartonverfahren bestimmt werden. Es sollten nicht mehr als 10^3 bis 10^5 Keime pro ml Endvolumen vorhanden sein.

1.6.3.2. Inokulum aus Kläranlagenablauf

Das Inokulum sollte vorzugsweise aus einer Kläranlage stammen (Belebtschlammanlage oder Tropfkörper), die hauptsächlich häusliche Abwässer reinigt. Der Kläranlagenablauf muß zwischen Entnahme und Verwendung aerob gehalten werden. Zur Vorbereitung der Impfung wird die Probe durch ein grobes Filterpapier filtriert. Die ersten 200 ml werden verworfen. Der Rest des Filtrats wird bis zum Gebrauch aerob gehalten. Das Inokulum muß am Tag der Probenahme verwendet werden.

1.6.3.3. Inokulum aus einer Labor-Belebtschlammanlage

Der Ablauf einer stark belüfteten Labor-Belebtschlammanlage wird hierzu verwendet. Das Inokulum wird wie unter 1.6.3.2 vorbereitet.

1.6.3.4. Misch-Inokulum

3 verschiedene Impfproben (1.6.3.1 — 1.6.3.3) werden zu gleichen Teilen gut gemischt und aus dieser Mischung das endgültige Inokulum entnommen.

1.6.4. Prüfverfahren

Alle vor der Inkubation notwendigen Arbeiten müssen bei etwa 20 °C durchgeführt werden. Gruppen von Flaschen (1.6.2.1) werden zur Bestimmung des BSB-Werts der Prüfsubstanz bzw. der Kontrollsubstanz in parallelen Versuchsreihen vorbereitet (siehe Anlage 2). Wenn chemische Analysen gleichzeitig durchgeführt werden, muß eine genügend große Anzahl von Flaschen — einschließlich der für die Kontroll- und Blindversuche — vorbereitet werden. So sind beispielsweise 7₄ oder 15 parallel angeordnete Flaschen im Hinblick auf die Analysen nach 0, 5, 15 und 28 Tagen pro Prüfsubstanz erforderlich. Dementsprechend muß in großen Kolben eine ausreichende Wassermenge bereitgestellt werden (1.6.2.2).

Diese großen Flaschen werden zuerst mit einem Ansaugheber zu einem Drittel ihres Volumens mit destilliertem Wasser (1.6.1.1) gefüllt. Dann werden je nach Endvolumen die verschiedenen Stammlösungen (1.6.1.2) Prüf- oder Kontrollsubstanzen in solchen Mengen zugesetzt, daß Endkonzentrationen von 2 bzw. manchmal 5 oder 10 mg/l erreicht werden.

Die Konzentration von etwa 9 mg gelöstem Sauerstoff pro Liter Wasserlösung bei 20 °C beschränkt die mögliche Ausgangskonzentration der Prüfsubstanz auf etwa 2 mg/l. Nur so ist nach Oxidation der Prüfsubstanz eine genügende Restsauerstoffkonzentration gewährleistet.

Schwer abbaubare Substanzen mit niedrigem ThSB-Wert werden parallel dazu bei höheren Konzentrationen getestet. Dann wird mit der Pipette 1 Tropfen Inokulum pro Liter Endvolumen zugesetzt. Das gleiche gilt für den Blindversuch.

Schließlich wird die Lösung mit einem Ansaugheber, der bis zum Boden der Flasche reicht, aufgefüllt. Dadurch wird eine ausreichende Durchmischung gewährleistet. Danach wird jede zubereitete Lösung sofort mit dem Ansaugheber aus dem unteren Viertel der Flasche (nicht vom Flaschenboden) in die jeweilige Flaschengruppe gefüllt.

Außerdem werden die Eigenzehrungskontroll-Flaschen analysiert bzw. zur späteren Analyse konserviert (zur O₂-Bestimmung durch Ausfällen mit MnCl₂ (Mangan(II)chlorid) und NaOH (Natriumhydroxid)).

Die restlichen parallelen Flaschen werden unter Lichtabschluß in ein Wasserbad von 20 °C gesetzt und nach 5, 15 bzw. 28 Tagen entnommen und analysiert. Neben jeder Serie führt man vollständige Parallelversuche zur Blindwertbestimmung und zur Ermittlung der O₂-Eigenzehrung ohne Inokulum oder Kontrollsubstanz durch.

Hemmtest

Beim Geschlossenen Flaschentest können Substanzen auf einfache Weise auf Hemmung untersucht werden:

Serie 1: 2 mg/l einer gut abbaubaren Verbindung, z. B. Fettalkohol, kondensiert mit Ethylenoxid in einem Molverhältnis von 1:10 bzw. irgend einer Eichsubstanz.

Serie 2: x mg/l Prüfsubstanz (x ist normalerweise 2).

Serie 3: 2 mg/l der gut abbaubaren Substanzen und x mg/l Prüfsubstanz.

Sind die BSB-Werte der Serie 3 niedriger als die Summe der BSB-Werte der Serien 1 und 2, kann die Prüfsubstanz bei dieser Konzentration als bakterienhemmend angesehen werden. Dieses Kontrollexperiment ist immer notwendig, wenn keine oder eine schlechte Abbaubarkeit angesichts der Struktur der Prüfsubstanz unlogisch erscheint und es Hinweise darauf gibt, daß dies auf Hemmung zurückzuführen ist.

1.6.5. Bestimmung des gelösten Sauerstoffs

Der Gehalt an gelöstem Sauerstoff wird nach einem chemischen oder elektrochemischen, international oder national anerkannten Standardverfahren bestimmt.

2. DATEN UND AUSWERTUNG

Die Analysenergebnisse werden im anhängenden Formblatt aufgezeichnet (siehe Anlage 3).

Der Verlauf des Abbaus wird graphisch in einem Diagramm dargestellt, das in Anlage 4 enthalten ist.

Die Ergebnisse des Abbautests sind gültig, wenn die Bedingungen erfüllt sind,

- daß in der gleichen Testserie die Kontrollsubstanz innerhalb von 28 Tagen einen Abbau von $\geq 60\%$ erzielt. Falls dies nicht der Fall ist, muß die ganze Serie verworfen werden;
- daß die O_2 -Eigenzehrung nach 5 Tagen $0,3 \text{ mg } O_2/l$ und nach 28 Tagen $0,4 \text{ mg } O_2/l$ nicht überschreitet. In der Impfzehrkontrolle sollten folgende Werte nicht überschritten werden: $0,5 \text{ mg } O_2/l$ nach 5 Tagen und $0,6 \text{ mg } O_2/l$ nach 15 und 28 Tagen.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält

- Angaben entsprechend dem Formular (Anlage 3);
- den graphisch dargestellten Verlauf des Abbaus in einem Diagramm, in dem die lag-Phase, die Abbauphase, die Steigung und das Zeitfenster angegeben werden („Zeitfenster“ bezeichnet hier einen Zeitraum von 10 Tagen beginnend mit dem Tag, an dem der beobachtete Abbaugrad zum ersten Mal 10% übersteigt);
- eine Angabe der Methode zur Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs;
- eine Angabe der Methode zur Sauerstoffmessung;
- Angaben über die Dispersion von unter Testbedingungen schwerlöslichen Substanzen;
- Kriterien für die Gültigkeit des Tests.

3.2. Interpretation der Ergebnisse

Die Möglichkeit, daß stickstoffhaltige Verbindungen die Ergebnisse beeinflussen können, sollte bedacht werden.

Aufgrund der Strenge dieses Tests bedeutet ein niedriges Ergebnis nicht unbedingt, daß die Prüfsubstanz unter Umweltbedingungen biologisch nicht abbaubar ist, sondern zeigt nur, daß weitere Untersuchungen notwendig sind, um dies festzustellen.

Prüfsubstanzen, bei denen in diesem Test eine hohe CO -Bildung beobachtet wird, können als biologisch leicht abbaubar angesehen werden, falls diese Werte innerhalb von 10 Tagen nach dem Zeitpunkt erreicht werden, bei dem der biologische Abbau zum ersten Mal 10% übersteigt.

4. LITERATUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301 D. 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.

Anlage 1

Berechnung des theoretischen Sauerstoffbedarfs (ThSB)

Der ThSB der Substanz $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ mit dem Molekulargewicht MG wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{ThSB}_{\text{NH}_3} = \frac{16 \left(2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right)}{\text{MG}}$$

Diese Berechnung geht davon aus, daß C zu CO_2 , H zu H_2O , P zu P_2O_5 und Na zu Na_2O oxidiert wird. Halogen wird als Halogenwasserstoff und Stickstoff als Ammoniak eliminiert.

Beispiel: Glukose $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, MG = 180

$$\text{ThSB} = \frac{16 \left(2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg O}_2/\text{mg Glukose.}$$

Molekulargewichte von Salzen, die nicht von Alkalimetallen stammen, werden unter der Annahme berechnet, daß die Salze hydrolysiert worden sind.

Man geht davon aus, daß Schwefel zu +6 oxidiert wird.

Beispiel: Natrium n-Alkylbenzolsulfonat $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{SO}_3\text{Na}$.

Molekulargewicht: 348

$$\text{ThSB} = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg O}_2/\text{mg Substanz.}$$

Aus stickstoffhaltigen Substanzen kann Stickstoff als Ammoniak, Nitrit oder Nitrat eliminiert werden, was den theoretischen Sauerstoffbedarf bestimmt.

$$\text{ThSB}_{\text{NO}_2} = \frac{16 \left(2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3n + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right)}{\text{MG}}$$

$$\text{ThSB}_{\text{NO}_3} = \frac{16 \left(2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right)}{\text{MG}}$$

Angenommen, im Falle eines sekundären Amins ist durch Analyse festgestellt worden, daß der gesamte Stickstoff als Nitrat vorliegt: $(\text{C}_{12}\text{H}_{25})_2\text{NH}$, MG: 353

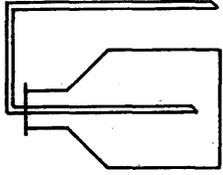
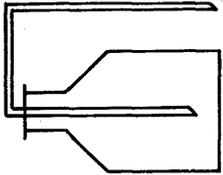
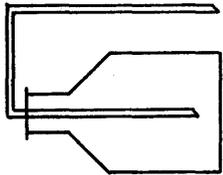
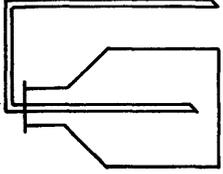
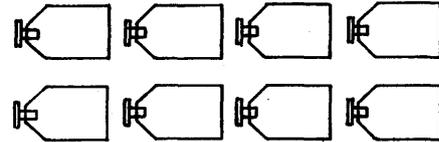
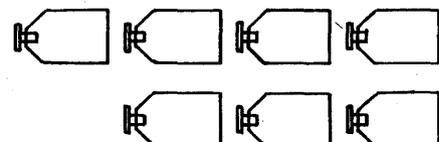
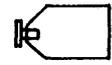
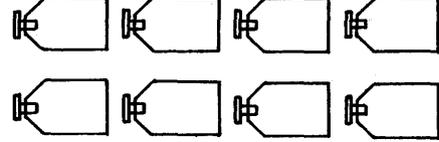
$(\text{C}_{12}\text{H}_{25})_2\text{NH}$, MG: 353

$$\text{ThSB}_{\text{NO}_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg O}_2/\text{mg Substanz.}$$

Anlage 2

Schema der Flaschenanordnung beim Geschlossenen Flaschentest

(* = Spezifische Analyse; falls verfügbar)

	Kontrollen	Bestimmungen
Analysen Sofort Nach 5 Tagen Nach 15 Tagen Nach 28 Tagen	<p>Destilliertes Wasser mit Salzlösungen</p> <p>↓</p> 	<p>Destilliertes Wasser mit Salzlösungen</p> <p>Inokulum</p> <p>↓</p> <p>Eichverbindung</p> <p>↓</p> <p>Kontrollsubstanz</p> 
	<p>Destilliertes Wasser mit Salzlösungen</p> <p>Inokulum</p> <p>↓</p> 	<p>Destilliertes Wasser mit Salzlösungen</p> <p>Inokulum</p> <p>↓</p> <p>Prüfsubstanz</p> <p>↓</p> <p>Prüfsubstanzen</p> 
	<p>O₂ - Best.</p> 	<p>O₂ - Best.</p> 
	<p>*-Best.</p> 	<p>*-Best.</p> 

Anlage 3

Biologischer Abbau: Geschlossener Flaschentest (Formblatt)

Prüfinstitut:
 Untersuchungsleiter:
 Testbeginn am: Experiment-Nr.
 Prüfsubstanz:
 Chemische Struktur:

 Analyse (Winkler-Verfahren oder Sauerstoffelektrode):
 ThSB oder CSB der Testsubstanz: mg O₂/mg
 Temperatur des Wassers nach Belüftung:
 O₂-Konzentration des Wassers nach Belüftung und Absetzen vor Testbeginn: mg O₂/l

Testergebnis

D_t = BSB, ausgedrückt in % ThSB nach 28 Tagen oder
 D_t = BSB, ausgedrückt in CSB nach 28 Tagen

Gültigkeit der Ergebnisse

Kontrollsubstanz:
 Ergebnis: BSB, ausgedrückt in % ThSB nach 28 Tagen
 Bezugsexp.-Nr.:

Bemerkungen:

Prüfinstitut:
 Prüfsubstanz:
 Experiment Nr.:

A: O₂-Bestimmungen:

	Kolben Nr.		mg O ₂ /l nach x Tagen			
			0	5	15	28
Min. Nährlösung ohne Testsubstanz und ohne Impfung	O ₂ -Kontrolle	c ₁		—	—	—
		c ₂		—	—	—
	Mittelwert	$m_0 = \frac{c_1 + c_2}{2}$				
Min. Nährlösung ohne Testsubstanz aber mit Impfung	1	c ₃				
	2	c ₄				
	Mittelwert Blindversuch	$m_b = \frac{c_3 + c_4}{2}$				
Min. Nährlösung mit Testsubstanz und Impfung	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Mittelwert Prüfsubstanz	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

B: O₂-Abnahme (mg BSB/1) nach x Tagen

$BOD_x - (m_0 - m_{t_x}) - (m_l - m_{b_x})$ ⁽¹⁾

mg BSB/1 nach x Tagen		
5	15	28

⁽¹⁾ Diese Differenz ist für die Gültigkeitskontrolle des Tests von Bedeutung (Siehe 1.6.3.1.3.)

C: Bewertung

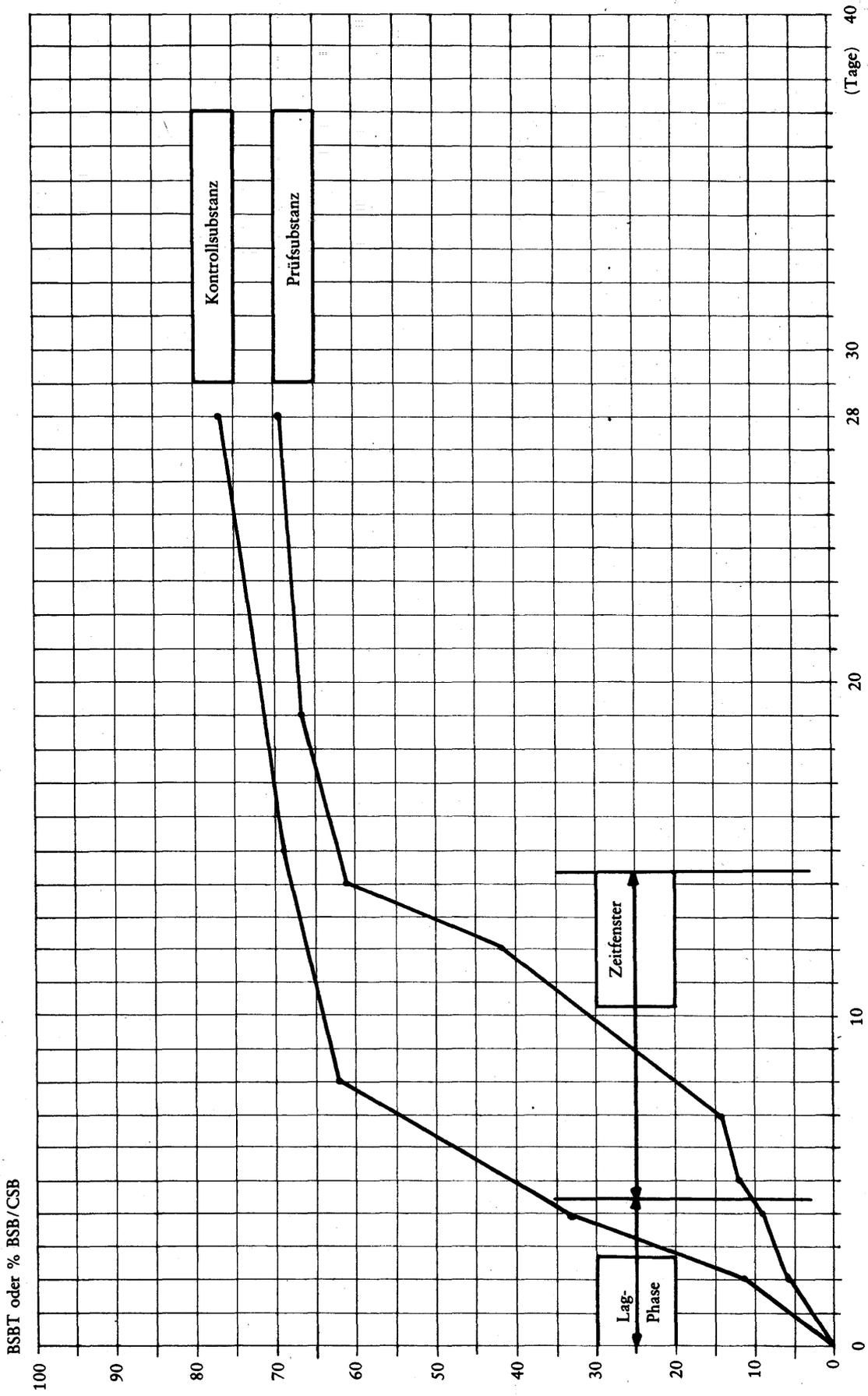
$D_t = \frac{\text{mg BSB}_x/\text{l}}{\text{mg}_{\text{Substanz}}/\text{l} \cdot \text{ThSB}} \cdot 100$ oder $\% \text{ BSB}_x/\text{CSB} = \frac{\text{mg BSB}_x/\text{l}}{\text{mg}_{\text{Substanz}}/\text{l} \cdot \text{CSB}} \cdot 100$

	nach x Tagen		
	5	15	28
% BSB/ThSB			
% BSB _x /CSB			

Anlage 4

Geschlossener Flaschentest

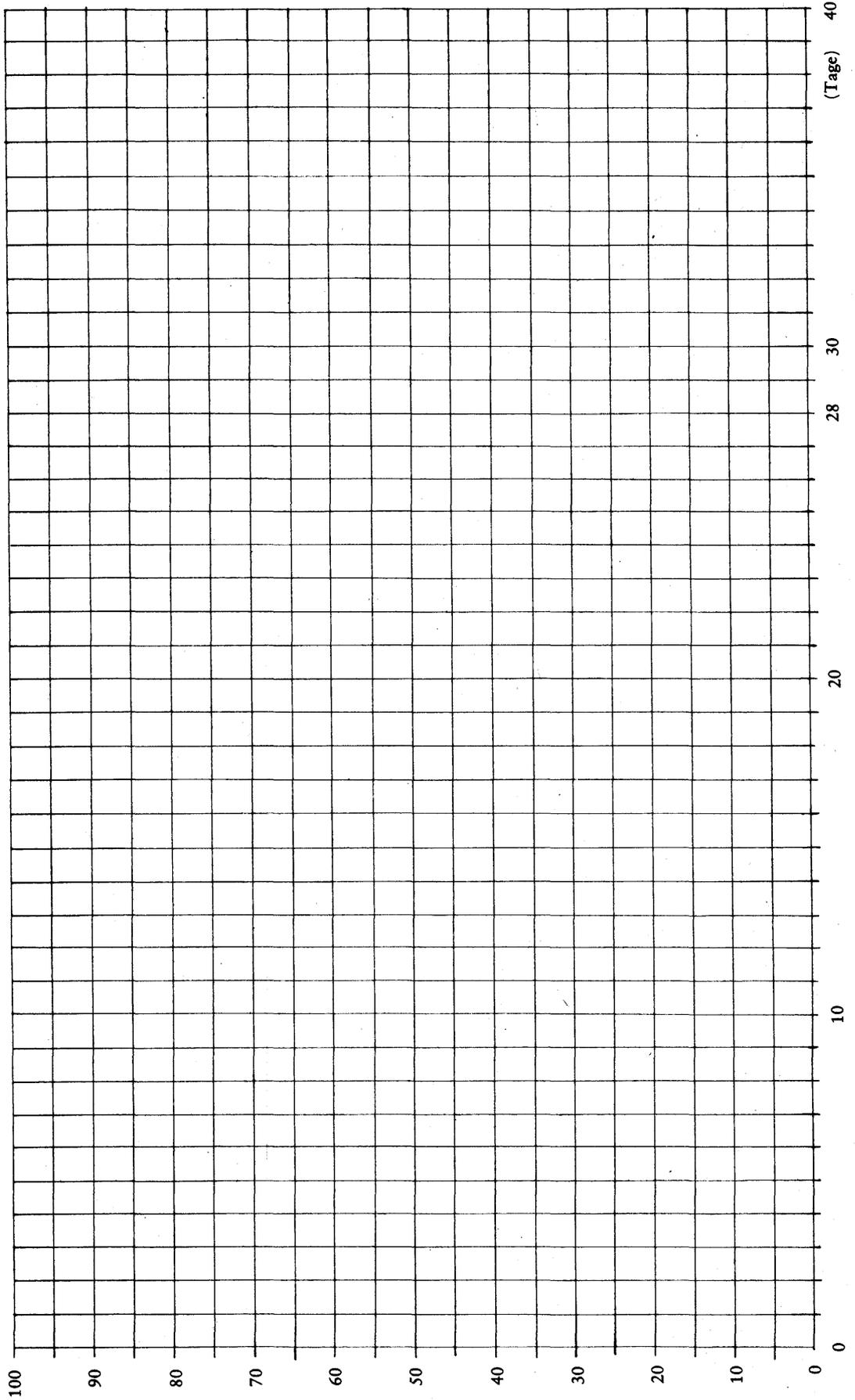
Prüfinsitut: Prüfsbstanz: Exp.-Nr.:



Geschlossener Flaschentest

Prüfsubstanz: Prüfsubstanz: Exp.-Nr.:

BSBT oder % BSB/CSB



C. 7. ABBAUBARKEIT

BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — MODIFIZIERTER MITI-TEST

1. METHODE

1.1. Einleitung

Zweck dieses Prüfverfahrens ist die Messung der biologischen Abbaubarkeit von organischen Substanzen im wässrigen Medium mit Hilfe eines Respirometers, das den biochemischen Sauerstoffbedarf (BSB) aufzeichnet.

Zur Berechnung des theoretischen Sauerstoffbedarfs (ThSB) der Prüfsubstanz wird deren empirische Formel benötigt.

Die Methode ist nur für solche organische Prüfsubstanzen geeignet, die bei den im Test verwendeten Konzentrationen

- einen vernachlässigbaren Dampfdruck aufweisen,
- auf Bakterien keine Hemmung ausüben,
- das Absorptionsmittel für Kohlendioxid weder erreichen noch damit reagieren.

Wenn die Prüfsubstanz bei der im Test verwendeten Konzentration nicht löslich ist, müssen gegebenenfalls besondere Maßnahmen ergriffen werden, um eine gute Verteilung zu erreichen, so z. B. eine Dispersion mit Ultraschall.

Informationen über die toxische Wirkung der Prüfsubstanz gegenüber Mikroorganismen können für die Interpretation von Prüfergebnissen, die nur einen geringen Abbau anzeigen, von Nutzen sein.

Informationen über den relativen Anteil der wichtigsten Verunreinigungen der Prüfsubstanz können sowohl für die Interpretation der Ergebnisse, wie auch für die Wahl der am besten geeigneten Prüfkonzentration von Nutzen sein.

1.2. Definitionen und Einheiten

$$\text{Prozentualer Abbau (\%)} = \frac{(\text{BSB} - \text{B})}{\text{ThSB (oder CSB)}} \times 100 \%$$

oder

$$\text{Prozentualer Abbau (\%)} = \frac{(\text{Sb} - \text{Sa})}{\text{Sb}} \times 100 \%$$

Dabei ist:

- BSB: Biochemischer Sauerstoffbedarf der Prüfsubstanz, der BSB-Kurve entnommen (experimentell ermittelt) (mg);
- B: Biochemischer Sauerstoffbedarf des Blindwerts (Nährmedium und Inokulum), der BSB-Kurve entnommen (experimentell ermittelt) (mg);
- ThSB: Theoretischer Sauerstoffbedarf für die vollständige Oxidation der Prüfsubstanz (berechnet) (mg);
- Sa: Restliche Menge der Prüfsubstanz am Ende des biologischen Abbautests (experimentell ermittelt) (mg);
- Sb: Restliche Menge der Prüfsubstanz am Testende in einem Ansatz, der nur aus Wasser und der Prüfsubstanz besteht (experimentell ermittelt) (mg).

1.3. Kontrollsubstanzen

Zur Prüfung der Aktivität des Inokulums ist die Verwendung von Kontrollsubstanzen wünschenswert. Anilin, Natriumacetat oder Natriumbenzoat können hierfür benutzt werden. Der Test kann als gültig

betrachtet werden, wenn der aus dem Sauerstoffbedarf berechnete, prozentuale Abbau des Anilins nach 7 Tagen einen Wert von 40 % und nach 14 Tagen einen Wert von 65 % erreicht hat. Wenn die Wiederauffindungsrate von Sb recht gering ist, wird der Test als ungünstig betrachtet.

1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz ist die einzige Quelle an organischem Kohlenstoff. Die Mikroorganismen sind nicht an die Prüfsubstanz adaptiert.

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs wird ein automatisch arbeitendes, geschlossenes System (Respirometer) verwendet. Die Prüfsubstanz wird zusammen mit den Mikroorganismen des Inokulums in die Testgefäße gegeben. Während der Dauer des Tests wird der biochemische Sauerstoffbedarf (BSB) ständig im Respirometer gemessen. Die biologische Abbaubarkeit wird aus dem BSB und aus zusätzlichen chemischen Analysen ermittelt. Als Analysen kommen z. B. die Messung der Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) oder der restlichen Prüfsubstanz in Frage.

1.5. Qualitätskriterien

1.5.1. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit ist im allgemeinen gut, vor allem bei Prüfsubstanzen, die eine Wasserlöslichkeit von mehr als 0,1 g/l besitzen.

1.5.2. Empfindlichkeit

A) Messung des Sauerstoffverbrauchs:

Die Nachweisgrenze liegt bei 1 mg (Sauerstoffverbrauch durch die Mikroorganismen).

B) Chemische Analysen:

Die Empfindlichkeit hängt von der analytischen Methode ab.

1.5.3. Spezifische Anwendbarkeit

Der Test ist für alle Prüfsubstanzen anwendbar, die einen Quotienten (C) Wasser/(C) Luft ≥ 1 besitzen.

Bei flüchtigen Prüfsubstanzen sollte ein modifiziertes Respirometer verwendet werden, das besondere Kapillarröhren besitzt, ansonsten aber dem normalen Respirometer entspricht (siehe Anlage 1).

1.6. Beschreibung der Methode

1.6.1. Reagenzien

1.6.1.1. Das deionisierte Wasser darf nicht mehr als 10 % Kohlenstoff, verglichen mit der Konzentration der Prüfsubstanz, enthalten.

1.6.1.2. Nährmedium

Jeweils 3 ml der nachfolgend aufgeführten Lösungen A, B, C und D werden mit deionisiertem Wasser auf ein Volumen von 1 000 ml aufgestockt.

a) Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4	21,75 g;
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	8,50 g;
Dinatriumhydrogenphosphat-dodecahydrat $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	44,60 g;

Ammoniumchlorid NH_4Cl gelöst in 1 000 ml Wasser, der pH-Wert sollte 7,2 betragen.	1,70 g
b) Magnesiumsulfat-heptahydrat $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ gelöst in 1 000 ml Wasser.	22,50 g
c) Calciumchlorid CaCl_2 gelöst in 1 000 ml Wasser.	27,50 g
d) Eisen(III)chlorid-hexahydrat $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ gelöst in 1 000 ml Wasser.	0,25 g

1.6.2. Geräte

Respirometer mit 6 Testgefäßen mit je 300 ml Volumen.

Gefäße 1 und 2:

300 ml deionisiertes Wasser und 30 mg Prüfsubstanz.

Gefäße 3 und 4:

300 ml Nährmedium, 9 mg Belebtschlamm (Trockensubstanz) und 30 mg Prüfsubstanz.

Gefäß 5:

300 ml Nährmedium, 9 mg Belebtschlamm (Trockensubstanz) und 30 mg Anilin oder eine andere Kontrollsubstanz.

Gefäß 6:

300 ml Nährmedium und 9 mg Belebtschlamm (Trockensubstanz).

1.6.3. Vorbereitung des Inokulums

1.6.3.1. Belebtschlamm

Entnahmeorte der Belebtschlämme:

Belebtschlamm wird in der Regel an 10 verschiedenen, über das ganze Land verteilten Orten entnommen, wobei Gebiete bevorzugt werden, in denen besonders viel chemische Substanzen gebraucht oder entsorgt werden.

Für den Standardbelebtschlamm des Japanese Chemical Biotesting Center wird Schlamm beispielsweise an folgenden Stellen genommen und dann gemischt:

- aus 3 kommunalen Kläranlagen, im nördlichen, mittleren und südlichen Teil Japans,
- aus einer Industriekläranlage, in der Abwässer der Chemischen Industrie behandelt werden,
- aus 3 Flüssen im nördlichen, mittleren und südlichen Teil Japans,
- aus einem See im mittleren Japan,
- aus 2 Meeresbuchten in Japan,

Häufigkeit der Probenahme des Belebtschlammes:

In der Regel sollte viermal im Jahr, im März, Juni, September und Dezember eine Probe genommen werden.

Methoden der Belebtschlammmentnahme:

- aus Kläranlagen wird 1 l Rücklaufschlamm entnommen;
- aus Flüssen, Seen, Sümpfen und dem Meer werden 1 l Oberflächenwasser und 1 l Boden aus dem Uferbereich, der mit der Atmosphäre in Kontakt ist, entnommen.

Vorbereitung:

Die Proben der verschiedenen Entnahmeorte werden unter Rühren in einem Behälter gemischt. Dann läßt man die gesamte Probe stehen. Die aufschwimmenden Stoffe werden entfernt, die überstehende Flüssigkeit wird abfiltriert (Filterpapier Nr. 2). Das Filtrat wird mit Natronlauge oder Phosphorsäure auf einen pH-Wert von $7,0 \pm 1,0$ eingestellt. Dann wird es in einen Zuchtbehälter umgefüllt und belüftet.

Zucht des Belebtschlamm:

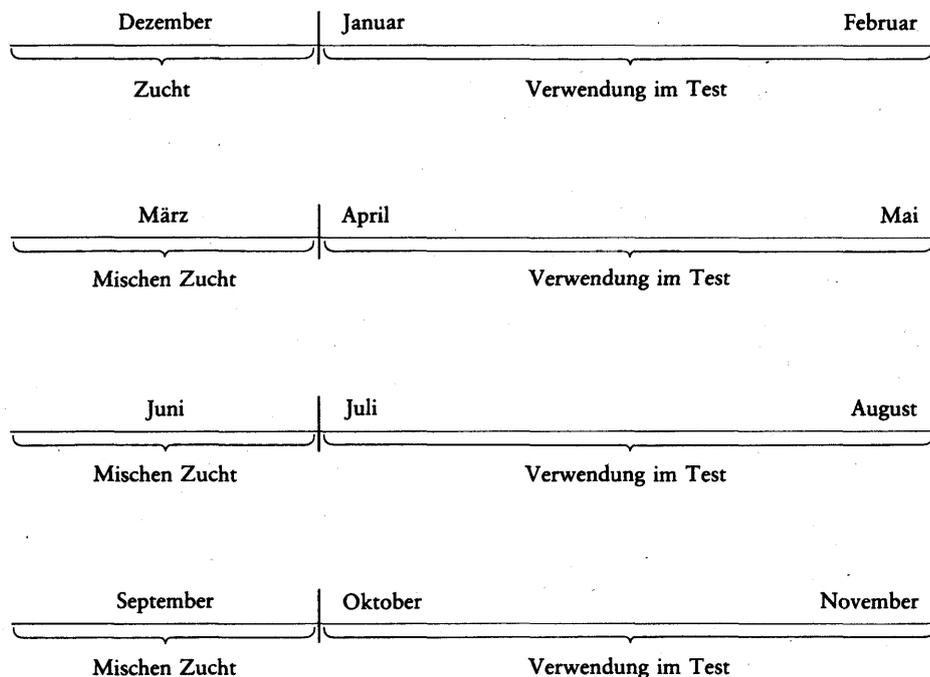
Einmal pro Tag wird die Belüftung für ca. 30 Minuten abgeschaltet, dann wird ungefähr $\frac{1}{3}$ des Überstands entnommen. Danach wird die gleiche Menge eines 0,1%igen synthetischen Abwassers hinzugefügt. Die Belebtschlammzucht wird bei $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ gehalten. Das synthetische Abwasser enthält pro l Wasser 1 g Glukose, 1 g Pepton und 1 g Kaliumhydrogenphosphat. Es wird mit Natronlauge auf einen pH-Wert von $7,0 \pm 1,0$ eingestellt.

Kontrolle:

Zur Kontrolle der Belebtschlammzucht werden folgende Faktoren überprüft und, wenn nötig, korrigiert:

- Aussehen des Überstands: Der Überstand des Belebtschlamm sollte klar sein;
- Absetzeigenschaften des Belebtschlamm: Der Belebtschlamm muß sich in großen Flocken gut absetzen;
- Stand der Belebtschlamm-bildung: Wenn sich keine Flocken bilden, muß entweder die Menge oder die Zugabefrequenz des 0,1%igen synthetischen Nährmediums erhöht werden;
- pH-Wert: Der pH-Wert des Überstands soll bei $7,0 \pm 1,0$ liegen;
- Temperatur: Die Inkubationstemperatur des Belebtschlamm beträgt $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- Intensität der Belüftung: Wenn der Überstand durch das synthetische Abwasser ersetzt wird, muß der Belebtschlamm so belüftet werden, daß die Konzentration an gelöstem Sauerstoff nicht unter 5 mg/l absinkt;
- Mikroflora des Belebtschlamm: Bei einer mikroskopischen Untersuchung (bei etwa 100—400facher Vergrößerung) müssen verschiedene Protozoenarten und Belebtschlammflocken zu sehen sein;
- Mischen von frischem und altem Belebtschlamm: Um frischen und alten Belebtschlamm bei einer vergleichbaren Aktivität zu halten, wird wie folgt gemischt. Das Filtrat des Überstands des alten, bereits in der Prüfung verwendeten Belebtschlamm, wird mit einem gleichen Teil Überstandsfiltrat eines frisch gesammelten und vorbereiteten Belebtschlamm gemischt. Diese Mischung wird weitergezüchtet;
- Aktivitätskontrolle des Belebtschlamm: Die Aktivität des Belebtschlamm sollte regelmäßig, mindestens jedoch alle 3 Monate überprüft werden. Diese Prüfung erfolgt mit einer Kontrollsubstanz nach der hier beschriebenen Prüfmethode. Die Kontrolle muß besonders sorgfältig durchgeführt werden, wenn frischer und alter Belebtschlamm gemischt wurden, um den Vergleich zum alten Belebtschlamm zu haben.

Beispiel für die Präparation der Belebtschlammproben und Übersicht der Verwendungszeiträume:



(Dieses Schema wird entsprechend weitergeführt).

1.6.4. *Vorbehandlung der Prüfsubstanz*

Wenn die Prüfsubstanz in der vorgesehenen Konzentration nicht in Wasser gelöst werden kann, sollte sie so fein wie möglich verteilt werden.

1.6.5. *Zugabe der Prüfsubstanz und Testvorbereitung*

Folgende Testgefäße werden benötigt. Sie werden an die Prüftemperatur angepaßt (siehe 1.6.2).

1. Zwei Testgefäße mit Wasser und 100 mg/l Prüfsubstanz (Gefäße 1 und 2);
2. Zwei Testgefäße mit Nährmedium, Inokulum und 100 mg/l Prüfsubstanz. Der pH-Wert der Ansätze muß, wenn nötig, auf 7 eingestellt werden, bevor das Inokulum zugegeben wird (Gefäße 3 und 4);
3. Ein Testgefäß mit Nährmedium, Inokulum und 100 mg/l Anilin oder einer anderen Kontrollsubstanz (Gefäß 5);
4. Ein Testgefäß für den Blindwert, das nur Nährmedium und Inokulum enthält (Gefäß 6).

1.6.5.1. *Beimpfung mit Belebtschlamm*

Das Inokulum wird in die Testgefäße 3, 4, 5 und 6 gegeben. Die Konzentration an Trockensubstanz, die z. B. nach den Japanese Industrial Standards bestimmt wird, beträgt 30 mg/l.

1.6.5.2. *Testbedingungen*

- Konzentration der Prüfsubstanz: 100 mg/l;
- Konzentration des Belebtschlammes: 30 mg/l;
- Testtemperatur: 28 °C—25 °C; sie sollte täglich überprüft werden;
- Testdauer: 28 Tage;

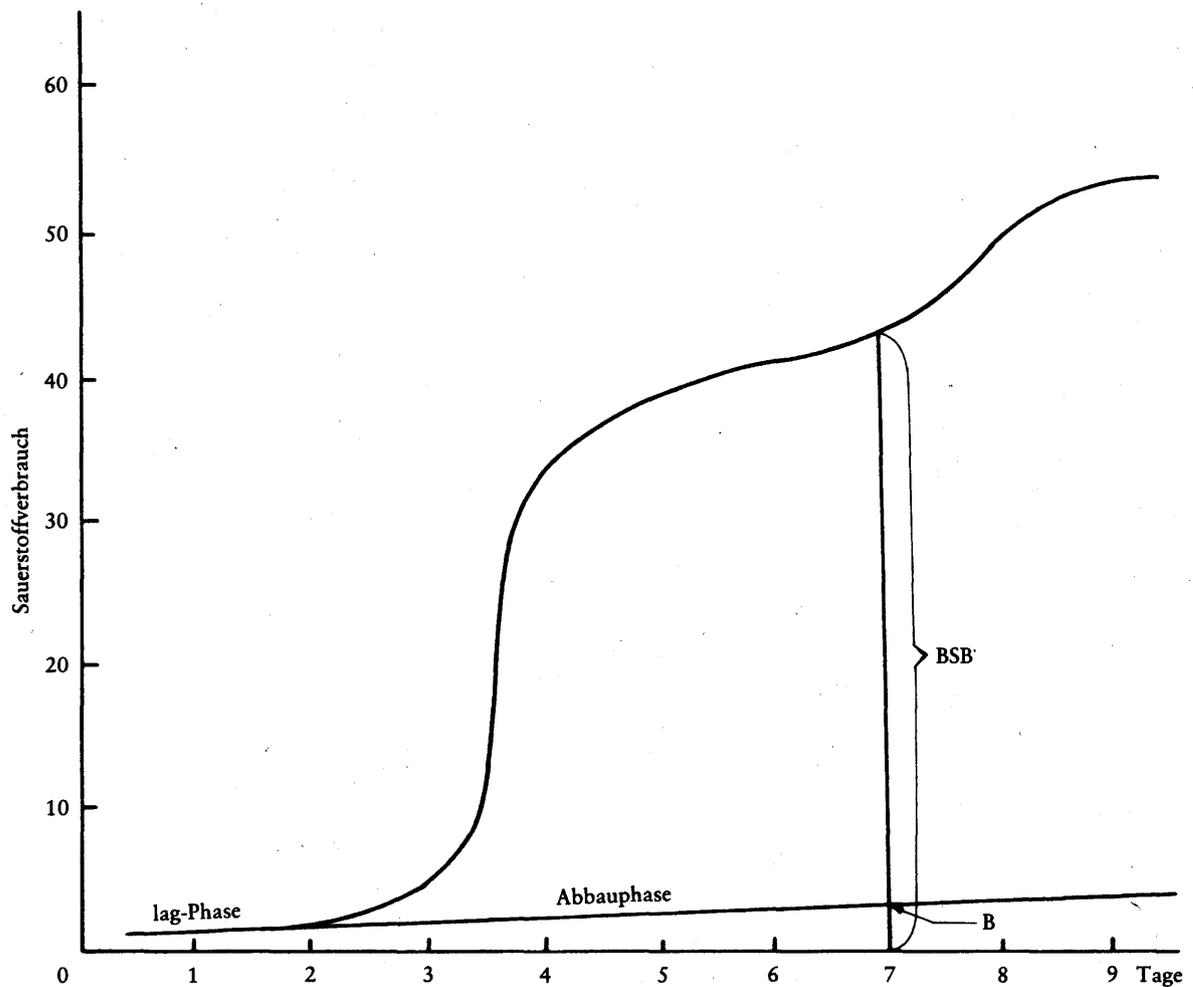
- die Prüfansätze werden im Dunkeln gehalten. Die Farbe des Inhalts der Testgefäße sollte täglich auf eine mögliche Veränderung geprüft werden;
- die Prüfansätze werden mit einem mechanischen Rührer gerührt.

1.6.6. Durchführung der Prüfung

Die BSB-Kurve wird bis zum Ende der Prüfung (28 Tage) kontinuierlich aufgezeichnet (siehe Abbildung). Am Ende der Prüfung (28 Tage) werden der pH-Wert und die Konzentration der restlichen Prübsubstanz sowie die der Zwischenprodukte in den Testgefäßen bestimmt.

Abbildung

BSB-Kurve von Anilin



Die Prübsubstanz im Testgefäß ohne Belebtschlamm wird ebenfalls analysiert, um zu prüfen, ob sie sich während der Prüfdauer verändert hat oder ob eine Elimination durch Verdunstung oder Adsorption an die Gefäßwand eingetreten ist.

1.6.7. Analysengeräte

Wenn die Prübsubstanz wasserlöslich ist, wird die restliche Konzentration an organischem Kohlenstoff am Ende der Prüfung bestimmt.

- a) Bestimmung in einem DOC-Analysator: 10 ml Testlösung werden jedem Testgefäß entnommen und bei 3 000 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Im Überstand wird dann der DOC mit Hilfe des DOC-Analysators gemessen;
- b) Sonstige Analyse: Der Gesamtinhalt des Testgefäßes wird mit einem für die Prüfsubstanz geeigneten Lösemittel extrahiert. Nach einer entsprechenden Vorbehandlung, wie z. B. einer Aufkonzentrierung, wird der restliche Anteil der Prüfsubstanz mit Hilfe eines geeigneten Analysengerätes (Gaschromatograph, Massenspektrometer, Spektralphotometer u. a.) bestimmt;

Flüchtige Prüfsubstanzen: Wenn eine flüchtige Prüfsubstanz geprüft wird, sollte das Thermostatenbad des Respirometers auf 10 °C abgekühlt werden. Bei dieser Temperatur sollte es mindestens 30 Minuten gehalten werden, um eine Verdunstung der Prüfsubstanz zu verhindern. Dann wird die Analyse entsprechend Buchstabe a) oder b) durchgeführt.

2. DATEN UND AUSWERTUNG

2.1. Berechnung der Ergebnisse

Die Verfahren zur Berechnung des prozentualen Abbaus aus den Ergebnissen der Messung des Sauerstoffbedarfs und der direkten Analyse sind bei 1.2 angeführt.

2.2. Vergleich der Ergebnisse

Der theoretische Sauerstoffbedarf (ThSB) wird entweder nach der ursprünglichen MITI-Methode oder nach der im Anhang 2 angegebenen Methode berechnet:

<i>Element</i>	<i>oxidierte Form</i>
C	CO ₂
H	H ₂ O
N	NO ₂
S	SO ₂
X (Halogene)	X

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält folgende Punkte:

- Informationen über die Prüfsubstanz;
Name, Strukturformel, Molekulargewicht, Reinheit, Art der Verunreinigungen, physikalische und chemische Eigenschaften, Identifizierungsdaten;
- Prüfbedingungen;
- Belebtschlamm, Entnahmestellen und Konzentration;
- Testsubstanz, Konzentration;
- Testdauer;
- Prüftemperatur;
- Analysenverfahren, Vorbehandlung, Instrumentelle Meßbedingungen, Wiederauffindungsrate, Identifizierung von Zwischenprodukten;

- Prüfergebnisse, Abbaukurven (Prüf- und Kontrollsubstanz),
 - BSB (mg),
 - B (mg),
 - Sa (mg),
 - Sb (mg),
 - ThSB (mg),prozentualer Abbau, ermittelt über die BSB-Bestimmung,
prozentualer Abbau, ermittelt über die chemische Analyse;
- Chromatogramme und Spektren, die für die Analysen benötigt wurden;
- Nachweis der Gültigkeit der Prüfung (siehe 1.3).

3.2. *Interpretation*

Es ist zu berücksichtigen, daß stickstoffhaltige Verbindungen das Prüfergebnis beeinflussen können.

Stellt man fest, daß die Wiederauffindungsrate von Sb bei 10 % oder darunter liegt, ist dies entweder ein Hinweis auf analytische Probleme oder es könnte z. B. eine Hydrolyse vorliegen. In einem solchen Fall müssen die Ergebnisse besonders vorsichtig interpretiert werden.

Weil dieser Test abbaubare Substanzen recht scharf differenziert, bedeutet ein niedriger Abbaugrad nicht unbedingt, daß die Prüfsubstanz in der Umwelt nicht abgebaut wird. Um eine solche Aussage treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Prüfsubstanzen, die in diesem Test einen hohen Sauerstoffbedarf aufweisen, können als biologisch leicht abbaubar betrachtet werden. Voraussetzung ist jedoch, daß der Abbau innerhalb von 10 Tagen, ab dem Tag, an dem 10 % abgebaut wurden, abgeschlossen ist.

4. LITERATUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301C. 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.

Anlage 1

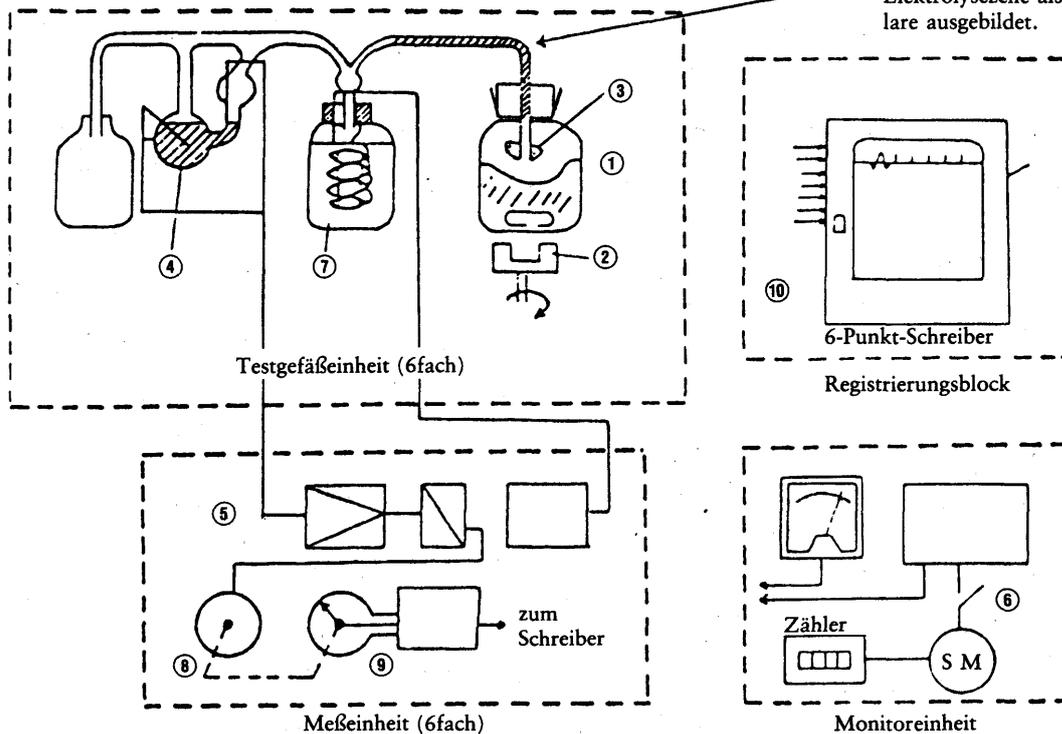
Funktionsprinzip eines Gerätes zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs in einem geschlossenen System

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs der Mikroorganismen erfolgt in einem Coulometer, einem Gerät, das nach einem elektrochemischen Prinzip (Coulometrie) arbeitet.

In der Abbildung wird das Gerät als Blockdiagramm dargestellt.

Abbildung
Blockdiagramm des Coulometers

Bei der modifizierten Form des Coulometers für die Prüfung leicht flüchtiger Substanzen ist die Verbindung zwischen dem Testgefäß und der Elektrolysezelle als Kapillare ausgebildet.



Im Testgefäß (1) wird der Prüfansatz mit einem Magnetrührer (2) gerührt. Die Mikroorganismen verbrauchen für die Abbauprozesse den im Wasser gelösten Sauerstoff. Aus dem Luftraum im Testgefäß wird daraufhin Sauerstoff nachgeliefert. Das beim Abbau entstehende Kohlendioxid wird gleichzeitig freigesetzt. Es wird durch Natronkalk im Luftraum gebunden (3). Auf diese Weise entsteht im Testgefäß ein Unterdruck. Ein Elektrodenmanometer (4) registriert den Druckabfall und wandelt ihn in ein elektrisches Signal um (5). Über ein Relais (6) wird das Signal verstärkt; es dient dann zur Ansteuerung eines Synchronmotors (8). Parallel dazu wird in einer Elektrolysezelle (7) Sauerstoff elektrolytisch aus schwefelsaurer Kupfersulfatlösung erzeugt. Dieser Sauerstoff wird dem Testgefäß zugeleitet und gleicht den Unterdruck aus. Das Manometer registriert den Druckausgleich und unterbricht den Relaischaltkreis; somit wird der Synchronmotor abgeschaltet und die Sauerstoffproduktion in der Elektrolysezelle unterbrochen.

Die im Testgefäß verbrauchte Sauerstoffmenge entspricht der Menge an elektrolytisch produziertem Sauerstoff. Da mit konstantem Strom gearbeitet wird, ist sie auch der Elektrolysendauer proportional. Eine Registrierung des Sauerstoffverbrauchs auf einem Schreiber (10) läßt sich erreichen, weil der Drehwinkel des Synchronmotors über ein Potentiometer (9) in ein mV-Signal umgewandelt wird.

Anlage 2

Berechnung des theoretischen Sauerstoffbedarfs (ThSB)

Der ThSB der Substanz $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ mit dem Molekulargewicht MG wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{ThSB}_{\text{NH}_3} = \frac{16 \left(2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right)}{\text{MG}}$$

Bei dieser Berechnung geht man davon aus, daß H zu H_2O , C zu CO_2 , P zu P_2O_5 , Na zu Na_2O , Halogene zu Halogenwasserstoffen und Stickstoff zu Ammoniak umgewandelt wird.

Beispiel: Glukose $C_6H_{12}O_6$ MG = 188

$$\text{ThSB} = \frac{16 \left(2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6 \right)}{188} = 1,07 \text{ mg O}_2/\text{mg Glukose.}$$

Das Molekulargewicht von Salzen, die nicht von Alkalimetallen stammen, wird so berechnet, als lägen die Salze hydrolysiert vor. Vom Schwefel wird angenommen, daß er zu Sulfat oxidiert wird.

Beispiel: Na-n-Alkylbenzolsulfonat $C_{18}H_{29}SO_3Na$ MG = 348

$$\text{ThSB} = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg O}_2/\text{mg Substanz.}$$

Bei stickstoffhaltigen Substanzen kann der Stickstoff in Ammoniak, Nitrit oder Nitrat umgewandelt werden. Dies wirkt sich unterschiedlich auf den Wert des ThSB aus:

$$\text{ThSB}_{\text{NO}_2} = \frac{16 \left(2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right)}{\text{MG}}$$

$$\text{ThSB}_{\text{NO}_3} = \frac{16 \left(2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right)}{\text{MG}}$$

Beispiel: sekundäres Amin $(C_{12}H_{25})_2NH$ MG = 353

(es wird angenommen, daß der gesamte Stickstoff in Nitrat umgewandelt wurde)

$$\text{ThSB}_{\text{NO}_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg O}_2/\text{mg Substanz.}$$

Anlage 3

Biologischer Abbau: Modifizierter MITI-Test

Prüfinstitut:

Untersuchungsleiter: Exp.-Nr.:

Testbeginn am:

Prüfsubstanz:

Chemische Struktur:

Analytische Vorschrift:

ThSB oder CSB der Testsubstanz:

Inokulum:

Entnahmeorte:

Konzentration:

Testergebnis

..... % Abbau = $\frac{BOD - B}{ThOD} \times 100$ % nach 28 Tagen

..... % Abbau = $\frac{BOD - B}{COD} \times 100$ % nach 28 Tagen

..... % Abbau = $\frac{Sb - Sa}{Sb} \times 100$ % nach 28 Tagen

Gültigkeit der Ergebnisse

Kontrollsubstanz:

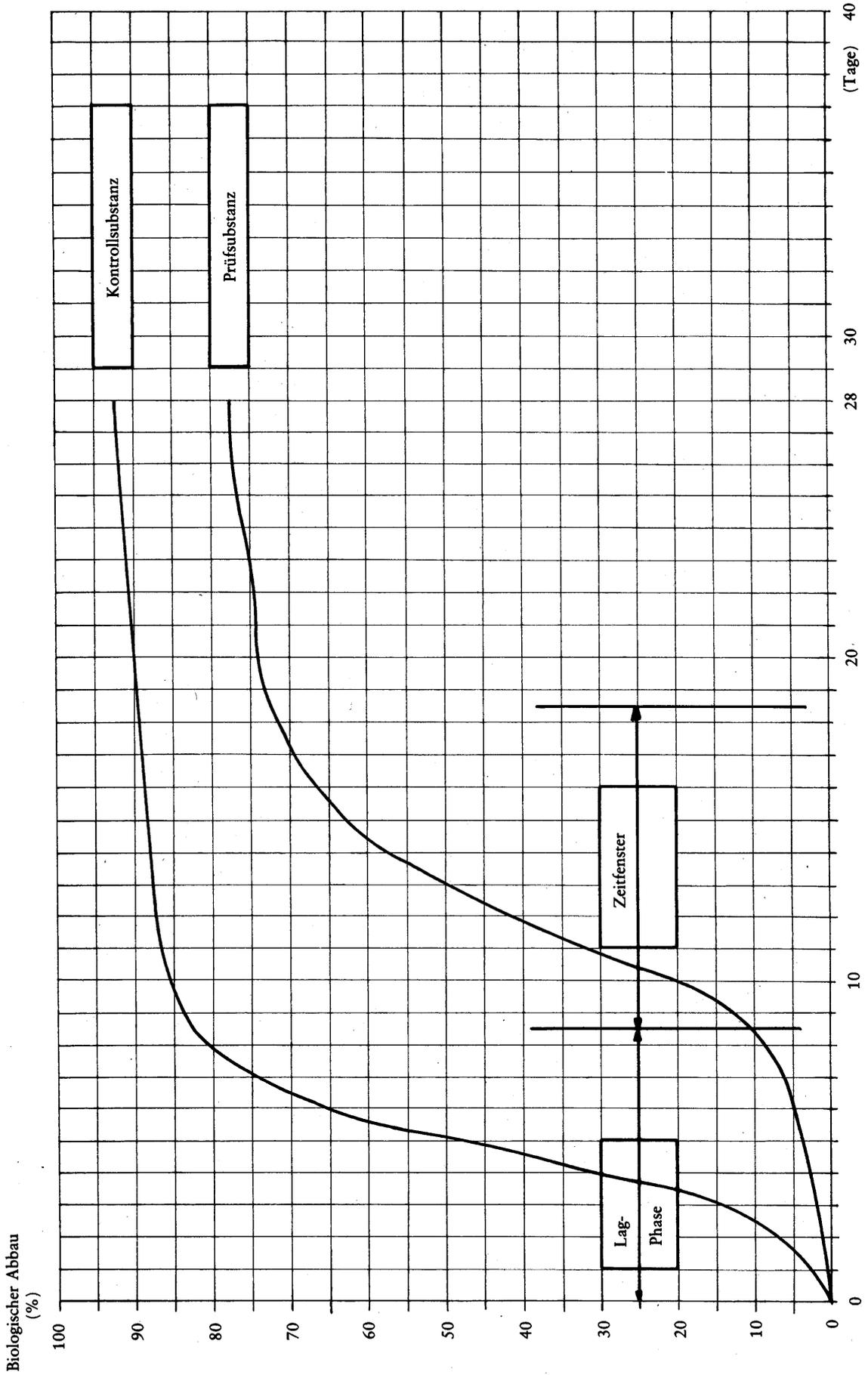
Ergebnis: % Abbau nach 28 Tagen

Bezugsexp.-Nr.:

Bemerkungen:

Anlage 4
Modifizierter MITI-Test

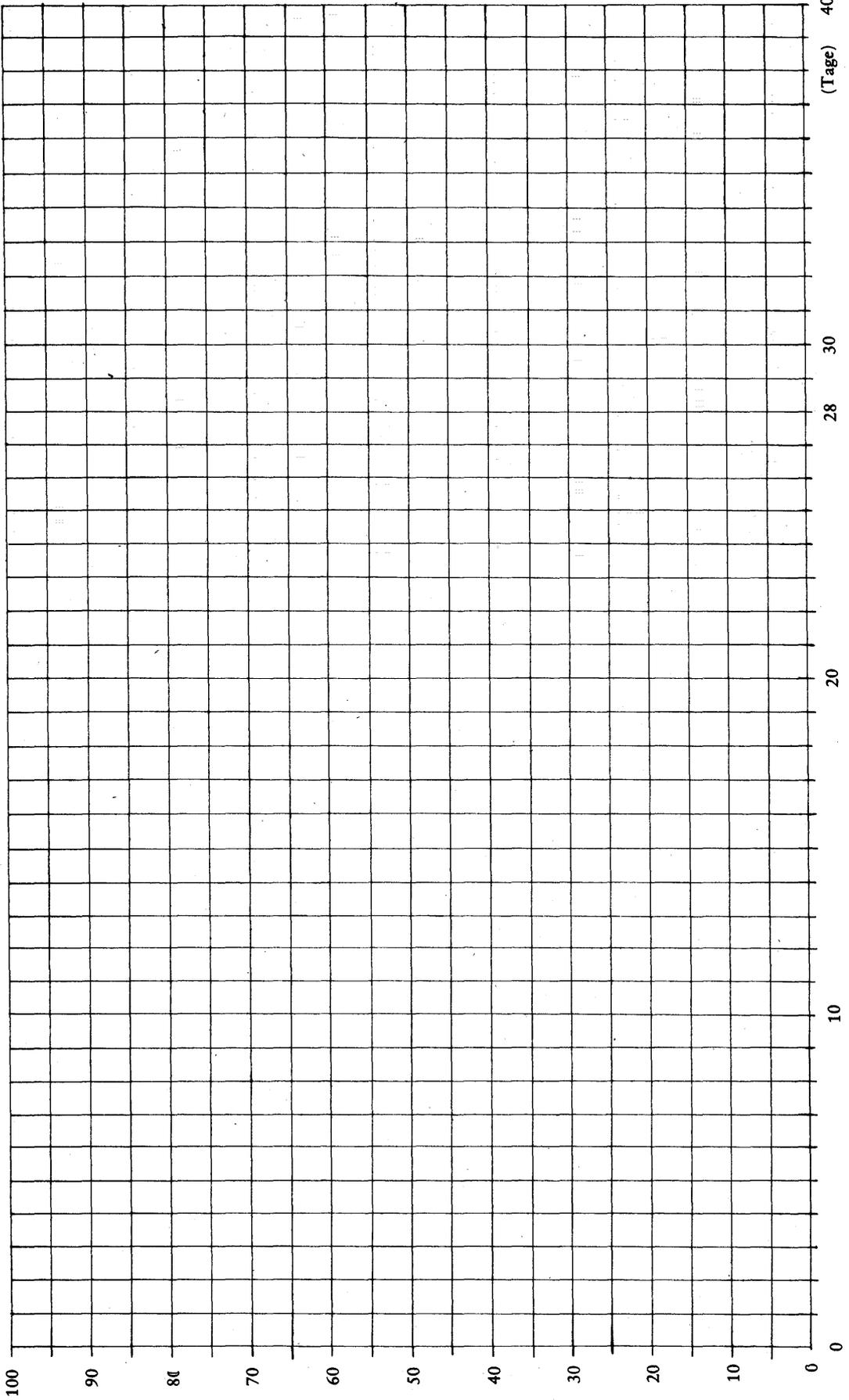
Prüfstitut: Prüfsubstanz: Exp. Nr.:



Modifizierter MITI-Test

Prüfsubstanz: Exp. Nr.:

Biologischer Abbau (%)



C. 8. ABBAUBARKEIT

BIOCHEMISCHER SAUERSTOFFBEDARF

1. METHODE

1.1. Einleitung

Diese Methode hat die Messung des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB) fester oder flüssiger organischer Stoffe zum Ziel. Die mit diesem Verfahren erzielbaren Prüfergebnisse gelten in erster Linie für wasserlösliche Substanzen; flüchtige und in Wasser schwer lösliche Verbindungen können zumindest grundsätzlich auch mit diesem Verfahren geprüft werden.

Die Methode ist nur für organische Substanzen anwendbar, die bei den im Test verwendeten Konzentrationen keine hemmende Wirkung auf das Inokulum haben. Ist ein Stoff bei der Testkonzentration nicht löslich, so sind gegebenenfalls besondere Verfahren wie Ultraschalldispersion anzuwenden, um eine ausreichende Dispersion der eingesetzten Testsubstanz sicherzustellen.

Angaben über die Toxizität der zu prüfenden Substanz können bei der Interpretation niedriger Ergebniswerte und bei der Auswahl der geeigneten Testkonzentrationen von Nutzen sein.

1.2. Definitionen und Einheiten

Der biochemische Sauerstoffbedarf (BSB) wird definiert als die Menge an gelöstem Sauerstoff, die zur biochemischen Oxidation einer bestimmten Menge einer gelösten Substanz unter den vorgeschriebenen Bedingungen notwendig ist.

Die Ergebnisse werden dargestellt als g Sauerstoffbedarf (BSB)/g Prüfsubstanz.

1.3. Kontrollsubstanzen

Es können noch keine Referenzsubstanzen zu Kalibrierungszwecken empfohlen werden. Es wird daher empfohlen, eine geeignete Kontrollsubstanz zur Prüfung der Aktivität des Inokulums zu verwenden.

1.4. Prinzip der Methode

Eine bestimmte Menge der Prüfsubstanz wird in einem geeigneten sauerstoffreichen Nährmedium gelöst oder dispergiert und anschließend mit einem Inokulum angeimpft und bei gleichbleibender vorgeschriebener Temperatur im Dunkeln inkubiert. Der BSB wird aufgrund der Differenz des Gehaltes an gelöstem Sauerstoff vor Beginn und nach Ende des Tests bestimmt. Die Testdauer muß wenigstens 5 Tage, jedoch nicht mehr als 28 Tage betragen.

Parallel zu diesem Test ist ein Blindversuch ohne die Prüfsubstanz durchzuführen.

1.5. Qualitätskriterien

Die BSB-Bestimmung kann nicht als sichere Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit eines Stoffes betrachtet werden. Dieser Test ist nur als „Screening“-Test zu betrachten.

1.6. Beschreibung der Methode

Eine Lösung oder Dispersion bzw. Suspension der Prüfsubstanz wird in einer geeigneten Konzentration vorbereitet. Dann wird der BSB mit Hilfe eines geeigneten, standardisierten Verfahrens ermittelt. Ein noch zu vereinbarendes internationales Verfahren wäre gegebenenfalls vorzuziehen.

2. DATEN UND AUSWERTUNG

Der BSB der Prüfsubstanz wird entsprechend der ausgewählten Methode berechnet und in g Sauerstoffbedarf/ g Prüfsubstanz angegeben.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Die angewandte Methode ist anzugeben. Als biochemischer Sauerstoffbedarf ist der Mittelwert von mindestens drei gültigen Meßergebnissen anzugeben. Alle für die Interpretation der Ergebnisse wichtigen Informationen und Bemerkungen sind zu erwähnen, insbesondere hinsichtlich Verunreinigungen, Aggregatzustand, toxischer Wirkungen und Zusammensetzung der Prüfsubstanz, die das Ergebnis beeinflussen könnten.

Wenn ein Zusatz zur Hemmung der biologischen Nitrifikation verwendet wurde, ist dies anzugeben.

4. REFERENZEN

Verzeichnis der genormten Methoden, z. B.

NF T 90—103: Determination of the Biochemical Oxygen Demand.

NBN 407: Biochemical Oxygen Demand

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (DZV)

The Determination of Biochemical Oxygen Demand, (Methods for the examination of Water and Associated Materials, HMSO, London).

C. 9. ABBAUBARKEIT

CHEMISCHER SAUERSTOFFBEDARF

1. METHODE

1.1. Einleitung

Zweck des Verfahrens ist die Messung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CBS) von festen und flüssigen organischen Stoffen unter bestimmten, standardisierten Laborbedingungen.

Zur Durchführung dieses Tests sowie zur Interpretation der Testergebnisse sind Angaben über die chemische Formel der Prüfsubstanz von Nutzen (z. B. der Gehalt von Halogensalzen, Eisensalzen oder an chlorierten Kohlenwasserstoffen).

1.2. Definitionen und Einheiten

Der chemische Sauerstoffbedarf ist ein Maß für die Oxidierbarkeit einer Substanz. Er wird als diejenige Sauerstoffmenge eines oxidierenden Reagenzmittels ausgedrückt, die eine Prüfsubstanz unter bestimmten Laborbedingungen verbraucht.

Das Testergebnis wird in g Sauerstoffverbrauch/ g Prüfsubstanz angegeben.

1.3. Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen müssen bei der Prüfung neuer Stoffe nicht immer eingesetzt werden. Sie sollten von Zeit zu Zeit zur Eichung der Meßmethode benutzt werden, um auf diese Weise eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse, die mit anderen Methoden erzielt wurden, zu ermöglichen.

1.4. Prinzip der Methode

Eine bestimmte Menge der in Wasser gelösten oder verteilten Substanzen wird mit Kaliumdichromat in einem starken Schwefelsäuremedium in Gegenwart von Silbersulfat als Katalisator durch Erhitzen am Rückflußkühler angereichert. Das restliche Dichromat wird durch Titrieren mit standardisierter Ammoniumeisen(II)sulfatlösung bestimmt.

Bei chlorhaltigen Substanzen wird zur Verringerung von Störungen durch das Chlorid Quecksilbersulfat zugefügt.

1.5. Qualitätskriterien

Wegen der willkürlichen Bestimmungsart muß der chemische Sauerstoffbedarf eher als „Oxidierbarkeitsindikator“ denn als Maßstab für den Gehalt an organischer Substanz einer Prüfsubstanz betrachtet werden.

Chloride können das Testergebnis verfälschen. Anorganische, reduzierende oder oxidierende Agenzien können die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs ebenfalls beeinflussen.

Einige zyklische Verbindungen werden in diesem Test nicht vollständig oxidiert.

1.6. Beschreibung der Methode

Zuerst wird eine Lösung oder eine Dispersion bzw. Suspension der Testsubstanz hergestellt, um einen CBS zwischen 250 und 600 mg/l zu erzielen.

Bemerkung:

Bei schlecht löslichen oder nicht emulgierfähigen Substanzen kann eine bestimmte Menge pulverförmiger oder flüssiger Prüfsubstanz abgewogen werden; sie sollte etwa 5 mg CBS entsprechen.

Diese Menge wird zusammen mit Wasser in die Testgefäße eingefüllt. Dann wird der chemische Sauerstoffbedarf mit einer beliebigen, standardisierten Methode gemessen, solange noch keine international standardisierte Methode veröffentlicht wurde, die vorzuziehen wäre.

2. DATEN UND AUSWERTUNG

Der in den Versuchskolben auftretende CBS-Wert wird mit Hilfe der jeweiligen standardisierten Methode berechnet und in g chemischen Sauerstoffbedarf pro g Testsubstanz ausgedrückt.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Wenn eine Referenzmethode verwendet wurde, sollte diese ebenso erwähnt werden wie eventuelle Abweichungen davon.

Der chemische Sauerstoffbedarf sollte aus mindestens 3 Meßwerten ermittelt werden. Der Bericht sollte alle für die Interpretation der Meßergebnisse relevanten Informationen und Bemerkungen enthalten, z. B. die Verunreinigungen der Prüfsubstanz, den physikalischen Zustand und die Zusammensetzung der Substanz (falls bekannt), wenn diese Faktoren die Testergebnisse beeinflussen.

Die Verwendung von Quecksilbersulfat zur Herabsetzung der Störungen durch Chlorid muß erwähnt werden.

4. LITERATUR

Liste der standardisierten Verfahren, z. B.:

NBN T 91—201	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
ISBN O 11 7512494	Chemical Oxygen Demand (dichromate value) of polluted and waste waters.
NF T 90—101	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
DS 217 = Water Analysis	Determination of the Chemical Oxygen Demand.
DIN 38409 — H — 41	Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD) within the range above 15 mg/l.
NEN 3235 5.3	Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.
ISO DP 6060	Water Quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate Methods.

C. 10. ABBAUBARKEIT

ABIOTISCHER ABBAU: HYDROLYSE IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH

1. METHODE

Die Methode basiert auf der Prüfrichtlinie der OECD (1).

1.1. Einleitung

Die Hydrolyse ist eine wichtige den abiotischen Abbau bestimmende Reaktion. Sie ist bei Substanzen, die nur wenig biologisch abbaubar sind, von besonderer Bedeutung und kann den Verbleib einer Substanz in der Umwelt beeinflussen.

Die meisten Hydrolysereaktionen laufen nach einer Reaktion pseudo-erster Ordnung ab, so daß die Halbwertszeiten von der Konzentration unabhängig sind. Das erlaubt in der Regel die Extrapolation der Ergebnisse bei im Labor eingestellten Konzentrationen auf Umweltbedingungen.

Weiterhin wurden bei einer Anzahl chemischer Verbindungen Beispiele für eine befriedigende Übereinstimmung der in reinem und in natürlichem Wasser gemessenen Daten erbracht (Siehe 2).

Für die Anwendung dieser Prüfmethode ist es von Nutzen, vorher Angaben über den Dampfdruck des Stoffes zu haben.

Die Methode ist nur für wasserlösliche Substanzen geeignet. Verunreinigungen beeinträchtigen in der Regel die Ergebnisse.

Das Hydrolyseverhalten von Substanzen muß bei den gewöhnlich in der Umwelt vorliegenden pH-Werten untersucht werden (pH 4—9).

1.2. Definitionen und Einheiten

Unter Hydrolyse versteht man die Reaktion einer Substanz RX mit Wasser, die sich durch den Austausch der Gruppe X mit OH darstellen läßt:



Die Geschwindigkeit, mit der die RX-Konzentration abnimmt, ist gegeben durch

$$\text{Geschwindigkeit} = k \cdot [\text{H}_2\text{O}] \cdot [\text{RX}] \quad [2]$$

Da Wasser gegenüber der Substanz im Überschuß vorhanden ist, wird dieser Reaktionstyp gewöhnlich als Reaktion pseudo-1. Ordnung beschrieben, in der die ermittelte Geschwindigkeitskonstante durch die Beziehung

$$k_{\text{obs}} = k \cdot [\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

gegeben ist und aus dem Ausdruck

$$k_{\text{obs}} = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

für einen pH-Wert und für eine Temperatur T bestimmt werden kann.

Dabei sind:

t = Zeit;

C₀ = Konzentration der Substanz zu der Zeit Null;

C_t = Konzentration der Substanz zu der Zeit t;

2,303 der Umrechnungsfaktor zwischen natürlichen Logarithmen und Logarithmen zur Basis 10.

Die Konzentrationen können in g/l oder in mol/l angegeben werden.

Die Einheit der Konstante k_{obs} ist $(\text{Zeit})^{-1}$.

Die „Halbwertszeit“ $t_{1/2}$ ist als diejenige Zeit definiert, nach der die Ausgangssubstanz um 50 % reduziert ist:

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

Aus den Gleichungen [4] und [5] folgt:

$$t_{1/2} = 0,693/k_{\text{obs}} \quad [6]$$

1.3. Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen, in denen ein neuer Stoff untersucht wird, eingesetzt werden. Sie sollen primär dazu dienen, die Methode von Zeit zu Zeit zu überprüfen und die Möglichkeit bieten, Ergebnisse zu vergleichen, wenn eine andere Methode angewendet wird.

- Acetylsalicylsäure (Aspirin),
- Thiophosphorsäure-0,0-diethyl-0-(6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pyrimidinyl)-ester (Dimpylat, Diazinon)

sind als Referenzsubstanzen eingesetzt worden (1).

1.4. Prinzip der Prüfmethode

Die Substanz wird in geringer Konzentration in Wasser gelöst: pH-Wert und Temperatur werden kontrolliert.

Die Abnahme der Substanzkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit wird durch eine geeignete Analysenmethode verfolgt.

Die Logarithmen der Konzentrationen werden gegen die Zeit aufgetragen. Wenn die Resultierende linear ist, kann man die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung aus der Neigung der Geraden erhalten (siehe (2)).

Läßt sich eine Geschwindigkeitskonstante bei einer vorgegebenen Temperatur nicht direkt ermitteln, so kann sie gewöhnlich mit der Arrhenius-Beziehung abgeschätzt werden, die die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten angibt.

Dazu trägt man den Logarithmus der bei anderen Temperaturen ermittelten Geschwindigkeitskonstanten gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur (K) auf.

Aus dem linearen Verlauf kann der Wert solcher Geschwindigkeitskonstanten extrapoliert/interpoliert werden, die nicht direkt bestimmt wurden.

1.5. Qualitätskriterien

In der unter (2) zitierten Veröffentlichung wird berichtet, daß die Messung der Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse bei 13 Klassen organischer Verbindungen von hoher Genauigkeit sein kann.

Die Wiederholbarkeit (= repeatability) hängt insbesondere von einer Kontrolle des pH-Wertes und der Konzentration des gelösten Sauerstoffs ab. Sie kann weiterhin durch Mikroorganismen beeinflusst werden.

1.6. Beschreibung der Methode**1.6.1. Reagentien****1.6.1.1. Pufferlösungen**

Der Versuch wird bei drei pH-Werten durchgeführt: 4,0, 7,0 und 9,0.

Zu diesem Zweck sind Pufferlösungen unter Verwendung von analysereinen Chemikalien und destilliertem oder deionisiertem Wasser vorzubereiten. In der Anlage sind einige Beispiele für Puffersysteme zusammengestellt.

Das verwendete Puffersystem kann die Hydrolysegeschwindigkeit beeinflussen. Wenn dies festgestellt wird, sollte eine andere Pufferlösung verwendet werden. In (2) wird die Verwendung von Borat- und Azetatpuffern anstelle von Phosphat empfohlen.

Wenn der pH-Wert der Pufferlösungen für die jeweilige Testtemperatur nicht bekannt ist, muß er mit einem geeichten pH-Meßgerät bei der ausgewählten Temperatur auf $\pm 0,1$ pH-Einheiten genau bestimmt werden.

1.6.1.2. Versuchslösungen

Die Prüfsubstanz wird in der ausgewählten Pufferlösung gelöst. Die Konzentration sollte 0,01 mol/l oder die halbe Sättigungskonzentration nicht überschreiten, je nachdem welcher Wert niedriger ist.

Die Verwendung von mit Wasser mischbaren, organischen Lösungsmitteln wird nur für Substanzen niedriger Wasserlöslichkeit empfohlen. Die Menge des Lösungsvermittlers soll geringer als 1 % sein und den Hydrolyseverlauf nicht beeinflussen.

1.6.2. Apparatur

Für die Hydrolysereaktion werden Glaskolben mit Stopfen (kein Fett) verwendet.

Falls die Substanz oder das Puffersystem flüchtig ist, oder wenn bei höheren Temperaturen gearbeitet wird, sollte man vorzugsweise abgeschmolzene oder mit Septum verschlossene Probengefäße verwenden und große Luftvolumina vermeiden.

1.6.3. Analysenmethode

Die einzusetzende Analysenmethode ergibt sich aus der Art der zu untersuchenden Substanz. Sie muß ausreichend genau und empfindlich sein, um eine Abnahme der Anfangskonzentration um 10 % festzustellen. Die Methode muß ausreichend spezifisch sein, um die Bestimmung der Prüfsubstanz bei der Konzentration der Versuchslösung zu ermöglichen und kann aus einer Kombination geeigneter Analysetechniken bestehen.

1.6.4. Versuchsbedingungen

Die Versuche werden unter Verwendung einer temperaturkontrollierten Vorrichtung oder unter Benutzung eines Thermostatbades durchgeführt, eingestellt auf $\pm 0,5$ °C der gewählten Temperatur. Die Temperatur selbst muß auf $\pm 0,1$ °C genau gemessen werden. Photolytische Einflüsse müssen durch geeignete Maßnahmen verhindert werden.

Weiterhin sollen alle geeigneten Vorkehrungen getroffen werden, gelösten Sauerstoff zu entfernen (z. B. indem man 5 Minuten lang Stickstoff oder Argon vor Zubereitung der Lösung durchleitet).

1.6.5. *Meßverfahren*1.6.5.1. *Vortest*

Für alle Substanzen muß ein Vortest bei $50\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ bei jedem der drei pH-Werte 4,0/7,0 und 9,0 ausgeführt werden. Eine ausreichende Zahl von Messungen muß vorgenommen werden, um für jeden pH-Wert entscheiden zu können, ob bei 50 °C die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) kleiner als 2,4 Stunden ist oder ob weniger als 10 % nach 5 Tagen hydrolysieren (Man kann abschätzen, daß diese Daten Halbwertszeiten von weniger als einem Tag oder mehr als einem Jahr unter Bedingungen entsprechen, die eher in der Umwelt anzutreffen sind (25 °C)).

Keine weiteren Versuche sind erforderlich, wenn sich aus dem Vortest ergibt, daß bei 50 °C 50 % oder mehr der Prüfsubstanz in 2,4 Stunden oder weniger als 10 % nach 5 Tagen bei allen drei pH-Werten (4, 7 und 9) hydrolysieren.

Andernfalls wird jeweils für einzelne pH-Werte, bei denen dieser Sachverhalt nicht vorliegt, Test Nr. 1 durchgeführt.

1.6.5.2. *Test Nr. 1*

Bei den pH-Werten, für welche sich im Vortest die Notwendigkeit weiterer Prüfungen ergeben hat, wird der Test Nr. 1 ausgeführt. Gearbeitet wird bei einer Temperatur, vorzugsweise bei $50\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ und wenn möglich unter sterilen Bedingungen.

Um den Reaktionsverlauf nach pseudo-1. Ordnung bei den ausgewählten pH-Werten zu prüfen, nimmt man zur Abdeckung des Bereichs zwischen 20 % und 70 % Hydrolyse eine ausreichende Zahl von Proben (nicht weniger als 4).

Für jeden pH-Wert, bei dem Test Nr. 1 durchgeführt wird, bestimmt man die Reaktionsordnung.

Abschätzung der Geschwindigkeitskonstanten bei 25 °C :

Die Entscheidung über das weitere experimentelle Vorgehen hängt davon ab, ob aus dem Test Nr. 1 auf eine Reaktion pseudo-1. Ordnung geschlossen werden kann oder nicht.

Wenn aus dem Test Nr. 1 nicht sicher eine Reaktion pseudo-1. Ordnung gefolgert werden kann, müssen weitere Versuche nach Test Nr. 2 ausgeführt werden.

Folgt aus dem Test Nr. 1 sicher eine Reaktion pseudo-1. Ordnung, werden weitere Versuche nach Test Nr. 3 durchgeführt (Alternativ können unter besonderen Umständen möglicherweise die Geschwindigkeitskonstanten bei 25 °C aus den unter Benutzung der Daten von Test Nr. 1 errechneten Konstanten bei 50 °C berechnet werden, siehe Abschnitt 3.2).

1.6.5.3. *Test Nr. 2*

Dieser Test wird bei jedem pH-Wert ausgeführt, für den sich aus den Ergebnissen von Test Nr. 1 die Notwendigkeit dazu ergeben hat:

- entweder bei einer Temperatur niedriger als 40 °C
- oder bei zwei Temperaturen über 50 °C , die sich voneinander um wenigstens 10 °C unterscheiden.

Bei jedem pH-Wert und jeder Temperatur, für die Test Nr. 2 durchgeführt wird, sollen wenigstens 6 Meßpunkte im Bereich 20 bis 70 %iger Hydrolyse in angemessenen Zeitabständen bestimmt werden.

Bei einem pH-Wert wird bei einer Temperatur eine Wiederholungsmessung ausgeführt. Wird der Test Nr. 2 bei zwei Temperaturen über 50 °C durchgeführt, soll die Messung vorzugsweise bei der tieferen dieser beiden Temperaturen wiederholt werden.

Bei jedem pH-Wert und jeder Temperatur, für die Test Nr. 2 ausgeführt wird, soll, wenn möglich, eine graphische Abschätzung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) vorgenommen werden.

1.6.5.4. Test Nr. 3

Der Test wird bei jedem pH-Wert ausgeführt, für den sich aus den Ergebnissen von Test Nr. 1 die Notwendigkeit dazu ergeben hat:

- entweder bei einer Temperatur niedriger als 40 °C
- oder bei zwei Temperaturen über 50 °C, die sich voneinander um wenigstens 10 °C unterscheiden.

Bei jedem pH-Wert werden bei jeder Temperatur, für die Test Nr. 3 durchgeführt wird, drei Meßpunkte gewählt. Der erste unmittelbar am Anfang, der zweite und der dritte bei einem Hydrolysegrad von größer als 30 %. Die Konstante k_{obs} und $t_{1/2}$ sollen berechnet werden.

2. DATEN

Bei einem Reaktionsverhalten nach pseudo-1. Ordnung kann man die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_{obs} für jeden pH-Wert und jede Temperatur durch Regressionsanalyse berechnen oder aus der graphischen Auftragung der Logarithmen der Konzentration gegen die Zeit ermitteln, indem man den Ausdruck

$$k_{\text{obs}} = - \text{Neigung} \cdot 2,303$$

anwendet.

Weiterhin kann $t_{1/2}$ aus Gleichung [6] berechnet werden.

Wenn möglich, kann $k_{25^\circ\text{C}}$ durch Anwendung der Arrhenius-Gleichung erhalten werden.

Für ein Verhalten, das nicht pseudo-1. Ordnung entspricht, siehe 3.1.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Versuchsbericht

Der Versuchsbericht sollte möglichst folgende Angaben enthalten:

- Beschreibung der Substanz;
- mit Referenzsubstanzen erhaltene Ergebnisse;
- Prinzip und Einzelheiten der angewendeten Analysenmethode;
- für jeden Versuch: Temperatur, pH-Wert, Zusammensetzung des Puffers, eine Tabelle mit allen Konzentrations-Zeit-Daten;
- bei Reaktion pseudo-1. Ordnung die Werte für k_{obs} und $t_{1/2}$ einschließlich Berechnungsverfahren;
- bei einer Reaktion, die nicht pseudo-1. Ordnung entspricht, graphische Darstellungen der Logarithmen der Konzentrationen gegen die Zeiten;
- alle zur Interpretation der Ergebnisse erforderlichen Angaben und Beobachtungen.

3.2. Interpretation der Ergebnisse

Es kann möglich sein, annehmbare Werte für die Geschwindigkeitskonstanten (bei 25 °C) von Prüfsubstanzen zu berechnen. Vorausgesetzt, experimentelle Daten für die Aktivierungsenergie liegen bereits für ähnliche Stoffklassen vor und vorausgesetzt, die Annahme ist vernünftig, daß die Aktivierungsenergie der Prüfsubstanz von gleicher Größenordnung ist.

4.

LITERATUR

- (1) OECD, Paris 1981, Test guideline III — Decision of the Council C(81).30 Final.
 - (2) OECD, Paris 1981, Test guideline III — Decision of the Council C(81) 30 Final — reference 2.
-

Anlage

PUFFERMISCHUNGEN

A. CLARK UND LUBS

Die in diesen Tabellen aufgeführten pH-Werte wurden ausgehend von den Potentialmessungen unter Verwendung der Sørensen'schen Standardgleichungen (1909) errechnet. Die tatsächlichen pH-Werte liegen um 0,04 Einheiten über den Werten in dieser Tabelle.

Zusammensetzung

	<i>pH</i>
Kaliumhydrogenphthalat (0,1 mol/l) und HCl (0,1 mol/l) bei 20 °C	
2,63 ml HCl + 50 ml Phthalat auf 100 ml	3,8
Kaliumhydrogenphthalat (0,1 mol/l) und NaOH (0,1 mol/l) bei 20 °C	
0,40 ml NaOH + 50 ml Phthalat auf 100 ml	4,0
3,70 ml NaOH + 50 ml Phthalat auf 100 ml	4,2
Monokaliumphosphat (0,1 mol/l) und NaOH (0,1 mol/l) bei 20 °C	
23,45 ml NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml	6,8
29,63 ml NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml	7,0
35,00 ml NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml	7,2
H ₃ BO ₃ (0,1 mol/l) in KCl (0,1 mol/l) und NaOH (0,1 mol/l) bei 20 °C	
16,30 ml NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml	8,8
21,30 ml NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml	9,0
26,70 ml NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml	9,2

B. KOLTHOFF UND VLEESCHOUWER

Zusammensetzung

	<i>pH</i>
Monokaliumcitrat (0,1 mol/l) und NaOH (0,1 mol/l) bei 18 °C (kleine Thymolkristalle oder wenige Milligramm Quecksilberjodid hinzufügen, um Schimmelbildung zu vermeiden):	
2,0 ml NaOH + 50 ml Citrat auf 100 ml	3,8
9,0 ml NaOH + 50 ml Citrat auf 100 ml	4,0
16,3 ml NaOH + 50 ml Citrat auf 100 ml	4,2

C. SÖRENSEN

Borax (0,05 mol/l) und HCl (0,1 mol/l)

Zusammensetzung		pH			
ml Borax	ml HCl	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86

Borax (0,05 mol/l) und NaOH (0,1 mol/l)

Zusammensetzung		pH			
ml Borax	ml NaOH	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
9,00	1,00	9,36	9,42	9,18	8,94
8,00	2,00	9,50	9,57	9,30	9,02
7,00	3,00	9,68	9,76	9,44	9,12